

细胞周期蛋白依赖性激酶-2两种剪接体在SH-SY5Y细胞中共表达

近年来, 研究发现, 一些丝/苏氨酸激酶和其相结合的蛋白(细胞周期素, cyclin)是细胞周期调控的重要因素。肿瘤细胞的发生、发展与细胞周期的调节失控密切相关, 细胞周期蛋白依赖性激酶-2(CDK-2)是调节细胞周期中一个重要的激酶, 调节细胞由G₁期进入S期。SH-SY5Y细胞是一种成神经瘤细胞(human neuroblastoma cell), 本实验旨在研究在此细胞中的表达情况。

1 材料与方法

1.1 材料

SH-SY5Y细胞由中国医学科学院基础医学研究所提供。细胞培养基1640、胎牛血清购自Gibco-BRL公司。RNA提取试剂异硫氰酸胍、DEPC(焦碳酸二乙酯)为Sigma产品。反转录酶AMV、Taq酶、DNase I、连接酶、pMD18-T载体等购自Takara公司。CDK-2基因的引物(P1, 5' cttctgccattctcatcgg-3'; P2, 5' gcttgtagg gt cgtagtg-3')以及载体上的引物(primer A 5'-gta aaacgacggccagt-3'; primer B 5'-caggaacagctatgac-3')由上海博亚公司合成。

1.2 方法

1.2.1 SH-SY5Y细胞的同步化和周期分析 用含羞草氨酸俘获法进行同步化, 使细胞处于G₁/S期。按文献[9]进行。用流式细胞分析法进行周期分析。

1.2.2 SH-SY5Y细胞的细胞质总RNA的提取 参照文献[1]进行。

1.2.3 逆转录PCR反应 取20 μg总RNA(经DNase I消化后, 溶于DEPC水)、2 μg oligo(dT)₁₈、15U AMV、Rnasin 20 U、5×buffer 10 μl和适量的水使总体积为50 μl, 42 °C反应1 h合成cDNA第一条链。取逆转录产物2 μl, 加入引物P1、P2(20 mmol/L)各2 μl, 进行PCR反应, 总体积为50 μl。

