

# P15<sup>INK4b</sup>对人黑色素瘤细胞周期及G<sub>1</sub>期相关调控基因的影响\*

刘军 童迎凯 柳惠图\*\* 张伟 高萍

(北京师范大学生命科学学院细胞所, 教育部细胞增殖与调控生物学重点实验室, 北京 100875)

**摘要** 人黑色素瘤细胞 A375 是 P15<sup>INK4b</sup> 缺失细胞系, 通过细胞转染技术将外源 P15<sup>INK4b</sup> cDNA 转染 A375 细胞, 经 PCR 和 Western blot 检测, 证明构建了 P15<sup>INK4b</sup> 稳定表达细胞模型 MLIK6. 流式细胞光度术结果显示, 与对照组 MLC2 相比, MLIK6 细胞 G<sub>1</sub> 期升高 11%, S 期下降 14%. 利用 TdR-N<sub>2</sub>O 同步法所得同步的 MLIK6 和 MLC2 的 M 期细胞比例分别达到 89.1% 和 76.8%, 而 G<sub>1</sub> 期的比例分别为 74.3% 和 76.4%. <sup>3</sup>H-TdR 掺入的结果显示, MLIK6 从 G<sub>1</sub> 期进入 S 期的时间比 MLC2 延长 2 h, 并且掺入强度明显减弱. 进一步探讨 P15<sup>INK4b</sup> 对 G<sub>1</sub>/S 相关调控基因的影响, 发现 G<sub>1</sub> 期的 MLIK6 细胞在诱导 P27 表达升高的同时, cyclinD1, Cdk4, cyclinE 和 c-myc 的蛋白水平均降低, 其中 cyclinD1 的抑制在晚 G<sub>1</sub> 期附近最显著, 而对 cyclinE 的抑制则在 G<sub>1</sub>/S 转换处表现突出, 癌基因 c-myc 表达受到明显抑制并贯穿于 G<sub>1</sub>→S 全部时间进程中. 说明 P15<sup>INK4b</sup> 是通过对 G<sub>1</sub> 期不同阶段细胞周期引擎分子 cyclinD1, Cdk4, cyclinE 和癌基因 c-myc 的抑制及增加 CKI P27 延缓了 G<sub>1</sub>/S 进程.

**关键词** P15<sup>INK4b</sup> CKI 细胞周期 G<sub>1</sub>期相关基因表达 细胞同步化

P15<sup>INK4b</sup> 是细胞周期蛋白激酶抑制因子 CKI (cyclin-dependent kinase inhibitor) 中 INK4 家族成员<sup>[1]</sup>. INK4 家族抑制的靶蛋白均为 cyclinD-CDK4/6 复合物<sup>[2]</sup>. 目前认为 INK4 家族成员包括 P15<sup>INK4b</sup>、P16<sup>INK4a</sup>、P18<sup>INK4c</sup> 和 P19<sup>INK4d</sup><sup>[3]</sup>, 它们在细胞周期 G<sub>1</sub>/S 进程中发挥作用, 导致增殖失控、细胞转化甚至引起凋亡<sup>[4]</sup>. 在众多的实体瘤和肿瘤细胞系中, 不同程度地存在着 P15<sup>INK4b</sup> 基因的缺失、启动子点突变或高甲基化<sup>[2]</sup>. 但 P15<sup>INK4b</sup> 的作用除了与 cyclinD-CDK4/6 结合导致 pRb 磷酸化水平降低外<sup>[5]</sup>, 下游事件, 特别是在 G<sub>1</sub> 期至 S 期的不同时间进程中, 其作用特性与机理均尚未见报道. 我们利用 P15<sup>INK4b</sup> 基因缺失的人黑色素瘤 A375 细胞构建了 P15<sup>INK4b</sup> 高表达细胞模型, 通过高效率的同步化技术, 检测了 P15<sup>INK4b</sup> 基因对 G<sub>1</sub>/S 进程有关的调控因子的影响.

