

基于 p53 信号转导网络数学模型研究热疗联合放疗在 肿瘤治疗中的协同效应

孙廷哲*

(安庆师范大学生命科学学院, 安庆 246133)

摘要 基于 p53 信号转导网络数学模型研究温度和辐射在调控 p53 动力学行为过程中的协同效应。利用时滞微分方程构建 p53 动力学模型, 使用加速 τ -leap 算法进行随机模拟分析, 采用 Loewe 和 Bliss 协同指数计算协同性, 用 MATLAB 软件进行数值模拟。结果显示, 在较低温下, p53 脉冲的振幅和特征基音随温度发生转变。p53 脉冲的振幅和周期具有较大的变异性。在 39 °C 以下, p53 首个脉冲的振幅随温度升高而增加, 而 p53 的特征基音则随着温度升高而降低。较温和的高温环境 (≥ 41 °C) 则破坏了 p53 脉冲, p53 蛋白水平呈现持续累积。随着温度的升高, 自相关图谱中的周期行为逐渐消失。以 p53 的累积值和最大值作为评价指标, 温度和辐射剂量可产生显著的协同作用。另外, 温度对 p53 动力学的影响是可逆的。总之, 温度可显著影响 p53 的动力学特征。在肿瘤治疗中, 热疗亦可为放疗提供有益的帮助。

关键词 p53; 数学模型; 热疗; 放疗; DNA 损伤; 肿瘤

中图分类号 Q612 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2021)03-0361-10

doi: 10. 11665/j. issn. 1000-5048. 20210314

引用本文 孙廷哲. 基于 p53 信号转导网络数学模型研究热疗联合放疗在肿瘤治疗中的协同效应[J]. 中国药科大学学报, 2021, 52(3): 361–370.

Cite this article as: SUN Tingzhe. Mathematical modeling of the synergy between hyperthermia and radiotherapy in tumor treatment based on p53 signaling network[J]. J China Pharm Univ, 2021, 52(3): 361–370.

Mathematical modeling of the synergy between hyperthermia and radiotherapy in tumor treatment based on p53 signaling network

SUN Tingzhe*

School of Life Sciences, Anqing Normal University, Anqing 246133, China

Abstract The aim of the current study was to investigate the synergistic effect between temperature and irradiation on p53 dynamics using mathematical model in p53 signaling pathway. Delayed differential equations were used to construct the dynamic p53 model. The accelerated τ -leap stochastic simulation algorithm was used to analyze the stochastic behavior. Loewe and Bliss combination indexes were used to calculate the synergy. Numerical simulations were performed in MATLAB software. Results showed that at relatively lower temperatures, the amplitude and characteristic pitch of p53 pulses varied with changing temperatures. The amplitude and duration of p53 pulses were highly variable. At temperatures below 39 °C, the amplitude of the first p53 pulse was increased when temperature was elevated, whereas the characteristic pitch of p53 pulses was decreased with increasing temperature. Under mild hyperthermia (≥ 41 °C), p53 pulses were disrupted and p53 proteins became steadily accumulated. The patterns of periodicity in auto-correlation plot gradually vanished when the temperature was increased. With the metrics of cumulative and maximal p53 levels, there existed notable synergistic effects between the temperature and irradiation doses. In addition, the effect of temperature on p53 dynamics was reversible. To sum up, temperature could significantly affect dynamic p53 patterns. Radiotherapy may also benefit from hyperthermia in tumor treatment.

收稿日期 2021-01-07 * **通信作者** Tel: 18133007595 E-mail: confucian007@126.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 31971185); 安徽省高校优秀青年人才支持计划重点资助项目 (No. gxyqZD2020031)

Key words p53; mathematical model; hyperthermia; radiotherapy; DNA damage; tumor

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31971185) and the Key Projects for Outstanding Young Talents in Colleges and Universities of Anhui Province (No. gxyqZD2020031)

在对DNA损伤的应答中,维持基因组稳定性对多细胞生物至关重要。细胞内的信号转导网络受到不断变化的生理状态和环境因素影响,其中温度是一个重要因素。研究表明,细胞内的部分信号转导网络(如昼夜节律)具备补偿机制,可对温度变化不敏感^[1],而NF- κ B信号转导网络动力学特征则表现出对温度变化的较高敏感性^[2]。最近,Jentsch等^[3]通过单细胞荧光实验发现DNA损伤刺激下,p53信号网络对温度变化产生应答,其脉冲振幅和频率随温度变化,甚至发生由脉冲到非脉冲的转变。

转录因子p53是重要的网络节点,可对多种刺激产生响应,并诱导细胞产生一系列应答反应,如细胞周期阻滞、衰老或细胞凋亡^[4]。在生理状态下,细胞内的p53蛋白水平较低,这主要是通过一种E3泛素连接酶MDM2介导的p53降解实现的^[5]。*mdm2* mRNA又受到转录因子p53诱导,因此形成一条重要的负反馈环路^[6]。而PPM1D/Wip1介导的另一条负反馈环路同样影响p53的脉冲发生^[7]。p53蛋白介导的信号转导是一个动态过程,p53的动力学特性受到内源性和外源性刺激类型和总量的影响,进而调控细胞对刺激的应答,对细胞命运产生影响^[8]。在多数肿瘤细胞中都可以观察到p53蛋白的失活,这可以通过*TP53*基因突变、减弱的DNA结合能力或扩增p53的负调控因子MDM2/Wip1^[9]。功能性p53水平的不足将会产生药物抗性并与较低的生存率相关联^[10]。

在静息状态下,人体维持相对稳定的核心温度(约37℃)。然而,受环境温度影响,体表温度(尤其在肢端)可降低至约33℃^[11]。另外,体温也受到其他因素影响,如年龄、性别和运动状态,进而偏离静息体温^[12]。而在心血管疾病或感染、自身免疫类疾病诱发的发热状态下,由于正常血液传输和散热机制受阻,体内核心温度可能会大幅超过40℃^[13]。温度对机体的影响是多方面的,在分子水平上,温度可对酶活性产生影响。在细胞水平上,高热可对代谢、蛋白质合成等过程产生显

