DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.01.006

视黄酸及芳维甲对 HL-60细胞细胞周期素及相关激酶 $P34^{cdk2}$蛋白表达的影响*

张乾勇 糜漫天 朱俊东 (第三军医大学预防医学系营养卫生学教研室) 重庆,630038

提 要 目的:本研究从细胞周期调控这一角度来探讨视黄酸类物质阻遏白血病细胞增殖的分子机理。方法:采用两步过量胸苷阻断法将 HL-60细胞同步化于 G_1/S期边缘,5× 10^{-6} mol/L视黄酸或芳维甲处理 1 d~ 4 d后收获细胞,以流式细胞仪(FCM)分析细胞周期相分布,免疫印迹法检测 Cyclin E、Cyclin D_1和 $P34^{cdk2}$蛋白表达水平。结果:Cyclin E和 D_1蛋白表达量具有周期依赖性,G_1期开始增加,S期达到高峰,G_2期逐渐下降,而 $P34^{cdk2}$蛋白表达量在整个细胞周期中无明显变化;视黄酸或芳维甲处理后,大部分细胞被阻断在 G_0/G_1期,$P34^{cdk2}$蛋白表达量变化不明显,而 Cyclin E和 D_1蛋白表达量明显下降。结论:视黄酸或芳维甲诱导的 Cyclin E和 Cyclin D_1蛋白表达的降低,可能与视黄酸类物质干扰细胞 G_1→S期转换、阻遏 HL-60细胞增殖并诱导其分化有关。

关键词 视黄酸;细胞周期素;$P34^{cdk2}$
中图法分类号 R329.28

近年来对细胞周期调控分子机理的研究已有突破性进展,确定了细胞周期素(Cyclin)的周期性累积和降解对细胞周期进程的调控作用。Cyclin依赖的蛋白激酶(CDK)的活性除了受自身一些酪氨酸残基的磷酸化状态及一些蛋白因子加 P21、P27、CAP20等的调节外,主要受 Cyclins的调节。目前认为哺乳动物细胞中细胞周期调控的核心机理是通过不同 Cyclin与其相关的 CDK形成复合体,产生特定的激酶活性,使细胞通过特定的调控点顺利地完成细胞周期。

细胞周期的进程有赖于不同 Cyclin/CDK复合物在恰当时间形成,被活化以及灭活[1],其中 Cyclin是调节亚基,CDK是催化亚基。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]。视黄酸类物质能抑制白血病细胞的增殖,并将它们阻断在 G_1/G_0期,其分子机理尚不清楚。为了探讨视黄酸类物质阻遏白血病细胞增殖的分子机理,我们研究了视黄酸或芳维甲对 HL-60细胞中 Cyclin E、Cyclin D及 $P34^{cdk2}$蛋白表达水平的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株的培养

HL-60(人早幼粒白血病细胞)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 RPMI1640培养液中常规培养传代。

1.2 视黄酸、芳维甲处理

视黄酸(全反式,RA)为 Sigma产品,第三代视黄酸衍生物芳维甲——全名为芳香维甲酸乙脂(Arotinoidethylester,AREE)由本校附属西南医院皮肤科何威博士提供。RA和 AREE分别溶于二甲基亚砜(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^{-6} mol/L,对照组培养液中仅含相应量的 DMSO(0.1%)。

1.3 抗体

鼠抗 Cyclin E单克隆抗体由美国麻省综合医院癌症中心 E.Lees教授惠赠,兔抗 $P34^{cdk2}$、鼠抗 Cyclin D_1单克隆抗体为 Santa Cruz生物工程公司产品,羊抗兔 IgG-HRP为华美生物工程公司产品,生物素化抗鼠 IgG及 SP-HRP由本校基础部组织与胚胎学教研室邓晓林博士提供。

1.4 细胞周期同步化

用两步过量胸苷阻断法[4]。

1.5 细胞周期分析

经 RA和 ATEE处理或胸苷同步化的 HL-60细胞,碘化丙啶染色后用流式细胞仪(FCM)对 DNA进行定量分析,再结合计算机软件推算出各细胞周期相细胞所占比例。

1.6 免疫印迹法

1× 10^7个细胞经 100μl 1% NP-40裂解液(50 mmol/L Tris 150 mmol/L NaCl 1% NP-40 25 mmol/L NaF 5 mmol/L Na_3VO_4 5 mmol/L $Na_4P_2O_7$ 0.1% SDS 1 mmol/L PMSF 10μg/ml Leupetin 10μg/ml Aprotinin)裂解,20μl样品中加入 20μl 2× SDS加样缓冲液,沸水中煮 5 min,经 10% SDS-PAGE电泳后用电转移转膜,1% BSA封闭 37℃ 1 h或 4℃过液,加一抗 37℃孵育 1 h,再用二抗及 SP-HRP孵育 37℃ 1 h,

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39570296
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

