

细胞周期的调控及在核移植研究中的应用

赵雪萍, 王锋*, 孙永成, 潘晓燕

(南京农业大学 动物胚胎工程技术中心, 南京 210095)

摘要: 细胞周期是生命活动中一个最重要的过程。以 cyclin、CDK、CKI 等细胞周期调控蛋白的相互作用推动着细胞周期时相的进展和时相之间的转变。这一过程受到严密的调控机制所监控。在核移植的研究中, 对细胞周期进行调控, 使细胞阻滞于某一特定时期有非常重要的意义。

关键词: 细胞周期; 增殖; 泛素降解; 细胞周期同步化

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7083(2005)04-0665-04

Cell Cycle Regulation and Application in Nuclear Transferring

ZHAO Xue-ping, WANG Feng*, SUN Yong-cheng, PAN Xiao-yan

(Center of Animal Embryo Engineering and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: Cell cycle is essential for the life. The interactions among cyclin, CDK and CKI promote the transforming of cell cycle, which are regulated by strict mechanism. Regulating the cell cycle and synchronizing cells at certain stage plays an important role in the study of nuclear transferring.

Key words: cell cycle; proliferation; ubiquitin degradation; synchronization of cell cycle

细胞周期是细胞生命活动的基本过程, 最主要的事件是遗传信息的载体 DNA 复制成两份拷贝, 并通过有丝分裂的方式将两份拷贝分配到两个子代细胞中。细胞增殖是一个严格控制和有特定顺序的过程。近年来, 核移植技术得到迅速发展, 不同细胞类型供体的克隆动物相继生产。由于体外传代培养的细胞能够为核移植提供大量的供体细胞, 并且便于转基因操作进行转基因动物生产, 所以传代培养的细胞在核移植技术中应用广泛^[1,2,3]。核移植的供体和受体细胞的细胞周期调控对核移植的成功率有非常重要的影响。本文拟对细胞增殖过程中细胞周期的调控以及细胞周期调控在核移植研究中的应用做一综述。

1 细胞增殖的调控

在细胞周期中, 由 cyclin (细胞周期蛋白)、CDK (周期蛋白依赖性蛋白激酶) 和 CKI (CDK 激酶抑制剂) 组成的“驱动器”对靶蛋白的磷酸化修饰以及蛋白磷酸酯酶对它的去磷酸化推动着细胞周期中时相的进展和各相之间的转变。cyclin、CDK、CKI 的合成组装、修饰活化、拆卸降解和转换是导致细胞周期时相的推进和各相间过渡的核

心机制, 被来源于细胞外生长因子的信号转导所调节。

1.1 细胞周期检测点

细胞周期是一个不可逆的过程。细胞周期不同时相的转变存在着细胞周期检测点 (cell cycle checkpoints), 当外界环境发生改变时会限制细胞周期的转变, 作为一保护机制在真核生物生命活动中起着十分重要的作用。检测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^[4]。在真核细胞的一系列细胞周期检测点中, G1/S 期检测点至关重要。细胞在该检测点对各类生长因子、分裂原以及 DNA 损伤等复杂的细胞内外信号进行整合和传递, 决定细胞是否进行分裂、发生凋亡或是进入 G0 期^[5,6]。CDC25A 磷酸脂酶的靶操作序列在 G1 检测点启动和短暂的 S 期内反应都起着重要的作用^[5]。

1.2 细胞周期的调控蛋白

pRB (成视网膜细胞瘤蛋白) 控制 G1 期调控检测点, 调控的分子机制主要是通过控制 pRB 的丝氨酸和苏氨酸残基磷酸化状态来实现的。在检测点之前, pRB 处于低磷酸化状态, 这时它与 E2F (一种转录激活因子) 结合, 并抑制 E2F 的活性,

