

切割作用, 而且混合数目越多, 切割率越高<sup>[6]</sup>. 我们比较了两个核酶串联和混合的切割作用, 结果切割效率基本相同, 可能与我们混合核酶数目较少有关. 目前我们已构建了三个核酶串联和混合核酶载体, 进一步的结果将另文发表.

### 参 考 文 献

- 1 连建奇, 周永兴 (Lian J Q, Zhou Y X). 核酶及其抗病毒作用的研究进展. 国外医学: 流行病学和传染病学 (Foreign Medical Sciences: Epidemiology and Infectious Diseases), 1995, **22** (5): 212~ 216
- 2 连建奇, 周永兴, 金由辛 (Lian J Q, Zhou Y X, Jin Y X). 抗 HBV C 基因核酶自剪切转录载体的构建. 第四军医大学学报 (Journal of the Forth Military Medical University), 1997, **18** (4): 376~ 377
- 3 李 洁, 金海翎, 张庆琪, 等 (Li J, Jin H L, Zhang Q Q, et al). 双价核酶对烟草花叶病毒的两个靶序列的专一切割作用. 生物工程学报 (Chin J Biotech), 1995, **11** (1): 20~ 26
- 4 Chen C J, Banerjee A C, Harmison G G, et al. Multi-target-ribozyme directed to cleave at up to nine highly conserved HIV-1 env RNA regions inhibits HIV-1 replication potential effectiveness against most presently sequenced HIV-1 isolates. Nucleic Acid Res, 1992, **20** (1): 4581~ 4589
- 5 陈 桦, 陆长德, 祁国荣 (Chen H, Lu C D, Qi G R). 混合 Ribozyme 联合切割小鼠腺苷脱氨酶 mRNA 研究. 生物化学与生物物理学报 (Acta Biochimica et Biophysica Sinica), 1994, **26** (6): 603~ 607
- 6 Ohkawa J, Yuyama N, Takebe Y, et al. Importance of independence in ribozyme reactions: kinetic behavior of trimmed and of simply connected multiple ribozymes with potential activity against

human immunodeficiency virus. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, **90** (23): 11302~ 11306

**Two-unit Ribozyme Mediated Cleavage Against Hepatitis B Virus.** LIAN Jian-Qi, ZHOU Yong-Xing, JIN Your-Xin<sup>1)</sup> (Tangdu Infectious Hospital, Forth Military Medical University, Xi'an 710038, China; <sup>1)</sup> Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

**Abstract** To detect cleavage activity of anti-HBV two-unit ribozyme and single ribozyme, and compare two connected ribozyme cleavage efficiency with two mixed ribozymes, firstly, Rz1, Rz3 and Rz13 ribozymes transcription vectors were constructed, then cleavage activity of Rz1, Rz3 and Rz13 ribozymes on target RNA were observed. The results showed that antiviral activity of two-unit ribozyme, whether connected (Rz13) or two mixed ribozymes, has higher cleavage efficiency than single ribozyme. Cleavage efficiency has no difference between connected (Rz13) and two mixed ribozymes ( $n = 2$ ,  $P > 0.05$ ).

**Key words** hepatitis B virus C gene, connected ribozyme, mixed ribozymes

## PKC<sub>v</sub> 过表达诱导 C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub> 细胞生长失控的初探\*

赵 霞 柳惠图<sup>1)</sup>

(北京师范大学生物系, 细胞增殖及调控生物学开放实验室, 北京 100875)

**摘要** 通过 DNA 重组构建蛋白激酶 C<sub>v</sub> (PKC<sub>v</sub>) 亚类的重组质粒并经基因转染技术和 DNA 印迹、蛋白质印迹与 PKC 活性分析, 获得了过表达 PKC<sub>v</sub> 的 C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub> 细胞——NCP4. NCP4 细胞生长速率提高, 流式细胞光度术检测表明, NCP4 细胞 G1 期百分率下降, S 期和 G2+ M 期百分率升高, 与对照组细胞相比, 血清依赖性明显下降, 贴壁依赖性降低, 在软琼脂中形成小集落, 出现部分转化表型. 进一步检测, 首次观察到 NCP4 细胞中癌基因 c-sis 表达明显增强, 这可能是 NCP4 细胞血清依赖性下降的分子机理之一. 实验表明, 在正常 C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub> 细胞中 PKC<sub>v</sub> 的过表达可直接导致细胞增殖加速并可诱导出现部分转化特征.

