

Acknowledgement The author would be very glad to thank Dr. Choong-Chin Liew, Dr. Adolfo Borges and Prof. Zeng Ding for their support and help. This work is supported in part by the Medical Research Council of Canada and by the opening research grant of The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University.

人类主要 Cyclins 在 MOLT-4 细胞 阻断动力学下的表达规律*

龚建平** 陈义发 舒丹 陶德定

(同济医科大学附属同济医院分子医学中心 武汉 430030)

细胞周期素(Cyclins)是细胞周期素依赖性蛋白激酶(Cyclin-Dependent-Kinases, CDKs)的调控亚单位,顺序激活的CDKs驱动着细胞依次通过细胞周期各时相(即G₁, S, G₂和M期)。尽管CDKs的最后激活与否,还受到CDKs抑制剂(CDK Inhibitors, CKIs)和Cdc25/Weel两个系统的调控,Cyclins的细胞周期时相性起伏(即:细胞周期特异性的Cyclins合成与降解)仍是CDKs顺序激活的基本前提^[1]。因此,Cyclins蛋白水平的表达分析,显得特别重要。

长期以来,人们分析基因的蛋白质水平表达依赖于经典的免疫印迹方法(Immunoblotting或Western Blots),尽管生命科学领域里许多重要的数据大多来自这类经典的方法学,也为现代生物学的进步做出过许多重要的贡献,但对于细胞周期特异性的基因蛋白质水平表达分析,仍暴露出其明显的局限性^[2]。基于免疫细胞化学和DNA含量分析的多参数流式细胞术分析,为这种特殊类型的基因表达分析提供可行性^[3]。本研究拟以T淋巴细胞白血病细胞MOLT-4为对象,在阻断动力学(Stathmokinesis,又称有丝分裂中期阻滞法Metaphase-arrest Technique)状态下,应用Cyclins/DNA双参数流式细胞术,阐明人类主要Cyclins在非同步化培养细胞的细胞周期特异性表达规律和该技术分析蛋白质水平基因表达的可行性。

材料与 方法

一、材料

细胞:MOLT-4细胞(美国,Dr. Darzynkiewicz惠赠)置入含有10%胎牛血清、抗生素(100u/ml的青霉素和100μg/ml的链霉素)和2mmol/L谷胺酰氨的RPMI 1640培养液中悬浮培养。细胞培养中所用培养液、胎牛血清等购自GIBCO公司。为保持细胞的非同步化生长,或处于对数生长期,培养密度保持在大约4×10⁵细胞/ml,进行细胞传代。实验中所用长春花碱(Vinblastine)购自Sigma公司,以100μg/ml溶于二甲亚砜(DMSO),储藏于-20℃备用。实验终浓度为0.05μg/ml,处理后0、3、6、9小时,收获细胞。

二、方法

1. DNA含量分析:培养细胞收获后(约2×10⁶细胞),用80%冷乙醇固定,置于-20℃冰箱过夜。固定后细胞,用PBS洗涤二次,随后温育于PC缓冲液40μl中^[12],约30min。再次洗涤细胞后,用10μg/ml PI和0.1% Rnase A(Sigma公司),在室温下进行DNA染色20min,待流式细胞术分析。

2. Cyclins/DNA双参数分析:培养细胞收获后(约2×10⁶细胞),用80%冷乙醇固定,置于-20℃冰箱过夜。固定后细胞,用PBS洗涤二次,然后用PBS稀释的0.25% Triton X-100在冰上处理5min。5min Triton X-100处理后,加以PBS 5ml,离心、洗涤二次,然后

本文1998年11月17日收到,1999年7月8日接受。

* 本研究受国家自然科学基金(39670365、39730270、39725027)和卫生部科研基金(202-01-06)资助。 **项目负责人。

加入用 1% BSA 稀释的鼠抗人 Cyclin B1、E 或 A 单克隆抗体(在 100 μ l 体积中,每 5×10^5 细胞与 0.25 μ g 抗体反应),在 4 $^{\circ}$ C 放置过夜。次日细胞用 PBS 5ml 离心、洗涤后,加入标有 FITC 羊抗鼠 IgG 抗体(Sigma 公司)(用 1% BSA 以 1:40 的比例稀释),在室温下放置 30min。再次洗涤细胞后,用 10 μ g/ml PI 和 0.1% RNase A (Sigma 公司),在室温下进行 DNA 染色 20min,待流式细胞术分析。抗体特异性同质对照采用同质特异性抗体,鼠抗人 IgG 单克隆抗体(Sigma 公司),余下处理同上,其他方法学细节,还可参见我们以往报道^[2,3]。

