

DOI: 10.11844/cjcb.2013.06.0049

# RasG及相关蛋白与盘基网柄菌细胞增殖相关性的研究

许苏娟 侯连生\*

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

**摘要** RasG是盘基网柄菌单细胞增殖过程中的关键蛋白, 其基因的异常表达常会导致细胞增殖速度的改变。经观察发现, 尿囊酸酶基因干扰后的盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)细胞(RNAi-*allC*)的分裂速度明显快于野生型KAX-3细胞。为探讨RasG及相关蛋白参与盘基网柄菌细胞增殖的调控机制, 该文使用实时荧光定量PCR检测受体酪氨酸激酶/Ras途径的*disc I*、*myo I*、*gef R*、*rasG*、*mkk A*、*mek A*及*erk A*在KAX-3和RNAi-*allC*细胞中mRNA水平上的表达情况。蛋白免疫印迹检测两细胞中Disc I和RasG的蛋白含量。实时荧光定量PCR结果显示, 所有检测的基因在两种类型细胞中的表达均存在差异; 相对于KAX-3细胞, RNAi-*allC*细胞除*disc I*和*rasG*显著下调外, 其他基因均明显上调。蛋白免疫印迹结果显示, RNAi-*allC*细胞中Disc I和RasG的蛋白含量明显少于野生型细胞( $P<0.05$ )。这些数据提示, 尿囊酸酶基因的干扰引起了RasG和RasG上下游蛋白含量的变化, 最终导致细胞周期缩短, 细胞增殖加快。说明RasG及相关蛋白可能参与了盘基网柄菌细胞增殖的调控。

**关键词** 盘基网柄菌; RasG蛋白; 受体酪氨酸激酶/Ras途径; 尿囊酸酶; 细胞增殖

## Correlation Between RasG with Its Relative Proteins and Cell Proliferation of *Dictyostelium discoideum*

Xu Sujuan, Hou Liansheng\*

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

**Abstract** RasG is involved in cell proliferation. The abnormal expression of *rasG* can significantly affect *Dictyostelium discoideum* cell proliferation. RNAi-*allC* cells (silence of allantoicase gene) grew more quickly than wild-type cells KAX-3. To study the molecular mechanism of RasG and its relative proteins during the cell proliferation, the relative genes of RTK/Ras pathway including *disc I*, *myo I*, *gef R*, *rasG*, *mkk A*, *mek A* and *erk A*, were compared by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR). Disc I and RasG proteins were detected by Western blot. qRT-PCR results showed that these genes were obviously differentially expressed in the two types of cells. In contrast with KAX-3 cells, the expression of *disc I* and *rasG* in RNAi-*allC* cells was markedly down-regulated, while others increased. Western blot results showed that the expression of Disc I and RasG was significantly lower in RNAi-*allC* cells than in KAX-3 cells ( $P<0.05$ ). It indicated that the high-speed division rate of RNAi-*allC* cells was due to the change of RasG and its relative proteins expression. The above results suggest that RasG and its relative proteins may play important roles in the regulation of *D. discoideum* cell proliferation.

**Key words** *Dictyostelium discoideum*; RasG protein; RTK/Ras pathway; allantoicase; cell proliferation

收稿日期: 2013-02-26 接受日期: 2013-04-28

国家自然科学基金(批准号: 30970316、30670266)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 021-62233767, E-mail: lshou@bio.ecnu.edu.cn

Received: February 26, 2013 Accepted: April 28, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30970316, 30670266)

\*Corresponding author. Tel: +86-21-62233767, E-mail: lshou@bio.ecnu.edu.cn

网络出版时间: 2013-05-31 13:38

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130531.1338.001.html>

在细胞增殖的调节过程中, 受体酪氨酸激酶/Ras途径是细胞生长信号传导网络中最重要传导通路之一, 几乎所有生长因子刺激细胞增殖的信号和大部分细胞因子信号都离不开该通路<sup>[1]</sup>。该途径中的“分子开关”Ras是调控细胞增殖的关键蛋白。Ras是一种小的鸟嘌呤核苷酸结合蛋白, 它的生物活

性由可调控的GDP/GTP循环所控制。*Ras*基因突变常见于人类的许多癌症中,突变后持续活化的生长信号能够导致细胞的恶性增殖<sup>[2]</sup>。因此,对*Ras*有关的信号转导通路进行研究,能够有助于寻找新的抗癌药物的靶位点。

盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)有相当大的*Ras*蛋白家族,现研究较为清楚的主要有*RasD*、*RasG*、*RasB*、*RasC*、*RasS*和*Rap*。这些蛋白分别在生长和发育的不同时期表达<sup>[3-5]</sup>。其中,在盘基网柄菌单细胞增殖阶段,*RasG*数量最多,且*rasG*基因的过表达会导致盘基网柄菌细胞增殖速度的减慢<sup>[6-7]</sup>。*RasG*与高等生物的H-*Ras*高度同源,但至今未曾有报道称*RasG*与高等生物一样,通过受体酪氨酸激酶/*Ras*途径调控细胞增殖。因此,研究受体酪氨酸激酶/*Ras*途径中的关键蛋白在盘基网柄菌生命活动中的作用,对了解*Ras*及其相关蛋白在低等生物复杂信号网络中的作用有重要意义,并对理解高等生物的受体酪氨酸激酶/*Ras*途径参与生命活动的调控机理有借鉴作用。

本实验室使用RNAi技术干扰盘基网柄菌的尿囊酸酶(allantoicase, *allC*)基因,获得RNAi-*allC*突变细胞。笔者在培养细胞的过程中发现,相对于野生型KAX-3细胞, RNAi-*allC*细胞形态变小,细胞的增殖速度明显加快,类似癌细胞的生长状况。有研究发现,在多数情况下,癌变细胞的恶性增殖与受体酪氨酸激酶/*Ras*途径中的各基因的异常表达密切相关<sup>[8]</sup>。为此,我们以RNAi-*allC*细胞为材料,并以KAX-3细胞作对照,通过实时荧光定量PCR和蛋白免疫印迹(Western blot)等技术检测*RasG*及与人类同源的受体酪氨酸激酶/*Ras*途径中的其它6个主要基因和蛋白的表达情况。探讨*RasG*及其相关蛋白参与盘基网柄菌细胞增殖调控的机制,能够为研究盘基网柄菌细胞增殖的机理奠定基础,并为高等生物复杂信号通路的研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株与细胞培养

1.1.1 细胞株 盘基网柄菌野生型KAX-3细胞。由多伦多大学医学院生化实验室Siu Chi-Hung惠赠;盘基网柄菌RNAi-*allC*细胞<sup>[9-10]</sup>。由本实验室通过RNAi技术对KAX-3细胞的尿囊酸酶基因进行干扰获得。

1.1.2 细胞培养 盘基网柄菌野生型KAX-3细胞和RNAi-*allC*细胞均培养于HL-5液体培养基<sup>[11]</sup>中,在21 °C下以79 r/min的转速于摇床上无菌培养。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞生长曲线的绘制及细胞周期时间的测定 取等量( $3 \times 10^4$ /mL)的野生型KAX-3细胞和RNAi-*allC*细胞分别接种于100 mL的HL-5培养基中培养。每隔2 h对RNAi-*allC*细胞计数,每隔12 h对KAX-3细胞计数。每次计数重复3次,计数结果取3次测量结果的平均值。以平均值的对数值为纵坐标、计数时间为横坐标作图。

根据细胞周期时间的测定方法,使用下列公式计算时间:  $2^0 \cdot Ni = 2^n \cdot Ne$ , Ni为开始计数时每毫升的细胞数, Ne为另外一个时刻每毫升的细胞数,两次计数的间隔时间为T, 细胞周期时间 =  $\ln 2 \cdot T / (\ln Ne - \ln Ni)$ 。要求Ne和Ni均为对数生长期内的细胞计数。

1.2.2 实时荧光定量PCR 收集等量( $1 \times 10^7$ /mL)对数期的野生型KAX-3细胞和RNAi-*allC*细胞,使用Trizol法分别提取两细胞的总RNA。TaKaRa反转录试剂盒反转cDNA,配制25  $\mu$ L的反应体系。其中,SYBR Premix Ex Taq 12.5  $\mu$ L, cDNA 1  $\mu$ L(10 ng),引物各0.25  $\mu$ L(20  $\mu$ mol/L),以上操作均在冰上配制完成。反应条件为: 95 °C 30 s; 94 °C 15 s, 55 °C 20 s, 72 °C 20 s, 40个循环后再于60 °C延伸5 s。所有基因均做3管平行。三管平行管的Ct值差距小于0.5为有效数据,结果取三管Ct值的平均值。根据 $\Delta\Delta Ct$ 法计算基因相对表达量,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值>1.0认为表达增高, <1.0认为表达降低, =1.0认为表达无改变<sup>[12]</sup>。检测基因及内参基因*GAPDH*的引物运用Primer 5.0软件设计。引物序列见表1。