2000-01-27 收稿, 2000-03-24 收修改稿

\* 国家自然科学基金(批准号: 39780014)、北京市自然科学基金(批准号: 7961001)、国家重点基础研究项目(批准号: 1999053901)和高等学校博士学科点专项科研基金(批准号: 98002714)资助项目

\*\* 联系人

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞培养

人黑色素瘤 A375 细胞(由北京市肿瘤防治研究所提供)及转染细胞在 37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中培养。

### 1.2 细胞转染

将纯化的真核表达质粒 PXJ-41-P15(含 P15 cDNA 的 PBS(SK<sup>+</sup> P15 质粒, 由美国冷泉港实验室赠与, 表达质粒由本室构建)和 PXJ-41 通过脂质体(Gibco BRL)转染 A375 细胞, 方法按说明书进行。24 h 后, 用含 G418(Sigma)培养基筛选阳性克隆, 进行扩大培养。

### 1.3 PCR

按文献[6]合成一对位于 P15 基因外显子 I 的引物, 其序列为 5'-CCAGAAG-CAATCCAGGCGCG-3'和 5'-AATGCACACCTCGCCAACG-3'。将处于对数生长期的细胞加适量细胞裂解液 55℃作用 30 min, 沸水浴 5 min, 12 000 g 离心 5 min, 取 2 μL 作为反应模板。PCR 条件为: 95℃ 2min; 95℃ 30 S, 59℃ 1min, 70℃ 1min, 30 个循环; 72℃ 10 min。产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳检测。

### 1.4 流式细胞术

取对数生长期细胞, 用 75% 乙醇固定, 离心收集后用 50 μg/mL 的 RNase 于 37℃ 消化 30 min, 650 μg/mL 碘化丙啶(PI)染色 1 h, 流式细胞分析仪测定。

### 1.5 细胞同步化及<sup>3</sup>H-TdR 掺入法鉴定细胞周期

采用 N<sub>2</sub>O-TdR 双阻断法<sup>[7]</sup>进行同步, 将同步至 M 期细胞在血清中培养 4 h, 细胞进入 G<sub>1</sub> 期, 继续培养, 分别取 4, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 和 21h 的细胞样品进行<sup>3</sup>H-TdR 掺入, 用液闪仪检测同位素掺入强度<sup>[8]</sup>。

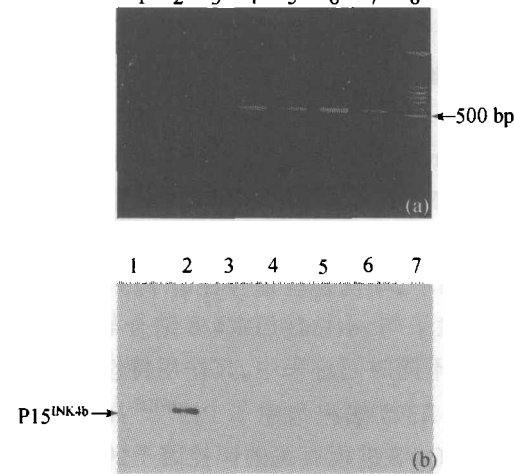


图 1 表达 P15<sup>INK4b</sup> 人黑色素瘤细胞模型的鉴定  
(a) PCR 分析。1~8 分别为: H<sub>2</sub>O 对照, MLC2, MLC1, MLIK9, MLIK8, MLIK6, MLIK2, 100bp DNA 分子量标准;  
(b) Western blot 分析。1~7 分别为: A375, MLIK6, MLIK8, MLC1, MLC2, MLC3, MLC4

### 1.6 Western blot<sup>[9]</sup>

从培养细胞中提取蛋白质后, 进行蛋白质电泳、转膜和抗原抗体反应及显色。实验所用抗体(CKI P15, cyclinD1, CDK4, cyclinE, P27 及 c-myc)均购于 Santa Cruz 公司。

## 2 结果

### 2.1 高表达 P15<sup>INK4b</sup> 人黑色素瘤细胞模型的建立与鉴定

通过 Western blot 和对基因组 DNA 的 PCR 实验证实, 在人黑色素瘤 A375 细胞中缺失 P15<sup>INK4b</sup> 基因(图略)。将重组质粒 PXJ-41-P15 和空载质粒 PXJ-41 分别转染 A375 细胞获得了多个具有 G418 抗性的细胞克隆, 通过对基因组 DNA 的 PCR 实验鉴定后(图 1(a)), 分别选取 MLIK6 和 MLC2 作为实验对象。Western blot 结果(图 1(b))显示, MLIK6 可

