

盘基网柄菌突变型细胞 *allC* 的细胞周期异常

周子康^① 罗倩^② 侯连生^{①*}

① 华东师范大学生命科学学院 上海 200062; ② 上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240

摘要: 研究盘基网柄菌 (*Dictyostelium discoideum*) 细胞周期的相关问题可以为真核生物细胞周期调控研究提供理论基础。细胞计数和细胞倍增时间计算的结果表明, 突变 *allC* 细胞的倍增时间为 2.36 h, 仅为 KAx-3 细胞倍增时间的 1/3。进一步利用流式细胞术测定两种细胞的细胞周期, 并结合实时荧光定量 PCR 技术测定 *cycB1* 和 *cdk1* 基因的相对表达量的比值, 我们发现, 培养 16 h 的 *allC* 细胞处于 G2 期的数目 (1.51%) 显著少于 KAx-3 细胞 (16.61%) ($P < 0.05$)。 *allC* 细胞和 KAx-3 细胞的细胞周期素 B1 (*cyclinB1*, *cycB1*) 基因相对表达量分别是 2.5 和 0.24 ($P < 0.05$), 两者相差 10 倍。两种类型细胞中处于 G2 期的细胞数目差异十分明显, *cycB1* 的相对表达量也存在显著差异, 表明 *cycB1* 的过表达可能在一定程度上影响 *allC* 细胞的细胞周期正常的调控机制, 与突变细胞的 G2 期异常有一定关系, 但具体机制仍需进一步探究。

关键词: 流式细胞; 细胞周期异常; *cyclinB1*

中图分类号: Q952 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2014)01-57-06

Cell Cycle Abnormality in *Dictyostelium discoideum allC* Mutant Cell Line

ZHOU Zi-Kang^① LUO Qian^② HOU Lian-Sheng^{①*}

① *School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062;*

② *School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China*

Abstract: Study on *Dictyostelium discoideum* cell cycle can provide theoretical foundation for research of the eukaryotic cell cycle regulation. In this study, the cell counting and cell doubling time calculation indicated that the *allC* mutant doubling time was 2.36 h, only one third of that of KAx-3 cells. To search for the reason of shortened *allC* mutant doubling time, the function of cyclin B1, cell cycle of mutant cells and wild cells were studied by flow cytometry and real time-quantitative PCR. After cultured for 16 hours, the number of the mutant *allC* cells (1.51%) in the G2 phase was significantly less than that of KAx-3 cells (16.61%) ($P < 0.05$). The relative expression level of cyclin B1 in *allC* mutant and KAx-3 cells were 2.5 and 0.24, respectively. It has demonstrated that the G2 phase of *allC* mutant was obviously shorter than that of KAx-3 cells, so was the relative expression level of cyclin B1 which was related closely to G2 phase regulation. Our results suggest that the overexpression of cyclin B1 in *allC* mutant may affect the normal cell cycle regulation to some extent, and it contributes to G2 phase abnormality.

Key words: Flow cytometry; Cell cycle abnormality; CyclinB1

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 30970316);

* 通讯作者, E-mail: lshou@ecnu.edu.cn;

第一作者介绍 周子康, 男, 硕士研究生; 研究方向: 动物细胞与分子生物学; E-mail: tonyzhou.tf@gmail.com。

收稿日期: 2013-04-15, 修回日期: 2013-08-29

作为一种结构简单的单细胞真核生物,盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)是细胞生物学和分子生物学研究领域的良好模式生物。近年来,一系列的科学研究成果均以盘基网柄菌为研究材料。细胞周期是连续分裂细胞从一次有丝分裂结束到下一次有丝分裂结束所经历的全过程。根据整个过程不同阶段的特征,通常将细胞周期划分为4个时相,即G1期(G1 phase)、S期(DNA合成期,S phase)、G2期(G2 phase)和M期(分裂期,Mitosis phase)。一些研究表明,盘基网柄菌Ax-2品系细胞周期中不存在G1期(Weijer et al. 1984, Gomer et al. 1996, Wood et al. 1996)。但是,也有学者在盘基网柄菌NC4-H品系细胞周期检测到G1期(Zada-Hames et al. 1978, McDonald et al. 1984, Azhar 2001)。因此,对于盘基网柄菌细胞周期各个时相的界定仍存在争议。盘基网柄菌KAX-3品系细胞周期目前尚无相关报道,由此深入研究KAX-3品系的细胞周期是必要的。

