

研究简报

$p14^{ARF}$ 对人黑色素瘤细胞增殖的影响及其作用机理的初探*

彭丽霞 张 伟 柳惠图** 何大澄 高 萍

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

摘要 ARF (alternative reading frame) 作为 *INK4a/ARF* 的 β 转录产物, 能够稳定 p53, 诱导细胞周期阻断或凋亡. 利用高表达 $p14^{ARF}$ 的人黑色素瘤细胞模型, 探讨了 ARF 抑制细胞增殖的分子作用机理. 研究发现 $p14^{ARF}$ 高表达能将细胞周期阻断在 G1 和 G2 期, p53, p21^{cip1} 和 p27^{kip1} 蛋白水平明显增强, 而 p-ERK1/2, CyclinD1 和 CyclinE 蛋白水平下降, 明显抑制细胞生长. 提示 $p14^{ARF}$ 能通过 ERK (extracellular signal-regulated kinase) 信号通路相互协调作用抑制 A375 细胞增殖.

关键词 $p14^{ARF}$, p53, ERK, 细胞周期阻断

学科分类号 Q291

INK4a/ARF 基因位于人染色体 9p21, 是多种肿瘤常见失活位点之一. *INK4a/ARF* 具有两套启动子, 通过可变阅读框, 能够编码两种转录产物: α 转录产物, p16^{INK4a}; β 转录产物, $p14^{ARF}$ (鼠来源称为 p19^{ARF})^[1]. 由于 *INK4a/ARF* 独特的细胞周期调控作用, 受到广泛的关注. 尤其是 ARF 作为新发现的肿瘤抑制因子, 是目前细胞周期调控因子的研究热点之一. ARF 能够与原癌蛋白 MDM2 (murine double minute 2) 结合, 上调 p53 水平, 从而诱导细胞周期的阻断和凋亡^[2, 3]. 目前对 ARF 在细胞增殖和凋亡相关性方面的研究虽然取得一定进展, 但是对 ARF 的调控机理不是很清楚. 本研究应用 *pcDNA3-p14^{ARF}* 导入的高表达 $p14^{ARF}$ 人黑色素瘤 A375 细胞模型^[4], 对 $p14^{ARF}$ 抑制 A375 细胞增殖的机理, 特别是一些重要的与增殖相关的信号通路如 ERK (extracellular signal-regulated kinase) 信号通路是否参与了 A375 细胞周期的阻断作用进行了探讨.

1 材料和方法

1.1 材料

人黑色素瘤细胞 A375 购自中国科学院生物化学与细胞生物研究所; ECL 免疫荧光印迹试剂盒购自 Amersham 公司; CyclinD1, CyclinE, p-ERK1/2, p53, p21^{cip1} 和 p27^{kip1} 抗体购自美国 Santa Cruz 公司.

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 1.0×10^6 U/L 青霉素, 100 mg/L 链霉素.

1.3 细胞周期分析 (流式细胞光度术)

收集对数生长期细胞, 用 75% 乙醇固定 24 h 以上. 离心收集细胞, 用 PBS 洗两次后重悬, 用 RNase (50 mg/L) 于 37℃ 处理 30 min. 加 PI (80 mg/L) 染色 1 h 后, 用流式细胞分析仪测定.

1.4 细胞生长曲线的测定

对数生长期细胞按 4×10^3 /孔接种于 96 孔板, 加入 MTT (5×10^{-3} mg/L), 37℃ 孵育 4 h, 加 SDS 脱色液 (10% SDS, 0.01 mol/L HCl) 处理过夜, 空白对照以 DMEM 培养基代替细胞悬液, 于 570 nm 读取 A 值. 每点取 4 个平行孔的平均值. 总共测定 96 h.

1.5 有丝分裂百分数的测定

对数生长期细胞按 3×10^4 /ml 接种于培养皿中, 培养 48 h. 用 5 ml KCl 溶液 (0.075 mol/L) 37℃ 水浴低渗处理 15 ~ 20 min. 1 ml 新配置的固定液 (甲醇: 冰醋酸 = 3:1) 预固定, 再加入 5 ml 固定液, 室温固定 30 min, 弃上清. 加入 0.3 ~ 0.5 ml 固定液, 用 Giemsa 染液染色 6 ~ 10 min, 晾干后镜检.

* 国家重点基础研究资助项目 (G1999053901).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62209699, E-mail: liuhuitu@bnu.edu.cn

收稿日期: 2003-07-25, 接受日期: 2003-09-05

1.6 蛋白质印迹

按文献 [5] 中的方法进行蛋白质电泳, 转膜, 封闭. 再用一抗和辣根过氧化物酶标记的二抗孵育后, 按 ECL 免疫荧光印迹试剂盒说明进行显色, 曝光.