著影响^[14]。临床上,热疗辅助常规抗肿瘤疗法是一种常用的治疗手段。有临床证据表明,持续(超过1 h)40~42℃热疗结合放疗可有效地减小局部肿瘤体积,提高患者生存率^[15]。过热(hyperthermia)可对p53信号转导网络动力学产生显著影响^[3],但温度变化如何影响p53信号网络尚缺乏理论研究。

本文通过构建微分方程模型,结合随机模拟方法系统模拟了温度对p53动力学的影响。模型也模拟了细胞过热处理后,当温度降至正常体温时p53脉冲的重现。同时,本研究也揭示了温度与辐射剂量的协同效应。此协同性可能为热疗辅助放疗的有效性提供一种新的解释。

1 材料

1.1 软件

数值模拟使用美国MathWorks公司MATLAB软件实现(版本R2018b)。

2 方法

2.1 构建p53网络模型

基于之前的10变量p53网络模型^[16],描述p53通路对DNA损伤刺激的应答,形成时滞微分方程(表1)。电离辐射(ionizing radiation, IR)可诱导DNA双链断裂损伤(DNA double strand break, DSB)并磷酸化激活共济失调毛细血管扩张突变(ataxia-telangiectasia mutated, ATM)^[17]。将总ATM水平设为常量^[18]。活化的ATM(变量 ATM^*)可以磷酸化p53和MDM2,磷酸化的p53(变量 $P53p$)变得更加稳定而磷酸化的MDM2(变量 $MDM2p$)则加速降解^[19]。模型中整合了p53-MDM2^[6]和p53-Wip1-ATM^[7]两条负反馈环路,故p53蛋白(变量 $P53$),MDM2蛋白(变量 $MDM2$)和Wip1蛋白(变量 $WIP1$)蛋白计3个变量引入模型。考虑转录过程,*p53* mRNA分子(变量 $p53$),*MDM2* mRNA分子(变量 $mdm2$)和*Wip1* mRNA分子(变量 $wip1$)也予以考虑并整合入模型。过热状态下,细胞内Hsp70的

水平显著上升,作为分子伴侣抑制 p53 和 MDM2 的结合,从而提高 p53 的稳定性^[20]。通过运用 Arrhenius^[21]方程项,表示温度对 MDM2 降解 p53 的影响(表 1 和表 2)。基于最近的研究,磷酸化的 MDM2 与 p53 mRNA 的结合(变量 $p53MDM2p$)以及翻译增强效应也整合进入了模型(表 1)^[22]。出于

简化模型目的,未考虑所有分子的亚细胞定位。降解、磷酸化和去磷酸化反应使用质量作用(mass action)定律进行描述,较之 Michaelis-Menten 方程可显著减少未知参数个数。另外,Michaelis-Menten 方程较之质量作用定律具有更强非线性,更易产生复杂动力学行为^[16]。参数取值见表 2。

Table 1 Delayed differential equations for p53 model

No.	Equations
(1)	$\frac{dp53}{dt} = k_1 - k_2 \cdot p53 - k_f \cdot p53 \cdot MDM2p + k_r \cdot p53MDM2p$
(2)	$\frac{dmdm2}{dt} = k_3 - k_4 \cdot mdm2 + k_5 \cdot [P53p(t - \tau_1)]^4 / ([P53p(t - \tau_1)]^4 + K_1^4)$
(3)	$\frac{dwip1}{dt} = k_6 - k_7 \cdot wip1 + k_8 \cdot [P53p(t - \tau_2)]^4 / ([P53p(t - \tau_2)]^4 + K_2^4)$
(4)	$\frac{dP53}{dt} = k_9 \cdot p53 + k_c \cdot p53MDM2p - k_{10} \cdot P53 - k_{11} \cdot MDM2 \cdot P53 - k_{12} \cdot ATM^* \cdot P53 + k_{13} \cdot WIP1 \cdot P53p$
(5)	$\frac{dP53p}{dt} = k_{12} \cdot ATM^* \cdot P53 - k_{13} \cdot WIP1 \cdot P53p - k_{14} \cdot MDM2 \cdot P53p$
(6)	$\frac{dMDM2}{dt} = k_{15} \cdot mdm2(t - \tau_3) - k_{16} \cdot MDM2 - k_{17} \cdot ATM^* \cdot MDM2 + k_{18} \cdot WIP1 \cdot MDM2p$
(7)	$\frac{dMDM2p}{dt} = k_{17} \cdot ATM^* \cdot MDM2 - k_{18} \cdot WIP1 \cdot MDM2p - k_{19} \cdot MDM2p - k_f \cdot p53 \cdot MDM2p + k_r \cdot p53MDM2p$
(8)	$\frac{dWIP1}{dt} = k_{20} \cdot wip1(t - \tau_4) - k_{21} \cdot WIP1$
(9)	$\frac{dATM^*}{dt} = k_{22} \cdot \frac{DSB}{DSB + K_3} \cdot ATM + k_{23} \cdot ATM^* \cdot ATM - k_{24} \cdot WIP1 \cdot ATM^* - k_{25} \cdot ATM^*$
(10)	$\frac{dp53MDM2p}{dt} = k_f \cdot p53 \cdot MDM2p - k_r \cdot p53MDM2p$

The total level of ATM was held constant^[18], $ATM + ATM^* = 1$. $k_{11} = 4 \cdot e^{-0.6(T - 33)}$, where T is the temperature. Details for variables and kinetic parameters were shown in Table 2.