3. 流式细胞术分析:经上述处理后的细胞,荧光标记成功后,应用 FACSsort 流式细胞仪(Becton Dickinson, 美国)进行测量。经 488nm 激光激发,被标记细胞发射的红色(PI)和绿色(FITC)荧光同时、分别被

FACSsort 流式细胞仪的标准透镜接收。尔后,应用 Cellquest 软件(Becton Dickson, 美国),对上述所测细胞的双参数荧光强度、任一细胞群体的平均荧光强度进行分析。

结 果

图 1 所示为未经任何处理的、处于对数生长期的培养 MOLT-4 细胞 DNA 含量分析的直方图(图 1-a),Cyclin E(图 1-b)、A(图 1-c)、B1(图 1-d)蛋白分别与 DNA 含量的双维点图。根据双维点图可以清楚地看到,Cyclin E 蛋白表达的高峰在 G₁ 期,Cyclin A、B1 二蛋白表达的高峰在 G₂/M 期,显示了非同步化细胞的细胞周期特异性基因蛋白质水平的表达规律。

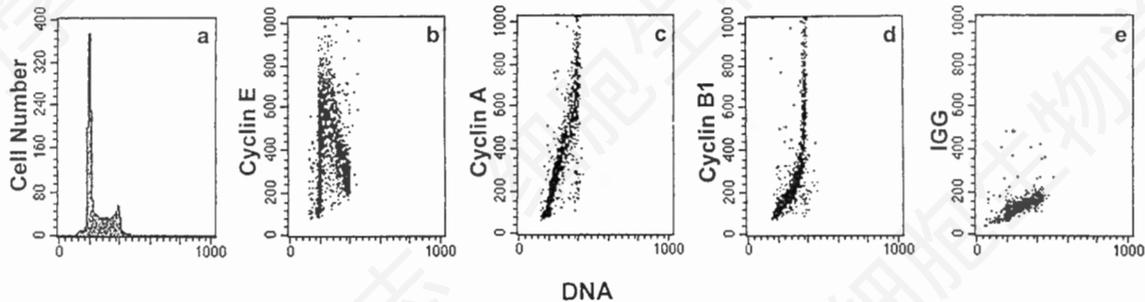


图 1 人类主要 Cyclins 在 Molt-4 细胞的表达

为了更进一步了解它们的动态表达规律,我们采用了有丝分裂中期阻滞法,使细胞按序通过 G₁、S、G₂、M 各期,而停留在有丝分裂中期。因此,我们将处于对数生长期培养的 MOLT-4 细胞,经长春花碱处理后,细胞将被阻滞在有丝分裂中期,于处理后 3、6、9 小时分别收获细胞。从 DNA 含量直方图上可以看出(图 2),随着长春花碱的作用时间延长,位于 G₀/G₁ 期的细胞逐渐减少,而进入 G₂/M 期的细胞逐渐增多,显示出典型的 Stathmokinesis 状态,为人类主要 Cyclins 蛋白在培养 MOLT-4 细胞动态表达规律的阐明,奠定了基础。

当 MOLT-4 细胞处于 Stathmokinesis 状态时,对数生长期下人类主要 Cyclins 蛋白的表达规律(图 1)被动态地显示出来(图 3,4,5)。

首先是被称为“有丝分裂 Cyclin”(Mitotic Cyclin)的 Cyclin B1,随着长春花碱的作用时间延长而逐渐增加,提示 Cyclin B1 的表达高峰在有丝分裂中期,或至少高峰延长至有丝分裂中期(图 3)。从图 1 看,Cyclin A 的表达高峰虽然也在 G₂/M 期,但随着长春花碱作用时间的延长,越来越多的细胞阻滞在有丝分裂中期,此刻的 Cyclin A 表达突然下降为零(或迅速降解为零),显示 Cyclin A 的准确表达高峰在 G₂ 期,而不是 M 期(图 4)。进一步比较 Cyclin A 与 B1 的细胞周期特异性表达规律(图 3,4),可见 Cyclin A 的表达升高起始于 S 早期,而 Cyclin B1 起始于 S 中晚期。Cyclin E 则不然,其表达高峰在 G₁ 期,随着长春花碱作用时间的延长,越来越多的细胞出 G₁ 期,经 S 期、G₂ 期,累积