1.2.4 PCR产物银染 按文献[2]进行。

1.2.5 PCR产物的克隆 取PCR产物4.5 μl与pMD18-T载体连接。转化XL-1细菌, 挑选克隆, pMD18-T载体上的引物(primerA 和 primerB)进行鉴定, 测序。

2 结果

流式细胞计量仪分析结果见图1。

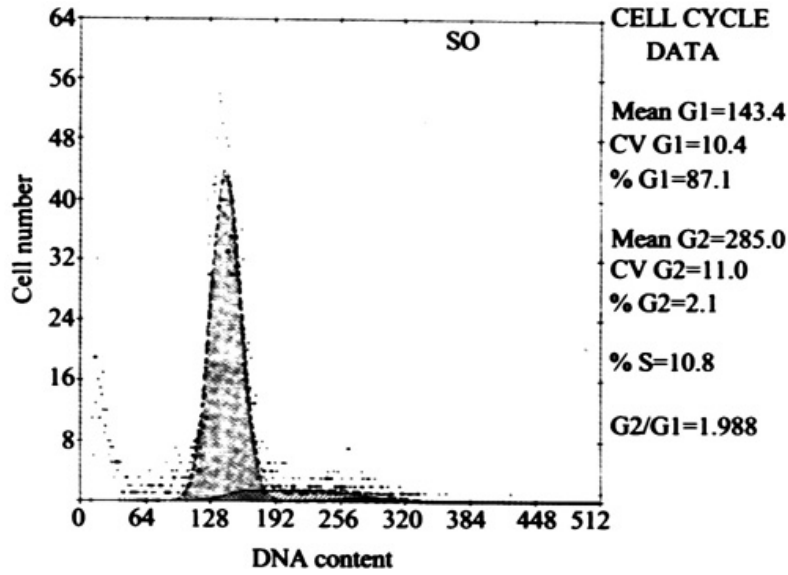


图1 流式细胞计量仪分析图
Fig.1 Results of the FACS analysis

图1 流式细胞计量仪分析图
Fig.1 Results of the FACS analysis

PCR产物经聚丙烯酰胺胶电泳和银染后，PCR产物有两条DNA带，一个为470 bp左右(B_1)、另一DNA带大约为370 bp(B_2)，且染色较淡(图2)。

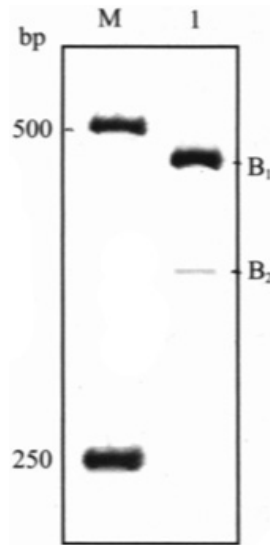


图2 PCR产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳银染
Fig.2 PCR products with silver staining on non-denaturing poly-acrylamide gel
M: Marker; Lane 1: PCR products

从胶上分离、纯化此两个DNA片段，与pMD18- T载体连接，PCR鉴定后测序，并在NCBI的核酸数据库里检索。结果显示两个片段，均是CDK-2的一部分。 B_1 序列与X61622.1序列完全一致，第4外显子结束，紧接着第5外显子序列，即GAG(486)-G(487)TGGTGAC；在图3中相对的位置为GAG(165)-G(166)TGGTGAC。而 B_2 的序列是当第4外显子结束，紧接着为第6外显子序列，即GAG(486)-G(589)TGACTCG；在图4所对应的位置是GAG(179)-G(180)TGACTCG，与AB012305.1序列一致。

