

# 细胞周期决定核糖体蛋白S6在真核细胞核仁中的聚积

张 朵<sup>1,2</sup> 兰风华<sup>1</sup> 高丽华<sup>2</sup> 邵 勇<sup>2</sup> 陈惠鹏<sup>2</sup> 胡显文<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>南京军区福州总医院实验科, 福州 350025; <sup>2</sup>军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

**摘要** 核糖体蛋白S6(rpS6)是核糖体40S小亚基的核心组成蛋白之一。研究表明, rpS6可以通过核定位信号进入细胞核中, 在核仁中参与核糖体的组装。在该研究中发现, rpS6在高等真核细胞核仁中的聚积与细胞周期有关, rpS6在S期中晚期开始在核仁中聚积, G<sub>2</sub>期含量达到最高, M期核仁分解时消失。推测, rpS6在核仁中的这种分布特性可能与核糖体的合成随细胞周期变化有关。

**关键词** 核糖体蛋白S6; 细胞周期; 核糖体组装

## Cell Cycle Determining the Accumulation of Human Ribosomal Protein S6 at the Nucleolus in Eukaryotes

Zhang Duo<sup>1,2</sup>, Lan Fenghua<sup>1</sup>, Gao Lihua<sup>2</sup>, Shao Yong<sup>2</sup>, Chen Huipeng<sup>2</sup>, Hu Xianwen<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Clinical Genetic Research Center, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou 350025; <sup>2</sup>Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China)

**Abstract** Ribosomal protein S6 (rpS6) is one of the 33 ribosomal proteins of the 40S small subunit. Previous studies have showed that rpS6 could enter nuclear and participate the ribosomal biogenesis at nucleolus. In this study, we found that the distribution of rpS6 at nucleolus correlated to the phasing of cell cycle. It started to concentrate in the nucleolus at later S phase and disconcentrated at M phase as the nucleolus disintegrates. We speculated that this distribution feature might correlate to the changes of ribosomal biogenesis during cell cycle progress.

**Key words** ribosomal protein S6; cell cycle; ribosomal biogenesis

在真核细胞中, 核糖体由40S小亚基和60S大亚基组成, 在细胞中主要负责蛋白质的翻译。研究表明, 真核细胞的核仁是核糖体生物合成的场所<sup>[1]</sup>。大、小亚基在核仁中完成初级组装后, 分别以不同的运输载体输送到细胞质中。在细胞质中, 大、小亚基继续组装并最终形成成熟的核糖体。Klinge等<sup>[2]</sup>的研究表明, 核糖体的形成过程约需200个因子参与, 包括早期核糖体蛋白、顺式作用因子以及非编码核仁小RNA。

rpS6是33个核糖体小亚基蛋白之一。在成熟的核糖体中, rpS6蛋白横跨小亚基的“左脚”和“右脚”<sup>[3]</sup>。

有研究表明, 在高等真核细胞的核仁中, 可检测到rpS6蛋白的存在<sup>[1]</sup>。在酵母细胞中, rpS6是核仁中U3核蛋白复合体(U3 ribonucleoprotein, U3 RNP)的组成成分<sup>[4-5]</sup>。U3 RNP是一类核糖体蛋白复合体, 在细胞中主要负责40S小亚基的组装过程<sup>[6-7]</sup>。在HeLa细胞中, 通过siRNA干涉的方法敲低rpS6蛋白的表达量后, 可明显地观察到30S pre-rRNA堆积, 同时参与40S小亚基组装的成熟18S rRNA的合成量减少, 但是28S和5.8S rRNAs的合成却没有受到影响<sup>[8]</sup>。敲除了rpS6等位基因的小鼠, 在经受了48 h的饥饿后, 重新给予食物, 其肝脏细胞丧失了合成40S小亚基的能力, 可

收稿日期: 2013-09-18 接受日期: 2014-03-07

国家重大科技专项“重大新药创制”(批准号: 2012ZX02101001-001)和全军医学科技青年培育项目(批准号: 13QNP042)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 010-66948820, E-mail: huxw1969@163.com

