

参 考 文 献

- 1 Cogdell R. The function of pigments in chloroplasts. In: Goodwin T W ed. Plant Pigments. London: Academic Press, 1988, 183 ~ 230
- 2 Kvinsky N I. Mechanism of inactivation of oxygen species by carotenoids. In: Simic M G, Nygaard O ed. Anticarcinogenesis and Radiation Protection. New York: Plenum Press, 1988, 4~ 46
- 3 Loeblich L A. Photosynthesis and pigments influenced by light intensity and Salinity in the halophilic *D. salina* (chlorophyta). J Mar Biol Ass UK, 1982, **62**: 493~ 508
- 4 Ben-Amotz A, Lers A, Avron M. Stereoisomers of carotene and phytoene in the alga *Dunaliella bardawil*. Plant Physiol, 1988, **86**: 1286~ 1291
- 5 Zecheister L. *Cis-trans* Isomeric Carotenoids Vitamins A and Arglpolyenes. New York: Academic Press, 1962, 46~ 57
- 6 Ben-Amotz A, Avron M. The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. Trends Biotechnology, 1990, **8**: 121 ~ 126
- 7 Ibrahim K, Jafferey N A, Zuberi S J. Plasma Vitamin A and Caroten levels in squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. Clin Oncol, 1997, **3**: 203~ 207
- 8 刘建国, 赵学武, 王玉君, 等 (Liu J G, Zhao X W, Wang Y J, et al). 胁迫条件下盐藻 β -胡萝卜素及其异构体积累的研究——盐度的影响. 海洋与湖沼 (Oceanologia et limnologia Sinica), 1994, **25** (1): 71~ 77
- 9 Goodwin T W. Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. New York: Academic Press, 1976. 209~ 219
- 10 Jimenez C, Pick U. Differential Reactivity of β -Carotene isomers from *Dunaliella bardawil* Toward Oxygen Radicals. Plant physiol, 1993, **101**: 385~ 390

Using HPLC to Investigate the Dynamic Rule of Accumulating β -Carotene Isomers in *Dunaliella salina* Under the Special Stress Conditions. WANG Yong, QIAN Kai-Xian (Department of Biological

Sciences and Technology, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China).

Abstract The method of high performance liquid chromatography (HPLC) was used to analyse the dynamic rule about accumulating β -carotene isomers in *Dunaliella salina* under the special stress conditions. The results show: 1. The strength of stress conditions is advantageous to accumulate *trans*-isomer, otherwise, decreasing the stress conditions advantage to accumulate *cis*-isomers. For example, under the conditions of 32 °C with light intensity 10 000 lx, salinity 18%, the amount of *trans*-isomer is most (2.593 mg/L), but the *cis*-isomers amount is most (0.630 mg/L) under 25 °C, indoor-nature light and salinity 24%. 2. The kind and amount of *cis*-isomers are different when the stress conditions are changed. After being cultured 30 days, *trans*-isomer and two *cis*-isomers were obtained under 25 °C, indoor nature light salinity 24%, but only *trans*-isomer and one *cis*-isomer were obtained, when 32 °C with 10 000 lx light intensity and salinity 18%. 3. Even though the stress conditions is the same, it is different of the isomers' kind and amount only when culturing time is changed. For example: under the conditions of 25 °C 10 000 lx, 18% salinity, only *trans*-isomer was found before culturing, after 8 days and 19 days, *trans*-isomer and two *cis*-isomer, after 34 days, *trans*-isomer and one *cis*-isomer were found.

Key words β -carotene isomer, high performance liquid chromatography (HPLC), β -carotene

淋巴细胞凋亡与 p53 蛋白表达关系的研究*

钟叔平

(汕头大学医学院生物化学教研室, 汕头 515031)

摘要 培养 B95-8 细胞, 分离 EB 病毒, 转染外周血和扁桃体淋巴细胞, 建立永生化的 LCLs 和 TLCL 细胞株; 带有 wt P₅₃ 基因的 LCLs 在 DNA 损伤剂——顺铂处理前未检出 p53 蛋白, 经顺铂处理后, LCLs 随作用时间延长细胞存活率明显下降、p53 蛋白水平升高、DNA 电泳显出梯状带; 含 mt P₅₃ 基因的淋巴瘤细胞在顺铂处理前可检出高浓度的 p53 蛋白, 经顺铂处理后, 细胞存活率与 p53 蛋白并无明显改变。这些结果表明: 顺铂引起细胞 DNA 损伤、激活 wt p53 蛋白的表达、继而 wt p53 蛋白又促进了 DNA 损伤细胞凋亡。