本实验室用RNA干扰技术构建的盘基网柄菌尿囊酸酶突变细胞*allC*细胞倍增时间大幅缩短,这一现象表明突变细胞的细胞周期发生了改变。但是对于突变细胞*allC*细胞周期如何改变及其分子机制尚不清楚。普遍认为细胞周期的正常运行依赖于不同阶段的细胞周期检验点(cell cycle checkpoints)的严格调控。检验点主要存在G1-S期、S期、G2期和M期,检验点功能缺陷可能会导致遗传基因突变和染色体结构异常的细胞获得增殖,最终导致肿瘤的产生(周开梅等2010)。在诸多肿瘤细胞,例如乳腺癌、胃癌、食道癌及结肠癌等等,均能检测到细胞周期素依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)或细胞周期素A、B1、D等表达异常(Hunter et al. 1994, MuUer-tidow et al. 2001, Shih et al. 2003, 杨军平等2003, Takasu et al. 2007, 王璐等2008)。因此我们以突变细胞*allC*和野生型KAX-3细胞为主要研究材料,利用流式细胞术对两种细胞周期进行测定,运用实时荧光定量PCR技术测定细胞周期中重要的调控因子细胞周期素依赖性激酶1

(*cdk1*)和细胞周期素B1(*cycB1*)基因相对表达量的差异。为进一步研究细胞周期调控机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞的培养 盘基网柄菌突变型(*allC*)细胞和野生型(KAX-3)细胞,以相同接种量接种在新鲜的HL-5液体培养基中,22℃恒温,180 r/min振荡培养。

1.2 细胞周期的测定 分别收集培养16 h处于对数生长期和培养48 h处于稳定期的两种细胞 1×10^7 个,依据梁智辉等(2008)编写的著作《流式细胞术基本原理与实用技术》提供的参考方法处理流式细胞样品,利用DAPI染色液染色,并使用BD FACSAria II分选型流式细胞仪(美国BD公司)测定样品。*allC*和KAX-3细胞均重复实验3次。

1.3 *cycB1* 相对表达量的测定和计算 根据盘基网柄菌基因数据库和NCBI的相关记录,运用Primer Premier 5.0软件分别设计*cdk1*和*cycB1*引物。参考PrimeScript™ RT reagent Kit (Takara)逆转录试剂盒说明书,逆转录获得目的基因的cDNA。然后按照SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time)试剂盒配制实时荧光定量PCR反应体系25 μl,将实验组和内参基因(*GAPDH*)以相同的上样浓度依次加入PCR八联管中,放入Bio-Rad CFX96™ Real Time System仪上进行扩增。反应条件为:预扩增95℃ 30 s,然后94℃ 15 s,55℃ 20 s,72℃ 20 s,40个循环,末次延伸72℃ 7 min。在每个循环的延伸阶段同步多次采集荧光。上述反应完成后,利用BioRad CFX 96™ Real-Time System自带软件进行数据分析。分析结果依照Livak法($2^{-\Delta\Delta CT}$ 法)(参考BioRad CFX 96™ Real-Time System用户使用手册)计算目的基因的相对表达量。具体过程如下,①对所有测试样本(test)和校准样本(cal),用内参基因(ref)的 C_T 值(初始循环数)归一目标基因的 C_T 值: $\Delta C_{T(\text{test})} = C_{T(\text{target, test})} - C_{T(\text{ref, test})}$, $\Delta C_{T(\text{cal})} = C_{T(\text{target, cal})} - C_{T(\text{ref, test})}$;②用标准样本的 ΔC_T 值

归一实验样本的 ΔC_T 值: $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{test})} - \Delta C_{T(\text{cal})}$; ③ 计算表达水平比率: $2^{-\Delta\Delta C_T} =$ 表达量比值。

2 结果

2.1 流式细胞术测定细胞周期 使用 Modfit 软件对流式细胞术的结果进行分析, 3 次重复实验得到的结果基本一致(图 1)。图中各个时相细胞数目所占的百分比为 3 次实验的平均

值。软件分析所得出的结果均在置信区间内, RCS(拟合度): 0.9 ~ 5.0, CV%(变异系数) < 8, Debris(碎片) < 20%。

2.1.1 16 h 细胞周期 培养 16 h 的 *allC* 和 KAx-3 细胞周期的各个时相均存在(图 1a, c)。*allC* 细胞周期中处于 G1 期的细胞数量为 38.64%; 处于 S 期的细胞数量约占细胞总数的 59.85%; 处于 G2 期的细胞数量约占细胞总数的 1.51% (图 1c)。KAx-3 细胞周期中处于