1.2.3 蛋白免疫印迹 收集等量( $1 \times 10^7$ /mL)对数期的野生型KAX-3细胞和RNAi-*allC*细胞,分别提取两细胞的总蛋白。按Laemmli(1907)法<sup>[13]</sup>进行SDS-PAGE电泳分离蛋白质,转膜,5%脱脂奶粉室温封闭2 h,单克隆*Ras*一抗(鼠抗,稀释倍数1:1 000, Abcam公司)、PTK一抗(兔抗,稀释倍数1:1 000, Cell Signaling公司)和内参 $\beta$ -actin一抗(兔抗,稀释倍数1:1 000, Abcam公司) 4 °C孵育过夜,洗膜,分别用碱性磷酸酶(AP)标记的二抗(羊抗鼠IgG和羊抗兔IgG,稀释倍数1:4 000, 碧云天生物技术研究所)室温孵育2 h,洗膜, NBT/BCIP显影5 min,拍照。各条带灰度值结果以目的基因和内参基因灰度值之比表示。

表1 引物名称及序列  
Table 1 Primer sequences

引物 Primer	上游引物序列(5'→3') Upstream primer sequence(5'→3')	下游引物序列(5'→3') Downstream primer sequence(5'→3')	预扩增片段长度(bp) Fragment length(bp)
<i>GAPDH</i>	TAT GTC ATT CCG TGT TCC A	GTA TTT GTC AGA TTC AGA GGC	124
<i>disc I</i>	ATC AAT CGT AGA TAC CAA CC	TAC ACC AGT AAT AGC AGC AC	148
<i>myo I</i>	AGA TTA TGA TGT GGA TGG GTG	GGT TTG ACG ATA GGC TTG AC	137
<i>gefR</i>	TAT TGA AGA GCG TGT TA	AAG GAA GTA ATG GTG G	245
<i>rasG</i>	TGT CGT TGG TAA CAA ATG C	GGC AGA GGT TTC AAG GA	106
<i>mkk A</i>	CAT CAT TAT CCC CAA CTC A	GCA TTT GAC CCT TTT CTG T	181
<i>mek A</i>	CAG AGG GCT CAA TTT TCA	CAA TCT TTG CTT CAC CTT TAT	216
<i>erk A</i>	ATG GTG CCT ATG GAG TTG TTT	CAT CCG ATA ATG GTT GTG GT	279

1.2.4 统计学方法 所有实验数据均通过不同批次的3次重复实验获得, 每次重复实验又设立3组平行。所得数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 13.0统计分析软件对数据进行统计学分析, \* $P < 0.05$ 为显著性差异, \*\* $P < 0.01$ 为极显著差异。

## 2 结果

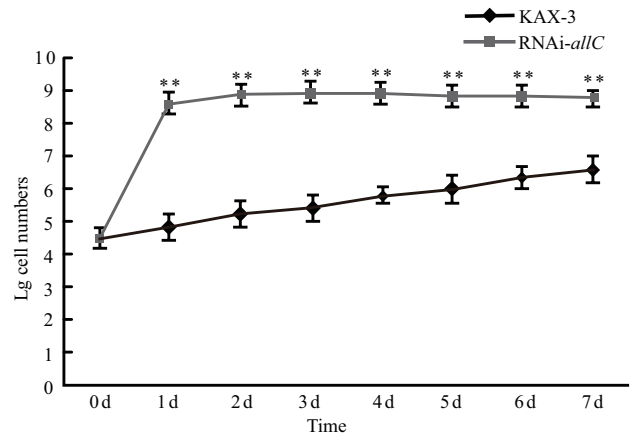
### 2.1 KAx-3和RNAi-*allC*细胞株的生长曲线和细胞周期

为比较KAx-3和RNAi-*allC*细胞的生长趋势, 等量接种 $3 \times 10^4$ /mL的两细胞株后, 定时定量统计细胞数, 实验不间断地持续7 d。根据细胞计数结果绘制两细胞株的生长曲线(图1)。从图中可看出, KAx-3细胞呈现平稳缓慢增长趋势, 到7 d时, 细胞数目才约 $3.99 \times 10^6$ /mL; 而RNAi-*allC*细胞仅1 d细胞数目就达 $4.14 \times 10^8$ /mL, 之后6 d内细胞数相对稳定, 7 d时约达 $6.3 \times 10^8$ /mL。根据细胞周期时间的计算方法, KAx-3细胞的细胞周期约为28.3 h, RNAi-*allC*细胞约为3.5 h。前者细胞周期约是后者的8倍。可见尿囊酸酶基因干扰后的细胞生长分裂速度明显快于野生型KAx-3细胞。