* 广东省高教厅自然科学重点资助项目 (1996-32); 李嘉诚科研基金资助项目 (9602)。

收稿日期: 1997-12-01, 修回日期: 1998-02-23

关键词 细胞凋亡, 顺铂, p53 蛋白, DNA, 损伤

学科分类号 Q24, Q51

细胞凋亡 (apoptosis) 或程序性细胞死亡 (programmed cell death) 是引起细胞“自杀”的一种积极的反应. 细胞凋亡的调节涉及众多基因. 一般认为, Bcl2 可抑制细胞凋亡促进细胞生存^[1]; Bax 属 Bcl2 家族的成员, Bax 可加速细胞死亡^[2]. Bcl2 与 Bax 的相互作用决定细胞生存、抑或通过凋亡作用而死亡^[2]. 肿瘤抑制子-p53 蛋白是细胞周期中重要的调节基因, 野生型 (wild type, wt) p53 蛋白具有抑制细胞生长和诱导 DNA 损伤细胞走向凋亡的功能; 突变型 (mutant type, mt) p53 蛋白却丧失此作用. 本文选用 EB 病毒转化的淋巴瘤细胞系 (lymphoblastoid cell line, LCL) 和 EB 病毒阳性的淋巴瘤细胞株为材料, 用化疗药物——顺铂作 DNA 损伤剂诱导细胞凋亡, 分析细胞凋亡与 p53 蛋白表达之间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料

细胞株: P₅₃ 基因突变型人直肠癌细胞株 SW480 (ATCC, CCL228, USA); 抗 p53 蛋白的单克隆抗体杂交瘤细胞株 pAb1801. B95-8、Ramos、Raji、BJAB、Molt4 细胞株.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: SW480 细胞培养参考文献 [3]. LCLs, Molt4, Raji, Ramos, BJAB 培养于 RPMI1640 中培养.

1.2.2 LCLs 细胞株的建立: 取肝素抗凝的外周血, 加入 Ficoll 梯度离心管中 (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) 分离淋巴细胞, 于含青、链霉素和 15% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中生长.

EB 病毒的分离: TPA (30 g/L) 处理 B95-8 细胞 6 d, 离心 16 000 g 5 min, 0.45 μ m 滤纸过滤培养液, 离心 140 000 g 60 min, 分离病毒粒子, 用无 TPA 的培养液仔细洗涤病毒粒子, 重悬浮在 1/50 培养液中, -80℃ 保存.

将 B95-8 细胞中分离的 EB 病毒转化外周血淋巴细胞 (或扁桃体组织细胞), 在 RPMI1640 中培养, 得永生淋巴瘤细胞系 LCLs 和 TLCL.

1.2.3 细胞凋亡的诱导: 在 LCLs、TLCL、BJAB、Ramos、Raji 和 Molt4 的细胞培养瓶中加入 DNA 损伤剂——顺铂至终浓度为 10 mg/L, 于不

同时间收获细胞, 苔酚蓝染色计数存活细胞数.

1.2.4 可溶性 DNA 片段的检测: 收集 1×10^7 培养细胞, PBS 洗涤二次, 细胞沉淀悬浮于裂解液 (5 mmol/L Tris pH 8.0, 20 mmol/L EDTA, 0.5% Triton X 100, 1 mmol/L PMSF) 中处理 20 min, 离心 16 000 g 20 min, 回收含可溶性 DNA 片段的上清液, 苯酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀, 沉淀所得 DNA 用含 RNase (100 mg/L) 的 TE 缓冲液重悬浮, 1.2% 琼脂糖电泳观察 DNA 片段.

1.2.5 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳和凝胶银染: 选用 10% 分离胶, 具体步骤见文献 [3].

1.2.6 免疫印迹: 参照文献 [3], 3% BSA 封闭, 一抗为 1:1000 稀释度的 pAb1801, 二抗为 1:2000 稀释度的羊抗人-HRP, ECL 反应液 (Amersham Co. USA) 显色、压片、观察结果.