**关键词** 蛋白激酶 C<sub>v</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub> 细胞, 增殖与转化

学科分类号 Q28

\* 国家自然科学基金资助项目 (9388002、39200024 和 39430080). <sup>1)</sup> 通讯联系人.

收稿日期: 1998-09-15, 修回日期: 1999-01-19

在细胞的信号传递网络中, 蛋白激酶 C (PKC) 是一类非常重要的中介者. 它通过对底物 Ser/Thr 残基磷酸化, 参与了细胞内信号转导作用. 蛋白激酶 C 是一多基因编码的家族, 至今已发现了 12 个亚类<sup>[1]</sup>. 人们对于 PKC<sub>γ</sub> 在学习、记忆、突触形成等生理过程中的作用有所探讨, 但对其在细胞增殖转化中的作用了解较少<sup>[2]</sup>. 我们通过构建过表达 PKC<sub>γ</sub> 的真核表达质粒及建立稳定过表达 PKC<sub>γ</sub> 的 C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub> 这一细胞模型来探讨 PKC<sub>γ</sub> 在细胞增殖、转化中的作用.

## 1 材料与方 法

质粒 pMT<sub>2</sub>-PKC<sub>γ</sub> 由中国科学院陈德高教授惠赠, 质粒 pXJ41-neo 由新加坡大学王跃博士惠赠.

内切酶和修饰酶购自华美生物工程公司; α-<sup>32</sup>P-dCTP, γ-<sup>32</sup>P-ATP 由北京亚辉生物工程公司提供; 组蛋白 III (histone III)、二酰基甘油 (DG)、磷脂酰丝氨酸 (PS) 购自美国 Sigma 公司; G418 和抗 PKC<sub>γ</sub> 抗体购自美国 Gibco 公司; HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自华美生物工程公司.

### 1.1 质粒重组构建

参照文献 [3], 酶切并去磷酸化载体, 按线性载体: 目的 DNA 片段 = 1: 3 (摩尔比) 混合, 加入 3U T4DNA 连接酶, 15 °C 连接过夜, 取适量连接产物转化感受态菌, 37 °C 培养过夜并挑取转化菌落, 提取质粒 DNA, 进行酶切分析筛选重组子.

### 1.2 细胞培养

小鼠成纤维细胞 (C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub>, 15 代左右) 培养于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中, 在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养.

### 1.3 基因转染

用磷酸钙法将纯化质粒转染细胞<sup>[3]</sup>, 37 °C 培养 24 h 后, 胰酶消化并 1: 4 稀释接种, 同时加入 G418 (400 mg/L) 筛选, 2 周后挑选阳性克隆进行扩大培养.

### 1.4 分子杂交

按文献 [4] 提取细胞中总 RNA; 按文献 [3] 进行点杂交及 DNA 印迹; 低融点胶方法回收基因片段并用于探针制备; 探针按照随机引物试剂盒的程序进行标记, 42 °C 下进行分子杂交后分别在含有

0.1% SDS 的 2 × SSC 液和含 0.1% SDS 的 0.1 × SSC 液洗膜, 干燥后用 X 胶片在 -80 °C 进行曝光.

### 1.5 细胞 PKC 活性测定

以 γ-<sup>32</sup>P-ATP 掺入到牛胸腺组蛋白 III 放射性掺入量来确定 PKC 活性, 活力单位定义为 30 °C 下每分钟每毫克蛋白质的 <sup>32</sup>P 计数.

