

佛波酯对 CKI p15^{INK4B}高表达的人黑色素瘤细胞生长及凋亡的影响*

童迎凯 柳惠图** 刘 军

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

摘要 通过 DNA 体外重组和转染技术, 将已构建好的含有 p15 基因全长的质粒 pXJ-41-p15 转染 p15 缺失的人黑色素瘤细胞 A375, 经 G418 筛选出阳性单克隆, 并经 PCR、蛋白质印迹等检测, 证明建立了 p15 稳定高表达的细胞模型。实验表明, 经佛波酯 (PMA) 长期处理, 实验组细胞中的 p15 表达水平进一步上升, 同时观察到蛋白激酶 C (PKC) 活性下降, 与对照组细胞相比 p15 高表达的细胞 PKC 活性及细胞生长均受到较强烈的抑制, 并能引起约 30% 的实验组细胞发生凋亡。凋亡细胞中 Caspase3 P20 亚基的水平上升。结果表明, CKI p15 与 PKC 信号系统在调节细胞增殖、凋亡的过程中具有一定的相关性, 它们的协同作用可能启动了细胞中与 Caspase 相关的凋亡通路, 使细胞发生凋亡。

关键词 p15, 周期蛋白依赖激酶抑制因子, 佛波酯 (PMA), 蛋白激酶 C, 细胞凋亡

学科分类号 Q291

p15^{INK4B}是近年来发现的周期蛋白依赖激酶抑制因子 (CDK inhibitor, CKI) 家族中的一个新成员^[1], 已知 CKI 家族与细胞增殖、分化及肿瘤发生、发展密切相关^[2], 但有关 p15^{INK4B}在细胞增殖等方面的调节作用了解不多, p15 的调节作用与信号系统之间的相关性更是知之甚少。本研究采用基因转染的方法建立了 p15 高表达的人黑色素瘤细胞模型, 对 p15 在细胞增殖、凋亡的作用中与佛波酯 (PMA) 有关的信号系统的相关性作了一定的探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

人黑色素瘤细胞 A375 由北京市肿瘤防治研究所提供, P15 外显子 I 引物和 Taq 酶, dNTP, DNA Ladder 分别购自赛百盛公司和 TaKaRa 公司, Lipofect AMINE PLUS 脂质体转染试剂盒和 ECL 免疫印迹试剂盒分别购自 GIBCO 公司和 Amersham 公司, PMA 购自 Sigma 公司, P15, 半胱氨酸蛋白水解酶 Caspase-3 P20 抗体购自 Santa Cruz 公司, 荧光染料 Hoechst 33342 购自 Molecular Probe 公司, γ -³²P-ATP 购自北京亚辉生物工程有限公司, 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 试剂和碘化丙啶 (PI) 由北京华美生物工程公司提供。

1.2 细胞培养

A375 细胞以及转染后的细胞在 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, DMEM 培养基中含 10% 小牛血清和 100 U/ml 青霉素, 100 μg/ml 链霉素。

1.3 质粒的制备和纯化

基本按文献 [3] 中的方法进行提取和纯化。

1.4 基因转染

利用本室构建的过表达 p15 的真核表达载体和空载体 pXJ-41-p15, pXJ-41-neo 质粒^[4], 通过脂质体方法转染细胞 24 h 后加入含 G418 (300 mg/L) 的培养基进行筛选, 两周后筛选出抗 G418 的阳性克隆, 进行扩大培养。

1.5 PCR

p15 基因含有两个外显子, 针对外显子 I 设计了 p15 基因引物^[5]: 上游引物: 5'-CCAGAAGCAATCCAGGCGCG-3'; 下游引物: 5'-AATGCACACCTCGCCAACG-3'。收集对数生长期细胞, 加适量裂解液, 55℃作用 30 min, 离心收集上清, 每次 PCR 反应约取 2 μl 作为 DNA 模板。每 50 μl PCR 反应体系中含 100 ng 基因组 DNA, 95℃ 2 min 起始, 95℃ 30 s 30~35 个循环, 59℃ 退火 1 min, 70℃延伸 1 min, 72℃终止 10 min。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离检测。

1.6 生长曲线 (MTT 法)

取对数生长期细胞按 2.5×10^3 /ml 接种于 96

* 国家自然科学基金资助项目 (39780014), 北京市自然科学基金重点项目 (7961001), 国家重点基础研究项目 (1999053901), 高校博士点科研基金资助项目 (98002714)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-62209699, E-mail: CKIPKC@ht.rol.cn.net

收稿日期: 2000-03-06, 接受日期: 2000-06-07

孔板, 加入 MTT (5 g/L), 37℃ 孵育 4 h, 加脱色液 DTW 处理 1 h 以上, 空白对照以 DMEM 培养基代替细胞悬液, 读取 A_{570} 值. 每点取 4 个平行孔的平均值. 每隔 24 h 测定一次, 直至第 5 天.