2 结果

2.1 细胞存活率和可溶性 DNA

顺铂 (10 mg/L) 处理 LCLs、TLCLs、Raji、Ramos 细胞, 取处理不同时间的细胞, 计数其存活率. 图 1a 表明: 经顺铂处理的 LCL 和 TLCL 细胞

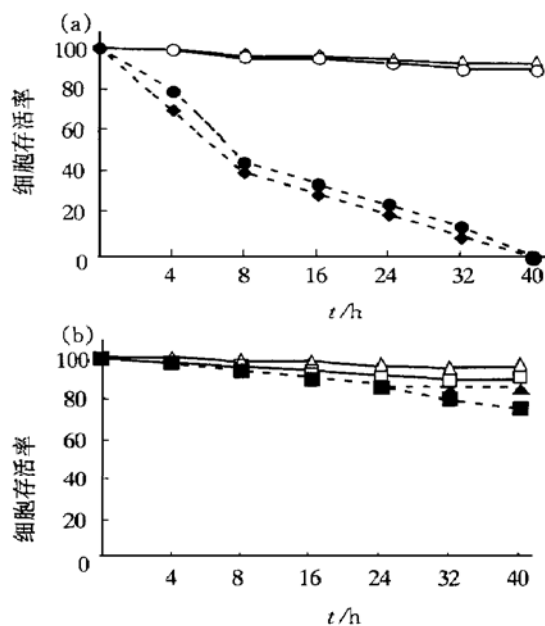


图 1 顺铂对细胞存活率的影响

(+): 含顺铂; (-): 无顺铂. (a) $\diamond$ — $\diamond$: LCL (-); $\blacklozenge$ — $\blacklozenge$: LCL (+); $\circ$ — $\circ$: TLCL (-); $\bullet$ — $\bullet$: TLCL (+). (b) $\triangle$ — $\triangle$: Raji (-); $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$: Raji (+); $\square$ — $\square$: Ramos (-); $\blacksquare$ — $\blacksquare$: Ramos (+).

存活率明显下降, 至 8 h, LCL 和 TLCL 细胞死亡数过 50% (图 1a). 带有 mt P_{53} 基因的淋巴瘤细胞株 Raji 和 Ramos 细胞与带 wt P_{53} 基因的 LCL 和 TLCL 细胞显然不同, 处理 8 h 后的细胞死亡数仅占 5% (图 1b).

抽提顺铂 (10 mg/L) 处理 24 h 后的培养细胞可溶性 DNA, 分析细胞凋亡产生的 DNA 片段. Raji 细胞未见 DNA 梯状带 (图 2, 带 1), LCL1、LCL2、TLCL (图 2, 带 2, 3, 4) 则分别出现凋亡细胞特征性的 DNA 梯状带, 以上结果表明: 带有 mt P_{53} 基因的 Raji、Ramos 细胞对顺铂具有抵抗作用.

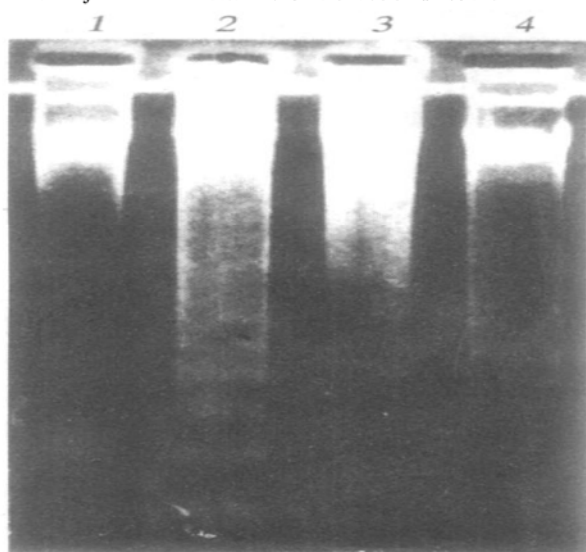


图 2 DNA 片段电泳分析

1: Raji; 2: LCL1; 3: LCL2; 4: TLCL.

2.2 顺铂诱导 $p53$ 蛋白的表达

取 LCLs、TLCL、BJAB、Molt4、Ramos、

Raji 细胞裂解液, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离各种细胞蛋白质, 比较各种淋巴细胞蛋白质电泳行为, 结果表明: 除 Molt4 在低分子量区多出一条蛋白带外 (图 3, 带 6), 其他各种细胞的蛋白质图谱 (图 3) 基本相同; 免疫印迹结果表明: BJAB、Ramos、Raji 均被抗人 $p53$ 蛋白氨基端的单克隆抗体 pAb1801 识别, 出现阳性反应, 其中尤以 Raji 阳性条带最强. 所用多株 LCLs、TLCL 和 Molt4 均无阳性 (图 4), 为了观察顺铂诱导 DNA 损伤后 $p53$ 蛋白表达水平的改变, 这六种细胞株分别用 DNA 损伤剂顺铂 (10 mg/L) 处理. 取处理不同时间的 LCLs 的 1×10^6 细胞制备裂解液, 观察顺铂诱导 $p53$ 蛋白的表达, 结果表明: 带有 wt P_{53} 基因的 LCLs 和 TLCL 细胞在顺铂作用下均可诱导 $p53$ 蛋白的表达, 其表达量随作用时间的延长