### 2.2 盘基网柄菌酪氨酸激酶/Ras途径相关蛋白氨基酸序列的对比结果与分析

为研究盘基网柄菌受体酪氨酸激酶/Ras途径中的相关蛋白, 我们先将人的RTK、Grb2、RasGEF、Ras、MAPKKK、MAPKK和MAPK氨基酸序列和盘基网柄菌数据库的所有氨基酸序列进行比对。结果显示, 盘基网柄菌中同源蛋白依次是: Disc I(50%)、Myo I(50%)、RasGEF R(39%)、RasG(75%)、MKK A(41%)、MEK A(31%)及ERK A(41%)。

尽管部分蛋白同源性不是很高, 查阅相关文献后证实, 盘基网柄菌的Disc I、RasGEF R、RasG、



数据通过3次重复测量获得, 每次重复实验设立3组平行, 即为9次测量结果的均值。误差线为标准差。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $n = 3$ 。

Each experimental data was obtained through three parallel experiments and there were three parallel groups in every parallel experiment, so the data above were average value by nine measuring results. Error line is the standard deviation. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $n = 3$ .

图1 KAx-3细胞和RNAi-*allC*细胞生长曲线

Fig.1 The growth curve of KAx-3 and RNAi-*allC* cells

MKK A、MEK A和ERK A的确是人的相应蛋白的同源蛋白<sup>[14-17]</sup>。但在分析Myo I结构域后, 发现Myo I蛋白仅含1个SH3结构域, 不含SH2结构域, 而Grb2蛋白含有1个SH2和2个SH3结构域, 其中SH2结构域能够特异性识别上游RTK的磷酸化酪氨酸pY及其C端的3-5个氨基酸残基, 其结合pY的孔穴中含有与pY结合的重要位点, 分别为 $\beta$ B5(第2个 $\beta$ -折叠的第5位氨基酸)-Arg,  $\alpha$ A2-Arg和 $\beta$ D6-Lys。在仔细分析Myo I氨基酸序列后, 发现Myo I也含有与pY结合的重要位点, 且与Grb2的SH2结构域的pY结合位点趋于一致。由此推断Myo I可能通过这三个重要结合位点与Disc I的pY特异性结合, 起到SH2结构域的作用。因此, 以上7个蛋白及其基因均可用于后续实验。