1.7 流式细胞术 (FCM)

取对数生长期细胞, 加入 75% 乙醇固定, 离心收集细胞, 用 PBS 洗两次后重悬, 用 RNA 酶 (50 mg/L) 于 37℃ 处理 30 min. 加 PI (650 mg/L) 染色 1 h 后用流式细胞分析仪测定.

1.8 蛋白质印迹

基本按文献 [3] 中的方法进行蛋白质电泳, 转膜, 封闭, 再用 p15 等一抗及辣根过氧化物酶标记的二抗进行孵育后, 按照 ECL 免疫试剂盒说明进行显色、曝光.

1.9 PKC 激酶活性分析

参考文献 [6] 进行. 4℃ 收集细胞, 加入裂解液 (2 mmol/L EDTA, 2 mmol/L EGTA pH 7.5, 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 0.33 mol/L 蔗糖, 0.5 mmol/L β -巯基乙醇, 0.5 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (PMSF), 1% Triton X-100, 10 g/L 亮抑蛋白酶肽 leupeptin), 超声使细胞破碎. 再加入适量裂解液冰浴振荡 1 h, 50 000 r/min, 4℃ 离心 1 h, 上清为胞内总 PKC.

4℃ 下以 1 ml 床体积的 DEAE-52 纤维素部分纯化 PKC. 活性测定的反应体系为 25 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 5 mmol/L $MgCl_2$, 25 μ g 组蛋白 (Histone I), 500 μ mol/L $CaCl_2$, 100 μ g 磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS), 0.2 μ g 二酰基甘油 (diacylglycerol, DG). 对照组中不加 $CaCl_2$ 和 PS, DG, 而加入 200 μ mol/L EDTA, 加入酶提取液, 30℃ 预保温 5 min, 再加 γ - ^{32}P -ATP 启动反应. 中止反应后将混合物点在 Whatman PE-81 膜上, 经洗膜、晾干, 通过液体闪烁计数器测定 cpm 值, PKC 活性以每毫克蛋白质的 cpm 值表示.

1.10 荧光染色观察细胞核

分别将在盖玻片上培养的贴壁细胞和加药后悬浮起来的细胞进行染色, 以 10 μ mol/L Hoechst 和 50 mg/L 的 PI 于 37℃ 染色 30 min, 用无血清培养基洗去染液后封片镜检. 荧光显微镜紫外光激发下观察细胞核的蓝色荧光, 发生染色质凝集的细胞为凋亡细胞, 而细胞核均匀着色、同时非 PI 着色的细胞为正常细胞. 只对非坏死细胞、PI 阴性率达 90% 以上的样品进行统计观察.

2 结 果

2.1 高表达 p15 细胞模型的建立与鉴定

经鉴定 A375 细胞是缺失 p15 基因的人黑色素瘤细胞株 (图略).

分别用重组质粒 pXJ-41-p15 和 pXJ-41-neo 转染 A375 细胞, 用终浓度为 300 mg/L 的 G418 筛选得到的抗性细胞株, 分别命名为 MLIK1、2、3、...9, 转染 pXJ-neo 空载体的细胞命名为 MLC1、2、3、4.

分别提取上述 MLIK 和 MLC 细胞的总 DNA 作为模板, 以 p15 基因外显子 I 上的引物扩增 p15 基因, 在 MLIK2、6、8、9 细胞中得到 542 bp 的扩增片段, 与 p15 Exon I 的片段大小相吻合. 证明 pXJp15 已成功转染进入 A375 细胞 (图 1a). 在转染 pXJ-41 空载体的 MLC1, MLC2 细胞中则未得到该片段.