2.2 随机模拟

由于模型中最大分子个数超过 10^5 ,因此使用加速 τ -leap 算法并引入时滞项^[23]。在随机模拟过程中,所有 τ_i ($i=1, 2, 3, 4$) 均围绕参考值产生 $\pm 3\%$ 扰动。

2.3 协同性

温度和辐射剂量的协同通过 Loewe 和 Bliss 协同指数 (combination indexes, CI) 进行度量^[24]。Loewe 协同指数 (CI_{Loewe}) 定义为:

$$CI_{Loewe} = \frac{d_1}{GC_x^{(1)}} + \frac{d_2}{GC_x^{(2)}} \quad (1)$$

其中 d_1 (温度) 和 d_2 (DNA 双链断裂 DSB) 指等效线图 (isobologram) 中达到 40% 最大效应时所对应的剂量。 $GC_x^{(1)}$ 和 $GC_x^{(2)}$ 分别代表单独变化温度或 DSB 的取值并使效应值增加 40% 时,所需的温度或

DSB 量。在等效线图中,若图像呈下凸形态,表明系统存在协同性。

Bliss 协同指数 (CI_{Bliss}) 定义为:

$$CI_{Bliss}(x, y) = \frac{R_1(x) + R_2(y) - R_1(x)R_2(y)}{R_{12}(x, y)} \quad (2)$$

其中 $R_1(x)$, $R_2(y)$ 和 $R_{12}(x, y)$ 分别指温度为 x 、DNA 双链断裂数量为 y , 温度-DNA 双链断裂组合剂量为 $[x, y]$ 时, p53 效应的相对变化。p53 的效应为总 p53 蛋白水平在时间上的积分和总 p53 蛋白的最大值。

3 结果

3.1 温度对 p53 脉冲的影响

此模型主要包含两条负反馈环路 (p53-MDM2 和 p53-Wip1-ATM)。模型中, 温度 (T) 影响 MDM2

Table 2 Descriptions and values for variables or parameters in p53 model

Variable or parameter	Value	Description	Reference
$p53$	0.200 0	Initial concentration of p53 mRNA	[16]
$mdm2$	0.100 0	Initial concentration of MDM2 mRNA	[16]
$wip1$	0.020 0	Initial concentration of Wip1 mRNA	[16]
$P53$	0.001 7	Initial concentration of p53 protein	Estimated
$MDM2$	0.588 2	Initial concentration of MDM2	[16]
$WIP1$	0.004 0	Initial concentration of Wip1	[16]
ATM	1	Unphosphorylated ATM	[16]
k_1	0.000 5	Production rate of p53 mRNA	[16]
k_2	0.002 5	Degradation rate of p53 mRNA	[25]
k_3	0.001	Production rate of MDM2 mRNA	[16]
k_4	0.01	Degradation rate of MDM2 mRNA	[26]
k_5	0.005	p53 dependent $mdm2$ transcription rate	[16]
k_6	0.000 5	Production rate of Wip1 mRNA	[16]
k_7	0.025	Degradation rate of Wip1 mRNA	[16]
k_8	0.008	p53 dependent $wip1$ transcription rate	[16]
k_9	0.005	Translation rate of p53	[16]
k_{10}	0.017	Degradation rate of p53	[27]
k_{11}	Varied	MDM2 dependent p53 degradation	/
k_{12}	3.5	ATM* induced p53 phosphorylation	[16]
k_{13}	0.25	Wip1 induced P53p dephosphorylation	[16]
k_{14}	0.02	MDM2 dependent P53p degradation	[16]
k_{15}	0.1	Translation rate of MDM2	[16]
k_{16}	0.017	Degradation rate of MDM2	[27]
k_{17}	0.4	ATM* induced MDM2 phosphorylation	[16]
k_{18}	0.5	Wip1 induced MDM2p dephosphorylation	[16]
k_{19}	0.135	Degradation rate of MDM2p	[16]
k_{20}	0.01	Translation rate of Wip1	[16]
k_{21}	0.005	Degradation rate of Wip1	[28]
k_{22}	0.001 5	DSB induced ATM activation rate	Estimated
k_{23}	0.005	ATM autoactivation rate	[16]
k_{24}	0.4	Wip1 induced ATM* dephosphorylation	Estimated
k_{25}	0.005	ATM* basal inactivation rate	[16]
k_f	0.5	p53 mRNA MDM2p association rate	[22]
k_r	0.08	p53-MDM2p dissociation rate	[22]
k_c	0.25	p53-MDM2p translation rate	[16]
K_1	0.25	EC ₅₀ for induced $mdm2$ transcription	[16]
K_2	0.25	EC ₅₀ for induced $wip1$ transcription	[16]
K_3	500	Activation scaling parameter	Estimated
τ_1	30	$mdm2$ transcriptional delay	[29]
τ_2	30	$wip1$ transcriptional delay	[29]
τ_3	10	$mdm2$ translation delay	[29]
τ_4	10	$wip1$ translation delay	[29]

The first and second order rate constants take the unit min^{-1} and $\text{L}/(\mu\text{mol} \cdot \text{min})$, respectively. The unit for production rate is $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$. Initial conditions for p53 protein ($P53$), k_{22} , k_{24} and K_3 were estimated to match experimentally observed p53 dynamics [3]. The time takes the unit of min. Initial concentrations for phosphorylated p53 ($P53p$), phosphorylated MDM2 ($MDM2p$), active ATM (ATM^*) and p53 mRNA-MDM2p complex ($p53MDM2p$) were all set to be 0

和 p53 的结合, 即 MDM2 对 p53 的降解作用(表达式见表 1)。用 10 Gy 辐射刺激系统, 模拟 Jentsch 等^[3]的实验条件, 方程(9)中初始 DSB 取值设定为 300, 即依据文献报道 1 Gy 辐射剂量平均产生 30 个 DNA 双链断裂损伤^[30]。当温度设置为 33 °C 时, 总 p53 蛋白(磷酸化和未修饰 p53 总和)呈现持续的无衰减脉冲, 脉冲的周期约为 5.9 h(图 1-A)。当增加温度至 35 °C 和 37 °C 时, 持续的脉冲仍能被观测到。注意到随着温度的升高, p53 首个脉冲的振幅逐渐增加, 同时持续脉冲的周期进一步缩短(图 1-C), 模拟的脉冲周期与 Jentsch 等^[3]的实验结果一致。值得注意的是, 当继续增加温度至 39 °C, 首个脉冲的振幅进一步增加。系统虽在 24 h 内进行

持续脉冲, 但脉冲的振幅呈现逐渐衰减趋势(图 1-C)。注意到 p53 首个脉冲的出现时间随着温度的增加而逐渐加速, 表现为脉冲峰值的提前(图 1-B)。当温度增加到 41 °C 时, p53 的持续脉冲完全消失, p53 蛋白水平在首个脉冲回落以后呈持续增长的趋势(图 1-C)。综上所述, 温度对 p53 的动力学特征产生影响, 过热状态下 p53 的脉冲将被破坏。在 Jentsch 等^[3]的实验中, 当温度达到 41 °C 时, 10 h 后 p53 的水平具有明显的下降趋势。另外, 信号转导网络中的生化反应发生本身是一个随机过程^[28], 需要进行随机模拟。因此, 后续将对模型进行一定的修正, 从而更好拟合。