2 结 果

2.1 *p14^{ARF}* 高表达对人黑色素瘤细胞增殖的影响

A375, AP6 和 AA4 细胞在含 10% 血清的 DMEM 培养基中的生长状况表明: *p14^{ARF}* 高表达明

显抑制了 AA4 细胞的增殖. 与 A375 和 AP6 细胞相比, AA4 细胞生长速率明显下降, 增殖受到抑制, 细胞倍增时间延长. 培养 96 h 后, 与 A375 和 AP6 细胞相比, AA4 细胞数量分别减少了 26.2% 和 20.7% (图 1). 同时有丝分裂指数 (MI) 测定显示: 与 A375, AP6 细胞相比, AA4 细胞有丝分裂指数分别下降 36.8% 和 34.4% (图 2).

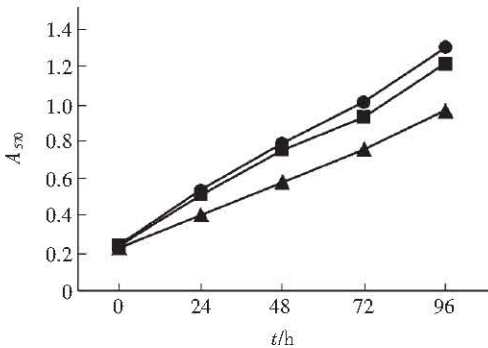


Fig. 1 The growth curve of the cells

● ●: A375, ■ ■: AP6, ▲ ▲: AA4.

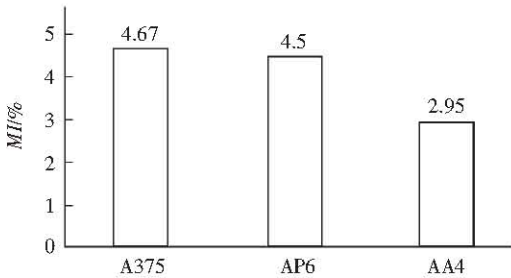


Fig. 2 The MI of the cells

流式细胞术分析表明: 同 A375 和 AP6 细胞相比, AA4 细胞 G1 期分别上升 26.6%, 21.8%; S 期分别下降 38.4%, 35.5% (图 3). 实验表明, *p14^{ARF}* 过表达抑制了 A375 细胞 G1/S 的进程.

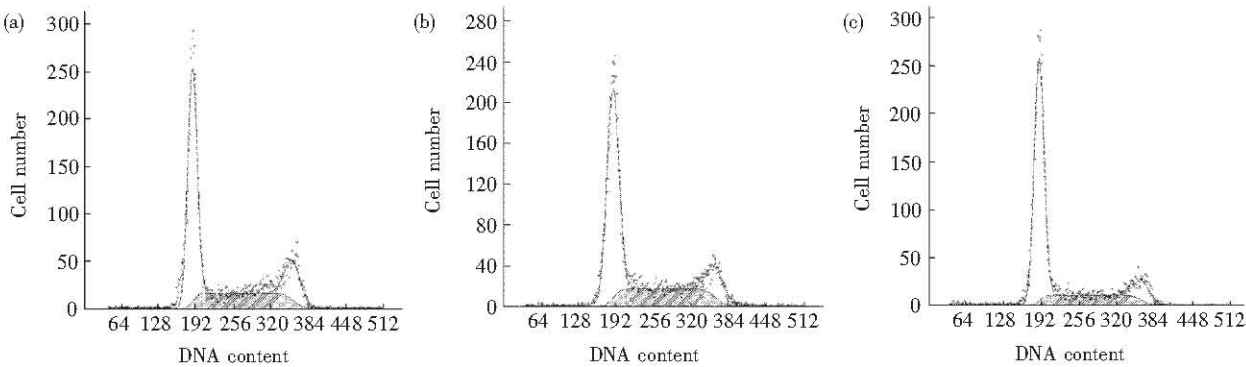


Fig. 3 Cell cycle analysis of the cells by FCM

(a) A375: G1 = 53.3%, S = 30.7%, G2/M = 16.0%; (b) AP6: G1 = 55.4%, S = 29.3%, G2/M = 15.3%; (c) AA4: G1 = 67.5%, S = 18.9%, G2/M = 13.6%.

综合上述结果可见, *p14^{ARF}* 高表达抑制了 A375 细胞 G1/S 和 G2/M 的转换.

2.2 *p14^{ARF}* 高表达对细胞周期相关因子的影响

提取 AA4, AP6 和 A375 细胞的蛋白质, 通过蛋白质印迹检测 p53, p21^{cip1}, p27^{kip1}, p-ERK,

Cyclin D1 和 Cyclin E 蛋白表达水平. 结果表明: 同 AP6 和 A375 细胞相比, 高表达 *p14^{ARF}* 的 AA4 细胞中 p53, p21^{cip1} 和 p27^{kip1} 蛋白水平较高 (图 4), 而 p-ERK1/2, Cyclin D1 和 Cyclin E 蛋白水平都有不同程度的降低 (图 5).