### 1.6 蛋白质印迹

按《分子克隆实验指南》进行<sup>[3]</sup>.

### 1.7 生长曲线

取对数生长期的细胞, 以 1 × 10<sup>4</sup>/ml 接种小方瓶, 24 h 计数一次, 连续计数 5 d, 以细胞增殖数目表示细胞增殖程度.

### 1.8 流式细胞光度术

收集对数生长期细胞离心去培养液, 在细胞沉淀中加入 70% 乙醇固定, PBS 洗 2 次, RNase 处理 30 min, 碘化丙啶 (PI) 冰上染色 30 min 后测定.

### 1.9 软琼脂实验

0.6% 琼脂溶液高压灭菌后冷却至 42 °C, 然后将其等体积加入到含 1 000 个细胞的 2 × DMEM 培养基中混匀, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 中培养 2 至 4 周, 观察软琼脂中集落生长情况.

## 2 结 果

### 2.1 PKC<sub>γ</sub> 亚类真核表达质粒的重组构建

质粒 pXJ41-neo 是一个真核表达载体, 它能在真核细胞中高表达插入片段, 并带有一个药物筛选的标志基因 neo, 重组质粒 pMT<sub>2</sub>-PKC<sub>γ</sub> 内含全长为 2.5 kb 的 PKC<sub>γ</sub> cDNA 片段.

分别用 EcoR I 酶切 pMT<sub>2</sub>-PKC<sub>γ</sub> 质粒和 pXJ41-neo, 回收 PKC<sub>γ</sub> 片段, 用 T4DNA 连接酶进行连接, 连接产物转化 HB101 菌并挑取转化菌落, 小量制备质粒 DNA, 用 Sal I / Hind III 双酶切鉴定, 正向连接的重组质粒, 定名为 pXJ41-PKC<sub>γ</sub>, 反向连接的质粒定名为 pXJ41-CKP<sub>γ</sub> (图 1).

### 2.2 过表达 PKC<sub>γ</sub> 的 C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub> 细胞模型建立和鉴定

**2.2.1 基因转染:** 通过磷酸钙沉淀方法, 将纯化质粒 pXJ41-neo 及 pXJ41-PKC<sub>γ</sub> 分别转染正常小鼠成纤维细胞 (C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub>), 用 G418 筛选, 挑选阳性克隆进行扩大培养. 将含有 PKC<sub>γ</sub> 及仅含有真核表达载体的细胞分别命名为 NCP 和 NCC, 挑选 6 个 NCP 阳性克隆 (NCP1~6) 进行进一步鉴定.