用 0.05% DAB+ 0.03% $CoCl_2$+ 0.03% H_2O_2 0.01 mol/L Tris· Cl(pH 7.4)缓冲液显色。

2 结果

2.1 Cyclin E Cyclin D_1及 $P34^{cdk2}$的周期相特异性表达

HL-60细胞经 2× 10^{-3} mol/L胸苷处理两次后,90%的细胞被同步化在 G_1/S期边缘,释放 2 h后有 80%的细胞进入 S期,6 h后 G_2/M期细胞达 70%,10 h后 G_1期细胞约 70%见图 1。免疫印迹分析显示 Cyclin E和 Cyclin D_1蛋白的表达是周期依赖性的,在 G_1期后期升高,S期达到高峰,G_2期逐渐下降,没有发现 $P34^{cdk2}$蛋白表达有明显的周期性变化,见图 2。

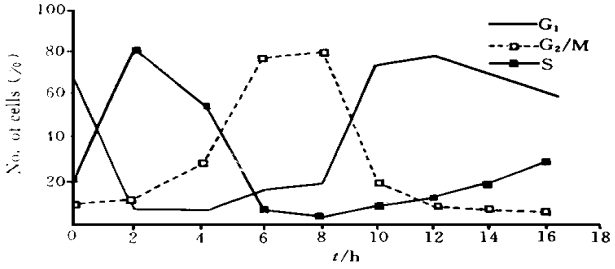


图 1 同步化的 HL-60细胞释放不同时间后细胞周期相分布变化

Fig 1 FCM analysis of cell cycle distribution in sythronized HL-60 cells at the indicated times after release from the block

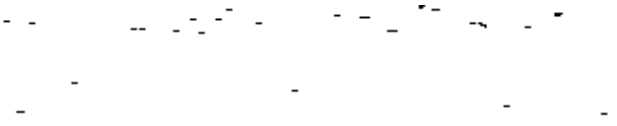


图 2 免疫印迹分析经两步过量胸苷阻断法同步化的 HL-60细胞释放不同时间后 Cycline E Cyclin D_1和 cdk2蛋白表达变化

Fig 2 Analysis of cyclin E, cyclin D_1, cdk2 protein by immunoblotting at the indicated times after release from the double thymidine block

2.2 RA及 AREE对 Cyclin E Cyclin D_1及 $P34^{cdk2}$蛋白表达的影响

RA和 AREE均能抑制 HL-60细胞的增殖,并将 HL-60细胞阻断于 G_1/G_0期。未经处理的细胞约有 60%处于 S期和 G_2/M期,经 RA或 AREE处理 4 d后 HL-60细胞有 90%受阻于 G_1/G_0期。经 RA处理 3d后 Cyclin E蛋白表达量显著下降,Cyclin D_1蛋白表达量也明显下降,AREE处理后有类似变化,但不及 RA的作用显著,而 RA和 AREE对 $P34^{cdk2}$蛋白表达量都无明显影响见图 3。



图 3 免疫印迹分析 RA或 AREE对 HL-60细胞 Cyclin E Cyclin D_1和 cdk2蛋白表达的影响

Fig 3 Immunoblot analysis the cyclin E, cyclin D_1 and cdk2 protein in total cell lysates of HL-60 cells after exposure to RA or AREE

3 讨论

哺乳动物细胞周期进程是受 CDKs调控的,不同的 CDKs通过周期依赖性表达、周期相特异磷酸化及与特定的 Cyclins相结合而在细胞周期的不同时相产生特定的作用[5]。Cyclin E/cdk2复合物在 G_1晚期和 S期发挥作用,Cyclin B/cdc2复合物能促进 G_2期细胞向 M期转换,Cyclin A/cdk2和 Cyclin A/cdc2是细胞通过 S期和 G_2期所必需的,Cyclin D/cdk4在 G_1期向 S期转化过程中起重要作用[6,7]。视黄酸类物质能抑制 HL-60细胞的增殖,并将它们阻断在 G_1/G_0期,其分子机理还不清楚。本研究检测了经两步过量胸苷阻断法同步化的 HL-60细胞 Cyclin E Cyclin D_1及 cdk2蛋白周期性变化情况,发现 Cyclin E呈周期依赖性表达,在 S期最高,G_2期逐渐下降,cdk2无明显周期性变化,即在 HL-60细胞各周期时相中,cdk2表达量基本一致,这一结果与其他作者报道的不同细胞株所得结果基本一致[2,3],由此可以认为 Cyclin E/cdk2复合物的多少主要取决于 Cyclin E这一调节亚基表达水平。本研究还显示 Cyclin D_1在 HL-60细胞中的表达也呈周期依赖性变化,在 G_1期和 S期表达较高,这一结果与 Burger等人在 NIH3T3细胞及人成纤维细胞株 WI-38细胞中观察到的现象有一定偏差[8],推测这一差异与胸苷处理或细胞株的不同有一定关系。