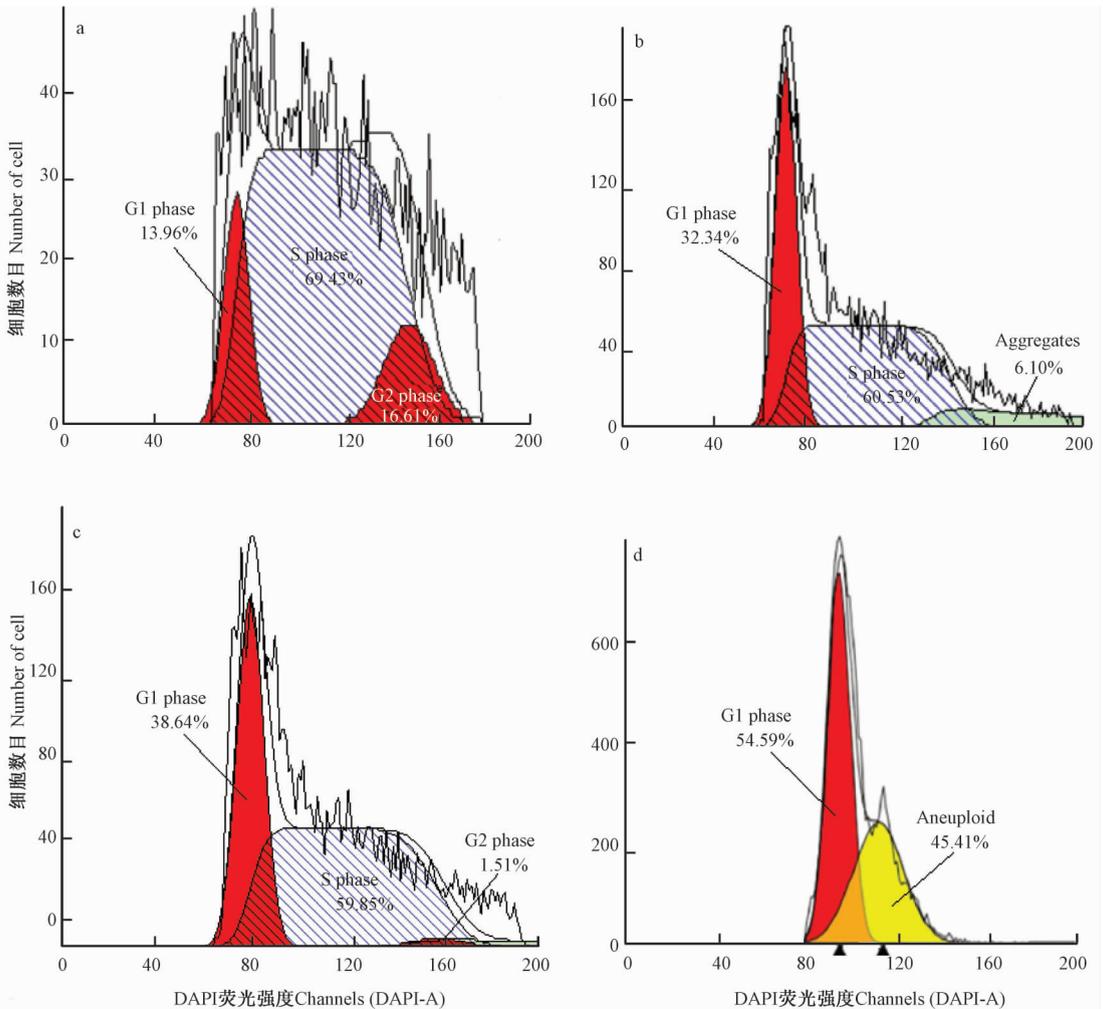


图 1 流式细胞检测结果

Fig.1 The result of flow cytometry

a, b 分别代表野生型 KAx-3 细胞培养 16 h、48 h 流式细胞检测结果。c、d 分别代表突变型 *allC* 细胞培养 16 h、48 h 流式细胞检测结果。a、b 和 c 中阴影部分的面积代表处于 S 期的细胞数目。d 中黄颜色部分的面积代表存在非整倍体 DNA 的细胞数目。

Fig. a and b represent the results of 16 h and 48 h cytometry of KAx-3 cells. Fig. c and d represent the results of 16 h and 48 h cytometry of *allC* mutant. The area of the shadow represents the number of the cells which stay in S phase in Fig. a, b and c. The area of yellow in the Fig. d represents the number of the cells which are aneuploid.