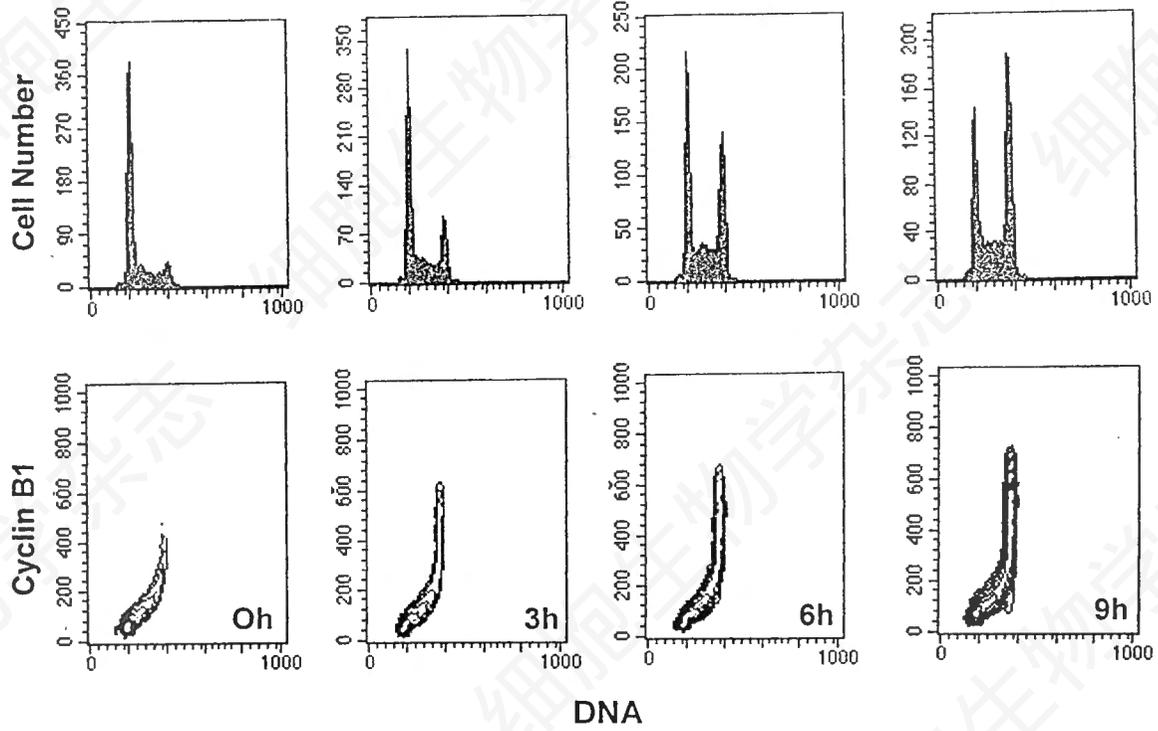


图2 人类 Cyclin B1 在 Molt-4 细胞的表达规律

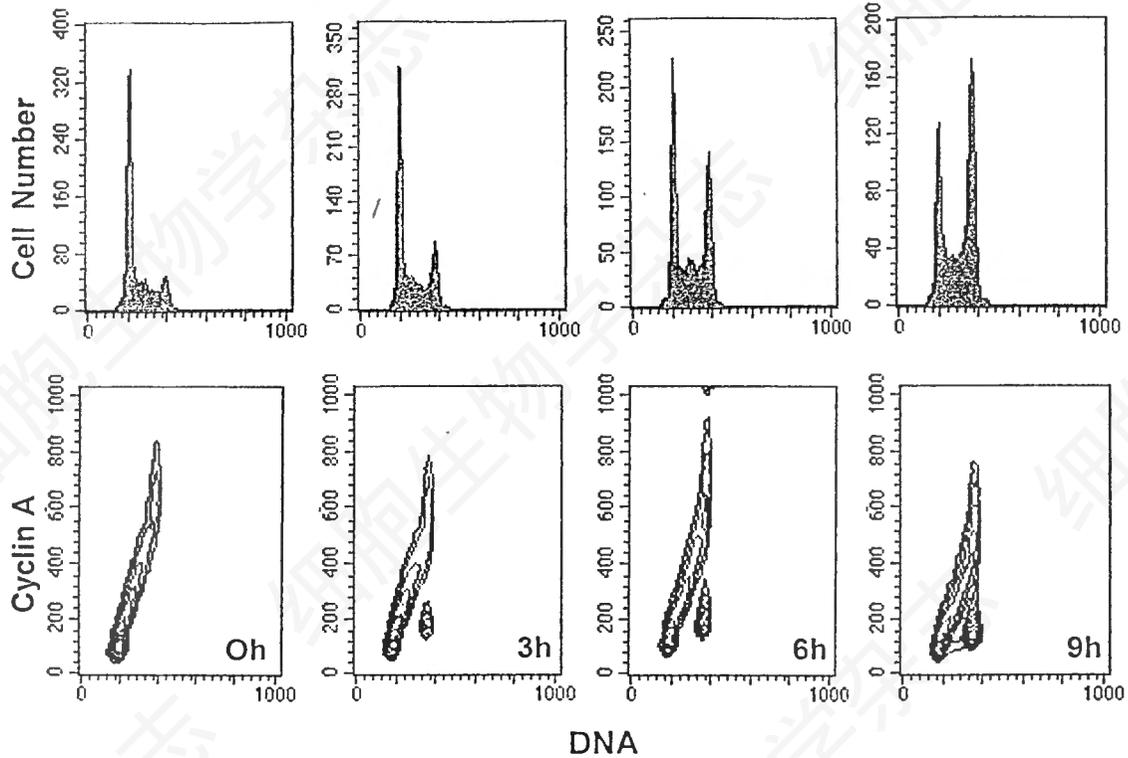


图3 人类 Cyclin A 在 Molt-4 细胞的表达规律

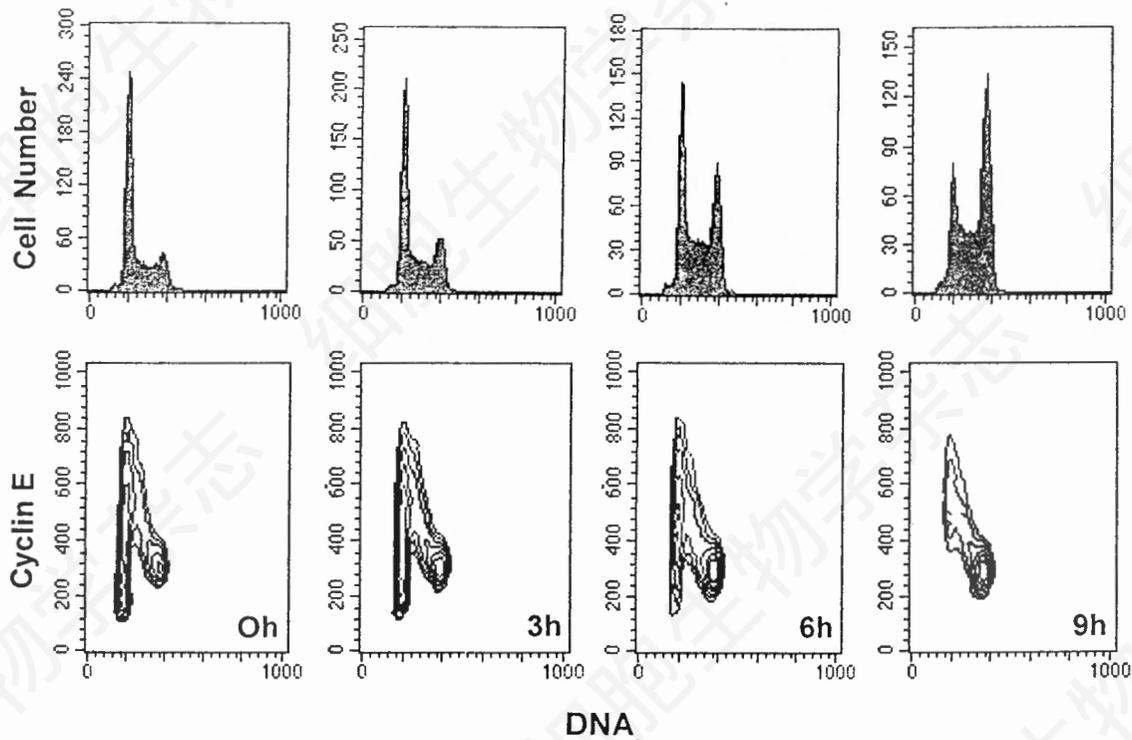


图4 人类 Cyclin E 在 Molt-4 细胞的表达规律

于 M 期,值得注意的是,此刻的 G_1 期细胞首先减少的不是 Cyclin E 高表达群,而依次是 Cyclin E 无表达、低表达、高表达细胞群,显示 Cyclin E 的表达升高起始于 G_1 中期,高峰在 G_1 晚期的 G_1 、S 期交界处,随着细胞进入 S 期, Cyclin E 开始下降,到 G_2 /M 期降为零。