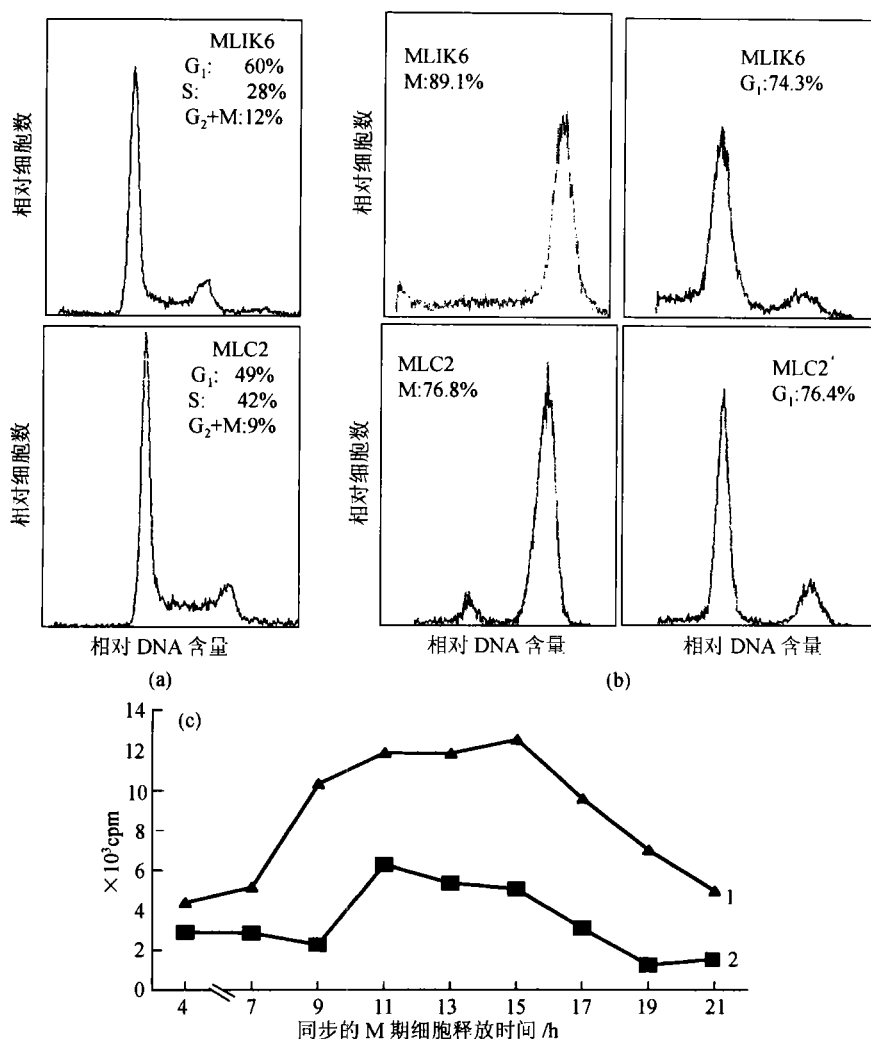


图 2 高表达 P15<sup>INK4b</sup>对人黑色素瘤细胞周期的影响

(a) FCM 结果示 MLIK6 和 MLC2 细胞的周期时相分布; (b) FCM 结果示 N<sub>2</sub>O-TdR 同步法所获得的 M 和 G<sub>1</sub> 期细胞同步百分率; (c) <sup>3</sup>H-TdR 掺入结果示 G<sub>1</sub>→S 进程, 曲线 1 为 MLC2, 2 为 MLIK6

以稳定表达 P15<sup>INK4b</sup>, 而 MLC2 不表达. 证明通过转染已得到了稳定表达 P15<sup>INK4b</sup>的细胞模型.

