

蛋白激酶 A 抑制剂对 HeLa 细胞 S 期进程的影响*

孙霞 柳惠图** 童迎凯 王端顺

(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 以同步化的 HeLa 细胞为实验材料, 研究了蛋白激酶 A (PKA) 抑制剂对 HeLa 细胞 S 期进程的影响及其作用的分子机理. 通过 TdR 双阻断法, 获得了同步化的 S 期细胞, ^3H -TdR 掺入实验表明 PKA 抑制剂 type III (80 mg/L) 明显提高了 S 期 ^3H -TdR 的掺入水平, 提示了 PKA 在 S 期进程中起阻抑作用. 进一步实验表明, 在 PKA 抑制剂 type III 作用下胸苷激酶 (TK) 活性和 PCNA 蛋白水平均有所提高, 同时明显促进了 CyclinA 蛋白的表达, 并抑制了周期负调因子 p21 蛋白的水平, 但对 CDK2 表达几乎无影响. 结果表明, PKA 可通过作用于 PCNA 和引擎分子 CyclinA 的水平和通过影响 p21 的表达负调于 S 期进程. 这可能是 PKA 负调 HeLa 细胞 S 期进程的分子机理之一.

关键词 蛋白激酶 A, 蛋白激酶 A 抑制剂, S 期, HeLa 细胞

学科分类号 Q291

已知细胞周期进程受控于多种激酶和磷酸酶作用下的 Cyclin-CDKs 的磷酸化和去磷酸化作用, 而这些激酶和磷酸酶又受控于上游信使系统. 蛋白激酶 A (PKA) 与细胞增殖、转化、分化密切相关, 虽然已有一些文献报道了它在不同细胞中的作用, 但结果不尽相同^[1,2]. 并且, PKA 对细胞周期特别是 S 期周期引擎分子及相关调控因子的作用也报道甚少, 有待进一步阐明. 为此, 我们利用 TdR 双阻断法, 获得了 S 期细胞, 并以之为模型, 通过蛋白激酶 A (PKA) 抑制剂, 研究了 PKA 在 HeLa 细胞 S 期进程中的作用及其作用的分子机理.

1 材料和方法

1.1 材料

HeLa 细胞 (本室保存), ^3H -TdR 分别购自北京亚辉生物工程公司和中国科学院上海核技术开发公司, CDK2、CyclinA、PCNA、p21 抗体购自北京中山生物工程公司, ECL 免疫印迹试剂盒和 TdR 分别购自 Amersham 公司和北京天象人生物工程公司, PKA 抑制剂 type III 由 Sigma 公司提供.

1.2 细胞培养

HeLa 细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基, 在 37℃, 5% CO_2 培养箱中培养.

1.3 细胞同步化

采用 TdR 双阻断法: 当细胞进入对数生长期, 更换含 2.5 mmol/L TdR 阻断剂的培养液, 继续培养 16 h, 换新鲜的含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液释放细胞 9 h, 再次更换含 2.5 mmol/L TdR 阻

断剂的培养液继续培养 16 h, 重新加入新鲜培养液再次释放, 即获得 S 期细胞.

1.4 生长曲线测定

分别取对数生长期实验组和对照组细胞, 按 $1 \times 10^4/\text{ml}$ 的细胞浓度接种于 24 孔板, 在 37℃, 5% CO_2 条件下培养, 每 24 小时用血球计数板平行计数 3 孔, 绘制曲线.

1.5 ^3H -TdR 掺入

样品细胞在含 ^3H -TdR (37 Bq/ml) 的培养液中孵育 1 h 后进行洗脱和裂解, 细胞裂解液用 GF/C 型玻璃纤维膜抽滤, 经洗膜和烘干后, 进行液闪计数, 掺入强度用 10^6 细胞的 Bq 值表示.

1.6 胸苷激酶 (TK) 活性测定

参见文献 [3]. 反复冻融细胞, 使细胞及细胞核完全破裂, 4℃离心取适量上清液, 加入反应液 (15 mmol MgCl_2 , 30 mmol Tris-HCl, pH 7.5; 30 mmol ATP), 和 3.7×10^2 Bq ^3H -TdR, 于 37℃反应 20 min, 取 50 μl 点样于 DE81 纤维素膜上, 洗膜, 烤干, 用液体闪烁计数器测 cpm 值, 计算每毫克蛋白质的酶活反应 Bq 值.

1.7 蛋白质印迹

分别收集实验组和对照组细胞, 离心, 加入适量的细胞裂解液在冰上充分裂解后, 离心取上清作

* 国家自然科学基金资助项目 (39430080).