Received: September 18, 2013 Accepted: March 7, 2014

This work was supported by the State Project For Essential Drug Research and Development (Grant No.2012ZX02101001-001) and the Youth Development Projects of Medical Science in PLA (Grant No.13QNP042)

\*Corresponding author. Tel: +86-10-66948820, E-mail: huxw1969@163.com

网络出版时间: 2014-07-02 11:14 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0303.html>

明显地观察到34S pre-rRNA的堆积(相当于人细胞中的30S pre-rRNA)和成熟18S rRNA合成量的减少<sup>[9]</sup>。目前, rpS6蛋白在18S rRNA剪接成熟过程中的具体作用以及如何影响40S小亚基合成还不清楚。在真核细胞中, 核糖体合成活动与细胞生长密切相关, 合成活动随细胞周期进程而变化。在研究rpS6蛋白在核糖体生物合成中作用的过程中, 我们观察到rpS6蛋白在细胞核仁中的定位也随细胞周期进程发生变化, 推测其定位变化可能受核糖体合成活动的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

兔抗人rpS6单克隆抗体购自Cell Signaling公司; 鼠抗人Mpp10单克隆抗体购自Abcam公司; 依据NCBI(NM\_001010.2)公布的rpS6序列优化合成HA-rpS6基因, 由金思特科技(南京)有限公司合成; 脂质体Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司; anti-HA tag和anti-EGFP tag购自MBL公司; CF<sup>TM</sup>555驴抗兔IgG (H+L)为Biotium公司产品; 胸苷购自Sigma公司; 秋水仙素购自北京中科瑞泰科技有限公司。

### 1.2 免疫荧光双标检测rpS6蛋白和Mpp10蛋白在HEK293中的分布

HEK293细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM/F12(1:1)培养基中, 实验前将其接种于无菌Nunc Lab-Tek<sup>TM</sup>腔室盖玻片中培养。待其生长至对数生长期时, 预冷的70%乙醇冰上固定1 h, 0.2% TritonX-100通透5 min, PBS清洗3次, 每次3 min, 6% BSA 37 °C封闭30 min, 同时加入1:100稀释的兔抗人rpS6单克隆抗体和鼠抗人Mpp10单克隆抗体100 μL, 4 °C湿盒内孵育过夜。PBS清洗3次, 每次10 min, 同时加入1:400稀释的CF<sup>TM</sup>555驴抗兔IgG (H+L)和CF<sup>TM</sup>488驴抗鼠IgG (H+L), 37 °C避光条件下反应60 min。0.5 μg/mL DAPI室温反应5 min染细胞核, 封片后在激光共聚焦显微镜下观察。

### 1.3 HA-rpS6融合蛋白在HEK293细胞内的分布

以合成的HA-rpS6基因为模板, 通过PCR的方法扩增HA-rpS6基因并引入BamH I和Xho I酶切位点, 双酶切后克隆入pIRES2-EGFP质粒。扩增引物序列如下: HA-rpS6上游引物: 5'-GCG CTC GAG ACC ATG TAC CCC TAT GAC GTG CC-3'; HA-rpS6下游引物: 5'-GCG GGA TCC TCA TTT CTG ACT AGA CTC GGA C-3'。使用Lipofectamine 2000将获得的重

组质粒转染入HEK293细胞, 具体操作按说明书进行。转染48 h后传代。0.38 g/L G418加压筛选, 待无G418抗性的细胞被杀死后, 以有限稀释法进行单克隆筛选。将筛选获得的稳定转染细胞扩大培养。待细胞在培养瓶中长满后, 弃培养基, 加入1 mL细胞裂解液, 冰上裂解30 min。4 °C, 12 000 r/min离心30 min, 取30 μL上清, 进行Western blot分析。15% SDS-PAGE电泳结束后, 以90 V、60 min条件将蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 5%脱脂奶粉37 °C封闭1 h, 加入1:200稀释的兔抗HA标签抗体和1:200稀释的鼠抗Mpp10单克隆抗体200 μL, 4 °C湿盒内孵育过夜。TBST洗涤后加1:10 000稀释的山羊抗兔IgG/HRP和山羊抗鼠IgG/HRP, 37 °C缓慢摇动反应1 h, Enlight<sup>TM</sup>化学发光试剂显色。