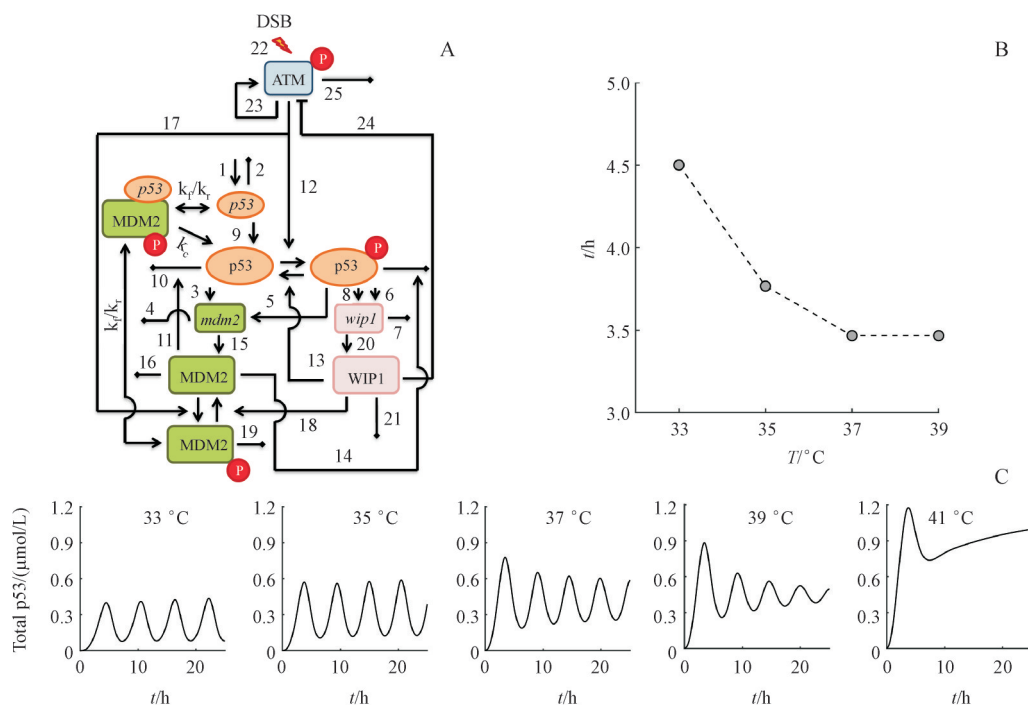


Figure 1 Effect of temperature on p53 pulses

A: Schematic diagram for p53 signaling network. Arrows indicate activation whereas blunt arrows denote inhibition or degradation; B: Peaking time for the first p53 pulses with increasing temperature; C: Dynamics of total p53 levels in response to increasing temperature

3.2 随机模拟重现 p53 的动力学特征

如上所述, 在 41 °C 过热处理下, 确定性常微分方程中总 p53 的水平在 10 h 后未有下降趋势。为修正此不足, 在随机模拟中, 引入 DNA 损伤修复作用。根据 Mönke 等^[31]报道, 将模型中 DSB 修复设置为 $(N_s - N_b) e^{-r} + N_b$, 其中 N_s 为辐射诱导 DSB 数量(即 30 DSB/Gy), N_b 为细胞中本底 DSB 数量。模型中设定为 $N_b = 3$, $r = 0.004$ 。将 DNA 损伤修复

过程整合入模型后, 给予 10 Gy 辐射刺激(计 300 DSB), 在 41 °C 下, 发现在此 25 h 观察窗口内的晚期, p53 水平即总 p53 分子数逐渐下降(图 2-A)。由于辐射诱导的 DSB 被不断修复, 因此 DSB 对 ATM 活化的作用减弱, 进而导致 41 °C 下后期 p53 水平降低(图 2-A)。值得注意的是, 即使未予外源性辐射刺激(0 Gy), 较之 33 ~ 39 °C, 在 41 °C 时, 细胞中的 p53 水平也呈现较为明显的上升(图 2-A)。

此模拟结果与 Jentsch 等^[3]的实验结果是吻合的。另外,通过基音试别(Pitch detection)计算 p53 脉冲特征基音所在位置。结果显示,在 33 °C 时, p53 首个脉冲出现较 37 °C 晚,而 39 °C 时, p53 首个脉冲基音则较之 37 °C 时更早出现(图 2-B)。虽然从中位数水平可比较基音出现的时间次序,但总体而言,各个温度下 p53 第一个脉冲基音分布具有较大的重叠。另外, p53 第 2 和第 3 个脉冲的基音分布特征与第一个脉冲具有相似随温度变化的趋势(图

2-B)。脉冲的振幅随温度的变化趋势如图 2-C 所示。对 p53 的首个脉冲而言,温度从 33 °C 增加到 37 °C,振幅随温度升高而增大。而 39 °C 时,首个脉冲的振幅和 37 °C 比未见明显增加(图 2-C)。而对于第 2 和第 3 个 p53 脉冲,温度对脉冲幅度的影响明显减弱(图 2-C)。计算 500 组随机模拟中不同时间点的相关系数以进一步阐明 p53 脉冲随温度的变化。结果显示,时间点相关系数的特征随温度发生变化。在 33 ~ 37 °C 下,可以观察到较为明显