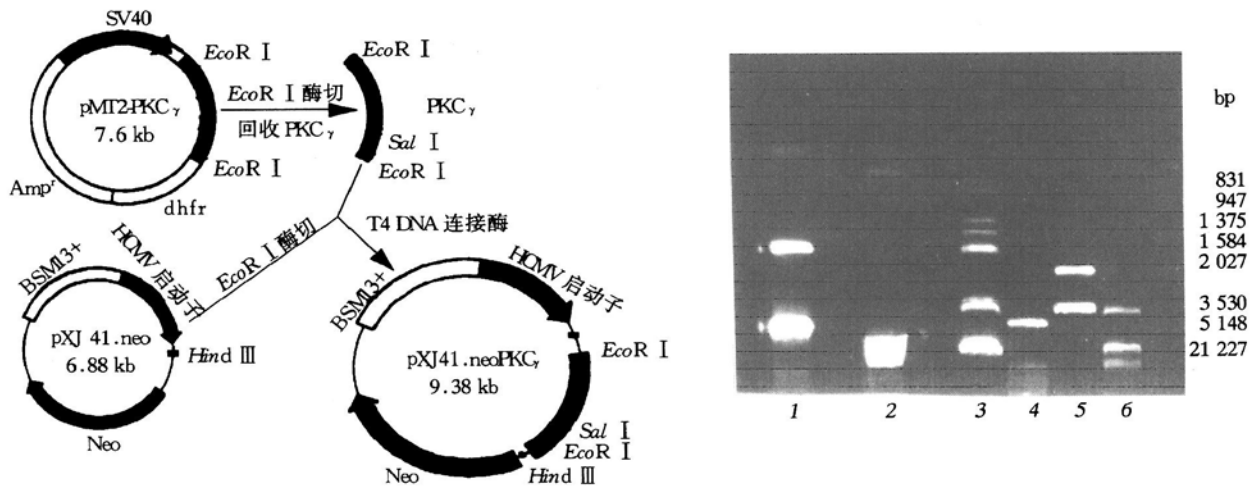


图1 真核表达质粒 pXJ41-neoPKC<sub>γ</sub> 的构建及其酶切鉴定

1: pXJ41-CKP<sub>γ</sub>/Hind III+ Sal I; 2: pXJ41-PKC<sub>γ</sub>/Hind III+ Sal I; 3: 分子质量标准: λDNA/Hind III+ Eco R I; 4: pXJ41-neo; 5: pMT2-PKC<sub>γ</sub>/Eco R I; 6: pMT2-PKC<sub>γ</sub>.

2.2.2 过表达 PKC<sub>γ</sub> 亚类 C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub> 细胞模型的鉴定:

a. DNA 印迹分析: 分别提取 C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub>、NCC、NCP4 细胞基因组 DNA, 用 EcoR I 酶切, 以回收的 PKC<sub>γ</sub> cDNA 片段做探针进行 DNA 印迹. 结果表明, 在转染细胞中有一条约 2.5 kb (相当于插入片段大小) 的外源性杂交带. 表明外源 PKC<sub>γ</sub> 序列已稳定、完整地整合到被转染细胞 NCP4 的基因组中 (图 2a).

b. PKC<sub>γ</sub> 亚类蛋白含量的测定: 分别提取 C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub>、NCC、NCP4 细胞中的总蛋白, 电泳分

离后转移至硝酸纤维素膜, 经 BSA 封闭后, 与抗 PKC<sub>γ</sub> 的抗体及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 孵育后, 利用 ECL 免疫检测试剂盒进行显色 (图 2b). 结果表明, NCP4 细胞中 PKC<sub>γ</sub> 蛋白明显表达, 亲本和对照细胞中 PKC<sub>γ</sub> 表达甚弱, 低于检测水平.

c. PKC 活性的测定: 取对数生长期的 C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub>、NCC、NCP4 细胞进行细胞内总 PKC 活性测定. 结果表明, NCP4 细胞 PKC 活性明显高于亲本细胞和对照细胞 (图 2c).

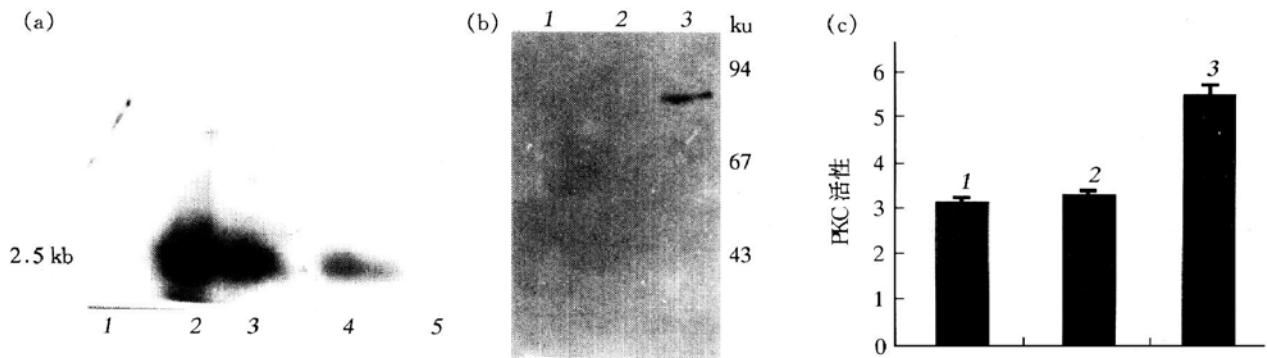


图2 过表达 PKC<sub>γ</sub> 亚类 C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub> 细胞模型的鉴定