** 通讯联系人.

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

收稿日期: 2000-04-13, 接受日期: 2000-06-07

为电泳样品, Bradford 法测定蛋白质浓度, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳完毕后, 电转移到硝酸纤维素膜上, 封闭. 封闭后的膜分别与一抗溶液和辣根过氧化物酶标记的二抗溶液室温下振荡孵育. 按照 ECL 免疫印迹检测试剂盒 (Amersham 公司产品) 说明进行显色、曝光.

2 结 果

2.1 PKA 抑制剂对 HeLa 细胞生长的影响

HeLa 细胞用含 PKA 抑制剂 type III (80 mg/L) 的培养液培养, 通过测定生长曲线, 观察到该抑制剂对细胞生长有明显的促进作用, 并随作用时间的延长而愈趋明显, 在第 5 天时 PKA 抑制剂处理组细胞计数较对照组提高 75% (图 1) (细胞死亡率 < 5%).

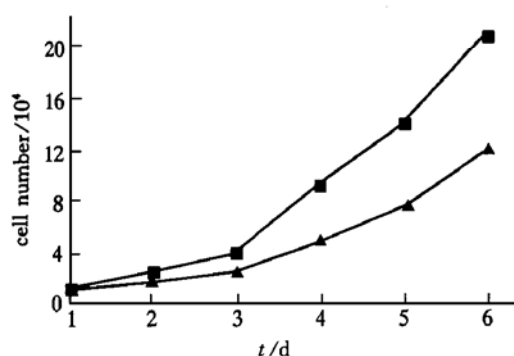


Fig. 1 Effect of PKA inhibitor type III on growth of HeLa cells

▲—▲: control; ■—■: PKA-inhibitor.

2.2 PKA 抑制剂对 HeLa 细胞 S 期进程影响

TdR 双阻断后细胞处于 G1/S 期交界处, 对照组细胞释放后继续培养, 实验组细胞在释放同时加入 PKA 抑制剂 (80 mg/L), 分别取 1、2、4、6、8、10 h 的上述两组细胞加入 ³H-TdR (37 Bq/ml) 孵育 1 h, 液闪计数器测定 ³H 掺入强度. 结果表明,

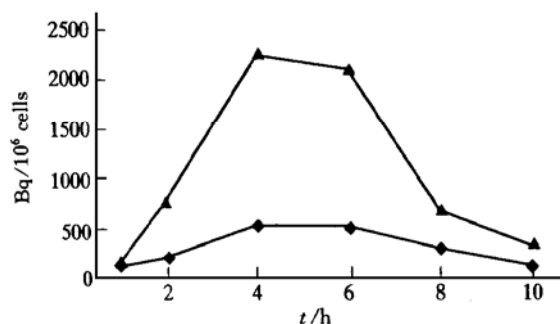


Fig. 2 Effect of PKA inhibitor type III on S phase progression of HeLa cells by ³H-TdR incorporation

◆—◆: control; ▲—▲: PKA inhibitor type III.

在 PKA 抑制剂处理下, ³H-TdR 的掺入峰值明显提高 (与对照组相比峰值提高了 4.3 倍), 说明 PKA 抑制剂促进了 S 期进程 (图 2).

2.3 PKA 抑制剂对 S 期 HeLa 细胞 TK 激酶活性的影响

释放处于 G1/S 期交界处的细胞, 用 PKA 抑制剂 type III 处理 4 h 后, 测定 TK 活性, 结果表明该抑制剂处理后, TK 激酶的活性提高了 15.5%, 说明 PKA 可能通过影响 TK 活性的变化调节 S 期进程 (图 3).

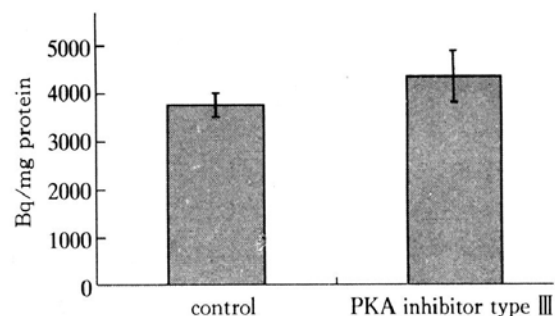


Fig. 3 Effect of PKA inhibitor type III on TK activity in S phase HeLa cells

2.4 PKA 抑制剂对 S 期 HeLa 细胞周期引擎分子的影响

已知细胞周期引擎分子 CDK2 和 CyclinA 的蛋白质表达水平及活性与 S 期进程密切相关, 为此, 我们探讨了这些蛋白质水平的变化. 释放处于 G1/S 交界处 HeLa 细胞时, 用 PKA 抑制剂 type III 处理 4 h, 蛋白质印迹表明, 该抑制剂促进了 CyclinA 的表达 (图 4a), 但对 CDK2 蛋白水平的表达几乎无影响 (图 4b). 说明 PKA 可能通过作用于 CyclinA 的表达发挥对 S 期进程的调节作用.