分别提取上述 MLIK 和 MLC 细胞的总蛋白, 用 p15 抗体进行免疫印迹实验, 结果表明, MLIK6 细胞中有 p15 蛋白的高表达, 而 MLC1、2、3、4 细胞中则未见 p15 表达. 上述结果显示, 稳定高表达 p15 的人黑色素瘤细胞模型已被成功地建立 (图 1b). 选择 MLIK6 作为实验组细胞, 选择

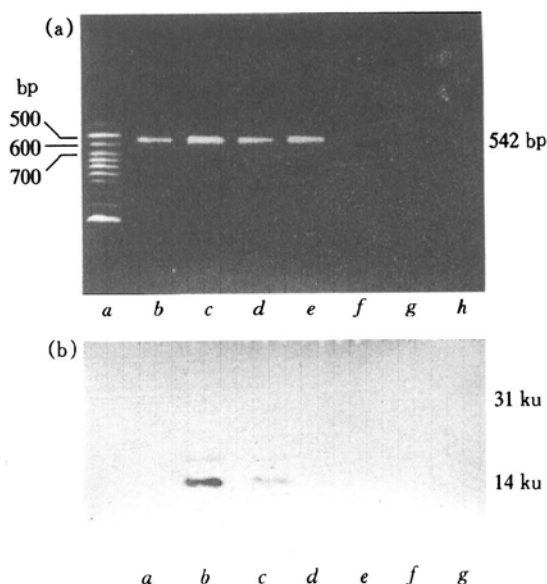


Fig. 1 Expression of p15 in transfected cells

(a) Analysis of p15 gene by PCR. a: 100 bp DNA marker; b, c, d, e: Clones of MLIK2、6、8、9 which are transfected with pXJ-41-p15; f, g: Clones of MLC1、MLC2 which are transfected with pXJ-41-neo; h: Control of H_2O . (b) Analysis of p15 protein by Western blot. a: A375; b, c: Clones of MLIK6、MLIK8 which are transfected with pXJ-41-p15; d, e, f, g: Clones of MLC3、MLC4、MLC1、MLC2 which are transfected with pXJ-41-neo.

MLC2 作为对照组细胞。

2.2 PMA 长期处理对 p15 表达水平和 PKC 活性的影响

取对数生长期 MLIK6 细胞, 用 100 $\mu\text{g/L}$ 的 PMA 作用 72 h 后提取总蛋白, 免疫印迹结果表明, 与不加药的对照组细胞相比, PMA 处理 72 h 的 MLIK6 细胞中 p15 的表达水平出现进一步上升 (图 2a)。

取对数生长期的 MLIK6 和 MLC2 细胞, 用 100 $\mu\text{g/L}$ 的 PMA 作用 72 h 后测定 PKC 活性。实验表明, 两组细胞分别与不加药的对照组细胞相比, PMA 均能抑制细胞的 PKC 激酶活性, 但 MLIK6 细胞中 PKC 活性抑制更强烈, MLC2 细胞中的抑制率为 81.13%, MLIK6 细胞中的抑制率为 95.01% ($P < 0.05$) (图 2b)。

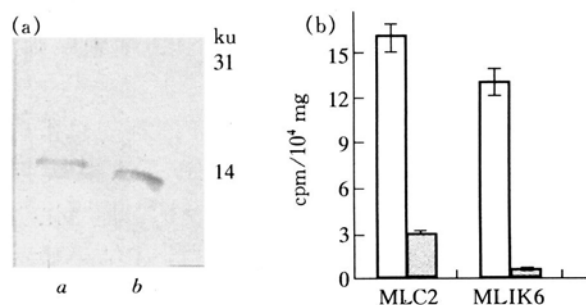


Fig. 2 The level of p15 protein (a) and the PKC activity (b) after treatment with PMA for 72 hours in cells
a: MLIK6; b: MLIK6 + PMA. □: control; ▒: PMA.