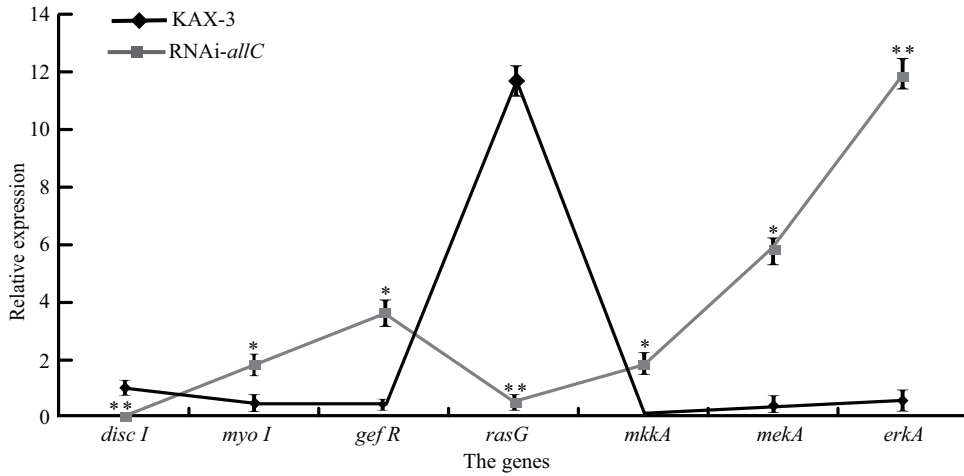
### 2.3 受体酪氨酸激酶/Ras途径相关同源基因的表达

为对比两细胞株受体酪氨酸激酶/Ras途径中各基因的变化趋势,我们首先以KAX-3细胞的*disc I*为参照,检测了KAX-3细胞中其他基因的相对表达量;之后比较了两细胞株中各基因的相对表达量。通过两细胞株相应基因表达量的倍数关系,等比转换得出RNAi-*allC*细胞相对于KAX-3细胞各基因的表达量(图2)。如图所示:(1)相对于KAX-3细胞, RNAi-*allC*细胞除*disc I*和*rasG*显著下调外,其他基因均显著上调,且*disc I*、*rasG*和*erk A*表达差异极显著。(2) KAX-3细胞中,在*disc I*正常表达情况下, *myo I*、*gef R*基因表达显下降趋势;而在RNAi-*allC*细胞中, *disc I*表达显著下调后, *myo I*、*gef R*基因表达量呈上升趋势。(3)KAX-3细胞中,在*rasG*正常表达情况下,下游的*mkkA*、*mekA*、*erkA*基因在一个低表达范围内波动;而在RNAi-*allC*细胞中, *rasG*表达显著下调后,其下游基因表达却相应上调,且上调幅度逐级增大。

著上调,且*disc I*、*rasG*和*erk A*表达差异极显著。(2) KAX-3细胞中,在*disc I*正常表达情况下, *myo I*、*gef R*基因表达显下降趋势;而在RNAi-*allC*细胞中, *disc I*表达显著下调后, *myo I*、*gef R*基因表达量呈上升趋势。(3)KAX-3细胞中,在*rasG*正常表达情况下,下游的*mkkA*、*mekA*、*erkA*基因在一个低表达范围内波动;而在RNAi-*allC*细胞中, *rasG*表达显著下调后,其下游基因表达却相应上调,且上调幅度逐级增大。

### 2.4 Disc I 和RasG蛋白的表达

对Disc I和RasG蛋白表达情况检测后发现,两

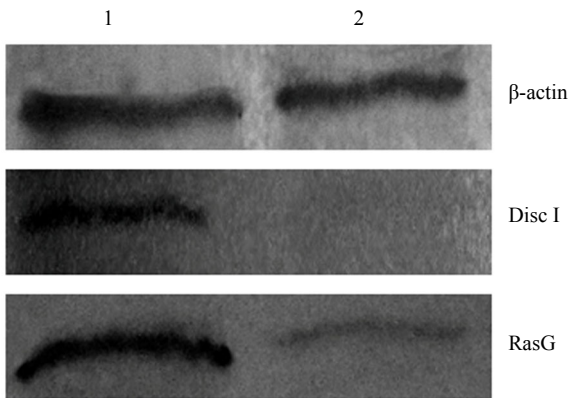


数据通过三次重复测量获得,每次重复实验设立三组平行,即为九次测量结果的均值。误差线为标准差。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $n = 3$ 。

Each experimental data was obtained through three parallel experiments and there were three parallel groups in every parallel experiment, so the data above were average value by nine measuring results. Error line is the standard deviation. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $n = 3$ 。

图2 KAX-3细胞和RNAi-*allC*细胞中Disc I 和RasG蛋白的相对表达量

Fig.2 The relative expression of Disc I and RasG proteins in KAX-3 and RNAi-*allC* cells

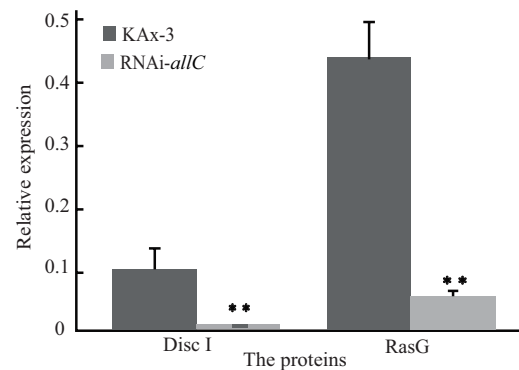


1: 野生型KAX-3细胞株; 2: RNAi-*allC*细胞株。

1: KAX-3 cells; 2: RNAi-*allC* cells.

