

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Hannon G, J, Beach D, 1994, *Nature*, **371**:257 - 261.
- [ 2 ] Melanic H, C. 1999, *Biophysics and Molecular Biology*, **71**:479 - 500.
- [ 3 ] 梁云燕、王代树、王永潮, 1991, 细胞生物学杂志, **13** (3):137 - 140.
- [ 4 ] 童迎凯、刘军、柳惠图, 2000, 中国生物化学与分子生物学报, **16**(4):514 - 519.
- [ 5 ] Guan K L, Jenkins C W, Li Yan et al. , 1994, *Genes Dev*, **8**:2939 - 2952.
- [ 6 ] Roussel M. F, 1999, *Oncogene*, **18**:5311 - 5317.
- [ 7 ] Koff A, Giodono A, Desai D, et al. , 1992, *Science*, **257**: 1689.
- [ 8 ] Reynisdottir I, polyak K, iavarone A, et al. , 1995, *Genes Dev*, **9**:1831 - 1845.
- [ 9 ] Sgambato A, cittadini A, Faraglia B, et al. , 2000, *J of Cellular physiology*, **183**:18 - 27.
- [ 10 ] Zhang Hong, Liu Hui Tu, Shi Fa Wu, 2000, *Chinese Science Bulletin*, **45**(15):1408 - 1412.
- [ 11 ] Galaktionov K, Chen X, Beach D, 1996, *Nature*, **382**: 511.
- [ 12 ] Terada Y, Inoshita S, Nakashima O, et al. , 1999, *Kidney International*, **56**:1258 - 1261.
- [ 13 ] Regen K, Uif RR, 1998, *Oncogene*, **17**:1457 - 1462.
- [ 14 ] Kawada M, Yamagoe S, Murakami Y, et al. , 1997, *Oncogene*, **15**:629 - 637.
- [ 15 ] Yan GZ, Ziff EB, 1995, *J, Neurosci*, **15**:6200 - 6212.

## EFFECT OF P15<sup>INK4B</sup> EXPRESSION ON THE INHIBITION OF G<sub>1</sub>/S PROGRESSION AND THE RELATION TO MAPK SIGNAL PATHWAY IN HUMAN MELANOMA CELLS\*

LIU Jun LIU Hui Tu\*\* TAN Xin GAO Ping

(The Key Laboratory of Cell Proliferation and Regulation Biology of Ministry of Education, College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

### ABSTRACT

The synchronized M phase cells of MLIK6 and MLC 2 were harvested by the method of thymidine(TdR) and N<sub>2</sub>O arresting. The result of <sup>3</sup>H-TdR incorporation indicated that the transition of G<sub>1</sub>/S of MLIK6 cells was delayed 2h compared with the control MLC 2 cells and the incorporation rate decreased obviously. Furthermore, the effect of P15<sup>INK4B</sup> expression on the some G<sub>1</sub> phase related regulatory protein was studied. When the synchronized cells in M phase were released for 8h(in late G<sub>1</sub> phase), the levels of CyclinD1, CyclinE, Cdk4 and C-Myc were decreased obviously in MLIK6 cells. But the expression of P27<sup>KIP1</sup> increased as compared with that of control MLC 2 cells. At the same time, the relationship between overexpression of P15<sup>INK4B</sup> and MAPK signal in transition from G<sub>1</sub> to S phase of A375 cells at late G<sub>1</sub> phase was studied, comparing with the control MLC 2 cells, the level of ERK1 and ERK2 almost have no change in MLIK6 cells, but that of P-ERK1 and P-ERK2(activated form) were decreased markedly. The results suggest that P15<sup>INK4B</sup> delayed G<sub>1</sub>/S transition and inhibited DNA synthesis by affecting G<sub>1</sub>/S phase related regulatory proteins and inhibiting the activity of ERK1 and ERK2.

**Key words:** P15<sup>INK4B</sup> Cell cycle MAPK Human melanoma cells

\* Project supported by the Natural Science Foundation of China(No. 39780014), the Natural Science Foundation of Beijing(No. 7961001) and the Major State Basic Research project(No. G1999053901).

\*\* Corresponding author.