收稿日期: 2005-03-04 修回日期: 2005-04-28

作者简介: 赵雪萍 (1980~), 女, 硕士生

* 通讯作者 Corresponding author, 博士, 教授, 博导, 主要从事动物胚胎工程研究, Email: fwang2001@sina.com

导致了对进入 S 期所必需的一系列基因的表达不能进行。如果满足了细胞的生长条件,细胞内的 CDK4/6-cyclin D 复合物将被活化,对 pRB 进行磷酸化。随后 pRB 又被 CDK2-cyclin E 复合物进一步过磷酸化^[7,8]。过磷酸化的 pRB 处于失活状态,不能与 E2F 结合,使得 E2F 的转录激活作用得到发挥,启动了一系列基因的表达,从而使细胞通过检测点,最终推动细胞进入 S 期^[9]。只有在发生至少两个独特的 G1 期 cyclin-激酶复合物连续作用后,pRB 完整的磷酸化,E2F 结合失活,以及 E2F 转录激活才会发生^[7]。在 pRB 缺失的细胞里,p130 (pRB 家族的一员)被 CDK2-cyclin E 复合物过磷酸化,从而释放 E2F^[10]。P130 磷酸化时没有形成 cyclin D-CDK4/6 复合物(与 CDK2-cyclin E 复合物活性一致),并且能被主导负调控基因 CDK2 的表达所抑制。主导负调控基因 CDK2 阻止内源性 p130-E2F-4 复合物的分离,抑制 E2F-4 依赖性转录^[10]。

另外还有一些蛋白参与调控细胞周期。如 ID (inhibitors of DNA binding) 蛋白,目前认为 ID 蛋白对细胞生长发挥正调控作用,因为 bHLH (basic helix-loop-helix) 转录因子的基本功能是激活分化相关基因表达和诱导 G1 期细胞阻滞,而这些功能被 HLH 蛋白 ID 家族的成员负调控。G0 期细胞 ID 蛋白低水平表达或不表达,而在受促有丝分裂信号刺激后,ID 蛋白可在 1~2 h 内被快速诱导表达,在 G1 晚期向 S 期转变过程中 CDK2 产生的磷酸化提供一个开关,使 ID3 的 G1 早期细胞周期调控功能失效,并且调节 bHLH 的靶特异性,促进细胞周期进入 S 期。进入 S 期后表达水平上调^[11]。

还有 TGF- β 1 (转化生长因子- β 1),TGF- β 造成的 cyclin A 相关激酶抑制主要是因为 cyclin A mRNA 和蛋白的降低。相反的是,TGF- β 虽然抑制 cyclin E mRNA 的积累,但 cyclin E 蛋白的降低很少。我们发现 cyclin E 相关激酶活性经常伴随着 G1/S 转变被抑制^[6]。整合蛋白介导的细胞粘附转导信号与 TGF- β 1 途径协同作用,调控肌动蛋白细胞骨架和细胞增殖,抑制细胞生长^[12]。

脂质过氧化反应的产物——HNE (4-Hydroxynonenal) 对细胞增殖有负调控作用。HNE 诱导 pRB 脱磷酸化,增加 pRB/E2F1 复合物,而 pRB/E2F4 复合物减少,因为 HNE 负调控 E2F4 蛋白的表达。E2F 与 P2 c-myc 启动子结合的分析表明,HNE 减少自由的 E2F 量,同时增加 pRB (以及

pRB 家族成员)与 E2F 的结合,从而抑制转录。HNE 通过降低一定数量的基因,包括 pRB/E2F 途径调控的基因,从而抑制 E2F 转录活性^[13]。

1.3 细胞周期调控蛋白的降解

CKI 活性抑制因子的降解是细胞分裂所必需的,而细胞周期正调控因子的降解则对维持细胞稳态至关重要。为了确保一个已经启动的细胞周期向单一的、细胞分裂的方向推进,细胞周期蛋白和其他蛋白质必须在任务完成后被迅速且不可逆地降解掉。这些降解是通过泛素化途径 (ubiquitin pathway) 进行的。