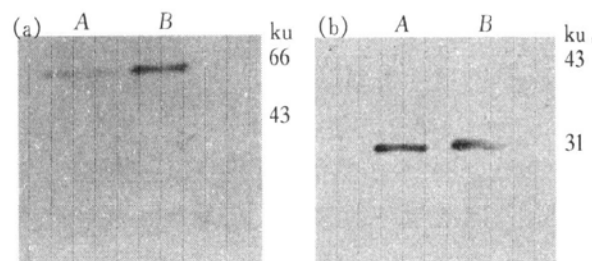


Fig. 4 Effect of PKA inhibitor type III on the protein level of CyclinA (a) and CDK2 (b) in S phase HeLa cells

A: control; B: PKA inhibitor type III (80 mg/L).

2.5 PKA 抑制剂对 S 期 HeLa 细胞 PCNA 和 p21 的影响

已知 PCNA 作为 DNA 聚合酶 δ 的附属蛋白,

在 DNA 的复制和修复中起重要作用; p21 是细胞周期的负调因子, 因而我们进一步探讨了 PKA 抑制剂对上述蛋白质表达的影响. 释放处于 G1/S 交界处的 HeLa 细胞时, 加入 PKA 抑制剂 type III 处理 4 h, 免疫印迹表明, 该抑制剂对 PCNA 的表达水平有刺激作用 (图 5a), 并能明显降低 p21 的蛋白质水平 (图 5b). 结果表明, PKA 通路可通过调控 p21、PCNA 来影响 S 期的进程.

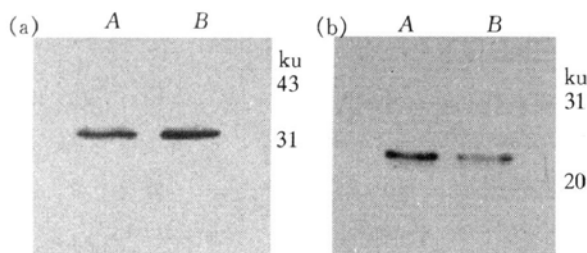


Fig.5 Effect of PKA inhibitor type III on the protein level of PCNA (a) and p21 (b) in S phase HeLa cells

A: control; B: PKA inhibitor type III (80 mg/L).

3 讨 论

cAMP-PKA 对细胞周期的调控作用虽然早有报道^[4], 但迄今为止, 人们对于它的调节作用仍然不能有一个统一的认识. 因为这条通路在不同细胞中所表现出的调控作用不相一致, 在某些细胞 (尤其是在肿瘤细胞) 中是负调控作用, 而在另一些细胞中则是增殖的正调因子. Vadivello 等^[5]在巨噬细胞的研究结果中显示出, cAMP 主要通过降低 Cyclin D₁ 蛋白水平和 CDK4 的 mRNA 及蛋白质水平来抑制细胞周期的进行. 在星形胶质细胞和成纤维细胞^[6]中也有相似的报道. 而 Withers 等^[7]在 Swiss 3T3 中得到了相反的结论, 发现 cAMP 水平的升高刺激了 DNA 的合成和细胞增殖. 类似的结论在小鼠的成纤维细胞、大鼠肝脏表皮细胞^[8]等实验中得到了证实. 本实验通过 PKA 抑制剂的研究显示出, PKA 在细胞增殖中起负调作用, 在 HeLa 细胞中负调 S 期进程. 迄今为止, PKA 对 S 期相关调控因子的作用报道甚少. 已知 CyclinA 为激活 CDK2 所必需, 通过我们的实验显示出, 处于 G1/S 交界处的 HeLa 细胞被释放进入 S 期时, PKA 抑制剂可刺激 CyclinA 表达, 启示了 PKA 的存在可能通过抑制引擎分子 CyclinA 的表达, 从而进一步影响 CDK2 的活性, 阻抑 S 期进程. 已有资料表明 PCNA 是 DNA 聚合酶 δ 的一个附属蛋白质, 它能在双链 DNA 周围形成一个滑动夹板, 从而与