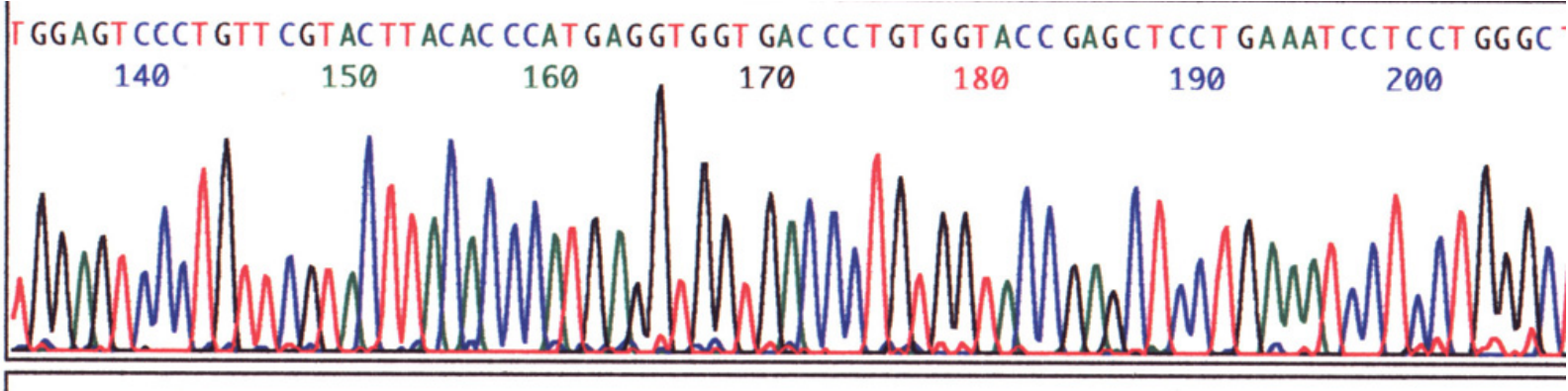


图3 B1的测序部分结果
Fig.3 Part of the sequencing results of B₁ DNA band

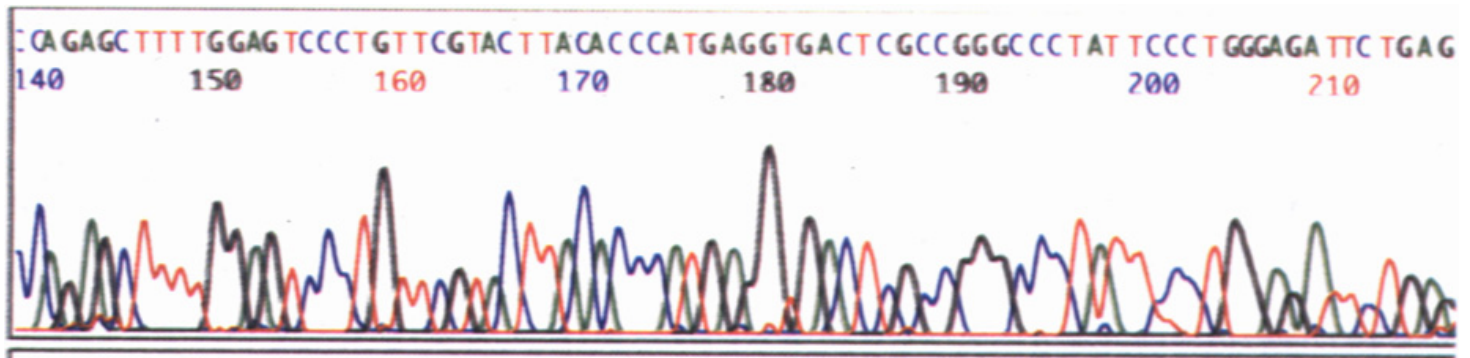


图4 B2的测序部分结果
Fig.4 Part of the sequencing results of B₂ DNA band

3 讨论

目前的研究结果表明,细胞周期是受细胞周期素(cyclins)和CDK形成的蛋白质复合物进行严格的调节的。细胞周期素主要有cyclinA、B、C、D、E,其中cyclinD至少包含cyclinD1、D2和D3三个亚型。与细胞周期素相结合的激酶主要是cdc2,由于其相对分子质量为34 000,常写作P34cdc2。在动物细胞中还有一些与P34cdc2相似的CDKs,如CDK-2、CDK-4、CDK-5和CDK-6,它们分别与不同的细胞周期素相结合,发挥调节细胞周期的作用。CDK-2与P34cdc2在蛋白质序列上具有65%的相似性[3]。

细胞周期有两个限制点,一个调控点是G₂/M期;另一个是G₁/S转折点,在此转折点,CDK-2发挥了重要的作用。使用含盖草氨酸这种有效的G₁/S期同步化试剂处理SH-SY5Y细胞,通过流式细胞计量仪检测细胞周期中DNA含量的变化确定细胞同步化于G₁/S期。Cyclin E的表达与CDK-2结合使CDK-2磷酸化而活化,促使细胞通过该限制点进入S期[4];进入S期后,cyclin A与CDK-2结合进一步促进DNA的合成。

在一些肿瘤中,CDK-2的表达异常[5]或与其结合的cyclin E表达异常升高[6],RA(全反式维甲酸)等药物对肿瘤的治疗作用可能通过对CDK-2的抑制作用[7][8]。Nishikawa等报道在乳腺癌中的CDK-2是缺失了一个外显子(34个氨基酸)。

SH-SY5Y细胞是成神经瘤(小儿常见的脑肿瘤)细胞的一种,它对RA的作用下可以分化成具有神经元表型细胞。作者在研究CDK-2在SH-SY5Y细胞中的表达过程中,发现CDK-2的这两种剪接形式并存表达,在变异剪接体中第五个外显子缺如,但其表达量较正常的剪接体少很多,在琼脂糖凝胶上用溴化乙锭染色很难观察出来,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳才可以显示(图1)。这种剪接形式经克隆测序证实(图3、4)。

这种两种剪接方式在SH-SY5Y细胞中共表达,鲜有报道,其作用不明,仍有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Chmezynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal Biochem, 1987, 162(1): 156-9.
- [2] 赵菲,张素娟,蒋胜辉. 核酸电泳银染技术与干胶制备的改良[J]. 临床与实验病理学杂志, 1999, 15(5): 401.
Zhao F, Zhang SJ, Jiang SH. The argentine technology of nucleic acid electrophoresis and the improve of wafer' preparation[J]. J Clin Exp Pathol, 1999, 15(5): 401.
- [3] Tsai LH, Harlow E, Meyerson M. Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase[J]. Nature, 1991, 353(6340): 174-7.
- [4] Hinchcliffe EH, Li C, Thompson EA, et al. Requirement of Cdk2- cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in Xenopus egg extracts[J]. Science, 1999, 283(5403): 851-4.
- [5] 马向东,陈必良,王德堂,等. 细胞周期蛋白依赖性激酶2、热休克蛋白60在宫颈癌组织中的表达[J]. 现代妇产科进展, 2000, 9(5): 335-7.