## 2.2 P15<sup>INK4b</sup>对人黑色素瘤细胞周期的影响及细胞同步化

流式细胞术结果(图 2 (a))显示, 与空载细胞 MLC2 相比, MLIK6 细胞 G<sub>1</sub> 期的比例上升了 11%, 而 S 期的比例下降了 14%. 通过 N<sub>2</sub>O-TdR 同步法分别得到同步化的 MLIK6 和 MLC2 细胞. 前者的 M 期同步百分率为 89.1%, G<sub>1</sub> 期为 74.3%; 后者的 M 期同步百分率为 76.8%, G<sub>1</sub> 期为 76.4%(图 2(b)). <sup>3</sup>H-TdR 掺入的液闪结果(图 2(c))看出, MLIK6 的掺入强度明显减弱, 其进入 S 期的时间和到达 S 期高峰的时间后移 2 h, 并且 MLIK6 的 S 期明显短于 MLC2. 说明 MLIK6 的 G<sub>1</sub>/S 进程受到了抑制.

### 2.3 P15<sup>INK4b</sup>表达对人黑色素瘤细胞 G<sub>1</sub> 期相关调控因子的影响

同步化的 MLIK6 和 MLC2 细胞阻断在 M 期后, 分别释放 4, 6, 8 和 10 h, 提取总蛋白, 利用 Western blot 分别检测了细胞周期调控相关蛋白 cyclinD1, CDK4, cyclinE, P27 和 c-myc 表达的变化. 结果(图 3)显示出 cyclinD1 表达在 MLIK6 细胞中受到抑制, 在 8 h 时其水平几乎为零, 而在 10 h 有所恢复. CDK4 表达水平在两种细胞中的变化不明显, 在 MLIK6 细胞中随着 G<sub>1</sub> 期的

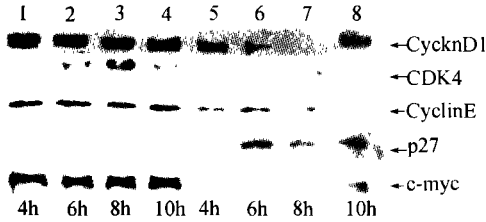


图 3 Western blot 结果示 P15<sup>INK4b</sup>高表达对人黑色素瘤细胞 G<sub>1</sub> 期相关调控因子的影响  
1~4, MLC2 细胞; 5~8, MLIK6 细胞; h, 同步的 M 期细胞释放时间

进程表达水平有减弱趋势. 与 MLC2 相比, MLIK6 的 cyclinE 表达水平明显降低, 并随着 G<sub>1</sub> 期的推进逐级减弱, 在 10h 后达到最低水平. MLIK6 的 c-myc 表达在各个时间点上均受到显著抑制. P27 表达水平与对照相比, 4h 时没有明显变化, 而在 6, 8 和 10 h 时的表达明显升高. 说明在人黑色素瘤细胞 G<sub>1</sub> 期至 S 期的进程中, P15<sup>INK4b</sup>增加了 P27 水平, 同时抑制了 cyclinD1 表达, 以晚 G<sub>1</sub> 期附近最为显著, 但对 cyclinE 的抑制效应却是在 G<sub>1</sub>/S 转换最为突出. 而 c-myc 表达受到明显抑制并贯穿于 G<sub>1</sub>→S 全部时间进程中.

## 3 讨论

P15<sup>INK4b</sup>基因位于染色体 9p21 区域, 与 P16<sup>INK4a</sup>相邻<sup>[10]</sup>, 显示出 9p21 在细胞周期调控中占有重要地位. 已有资料表明在 TGF- $\beta$  诱导并导致阻断 G<sub>1</sub> 期的 HaCaT 细胞中 P15<sup>INK4b</sup>表达升高了 30 倍<sup>[10]</sup>. 随后的研究大多数集中于在各种实体瘤和癌细胞系中该基因的失活机理(包括缺失、点突变和甲基化)上, 而对 G<sub>1</sub> 期 P15<sup>INK4b</sup>引发的下游事件知之甚少. 尤其是 P15<sup>INK4b</sup>在 G<sub>1</sub> 期内不同时间进程中的作用及机理尚未见报道.