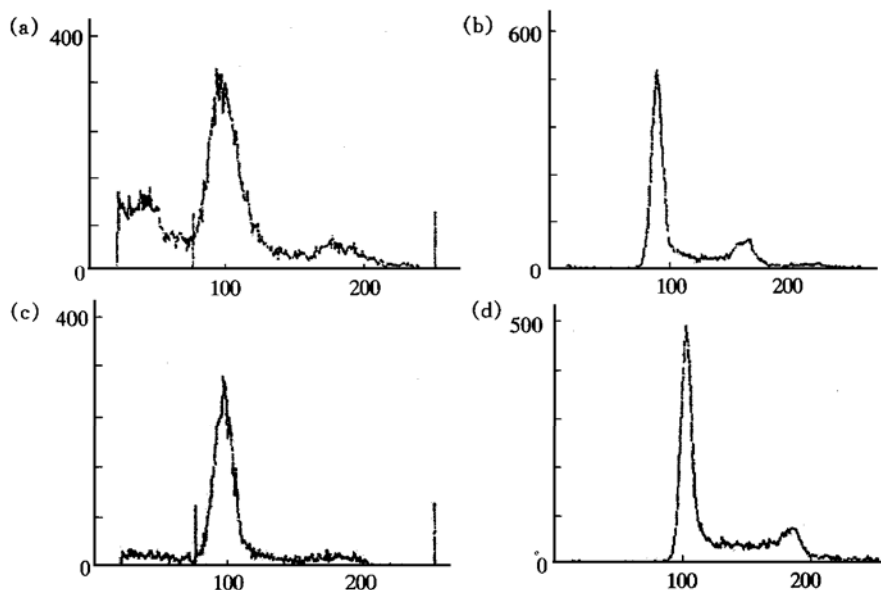


Fig. 4 Analysis of flow cytometry (FCM) of cells after treatment of PMA (100 $\mu\text{g/L}$) for 72 h

(a) MLIK6 + PMA; (b) MLIK6; (c) MLC2 + PMA; (d) MLC2.

进一步取用 100 $\mu\text{g/L}$ PMA 处理 72 h 的 MLIK6 细胞和 MLC2 细胞, 用 10 $\mu\text{mol/L}$ Hoechst

2.3 PMA 长期处理对细胞生长的影响

取适量的 MLIK6 和 MLC2 细胞分别于 DMEM 培养基和含有 PMA (100 $\mu\text{g/L}$) 的 DMEM 培养基中进行培养, 实验表明, PMA 能抑制 MLIK6 和 MLC2 细胞的生长, 并且在 PMA 作用的 72 h 后与 MLC2 细胞相比, PMA 能更明显地抑制 MLIK6 细胞的生长 (图 3)。

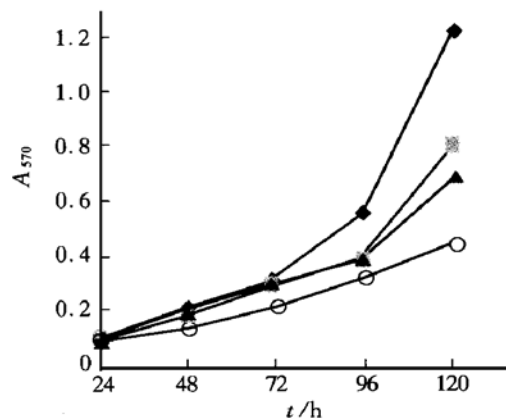


Fig. 3 Growth curve of cells after treatment with PMA

◆: MLC2; ▒: MLC2 + PMA; ▲: MLIK6; ○: MLIK6 + PMA.

2.4 PMA 对 p15 高表达的人黑色素瘤细胞凋亡的影响

FCM 分析表明, 用 PMA 长期处理的 MLIK6 细胞出现凋亡特异峰, 细胞凋亡比例为 28.9%, 而在相同处理的 MLC2 细胞中基本无此现象 (图 4)。

和 50 mg/L 的 PI 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 染色 30 min 后, 在荧光显微镜紫外光激发下进行观察。镜检结果表明, 用

PMA 处理 72 h 的 MLIK6 细胞中有部分细胞发生染色质凝集, 显示出凋亡特征. 而在相同处理的

MLC2 细胞中基本未发现类似现象 (图 5).