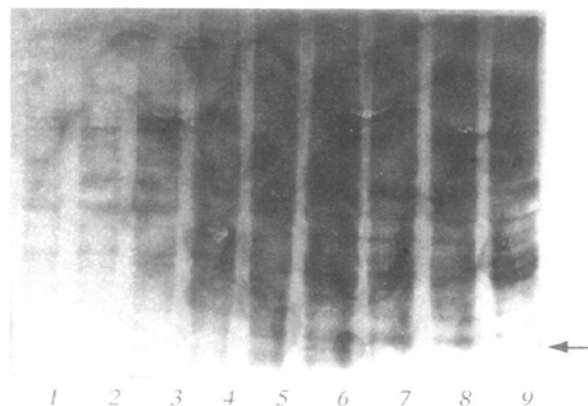


图 3 蛋白质 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

1~4: LCLs; 5: BJAB; 6: Molt4; 7: Ramos; 8: Raji; 9: TLCL.

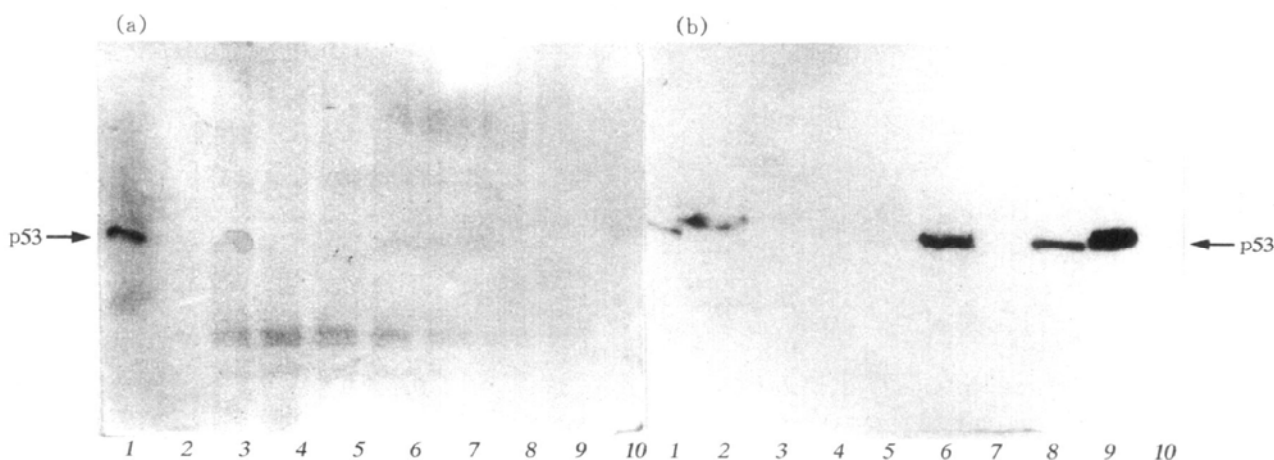


图 4 不同细胞裂解液 $p53$ 蛋白的免疫印迹分析

(a) 1: SW480; 2~9: LCL; 10: TLCL. (b) 1: SW480; 2: *E. coli*; 3~5: LCLs; 6: BJAB; 7: Molt4; 8: Ramos; 9: Raji; 10: TLCL.

而有所增加 (图 5), 而带有 mt P₅₃ 基因的 BJAB、Ramos、Raji、Molt4 细胞却未见 p53 蛋白质水平的改变。

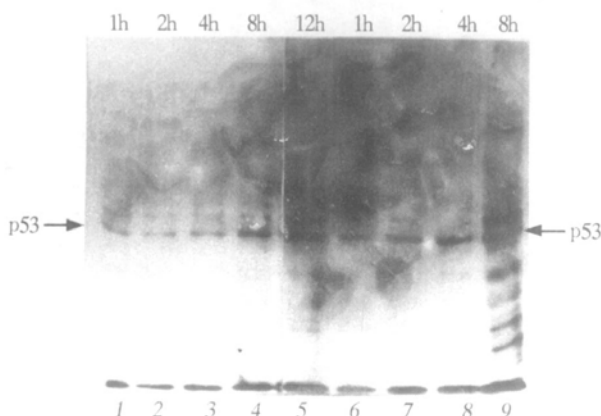


图 5 顺铂处理后 wt p53 蛋白的表达

1~5: LCL; 6~9: TLCL.