G1 期的细胞数量约为 13.96% ; 处于 S 期的细胞数量约占细胞总数的 69.43% ; 处于 G2 期的细胞数量约占细胞总数的 16.61% (图 1a)。将 3 次重复实验的 G2 期两种细胞数目所占细胞总数百分比的结果使用 SPSS 13.0 软件 (*t* 检验) 进行分析, 得出 $P < 0.05$ 具有统计学上的显著性差异。

2.1.2 48 h 细胞周期 培养 48 h 的 *allC* 和 KAx-3 细胞周期分析结果却均未能显示 G2 期的峰图 (图 1b, d)。流式细胞数据显示, KAx-3 细胞虽不能呈现 G2 期的标准峰图, 但是出现约 6.10% 的粘连体细胞 (图 1b); *allC* 细胞周期中约 45.41% 的细胞是非整倍体 (aneuploid), 而 KAx-3 细胞没有检测到这一现象。此外, 由分析结果还可以看出, *allC* 细胞中未能检测到 S 期细胞 (图 1c), 而 KAx-3 却有约 60.53% 的细胞处于 S 期 (图 1b)。

2.2 *CycB1* 基因相对表达量

2.2.1 *CycB1* 基因初始循环值 (C_T) 的测定 运用 RT-QPCR 技术, 测定了 *cdk1* 和 *cycB1* 基因在 *allC* 和 KAx-3 细胞中相对表达量的差异, 所有样品组测得的熔解曲线 (melt curve) 为单峰, 没有出现非特异性扩增。

2.2.2 *CycB1* 基因相对表达量的计算 根据 Livak $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法, 将 BioRad CFX 96™ Real-Time System 测定的三次平行实验的初始循环值取平均数。计算两种细胞内测试样本 *cycB1* 基因的相对表达量时, 以各自细胞中的 *cdk1* 基因 C_T 值作为校准样本, *GAPDH* 作为内参基因。在 *allC* 细胞中得到 *cycB1* 基因与 *cdk1* 基因的平均表达量之比为 2.50; 而 KAx-3 细胞中 *cycB1* 基因与 *cdk1* 基因的平均表达量之比仅为 0.24。二者差异显著 ($P < 0.05$)。

3 分析与讨论

3.1 KAx-3 品系存在 G1 期 笔者通过显微镜观察和细胞计数确认了突变细胞 *allC* 的生长速度明显快于野生型 KAx-3 细胞, *allC* 突变细胞的倍增时间为 2.36 h, KAx-3 细胞的倍增时间为 7.91 h。突变细胞倍增时间大幅度缩短意

味着 KAx-3 细胞的生长、增殖状态发生了改变。为此有必要确认两类细胞的细胞周期。流式细胞术是目前测定 DNA 含量和细胞周期最为普遍的研究方法之一, 其基本原理是测量并收集细胞的荧光信号, 判断细胞中 DNA 含量, 统计不同 DNA 含量细胞的数目, 最终以该时间节点不同 DNA 含量的细胞占上样总数的百分比来确定细胞周期。DAPI (4',6-二脒基-2-苯基吲哚, 4',6-diamidino-2-phenylindole) 染色具有标记效率高, 荧光变异系数小, 与 DNA 链上的 A-T 碱基对特异性结合, 不易受 RNA 干扰, 检测灵敏度高等优势, 是测定 DNA 含量和细胞周期的理想染料。从流式细胞的分析结果 (图 1a, c) 中可以看出, 生长 16 h 的细胞均能检测到细胞周期的各个时相。说明该时间段的细胞正处于生长对数期, 生长状态最为活跃, 各项生理指标均处在最佳值。其中测得 *allC* 细胞中 38.64% 处于 G1 期, KAx-3 细胞中 13.96% 处于 G1 期。Azhar 等 (2001) 利用 Syto-11 活性染料测得 NC4-H 品系的 G1 期细胞数目的百分比为 13%, 细胞倍增时间约 4 h。Zada-Hames 等 (1978) 利用同位素标记法测得 AX2 品系细胞倍增时间约为 8 h, 其中约有 19.1% 的细胞处在 G1 期。本研究结果表明, 野生型 KAx-3 品系倍增时间 7.91 h, 约 14% 的细胞处于 G1 期。尽管笔者与前人的研究方法不同, 但是得到的结果基本一致, 这说明利用 DAPI 作为染料对细胞进行流式细胞术的检测可以更加便捷地测定细胞周期、界定各个时相, 同时也证明了笔者绘制的生长曲线 (本文未给出) 可以准确反映细胞的生长状况, 选取 16 h 的细胞作为测定对象是恰当的。