讨 论

过去几年, Cyclins 蛋白表达的重要性一再被人们强调,由于现代生物学技术的限制,人类细胞 Cyclins 蛋白表达水平及规律大多来自酵母研究的间接推测和细胞同步化后免疫印迹的粗略估计。其原因在于增殖状态的人类细胞是细胞周期各时相并存的混合群体,经典的细胞生物学和分子生物学方法,不能同时判断特定的细胞周期时相和该时相特定的基因蛋白表达水平。基于免疫细胞化学和 DNA 含量分析的多参数流式细胞术分析,克服了这一难点,在利

用 DNA 含量进行细胞周期分析的同时,对不同细胞周期时相基因蛋白表达水平进行定量分析,使人类非同步化培养细胞的 Cyclins 蛋白分析成为可能^[3],同时免去了细胞同步化后不平衡生长带来的失真^[2]。

在非同步化培育细胞,应用 Cyclins/DNA 双参数流式细胞术,可以获得人类主要 Cyclins 蛋白的表达图形(图 1),通过这些图形,人们可以清楚地看到, Cyclin A、B1 二蛋白表达的高峰在 G_2 /M 期, Cyclin E 蛋白表达的高峰在 G_1 期,第一次在人类非同步化细胞显示了其主要 Cyclins 蛋白的表达规律。进一步结合有丝分裂中期阻滞法,发现了 Cyclin A、B1 二蛋白表达规律细微而稳定的差异, Cyclin A 的降解意味着细胞完成了 G_2 期,进入了有丝分裂期,而 Cyclin B1 的降解意味着细胞完成了有丝分裂期,进入了下一轮 G_1 期。也发现了 Cyclin E 蛋白的分解意味着细胞完成了 G_1 期,进入了 S

期。

这些研究结果,进一步确立了 Cyclins/DNA 双参数流式细胞术在分析细胞周期特异性基因蛋白表达的可行性和可靠性,精确的定位了人类主要 Cyclins 在细胞周期中的具体时相,为人类细胞周期的研究,提供了最基本的数据和规律。

摘 要

细胞周期素与相应的细胞周期素依赖性蛋白激酶相结合,驱动着细胞通过细胞周期各时相,而细胞周期素时相性规律大多来自酵母研究或同步化细胞的分析。本研究着重于人类非同步化细胞的细胞周期素时相性规律的揭示。采用人类白血病细胞株 MOLT-4,使其处于对数生长期,加以有丝分裂中期阻滞法,应用多参

数流式细胞术分析人类主要细胞周期素 B1、A 和 E。分析发现,细胞周期素 B1 峰值在 M 期,降解于 M 期后,细胞周期素 A 峰值在 G₂ 期,降解于 M 期,细胞周期素 E 峰值在 G₁ 晚期,降解于 S 期。以上结果,使我们首次在人类非同步化培养细胞展现了主要细胞周期素的时相性表达规律。

关键词: 细胞周期 细胞周期素 流式细胞术
MOLT-4 细胞

参 考 文 献

- [1] Norbury, C. et al., 1992, *Annu Rev Biochem.*, **61**:441-70.
- [2] Gong, J. et al., 1995, *Cell Growth Differ.*, **6**: 1485-1493.
- [3] Gong, J. et al., 1993, *Cancer Res.*, **53**:5069-5099.

EXPRESSION OF HUMAN MAJOR CYCLINS IN MOLT-4 CELLS STATHMOKINESIS

GONG Jian Ping CHEN Yi Fa SHU Dan TAO De Ding

(Molecular Medicine Center, Tongji Hospital, Tongji Medical University, Wuhan, 430030)

ABSTRACT

Cyclins are major proteins that combined with CDKs to drive cells pass different phases of cell cycle. Most data of cyclins schedule in human came from yeast researches or human synchronized cell lines. We present here is human major cyclins schedule of asynchronized cultured cells. The major cyclins (B1, A and E) were analyzed by cyclins/DNA multiparameter flow cytometry in exponential growth or Stathmokineses of MOLT-4 cells. The data present that cyclin B1 expression peak is in M phase and degradation is after M phase; cyclin A expression peak is in G₂ phase and degraded in M phase; cyclin E expression peak is in late G₁ and degraded in S phase. Schedule of human major cyclins in asynchronized cultured cells were presented by cyclins/DNA multiparameter flow cytometry. The data of their peaks and degradation time is very useful for cell biology and oncology research.

Key words: Cell cycle Cyclins Flow cytometry MOLT-4 cells