- 9 Telfer A, He W Z, Barber J. Spectral resolution of more than one chlorophyll a electron donor in the isolated photosystem II reaction center complex. *Biochim Biophys Acta*, 1990, 1017: 143~ 151

(1998-05-14 收稿, 1998-07-23 收修改稿)

CDK4 反义 RNA 对乳腺癌细胞增殖及 cyclinD1, cyclinE 和 CDK2 表达的影响

桑建利 王永潮

(北京师范大学生物系细胞增殖及调控生物学开放实验室, 北京 100875)

摘要 利用反义 RNA 抑制乳腺癌细胞中 CDK4 基因的表达, 观察分析了此基因与癌细胞增殖速率、成瘤性以及 cyclinD1, cyclinE 和 CDK2 表达的相关性. 当 CDK4 表达受到抑制后, 细胞的增殖速率和致瘤性明显降低, 显示出 CDK4 在乳腺肿瘤发生与发展中的重要作用. cyclinE 基因的表达水平有较大幅度的下降, cyclinD1 和 CDK2 基因表达水平变化较小, 可以推测 cyclinE 的表达依赖于 CDK4 的诱导. 这样, CDK4 表达的抑制不仅影响自身的作用, 还影响其他基因的表达, 细胞周期进程由此受到精确的调控.

关键词 CDK4 乳腺癌细胞 反义 RNA cyclinD1

细胞增殖的失控是癌细胞的主要特征之一, 致使其失控的因素有许多种, 其中 cyclin 和 CDK 基因的异常起着重要的作用^[1, 2], 这是由于不同种类的 cyclin 和 CDK 基因的顺序表达控制着增殖细胞的周期进程. 已有研究证实 cyclinD1 就是一种细胞原癌基因^[3], 对其他种类的 cyclin 基因在癌细胞中的表达也有广泛的研究^[4], 但对于 CDK 基因与癌细胞恶性特征之间的关系以及 CDK 与 cyclin 基因在表达上的相互影响缺乏专门的研究. 我们选取 CDK4 基因, 利用反义 RNA 抑制基因表达的技术, 探讨了此基因在表达受到抑制后, 乳腺癌细胞在增殖速率和致瘤性上的变化以及对 cyclinD1, cyclinE 和 CDK2 表达的影响.

1 材料与方法

(1) 实验材料. 乳腺癌细胞系 Bcap-37 来自北京医科大学第二附属医院妇科肿瘤研究所, 采用 PRMI1640 培养基加 10% 小牛血清于 37℃ 含 5% CO₂ 的培养箱中培养.

(2) 真核细胞反义 RNA 表达载体的构建及细胞转染. a. 本研究所用的 cyclinD1, CDK4 基因 cDNA 由美国 Cold Spring harbor 实验室的 David Beach 博士惠赠, cyclinE 基因 cDNA 由美国 Scripps 研究所的 Steve Read 博士惠赠, 真核细胞表达载体 pXJ41-neo 由新加坡国立大学王跃博士惠赠. 用 BamH I 和 Kpn I 双酶切 CDK4 cDNA 和表达载体, 通过将酶切基因片段与载体质粒连接构建成 CDK4 反义 RNA 真核细胞表达载体. b. 细胞转染采用《分子克隆实验指南》介绍的磷酸钙共沉淀法.

(3) 细胞生长曲线测定及流式细胞光度术分析. a. 取对数生长期细胞, 将其密度稀释成 1×10^4 个/mL 于小培养皿中培养, 每 24 h 取 1 次样, 每次 3 个重复, 计数后取平均数, 绘制成细胞生长曲线. b. 取对数生长期细胞, 用 75% 乙醇固定过夜, PBS 洗 2 次后加入 RNaseA (100

$\mu\text{g}/\text{mL}$) 37°C 保温 30~ 60 min, 然后加入 PI ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) 在冰上染色 30 min, 用流式细胞分析仪测定.

