

Cdc2/cyclin B1 对中心体蛋白 Nlp 的调控在细胞生长中的作用

赵雪莲 宋咏梅 金顺钱 詹启敏

摘要 目的 研究中心体蛋白 Nlp 受 Cdc2/cyclinB1 磷酸化调控对细胞生长的影响。方法 Northern blot 检测不同组织中 Nlp 的表达;EGFP - Nlp 转染 HeLa 细胞,采用 Double - Thymidine 方法细胞同步化后释放,细胞免疫荧光方法观察 Nlp 在整个细胞周期中的亚细胞定位;构建 Nlp 磷酸化位点突变细胞系,采用人工计数和 MTT 法检测磷酸化位点突变对细胞生长的影响。结果 Nlp 在不同组织中存在表达差异,Nlp 在不同细胞周期呈现不同的亚细胞定位,磷酸化位点 Ser185 和 Ser589 的突变促进细胞的体外生长。结论 Cdc2/cyclin B1 磷酸化位点突变后,Nlp 获得了更强的促进细胞生长的能力。

关键词 Nlp Cdc2/cyclin B1 磷酸化 细胞生长

The Effect of Cdc2/cyclinB1 on Regulating Centrosome Protein Nlp in Cell Growth. Zhao Xuelian, Song Yongmei, Jin Shunqian, Zhan Qimin. State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China

Abstract Objective To study the effect of Cdc2/cyclinB1 on regulating centrosome protein Nlp in cell growth. **Methods** Nlp expression in different tissues was detected by Northern blot. Transfection EGFP - Nlp was transfected into HeLa cells, and then synchronized by Double - Thymidine. Nlp subcellular localization throughout the cell cycle was investigated by immunofluorescence. Nlp phosphorylation sites mutant cell lines were built. Phosphorylation site mutation on cell growth was detected by manually counting and MTT assay. **Results** Nlp expression was distinct in different tissue. Nlp showed different subcellular localization throughout the cell cycle. Phosphorylation sites Ser185 and Ser589 mutation promoted cell growth *in vitro*. **Conclusion** Nlp obtains stronger ability to promote cell growth after Cdc2/cyclin B1 phosphorylation sites mutant.

Key words Nlp; Cdc2/cyclin B1; Phosphorylation; Cell growth

BRCA1 在大于 70% 的遗传性乳腺癌的病例中存在突变,是公认的乳腺癌易感基因,在细胞周期调控中起重要作用^[1,2]。为了深入了解 BRCA1 在乳腺癌发生发展中的作用机制,笔者实验室采用酵母双杂交实验筛选得到一个新的与 BRCA1 相互作用的蛋白 Nlp。在 Nlp 与 BRCA1 的相互作用的研究中,笔者发现 Nlp 的中心体定位依赖于 BRCA1 的正常功能。用 siRNA 方法来抑制细胞内源 Nlp 的表达可导致多核细胞现象,同样条件下,再在由于缺乏正常 BRCA1 而

产生中心体扩增和多核现象的 HCC1937 细胞中导入外源野生型 BRCA1,中心体异常并没有得到显著的缓解。说明 Nlp 在 BRCA1 调控中心体稳定性方面是一个重要的效应因子。通过 time - laps 成像分析,抑制内源性 Nlp 的表达可导致染色体分离异常,最终影响正常的有丝分裂进程并促进了基因组不稳定性发生。多项实验结果表明 Nlp 具有潜在的癌基因的特性,并可能跟肿瘤的发生发展相关^[3,4],在人类肺癌和乳腺癌中的检测结果支持笔者以上的猜测,笔者分别用免疫组化、Western blot 和 RT - PCR 从组织、蛋白和 mRNA 水平检测肿瘤组织中 Nlp 的表达情况,结果表明 Nlp 在多种肿瘤存在表达失调^[5,6]。

蛋白质水解和磷酸化作用是中心体蛋白的两种主要调控形式^[7-9]。到目前为止,3 个 Nlp 上游调控因子被鉴定。一个是 Plk1,有丝分裂之前,激活的 Plk1 磷酸化 Nlp,破坏 Nlp 与中心体,以及 Nlp 与 γ -tubulin 的相互作用,引起 Nlp 从中心体脱离,允许有