- Ma XD, Chen BL, Wang DT, et al. Expressions and significance of cyclin-dependent kinase2, heat shock protein60 in human cervicalcarcinoma[J]. Prog Obstet Gynecol, 2000, 9(5): 335-7.
- [6] Muller TC, Metzger R, Kugler K, et al. Cyclin E is the only cyclin-dependent kinase 2-associated cyclin that predicts metastasis and survival in early stage non-small cell lung cancer[J]. Cancer Res, 2001,61(2): 647-53.
- [7] 郎海滨, 糜漫天, 张乾勇, 等. 视黄酸对CDK-2组成性表达HL-60细胞增殖的影响[J]. 免疫学杂志, 2000, 16(2): 99-101.
- Lang HB, Mi MT, Zhang QY, et al. Influence of retinoic acid on CDK2-overexpressing HL-60 cells[J]. Immunol J, 2000, 16(2): 99-101, 122.
- [8] Park JH, Oh EJ, Choi YH, et al. Synergistic effects of dexamethasone and genistein on the expression of Cdk inhibitor p21WAF1/ CIP1 in human hepatocellular and colorectal carcinoma cells[J]. Int J Oncol, 2001, 18(5): 997-1002.
- [9] [美]DL 斯佩克特, RD 戈德曼, LA 莱因万德, 等著. 黄培堂译. 细胞实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 95-7.

参考文献:

- [1] Chmezynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-
chloroform extraction[J]. Anal Biochem, 1987, 162(1): 156-9.
- [2] 赵菲, 张素娟, 蒋胜辉. 核酸电泳银染技术与干胶制备的改良[J]. 临床与实验病理学杂志, 1999, 15(5): 401.
- Zhao F, Zhang SJ, Jiang SH. The argentine technology of nucleic acid electrophoresis and the improve of wafer' preparation[J]. J Clin Exp Pathol, 1999, 15(5): 401.
- [3] Tsai LH, Harlow E, Meyerson M. Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase[J]. Nature, 1991, 353(6340): 174-7.
- [4] Hinchcliffe EH, Li C, Thompson EA, et al. Requirement of Cdk2- cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in Xenopus egg extracts[J]. Science, 1999, 283(5403): 851-4.
- [5] 马向东, 陈必良, 王德堂, 等. 细胞周期蛋白依赖性激酶2、热休克蛋白60在宫颈癌组织中的表达[J]. 现代妇产科进展, 2000, 9(5): 335-7.
- Ma XD, Chen BL, Wang DT, et al. Expressions and significance of cyclin-dependent kinase2, heat shock protein60 in human cervicalcarcinoma[J]. Prog Obstet Gynecol, 2000, 9(5): 335-7.
- [6] Muller TC, Metzger R, Kugler K, et al. Cyclin E is the only cyclin-dependent kinase 2-associated cyclin that predicts metastasis and survival in early stage non-small cell lung cancer[J]. Cancer Res, 2001,61(2): 647-53.
- [7] 郎海滨, 糜漫天, 张乾勇, 等. 视黄酸对CDK-2组成性表达HL-60细胞增殖的影响[J]. 免疫学杂志, 2000, 16(2): 99-101.
- Lang HB, Mi MT, Zhang QY, et al. Influence of retinoic acid on CDK2-overexpressing HL-60 cells[J]. Immunol J, 2000, 16(2): 99-101, 122.
- [8] Park JH, Oh EJ, Choi YH, et al. Synergistic effects of dexamethasone and genistein on the expression of Cdk inhibitor p21WAF1/ CIP1 in human hepatocellular and colorectal carcinoma cells[J]. Int J Oncol, 2001, 18(5): 997-1002.
- [9] [美]DL 斯佩克特, RD 戈德曼, LA 莱因万德, 等著. 黄培堂译. 细胞实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 95-7.