## MAD2 蛋白在蚕豆细胞周期中的同源定位

马 岚 姚健晖 顾月华

(中国科学技术大学生命科学学院 合肥 230027)

细胞周期是一个受多种机制调控的高度有序的过程, 检验点调控机制是多种调控机制中的一种, 它可检测微管与染色体的结合, 以便在错误发生时及时阻止后期的启动, 让错误得到修复<sup>[1-3]</sup>。这类调控蛋白基因最初是从芽殖酵母中被发现, 目前至

少有七种具有此类功能的酵母基因被发现, 这些基因包括: Bub1, Bub2, Bub3, Mad1, Mad2, Mad3 和 Mps1<sup>[4]</sup>。其中研究最多的一种基因就是 Mad2。

本文 2002 年 3 月 19 日收到, 4 月 29 日接受。

该基因编码一种具有高度保守性的约 24kDa 的蛋白质(MAD2),它可以通过 Cdc20 阻碍后期启动复合物(APC)的活化<sup>[5-9]</sup>,从而阻碍后期的进行。作为动粒蛋白家族的一员<sup>[10]</sup>,MAD2 在脊椎动物细胞中定位于未与微管结合的动粒上,那些已经被微管占据的动粒上则观察不到 MAD2 的存在<sup>[11,12]</sup>。最近 Yu Hong-Guo 等的研究发现在小麦细胞中有 MAD 2 的同源蛋白的存在<sup>[13,14]</sup>。但除了小麦以外 MAD2 的同源蛋白还没有在其他种类植物中被发现<sup>[14,15]</sup>。我们的研究表明 MAD2 在蚕豆细胞中也存在同源蛋白,并且这种蛋白具有与动物细胞 MAD2 蛋白近乎相同的分布方式<sup>[11,12,21]</sup>。本文采用兔抗人 MAD2 抗体对蚕豆细胞中的该种蛋白进行研究,并就其在细胞周期中的定位进行了讨论。

## 材料与方法

### 1. 实验材料

蚕豆(*Vicia faba* L.)种子在蒸馏水中浸泡 24h,剥去种皮,将其放在铺有四层湿纱布的培养皿中置于 25±2℃ 下暗培养。待主根长至 1-2cm 时切去根尖,让侧根生长。取其根尖及新生芽尖备用。

### 2. 免疫印迹鉴定

植物总蛋白分别从根尖及茎尖两种分生组织中获取。首先将取下的分生组织称重后切碎,每克组织按 1ml 的比例加入匀浆液(10mmol/L Tris-HCl, 0.02% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0.001% PMSF, pH8.0)冰浴匀浆<sup>[16]</sup>。取适量的匀浆物以 2× 上样缓冲液稀释后进行超声处理,将处理后的样品在沸水浴中煮 2min 后离心去除样品中的不溶物。SDS-PAGE 分离蛋白后,将蛋白转移至硝酸纤维素膜上。脱脂奶粉封闭后,与一抗(兔抗人 MAD2 抗体,姚雪彪教授惠赠,稀释比例 1:500)在 37℃ 反应 1h。TPBS(PBS+0.05% Tween20)洗涤后与辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗反应,然后按分子克隆上的步骤进行显色<sup>[17]</sup>。

### 3. 染色体制片

取根尖与茎尖分生组织,切成 1mm 大小置于酶液中于 30℃ 消化 2.5h。酶液成分为:2% 纤维素酶 Onozuka R-10, 0.5% 果胶酶(w/v), 0.07% MES, 0.7mol/L 甘露醇, 6mmol/L CaCl<sub>2</sub>, pH 5.7<sup>[18]</sup>。消化完后以蒸馏水冲洗 3 次,取酶解后的组织块置于载玻片上,在 PBS 中压片。液氮冷冻揭片后,片子立刻浸入 PBS 中备用。

### 4. 免疫荧光染色

免疫荧光染色参照 Yao XB(1997)的步骤进行,并有一些改进。即将事先浸于 PBS 中的玻片取出,以 0.1% 的 TritonX-100 孵育 15min,然后用新鲜配制的 4% 的多聚甲醛固定。PBS 洗三次后以 3% 的 BSA 封闭,以避免抗体的非特异性结合。玻片冲洗后置于湿盒中与 MAD2 抗体共孵育,然后以 TPBS 进行洗涤。二抗采用罗丹明标记的羊抗兔