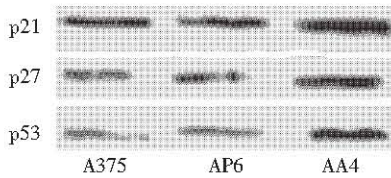


Fig. 4 Analysis the expression of p21, p27 and p53

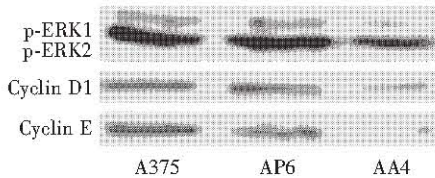


Fig. 5 Analysis the expression of p-ERK1/2, Cyclin D1 and Cyclin E

3 讨 论

通常认为 INK4a/ARF 基因产物 $p16^{INK4a}$ 和 $p14^{ARF}$ 分别通过 pRb 和 p53 途径, 抑制细胞增殖或促进细胞凋亡. 本研究发现 $p14^{ARF}$ 不仅可以通过 p53 调节通路抑制人黑色素瘤细胞增殖而且与 ERK 信号通路密切相关.

p53 是一种多功能的蛋白质, 能够引起细胞周期阻滞, 参与细胞的衰老, 分化和凋亡的过程. 通常 p53 水平较低, 半衰期很短. 有多种机制参与了 p53 功能的调节, 其中最重要且行之有效的是 p53 稳定性调节. 通过 FITC-p53 免疫荧光标记细胞, 在激光共聚焦显微镜下我们曾观察到, $p14^{ARF}$ 过表达能促进 p53 富集在细胞核中. $p14^{ARF}$ 缺失时, p53 分散在细胞质中^[4]. 本研究表明, 在 $p14^{ARF}$ 高表达的 AA4 细胞中 p53 水平明显增高. 已知 $p14^{ARF}$ 对 p53 水平的调节是通过结合 MDM2 实现的. MDM2 具有泛素连接酶 E3 的功能, 能够结合在 p53 的转录活性区域, 将 p53 从细胞核转运到细胞质中, 从而使 p53 降解. $p14^{ARF}$ 能在核质中捕获 MDM2, 阻止 MDM2 的转运作用, 使 p53 在细胞核中积累^[2, 3]. p21 转录受 p53 的正调控, 它的编码区上游 2.4 kb 启动子区有 p53 的结合位点^[6]. p21 是哺乳类细胞特异生长控制途径中关键的下效应因子, p53 的过表达通过 p21 的水平上升抑制细胞增殖. 本研究发现 $p14^{ARF}$ 过表达能抑制 A375 细胞增殖, 将细胞阻滞在 G1 期, 同时导致 p21 和 p27 蛋白水平上升. 说明在 $p14^{ARF}$ 过表达引起 A375 细胞阻滞在 G1 期过

程中, p21 和 p27 具有协同作用.

p21 和 p27 属于广谱 CDK 抑制因子, 能够抑制 G1 期 Cyclin-CDKs 复合物的活性, 阻断细胞周期的进程. 本实验观察到, $p14^{ARF}$ 过表达的 A375 细胞中 Cyclin D1 和 Cyclin E 表达水平下降, p21 和 p27 的抑制作用是上述结果的分子机理之一. Cyclin D 和 Cyclin E 是 G1 及 G1/S 转换期中主要表达的周期蛋白. Cyclin D 主要分为三种类型: D1, D2, D3. Cyclin D 的表达形式因细胞种类而异, 其中 Cyclin D1 在细胞中普遍表达^[7, 8]. Cyclin D, Cyclin E 能够分别与 CDK4/6 和 CDK2 结合, 分别磷酸化 Rb 不同位点. 非(低)磷酸化 pRb 能够结合 E2F, 募集组蛋白去乙酰化酶到 E2F 应答基因的启动子上, 使核心组蛋白去乙酰化, 染色体结构包装得更紧密, E2F 应答基因的转录被关闭. pRb 磷酸化后失活, 释放转录因子 E2F, E2F 应答基因开始转录^[9]. 促进细胞从 G1 进入 S 期.