基金项目:国家重大基础研究计划“973”项目(2009CB521801);国家自然科学基金重点项目和创新团体项目(30730046,30721001)

作者单位:100021 北京,中国医学科学院/北京协和医学院肿瘤医院研究所分子肿瘤学国家重点实验室

通讯作者:詹启敏,中国医学科学院肿瘤医院研究员,北京协和医学院教授,博士生导师,国家“973”重大基础研究项目(肿瘤领域)首席科学家,教育部“长江学者奖励计划”特聘教授,现任中国医学科学院/北京协和医学院副院长。电子信箱:zhanqimin@gmail.com

丝分裂装置——纺锤体的构建,伴随着微管生发活性的增强。而失调的 Nlp 可导致异常纺锤体的形成^[10]。Nlp 的另一个调控因子是 Nek2,活性的 Nek2 同样可以磷酸化 Nlp 并使其离开中心体,且该磷酸化作用可能引发 Nlp 被 Plk1 的磷酸化^[11]。笔者最近的研究表明,cdc2/cyclin B1 是另外一个关键的 Nlp 上游调控因子,其通过 Ser185 和 Ser589 的磷酸化来调控 Nlp 的亚细胞定位及 APC/c 途径介导的蛋白水解^[12]。Cdc2/cyclinB1 激酶复合物是著名的细胞周期调控因子,常常在肿瘤发生发展中被发现过度激活,导致肿瘤细胞的过度增生^[13]。本文的研究目标旨在通过肿瘤学表型的研究揭示 Cdc2/cyclin B1 对 Nlp 的磷酸化调控在肿瘤生物学中的作用。

材料与方法

1. 细胞培养与转染:人宫颈癌细胞系 HeLa 细胞由含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养。HeLa 细胞的瞬时转染参见常规脂质体转染步骤(lipofectamin reagent, invitrogen);稳定细胞系的建立:转染 HeLa 细胞 48h 后,将细胞以 1:10 的比例接种到 100mm 培养皿中,在含 400 μ g/ml G-418 的培养基进行选择培养,14 天后将肉眼可见克隆在含 200 μ g/ml G-418 选择培养基中扩大培养,通过置荧光显微镜观察和 Western blot 进行克隆鉴定。

2. 质粒:pEGFP-C3 为本室保存质粒;pEGFP-C3-Nlp 为以 pEGFP-C3 为载体,将人全长 Nlp cDNA(由日本 KAIUSADNA 研究所提供)定向克隆至 Sal I 和 Sma I 两酶切位点之间而获得;Ser185Ala 和 Ser589Ala 点突变质粒以 pEGFP-C3-Nlp 质粒为模板,设计引物进行点突变而获得(QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit,Stratagene)。

3. 细胞周期同步化处理:指数生长期的 HeLa 细胞,用 2mmol/L 的 thymidine 处理细胞 11h,然后以正常培养基培养释放 14h,再以 2mmol/L 的 thymidine 处理细胞 11h 后,释放细胞进入生长周期。

4. 细胞生长曲线的测定:(1)人工计数:将对数生长期的 HeLa 细胞以每皿 20000 接种于 60mm 培养皿中,设 6 个重复,之后每隔 24h 消化细胞进行人工计数,连续 6 天后统计数据并绘制生长曲线。(2)MTT 法:将对数生长期的 HeLa 细胞以每孔 3000 细胞接种于 96 孔板中,每种细胞设 6 个平行孔。24h 后,取 1 个 96 孔板,弃上清液,以 PBS 洗 3 次,每孔加入 200 μ l 浓度为 0.2mg/ml 的 MTT 的无血清培养基溶液,37 $^{\circ}$ C 培养 4h,小心弃去上清液,并加入 150 μ l DMSO 以溶解 MTT 沉淀,在酶标仪上震荡混匀,并测定 570nm 波长的 OD 值。连续测定 6 天,6 天后以测量天数为横坐标,以吸光度值为纵坐标绘制生长曲线。每隔 24h 以 MTT 染色,并检测其 570nm 的光密度(OD)值。