IgG,与玻片共孵育后再以 0.1μg/ml 的 DAPI 对 DNA 进行染色,缓冲甘油封片。若要同时对微管进行染色则在试验中需以微管稳定缓冲液(50mmol/L PIPES, 5mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 5mmol/L EGTA, pH 6.9)<sup>[19]</sup>代替 PBS(微管抗体为鼠抗人抗体,稀释比例为 1:5000),同时二抗采用 FITC 标记的羊抗鼠的 IgG,以区别于上一步 MAD2 的染色。若要观察 MAD2 在间期细胞中的分布则玻片在经去垢剂抽提之前须先以 4% 的多聚甲醛固定。做好的玻片在 OLYMPUS BX60 荧光显微镜下观察,显微图片以 SPOT CCD 相机拍摄,并用 Adobe Photoshop5.0 进行处理。

## 结 果

### 1. 蚕豆组织中 MAD2 同源蛋白的免疫印迹鉴定

MAD2 为一种进化中高度保守的蛋白质,在不同种类的生物中其分子量也不尽相同,例如在 HeLa 细胞中 MAD2 的分子量为 23.5kDa<sup>[11]</sup>,在蛙卵抽提物及蛙成纤维细胞中为 25kDa<sup>[12]</sup>,而在小麦的所有组织中则为 24kDa<sup>[13]</sup>。为证明蚕豆中有 MAD2 的同源蛋白存在,我们以蚕豆的根尖及茎尖分生组织为材料提取总蛋白进行免疫印迹分析。实验结果表明蚕豆的根尖及茎尖分生组织均有可被 MAD2 抗体特异识别的蛋白存在,该蛋白分子量在 26kDa 左右(图 1),比小麦及动物细胞内的该种同源蛋白稍大一些。

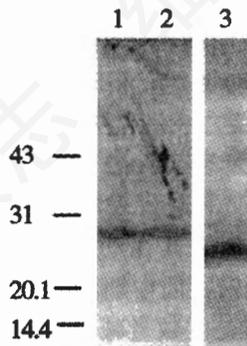


图 1 MAD 2 的免疫印迹结果

1. 来自于根尖生长点的蛋白。
2. 来自于茎尖分生组织的蛋白。
3. 人细胞 MAD2 分子对照。

### 2. MAD2 同源蛋白在蚕豆细胞中的定位

我们采用间接免疫荧光染色法来确定 MAD2 同源蛋白在蚕豆细胞中的定位,及其在整个细胞周期中的分布模式。荧光染色结果显示 MAD2 在植物细胞中同样定位于染色体的动粒部位,其亚细胞分布随细胞周期的进行而变化:在间期细胞中, MAD2 分布于整个细胞中,但这种分布是不均匀的,

因为 MAD2 会首先聚集于核膜外侧形成一个亮环(插页 1, 图版图 1), 在早中期(prometaphase)细胞中, 随着核膜的破裂 MAD2 开始在动粒处聚集, 最后 MAD2 定位于动粒, 在动粒处形成很亮的小点(插页 1, 图版图 2)。随着微管的延伸, 动粒逐渐被微管所捕获, 在那些已有微管结合的动粒处, MAD2 的染色逐渐减弱直至消失(插页 1, 图版图 3)。在中期细胞中, 染色体完全排列在赤道板上以后, 动粒处已没有 MAD2 的存在(插页 1, 图版图 4)。到晚中期及后期后, 在动粒区域更无 MAD2 的分布(插页 1, 图版图 5)。本实验共重复 8 次, 共观察细胞数 4000 个左右, 其中有丝分裂期细胞约占总细胞数的 40%, 有丝分裂前期细胞约占有丝分裂期细胞数的 60% 左右, 我们多次试验的结果均显示由上述现象的存在。另外, 为了检测免疫荧光标记反应的特异性, 每次试验都设了缺少一抗孵育的阴性对照, 在整个实验中, 阴性对照在染色体区域均未有信号产生。

## 讨 论

MAD2 不仅作为动粒蛋白家族的一员参与检测染色体与微管的附着, 更是作为一种重要的蛋白参与了纺锤体检验点这一在进化中非常保守的过程作用的发挥<sup>[20]</sup>。我们的实验结果显示, 针对人体细胞来源的 MAD2 的抗体可以特异性地识别蚕豆染色体的动粒部位, 这表明植物体内该种蛋白至少有部分蛋白序列与哺乳动物具有相同的免疫原性, 这更进一步证明了动粒蛋白在进化中的保守性。