有研究证实能诱导 HL-60细胞向巨系分化的 TPA能引起 HL-60细胞 Cyclin E mRNA表达水平下降,与 RA有相似作用的 DMSO在诱导 HL-60细胞向粒系分化过程中伴有 Cyclin D_1 mRNA表达降低[8]。RA对 HL-60细胞的诱导分化及增殖抑制过程中伴有 c-myc表达下调节[9],本实验发现 RA或 A-

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

REE处理 HL-60细胞后,Cyclin E和 Cyclin D1蛋白水平明显下降,而 cdk2蛋白无明显变化。已知 Cyclin E/cdk2, Cyclin D1/cdk4在 G1→S期转换过程中发挥重要作用[3],我们推测 RA类物质抑制白血病细胞增殖并将其阻断于 G1期的分子机理可能是: RA类物质引起 c-myc表达下调节,导致 Cyclin E, Cyclin D1表达降低, Cyclin E/cdk2, Cyclin D1/cdk4复合物形成减少, P34cdk2和 P34cdk4的激酶活性降低,细胞周期被阻滞于 G1期。

综上所述, Cyclin E和 Cyclin D1在 HL-60细胞中的表达水平是细胞周期依赖性变化的。RA及 AREE引起 HL-60细胞 Cyclin E和 Cyclin D1表达下调节,对 P34cdk2蛋白表达无明显影响。RA及 AREE处理 HL-60细胞后 P34cdk2蛋白表达虽无明显变化, Cyclin E蛋白表达降低可直接影响 P34cdk2蛋白激酶活性,从而干扰细胞由 G1→S期转换。然而,细胞周期的调控是极其复杂的, RA及 AREE的作用是否会同时诱导相应的细胞周期调控蛋白抑制物表达,或使 P34cdk2蛋白磷酸化状态改变,而影响细胞周期进程,尚有待进一步深入研究。

参考文献

1 Hunter T. Braking the cycle. Cell, 1993; 75(5): 839

2 Koff A, Giordano A, Desai D *et al*. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during G1 phase of the human cell cycle. Science, 1992; 257(18): 1689

3 Dulic V, Lees E, Reed S I. Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. Science, 1992; 257(25): 1958

4 Shimizu T O, Connor P M, Kohn K W. Unscheduled activation of cyclin B1/cdk2 kinase in human promyelocytic leukemia cell line HL-60 cells undergoing apoptosis induced by DNA damage. Cancer Res, 1995; 55(2): 228

5 Sherr C J. Mammalian G1 cyclins. Cell, 1993; 73(6): 1059

6 Tsai L H, Lees E, Faha B *et al*. The cdk2 Kinase is required for G1 to S transition in mammalian cells. Oncogene, 1993; 8(6): 1593

7 Atadja P, Wong H, Veiete C *et al*. Overexpression of cyclin D1 blocks proliferation of normal diploid fibroblaste. Experimental Cell Res, 1995; 217(2): 205

8 Burger C, Wick M, Muller R. Lineage-specific regulation of cell cycle gene expression in differentiating myeloid cells. Journal of Cell Science, 1994; 107(7): 2047

9 Jansen D P, Meichle A, Steiner P *et al*. Defferential modulation of cyclin gene expression by MYC. Proc Natl Acad Sci USA, 1993; 90(8): 3685

(收稿: 1996-07-15;修回: 1997-01-11)

(编辑　刘　鹏)

Effects of retionic acid and arotinoidethylester on the expression of cyclins and cyclin-dependent kinase cdk2 protein in HL-60 cells

Zhang Qianyong, Mi Mantian, Zhu Jundong (Department of Nutrition and Food Hygiene, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract **Objective**: Retinoids can exert the antiproliferation effect on HL-60 cells, but its mechanism remains unclear. In this study, the effect of retinoic acid (RA) and arotinoid-ethylester (AREE) on the expression of cell cycle regulatory proteins were studied to explore the mechanism. **Methods**: Cyclin E, Cyclin D1 and P34cdk2 protein expression was determined with immunoblotting and cell cycle distribution with FCM in synchronized HL-60 cells released from the double thymidine block and non-synchronized HL-60 cells exposed to RA or AREE for 1~4 d. **Results**: The amounts of both Cyclin E and Cyclin D1 protein fluctuated periodically through the cell cycle and reached their peak values in early S phase whereas P34cdk2 protein showed no periodic expression. RA or AREE treatment resulted in a down-regulation of Cyclin E and Cyclin D1 protein expression whereas no change was found in P34cdk2. **Conclusion**: These findings suggest that the amounts of Cyclin E/cdk2 complex depend on the level of Cyclin E protein and the down-regulation of Cyclin E protein in HL-60 cells maybe due to the antiproliferation of RA or AREE.

Key words retinoic acid; Cyclin; P34cdk2

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