DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.05.007

视黄酸对细胞周期素依赖性激酶基因表达的影响*

张乾勇** 糜漫天 郎海滨 杨志祥 韦 娜 黄国荣 (第三军医大学预防医学系营养卫生学教研室) 重庆,400038

提 要 目的:探讨视黄酸对细胞的增殖抑制作用与细胞周期调控基因表达改变的相关性。方法:HL-60细胞经全反式视黄酸(ATRA)处理1~4 d,^{3}H-TdR掺入实验检测ATRA对DNA合成能力的影响,免疫细胞化学染色分析cyclin E、cyclin D1、CDK2和CDK4蛋白表达的变化,核酸原位分子杂交检测ATRA对HL-60细胞CDC2、CDK2和CDK4 mRNA表达的影响。结果:5×10^{-6} mol/L ATRA处理HL-60细胞1~4 d后,^{3}H-TdR掺入率明显下降,CDK2和CDK4 mRNA和蛋白表达均无明显变化,处理3~4 d后,cyclin E和cyclin D1蛋白表达降低,CDC2 mRNA表达下降。结论:ATRA对HL-60细胞的增殖抑制作用可能与cyclin E、cyclin D1和CDC2基因表达下调节而导致相应cyclin/CDK复合物活性下降有关。

关键词 视黄酸;细胞周期调控;基因表达
中图法分类号 R329.28

近年来对细胞周期调控分子机制的研究已有突破性进展,其核心机制是细胞周期进程依赖于不同cyclin/CDK复合物在恰当时间形成、被活化及灭活[1]。多项研究显示:cyclin E-p34^{CDK2}及cyclin D-p34^{CDK4}在G$_1$→S期转化中发挥重要作用[2,3]。视黄酸(Retinoic acid, RA)及其衍生物对多种肿瘤细胞有增殖抑制和诱导分化作用,目前全反式视黄酸(All-trans retinoic acid, ATRA)已应用于临床,对肿瘤进行诱导分化治疗。然而,RA诱导细胞分化,抑制肿瘤细胞增殖并将它们阻断在G$_1$/G$_0$期,其分子机制尚不清楚。我们研究了RA对HL-60细胞中细胞周期调控基因的表达的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株的培养

HL-60(人早幼粒细胞白血病)细胞株由北京医科大学血液病研究所提供。细胞在含10%热灭活小牛血清的RPMI 1640培养液中常规培养传代。ATRA为Sigma产品,溶于二甲基亚砜(DMSO),配成5×10^{-3} mol/L储存液储存在-20℃,处理细胞终浓度为5×10^{-5}、5×10^{-6}、5×10^{-7}、5×10^{-8} mol/L,对照组培养液中仅含相应量的DMSO(0.1%)。

1.2 抗体与质粒

鼠抗cyclin E单克隆抗体由美国麻省综合医院癌症中心Lees教授惠赠,兔抗P34^{CDK2}、兔抗P34^{CDK4}、鼠抗cyclin D1单克隆抗体为Santa Cruz公司产品,SP试剂盒为Zymed公司产品。pNV-CDC2和pNV-CDK2质粒为日本Nagoya大学Tsuju教授惠赠,pBluescript-CDK4质粒为美国冷泉港实验室Beach教授惠赠。

1.3 生长曲线的测定

以5×10^4/ml细胞密度接种于24孔培养板中,经不同浓度ATRA处理1~6 d,每日各取3孔,台盼蓝染色计数,作生长曲线。

1.4 ^{3}H-TdR掺入实验

细胞经不同浓度ATRA处理24、48、72、96 h,于每个时相收获细胞前6 h加入^{3}H-TdR(0.5 μCi/孔),常规收获细胞,测Bq值。

1.5 免疫细胞化学染色

细胞经5×10^{-6} mol/L ATRA处理1~4 d,涂片,4%多聚甲醛固定,0.3% H_2O_2甲醇溶液封闭,10%山羊血清孵育,加一抗37℃孵育1 h(用0.01 mol/L PBS代替一抗进行阴性对照试验),再与生物素标记二抗及链菌素亲生物素过氧化物酶反应,用含0.05% DAB+0.03% $CoCl_2$+0.03% H_2O_2的0.01 mol/L Tris·Cl(pH7.4)缓冲液显色。

1.6 核酸原位分子杂交检测CDC2、CDK2、CDK4 mRNA

将质粒转入DH5a大肠杆菌后大量扩增、提取、纯化、酶切、回收cDNA片段,随机引物法地高辛标记制备成特异性探针。细胞经5×10^{-6} mol/L ATRA处理1~4 d,按文献[4]方法进行原位杂交。阴性对照不加探针或经RNase处理后再进行原位杂交。

