

CDKs 和 CKIs 在胃癌细胞周期调控中的相关性*

陈正明 吴乔** 苏文金

(厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室, 厦门 361005)

摘要 研究 CDKs 和 CKIs 在调节胃癌细胞周期进程中的作用表明, 全反式视黄酸 (ATRA) 通过诱导细胞滞留在 G_1/G_0 期而抑制胃癌细胞生长。Western blot 分析显示, ATRA 可上调 $p21^{waf1/cip1}$ 的表达, 而抑制 $p16^{ink4}$ 的表达。免疫沉淀及活性测定表明, CDK₂ 激酶活性可被 ATRA 抑制, 而 CDK₄ 活性先被诱导上升, 24 h 后逐渐下降。另外, ATRA 可以调节 Rb 蛋白的磷酸化和 c-myc 蛋白的表达。由此证实, ATRA 诱导胃癌细胞滞留于 G_1/G_0 期与其上调 $p21^{waf1/cip1}$ 的表达和抑制 CDK₂ 和 CDK₄ 激酶活性, 进而抑制 Rb 蛋白的磷酸化和 c-myc 的表达有关。Rb 蛋白是 ATRA 抑制胃癌细胞生长的下游调节因子。另外, $p16^{ink4}$ 的功能在胃癌细胞中可能丧失。

关键词 周期蛋白依赖性蛋白激酶, 周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制因子, 细胞周期, 胃癌细胞, 全反式视黄酸

中图分类号 Q2

Relationship between CDKs and CKIs in Regulation of Cell Cycle Progression of Human Gastric Cancer Cells

CHEN Zhengming, WU Qiao, SU Wenjin

(The State Laboratory for Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract The roles of CDKs and CKIs in regulation of cell cycle progression of human gastric cancer cells was investigated. The results demonstrated that ATRA (all-trans retinoic acid) inhibited growth of gastric cancer cells through inducing cells arrest in G_1/G_0 . Western blotting showed that $p21^{waf1/cip1}$ was up-regulated by ATRA in gastric cancer cells, which resulted in a decreased CDK₂ activity, as revealed by immunoprecipitation assay. However, $p16^{ink4}$, which specifically inhibited cyclin D₁/CDK₄ complexes, was down-regulated by ATRA both at mRNA and protein levels. By accompanying with another inhibitor $p21^{waf1/cip1}$, it led to the increase of CDK₄ activity after treatment of ATRA for 12 h, and the decrease after 24 h. As a result, Rb protein could be regulated in its phosphorylation state by ATRA. Furthermore expression of c-myc was suppressed by ATRA. Taken together, the data indicate that induction of gastric cancer cells arrest in G_1/G_0 by ATRA was probably through up-regulation of $p21^{waf1/cip1}$, which contributed to inhibition of CDK₂ and CDK₄ activities, then led to Rb phosphorylation changes, associated with inhibition of c-myc expression. Rb might be a downstream effector of ATRA in inhibition of gastric cancer cell growth. In addition, the function of $p16^{ink4}$ might be lost in gastric cancer cells.

Key words Cyclin dependent kinase, Cyclin dependent kinase inhibitor, Cell cycle, Gastric cancer cell, All-trans retinoic acid

细胞周期蛋白 (cyclins)、周期蛋白依赖性蛋白激酶 (cyclin dependent kinases, CDKs) 和周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制因子 (cyclin dependent kinase inhibitors, CKIs) 在细胞周期网络调控中起着重要作用。细胞生长既需要不同类型 cyclin 的正常消

* 国家自然科学基金资助 (39880015)