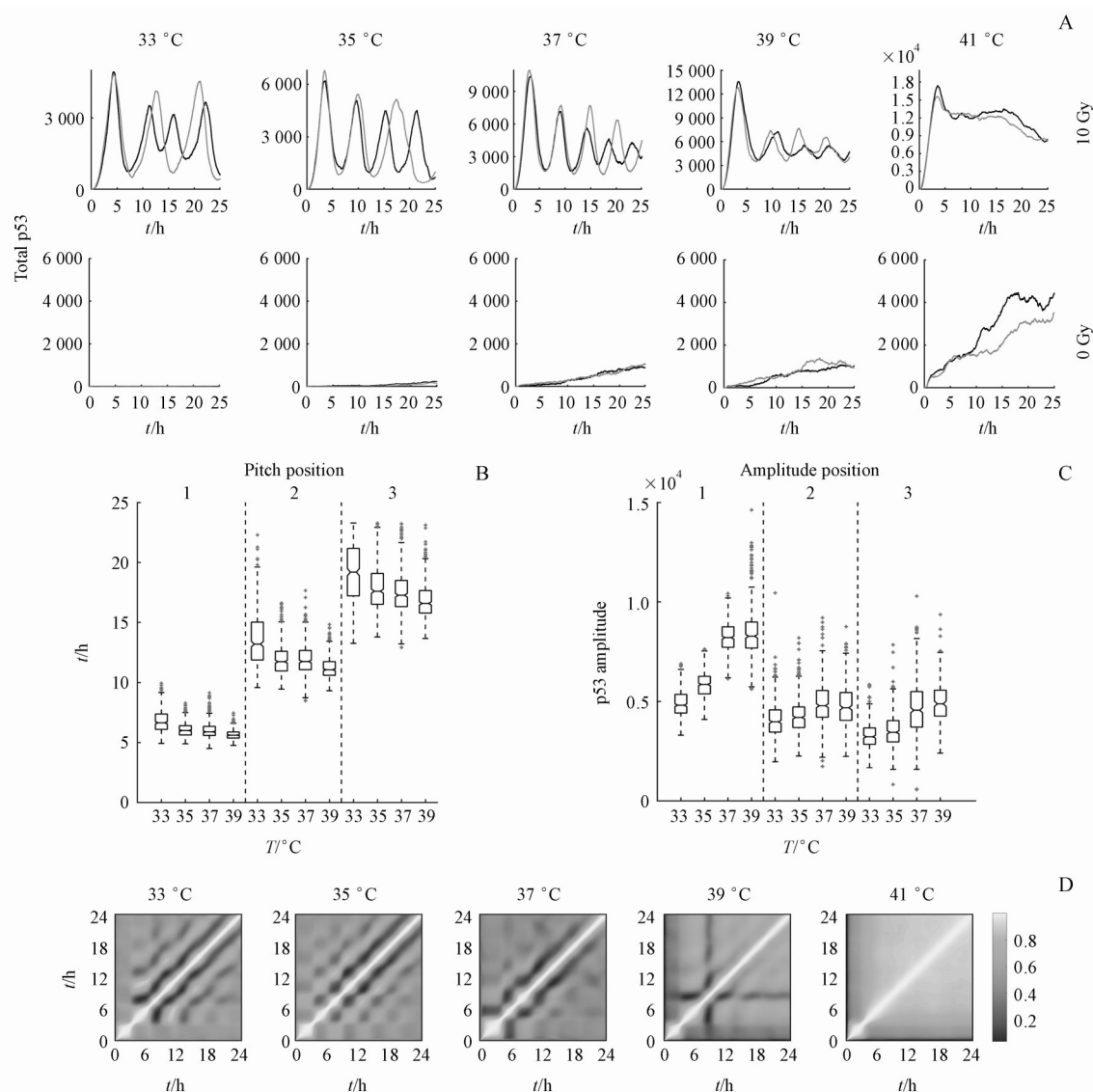


Figure 2 Characteristics of p53 pulses are varied with changing temperature

A: Dynamics of p53 with changing temperature in non-irradiated (0 Gy) and irradiated cells (10 Gy) during 25 hours. Two representative stochastic trajectories are shown as black and gray curves. DSB=3 when cells were non-irradiated. The unit is the molecular number; B: Pitch distributions for first three p53 pulses with different temperatures. The IR dose is 10 Gy; C: Distributions of amplitudes for first three p53 pulses for different temperatures; D: Self-correlation for p53 dynamics for different temperatures challenged by 10 Gy IR. Each point in the graph represents the Pearson correlation coefficient for p53 levels at two different time points except for points along the diagonal. The number of replicates is 500 in stochastic simulations

的周期性特征,而在 41 °C 时,周期性特征则基本消失(图 2-D)。值得注意的是,在 41 °C 时,p53 蛋白水平的强相关性较之在 33 ~ 39 °C 时显著延长,表明细胞在过热条件下,早期给予强刺激能够保证细胞在较晚时期仍具有较强应答。这些结果表明,随机模拟结合 DNA 损伤修复可以更好的模拟温度对 p53 动力学特征的影响。

3.3 温度和辐射刺激产生协同性

温度可以影响 p53 的动力学形态,进一步,通过等效线图绘制和计算 Bliss 协同指数探索温度影响 p53 信号转导的潜在意义。首先运用累积 p53 水平作为系统反应指标,计算 Bliss 协同指数。结

果显示,温度和 DSB 刺激产生了协同效应($CI_{Bliss} < 1$,图 3-A)。协同性的变化受到温度和 DSB 数量的影响,其中温度的影响更为显著,表现为 Bliss 协同指数沿温度升高方向快速下降(图 3-A)。若以最大 p53 蛋白水平作为系统反应指标,也得到了类似的变化趋势(图 3-B)。进一步,利用 Loewe 等效线图研究温度和辐射刺激的协同作用。Loewe 等效线图显示,温度和 DSB 数量同样产生了协同效应(图 3-C)。以最大 p53 蛋白水平作为反应指标的等效线图同样表明温度和辐射刺激两者间的协同效应(图 3-D)。