将稳定表达HA-rpS6融合蛋白的细胞接种于多聚赖氨酸处理的玻片上, 待细胞生长至70%~80%融合时, 甲醇室温固定10 min, PBS冲洗3次, 每次3 min。0.2% TritonX-100通透5 min。6% BSA 37 °C封闭60 min, 加入1:200稀释的兔抗anti-HA tag, 4 °C湿盒内过夜。PBS洗3遍, 每遍10 min, 1:400稀释的CF<sup>TM</sup>555驴抗兔IgG (H+L) 37 °C避光条件下反应60 min, PBS洗3遍, 每遍10 min。0.5 μg/mL DAPI室温反应5 min, PBS冲洗3次, 每次3 min, 封片后在激光共聚焦显微镜下观察。

### 1.4 rpS6-EGFP融合蛋白在HEK293细胞内的分布

以HA-rpS6-pIRES2-EGFP为模板, 扩增rpS6基因; BamH I和Hind III双酶切后克隆入pcDNA3.1-EGFP质粒, 引物序列如下: rpS6-EGFP上游引物: 5'-GCG AAG CTT CCA CCA TGA AGC TGA ACA TCT CCT TCC CTG-3'; rpS6-EGFP下游引物: 5'-GCG GGA TCC TTT CTG ACT AGA CTC GGA CTT G-3'。使用Lipofectamine 2000将重组质粒转染入HEK293细胞, 具体操作按说明书进行。Western blot鉴定rpS6-EGFP融合蛋白在细胞内的表达。激光共聚焦显微镜观察rpS6-EGFP融合蛋白在细胞内的分布。免疫荧光双标技术检测rpS6-EGFP融合蛋白在细胞内的定位, 具体操作如前所述。

### 1.5 细胞周期阻滞实验

取处于对数生长期的rpS6-EGFP融合蛋白稳定转染的细胞, 培养液中加入过量胸苷至终浓度为7 mmol/L, 继续培养13 h, 无血清培养基清洗后, 换正常培养基培养6 h, 再次在培养液中加入胸苷至

终浓度为7 mmol/L, 继续培养13 h后, 换正常培养基培养5 h, 此时大部分细胞被阻滞在S期。激光共聚焦显微镜观察并拍照, 流式细胞术检测细胞周期。

对于M期阻滞细胞, 在细胞培养液中加入秋水仙素至终浓度0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 继续培养10 h。此时大部分细胞被阻滞在M期。激光共聚焦显微镜观察并拍照, 流式细胞术检测细胞周期。

### 1.6 活细胞工作站观察

将rpS6-EGFP融合蛋白稳定转染的细胞接种于无菌的Nunc Lab-Tek™腔室盖玻片中培养, 待细胞生长至对数生长期时, 移至蔡司510 META倒置显微镜进行活细胞工作站观察, 每个视野以2  $\mu\text{m}$ /层进行层扫, 最后将所有的图片在Z轴方向合成为一个立体的图像, 每个视野5 min/次拍一次像, 观察持续24 h。获得的图像通过软件组合成视频进行观察保存。

## 2 结果

### 2.1 rpS6在HEK293细胞的分布与定位

使用免疫荧光双标技术对rpS6蛋白在野生型HEK293细胞中的分布进行了检测, 结果表明: rpS6蛋白可在部分细胞的核仁中检测到, 并且可与U3 RNP的标志性蛋白Mpp10共定位(图1)。从图中可以看出, Mpp10蛋白分布在每个细胞的核仁中, 而rpS6蛋白仅在部分细胞的U3 RNP中检测到, 由此, 我们提出, rpS6蛋白在细胞核仁中的分布具有异质性。