我们通过观察发现 MAD2 在蚕豆细胞中的出现及分布随细胞周期的进行表现出周期性的变化, 其定位模式非常类似于其在动物细胞中的同源蛋白<sup>[11,12,21]</sup>。这些蛋白在前中期汇集于动粒处, 随着微管的延伸, 在动粒处的数量减少, 表现在染色产生的亮点的减弱及减少。最后当动粒在中期全被微管捕获后亮点消失。在真核生物中对 MAD2 最早的研究就清楚地指出 MAD2 在动粒部位的出现仅限于早中期即染色体在赤道板聚集之前<sup>[10,11]</sup>。Waters 等随后证明 MAD2 从动粒处的消失并不是立即发生的, 而是有一个时间过程, 在此过程中 MAD2 在动粒处的染色逐渐减弱直至消失<sup>[22]</sup>。纺锤体如何与染色体动粒部位起始结合, 是什么原因使 MAD2 的结合仅局限于位于微管结合的动粒处, 又是什么原因导致 MAD2 在动粒处的消失, 这些问题仍未有一个定论。有些人认为微管的结合是 MAD2 在中期消失的原因<sup>[22]</sup>, 而另一些人认为微管在动

粒处施加的张力与 MAD2 的消失有关, 是纺锤体检验点的重要组成成分<sup>[23,24,25]</sup>。Yu Hong-Guo 则认为微管结合与张力均为有丝分裂及减数分裂中纺锤体检验点的成分, 两者在出现时间及相对贡献上存在差别, 以适应不同纺锤体装配方式的需要<sup>[13]</sup>。蚕豆作为一种模式材料经常被应用于各种染色体的研究中, 本文首次在蚕豆细胞中发现动粒蛋白的存在, 为以上问题的研究提供了一个可能的途径, 同时为动粒蛋白在动植物细胞中的进一步研究及其在进化中的作用提供了有价值的线索。

## 摘 要

细胞周期是一个高度有序的过程, 其运行过程受到多个检验点(checkpoint)的严格监控。MAD2 是动物细胞纺锤体检验点(spindle checkpoint)中一种重要的蛋白<sup>[6,7,9]</sup>。我们利用免疫印记法从蚕豆组织中检测到一种 MAD2 的同源蛋白, 该蛋白的分子量在 26KD 左右, 其亚细胞分布方式与动物细胞大致相同, 都随细胞周期的进行而变化: 在间期细胞中, MAD2 分布于整个细胞中, 并且在核膜外侧有优先聚集; 在有丝分裂前期细胞中, MAD2 在核膜破裂后开始在动粒处聚集; 到早中期(prometaphase), MAD2 定位于动粒; 随着微管的延伸, MAD2 逐渐减少直至消失, 在中期, 晚中期及后期细胞中, 动粒处已无 MAD2 的分布。

关键词: 蚕豆 检验点蛋白 动粒 同源定位

## 参 考 文 献

- [1] Hartwell, L. H., Weinert, T. A., 1989, *Cell*, **66**: 507-512.
- [2] Murray, A., 1994, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **6**: 872-876.
- [3] Elledge, S. J., 1996, *Science*, **274**: 1664-1672.
- [4] Hardwick, K. G., 1998, *Trends. Genet.*, **14**: 1-4.
- [5] Hwang, L. H. et al., 1998, *Science*, **279**: 1041-1044.
- [6] Fang, G., Yu, H., Kirschner, M. W., 1998, *Genes. Dev.*, **12**: 1871-1883.
- [7] Kallio, M. et al., 1998, *J. Cell. Biol.*, **141**: 1393-1406.
- [8] Wassmann, K., Benzra, R., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 11193-11198.
- [9] Elledge, S. J., 1998, *Science*, **279**: 999-1000.
- [10] Sugata, N. et al., 1999, *J. Biol. Chem.*, **274**: 27343-27346.
- [11] Li, Y., Benzra, R., 1996, *Science*, **274**: 246-248.
- [12] Chen, R. H. et al., 1996, *Science*, **274**: 242-246.