泛素化途径是目前已知的所有真核生物体内蛋白质降解途径中最为重要的、有高度选择性的蛋白质降解途径。不仅对变性的蛋白质、异常的蛋白质有降解作用,还能降解许多细胞中的调控蛋白,如调控细胞周期的蛋白质。泛素化途径能催化靶蛋白与泛素相连。首先,泛素经激活酶 E1 活化,从激活酶 E1 转移到结合酶 E2 上,再在连接酶 E3 的参与下,泛素又从结合酶 E2 转移到靶蛋白上,最后,由 26S 的蛋白酶体识别被泛素化的靶蛋白,将靶蛋白水解成小的肽段^[14]。泛素化途径对细胞周期的调控存在两种不同的途径,即依赖 SCF (Skp-cullin-F-box protein) 和 APC/C (anaphase promoting complex/cyclosome) 的泛素化途径。SCF 和 APC/C 都是泛素连接酶 E3,它们分别在细胞周期不同的时期被激活,SCF 途径要求 E2 酶,Cdc34 (或 Ubc3, ubiquitin-conjugating enzymes) 与 SCF 结合激活 DNA 复制。这一途径从 G1 期一直延续到 S 期末,许多调控 G1 期向 S 期过渡的调控因子,如 p27^{Kip1}、E2F、cyclin D 和 cyclin E 都是由此途径降解的。而 APC/C 途径是与两个 E2 (Ubc10 或 Ubc4) 之一结合,调控从 M 期的中期到 G1 向 S 期过渡的这段时间,主要与有丝分裂中 CDKs 作用,与姐妹染色单体的分离、纺锤体的解聚、胞质分裂、细胞脱离有丝分裂和细胞重新进入 G1 期都有密切的关系^[15,16]。

2 细胞周期调控在核移植研究中的应用

虽然核移植技术得到飞速发展,但目前核移植的成功率仍较低,影响核移植效率的因素有很多,首先,供体细胞不能有效地同步化于细胞周期的适当阶段;其次,处理后的细胞核不能有效重构;第三,妊娠晚期胚胎的丢失率较高;第四,围产期胎儿的健康不能保证^[17]。这些因素与供体核和受体

胞质的之间细胞周期一致性有很大的关系。

2.1 核移植受体的周期调控

MⅡ期卵母细胞是哺乳动物核移植使用最多的一类受体。MⅡ卵母细胞胞质中存在一类重要的蛋白质因子,即 MPF (成熟促进因子),MPF 在 MⅡ期活性很高,一旦受精或被激活,MPF 活性急剧下降。供体核暴露在高 MPF 活性的环境中,可以促进染色体的凝集,加速胞质中有关因子与核的交换,可以改善随后的发育。但若供体核未与受体进行同步化处理,供体胚核大部分处于 S 期,当移入未激活的去核卵母细胞时,形成大量的非二倍体重组胚,致使中途发育停滞、死亡。激活卵母细胞后, Ca^{2+} 浓度上升,CSF (细胞静止因子)活性下降,MPF 活性也下降。当移入激活的去核卵母细胞时,因 MPF 活性已消失,保持核膜的完整性,重组胚具有正常的染色体组成^[18]。

2.2 核移植供体细胞的周期调控

供体细胞的细胞周期对核移植胚胎的发育潜力有明显的影 响,目前进行的多数试验都采用 G0/G1 期细胞,目的是与 MⅡ期卵母细胞中存在的成熟促进因子活性的高水平相协调。

血清饥饿培养是细胞周期同期化于 G0/G1 期的基本方法。最普遍的处理方案是低血清培养 (0.5%FBS) 至少 2~3 天,血清饥饿处理对于细胞作为核质供体的生活力有潜在的负面作用。因为细胞核有损伤。血清饥饿的另一种可供选择的办法是使处于生长周期中的贴壁细胞生长至融合,通过接触抑制诱导细胞阻滞与细胞周期的 G0/G1 期。但接触抑制的持续时间可能不足以产生充分的细胞周期同步化,从而影响着床前胚胎发育^[19]。用有丝分裂期阻滞药物,如 2-methoxyestradiol,将细胞阻滞于 M 期,振荡选择 M 期细胞,培养一定时间后可以得到较整齐的 G1 期细胞^[20]。

Olomucine (CKI 的一种) 被用来控制细胞周期,通过血清饥饿和 olomucine 共同作用来协同抑制,使细胞同步化于 G0/G1 期。olomucine 是一种嘌呤类似物,能够特异性抑制 CDKs,控制 cyclin A、B、E 激酶的活性,可逆性的控制细胞进入 G1/S 和 G2/M 期^[21]。

CDK2 抑制剂, roscovitine, 可以用来使细胞周期同步化于 G0/G1 期,对于牛卵巢颗粒细胞, roscovitine 处理的细胞同步化效果比血清饥饿处理的效率高,虽然 roscovitine 处理组核移植后的囊胚发育率低于血清饥饿处理组,但出生胎儿数和胎儿