### 2.2 HA-rpS6融合蛋白在HEK293细胞核仁中的分布

以上研究结果提示, rpS6蛋白在真核细胞核仁中的分布具有异质性。为了便于后续研究, 我们构建了rpS6蛋白与HA标签(9个氨基酸)的融合蛋白。HA-rpS6融合基因克隆入pIRES2-EGFP质粒中后, 将

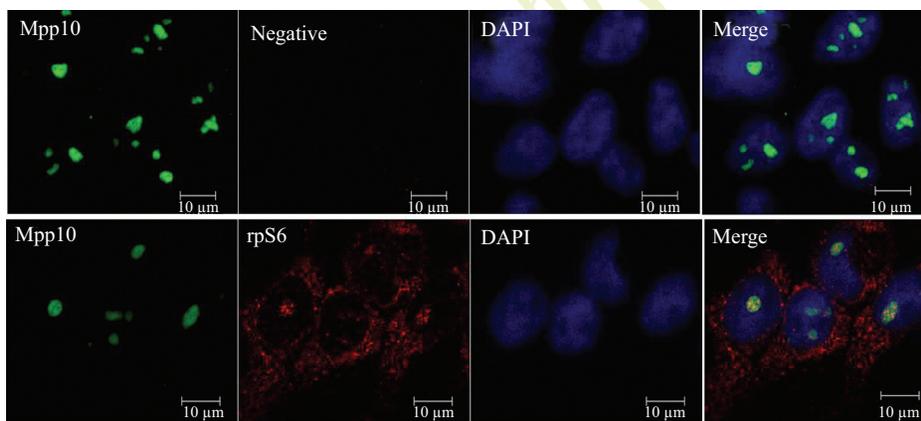
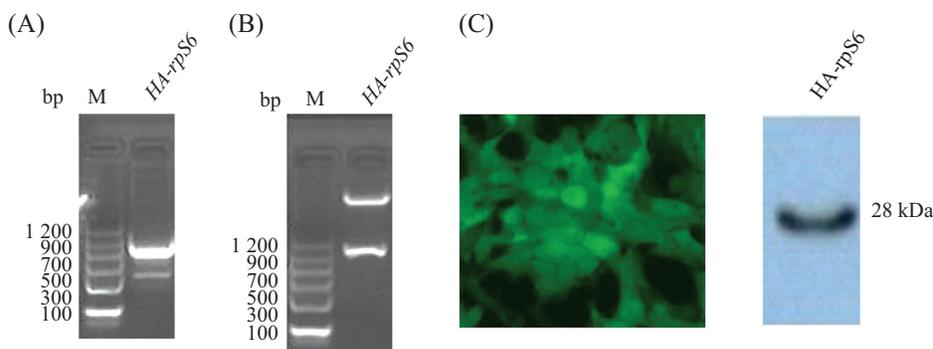


图1 免疫荧光双标实验检测rpS6蛋白在HEK293细胞核仁中的定位

Fig.1 Distribution of rpS6 in nucleolus of HEK293 cells detected by double immunofluorescence



A: PCR扩增HA-rpS6融合基因; B: 双酶切验证携带有HA-rpS6融合基因的重组子; C: 稳定表达HA-rpS6融合蛋白的HEK293细胞, 绿色荧光代表EGFP蛋白; D: Western blot检测稳定细胞系中HA-rpS6融合蛋白的表达。M: marker。

A: amplification of HA-rpS6 gene by PCR; B: the recombinant was confirmed by BamH I and Xho I digestion; C: the stably transfected HEK293 cells overexpressed HA-rpS6 fusion protein; D: expression of HA-rpS6 fusion protein in stably transfected cell lines was detected by Western blot. M: marker.