5. 细胞免疫荧光:细胞接种于含盖玻片的培养皿中进行培养,待固定前,PBS 洗细胞 2 次,每次 5min,用 -20 $^{\circ}$ C 预冷的

甲醇于室温固定细胞 10min;更换甲醇于 -20 $^{\circ}$ C 固定 10min 后,PBS 洗细胞 3 次,每次 5min,用正常山羊血清室温封闭 30min,PBS 稀释相应抗体,滴加在盖玻片上,于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜或室温 2h;PBS 洗 3 次,每次 5min,滴加 TRITC 偶联的羊抗鼠二抗和(或)FITC 偶联的羊抗兔二抗,室温孵育 1h;PBS 洗 3 次,每次 5min,DAPI 染色 15min,PBS 洗 3 次,每次 5min;封片并于荧光显微镜下观察。

结 果

1. Nlp 在不同组织中的表达:Nlp 在多种类型的肿瘤组织中存在高表达现象,具有潜在的癌基因特性。本文首先通过 Northern 来检测 Nlp 在正常组织中的表达分布情况。Northern 结果显示,在乳腺、肺、皮肤、胸腺、心脏组织中 Nlp 表达水平相对较高,而在肝脏、脑和卵巢中很低,几乎检测不到(图 1)。说明 Nlp 蛋白的表达调控存在组织间差异。

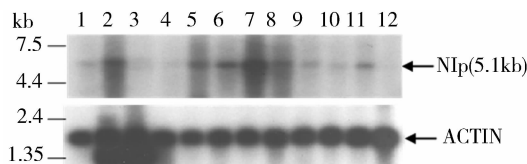


图 1 Northern 检测不同组织中 Nlp 的表达

1. 小肠;2. 乳腺;3. 肝;4. 脑;5. 肺;6. 皮肤;7. 心脏;8. 胸腺;
9. 睾丸;10. 肾;11. 子宫;12. 卵巢

2. Nlp 的亚细胞定位呈细胞周期依赖性:接下来笔者通过细胞免疫荧光方法来了解 Nlp 在整个细胞周期中的亚细胞定位情况。首先 EGFP-Nlp 转染 HeLa 细胞 36h 后,采用 Double-Thymidine 方法,将 EGFP-Nlp 细胞同步化于 G₁/S 期,然后释放细胞进入正常细胞周期,并于释放后的 12h 后固定细胞,经 DAPI 染核后,于正置荧光显微镜下观察。结果如图 2A 所示,在整个 G₁ 期,Nlp 明确地定位于中心体,呈点状;贯穿 S 期和 G₂ 随着中心体的复制,可观察到 Nlp 在已复制的两个中心体上的蛋白量不完全相同,由于从中心体复制到中心体的成熟期间,组成母中心体的子中心粒逐步成熟为新的中心体的母中心粒,在这个过程中 Nlp 在两个中心体上呈不对称分布,这一现象提示 Nlp 是母中心粒特异蛋白(图 2A, S $\rightarrow$ G₂);至 G₂/M 转换期,发现 Nlp 不再呈点状定位于中心体,而是呈“颗粒”状散布于整个胞质(图 2A, G₂/M)呈现戏剧性的定位的改变,提示这种转位可能在有丝分裂早期发挥重要作用;当细胞进入有丝分裂期,Nlp 又重新定位于纺锤体的两极(来源于两个复制的中心体);而随着有丝分裂期的结束,又发现 Nlp 出现在

两核中间(图 2A, cytokinesis), 笔者猜测这时 Nlp 定位于中间体(midbody), 暗示 Nlp 在胞质分裂中的潜在作用。图 2B 通过 γ -tubulin 染色指示中心体/纺锤体极, 进一步验证了 Nlp 在有丝分裂期的各个阶段

的定位情况。以上观察到的现象说明了 Nlp 在不同细胞周期呈现不同的亚细胞定位, 特别是有丝分裂早期, 从中心体定位到弥散到整个胞质的过程可能对有丝分裂进程具有重要意义。