** 联系人 Tel: (0592) 2182542, Fax: (0592) 2086630

E-mail: xgwu@xmu.edu.cn

陈正明, 男, 1969年生, 博士研究生

收稿日期: 1999-03-29, 修回日期: 1999-06-14

长, 又需要 CKI 参与监控 cyclin 来调节 CDK 活性, 三者平衡是保证细胞正常生长的必要条件. cyclinD 合成于 G₁ 早期, 促使细胞的 G₁-S 期转换^[1]. cyclinD 与 CDK 结合形成具有活性的激酶复合物 (cyclinD-CDK) 而对 Rb 蛋白磷酸化, 磷酸化的 Rb 蛋白失去对 E₂F 等转录因子的结合功能, 使游离的 E₂F 进入核内, 启动 S 期中细胞增殖相关基因 (如 c-myc, cdc2 等) 转录, 导致细胞恶性增殖^[2]. CKI 作为 CDK 底物的竞争物, 通过结合 CDK 而抑制 cyclin-CDK 活性, 由此阻止细胞进入 S 期^[3]. 因此, 诸多因子的相互作用形成级联调控网络, 共同调节细胞周期的进程.

细胞周期失控是癌变的重要原因之一, 一些生长因子诱导细胞增殖或者一些诱导剂诱导细胞分化归根到底就是影响细胞周期的运行, 因此细胞周期与细胞增殖、分化和凋亡等密切相关. 本文在观察视黄酸调控胃癌细胞周期过程中, 试图分析 cyclinD₁、CDK₂、CDK₄ 和 p21^{waf1/cip1}、p16^{ink4} 以及 Rb、c-myc 之间的相关性, 探讨这些因子在胃癌细胞周期中的正、负调控作用. 结果表明, 在视黄酸调节胃癌细胞周期过程中 p21^{waf1/cip1} 起着主要作用; p16^{ink4} 表达水平的下降可能导致 CDK₄ 活性的上升, 这为阐明胃癌细胞增殖和分化的调控机理提供新线索.

1 材料和方法

1.1 细胞培养和药物处理

胃癌细胞株 MGC80-3 和 BGC-823 均用 RPMI-1640 培养液培养. 细胞接种 24 h 后加入全反式视黄酸 (all-trans retinoic acid, ATRA, Sigma) 处理. MGC80-3 细胞由厦门大学抗癌中心提供, BGC-823 细胞购于上海细胞所细胞库.

1.2 细胞生长速率测定

以 1 000 细胞/孔将细胞接种到 96 孔培养板中, 加入不同浓度的 ATRA 处理细胞 9 d, 以 MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma) 染色细胞, SDS/二甲苯甲酰胺中止反应后在酶标仪上测定反应液光密度值 (570 nm).

1.3 流式细胞术测定细胞周期

细胞经 70% 乙醇固定后, 加入无 DNase 的 RNase (1.0 mg/ml) 处理细胞, 碘化丙啶 (Sigma) 染色, 用流式细胞仪分析细胞在各周期的分布.

1.4 RNA 提取和 Northern blot

硫氰酸胍-氯化铯超速离心法提取总 RNA. 以

α -³²P-dATP 和 α -³²P-dCTP (北京亚辉生物公司) 标记 DNA 探针 (北京天象人公司). 按文献[4]方法进行 Northern blot. 以 28S 和 18S 作为总 RNA 的定量参照.

1.5 蛋白提取和 Western blot

常规方法^[4]制备细胞裂解液, 在 SDS-PAGE 凝胶上电泳, 蛋白转膜后与相应抗体 (Santa Cruz) 温育, 以 ECL 试剂盒 (Amersham) 显示蛋白. 以 α -tubulin 作为蛋白的定量参照.

1.6 免疫沉淀和激酶活性测定

参照文献[5]方法测定. 细胞裂解液与 CDK₂ 或 CDK₄ 抗体 (Santa Cruz) 温育 2 h (室温), 用 Sepharose-protein A 沉淀蛋白, 以 Histon H₁ 作底物, 在含 γ -³²P-ATP 的反应液中反应, 反应液在 12% SDS-PAGE 上电泳后干胶, 放射自显影.