成活率较高。Roscovitine 处理能够使供体细胞达到同步化,并且有较高的核重构能力,提高核移植的效率^[17]。

mimosine (含羞草氨酸) 可以在 DNA 合成开始之前的 G1 期晚期使细胞周期进程停滞,从而将细胞周期阻滞于 G1 期。实现这一过程是通过增加 p27^{Kip1} 水平^[22,23]。

动物克隆的研究中通常是使用 G0/G1 期的体细胞。但除了 G0 期的细胞,其他时期也可获得克隆动物,表明 G0 期同步化处理并不是体细胞克隆的必备条件^[22]。有研究使用 G2/M 期的细胞来进行核移植,使用低剂量的 nocodazole 处理较长的时间,可以获得丰富的 G2/M 期体细胞^[24]。nocodazole 作为抗肿瘤药物是一种抗微管因子,它通过与 β -微管蛋白亚基的精氨酸残基结合来抑制自由微管蛋白分子的聚合反应,可以使细胞阻滞于有丝分裂期^[25]。

Birgit Kuhholzer 等报道说,对猪胚胎成纤维细胞,用血清饥饿预处理使其处于 S 期早期,再用 Hoechst 33342 (H342) 培养可获得 G2/M 期供体细胞。由于种间特异性的差异,在鼠类和人类细胞,该方法处理的效率更高。荧光染料 H342 是一种 topoisomerase 抑制剂,能够抑制细胞周期进程。topoisomerase 是参与调控细胞周期的一种重要的酶。Top I 能促进染色质集合,在重组、延长和细胞分裂中起作用。Top II 对有丝分裂时染色体浓缩和分离是必需的。topoisomerase 抑制剂稳定蛋白和 DNA 之间形成的“分裂复合物”,阻止 DNA 链间的重新结合,H342 降低 Top I 和 Top II 介导的活性^[26]。

用兔 G1 期细胞做供体的研究表明,在大多数染色体凝集中,分裂中期的平板与纺锤体是完整的。但若移植的是 S 期细胞,早期多数失去完整性,而 S 期晚期则检测到总畸变量的增加。来自 S 期的重构胚的发育率最低^[27]。Ono 等也曾报道过用 M 期体细胞核作为供体核质核移植成功的例子。

D.N. Wells 等的研究结果显示,对于非转基因的成纤维细胞,血清饥饿处理使处于 G0 期所产生的成活牛犊数显著高于 G1 期供体细胞。而转基因成纤维细胞的结果则与此相反。这表明供体细胞的细胞周期阶段不是影响核移植效率最主要的因素,而是供体细胞类型与细胞周期所处阶段的协调作用^[28]。