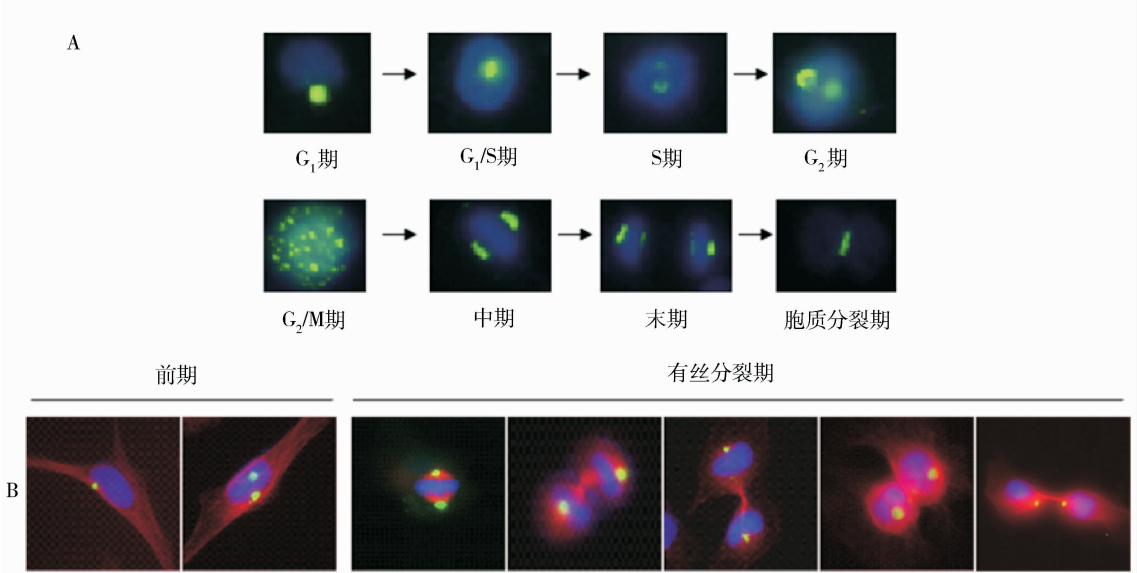


图 2 Nlp 的亚细胞定位呈细胞周期依赖性

3. Nlp 磷酸化位点突变细胞系的建立: 前期已有文献阐述了 Plk1 的磷酸化对 Nlp 的中心体定位的调控作用, 以及 Nlp 有丝分裂纺锤体的组装过程中的作用^[10]。本实验室最新研究结果表明, 激酶复合物 Cdc2/cyclin B1 在 Plk1 对 Nlp 的调控过程中作为 Plk1 的初级激酶(primary kinase)对 Nlp 的中心体定位和 Nlp 蛋白稳定性方面进行调控, 并且确定了该调控是通过 Nlp Ser185 和 Ser589 两个位点的磷酸化实现的。为了研究该磷酸化调控在肿瘤生物学的意义,

笔者建立了稳定表达 EGFP - Nlp wild type (WT)、EGFP - Nlp Ser185Ala (S185A)、EGFP - Nlp Ser589Ala (S589A)、EGFP - Nlp Ser185 + 589Ala (S185 + 589A) 以及 EGFP - C3 (EGFP) 5 种 HeLa 细胞系(图 3)。Western blot 证明它们均能稳定高表达 EGFP 或 EGFP - Nlp。通过荧光显微镜观察, Nlp 在四个稳定高表达 EGFP - Nlp 的 HeLa 细胞系中均呈点状分布, 但磷酸位点突变 Nlp 细胞系表现出较差的核质均一性, 表现为明显肿瘤细胞的特征。