图2 携带HA-rpS6融合基因的重组子的构建及稳定转染细胞系的获得

Fig.2 Construction of the recombinant that contains HA-rpS6 fusion gene and the establishment of the stably transfected HEK293 cells

重组子转染入HEK293细胞, 经G418筛选后, 获得了稳定表达HA-rpS6蛋白的细胞系(图2)。在此稳定转染细胞中, HA-rpS6蛋白与EGFP蛋白共表达, 从图2C中可以看出, EGFP蛋白均匀分布在整個细胞中。使用稳定转染细胞进行的免疫荧光双标实验表明, HA-rpS6融合蛋白分布在部分细胞的核仁中, 并且

可与Mpp10蛋白共定位, 分布特性与野生型rpS6蛋白一致(图3)。

### 2.3 细胞周期影响rpS6蛋白在人HEK293核仁中的分布

我们推测造成这种异质性的原因可能与细胞周期有关。为了证明此推测, 我们随后又构建

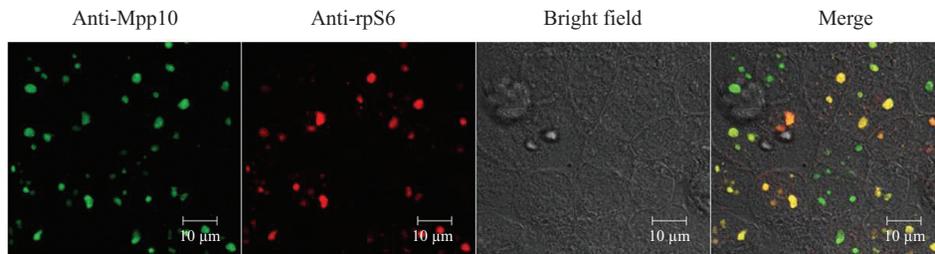
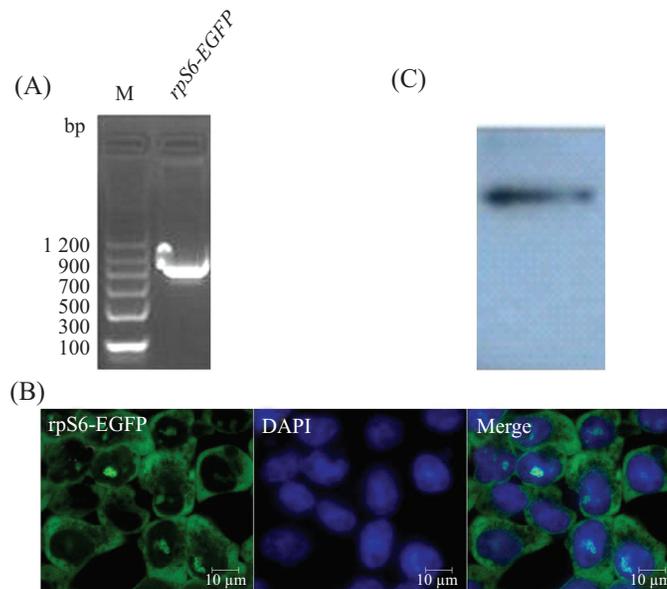


图3 免疫荧光双标实验检测HA-rpS6融合蛋白在稳定转染细胞中的定位

Fig.3 Colocalization of HA-rpS6 and Mpp10 in stably transfected HEK293 cells detect by double immunofluorescence



A: PCR扩增 $rpS6-EGFP$ 融合基因; B: 激光共聚焦显微镜观察稳定表达 $rpS6-EGFP$ 融合蛋白的HEK293细胞; C: Western blot检测稳定细胞系中 $rpS6-EGFP$ 融合蛋白的表达。M: marker。

A: amplification of  $rpS6-EGFP$  gene by PCR; B: the stably transfected HEK293 cell line expressed fusion protein  $rpS6-EGFP$ ; C: Western blot was used to detect the expression of  $rpS6-EGFP$  protein in stably transfected cells. M: marker.