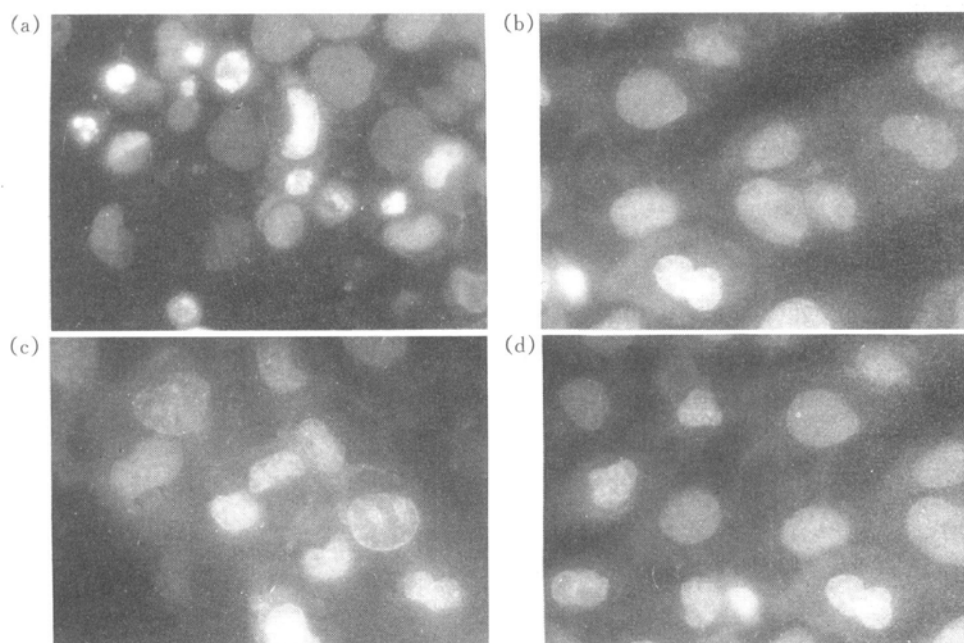


Fig.5 Analysis of fluorescence of cells stained by Hoechst33342 after treatment of PMA (100 µg/L) for 72 h

(a) MLIK6 + PMA; (b) MLIK6; (c) MLC2 + PMA; (d) MLC2.

提取 MLIK6 和用 PMA 作用 72 h 的 MLIK6 细胞的总蛋白, 经蛋白质印迹对凋亡通路中的重要分子 Caspase-3 的分析表明, PMA 作用后发生凋亡的细胞中 Caspase-3 活化状态的分子 P20 亚基的表达水平有一定提高 (图 6).

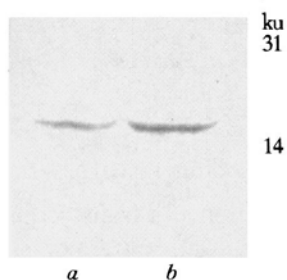


Fig.6 The level of Caspase-3 (P20) in cells after treatment of PMA (100 µg/L) for 72 h

a: MLIK6; b: MLIK6 + PMA.

3 讨 论

如前所述, 已有报道 p15 是抑癌基因和增殖抑制因子, 但对于 p15 作用的机理却了解不多, 能引起 p15 产生应答、调控细胞的信号更是知之甚少. 1994 年 Beach 小组发现在人角化细胞 HaCaT 中, 转化生长因子 TGF- β 能引起 p15 蛋白水平上升 30 倍^[7]. 但在细胞内是否存在 p15 基因调控与其他信号系统间的相互作用, 如在信号系统中占有重要地

位的肌醇磷脂通路是否参与 p15 相关的细胞周期调节, 一直是 CKI 研究领域的空白.

我们通过实验观察到, 当用 PMA 长期处理使 PKC 活性下降时, 细胞中的 p15 表达水平出现进一步上升. 这表明 p15 基因与 PKC 信号系统二者之间关系密切, 与 PMA 相关的 PKC 的变化能引起 p15 的应答. 对于 CKI 类分子与 PKC 信号系统之间的关系一直报道甚少, 有少量研究表明在 MCF-7 细胞中, 经 PMA 活化的 PKC 能阻抑细胞的 G1-S 和 G2-M 转换, 在此过程中 p21 水平升高, 并进一步影响 cyclinB 和 cdc2^[8]. 在卵巢癌细胞 SKOV-3 中, PMA 活化 PKC 之后能促进 p21 的表达, 且这种作用并不依赖于 p53 的存在, 而当 PKC 作用通路被阻抑时, PMA 就不能增加 p21 的水平^[9], 但有关 p15 与 PKC 作用的相关性则未见报道. 在我们的实验中发现 CKI p15 与 PKC 信号系统调控存在相关性, 首次观察到用 PMA 长期处理 p15 高表达的细胞时, 当 PKC 的活性受到更为强烈的抑制时, p15 的表达水平进一步上升. 同时, 细胞的生长速度更为缓慢, 并有接近 30% 的细胞出现凋亡. 我们注意到, 单独的 p15 或是 PMA 虽然都起到增殖抑制的作用, 但并不能引起细胞凋亡. 有人鉴于细胞凋亡需要磷酸酶的活化提