(a) DNA 印迹. 1: C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub>, 2, 3: PKC<sub>γ</sub> cDNA, 4: NCP4, 5: NCC; (b) 蛋白质印迹. 1: C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub>, 2: NCC, 3: NCP4; (c) PKC 活性分析. 1: C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub>, 2: NCC, 3: NCP4.

2.3 过表达 PKC<sub>γ</sub> 亚类 C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub> 细胞生长特性

2.3.1 生长曲线及细胞周期分析: 通过检测 C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub>、NCC、NCP4 细胞在含 10% 血清的培养液中的生长情况, 可以看出, 与亲本细胞

C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub> 和对照组细胞 NCC 相比, NCP4 细胞生长速率增加 (图 3a). 进一步通过流式细胞光度术测定表明 NCP4 细胞 G1 期百分率下降, S 期和

G2+ M期百分率升高 (图 3b, c). 因此PKC<sub>v</sub> 的过表达导致细胞增殖加速, 主要与促进细胞从 G1 期

向 S 期和 G2+ M 期转移从而使细胞倍增时间缩短有关.

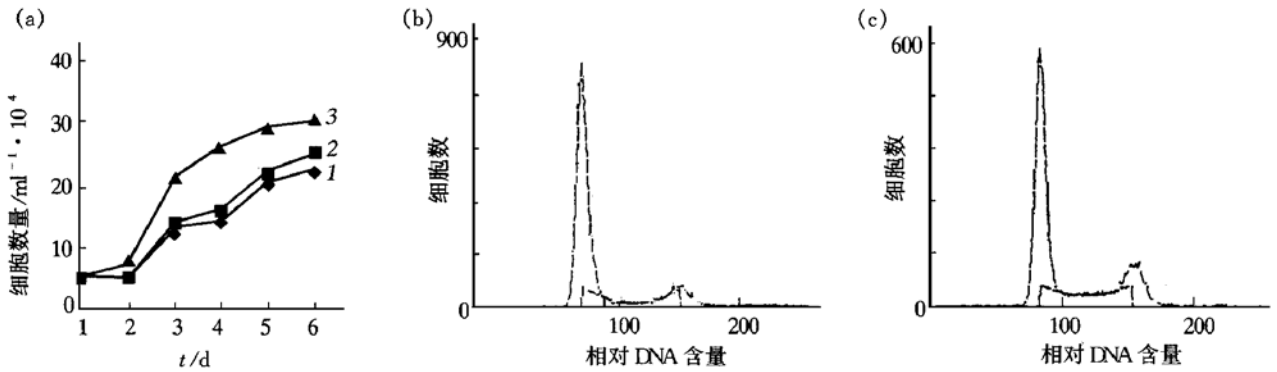


图 3 细胞生长曲线及周期分析

(a) 生长曲线. 1: C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub>, 2: NCC, 3: NCP4; (b) 和 (c) 分别为 NCC (b) 及 NCP4 (c) 流式细胞光度术分析. (b) 中各周期时相细胞所占比例为 G1 期: 71%, S 期: 21%, G2+ M 期: 6%; (c) 中各周期时相细胞所占比例为 G1 期: 58%, S 期: 27%, G2+ M 期: 15%.