2 结 果

2.1 ATRA 对胃癌细胞生长和细胞周期的影响

MTT 测定结果表明, ATRA 能够有效地抑制胃癌 MGC80-3 和 BGC-823 细胞生长, 抑制作用随 ATRA 浓度的增加而加强 (Fig. 1). 细胞周期测定表明, ATRA 可以调节 MGC80-3 和 BGC-823 细胞的周期分布, 细胞处理 24 h 后, G₁/G₀ 期细胞从 35.7% 提高到 61.7% (MGC80-3) 和从 29.9% 提高到 56.9% (BGC-823), 而 S 期细胞则从 54.0% 下降到 10.7% (MGC80-3) 和从 61.4% 下降到 16.0% (BGC-823) (Table 1).

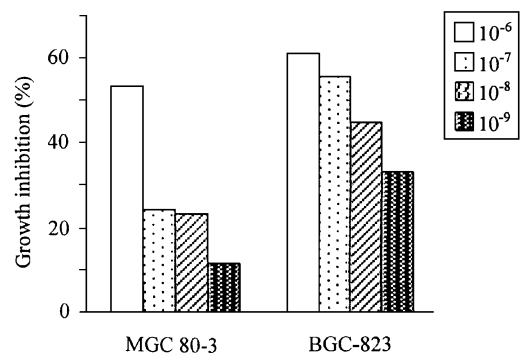


Fig 1 Effect of ATRA on growth inhibition of gastric cancer cells

The concentration of ATRA is 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹ mol/L respectively

2.2 ATRA 对 p21^{waf1/cip1} 和 p16^{ink4} 表达的影响

分析表明, p21^{waf1/cip1} 蛋白在 MGC80-3 和 BGC-823 细胞中均表达, ATRA 可以上调 p21^{waf1/cip1} 蛋白

Table 1 Cell cycle distribution (%) of gastric cancer cell lines

A TRA treatment	M GC80-3			BGC-823		
	0 h	12 h	24 h	0 h	12 h	24 h
G ₀ /G ₁	35.7	52.9	61.4	29.9	50.8	56.9
S	54.0	17.5	10.7	61.4	23.5	16.0
G ₂ /M	10.3	29.5	27.6	8.70	25.7	27.1

水平, 并且这种诱导在 3 h 就可以发生 (Fig 2A) . p16^{ink4} mRNA 和蛋白在 M GC80-3 和 BGC-823 细胞中表达, 但经过 A TRA 作用后, p16^{ink4} mRNA 和蛋白表达水平受到抑制, 而且随着 A TRA 作用时间的延长, 抑制作用更明显 (Fig 2B, Fig 3) .

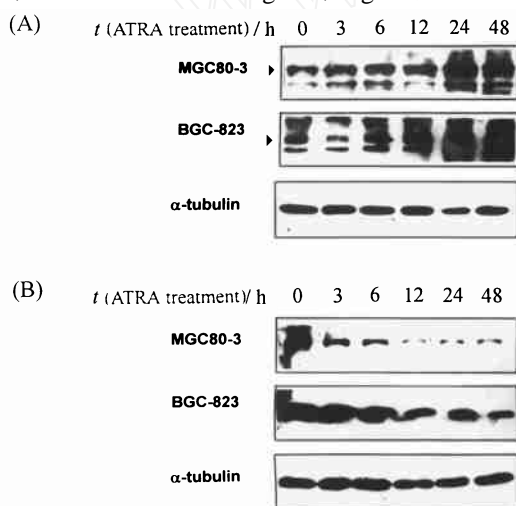


Fig 2 Expression of p21^{waf1/cip1} (A) and p16^{ink4} (B) in gastric cancer cells shown by Western blotting

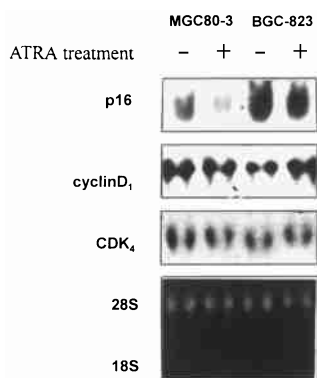


Fig 3 Expression of p16^{ink4} and cyclinD₁, CDK₄ mRNA in gastric cancer cells shown by Northern blotting

