

## 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

岳枫<sup>1</sup>, 马文丽<sup>1</sup>, 张宝<sup>1</sup>, 宋艳斌<sup>1</sup>, 郑文岭<sup>2</sup> (<sup>1</sup>第一军医大学分子生物学研究所, <sup>2</sup>广州军区总医院分子肿瘤研究所, 广东 广州 510515)

**摘要:**目的 观察细胞周期蛋白依赖性激酶-2(CDK-2)在 SH-SY5Y 细胞中的表达情况。方法 采用 RT-PCR 方法研究 CDK-2 的表达,用 DNA 银染技术观察 PCR 产物,割胶回收后,克隆到载体上、测序。结果 在聚丙烯酰胺胶上可以观察到两条 DNA 带,相对分子质量小的 DNA 带染色较弱;将两条 DNA 带切下,回收后与载体连接,测序证实两条 DNA 带均为 CDK-2 基因的产物。结论 CDK-2 的两种剪接形式在 SH-SY5Y 细胞中共表达,其中一种剪接形式是第五外显子缺失,但其表达量比较弱,其作用机制仍有待于进一步研究。

**关键词:**SH-SY5Y 细胞 / 酶学;细胞周期;细胞周期蛋白依赖性激酶-2;剪接变异

**中图分类号:**Q954.598 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-2588(2004)03-349-03

### Co-expression of two spliceosomes of cyclin-dependent kinase-2 in SH-SY5Y cells

YUE feng<sup>1</sup>, MA Wen-li<sup>1</sup>, ZHANG Bao<sup>1</sup>, SONG Yan-bin<sup>1</sup>, ZHENG Wen-ling<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; <sup>2</sup>Institute of Molecular Oncology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510000, China

**Abstract: Objective** To investigate the expression of cyclin-dependent kinase-2 (CDK-2) gene in SH-SY5Y cells. **Methods** The expression of CDK-2 gene was examined with reverse transcriptional (RT)-PCR, and the PCR products underwent electrophoresis on non-denaturing poly-acrylamide gel (PAG) followed by silver staining. The separated and purified DNAs were ligated into pMD18-T vector, and the positive clones identified by sequence analysis. **Results** Two DNA bands were displayed on PAG, and the one with smaller molecular weight was less intensively stained. The sequences of the two clones indicated that both were products of CDK-2 gene. **Conclusion** Two kinds of CDK-2 gene products are co-expressed in the SH-SY5Y cells, one of which lacks the fifth exon and is expressed at a low level.

**Key words:** SH-SY5Y cells/enzymology; cyclin-dependent kinase; cell cycle; spliced variants

近年来,研究发现,一些丝/苏氨酸激酶和其结合的蛋白(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 G<sub>1</sub> 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'-caggaaacagctatgac-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 用含草氨酸俘获法进行同步化,使细胞处于 G<sub>1</sub>/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)<sub>18</sub>、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。

收稿日期:2003-11-14

作者简介:岳枫(1975-),第一军医大学在读硕士研究生,E-mail: yuefeng@fimmu.com

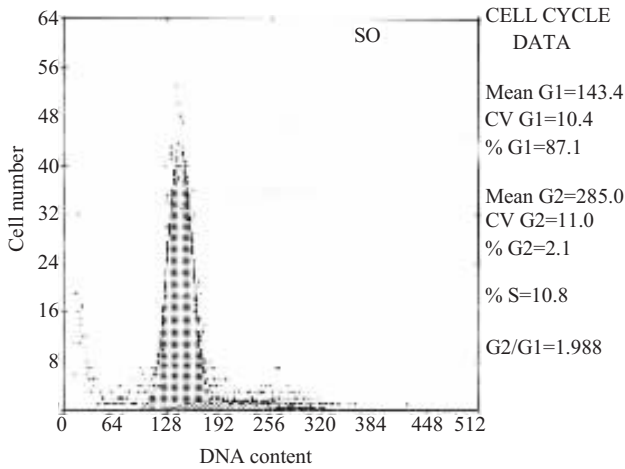


图 1 流式细胞计量仪分析图  
Fig.1 Results of the FACS analysis

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<sub>1</sub>)、另一 DNA 带大约为 370 bp(B<sub>2</sub>),且染色较淡(图 2)。

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

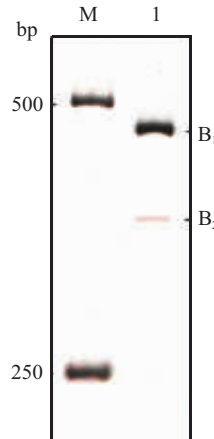


图 2 PCR 产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳银染  
Fig.2 PCR products with silver staining on non-denaturing poly-acrylamide gel  
M: Marker; Lane 1: PCR products

据库里检索。结果显示两个片段,均是 CDK-2 的一部分。B<sub>1</sub> 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<sub>2</sub> 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。