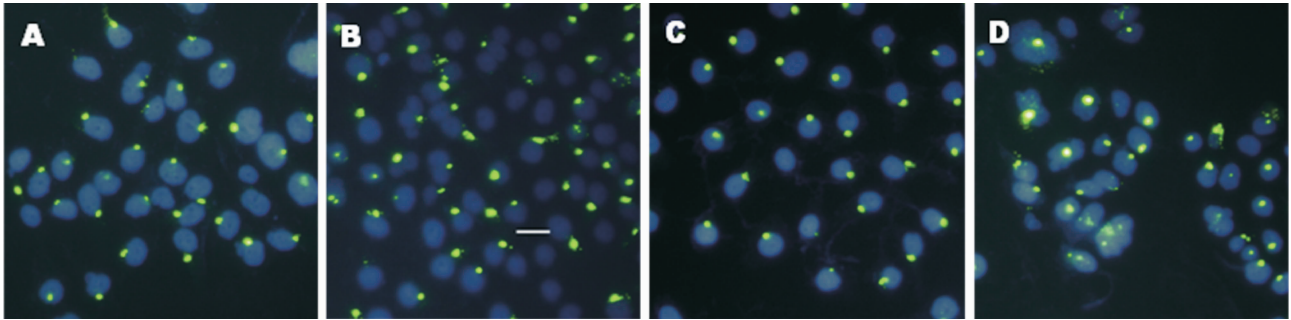


图 3 稳定细胞系的建立及鉴定

A. WT Nlp; B. Ser185Ala/Ser589Ala Nlp; C. Ser185Ala Nlp; D. Ser589Ala Nlp

4. 磷酸化位点 Ser185 和 Ser589 的突变促进 HeLa 细胞的体外生长: Cyclin B1 在多种恶性肿瘤中高表达, 其结果导致了 Cdc2/cyclin B1 激酶的持续激

活, 从而促进了细胞失控性的过度增生, 并促进肿瘤的发生发展^[13]。为了阐明 Cdc2/cyclin B1 活性失调对肿瘤生物学恶性表型的作用, 笔者分别用人工细胞

计数和 MTT 方法来比较野生型 Nlp 及突变型 Nlp 对 HeLa 细胞体外生长能力的影响。分别将 2×10^4 个 HeLa WT、HeLa S185A、HeLa S589A 和 HeLa S185 + 589A Nlp 细胞接种于 60mm 培养皿中,每间隔 24h 消化细胞进行计数。以细胞培养时间为横坐标,细胞数为纵坐标,绘制生长曲线。结果显示,与表达野生型 Nlp 的 HeLa 细胞相比,表达突变型 Nlp 的 HeLa 细胞的生长加快,表明非磷酸化 Nlp 对体外细胞生长有促进作用。同时采用了 MTT 法来检测不同细胞系的生长,得到了相似的结果。说明 Cdc2/cyclin B1 磷酸化位点突变后,Nlp 获得了更强的促进细胞生长的能力。

由于生长曲线是以稳定细胞系为实验材料,为了进一步证实 Nlp 磷酸化位点突变对细胞生长的作用,我们通过流式细胞仪分析了瞬时转染野生及突变 Nlp 的 HeLa 细胞的 S 期细胞百分比,来反映细胞增生情况。HeLa 转染不同 EGFP - Nlp 24h 后,PI 染色对 DNA 进行标记,通过流式细胞仪对 EGFP 阳性的细胞进行细胞周期分析,统计不同细胞 S 期细胞的百分数,图 4 的结果表明,3 株 Nlp 突变体细胞 S 期细胞的百分数显著高于野生型 Nlp 细胞。综合生长曲线和流式分析结果,我们得出结论,Nlp 的磷酸化失调促进了细胞的体外生长,进一步说明 Cdc2/cylin B1 对 Nlp 的调控作用在肿瘤生物学中的重要性。

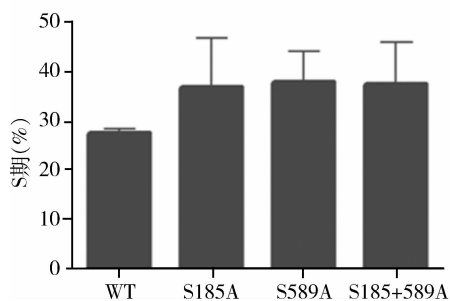


图 4 不同细胞 S 期细胞比较分析

讨 论

Nlp 是本实验室采用酵母双杂交实验筛选得到的一个新的与 BRCA1 相互作用的中心体蛋白。在 Nlp 与 BRCA1 的相互作用的研究中,笔者发现 Nlp 在 BRCA1 调控中心体稳定性方面是一个重要的效应因子,敲降内源 Nlp 导致染色体分离异常,最终影响正常的有丝分裂进程并促进了基因组不稳定性的发生,多项研究结果提示 Nlp 具有潜在的癌基因的特性,并可能跟肿瘤的发生发展相关,在人类肺癌和乳腺癌中