2.3 A TRA 对 cyclinD₁, CDK₂ 和 CDK₄ 的 mRNA、蛋白和激酶活性的影响

在 M GC80-3 和 BGC-823 细胞中都可以检测到

cyclinD₁ 和 CDK₄ mRNA 和蛋白的表达, 但 A TRA 不能调节其表达水平 [Fig 3, 4A, B] . 以免疫沉淀法测定激酶活性时, 可以检测到 M GC80-3 和 BGC-823 细胞中 CDK₄ 激酶活性, 当 A TRA 处理 6 h 和 12 h 时, CDK₄ 活性有所上升, 当 A TRA 处理 24 h 时, CDK₄ 活性受到抑制 (Fig 5A) . 与 CDK₄ 一样, A TRA 也不能抑制 CDK₂ mRNA 和蛋白水平 (结果未显示), 但与 CDK₄ 不同的是, A TRA 能够抑制 CDK₂ 活性 (Fig 5B) .

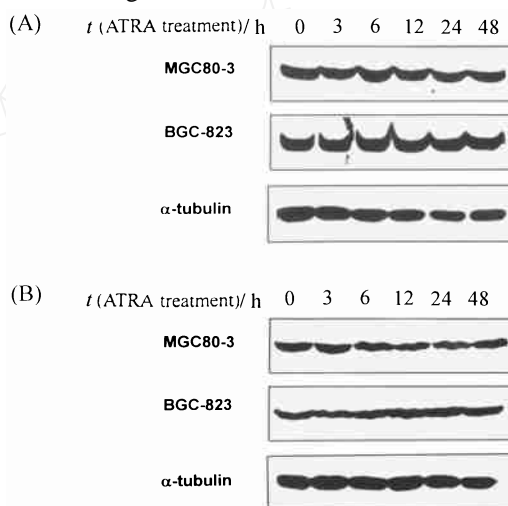


Fig 4 Expression of cyclinD₁ (A) and CDK₄ (B) in gastric cancer cells shown by Western blotting

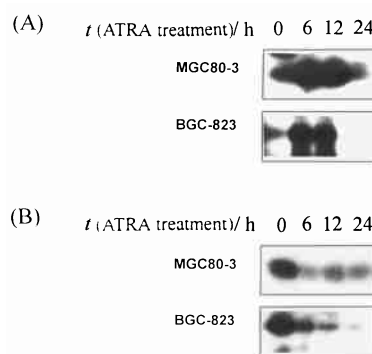


Fig 5 Activity of CDK₄ (A) and CDK₂ (B) in gastric cancer cells shown by immunoprecipitation

2.4 A TRA 对 Rb 和 c-myc 蛋白的影响

Western blot 分析显示, A TRA 参与调节 M GC80-3 和 BGC-823 细胞 Rb 的磷酸化过程, 使磷酸化的 Rb (ppRb) 比例减少, 去磷酸化的 Rb (pRb) 比例增加 (Fig 6A) . A TRA 还能够抑制 M GC80-3 和 BGC-823 细胞的 c-myc 蛋白表达, 并具有时间依赖性 (Fig 6B) .

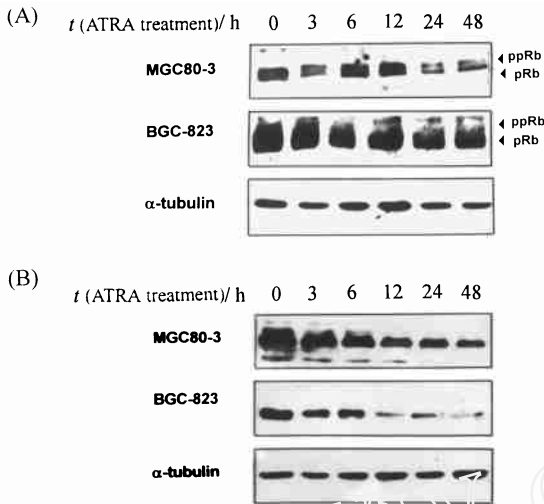


Fig 6 Expression of Rb (A) and c-myc (B) in gastric cancer cells shown by Western blotting