3.2 *allC* 细胞周期 G2 期缩短 Zada-Hames 等 (1978) 和 McDonald 等 (1984) 利用 AX-2 品系的细胞作为研究材料, 以放射性同位素跟踪法和细胞同步化等方法分别测得 AX-2 品系的细胞倍增时间为 8 h 和 8.5 h, 其中 G2 期时长分别为 4.15 h 和 4 h。两人测得的 G2 期细胞分别占细胞总数的 55% 和 45%。Azhar (2001) 利用 NC4-H 品系运用流式细胞技术和放射性

同位素跟踪法测得的细胞倍增时间 4 h, G₂ 期时长约为 2 h, G₂ 期细胞所占总细胞数目的 60%。尽管上述研究的结论不完全一致,但是仍然可以看出不同时相的细胞数目占总细胞数目的百分比可以间接表明该时相相对整个细胞周期的长短。本实验结果中(图 1a, c)显示,两种细胞 G₂ 数目的百分比(G_{2_{allC}}: 1.51%、G_{2_{KAx-3}}: 16.61%)可以非常直观地看出 *allC* 细胞 G₂ 期明显缩短。与前人的研究结果相比, *allC* 细胞 G₂ 期缩短表明细胞有可能快速通过了该时相进入 M 期,从而加快细胞的增殖速度,这个推测与 *allC* 细胞生长曲线表征的结果相契合。

3.3 *allC* 细胞中 *CycB1* 基因过表达 细胞增殖是生命活动的重要特征之一,受到严密的调控机制所监控。任何细胞,不管是简单的单细胞,还是高等生物体的细胞,其增殖过程都必须遵循一定的规律。在增殖过程中,任何一个关键步骤的错误,都有可能导导致细胞周期的改变,甚至细胞死亡。笔者的流式细胞实验已经证明, *allC* 细胞周期异常主要表现为 G₂ 期大幅度缩短。这提示我们, *allC* 细胞 G₂ 期缩短可能与 G₂ 期调控因子——G₂ 期检验点有关。细胞周期中 G₂ 期检验点的重要功能就是检测细胞的大小、DNA 复制以及相关的亚细胞结构是否达到进入 M 期的要求。已有研究证明, G₂ 期的检验点失效致使细胞内严格的调控机制遭到破坏,从而让尚未达到分裂要求的细胞越过 G₂ 检验点进入 M 期(Park et al. 2000)。因此,笔者对于细胞周期调控过程中 G₂ 期检验点的相关基因进行 mRNA 相对表达量的定量研究。从结果中我们可以看到, *allC* 细胞中 *cycB1* 基因的相对表达量高于 KAx-3 细胞 10 倍左右。人类细胞相关研究证实, *cycB1* 过表达可以改变 *cdc2* 激酶活性,从而启动有丝分裂,越过 G₂ 检验点使得其功能失效,造成失控性的细胞增殖(Yasui 1993, Mitra et al. 2004, Chen et al. 2008)。因此, *allC* 细胞中出现的 G₂ 期大幅度缩短,细胞增殖速度过快很可能与 *cycB1* 基因过表达致使 G₂ 期检验点失效有关。在研究过

程中笔者还观察到 *allC* 细胞的大小仅有 KAx-3 细胞的 1/10 左右,从 *allC* 细胞形态上的变化也可以推测 G₂ 期检验点可能已经失效。

3.4 *allC* 细胞中存在非整倍体 细胞培养至 48 h 时,由于自身代谢废物的逐渐积累和营养物质的不断消耗,细胞生长状态远远不如对数生长期,细胞基本处于稳定期或已经进入衰亡期。我们的实验结果也说明,培养 48 h 的 *allC* 未检测到 S 期和 G₂ 期的 DAPI 蓝色荧光信号(图 1d),细胞几乎丧失了分裂活性; KAx-3 细胞能够清晰的得到 S 期的峰图,但图中未能反映出明显的 G₂ 期峰图(图 1b),软件分析的结果表明约 6.10% 的细胞是即将细胞分裂的粘连体,这说明了 KAx-3 细胞在 48 h 仍能增殖,与生长曲线的趋势一致。此外,图 1d 我们可以推测出,在培养 48 h 的 *allC* 细胞中,很可能因为 *cycB1* 基因的过表达造成细胞内出现调控机制的紊乱,从而导致大约 1/2 的细胞存在非整倍体。这一推测得到了 Sasayamat 等(2005)研究结果的支持,他们认为 *cycB1* 的过表达有助于细胞越过 G₂ 期检验点造成染色体异常,产生非整倍体,进而促使肿瘤发生。因此, *cycB1* 基因的过表达也很可能是导致 *allC* 细胞染色体异常,非整倍体的出现的原因。