图3 三种蛋白免疫印迹结果图

Fig.3 Western blot results of the three proteins



数据通过3次重复测量获得,每次重复实验设立3组平行,即为九次测量结果的均值。误差线为标准差。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $n = 3$ 。

Each experimental data was obtained through three parallel experiments and there were three parallel groups in every parallel experiment, so the data above were average value by nine measuring results. Error line is the standard deviation. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $n = 3$ 。

图4 KAX-3细胞和RNAi-*allC*细胞中Disc I 和RasG蛋白的相对表达量

Fig.4 The relative expression of Disc I and RasG proteins in KAX-3 and RNAi-*allC* cells

细胞株的内参 $\beta$ -actin正常表达,说明提取的全蛋白样品均正常。此外,KAx-3细胞中两蛋白条带清晰可见;而RNAi-*allC*细胞中,两蛋白条带极其微弱(图3)。根据灰度值做柱形图,结果发现KAx-3细胞中,Disc I和RasG蛋白的灰度值分别为 $0.100\pm 0.035$ 、 $0.440\pm 0.060$ ;RNAi-*allC*细胞中,两蛋白的灰度值分别为 $0.010\pm 0.001$ 、 $0.060\pm 0.002$ 。与KAx-3细胞相比, RNAi-*allC*细胞中两蛋白表达均显著下调(图4)。

### 3 讨论

本研究发现, RNAi-*allC*细胞的分裂速度显著快于野生型KAx-3细胞,前者细胞周期约是后者的1/8。已有研究证实,受体酪氨酸激酶/Ras途径在细胞的增殖分化等过程中起着重要的调节作用,且与肿瘤的发生密切相关<sup>[18-19]</sup>。其组成和转导过程可归纳为:细胞外信号(如生长因子)→受体酪氨酸激酶(如RTK)→接头蛋白(如Grb2)→鸟苷酸释放因子(如RasGEF)→Ras→MAPK系统→生物学效应。突变细胞分裂速度异常加快,推其原因可能是RasG及其相关基因的异常表达影响了盘基网柄菌的细胞增殖。

为此,笔者运用实时荧光定量PCR技术检测两细胞株中受体酪氨酸激酶/Ras途径相关基因的表达情况。实验结果显示,与对照组KAx-3细胞相比, RNAi-*allC*细胞中除*rasG*和*disc I*的表达显著下调外,其他检测基因均显著上调。此外,KAx-3细胞中,在*disc I*正常表达的情况下,其下游的*myo I*、*gef R*基因表达呈下降趋势;而RNAi-*allC*细胞中,*disc I*显著低表达后,其下游的两个基因却呈上升趋势。Curat等<sup>[20]</sup>在研究酪氨酸激酶受体1(discoidin domain receptor 1, DDR1)对小鼠肾小球系膜细胞增殖作用中发现,与正常细胞相比,*ddr 1*基因敲除细胞的分裂速度显著提高。这说明该酪氨酸激酶受体在小鼠肾小球系膜细胞增殖过程中起负调控作用。实验数据表明,盘基网柄菌的*disc I*与部分高等生物酪氨酸激酶受体基因的功能一致,一旦*disc I*表达受到抑制,细胞增殖速度会随之加快。同时,KAx-3细胞中,*rasG*基因正常表达情况下,其下游的*mkk A*、*mek A*及*erk A*基因在一个低表达范围内波动;而RNAi-*allC*细胞中,*rasG*显著下调后,其下游基因表达量反而显著上调。有研究指出,*rasG*的过表达能够导致盘基网柄菌细胞增殖受到抑制<sup>[6]</sup>。本实验数据表明,*rasG*表达量降低后,细胞增殖速度加快。以上两实验结

果相互印证,说明了*rasG*的过表达或低表达均会影响盘基网柄菌的细胞增殖速度。由此证实*rasG*作为一种负调控因子参与了盘基网柄菌的单细胞增殖过程。笔者进一步分析发现,两细胞中*disc I*、*myo I*、*gef R*基因和*mkk A*、*mek A*、*erk A*基因的表达均呈一定的线性关系。由此可看出,细胞增殖速度的变化与相关调控途径中基因的表达有紧密关系。RNAi-*allC*细胞正是通过受体酪氨酸激酶/Ras途径中各基因之间的相互作用,最终加快细胞的增殖速度。也说明低等生物细胞的增殖调控与高等生物类似,都是通过受体酪氨酸激酶/Ras途径调控盘基网柄菌的细胞增殖。