2 结果

2.1 ATRA对HL-60细胞增值功能的影响

经过0.5×10^{-5}、5×10^{-6}、5×10^{-7}、5×10^{-8} mol/L的ATRA处理5 d后,HL-60细胞存活率分别为97%、69%、93%、96%、97%。在ATRA作用下,HL-60细胞生长受到不同程度的抑制。^{3}H-TdR掺入实验也表明一定浓度的ATRA能抑制HL-

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39570296
** 张乾勇,男,29岁,讲师

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

60细胞 DNA的合成,见表 1.

2.2 ATRA对 cyclin E、cyclin D1、CDK2和 CDK4蛋白表达的影响

免疫细胞化学染色发现 HL-60细胞中 cyclin E和 cyclin D1蛋白阳性反应物主要集中在细胞核,细胞质中也弥漫着少许。而 CDK2和 CDK4蛋白弥漫于整个细胞,细胞核中阳性着色略强于细胞质。经 5× 10^{-6} mol/L ATRA处理 3 d后,cyclin E和 cyclin D1蛋白阳性反应物强度明显降低,见图 1、2,而 CDK2和 CDK4蛋白阳性反应物强度无明显变化。

表 1 ATRA对 HL-60细胞 ^{3}H-TdR掺入率的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effect of ATRA on the ^{3}H-TdR incorporation rate in HL-60 cells ($\bar{x}\pm s$)

Concentration (C_B/mol·L^{-1})	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	6468±1231	15973±1859	42030±6125	32087±4748
5×10^{-5}	2362±861△	2046±783△	4681±1017△	3337±813△
5×10^{-6}	4101±986#	7988±1325△	10262±1782△	11859±2541△
5×10^{-7}	6214±1021	13129±1576	27987±5438#	23893±4591#
5×10^{-8}	7055±1450	16516±2729	36115±6327	30947±5579

#: $P<0.05$, △: $P<0.01$ *vs* control



图 1 未经处理的 HL-60细胞,cyclin E蛋白强阳性 (S-P× 400)

Fig 1 Immunocytochemical staining of cyclin E protein in untreated HL-60 cells, showing intensive positivity (S-P× 400)

图 2 HL-60细胞经 ATRA处理 3 d后,cyclin E蛋白中等强度阳性 (S-P× 400)

Fig 2 Immunocytochemical staining of cyclin E protein in HL-60 cells treated with ATRA for 3 d, showing moderate positivity (S-P× 400)

2.3 ATRA对 CDC2、CDK2和 CDK4 mRNA表达的影响

未经 ATRA处理的 HL-60细胞中 CDC2、CDK2和 CDK4 mRNA的原位分子杂交的反应信号都呈中等强度阳性反应。杂交阳性细胞为胞浆呈紫蓝色或紫褐色,杂交液中未加探针或杂交前用 RNase处理的阴性对照,杂交信号为阴性。5× 10^{-6} mol/L ATRA处理 HL-60细胞 3~4 d后,CDK2和 CDK4 mRNA的杂交信号无明显变化,CDC2 mRNA杂交信号减弱,见图 3、4.



图 3 未经处理的 HL-60细胞,原位杂交检测 CDC2 mRNA为中等强度阳性 (*In situ*× 200)

Fig 3 *In situ* hybridization of CDC2 mRNA in untreated HL-60 cells, showing moderate positivity (*In situ*× 200)

图 4 HL-60细胞经 ATRA处理 4 d后,原位杂交检测 CDC2 mRNA为弱阳性 (*In situ*× 200)

Fig 4 *In situ* hybridization of CDC2 mRNA in HL-60 cells treated with ATRA for 4 d, showing weak positivity (*In situ*× 200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 讨论