综上所述, *allC* 细胞倍增时间缩短,周期出现异常以及非整倍体的出现可能与 *cycB1* 过表达有关。尽管具体的分子调控机制尚不清楚,但是可以为研究高等生物复杂的细胞周期异常调控提供基础理论依据。

参 考 文 献

- Azhar M, Kennady P K, Pande G, et al. 2001. Cell cycle phase, cellular Ca²⁺ and development in Dictyostelium discoideum. International Journal of Developmental Biology, 45(2): 405-414.
- Chen H, Huang Q, Dong J, et al. 2008. Overexpression of CDC₂/CyclinB1 in gliomas and CDC₂ depletion inhibits proliferation of human glioma cells *in vitro* and *in vivo*. BMC Cancer, 8: 29.
- Gomer R A, Ammann R R. 1996. A cell-cycle phase-associated cell-type choice mechanism monitors the cell cycle rather than using an independent timer. Developmental Biology, 174

- (1): 82 - 91.
- Hunter T, Pines J. 1994. Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*, 79(4): 573 - 582.
- McDonald S A, Durston A J. 1984. The cell cycle and sorting behaviour in *Dictyostelium discoideum*. *Journal of Cell Science*, 66(1): 195 - 204.
- Mitra J, Enders G H. 2004. CyclinA/Cdk2 complexes regulate activation of Cdk1 and Cdc25 phosphatases in human cells. *Oncogene*, 23(19): 3361 - 3367.
- MuUer-Tidow C, Metzger R, Kügler K, et al. 2001. Cyclin E is the only Cyclin-dependent kinase2-associated cyclin that predicts metastasis and survival in early stage non-small cell lung cancer. *Cancer Research*, 61(2): 647 - 653.
- Park M, Chae H D, Yuan J, et al. 2000. Constitutive activation of cyclinB1-associated cdc2 kinase overrides p53-mediated G2-M arrest. *Cancer Research*, 60(3): 542 - 545.
- Sasayama T, Marumoto T, Kunitoku N, et al. 2005. Overexpression of aurora-a targets cytoplasmic polyadenylation element binding protein and Promotesm RNA polyadenylation of CDK1 and cyclinB1. *Genes to Cells*, 10(7): 627 - 638.
- Shih H C, Shiozawa T, Kato K, et al. 2003. Immunohistochemical expression of cyclins, cyclin-Dependent kinases, tumor-suppressor gene products, Ki-67 and sex steroid receptors in endometrial carcinoma; positive staining for cyclin A as a poor prognostic indicator. *Human Pathology*, 34(5): 471 - 478.
- Takasu S, Tsukamoto T, Ushijima T, et al. 2007. Cyclin D1 overexpression in N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced rat gastric adenocarcinomas. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 59(3/4): 171 - 175.
- Weijer C J, Duschl G, David C N. 1984. A revision of the *Dictyostelium discoideum* cell cycle. *Journal of Cell Science*, 70: 111 - 131.
- Wood S A, Ammann R R, Brock D A, et al. 1996. RtoA links initial cell type choice to the cell cycle in *Dictyostelium*. *Development*, 122(11): 3677 - 3685.
- Yasui W. 1993. Increased expression of p34^{cdc2} and its kinase activity in human gastric and colonic carcinomas. *International Journal of Cancer*, 53(1): 36 - 41.
- Zada-Hames I M, Ashworth J M. 1978. The cell cycle and its relationship to development in *Dictyostelium discoideum*. *Developmental Biology*, 63(2): 307 - 320.
- 梁智辉, 朱慧芬, 陈九武. 2008. 流式细胞术基本原理与实用技术. 武汉: 华中科技大学出版社, 69 - 86.
- 王璐, 封全灵, 史惠蓉. 2008. 细胞周期蛋白 B1 在卵巢癌中的研究进展. *国际妇产科学杂志*, (1): 44 - 46.
- 杨军平, 饶华. 2002. 细胞周期的失控与癌变. *江西医学检验*, 20(4): 237 - 238.
- 周开梅, 郭瑞珍. 2010. 细胞周期蛋白在恶性肿瘤中的表达. *医学综述*, (4): 533 - 536.