的检测结果显示支持笔者以上的猜测,免疫组化、Western blot 和 RT - PCR 从组织、蛋白和 mRNA 水平均证明 Nlp 在肿瘤的组织、蛋白和 mRNA 水平都表达失调。本论文主要阐明 Nlp 在不同组织水平上的表达差异,细胞周期中的亚细胞定位及 Cdc2/cyclin B1 磷酸化对 Nlp 调控情况,以利于全面了解和评价 Nlp 在肿瘤发生发展中所起的作用,促进对肿瘤病因学的认识及为临床诊断与治疗提供理论基础。

本研究观察到的稳定高表达 Cdc2/cyclin B1 磷酸化位点突变的 EGFP - Nlp 具有核质不均一性和细胞增生速度变快等恶性表型。这些表型引发我们思考以下两个问题:正常细胞中 Nlp 的表达量被严格地呈细胞周期依赖性调控的意义何在? Cdc2/cyclin B1 对 Nlp 磷酸化调控的意义何在? 通过已有文献报道和本研究结果笔者推测程序性的 Nlp 的移位/降解可能在中心体分离过程中有重要作用,该观点可得到以下 3 个证据的支持:①Nlp 在 G₂/M 期被 Plk1 调控而脱离中心体,Plk1 磷酸化位点突变体的表达可引起异常纺锤体的形成^[10];②Nlp 的蛋白水平经由 APC/c 的调控而呈细胞周期性变化,表达非降解型的 Nlp 突变体也可导致异倍体细胞的形成^[12];③本实验结果表明,G₂/M 期活性达高峰的 Cdc2/cyclin B1 磷酸化位点突变的 Nlp 可导致基因组不稳定性及促进细胞生长表型。综合以上证据,笔者认为 Nlp 很可能在中心体分离过程中发挥调控作用,Nlp 蛋白表达/降解的精确调控及精确时向磷酸化调控对 Nlp 正常功能具有重要意义,而失调的 Nlp 具有潜在癌基因特性。

参考文献

- Easton DF, Ford D, Bishop DT. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1 - mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. Am J Hum Genet, 1995, 56(1): 265 - 271
- Miki Y, Swensen J, Shattuck - Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science, 1994, 266(5182): 66 - 71
- Jin S, Gao H, Mazzacurati L, Wang Y, et al. BRCA1 interaction of centrosomal protein Nlp is required for successful mitotic progression. J Biol Chem, 2009, 284(34): 22970 - 22977
- Shao S, Liu R, Wang Y, et al. Centrosomal Nlp is an oncogenic protein that is gene - amplified in human tumors and causes spontaneous tumorigenesis in transgenic mice. J Clin Invest, 2010, 120(2): 498 - 507
- Qu D, Qu H, Fu M, et al. Increased expression of Nlp, a potential oncogene in ovarian cancer, and its implication in carcinogenesis. Gynecol Oncol, 2008, 110(2): 230 - 236
- Yu L, Song Y, Zhang Q. Ninein - like protein is overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma and contributes to cancer

- growth and resistance to apoptosis. *Oncol Rep*, 2009, 22(4): 789 – 798
- 7 Meraldi P, Nigg EA. Centrosome cohesion is regulated by a balance of kinase and phosphatase activities. *J Cell Sci*, 2001, 114(Pt 20): 3749 – 3757
- 8 Fry AM, Mayor T, Meraldi P, *et al.* C – Nap1, a novel centrosomal coiled – coil protein and candidate substrate of the cell cycle – regulated protein kinase Nek2. *J Cell Biol*, 1998, 141(7): 1563 – 1574
- 9 Haren L, Remy MH, Bazin I, *et al.* NEDD1 – dependent recruitment of the gamma – tubulin ring complex to the centrosome is necessary for centriole duplication and spindle assembly. *J Cell Biol*, 2006, 172(4): 505 – 515
- 10 Casenghi M, Meraldi P, Weinhart U, *et al.* Polo – like kinase 1 regulates Nlp, a centrosome protein involved in microtubule nucleation. *Dev Cell*, 2003, 5(1): 113 – 125
- 11 Rapley J, Baxter JE, Blot J, *et al.* Coordinate regulation of the mother centriole component nlp by nek2 and plk1 protein kinases. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(4): 1309 – 1324
- 12 Wang Y, Zhan Q. Cell cycle – dependent expression of centrosomal ninein – like protein in human cells is regulated by the anaphase – promoting complex. *J Biol Chem*, 2007, 282(24): 17712 – 17719
- 13 Song Y, Zhao C, Dong L, *et al.* Overexpression of cyclin B1 in human esophageal squamous cell carcinoma cells induces tumor cell invasive growth and metastasis. *Carcinogenesis*, 2008, 29(2): 307 – 315
- (收稿: 2010 – 09 – 25)
(修回: 2010 – 10 – 20)