出 PKC 可能通过抑制蛋白去磷酸化而抑制细胞凋亡, 这显示出 PKC 对凋亡的负调作用. 在本细胞模型中, 凋亡的发生是以 PKC 活性抑制为前提的, 这说明 PKC 在此特定的细胞中对凋亡起到负调作用, 但这种调节依赖于 p15 基因的共同作用. p15 的高表达引起 PKC 活性的下降, PMA 长期处理下引起 PKC 活性更为强烈降低的同时导致 p15 水平的进一步上升, 上升的 p15 又可能进一步抑制 PKC 激酶的活性. 这种调节模式提示了 p15 上升到一定水平时, 增殖受到更强烈的抑制, 可能突破了细胞控制凋亡的“阈值”, 使细胞走向凋亡. 在此过程中, p15 可能充当了 PMA 诱导的细胞凋亡中的重要中介者, 并与 PKC 信号通路协同作用, 从而导致了有 Caspase 通路参与的凋亡过程.

通过实验结果表明, 在细胞中存在着佛波酯 PKC-CKI 式的作用通路, CKI 可能是 PKC 调控细胞增殖等过程的关键底物之一. 但 PKC 的活性与 CKI 作用的相关性随着细胞类型与 CKI 种类的不同表现出差异性, 其机理有待于进一步探讨.

参 考 文 献

1 Serrano M, Hannon G J, Beach D. A new regulatory motif in cell

cycle control causing specific inhibition of CyclinD/CDK4. *Nature*, 1993, **366** (6456): 704~ 707

2 Nakamaki T, Miller C W, Koeffler H P. Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor genes, p15, p16, p18 and p19 in the myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*, 1997, **21** (3): 235

3 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1847~ 1875

4 Zhang H, Liu H T, Shi F W. Effect of P15^{INK4b/MTS2} on the proliferation of human hepatoma cells SMMC-7721. *Chinese Science Bulletin*, 2000, **45** (15): 1408~ 1412

5 Jin J, Harper J W, Bigner S H, *et al.* Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer Research*, 1994, **54** (24): 6353 ~ 6358

6 Wang X Y, Elizabeth R, Liu H T. Antisense inhibition of protein kinase Cα reverses the transformed phenotype in human lung carcinoma cells. *Exper Cell Res*, 1999, **250** (1): 253~ 263

7 Hannon C J, Beach D. p15^{INK4B} is a potential effector of TGF-β-induced cell cycle arrest. *Nature*, 1994, **371** (6494): 257~ 261

8 Barboule N, Lafon C, Chadebecq P, *et al.* Involvement of p21 in the PKC-induced regulation of the G2/M cell cycle transition. *FEBS Lett*, 1999, **444** (1): 32~ 37

9 Akashi M, Osawa Y, Koeffler H P, *et al.* p21WAF1 expression by an activator of protein kinase C is regulated mainly at the post-transcriptional level in cells lacking p53: important role of RNA stabilization. *Biochem J*, 1999, **377** (Pt 3): 607~ 616

Effect of PMA on Growth and Apoptosis of Human Melanoma Cell Overexpressing CKI p15^{INK4B}*

TONG Ying-Kai, LIU Hui-Tu^{**}, LIU Jun

(Key Laboratory of Cell Proliferation and Regulation Biology of Ministry of Education,
College of life science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract The plasmid pXJ-41-p15, which contains the full length DNA coding for p15 was introduced into human melanoma cell line A375 in which p15 was deleted by DNA recombination and transfection. Using G418, the positive clones were selected. And the cell model overexpressing p15 was constructed successfully through the analysis of PCR and Western blot. It is showed that the expression of p15 was further enhanced after the cells overexpressing p15 were treated with PMA for 72 hours. In contrast of the control cells, the PKC activity was further declined in the cells overexpressing p15 after treated with PMA. At the same time, the growth rate of cell was decreased more significantly and approximate 30% apoptotic cells were found. The expression of Caspase 3 (P20) was increased in the apoptotic cells. It is indicated that CKI p15 was related to PKC signal transduction in the regulation of cell proliferation and apoptosis. They may be involved in the apoptotic pathway including Caspase3, thus inducing the apoptosis of cells.

Key words p15, CKI, PMA, PKC, apoptosis

* This work was supported by grants from National Natural Science Foundation of China (39780014), the Natural Science Foundation of Beijing (7961001), the major state Basic Research Project (G1999053901) and the Doctoral Program Foundation, Education Ministry of China (98002714).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62209699, E-mail: CKIPKC@ht.rol.cn.net

Received: March 6, 2000 Accepted: June 7, 2000