3 讨 论

本文研究表明, ATRA 能够诱导胃癌细胞滞留在 G_1/G_0 期, 通过调控胃癌细胞周期而抑制胃癌细胞生长 (Fig 1, Table 1). 细胞周期的调节是一个复杂的调节网络, 有正、负调节方式. $p21^{waf1/cip1}$ 在细胞周期调控中起着重要作用, 它可以结合大多数的 CDKs 并抑制其激酶活性, 阻止细胞的周期进程^[6]. $p21^{waf1/cip1}$ 在大多数高等动物细胞中均有表达, 以量的方式调节细胞周期和细胞分化, 只有当 $p21^{waf1/cip1}$ 达到一定量时才影响细胞生长^[7]. 本文实验表明, $p21^{waf1/cip1}$ 在胃癌 MGC80-3 和 BGC-823 细胞中均有表达, 但表达水平较低, 经过 ATRA 的诱导, 表达水平迅速提高 (Fig 2A), 表明 ATRA 诱导的 $p21^{waf1/cip1}$ 表达与其对细胞周期调节和细胞生长抑制密切相关. $p16^{ink4}$ 是另一个重要的负调节因子, 能与 cyclinD₁ 竞争性结合 CDK₄, 抑制其对 Rb 蛋白的磷酸化^[8], 因而 $p16^{ink4}$ 被普遍认为是一种肿瘤抑制基因. 然而, 本文实验却发现, ATRA 下调胃癌 MGC80-3 和 BGC-823 细胞中 $p16^{ink4}$ mRNA 或蛋白的表达水平, 而且随着 ATRA 作用时间的延长, 抑制作用更明显 (Fig 2B, 3). 由此提示 $p16^{ink4}$ 的功能在胃癌细胞中可能降低甚至丧失, 这可能是由于其它相关因子的作用所致, 或者在 $p16^{ink4}$ 的基因调控区存在突变.

由于 $p16^{ink4}$ 具有特异性地与 cyclinD₁ 竞争而结合 CDK₄ 但不结合 CDK₂ 的特性^[9], 我们首先检测 cyclinD₁ 和 CDK₄ mRNA 和蛋白的表达水平. 结果

A TRA 不能在 mRNA 和蛋白水平上调 cyclinD₁ 和 CDK₄ 的表达 (Fig 3, 4). 进一步测定 CDK₄ 激酶活性显示, 当 ATRA 处理 6 h 和 12 h 时, CDK₄ 活性有所上升, 当 ATRA 处理 24 h 时, CDK₄ 活性受到抑制 (Fig 5A). 据此, 我们推测 ATRA 下调 $p16^{ink4}$ 的表达可能导致 CDK₄ 激酶活性的上升. 由于 $p16^{ink4}$ 并非唯一的 cyclinD-CDK₄ 抑制剂, 其生物活性可以被 $p21^{waf1/cip1}$ 补偿^[10], 因此, 24 h 后 ATRA 抑制 CDK₄ 激酶活性可能与其诱导 $p21^{waf1/cip1}$ 表达水平的上升有关. $p21^{waf1/cip1}$ 不仅可以抑制 CDK₄ 激酶活性, 也可以抑制 CDK₂ 激酶活性^[3]. 本文也观察到 ATRA 不能抑制 CDK₂ mRNA 和蛋白水平 (结果未显示), 但能够抑制 CDK₂ 激酶活性 (Fig 5B). 由此表明 ATRA 上调 $p21^{waf1/cip1}$ 表达与其抑制 CDK₂ 活性密切相关, 并进一步佐证了 $p21^{waf1/cip1}$ 在调节胃癌细胞周期过程中的关键作用. 因此, $p21^{waf1/cip1}$ 、 $p16^{ink4}$ 和 CDK₂、CDK₄ 之间的调控与被调控关系调节胃癌细胞的周期进程.