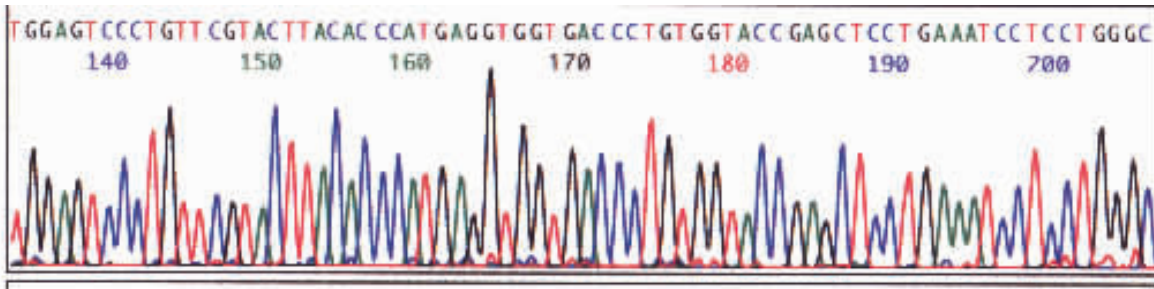


图 3 B<sub>1</sub> 的测序部分结果  
Fig.3 Part of the sequencing results of B<sub>1</sub> DNA band

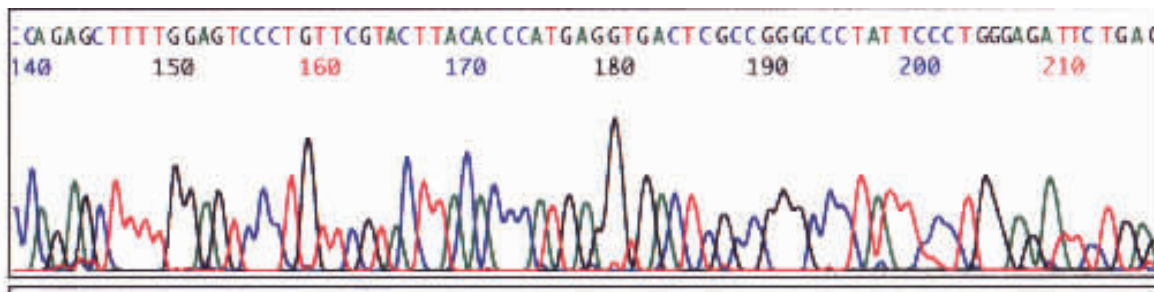


图 4 B<sub>2</sub> 的测序部分结果  
Fig.4 Part of the sequencing results of B2 DNA band

### 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<sup>[3]</sup>。

细胞周期有两个限制点,一个调控点是 G<sub>2</sub>M

期;另一个是 G<sub>1</sub>/S 转折点,在此转折点,CDK-2 发挥了重要的作用。使用含羞草氨酸这种有效的 G<sub>1</sub>/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 G<sub>1</sub>/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<sup>[4]</sup>;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<sup>[5]</sup>或与其结合的 cyclin E 表达异常升高<sup>[6]</sup>,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<sup>[7,8]</sup>。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 cervical-carcinoma[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.

(上接 346 页)

血供相对减少对吻合口组织愈合无影响,因此免残胃是吻合口的主要供血来源。免食管、胃残端血供减少组吻合口管径大小与正常对照组相比无统计学差异,表明吻合口管径完全取决于吻合操作技术,与食管、胃残端血液供应相对减少关系不大。食管、胃残端血供减少是否与吻合口的远期狭窄相关,有待于进一步研究。

本实验结果提示在食管、贲门癌手术操作过程中,可充分游离食管、胃体以保证手术安全、吻合确切,以达到肿瘤手术切除根治目的,术中不应拘泥于食管残端游离长度和胃体管状成形利用的限制,娴熟的手术技术是吻合口组织愈合的主要保证。Schroder<sup>[7]</sup>发现 7 例食管癌伴腹腔干动脉明显狭窄(>50%)患者,其吻合口组织血供相对减少,但未发现一例颈、胸吻合口瘘,本实验为这一临床结果提供了实验学基础。

#### 参考文献:

- [1] 刘 锴, 王云杰, 范 萌, 等. 食管胃吻合口的组织学病理学功能学及临床研究 [J]. 中华胸心血管外科杂志 (Chin J Thorac Cardiovasc Surg), 1994, 10: 70-2.
- [2] Meltem BK, Tanyel FC, Sevda M, et al. The preventive effect of heparin on stricture formation after caustic esophageal burns[J]. J Pediatr Surg, 1999, 34: 291-4.
- [3] 易小全. 围手术期化疗对大鼠结肠吻合口愈合的影响[J]. 中国肛肠病杂志(Chin J Coloproctol), 1999, 19(1): 24-6.
- [4] Law S, Arcilla C, Chu KM, et al. The significance of histologically infiltrated resection margin after esophagectomy for esophageal cancer[J]. Am J Surg, 1998, 176: 286-90.
- [5] Swanson SJ, Batirel HF, Bueno R. Transthoracic esophagectomy with radical mediastinal and abdominal lymph node dissection and cervical esophagogastrostomy for esophageal carcinoma [J]. Ann Thorac Surg, 2001, 72(6): 1918-24.
- [6] 昂春臣, 蒋 毅, 王培祥. 颈部食管胃粘膜延长单层吻合术 1032 例疗效观察[J]. 山东医学(Shangdong Med), 2002, 4(1): 7-8.
- [7] Schroder W, Zahringer M, Stippel D, et al. Does celiac trunk stenosis correlate with anastomotic leakage of esophagogastrostomy after esophagectomy[J]? Dis Esophagus, 2002, 15(3): 232-6.