我们将重组质粒 PXJ-41-P15 导入人黑色素瘤 A375 细胞, 得到了稳定表达 P15<sup>INK4b</sup>的细胞模型, 发现细胞的增殖受到抑制, 通过 FCM 分析表明了 P15<sup>INK4b</sup>过表达对人黑色素瘤细胞 G<sub>1</sub>→S 进程具有阻抑作用. CDK4/6 是 P15<sup>INK4b</sup>的靶蛋白<sup>[10]</sup>, P15<sup>INK4b</sup>与 CDK4/6 结合抑制了 cyclinD-CDK4/6 对 pRb 的磷酸化作用, 从而作用于 G<sub>1</sub>/S<sup>[10, 11]</sup>, 但是 P15<sup>INK4b</sup>对 G<sub>1</sub> 期不同阶段增殖相关调控因子的影响尚有待探讨. 通过同步化实验结果表明 P15<sup>INK4b</sup>降低了 cyclinD1 在 G<sub>1</sub> 期的水平, 以 8 h 时(即在晚 G<sub>1</sub> 期附近)抑制率达到最高, 提示了在该细胞中 cyclinD1 在 G<sub>1</sub> 期的主要作用时间点. 说明 P15<sup>INK4b</sup>对 G<sub>1</sub> 期的迟滞作用除了直接抑制 CDK4/6 的活性外, 还表现在降低 Cdk4 和 CDK4/6 的激活因子—cyclinD1 的表达水平.

CyclinE 是作用于 G<sub>1</sub> 期的另一个周期蛋白, 它与 CDK2 结合促进 G<sub>1</sub> 进程<sup>[12]</sup>, cyclinE-CDK2 复合物的活性在 G<sub>1</sub>/S 转换时出现峰值<sup>[13]</sup>. 我们的结果显示出在 P15<sup>INK4b</sup>高表达的 G<sub>1</sub> 期细胞中 cyclinE 蛋白水平下降, 以 10 h 时(G<sub>1</sub>/S 转换处)最为明显, 表明了与 cyclinD1 不同, cyclinE 在 G<sub>1</sub>/S 转换处表达被强烈抑制, 导致了 G<sub>1</sub>/S 转换的延迟. P27 最初发现于 TGF- $\beta$  阻断的细胞中, 它可以与 cyclinE-CDK2 形成复合物并抑制后者的活性<sup>[14]</sup>, 推迟 G<sub>1</sub>-S 进程. 在 P15<sup>INK4b</sup>, P27 和 cyclinE 的关系上, 目前认为在正常增殖的细胞中, P27 主要与 CDK4/6 结合. 当用 TGF- $\beta$  处理后, P15<sup>INK4b</sup>水平迅速升高, 使 P15<sup>INK4b</sup>- cyclinD-CDK4/6 复合物水平增加, 而 P27 与 cyclinD-

CDK4/6 结合的机会减少,与 cyclinE-CDK2 结合的机会增多<sup>[15]</sup>. 我们在观察到由于 P15<sup>INK4b</sup> 的高表达影响 cyclinE 表达降低的同时,也发现 P27 在晚 G<sub>1</sub> 期表达水平有明显的上升,说明高水平的 P15<sup>INK4b</sup> 可以通过上述机制抑制 cyclinE-CDK2 的活性,也可以通过影响 cyclinE 和 P27 的表达水平使 G<sub>1</sub> 期延长甚至阻滞.

Max 与 myc 基因产物 Myc 结合形成一个转录因子,它通过与 P80<sup>cdc25A</sup> 和 P80<sup>cdc25B</sup> 基因调节序列结合<sup>[16]</sup>,从而促进这些基因调节蛋白的表达正调于细胞周期进程. 近年来有实验显示出 c-myc 可能存在直接作用于细胞周期引擎分子的通路<sup>[17]</sup>参与细胞周期的调控. 在 MvILu 细胞中发现由 TGF- $\beta$  引发的 G<sub>1</sub> 期阻滞可以使 c-myc 表达下降,而过表达 c-myc 的细胞又可以使这一现象逆转<sup>[18]</sup>. 我们在 P15<sup>INK4b</sup> 高表达的 A375 细胞中观察到 G<sub>1</sub> 期的 c-myc 水平明显降低,从而进一步表明了 CKI 作为周期负调因子可通过作用于癌基因之表达而影响细胞周期进程. 同时也显示出癌基因 c-myc 可通过参与对细胞周期的调控影响细胞异常增殖与诱导癌变等作用.