- [13] Yu, H. G. , Muszynski, M. G. , Dawe, R. K. , 1999, *J. Cell. Biol.*, **145**: 425-435.
- [14] Yu, H. G. , Hiatt, E. N. , Dawe, R. K. , 2000, *Trends in Plant Science*, **5**: 543-547.
- [15] Hoopen, R. T. et al. , 2000, *Chromosome*, **109**: 482-489.
- [16] 王关林, 方宏筠. 1998, 植物基因工程原理与技术, 634-636.
- [17] Sambrook, J. , Fritsch, E. F. , Maniatis, T. , 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2<sup>nd</sup>)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [18] 上海植物生理学会, 1985, 植物生理学试验手册, 1-5.
- [19] Yao, X. B. , Anderson, K. L. , Cleveland, D. W. , 1997, *J. Cell. Biol.*, **139**: 435-447.
- [20] Mnazanero, S. et al. , 2000, *Chromosome*, **109**: 308-317.
- [21] Hardwick, K. G. , 1998, *Trends Genet.*, **14**: 1-4.
- [22] Waters, J. C. et al. , 1998, *J. Cell. Biol.*, **141**: 1181-1191.
- [23] Nicklas, R. B. , 1997, *Annu. Rev. Biophys. Biochem.*, **17**: 431-449.
- [24] Waters, J. C. et al. , 1999, *Current Biology*, **9**: 649-652.
- [25] Nickals, R. B. , Ward, S. C. , Gorbsky, G. J. , 1995, *J. Cell. Biol.*, **130**: 929-939.

## LOCALIZATION OF MAD2 HOMOLOGUE IN Cell CYCLE OF VICIA FABA

MA Lan YAO Jian Hui GU Yue Hua

(School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027)

### ABSTRACT

Cell cycle is a highly ordered process, and it is tightly monitored by checkpoints. MAD 2 is an important protein of spindle checkpoint. We have identified a *broad bean* homologue of MAD 2 using immunoblotting method. It has a MW of about 26kDa. The pattern of its localization in mitotic cells is almost like those homologues in animal cells, it also varies with the stage of mitosis. During interphase, MAD 2 was distributed throughout the cell and had a prominent localization in perinuclear area. After nuclear envelope broke down, it began accumulating on kinetochore. In prometaphase, MAD 2 colocalized with the kinetochores. With the extension of microtubule, the kinetochore was labeled weakly or not at all. By late metaphase and anaphase, Mad 2 was not detectable on kinetochores.

**Key words:** *Vicia faba* Checkpoint protein Kinetochore Homologous location

## 无血清培养高密度乳猪肝细胞的形态和功能变化

陈 钟\* 丁义涛

张鹤云

(南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科 南京 210008)

(南京大学生化系 南京 210093)

生物人工肝(BAL)是治疗急性肝衰竭(ALF)或为肝移植创造条件的一种具有良好前景的手段。猪肝细胞因其分化功能接近于人肝细胞,且细胞产量较高,是最合适的异种细胞来源<sup>[1]</sup>,目前多数BAL使用猪肝细胞。理想的细胞培养密度为 $1 \times 10^5 - 5 \times 10^5 / \text{ml}$ <sup>[2]</sup>,然而,BAL需要大量肝细胞来支持ALF患者的肝功能<sup>[3-4]</sup>。制成有临床意义的BAL约需人全肝量的10% - 20% ( $2 \times 10^9 - 4 \times 10^9$  个细胞)<sup>[5]</sup>,BAL中细胞的密度常超过 $1 \times 10^7 / \text{m}^3$ <sup>[3]</sup>。此外,BAL使用时含血清培养基常需换成无血清培养基<sup>[6]</sup>。因此,了解肝细胞在无血清培养基中高密度培养的形态和功能对于判断BAL的治疗效果十分重要。但是,迄今为止,所见报告甚少<sup>[7-9]</sup>。本文研究了高密度猪肝细胞在无血清培养时的形态和功能。

### 材料和方法

#### 1. 材料

中国实验用小型乳猪10只,体重2.7-4.0 kg,雌雄不限,由本院实验动物中心提供。胶原酶IV、RPMI1640购于Gibco公司,其他试剂为分析纯级。

#### 2. 肝细胞分离和培养

采用改良的原位两步胶原酶灌注法分离乳猪肝细胞<sup>[10]</sup>。分离的肝细胞清洗后悬浮在RPMI1640中。台盼蓝拒染试验测活率。肝细胞以不同的密度接种至含 $200 \mu\text{g/L}$  氢化可的松,  $1 \text{mg/L}$  HGF,  $10 \mu\text{g/L}$  EGF,  $20 \mu\text{g/L}$  NGF,

本文2001年11月15日收到,2002年3月20日接受。  
本研究受江苏省卫生厅重点发展项目基金(BQ2000200)资助。

\*现工作单位:江苏南通医学院附属医院普通外科,邮编:226001。