小肠 RNA 对缺血再灌注条件下移植小型猪骨髓内皮祖细胞的体外干预效应观察

程 康 王海昌 周 祥 宗小娟 曾桂英

摘 要 目的 观察小肠 RNA 对小型猪骨髓内皮祖细胞(EPCs)生长的影响及适宜浓度,以及小肠 RNA 对缺血再灌注条件下移植 EPCs 的干预效应。**方法** 通过 Ficoll 方法分离,差速贴壁纯化,诱导生成猪 EPCs,分离提纯大鼠小肠 RNA。设立不同浓度 RNA 组,观察其对 EPCs 生长增生等细胞功能的影响;依据适宜浓度,设立小肠 RNA 预处理组、缺血再灌注后加小肠 RNA 组、单纯小肠 RNA 孵育组、单纯缺血再灌注组和正常对照组,观察细胞生长曲线和 LDH 变化,还原酶法测量 NO、NOS,观察 EPCs 的分泌功能。应用流式细胞仪观察 EPCs 凋亡情况,Western Blotting 观察 EPCs 表面 Flk – 1 的表达差异。**结果** 小肠 RNA 在 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 左右浓度促 EPCs 增生作用最明显;小肠 RNA 预处理组 EPCs 的 Flk – 1 水平上调,EPCs 凋亡较少,LDH 和 iNOS 生成明显低于单纯缺血再灌注组和缺血再灌注后添加小肠 RNA 组,但高于正常对照组和单纯小肠 RNA 处理组。**结论** 适宜浓度的小肠 RNA 可以促进 EPCs 的增生;小肠 RNA 预处理可以通过上调 EPCs 表面 Flk – 1 水平,减少凋亡和分泌不利因子等机制增强 EPCs 抵抗缺血再灌注后移植的微环境改变的不利影响。

关键词 内皮祖细胞 缺血再灌注损伤 小肠 RNA

Interfering Effect of Intestine RNA on Marrow – derived Endothelial Progenitor Cells of the Minipig Endured Ischemia and Reperfusion.

Cheng Kang, Wang Haichang, Zhou Xiang, Zong Xiaojuan, Zeng Guiying. Department of Cardiology, Xijing Hospital, Shanxi 710032, China

Abstract Objective To observe the growth and ideal content of marrow – derived endothelial progenitor cells (EPCs) of the minipig affected by intestine RNA, and study the interfering effect of intestine RNA on EPCs transplantation endured ischemia reperfusion injury (IRI). **Methods** We induced minipig EPCs by Ficoll separation method and purification based on different adherence rate, and separated the purified rat intestine RNA. We set different content of RNA groups to observe the effect on EPCs growth: group of intestine RNA pretreatment, group of adding intestine RNA after ischemia and reperfusion, group of incubation only with intestine RNA, group of simply ischemia and reperfusion, and normal control. The growth curve of the cells and content of LDH were detected. We measured NO, NOS with the deoxidize – enzyme methods to observe the secretion function of EPCs. Apoptosis situation was observed with flow cytometry, and Flk – 1 expression on the surface of EPCs with western blotting. **Results** The obviously stimulative effect of intestine RNA on EPCs growth was about 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The expression of Flk – 1 was up – regulated in the group pretreated with intestine RNA, with less apoptosis of

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370581)

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院心脏内科(程康、王海昌、周祥、曾桂英);放射医学教研室(宗小娟)

通讯作者:程康,电子信箱:chengkang2009@foxmail.com