(4) 软琼脂培养试验及裸鼠致瘤试验. a. 制备含 0.5% 琼脂的培养基, 取适当的量铺在 6 孔板每个孔的底部, 再取适量的含有 0.35% 琼脂的细胞悬浮液铺在上面进行培养, 约 3 周时在倒置显微镜上观察并记录结果. b. 将细胞制成单细胞悬液, 接种 6~ 8 周龄雌性 Bal b/c 裸鼠的前肢下或腹部, 每只裸鼠接种 0.2 mL (约含 6×10^6 个细胞) 每周观察 2 次并记录成瘤情况.

(5) Northern blot 分析. 按照《分子克隆实验指南》中的操作方法进行.

2 结果

2.1 细胞增殖能力的变化

用反义 RNA 使 CDK4 基因的表达受到抑制后, 与对照相比, 细胞的生长速率明显减慢. 培养至第 6 天时细胞生长抑制率为 51% (图 1). 细胞周期各时相的细胞所占比例发生明显变化: G1 期细胞所占比例从 40% 增加到 55%, S 期细胞所占比例从 56% 下降到 41% (图 2).

图1 CDK4 受抑制的乳腺癌细胞与对照相比生长速率的变化

图2 CDK4 受抑制的乳腺癌细胞与对照相比细胞周期时相分布的变化

(a) CDK4 表达受到抑制的细胞; (b) 对照细胞

2.2 细胞致瘤性的变化

CDK4 表达受到抑制的细胞在软琼脂中成集落能力下降, 一方面克隆形成率下降 69%, 另一方面形成的集落小于对照细胞 (图 3). 裸鼠接种细胞后, 对照组在近 2 周时就形成明显可见的肿瘤, 而 CDK4 表达受到抑制的细胞在近 10 周时, 仍无肿瘤形成, 这表明 CDK4 基因的表达与肿瘤细胞的恶化程度有着密切的关系.

2.3 cyclinD1, cyclinE 和 CDK2 基因表达的变化

分别从表达 CDK4 反义 RNA 的细胞和对照细胞中提取 RNA, 利用 Northern blot 分析了

图3 CDK4受抑制后,细胞在软琼脂中成集落能力降低
(a) CDK4表达受到抑制的细胞;(b) 对照细胞

cyclinD1, cyclinE 和 CDK2 的基因表达水平(图4),结果显示, cyclinD1 的 mRNA 水平变化不明显, cyclinE 表达水平有较大的下降, CDK2 的表达略有降低. 这说明 CDK4 表达受到抑制后, 主要影响 cyclinE 的表达, 对 cyclinD1 和 CDK2 的影响较小.

3 讨论

细胞周期的进程是由 cyclin 和 CDK 基因来调控的, 细胞进入增殖周期, 首先要通过 G1 期一个重要的调控点, 即限制点. 这个限制点由 cyclinD 和 CDK4 控制, 当 cyclinD(主要是 cyclinD1)与 CDK4 形成有活性的蛋白激酶复合体, 便可启动细胞周期的进行. cyclinD1 在癌细胞中的异常表达已有大量的研究, 现普遍认为它是一种细胞原癌基因^[2,3]. 由于 cyclinD1 基因产物在蛋白激酶复合体中为调节亚基, 且在细胞周期运行中呈周期性变化, 近几年里一直成为研究的重点, 并发现将 cyclinD1 抗体引入细胞可减弱肿瘤细胞的增殖能力^[5]. CDK4 基因产物为催化亚基, 在细胞周期中相对稳定因而未受足够的重视. 但从本研究结果看, CDK4 表达受到抑制后, 细胞的增殖速率明显减慢, 细胞生长抑制率达 51%, 流式细胞术分析的结果显示 G1 期细胞比例上升, S 期细胞比例下降, 进一步表明细胞增殖受到抑制. 不难理解由于 cyclinD1 与 CDK4 基因产物形成复合体才具有活性启动细胞周期, 若仅有 cyclinD1 的高表达, CDK4 的表达受到抑制, 细胞的增殖能力必然会下降. 实验结果还表明, CDK4 受到抑制后, 它在细胞周期调控点的作用没有其他基因可代替. 此外, 最近有文献报道在有些肿瘤细胞中 cyclinD1 和 CDK4 同时出现高表达^[6].