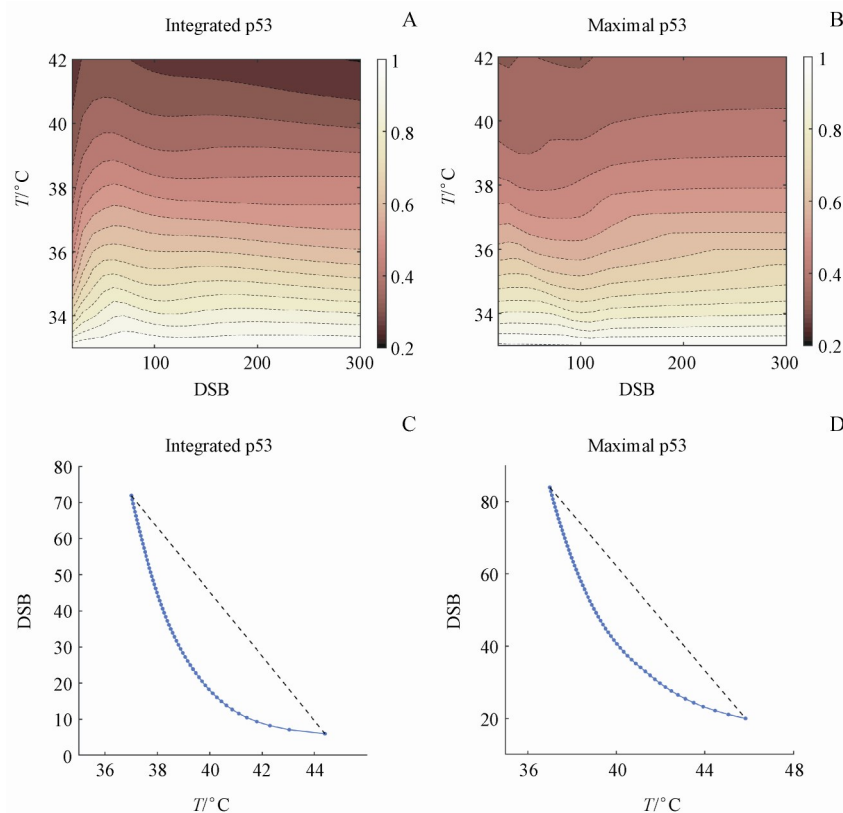


Figure 3 Synergy between temperature and irradiation-induced DNA damage

A: Calculation of Bliss combination indexes between temperature and DNA double strand break (DSB) numbers using temporal integrated p53 levels as the response metric; B: Bliss combination indexes for temperature and DSB numbers using maximal p53 levels as the response; C: Isobologram for integrated p53 responses with respect to DSBs and temperature; D: Isobologram for maximal p53 responses with respect to DSBs and temperature

从 p53 的累积值响应平面上,可以观察到当温度较低时,累积 p53 水平沿 DSB 数量的增加方向上升缓慢;而当温度增高时,辐射刺激的增加可以更为显著提升累积 p53 水平(图 4-A)。p53 最大值的响应平面也具有类似的趋势(图 4-B)。以上分析结果表明,温度可以增强 p53 对辐射刺激的应答,同时

过热状态可有效引发温度与辐射刺激的协同效应。

3.4 模拟 p53 对温度应答的可逆性

为进一步模拟实验中发现的 p53 对温度应答的可逆性^[3],首先设定模型初始温度为 41 °C。在 6 h 后,重新设定模型中系统温度为 37 °C。随机模拟结果显示,总 p53 蛋白水平首先迅速上升并达到

峰值(图 5-A)。如上所述,若系统温度持续设为 41 °C, p53 将不会出现后续脉冲(图 2)。但 6 h 后降低系统温度至生理温度 37 °C, 模拟显示经历短暂时滞后, p53 脉冲重新出现。后续 p53 脉冲持续时间可能较长, 也可能迅速衰减(图 5-A)。就群体水平而言, 总 p53 蛋白水平首先经历急速上升过程,

达到峰值后下降。在温度降至 37 °C 后, p53 的脉冲重现, 但其脉冲峰值随时间不断衰减, 直至 p53 脉冲消失(图 5-B)。500 组随机模拟结果表明, 降低温度至 37 °C 后细胞会重启 p53 脉冲(图 5-C)。以上模拟结果显示, p53 脉冲对温度变化具有可逆性, 与 Jentsch 等^[3]的实验结果一致。

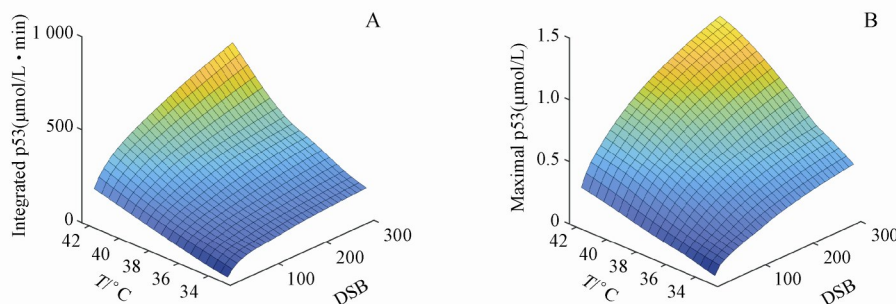


Figure 4 Response surface of p53 features to temperature and DSB numbers

A: Changes of integrated p53 with respect to varying temperature and DSB numbers; B: Changes of maximal p53 with respect to varying temperature and DSB numbers

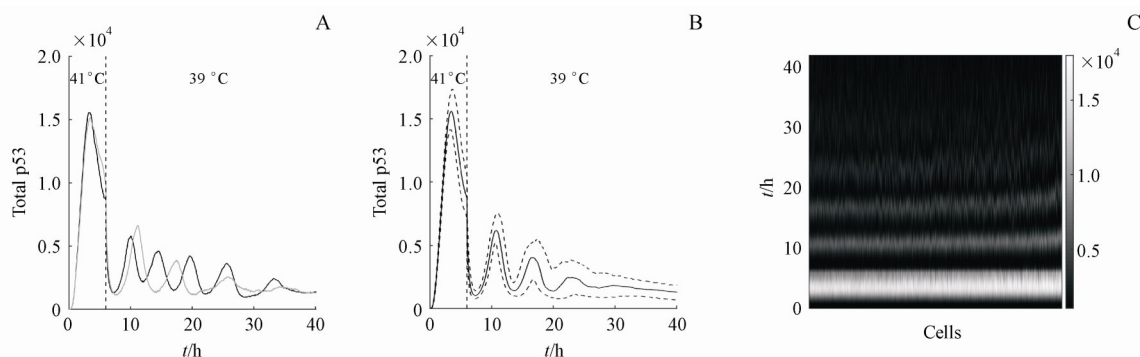


Figure 5 Dynamical p53 response to hyperthermia is reversible

A: Stochastic simulations identify the dynamic response of total p53 protein levels to temperature changes. IR = 10 Gy. The initial temperature is 41 °C. After 6 hours, the temperature is lowered to 37 °C. The vertical dashed line is a guide for the 6 h. Two representative stochastic trajectories are shown as black and gray curves. The unit is the molecular number; B: p53 response to temperature changes at populations. The solid black curve denotes the median responses, whereas the dashed black curves represent 25% and 75% quantile, respectively. The distance between the upper and lower dashed lines indicates the interquartile range. The unit is the molecular number; C: 500 stochastic trajectories are represented in a heatmap