2.3.2 血清依赖性实验: 将上述细胞接种于 1% 血清的 DMEM 中, 亲本细胞和空载体细胞很难贴壁, 细胞增殖减慢, 3 d 后细胞不能生长, 而 NCP4 细胞能正常贴壁和生长, 表明过表达 PKC<sub>v</sub> 的 NCP4 细胞血清依赖性下降, 表现出转化细胞的特征 (图 4).

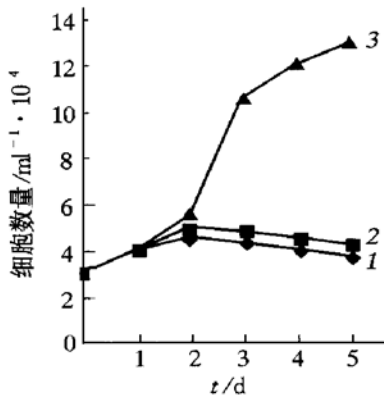


图 4 NCC, NCP4, C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub> 细胞在 1% 血清中的生长情况  
1: C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub>, 2: NCC, 3: NCP4.

2.3.3 软琼脂实验: 将过表达 PKC<sub>v</sub> 的 NCP4 细胞分散于含 0.3% 琼脂的 DMEM 培养基中, 培养 2 ~ 4 周后, 在软琼脂中形成小集落 (图 5), 表明 NCP4 细胞获得一定的转化表型.

2.3.4 c-sis 基因表达检测: 与亲本细胞及对照细胞相比, NCP4 细胞中 c-sis 基因表达水平升高 (图 6). 该现象可能是 PKC<sub>v</sub> 过表达的 NCP4 细胞血清依赖性下降的分子机理之一.



图 5 NCP4 细胞在软琼脂中培养 10 d 后形成小集落  
放大倍数: × 100.

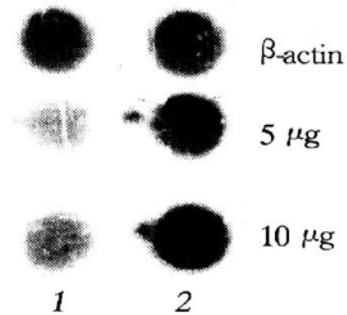


图 6 c-sis 基因在 NCC 及 NCP4 细胞中的表达  
1: NCC, 2: NCP4.

### 3 讨 论

我们自行构建了 PKC<sub>v</sub> 亚类的真核表达质粒, 并且通过基因转染方法首次将 PKC<sub>v</sub> 亚类转入正常小鼠成纤维细胞 C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub>. 初步分析表明过表达 PKC<sub>v</sub> 可使细胞生长速率加快, 促进了 C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub> 细胞从 G1 期向 S 期和 G2+ M 期转移, 从而导致了倍增时间缩短, 这可能与影响细胞周期调节因子 CDK/cyclin 有关. 我们曾观察到当分别用 PKC 的

刺激剂与抑制剂处理同步在早 G1 期 HeLa 细胞, TPA 可刺激 G1 → S 进程, 同时促进 cyclinD1 的表达, 反之, PKC 抑制剂在阻抑 G1/S 过渡时, cyclinD1 表达也明显被抑制 (待发表资料).