肿瘤抑制基因 Rb 是 G_1/S 期转换的中心成分, 可以被 CDKs 磷酸化, 在调控途径中位于 cyclin-CDK、 $p16^{ink4}$ 和 $p21^{waf1/cip1}$ 的下游^[8, 11], 因此, ATRA 对 $p21^{waf1/cip1}$ 的诱导和对 CDK₂、CDK₄ 激酶活性的抑制可能影响到 Rb 的功能状态. 本文结果证实了这一可能性, 即: ATRA 参与下调胃癌细胞 Rb 的磷酸化过程, 使磷酸化的 Rb 比例减少, 去磷酸化的 Rb 比例增加 (Fig 6A), 而后者则具有抗癌活性^[12]. 去磷酸化的 Rb 蛋白通过抑制 E2F 基因产物及其基因转录双重作用发挥作用^[2]. c-myc 是 E2F 的作用靶子, 在细胞增殖过程中具有重要作用, 所以当 ATRA 抑制 Rb 磷酸化后, 游离的 E2F 减少, c-myc 的表达也随之下降 (Fig 6B), 表明了 Rb 蛋白在周期调控中的重要地位. 当然, 细胞周期的调控是一个复杂的过程, 还有许多其它分子参与, 因此, 对它们相关性的进一步研究, 将有助于进一步阐明细胞增殖和分化的调控机理.

参考文献 (References)

- Ohtsubo M, Roberts J M. Cyclin-dependent regulation of G_1 in mammalian fibroblasts *Science*, 1993, 259: 1908~ 1912
- Sicinski P, Donaher J L, Parker S B, Li T S, Gardner H, Haslam S Z, Bronson R T, Elledge S J, Weinberg R A. Cyclin D₁ provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast *Cell*, 1995, 82: 621~ 630
- Leland H H, Michael B K. Cell cycle control and cancer, *Science*, 1994, 266: 1821~ 1827

- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning, A laboratory manual*, 2nd ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: Chapter 7; Chapter 18
- 5 Wilcken N R, Sarcevic B, Musgrove E A, Sutherland R L. Differential effects of retinoids and antiestrogens on cell cycle progression and cell cycle regulatory genes in human breast cancer cells *Cell Growth & Differentiation*, 1996, **7**: 65~ 74
- 6 Grana X, Rddy E P. Cell cycle control in mammalian cell: role of cyclins, cyclin dependent kinase (CDKs), growth suppressor gene and cyclin-dependent kinase inhibitors *Oncogene*, 1995, **11**: 211~ 219
- 7 Michieli P, Chedid M, Lin D, Pierce J H, Mercer W E, Givol D. Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res*, 1994, **54**: 3391~ 3395
- 8 Rene H M, Rafael E H, Felix L, Robert A W. Growth suppression by p16^{ink4} requires functional retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 6289~ 6293
- 9 David O M. Principles of CDK regulation *Nature*, 1995, **374**: 131~ 134
- 10 曹跃琼, 乔守怡, 赵寿元. 细胞周期抑制蛋白 Kip 及 Ink4 研究进展. 国外医学分子生物学分册 (Cao Yao-qiong, Qiao shou-yi, Zhao Shou-yuan. Study progress on cyclins dependent kinases Kip and Ink4 *Foreign Med Sci (Molecular Biology)*), 1998, **20**: 1~ 5
- 11 Andrew Y, Rhonda S, Susi V, Richard C. FM S (CSF-1 receptor) prolongs cell cyclin and promotes retinoic acid-induced hypophosphorylation of retinoblastoma protein, G₁ arrest, and cell differentiation *Exp Cell Res*, 1996, **229**: 111~ 125
- 12 刘新光, 于树玉. 全反式视黄酸和亚硒酸钠对 HL-60 细胞 Rb 基因的 RNA 表达及其产物磷酸化的影响. 癌症 (Liu Xin-guang, Yu Shu-yu, Effects of all-*trans* retinoic acid and sodium selenite on RNA of retinoblastoma gene (Rb) of human myeloid leukemia cells (HL-60) and phosphorylation of its gene product, *Chin J Cancer*), 1998, **17**: 435~ 437