4 讨论

p53 信号转导网络介导的信息传递过程是机体对环境刺激应答的重要环节。为了探讨温度对 p53 动力学性质的影响, 本研究构建了 p53 信号通路常微分方程模型。对微分方程的数值求解表明电离辐射刺激下, p53 的动力学形态随温度增加发生转变, 由脉冲转变为持续累积。同时在 33 °C~39 °C 下, p53 脉冲的振幅和周期分布也和温度变化具有强相关性。p53 的脉冲也具有一定的异质性

(heterogeneity)。模拟结果揭示温度对 p53 动力学形态调控的生理学意义, 即合适的温度和辐射刺激组合具有很强的协同效应, 能有效的增强系统中 p53 的应答反应。p53 的脉冲周期^[32]和持续累积的幅度^[33]是对刺激信号的重要编码, 直接对细胞命运产生决定性影响。因此, 温度对 p53 动力学形态的影响将直接关系到细胞的命运选择。p53 对温度变化的敏感性特征表明 p53 信号网络并不具有温度代偿机制, 这与最近关于 NF-κB 的发现

相类似^[2]。在 NF- κ B 的网络中,环境温度信息被编码成 RelA 振荡的频率,通过 RelA 的核转位影响下游基因表达,从而形成对温度的应答^[2]。因此,温度依赖的 p53 动力学性质变化可能会诱导差异化基因表达,进而影响下游细胞反应。温度影响的 p53 下游靶基因表达可能只限于早期^[3]。模型模拟显示 p53 首个脉冲表现出对温度的强敏感性,而后续脉冲对温度的响应会逐渐减弱。此结论为 Jentsch 等^[3]的实验发现提供一个可能的解释。进一步的实验和模型研究可能会更好的揭示温度对基因表达时程的影响。

在过热条件下,p53 脉冲消失,在一定时间内 p53 呈持续累积的动力学行为。持续的 p53 累积可能会诱导高水平的关键靶基因表达(例如 *CDKN1A/p21*)从而导致细胞周期阻滞或衰老^[34]。因此,p53 动力学反应的可逆性至关重要。在过热条件下,持续累积的 p53 可以诱发暂时的细胞周期阻滞以修复损伤 DNA,维持基因组稳定性。而当细胞恢复至生理温度后,p53 脉冲将重现并保证细胞重新进入细胞周期,维持细胞更新及稳态。利用 MDM2 小分子抑制剂 Nutlin-3 改变 p53 动力学形态,Purvis 等^[35]发现脉冲形态或持续高水平表达的 p53 蛋白对细胞命运具有显著影响,p53 脉冲促进细胞生存而持续高水平 p53 表达则诱导永久性细胞周期阻滞。较低温度可诱发 p53 脉冲而较高温度则会促使 p53 蛋白维持高表达状态,这与不同剂量 Nutlin-3 对 p53 动力学的影响相似^[3]。所以,温度可模拟抑癌小分子 Nutlin-3 改变 p53 动力学形态进而对细胞命运产生影响。

热疗辅助放疗已被广泛用于临床肿瘤治疗,且此组合疗法具有不良反应小的优点^[36]。但在分子水平上,热疗(过热状态)是如何影响肿瘤治疗的效果仍旧是一个未解决的问题。通过计算 Bliss 协同指数和绘制 Loewe 等效线图发现,温度和辐射刺激产生了协同效应。在适度过热条件下,温度和辐射刺激的协同效应显著增强。过热状态通过抑制 MDM2 对 p53 的降解,削弱 p53-MDM2 负反馈对 p53 的负向调控作用,从而诱导 p53 水平的升高。另外,温度对协同效应的影响可能更高效,表现为 Bliss 协同指数图中 CI_{Bliss} 沿着温度升高方向急剧降低。所以,热疗辅助放疗中设置适当的温度将更有利于产生高协同效应。但同时应注意到,

在一定的范围内,温度和辐射刺激的协同效应较弱(如低于生理温度区域)。此分析表明运用合适的过热温度辅助放疗才可能引起强协同效应,进而提高肿瘤治疗的效果。但本研究所揭示的协同效应依赖于细胞中存在野生型或功能型 p53 蛋白。若 *TP53* 发生突变以致失活,或负调控蛋白 MDM2 在肿瘤中过表达^[37],那么温度的协同效应可能不再适用。在 *TP53* 突变细胞中的进一步实验和理论研究将有助于解决这一问题。

此模型仍有不足,如随机模拟过程中主要考虑了内源性噪声(intrinsic noise),未对模型初值和参数进行随机化,而初值和参数的随机化将更多的引入外源性噪声(extrinsic noise)^[38]。外源性噪声的引入可能会更好的拟合实验数据。本模型仅考虑温度对 p53 蛋白降解的影响,其他机制的发现将有助于提高模型的精度。总之,此模型模拟了温度对 p53 的动力学形态影响,揭示了温度和辐射刺激的协同效应,为热疗辅助放疗提供了一个有益的理论参考。

致谢:穆丹老师帮助本论文顺利完成。

References

- [1] Hastings JW, Sweeney BM. On the mechanism of temperature independence in a biological clock[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1957, **43**(9):804-811.
- [2] Harper CV, Woodcock DJ, Lam C, et al. Temperature regulates NF- κ B dynamics and function through timing of A20 transcription[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, **115**(22):E5243-E5249.
- [3] Jentsch M, Snyder P, Sheng CB, et al. p53 dynamics in single cells are temperature-sensitive[J]. *Sci Rep*, 2020, **10**(1):1481.
- [4] Batchelor E, Loewer A. Recent progress and open challenges in modeling p53 dynamics in single cells[J]. *Curr Opin Syst Biol*, 2017, **3**:54-59.
- [5] Bieganski KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, **14**(5):359-370.
- [6] Wu X, Bayle JH, Olson D, et al. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop[J]. *Genes Dev*, 1993, **7**(7a):1126-1132.
- [7] Batchelor E, Mock CS, Bhan I, et al. Recurrent initiation: a mechanism for triggering p53 pulses in response to DNA damage[J]. *Mol Cell*, 2008, **30**(3):277-289.
- [8] Marcel V, van Long FN, Diaz JJ. 40 years of research put p53 in translation[J]. *Cancers*, 2018, **10**(5):152.
- [9] Tang QS, Su ZY, Gu W, et al. Mutant p53 on the path to metas-