DNA 聚合酶 δ 相互作用, 并使之持续合成 DNA^[9]. 所以, PCNA 是 DNA 合成中很重要的一个调节因子. 通过 PKA 抑制剂实验表明, HeLa 细胞 S 期 PCNA 的表达水平在抑制剂的作用下有所升高, 因此 PKA 有可能通过抑制 PCNA 的表达影响 DNA 的复制. 已知多种 CKI 可以通过与 CDK-Cyclin 复合物的结合而抑制其激酶活性, 肿瘤细胞的恶性生长常与 CKI 基因的丢失有关. p21 是一种广谱性的 CKI, 优先与 CDK2、CDK4 结合, 并抑制其活性. 同时, p21 又能抑制 PCNA 的活性, 直接抑制 DNA 的合成^[10]. 我们对同步的 HeLa 细胞 S 期的 p21 表达作了分析, 发现 PKA 抑制剂在刺激 S 期进程的同时明显抑制了 p21 的表达水平, 表明了当 PKA 存在时, 它可能通过作用于 p21 影响 CDK2 活性, 进而抑制 S 期进程. 综上所述, PKA 对特定细胞周期的调控是一个多层次的复杂的调控过程. 在 HeLa 细胞中, 它可能通过影响 PCNA 作用于 DNA 的合成, 又可能通过作用于 p21 等调控因子来影响 S 期引擎分子 CDK2-CyclinA 的表达和活性, 进而负调 S 期进程.

参 考 文 献

- 1 Showers M O, Maurer R A. A cloned bovine cDNA encodes an alternate form of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 1986, **261** (35): 16288~ 16291
- 2 Rannels S R, Corbin J D. Two different intrachain cAMP binding sites of cAMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem*, 1980, **255** (15): 7085~ 7088
- 3 Liu H T, Gibson C W, Hirschhorn R R, *et al.* Expression of thymidine kinase and dihydrofolate reductase genes in mammalian ts mutants of the cell cycle. *J Biol Chem*, 1985, **260** (6): 3269~ 3274
- 4 Rozengurt E. Early signals in the mitogenic response. *Science*, 1986, **234** (4773): 161~ 166
- 5 Vadivello P K, Vairo G, Novak U, *et al.* Differential regulation of cell cycle machinery by various antiproliferative agents is linked to macrophage arrest at distinct G1 checkpoints. *Oncogene*, 1996, **13** (3): 599~ 608
- 6 Won K A, Xiong Y, Beach D, *et al.* Growth regulated expression of D-type cyclin genes in human diploid fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (20): 9910~ 9914
- 7 Withers D J, Coppock H A, Seufferlein T, *et al.* Adrenomedullin stimulates DNA synthesis and cell proliferation via elevation of cAMP in Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett*, 1996, **378** (1): 83~ 87
- 8 Nishizuka Y. Three multifunctional protein kinase systems in transmembrane control. *Mol Biol Biochem Biophys*, 1980, **32**: 113~ 135
- 9 Levin D S, Bai W, Yao N, *et al.* An interaction between DNA ligase I and proliferating cell nuclear antigen: implications for Okazaki fragment synthesis and joining. *Proc Natl Acad Sci USA*,

1997, **94** (24): 12863~ 12868excision repair by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *J Biol*10 Pan Z Q, Reardon J T, Li L, *et al.* Inhibition of nucleotide*Chem*, 1995, **270** (37): 22008~ 22016

Primary Studies on the Progression of S Phase and its Molecular Mechanism by Protein Kinase A Inhibitor in the HeLa Cell*

SUN Xia, LIU Hui-Tu**, TONG Ying-Kai, WANG Duai-Shun

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

Abstract The synchronized HeLa cells were used to study the effect of protein kinase A (PKA) inhibitor on the progression of S phase. Synchronized cells in S phase were obtained by the method of TdR double block through ³H-TdR incorporation assay. The PKA inhibitor type III obviously increased the level of ³H-TdR incorporation of S phase in HeLa cells. In contrast with control, the activity of thymidine kinase (TK) in S phase increased, too. It indicated that PKA played an inhibitory role in S phase progression of HeLa cells. With the method of Western blotting, the PKA inhibitor type III enhanced the level of CyclinA and PCNA, inhibited the expression of p21, which is a negative regulator of cell cycle, but had no effect on the expression of CDK2. The results showed that PKA could negatively regulate the S phase progression by affecting the level of CyclinA, PCNA and influencing the expression of p21 protein. This may be one of the molecular mechanisms which is involved in the negative regulation of S phase progression by PKA in HeLa cells.

Key words protein kinase A, protein kinase A inhibitor, S phase, HeLa cells

* This work was supported by a grant from National Natural Science Foundation of China (39430080).

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

Received: April 13, 2000 Accepted: June 7, 2000