3 讨 论

顺铂为肿瘤治疗中一种常用的化疗药。它是有效的 DNA 损伤剂, 能引起细胞的 DNA 交联、叠加和 DNA 链断裂^[4]。在 DNA 损伤情况下, 大多数细胞都发生从 G₁~S 或从 G₂~M 的延迟。细胞周期检测点可阻止 G₁ 期受损伤的 DNA 复制或 G₂ 期受损伤的染色体分离, 以维持基因遗传的稳定^[5]。在淋巴细胞和纤维母细胞中, 通过辐射可快速诱导 GADD (growth arrest and DNA damage) 45 基因表达, 这种诱导反应随辐射剂量的不同而改变。GADD45 基因辐射诱导为 wt p53 依赖性^[5]。为了观察顺铂处理细胞后 wt p53 蛋白质水平的变化, 我们用 EB 病毒转化外周血淋巴细胞和手术切除的扁桃体淋巴细胞, 建立永生化的 LCL 和 TLCL 细胞系。结果表明: 带有 mt P₅₃ 基因的 EB 病毒阳性的 BJAB、Ramos、Raji 淋巴瘤细胞在顺铂处理前后细胞存活率和 p53 蛋白水平无明显改变; Molt4 虽带有 mt P₅₃ 基因, 但这种 mt P₅₃ 由于突变位点不同而影响了空间构象, 它不被 pAb1801 识别^[6]。带有 wt P₅₃ 基因的 LCL 和 TLCL 细胞在顺铂的作用下, 随作用时间的延长细胞存活率明显下降, p53 蛋白水平明显升高。这些结果表明: 顺铂引起的 DNA 损伤激活了 wt P₅₃ 的表达, 在 wt p53 蛋白的诱导下, DNA 损伤细胞走向凋亡以维持基因的遗传稳定; 这种 wt p53 依赖性的细胞凋亡, 在 P₅₃ 基因发生突变后 (如 Molt4, BJAB, Ramos, Raji 细胞) 则丢失。因此, 在临床肿瘤治疗的过程中, 对带有 wt P₅₃ 基因型的肿瘤患者选用顺铂进行

治疗, 可收到更好的疗效。

致谢 感谢湖南医科大学姚开泰教授对本文的指导。

参 考 文 献

- 1 Hockenbery D, Hunez G, Millman C, *et al.* Bcl-2 is an inner mitochondrial member protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 1990, **347** (): 334~336
- 2 Oltavi Z N, Millman C L, Korsmeyer S J, *et al.* Bcl-2 heterodimerizes in vivo a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 1993, **74** (): 609~610
- 3 钟叔平, 曹亮, 吴文翰 (Zhong S P, Cao L, Wu W H). p53 蛋白的免疫亲和层析纯化. *免疫学杂志 (J Immunology)*, 1997, **13** (2): 115
- 4 Fritsche M, Haessler C, Brandner G. Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damage agents. *Oncogene*, 1993, **8** (): 307~318
- 5 Kastan M B, Zhan Q M, El-Deiry W S, *et al.* A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*, 1992, **71** (): 587~597
- 6 Rodrigues S R, Rowan A, Smith M E F, *et al.* p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87** (): 7555~7559

Study of the Relation on Apoptosis and p53 Expression in Lymphocytes. ZHONG Shu-Ping (Department of Biochemistry, Shantou University Medical College, Shantou 515031, China).

Abstract Epstein-Barr Virus (EBV) is isolated from B95-8 cell line, the primary B lymphocytes from human blood and tonsil tissue are transfected with EBV in order to gain immortalized lymphoblastoid cell lines (LCLs) and tonsil lymphoblastoid cell lines (TLCL). The LCLs and TLCL contain wt p53 gene, and do not express p53 proteins before treatment with cisplatin. Cell viability are decreased, p53 proteins are accumulated, and DNA ladders appear in LCLs and TLCL with time extension after treating with 10 mg/L. Lymphoma cell lines (BJAB, Raji, Ramos, Molt4) carrying mutant p53 gene show accumulation of p53 protein before treatment with cisplatin. In paralleled experiment, the lymphoma cell lines appear relatively resistant to the doses of cisplatin. The results suggest that cisplatin cause DNA damage of LCLs and TLCL, activate wt p53 expression, and cells with DNA damage enter the pathway of apoptosis induced by wt p53.

Key words apoptosis, cisplatin, p53 protein, DNA, damage