本研究发现, $p14^{ARF}$ 过表达可使 p-ERK1/2 水平下降, 提示 p-ERK1/2 也可能参与 $p14^{ARF}$ 对细胞周期的阻断作用. ERK1/2 是哺乳动物细胞中 MAPKs 家族成员. 一般认为 ERK1/2 可被有丝分裂原或生长因子激活, 通过 Raf/MEK/ERK 通路调节细胞的增殖与分化^[10, 11]. 有报道表明, G1 期细胞周期阻滞与 ERK 活性降低有关^[12], ERK 能够刺激 Cyclin D1 的表达, 上调 Cyclin D1 和 CDK4/6 复合物的水平^[13]. 本研究发现 $p14^{ARF}$ 过表达, 磷酸化 ERK 蛋白水平降低, Cyclin D1 和 Cyclin E 蛋白水平也相应降低, 目前 $p14^{ARF}$ 调控 ERK 的机理尚不清楚, 但是该结果为进一步探讨 $p14^{ARF}$ 抑制细胞增殖作用机理提供了新的实验证据.

总之, 本实验通过建立 $p14^{ARF}$ 高表达的人黑色素瘤细胞模型, 发现 $p14^{ARF}$ 不仅可以通过 p53 途径, 还可能通过 ERK 信号通路, 抑制细胞增殖, 将细胞周期阻滞在 G1/S 期.

参 考 文 献

- 1 Stott F J, Bates S, James M C, *et al.* The alternative product from the human CDKN2A locus, $p14^{ARF}$, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J*, 1998, **17** (17): 5001 ~ 5014
- 2 Serrano M. The INK4a/ARF locus in the murine tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 2000, **21** (5): 865 ~ 869
- 3 Sheer C J, Weber J D. The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Deve*, 2000, **10** (1): 94 ~ 99
- 4 彭丽霞, 张伟, 柳惠图, 等. $p14^{ARF}$ 高表达对 γ 射线诱导的人黑色素瘤细胞凋亡的影响. *科学通报*, 2003, **48** (15): 1652 ~ 1656

- Peng L X, Zhang W, Liu H T, *et al.* Chin Sci Bull, 2003, **48** (15): 1652 ~ 1656
- 5 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 870 ~ 897
 - 6 Nakanishi M R S. Identification of the active region of the DNA synthesis inhibitory gene p21. EMBO J, 1995, **14**: 555 ~ 563
 - 7 Sheer C J. D-type cyclins. Trends Biochem Sci, 1995, **20** (5): 187 ~ 190
 - 8 Lavoie J N, L'Allemain G, Brunet A, *et al.* Cyclin D1 expression was regulated positively by the p42/p44^{MAPK} and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. J Biol Chem, 1996, **271** (34): 20608 ~ 20616
 - 9 Lundberg A S, Weinberg R. Fictional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-CDK complexes. Mol Cell Biol, 1998, **18** (2): 753 ~ 761
 - 10 Ramachandiran S, Huang Q, Dong J, *et al.* Mitogen-activated protein kinases contribute to reactive oxygen species-induced cell death in renal proximal tubule epithelial cells. Chem Res Toxicol, 2002, **15** (12): 1635 ~ 1642
 - 11 Kim S J, Ju J W, Oh C D, *et al.* ERK-1/2 and p38 kinase oppositely regulate nitric oxide-induced apoptosis of chondrocytes in association with p53, caspase-3 and differentiation states. J Biol Chem, 2002, **277** (2): 1332 ~ 1339
 - 12 Moon S K, Cho G O, Jung S Y, *et al.* Quercetin exerts multiple inhibitory effects on vascular smooth muscle cells: role of ERK1/2, cell-cycle regulation, and matrix metalloproteinase-9. Biochem Biophys Res Commun, 2003, **301** (4): 1069 ~ 1078
 - 13 Wagner M, Greten F R, Weber C K, *et al.* A murine tumor progression model for pancreatic cancer recapitulating the genetic alterations of the human disease. Genes Dev, 2001, **15** (3): 286 ~ 293

Effects of Overexpressing $p14^{ARF}$ on The Proliferation in Human Melanoma Cells *

PENG Li-Xia, ZHANG Wei, LIU Hui-Tu **, HE Da-Cheng, GAO Ping

(Key Laboratory of Cell Proliferation and Regulation Biology of Ministry of Education,

College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract ARF can induce cell cycle arrest or apoptosis. By using the A375 cell overexpressing $p14^{ARF}$ as a model, the molecular mechanism of cell cycle arrest by ARF was studied. It was indicated that overexpressing $p14^{ARF}$ resulted in G1-phase and G2-phase arrest. In the A375 cells overexpressing $p14^{ARF}$, the level of p53, p21^{cip1} and p27^{kip1} was upregulated, but the protein level of p-ERK1/2, Cyclin D1 and Cyclin E was inhibited. The results indicated that $p14^{ARF}$ induced the cell cycle arrest of A375 not only in a p53-dependent way, but also in cooperation with the ERK signal transduction pathway.

Key words $p14^{ARF}$, p53, ERK, cell cycle arrest

* This work was supported by a grant from The National Basic Research Program of China (G1999053901).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62209699, E-mail: liuhuitu@bnu.edu.cn

Received: July 25, 2003

Accepted: September 5, 2003