图4 携带 $rpS6-EGFP$ 融合基因重组子的构建及稳定转染细胞系的获得

Fig.4 Construction of the recombinant that containing  $rpS6-EGFP$  fusion gene and the establishment of the stably transfected HEK293 cells

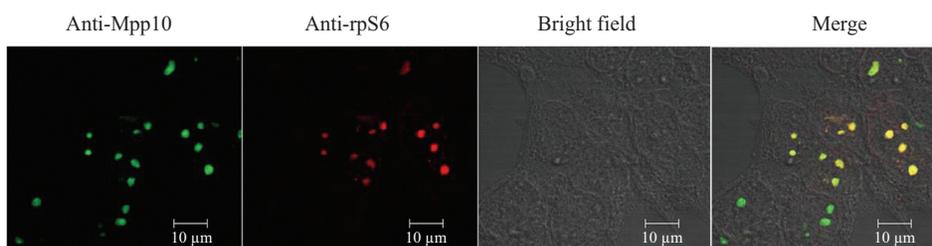
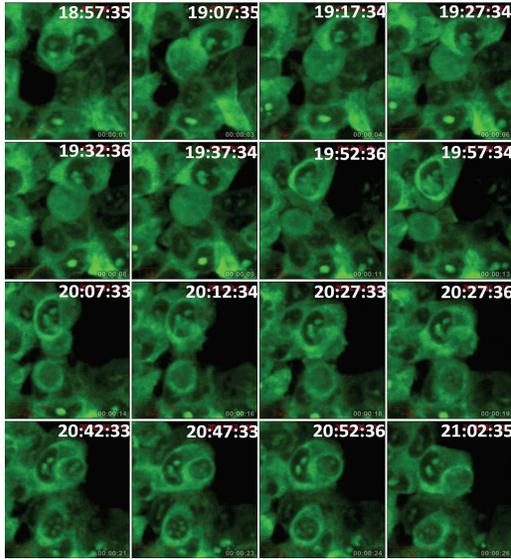


图5 免疫荧光双标实验检测 $rpS6-EGFP$ 融合蛋白在稳定转染细胞中的定位

Fig.5 The distribution of  $rpS6-EGFP$  protein in stably transfected cells detected by double immunofluorescence



视野中的圆形细胞为分裂细胞。

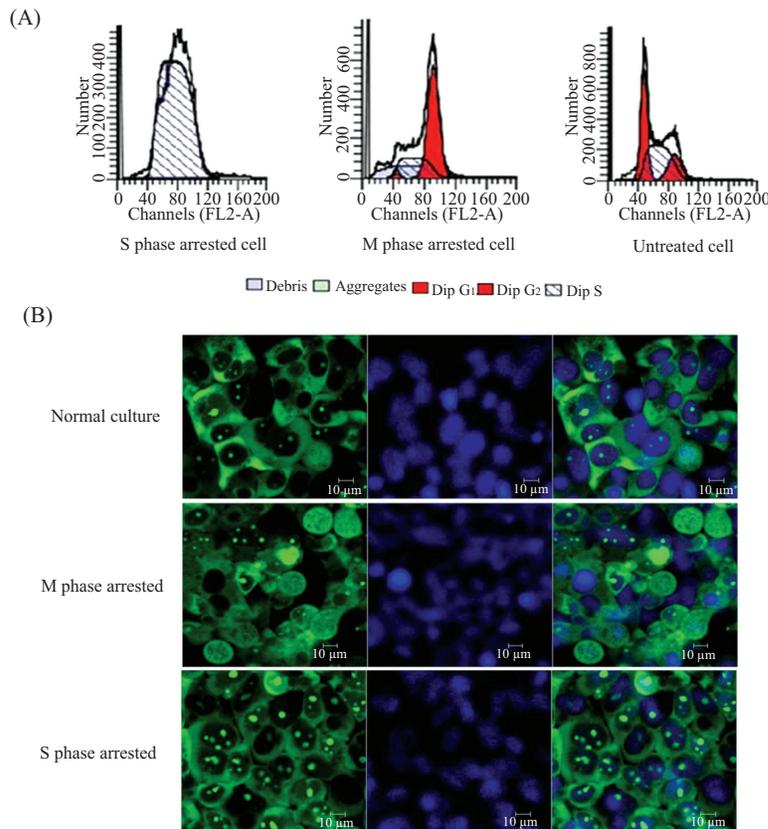
The dividing cells were round in the field.