我们也曾报道了 PKC 抑制剂作用于同步的 G2 期 HeLa 细胞可抑制 CDC2 激酶活性, 同时阻抑了 G2 向 M 期的转移<sup>[5]</sup>. 在不同的 PKC 亚类作用方面, 我们的资料也表明过表达 PKC $\alpha$  和  $\beta$ 1 可分别促进人胚肺 2BS 细胞和大鼠 NRK 细胞从 G1 期向 G2+ M 期过渡, 同时促进 cyclinB1 基因表达<sup>[6,7]</sup>. 因此不难看出, PKC $\gamma$  与  $\alpha$ ,  $\beta$  亚类相似, 在正常细胞中过表达也能促进细胞增殖, 表现出在细胞增殖中的调节作用. 在低血清条件下, 正常 C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub> 细胞和对照组细胞均不能生长, 但是过表达 PKC $\gamma$  的 NCP4 细胞生长良好, 正常增殖, 血清依赖性明显下降, 而对外源性生长因子依赖性的降低是转化细胞的一个特性. 这可能与首次观察到在过表达 PKC $\gamma$  的 C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub> 细胞中癌基因 *c-sis* 表达加强有关. 已知 PDGF-B 链与 *v-sis* 癌基因同源, Biswas 等<sup>[8]</sup>报道 PKC $\alpha$  活化可刺激 PDGF-B 基因表达, 因此可能与  $\alpha$  亚类相似, PKC $\gamma$  在整合一些自分泌通路信号中起重要作用. 综上所述, 本实验初步探讨了 PKC $\gamma$  在正常细胞增殖中的作用及其可能机理, 并为进一步探讨 PKC $\gamma$  在细胞生长调控中作用的分子机理提供了有效的细胞模型.

### 参 考 文 献

- Dekker L V, Parker P J. Protein kinase C - a question of specificity. *TIBS*, 1994, **19** (2): 73~ 74
- Housey G M, Johnson M D, Hsiao W L W, *et al.* Overexpression of protein kinase C causes disordered growth control in rat fibroblast. *Cell*, 1988, **52** (3): 343~ 354
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning — A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1. 53~ 16. 55
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162** (1): 156~ 159
- 郝智慧, 柳惠图, 王端顺 (Hao Z H, Liu H T, Wang D S). HeLa 细胞 G2/M/G1 进程中 PKA, PKC 与 CDC2 活性变化相关性之初探. *解剖学报 (Acta Anatomica Sinica)*, 1997, **28** (4): 83~ 87
- 杨晓红, 李 华, 柳惠图 (Yang X H, Li H, Liu H T). 蛋白激酶 C $\beta$ 1 过表达对 NRK 细胞生长失调的研究. *科学通报 (Chinese Science Bulletin)*, 1993, **38** (23): 2186~ 2189
- Wang X Y, Liu H T. Effect of PKC $\alpha$  on the gene expression related with proliferation and activity of transcription factor AP-1. *Chinese Science Bulletin*, 1997, **42** (23): 1986~ 1989
- Biswas P, Abboud H E, Kiyomoto H, *et al.* PKC $\alpha$  regulates thrombin-induced PDGF-B chain gene expression in mesangial cells. *FEBS Letters*, 1995, **373** (2): 146~ 150

**Preliminary Analysis of Disordered Growth Control in C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub> Cells Caused by Overexpression of PKC $\gamma$ .** ZHAO Xia, LIU Hui-Tu (*Key Laboratory of Cell Proliferation and Regulation Department of Biology, Beijing Normal University, Beijing 100875, China*).

**Abstract** A eukaryotic vector highly expressing PKC $\gamma$ , was constructed by DNA recombination and transfected into C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub> cells by gene transfection. The NCP4 cells stably expressing PKC $\gamma$  was isolated successfully by Southern blot, Western blot and PKC activity assay. The NCP4 cells displayed an enhanced growth rate, especially under low serum conditions, apparently reduced dependence on serum. By using FCM, it was shown that NCP4 cells exhibited decreased percentage in G1 phase, increased percentage in S phase and G2+ M phase. In contrast to control cells, NCP4 cells overexpressing PKC $\gamma$  decreased anchorage dependence and formed small colonies in soft agar. Furthermore, it was observed that the expression of oncogene *c-sis* increased obviously in NCP4 cells, it may be one of the molecular mechanisms of the reduced dependence on serum in NCP4 cells. The results indicated that specific elevation of the PKC $\gamma$  level directly affected the increase of growth rate and lead to some transforming phenotypes in C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub> cells.

**Key words** C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub>, PKC $\gamma$ , cell proliferation and transformation