- tasis[J]. *Trends Cancer*, 2020, **6**(1):62-73.
- [10] Gurpinar E, Vousden KH. Hitting cancers' weak spots: vulnerabilities imposed by p53 mutation[J]. *Trends Cell Biol*, 2015, **25**(8):486-495.
- [11] Sund-Levander M, Forsberg C, Wahren LK. Normal oral, rectal, tympanic and axillary body temperature in adult men and women: a systematic literature review[J]. *Scand J Caring Sci*, 2002, **16**(2):122-128.
- [12] Byrne C, Lim CL. The ingestible telemetric body core temperature sensor: a review of validity and exercise applications[J]. *Br J Sports Med*, 2007, **41**(3):126-133.
- [13] Guilherme L, Kalil J. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: cellular mechanisms leading autoimmune reactivity and disease[J]. *J Clin Immunol*, 2010, **30**(1):17-23.
- [14] Ó' Fágáin C. Enzyme stabilization—recent experimental progress[J]. *Enzym Microb Technol*, 2003, **33**(2/3):137-149.
- [15] Pelaez F, Manuchehrabadi N, Roy P, et al. Biomaterial scaffolds for non-invasive focal hyperthermia as a potential tool to ablate metastatic cancer cells[J]. *Biomaterials*, 2018, **166**:27-37.
- [16] Sun TZ, Cui J. A plausible model for bimodal p53 switch in DNA damage response[J]. *FEBS Lett*, 2014, **588**(5):815-821.
- [17] Tanaka T, Halicka HD, Traganos F, et al. Induction of ATM activation, histone H2AX phosphorylation and apoptosis by etoposide: relation to cell cycle phase[J]. *Cell Cycle*, 2007, **6**(3):371-376.
- [18] Hirai Y, Hayashi T, Kubo Y, et al. X-irradiation induces up-regulation of ATM gene expression in wild-type lymphoblastoid cell lines, but not in their heterozygous or homozygous Ataxia-telangiectasia counterparts[J]. *Jpn J Cancer Res*, 2001, **92**(6):710-717.
- [19] Hafner A, Bulyk ML, Jambhekar A, et al. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, **20**(4):199-210.
- [20] Walerych D, Olszewski MB, Gutkowska M, et al. Hsp70 molecular chaperones are required to support p53 tumor suppressor activity under stress conditions[J]. *Oncogene*, 2009, **28**(48):4284-4294.
- [21] Arrhenius S. Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren[J]. *Z Physik Chem*, 1889, **4**:226-248.
- [22] Gajjar M, Candeias MM, Malbert-Colas L, et al. The p53 mRNA-Mdm2 interaction controls Mdm2 nuclear trafficking and is required for p53 activation following DNA damage[J]. *Cancer Cell*, 2012, **21**(1):25-35.
- [23] Chatterjee A, Vlachos DG, Katsoulakis MA. Binomial distribution based tau-leap accelerated stochastic simulation[J]. *J Chem Phys*, 2005, **122**(2):024112.
- [24] Fouquier J, Guedj M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape[J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2015, **3**(3):e00149.
- [25] Hsing A, Faller DV, Vaziri C. DNA-damaging aryl hydrocarbons induce Mdm2 expression via p53-independent post-transcriptional mechanisms[J]. *J Biol Chem*, 2000, **275**(34):26024-26031.
- [26] Ju J, Schmitz JC, Song B, et al. Regulation of p53 expression in response to 5-fluorouracil in human cancer RKO cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, **13**(14):4245-4251.
- [27] Mayo LD, Dixon JE, Durden DL, et al. PTEN protects p53 from Mdm2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy[J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**(7):5484-5489.
- [28] Rossi M, Demidov ON, Anderson CW, et al. Induction of PPM1D following DNA-damaging treatments through a conserved p53 response element coincides with a shift in the use of transcription initiation sites[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, **36**(22):7168-7180.
- [29] Ma L, Wagner J, Rice JJ, et al. A plausible model for the digital response of p53 to DNA damage[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, **102**(40):14266-14271.
- [30] Vilenchik MM, Knudson AG. Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, **100**(22):12871-12876.
- [31] Mönke G, Cristiano E, Finzel A, et al. Excitability in the p53 network mediates robust signaling with tunable activation thresholds in single cells[J]. *Sci Rep*, 2017, **7**:46571.
- [32] Harton MD, Koh WS, Bunker AD, et al. p53 pulse modulation differentially regulates target gene promoters to regulate cell fate decisions[J]. *Mol Syst Biol*, 2019, **15**(9):e8685.
- [33] Chen X, Chen J, Gan ST, et al. DNA damage strength modulates a bimodal switch of p53 dynamics for cell-fate control[J]. *BMC Biol*, 2013, **11**:73.
- [34] Yang RZ, Huang B, Zhu YT, et al. Cell type-dependent bimodal p53 activation engenders a dynamic mechanism of chemoresistance[J]. *Sci Adv*, 2018, **4**(12):eaat5077.
- [35] Purvis JE, Karhohs KW, Mock C, et al. p53 dynamics control cell fate[J]. *Science*, 2012, **336**(6087):1440-1444.
- [36] Soares PI, Ferreira IM, Igreja RA, et al. Application of hyperthermia for cancer treatment: recent patents review[J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2012, **7**(1):64-73.
- [37] Ohnstad HO, Castro R, Sun JC, et al. Correlation of TP53 and MDM2 genotypes with response to therapy in sarcoma[J]. *Cancer*, 2013, **119**(5):1013-1022.
- [38] Keizer EM, Bastian B, Smith RW, et al. Extending the linear-noise approximation to biochemical systems influenced by intrinsic noise and slow lognormally distributed extrinsic noise[J]. *Phys Rev E*, 2019, **99**(5-1):052417.