图6 活细胞工作站观察rpS6-EGFP融合蛋白在核仁中的分布随细胞周期的变化(40×)

Fig.6 Dynamics of rpS6-EGFP protein during cell cycle observed by live-cell station (40×)

了rpS6-EGFP融合基因表达载体,并将其转染入HEK293细胞中, G418筛选后获得了稳定表达rpS6-EGFP融合蛋白的细胞系(图4)。在培养过程中发现, rpS6-EGFP融合蛋白在整个细胞群体中的分布存在异质性, 即在细胞群体中仅有部分细胞的核仁中有代表rpS6-EGFP蛋白的绿色荧光存在, 荧光强度也有强有弱, 另一部分细胞的核仁中则无绿色荧光存在(图4B)。免疫荧光双标实验表明, rpS6-EGFP融合蛋白在细胞核仁中可与Mpp10蛋白共定位, 分布特性与野生型rpS6蛋白一致(图5)。将稳定表达rpS6-EGFP融合蛋白的细胞移至活细胞工作站进行观察。结果表明, rpS6-EGFP蛋白在M期(核仁消失)时离开核仁, 在子代细胞的G<sub>1</sub>期后期或者S期重新进入核仁(图6)。

为了准确推测rpS6蛋白进入细胞核仁的时间, 我们又进行了细胞周期阻滞实验。对于S期阻滞细胞, 流式细胞术检测表明S期细胞比例高达99.48%(图7A), 而rpS6-EGFP蛋白入核计数表明, 仅



A: 流式细胞术检测细胞周期; B: 激光共聚焦显微镜观察rpS6-EGFP蛋白在各组细胞内的分布。

A: cell cycle of each group cells was detected by flow cytometry; B: the distribution of rpS6-EGFP fusion protein in each group cells was observed by confocal laser-scanning microscope.

图7 流式细胞术和激光共聚焦显微镜观察rpS6-EGFP融合蛋白在细胞核仁中的分布与细胞周期的关系

Fig.7 The relationship between concentration of rpS6-EGFP fusion protein in nucleolus and cell cycle observed by flow cytometry and confocal laser-scanning microscope

表1 rpS6-EGFP融合蛋白在各组细胞中的入核数量统计

Table 1 Statistics of cells that containing rpS6-EGFP in nucleolus in each group cells

组别 group	G <sub>0</sub> -G <sub>1</sub> 期(%) G <sub>0</sub> -G <sub>1</sub> phase (%)	S期(%) S phase (%)	G <sub>2</sub> -M期(%) G <sub>2</sub> -M phase (%)	M期(%) M phase (%)	rpS6-EGFP入核 Cells contained rpS6-EGFP in nucleolus
S phase arrested cells	0.00	99.48	0.52		85% (289/340)
M phase arrested cells	2.81	30.41	66.78	29.5% (90/305)	47.5% (145/305)
Untreated cells	37.86	44.81	17.33		53% (125/236)

85%的细胞在细胞核中有rpS6-EGFP蛋白存在, 15%的细胞在细胞核中观察不到绿色荧光蛋白存在(图7B和表1), 表明在S期细胞中, 有一部分细胞的细胞核中有rpS6-EGFP蛋白存在, 另一部分细胞的细胞核中无rpS6-EGFP蛋白, 提示rpS6-EGFP蛋白是在S期中晚期进入细胞核。结合活细胞工作站观察结果推测, rpS6-EGFP蛋白在S期的中期或晚期进入细胞核, M期核仁消失时离开。M期阻滞细胞和正常培养细胞的观察结果也支持上述结论(图7和表1)。

### 3 讨论

在本研究中, 我们首先通过免疫荧光双标等实验发现, rpS6在高等真核细胞核仁中的分布具有异质性, 随后通过活细胞工作站观察和细胞周期阻滞实验证明, rpS6在细胞核仁中的分布与细胞周期有关, 在S期中后期开始进入细胞核仁, G<sub>2</sub>期含量达到最高, M期核仁消失时消失。