从我们的实验结果中可以看出,*disc I*、*rasG*基因在盘基网柄菌细胞增殖过程中起着至关重要的作用。为深入探究两者对细胞增殖的调控作用,通过蛋白免疫印迹技术检测KAx-3和RNAi-*allC*细胞中Disc I和RasG的蛋白含量。结果显示, RNAi-*allC*细胞中两蛋白的表达均受到显著抑制,该结果与实时荧光定量PCR结果一致。有研究指出,在*rasG*基因敲除的盘基网柄菌细胞中,Disc蛋白含量显著低于野生型细胞<sup>[21]</sup>。即*rasG*表达量低的细胞中,Disc蛋白的含量也跟着降低。该结论与我们的实验结果一致。以上两实验结果进一步说明,RasG与Disc之间可能存在一定的关系。RasG表达改变后,Disc的含量也相应受到影响。究其原因可能是RasG的低表达能够显著影响*disc I*启动子活性,从而导致Disc I含量的减少。受体酪氨酸激酶/Ras途径中RasG位于Disc I下游,笔者推测RasG蛋白表达受抑制时,对Disc I亦有一种反馈调节行为,从而导致Disc I表达量降低。

值得提出的是,多数情况下,Ras是一种致癌因子,它的过表达会导致细胞恶性增殖,而表达量过低则抑制增殖<sup>[22]</sup>。但也有研究指出,在某些哺乳动物细胞中,如鼠许旺细胞、REF52鼠胚胎纤维元细胞以及鼠PC12细胞,Ras作为一种负调控因子参与细胞的增殖过程<sup>[23-25]</sup>。本研究表明,盘基网柄菌细胞中RasG在增殖过程中的作用与以上细胞中Ras的调控机制基本是一致的。也就是说,Ras在这些细胞增殖过程中均起负调控作用。但为什么盘基网柄菌RasG的调节机制与多数高等生物相反,Khosla等<sup>[26]</sup>也曾指出过这个疑问,不过之后并没有再做进一步深究。为此,很有必要对RasG参与盘基网柄菌细胞增殖的机制做进一步探讨。我们知道,*erk*基因处于

受体酪氨酸激酶/Ras途径的末端,低表达的*ras*能够通过上调该基因的表达来促进细胞增殖<sup>[27]</sup>。该结论与我们实验的结果是一致的。RNAi-*allC*细胞中,在RasG低表达的情况下,*erk A*基因的表达显著上调。殊途同归,盘基网柄菌细胞最终也是通过上调*erk A*基因的表达来促进细胞的增殖。因此,结合本次实验结果,我们推测尿囊酸酶的干扰可能通过RasG的下调,抑制了Disc I的表达,从而导致Disc I对其下游基因抑制作用的减弱或缺失,进而引起下游途径中其它基因表达上调,最终导致细胞增殖速度加快。但其确切机制和生物学意义还有待深入研究。