细胞增殖是细胞生命活动的重要特征之一,是

生物繁殖和生长发育的基础。对体外培养的成纤维细胞,控制作用于细胞的各种因素,使细胞按照正常的细胞周期增殖、在需要的情况下使细胞周期停留于某一阶段显得尤为重要。

3 参考文献

- [1] Cibelli JB, Stice SL, Golueke PL, *et al.* Cloned calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts [J]. *Science*, 1998, 280 (5376): 1256~1258.
- [2] Zakhartchenko V, Alberio R, Stojkovic M, *et al.* Adult cloning in cattle: potential of nuclei from a permanent cell line and from primary cultures [J]. *Mol Reprod Dev*, 1999, 54: 264~272.
- [3] 王玉阁, 邹贤刚, 成国祥, 等. 由胎儿成纤维细胞而来的克隆山羊 [J]. *科学通报*, 1999, 44 (21): 2319~2323.
- [4] Pietenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis [J]. *Toxicology*, 2002, 27 (181-182): 475~481.
- [5] Bartek J, Lukas J. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage [J]. *J Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13 (6): 738~747.
- [6] AJ Obaya, JM Sedivy. Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2002, 59: 126~142.
- [7] Lundberg AS, Weinberg RA. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes [J]. *Mol Cell Biol*, 1998, 18: 753~761.
- [8] Jiri Bartek, Jirina Bartkova, Jiri Lukas. The retinoblastoma Protein pathway in cell cycle control and cancer [J]. *Experimental Cell Research*, 1997, 237: 1~6.
- [9] Olivier Stevaux, Nicholas J Dyson. A revised picture of the E2F transcriptional network and Rb function [J]. *Cell Biology*, 2002, 14: 684~691.
- [10] Cheng L, Rossi F, Fang W, *et al.* Cdk2-dependent phosphorylation and functional inactivation of the pRB (-) related p130 protein in pRB (-), p16INK4a (+) tumor cells [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 30317~30325.
- [11] Deed RW, Hara E, Atherton GT, *et al.* Regulation of Id3 cell cycle function by Cdk-2-dependent phosphorylation [J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17 (12): 6815~6821.
- [12] Hwang-Phill Kim, Tai-Young Kim. TGF- β 1-mediated activations of c-Src and Rac1 modulate levels of cyclins and p27^{Kip1} CDK inhibitor in hepatoma cells replated on fibronectin [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 9: 1~11.
- [13] Giuseppina Barrera, Stefania Pizzimenti. 4-hydroxynonenal and regulation of cell cycle: effects on the pRB/E2F pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 37 (5): 597~606.
- [14] Varshavsky A. The ubiquitin system [J]. *Trends Biochem Sci*, 1997, 22: 383.
- [15] Lauren M, DeSalle, Michele Pagano. Regulation of the G1 to S transition by the ubiquitin pathway [J]. *FEBS Letters*, 2001, 490: 179~189.
- [16] 周蕊, 余泽华. 泛素化途径与细胞周期的关系 [J]. *生命科学*, 2003, 15 (6): 147~150.
- [17] Gibbons J, Arat S, Rzcudlo J. Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells [J]. *Biol Reprod*, 2002, (66): 895~900.
- [18] Kline D. Activation of the mouse egg [J]. *Theriogenology*, 1996, 45 (1): 81~90.
- [19] David Melican, Robin Butler, Nathan Hawkins, *et al.* Effect of serum concentration, method of trypsinization and fusion/activation utilizing transfected fetal cells to generate transgenic dairy goats by somatic cell nuclear transfer [J]. *Theriogenology*, 2005, 63 (6): 1549~1563.
- [20] Manami Urakawaa, Atsushi Idetaa, Tokihiko Sawadab, *et al.* Examination of a modified cell cycle synchronization method and bovine nuclear transfer using synchronized early G1 phase fibroblast cells [J]. *Theriogenology*, 2004, 62: 714~728.
- [21] YS Yu, XS Sun, HN Jiang, *et al.* Studies of the cell cycle of *in vitro* cultured skin fibroblasts in goats: work in progress [J]. *Theriogenology*, 2003, 59: 1277~1289.
- [22] I Vacková, M Engelová, I Marinov. Cell cycle synchronization of porcine granulosa cells in G1 stage with mimosine [J]. *Animal Reproduction Science*, 2003, 77: 235~245.
- [23] Gang Wang, Robin Miskimins, W Keith. Miskimins mimosine arrests cells in G1 by enhancing the levels of p27Kip1 [J]. *Experimental Cell Research*, 2000, 254: 64~71.
- [24] Ching-Chien Chang, Xiuchun Cindy Tian, Zsolt Peter Nagy, *et al.* Cell cycle synchronization of mouse skin fibroblasts with nocodazole to obtain G2/M phase rich somatic cell population for nuclear transfer [J]. *Fertility and Sterility*, 2002, 78 (Sup 1): 284.
- [25] RJ Vasquez, B Howell, AM Yvon, *et al.* Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability *in vivo* and *in vitro* [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 1997, 8 (6): 973~985.
- [26] Birgit Kühholzer, Randall S Prather. Synchronization of porcine fetal fibroblast cells with topoisomerase-inhibitor hoehchst 33342 [J]. *Animal Reproduction Science*, 2001, 66: 109~116.
- [27] Manami Urakawa, Atsushi Ideta, Tokihiko Sawada, *et al.* Examination of a modified cell cycle synchronization method and bovine nuclear transfer using synchronized early G1 phase fibroblast cells [J]. *Theriogenology*, 2004, 62: 714~728.
- [28] DN Wells, G Laible, FC Tucker. Coordination between donor cell type and cell cycle stage improves nuclear cloning efficiency in cattle [J]. *Theriogenology*, 2003, 59: 45~59.