在之前的研究中也见有rpS6与细胞周期关系的报道<sup>[9-10]</sup>。在敲除了 $rpS6$ 基因的小鼠胚胎杂合细胞中, 胚胎在发育至5.5 d后, 细胞不能进入M期, 出现凋亡, 导致胚胎死亡<sup>[10]</sup>。条件性敲除了 $rpS6$ 等位基因的成年小鼠, 在肝脏部分切除后, 剩余肝脏细胞生长不能进入S期, 肝脏组织不能再生。在本研究中, 我们通过活细胞工作站观察和细胞周期阻滞实验更加形象地观察到了rpS6与细胞周期进程的关系。

细胞周期进程决定rpS6在核仁中的分布, 而核仁是核糖体大、小亚基组装的场所。rpS6在核仁中的主要作用也是参与核糖体40S小亚基的早期组装。核糖体的生物合成也受细胞周期进程的影响, 如: rRNA的转录在S期和G<sub>2</sub>期最活跃, M期受到抑制, 子代细胞在进入G<sub>1</sub>期后逐渐恢复rRNA的转录活性<sup>[11]</sup>。转录起始因子(TIF)-IB/SL1和UBF的活性在M期也受到抑制, 但是TIF-IB/SL1在子代细胞进入G<sub>1</sub>期后很快恢复活性, UBF却在G<sub>1</sub>期后期才逐渐恢复活性<sup>[12]</sup>, 说明细胞的生命活动是一个受时间严格调控的过

程, 各种组分严格按照生命活动进程在各自的时间点启动相应的功能。

本研究虽然观察到rpS6在细胞核仁中的分布变化规律与核糖体的生物合成随细胞周期变化相一致, 但是rpS6在核糖体生物合成中的具体作用还有待进一步探讨。

### 参考文献 (References)

- 1 Kruger T, Zentgraf H, Scheer U. Intranucleolar sites of ribosome biogenesis defined by the localization of early binding ribosomal proteins. *J Cell Biol* 2007; 177(4): 573-8.
- 2 Klinge S, Voigts-Hoffmann F, Leibundgut M, Ban N. Atomic structures of the eukaryotic ribosome. *Trends Biochem Sci* 2012; 37(5): 189-98.
- 3 Anger AM, Armache JP, Berninghausen O, Habeck M, Subklewe M, Wilson DN, *et al.* Structures of the human and *Drosophila* 80S ribosome. *Nature* 2013; 497(7447): 80-5.
- 4 Dragon F, Gallagher JE, Compagnone-Post PA, Mitchell BM, Porwancher KA, Wehner KA, *et al.* A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* 2002; 417(6892): 967-70.
- 5 Bernstein KA, Gallagher JE, Mitchell BM, Granneman S, Baserga SJ. The small-subunit processome is a ribosome assembly intermediate. *Eukaryot Cell* 2004; 3(6): 1619-26.
- 6 Fournier MJ, Maxwell ES. The nucleolar snRNAs: Catching up with the spliceosomal snRNAs. *Trends Biochem Sci* 1993; 18(4): 131-5.
- 7 Venema J, Tollervey D. Processing of pre-ribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1995; 11(16): 1629-50.
- 8 Robledo S, Idol RA, Crimmins DL, Ladenson JH, Mason PJ, Bessler M. The role of human ribosomal proteins in the maturation of rRNA and ribosome production. *RNA* 2008; 14(9): 1918-29.
- 9 Volarevic S, Stewart MJ, Ledermann B, Zilberman F, Terracciano L, Montini E, *et al.* Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. *Science* 2000; 288(5473): 2045-7.
- 10 Panic L, Tamarut S, Sticker-Jantschkeff M, Barkić M, Solter D, Uzelac M, *et al.* Ribosomal protein S6 gene haploinsufficiency is associated with activation of a p53-dependent checkpoint during gastrulation. *Mol Cell Biol* 2006; 26(23): 8880-91.
- 11 Grummt I, Pikaard CS. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(8): 641-9.
- 12 Klein J, Grummt I. Cell cycle-dependent regulation of RNA polymerase I transcription: the nucleolar transcription factor UBF is inactive in mitosis and early G<sub>1</sub>. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(11): 6096-101.