软琼脂成集落和裸鼠成瘤试验结果显示 CDK4 受到抑制的乳腺癌细胞其成瘤能力受到很强的抑制, 抑制的程度明显大于 cyclinD1 表达受到抑制的细胞(结果另发). 癌细胞的致癌

图4 CDK4受抑制的乳腺癌细胞与对照细胞中
几种基因表达的 Northern blot 分析
(a) cyclinD1; (b) cyclinE; (c) CDK2. 1为 CDK4 表达
受到抑制的细胞, 2为对照细胞

性受到多种因素作用,细胞无限制的快速增殖是其中一个重要因素. 我们的研究表明, cyclinD1 和 CDK4 受到抑制后都能降低细胞的增殖能力,同时使细胞的致瘤性减弱. 然而,将 CDK4 抑制后便可如此强烈地抑制细胞致瘤性,表明它与癌细胞的致瘤性有更为密切的关系,其原因除了与细胞增殖能力直接相关外,可能对癌细胞的恶性程度还有着其他的作用,这有待于进一步研究.

通过对 CDK4 受到抑制后, cyclinD1, cyclinE 和 CDK2 表达水平的分析,初步探讨了这几个基因在表达上的相互关系. 依据周期调控的研究结果,当细胞通过了 G1 期限制点,即 cyclinD1 与 CDK4 形成蛋白激酶复合体后, cyclinE 与 CDK2 复合体随之形成,并使细胞完成 G1/S 期的转换,所以说 cyclinE 和 CDK2 对于细胞进入 S 期是非常重要的. Musgrove 等人以乳腺癌细胞为材料,证实了在分裂素刺激细胞时, cyclinD1 在 G1 早期被诱导表达,随后是 cyclinE 表达, CDK2 被激活. 在细胞中增加 cyclinD1 的表达, cyclinE 的表达量随之增加. 他们提出诱导 cyclinD1 的表达就足以激活 CDK2^[7]. 从我们的实验结果看(图4), CDK4 的表达受到抑制后, cyclinD1 的表达水平未受到明显影响,说明这 2 个基因在表达上不存在直接的依存关系. 细胞中 cyclinE 的表达水平明显下降, CDK2 的表达水平有所降低. 可以推测 cyclinE 的表达对 CDK4 的表达有明显的依赖性. 如果细胞中仅有 cyclinD1 的表达,即使是高水平表达,而与其相应的 CDK4 的表达受到抑制, cyclinD1/CDK4 复合体的形成将受到影响,同时由于诱导 cyclinE 的表达受阻, cyclinE/CDK2 复合体也难以形成,细胞通过 G1 期的限制点以及完成 G1/S 期的转换就会大大减缓. 这样细胞周期就在基因水平上保证了在前一个过程未完成时,后一个过程就难以进行. 通过对这几个基因表达水平的分析,不仅可探讨它们间表达上的相互关系,而且有助于深入认识细胞增殖速率的下降及成瘤性明显减弱的原因. 总之,利用反义 RNA 的抑制作用,通过检测分析揭示出 CDK4 在乳腺癌细胞的恶性增殖及成瘤性中有重要的作用以及对相关基因表达有明显的影响,这方面的研究对深入了解细胞周期调控基因间的关系及与癌细胞发生的相关性是十分有益的.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号:39430080)重点资助项目.