RA及其衍生物对多种肿瘤细胞有增殖抑制和诱导分化作用,对白血病细胞的作用尤为突出。80年代初 Breitman就报告了 10^{-6} mol/L的 RA可诱导 HL-60细胞或原代培养的急性早幼粒白血病细胞向终末分化。本实验显示 5×10^{-6} mol/L的 ATRA对 HL-60细胞有明显的增殖抑制作用。RA可通过 HL-60细胞内核受体使早期即刻反应基因 C-myc表达降低[5],其编码的核内蛋白减少,促使细胞向终末分化的基因开放。Jansen-durr等[6]用 BALB/c-3T3细胞组成性表达 C-myc后,cyclin E mRNA水平升高; Kim等[7]用反义 C-myc mRNA抑制 C-myc基因表达,则 CDC2 CDK2蛋白含量降低,细胞受阻于 G_1/G_0期。推测 RA对肿瘤细胞的增殖抑制及诱导分化作用可能与细胞周期调控蛋白表达改变有关。本实验发现 5×10^{-6} mol/L的 ATRA处理 3 d后,HL-60细胞 cyclin E和 cyclin D1蛋白水平明显下降,CDC2 mRNA表达降低,而 CDK2和 CDK4 mRNA及蛋白表达无明显变化。

哺乳动物细胞周期的进程依赖于不同的 CDK在恰当时间生成、被活化以及灭活。CDK的激酶活性除了与其表达水平及自身磷酸化状态有关外,还主要受相应的 cyclin的正调节。有研究表明,cyclin E/CDK2和 cyclin D1/CDK4复合物在 $G_1\rightarrow S$期转换过程中起重要作用[2]。ATRA对 HL-60细胞 CDK2和 CDK4 mRNA及蛋白表达无明显影响,但使 cyclin E和 cyclin D1蛋白表达降低。推测 ATRA使 HL-60细胞 Cyclin E/CDK2和 cyclin D1/CDK4复合物形成减少,CDK2和 CDK4激酶活性降低,导致细胞 $G_1\rightarrow S$期转换受阻,细胞增殖被抑制。

细胞周期的调控是极其复杂的,近年来认为 cyclins CDKs CDK抑制物(CKIs)、p53 pRb以及某些癌基因的表达产物相互间构成一个级联调控网络,对细胞周期的进程进行调控[8]。RA对细胞的增殖抑制作用与这一级联调控网络中的其它细胞周期调控蛋白表达及磷酸化状态改变的关系,有待进一步研究。

参考文献

1 Hirama T, Koeffler H P. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. Blood, 1995, 86(3): 841

2 Resnitzky D, Reed S I. Different roles for cyclin D1 and E in regulation of the G_1-to-S transition. Mol Cell Biol, 1995, 15(7): 3463

3 Dulic V, Lees E, Reed S I. Association of human cyclin E with a periodic G_1-S phase protein kinase. Science, 1992, 257(25): 1958

4 蔡文琴,王伯　主编.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术.成都:四川科学技术出版社, 1994. 415~418

5 Yen A, Forbes M E. C-myc down regulation and precommitment in HL-60 cells due to bromodeoxyuridine. Cancer Res, 1990, 50(5): 1411

6 Jansen-durr P, Meichle A, Steiner P. Differential modulation of cyclin gene expression by MYC. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(8): 3685

7 Kim Y H, Bucholz M A, Chrest F J, *et al*. Up-regulation of c-myc induces of the gene expression of the murine homologues of p34cdc2 and cyclin-dependent kinase-2 in T lymphocytes. J Immunology, 1994, 152(9): 4328

8 Wernberg R A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell, 1995, 81(3): 323

(收稿: 1997-08-05;修回: 1998-05-30)

(编辑　冷怀明)

Effects of retinoic acid on gene expression of cyclin-dependent kinases*

Zhang Qianyong, Mi Mantian, Lang Haibin, Yang Zhixiang, Wei Na, Huang Guorong (Department of Nutrition and Food Hygiene, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To investigate the relationship between the expression of cyclin-dependent kinases (CDKs) and the effects of all-trans retinoic acid (ATRA) on the proliferation of HL-60 cells. **Methods**: After HL-60 cells treated with ATRA for 1~4 d, the DNA synthesis capacity were examined with ^{3}H-TdR incorporation and the expression of cyclin E, cyclin D1, CDK2 and CDK4 protein were determined with immunocytochemical staining. Meanwhile, the expression of CDC2, CDK2 and CDK4 were determined with *in situ* hybridization. **Results**: ATRA inhibited the cellular proliferation and decreased the cellular capacity to synthesize DNA in HL-60 cells, which resulted in a down-regulation of the expression of cyclin E, cyclin D1 and CDC2 rather than that of CDK2 and CDK4. **Conclusion**: The down-regulation of cyclin E, cyclin D1 and CDC2 may be related to the effects of ATRA on proliferation of HL-60 cells, and related to the decrease of the activity of cyclin/CDK complex.

Key words retinoic acid; cyclin-dependent kinase; cell cycle regulator

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39570296

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net