### 参考文献 (References)

- Cobb MH, Goldsmith EJ. How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* 1995; 270(25): 14843-6.
- 何太平, 严卫红, 梁念慈. Ras信号转导通路. 国外医学: 检验学分册(He Taiping, Yan Weihong, Liang Nianci. Ras signaling transduction pathway. *Foreign Medical Sciences: Section of Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine*) 2004; 25(1): 74-6.
- Reymond CD, Gome RH, Mehdy MC, Firtel RA. Developmental regulation of a *Dictyostelium* gene encoding a protein homologous to mammalian ras protein. *Cell* 1984; 39(1): 141-8.
- Chubb JR, Wilkins A, Thomas GM, Insall RH. The *Dictyostelium* RasS protein is required for macropinocytosis, phagocytosis and the control of cell movement. *J Cell Sci* 2000; 113(4): 709-19.
- Jaffer ZM, Khosla M, Spiegelman GB, Spiegelman, Weeks G. Expression of activated Ras during *Dictyostelium* development alters cell localization and changes cell fate. *Development* 2001; 128(6): 907-16.
- Khosla M, Spiegelman GB, Insall R, Weeks G. Functional overlap of the *Dictyostelium* RasG, RasD and RasB proteins. *J Cell Sci* 2000; 113(8): 1427-34.
- Kosaka C, Khosla M, Weeks G, Pears C. Negative influence of RasG on chemoattractant-induced ERK2 phosphorylation in *Dictyostelium*. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1402(1): 1-5.
- Yang JJ, Kang JS, Robert SK. Ras signals to the cell cycle machinery via multiple pathways to induce anchorage-independent growth. *Mol Cell Biol* 1998; 18(5): 2586-95.
- 陈能星, 魏晓静, 刘伟, 侯连生. 盘基网柄菌*allC*的克隆、表达和多克隆抗体的制备. 华东师范大学学报(自然科学版)(Chen Nengxing, Wei Xiaojing, Liu Wei, Hou Liansheng. Clone, expression of allantoicase gene from *Dictyostelium discoideum* and preparation of polyclonal antibody against ALC. *Journal of East China Normal University (Natural Sci)*) 2010; 4: 77-84.
- 刘伟, 张树任, 陈能星, 侯连生. 盘基网柄菌尿囊酸酶基因RNA干扰载体的构建及干扰效果鉴定. 细胞生物学杂志(Liu Wei, Zhang Shuren, Chen Nengxing, Hou Liansheng. Construction and effect identification of RNAi expression vector targeting allantoicase gene in *Dictyostelium discoideum*. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2009; 31(3): 395-400.
- Kuwayama H, Nagasaki A. Desalted deep sea water increases transformation and homologous recombination efficiencies in *Dictyostelium discoideum*. *J Mol Microb Biotech* 2008; 14(4): 157-62.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8.
- Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259): 680-5.
- Mathieu SV, Aragao KS, Imberty A, Varrot A. Discoidin I from *Dictyostelium discoideum* and interactions with oligosaccharides: Specificity, affinity, crystal structures, and comparison with Discoidin II. *J Mol Biol* 2010; 400(3): 540-54.
- Arigoni M, Bracco E, Lusche DF, Kae H, Weeks G, Bozzaro S. A novel *Dictyostelium* RasGEF required for chemotaxis and development. *BMC Cell Biol* 2005; 6: 43.
- Nguyen HN, Raisley B, Hadwiger JA. MAP kinases have different functions in *Dictyostelium* G protein-mediated signaling. *Cell Signal* 2010; 22(5): 836-47.
- Mendoza MC, Booth E, Shaulsky G, Firtel RA. MEK1 and protein phosphatase 4 coordinate *Dictyostelium* development and chemotaxis. *Mol Cell Biol* 2007; 27(10): 3817-27.
- 邢雁霞, 刘斌钰. 受体型TPK-Ras-MAPK信号转导途径研究进展. 大同医学专科学校学报(Xing Yanxia, Liu Binyu. *Advancement in the research of TPK-Ras-MAPK signaling transduction pathway. Datong Medical College*) 2006; 1: 42-3.
- 孙小鹞, 李荣山. 洛伐他汀对人类肾小球系膜细胞增殖及细胞周期的影响. 山西医科大学学报(Sun Xiaowu, Li Rongshan. *Effects of lovastatin on proliferation and cell cycle of cultured human glomerular mesangial cells in vitro. J Shanxi Med Univ*) 2007; 38(2): 126-9.
- Curat CA, Vogel WF. Discoidin domain receptor 1 controls growth and adhesion of mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(1): 2648-56.
- Secko DM, Khosla M, Gaudet P, Tsang A, Spiegelman GB, Weeks G. RasG regulates Discoidin gene expression during *Dictyostelium* growth. *Exp Cell Res* 2001; 266(1): 135-41.
- Tsubaki M, Itoh T, Satou T, Imano M, Komal M, Ogawa N, et al. Nitrogen-containing bisphosphonates induce apoptosis of hematopoietic tumor cells via inhibition of Ras signaling pathways and Bim-mediated activation of the intrinsic apoptotic pathway. *Biochem Pharmacol* 2013; 85(2): 163-72.
- Bar-Sagi D, Feramisco JR. Microinjection of the ras-oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation. *Cell* 1985; 42(3): 841-8.
- Ridley AJ, Paterson HF, Noble M, Land H. Ras-mediated cell cycle arrest is altered by nuclear oncogenes to induce Schwann cell transformation. *EMBO J* 1988; 7(6): 1635-45.
- Sassone-Corsi P, Der CJ, Verma IM. Ras-induced neuronal differentiation of PC12 cells: Possible involvement of fos and jun. *Mol Cell Biol* 1989; 9(8): 3174-83.
- Khosla M, Spiegelman GB, Weeks G. Overexpression of an activated rasG gene during growth blocks the initiation of *Dictyostelium* development. *Mol Cell Biol* 1996; 16(8): 4156-62.
- Elion EA. Routing MAP kinases cascades. *Science* 1998; 281(5383): 1625-6.