参 考 文 献

- 1 Keyomarsi K, Pardee A B. Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 1 112~ 1 116
- 2 Gansauge S, Gansauge F, Ramadani M, et al. Overexpression of cyclinD1 in human pancreatic carcinoma is associated with poor prognosis. *Cancer Research*, 1997, 57: 1 634~ 1 637
- 3 Gillett C, Fantl V, Smith R. Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Research*, 1994, 54: 1 812~ 1 817
- 4 Buckley M F, Sweeney K J E, Hamilton J A, et al. Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene*, 1993, 8: 2 127~ 2 133
- 5 Lukas J, Bartek J, Strauss M. Efficient transfer of antibodies into mammalian cells by electroporation. *Journal of Immunological Methods*, 1994, 170: 255~ 259
- 6 Zhang T, Nanney L B, Luongo C, et al. Concurrent overexpression of cyclinD1 and cyclin-dependent kinase 4 in intestinal adenomas from multiple intestinal neoplasia mice and human familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Research*, 1997, 57: 169~ 175

- 7 Musgrove E A, Sarcevic B, Sutherland R. Inducible expression of cyclin D1 in T_47D human breast cancer cells is sufficient for cdk2 activation and pRB hyperphosphorylation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1996, 60: 363~ 378

(1998-05-19 收稿, 1998-08-06 收修改稿)

原麝安徽亚种分类地位的再研究

李明^④ 李元广 盛和林 玉手英利^④ 增田隆一
永田纯子 大泰司纪之

(华东师范大学生物学系, 上海 200062; ④中国科学院动物研究所, 北京 100080; ④石卷专修大学, 石卷 986, 日本;
北海道大学, 札幌 060, 日本)

摘要 自分布于安徽大别山的麝标本被定名为原麝安徽亚种以来, 就其分类地位的划分产生了众多分歧, 不同学者从形态学和生态学方面研究得出了多种不同的结论. 为了对安徽亚种的分类地位有一明确认可, 本研究利用形态特征、头骨形态差异的主成分分析和线粒体 DNA (mtDNA) 细胞色素 b 的 367 bp 片段序列差异, 对该亚种的分类地位进行再探讨. 经分析得出安徽麝标本与其他麝在外部形态和头骨形态上均存在着明显的差异, 而且它们之间的 DNA 序列差异在 6.24%~7.90%, 处于鹿类动物的种间差异水平. 据此, 从形态学和分子水平上认为安徽所产的麝应为一个独立种, 即安徽麝 (*Moschus anhuiensis* Wang, Hu et al).

关键词 安徽麝 形态特征 细胞色素 b 分类

安徽麝标本来自安徽大别山区, 自王岐山等人^[1]将安徽大别山的麝定为原麝安徽亚种 (*Moschus moschiferus anhuiensis*) 以来, 就该亚种的分类地位问题一直存在着不同的观点^[2~5]. Groves 等人^[2]认为安徽亚种在外形上与林麝更为接近, 因此厘定为林麝安徽亚种 *M. berezovskii anhuiensis*, 这种观点也得到了一些学者的认同^[4, 5]. 但盛和林^[3]则一直认为安徽所产的麝应为原麝安徽亚种, 并认为林麝也是原麝的一个亚种. 正由于这些宏观研究结果的不一致, 从而对安徽亚种的分类地位一直存在着很大的争论而未取得一致的看法. 为了对该亚种的分类地位有个明确的定位, 本研究从分子水平对其进一步研究, 并结合前人的形态学研究结果分析后认为, 分布于安徽的麝也是一个独立的种, 因而其学名应更改为安徽麝 (*Moschus anhuiensis* Wang, Hu et al), 并且原麝与林麝也应当保留其种级分类地位.

1 材料与方法

(1) 样本采集. 用于分子水平分析的安徽麝的皮张标本来自安徽大别山, 林麝指名亚种 (*M. berezovskii berezovskii*) 的肌肉样品来自华东师范大学麝饲养场, 林麝云贵亚种 (*M. b. yunguiensis*) 来自中国科学院昆明动物研究所, 马麝 (*M. chrysogaster*) 来自甘肃兴隆山. 对结果进行比较分析的东北原麝 (*M. moschiferus parvipes*) 的细胞色素 b 片段序列来自 GenBank (1997). 在形态学分析中, 用于测量头骨的标本都来自华东师范大学动物生态研究室, 其中个体数分别为原麝 9 个、安徽麝 4 个、林麝 25 个和马麝 8 个.

(2) 实验方法. () 形态学比较只选取了雄性个体进行头骨差异的分析. 头骨测量指

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-2-184>