### 参 考 文 献

- 1 Sherr C J, Roberts J M. Inhibitors of mammalian G<sub>1</sub> cyclin-dependent kinases. *Genes Development*, 1995, 9: 1 149
- 2 Schwaller J, Pabst T, Bickel M. Comparative detection and quantitation of human CDK inhibitor mRNA expression of p15<sup>INK4B</sup>, p16<sup>INK4A</sup>, p16 $\beta$ , p18<sup>INK4C</sup>, p19<sup>INK4D</sup>, p21<sup>WAF1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> and p57<sup>KIP2</sup> by RT-PCR using a polycompetitive internal standard. *British Journal of Hematology*, 1997, 99: 896
- 3 Marcos M, Ignacio P, Javier S, et al. Hypermethylation of the cell cycle inhibitor p15<sup>INK4b</sup> 3'-untranslated region interferes with its transcriptional regulation in primary lymphomas. *Oncogene*, 1999, 18:385
- 4 Arendt T, Holzer M, Gärtner U. Neuronal expression of cyclin dependent kinase inhibitors of the INK4 family in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 1998, 105: 949
- 5 Yuji Y, Hiroaki H, Kiitirou K. Analysis of the Rb Gene and Cyclin-Dependent kinase 4 Inhibitor Genes (p16<sup>INKA</sup> and p15<sup>INK4B</sup>) in Human Ovarian Carcinoma Cell Lines. *Experimental Cell Research*, 1997, 233: 233
- 6 Jin J, Harper J W, Bigner D D, et al. Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer Res*, 1994, 54: 6 353
- 7 梁云燕,王代树,王永潮. 一种高效率的细胞同步化方法. *细胞生物学杂志*, 1991, 13(3): 137
- 8 夏宗勤主编. *实验核医学与核药学*. 上海: 同济大学出版社, 1989. 54
- 9 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1 847
- 10 Hannon G J, Beach D. P15<sup>INK4B</sup> is a potential effector of TGF- $\beta$ -induced cell cycle arrest. *Nature*, 1994, 371: 257
- 11 Guan K L, Jenkins C W, Li Yan, et al. Growth suppression by p18, a p16<sup>INKA/MTS1</sup> and p14<sup>INKA/MTS2</sup>-related CKD6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Development*, 1994, 8: 2 939
- 12 Koff A, Cross F, Fisher A, et al. Human cyclinE, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. *Cell*, 1991, 66:1 217
- 13 Koff A, Giordano A, Desai D, et al. Formation and activation of a cyclinE-cdk2 complex during the G<sub>1</sub> phase of the cell cycle. *Science*, 1992, 257: 1 689
- 14 Koff A, Ohtsumi M, Polyack K, et al. Negative of regulation of G<sub>1</sub> in mammalian cells: Inhibition of cyclinE-dependent kinase by TGF-beta. *Science*, 1993, 260: 536
- 15 Timothy K, Niali S, Antonio G. Cyclins, cyclin-dependent kinase and cdk inhibitors: Implications in cell cycle control and cancer. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 1995, 5(2): 127
- 16 Galaktionov K, Chen X, Beach D. Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature*, 1996, 382: 511
- 17 Berns K, Kijimans E M, Bernards R. Repression of c-Myc responsive genes in cycling cells causes G<sub>1</sub> arrest through reduction of cyclin E/CDK2 kinase activity. *Oncogene*, 1997, 15(11):1 347
- 18 Warner B J, Blain S W, Seoane J, et al. Myc downregulation by transforming growth factor beta required for activation of the P15<sup>INK4b</sup> G<sub>1</sub> arrest pathway. *Molecular Cell Biology*, 1999, 19(9): 5 913