

蛋白激酶抑制剂对青石棉诱导肺成纤维细胞的细胞周期调控蛋白表达的影响

詹显全*, 杨青, 王治明, 王绵珍

(华西医科大学公共卫生学院, 四川 成都 610041; *现在湖南医科大学肿瘤研究所, 湖南 长沙 410078)

摘要: 目的 探讨青石棉致人胚肺成纤维细胞 (HEPF) 增殖的细胞周期变化的机制。方法 用流式细胞技术检测青石棉诱导 HEPF 的细胞周期调控蛋白表达的改变, 观察酪氨酸蛋白激酶 (TPK) 和蛋白激酶 C (PKC) 的抑制剂对其表达的影响。结果 青石棉可诱导 HEPF 的 Cyclin D₁、Cyclin E、PCNA、Cyclin A、Cyclin B₁ 和 P34cdc2 激酶等蛋白的阳性表达率发生改变。在青石棉组, PKC 抑制剂使 PCNA 表达的阳性率较未加入 PKC 抑制剂组明显降低, 对 P34cdc2 激酶影响不大 ($P > 0.05$); 而 TPK 抑制剂使 PCNA 表达的阳性率增高; P34cdc2 激酶表达的阳性率降低 ($P < 0.01$)。结论 这几种蛋白可能均参与了青石棉致 HEPF 增殖, PCNA (和 P34cdc2 激酶) 表达的改变可能与上游的 PKC (和 TPK) 信号通路有关。

关键词: 青石棉; 肺成纤维细胞; 细胞周期调控蛋白; 蛋白激酶 C; 酪氨酸蛋白激酶

中图分类号: P619.271; Q253 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2000)05-0257-05

The effect of protein kinase inhibitor on the expression of cell cycle-regulating protein of human embryonic pulmonary fibroblasts induced by crocidolite

ZHAN Xian-quan, YANG Qing, WANG Zhi-ming, WANG Mian-zhen

(Department of Occupational Health, School of Public Health, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of cell proliferation cycle change of human embryonic pulmonary fibroblasts (HEPF) induced by crocidolite. **Method** Using flow cytometry to measure the expression of cell cycle-regulating protein in the proliferation process of HEPF induced by crocidolite, while to detect the effect of tyrosine protein kinase (TPK) inhibitor and protein kinase C (PKC) inhibitor on expression of cell cycle-regulating protein of HEPF by crocidolite. **Results** Crocidolite might induce the positive expression rates of Cyclin D₁, Cyclin E, PCNA, Cyclin A, Cyclin B₁ and P34cdc2 kinase to be significantly changed. The PKC inhibitor might make the positive expression rate of PCNA significantly reduced in crocidolite group ($P < 0.01$), but had no effect on that of P34cdc2 kinase ($P > 0.05$). While TPK inhibitor could make the positive expression rate of PCNA increased and P34cdc2 kinase decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** These cell cycle-regulating proteins may be involved in the proliferation process of HEPF induced by crocidolite. The expression change of PCNA (or P34cdc2 kinase) was probably related to the up-stream signal pathway of PKC (or TPK).

Key words: Crocidolite; Pulmonary fibroblast; Cell cycle-regulating protein; Protein kinase C; Tyrosine protein kinase

我们先前的研究已证明青石棉可致人胚肺成纤维细胞细胞周期改变而促使其增殖, 且酪氨酸蛋白激酶 (TPK) 和蛋白激酶 C (PKC) 信号通路参与了这一过程。根据现代分子生物学理论, 细胞信号通路的上游信号最终必须作用于细胞周期调控蛋白基因, 引起细胞周期调控蛋白表达的改变来调节细胞周期变化。目

前认为参与细胞周期调控的蛋白系统主要有细胞周期蛋白 (Cyclin)、细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶 (CDK)、细胞周期基因 cdc2 的表达产物 P34cdc2 激酶和增殖细胞核抗原 (PCNA) 等调节因子, 而每类又是一蛋白质超家族^[1,2]。随着免疫组化和流式细胞技术^[3]的发展, 可方便地研究细胞周期、细胞膜上的受体和细胞内的蛋白表达。本研究采用先进的流式细胞技术观察 P34cdc2 激酶、PCNA、Cyclin B₁、Cyclin A、Cyclin D₁ 和 Cyclin E 在青石棉所致人胚肺成纤维细胞增殖中的表达, 同时检测 TPK 和 PKC 抑制剂对其表达的影响, 以从分子水平了解青石棉致肺成纤维细胞

收稿日期: 2000-04-18; 修回日期: 2000-06-29

基金项目: 卫生部科学研究基金资助 (编号: 98-1-229)

作者简介: 詹显全 (1969-), 男, 重庆市人, 博士后, 从事癌变分子机理研究。

增殖的细胞周期变化的机制。

1 材料与方法

1.1 实验用粉尘

UICC 青石棉尘 (美国 NIOSH 提供)、标准石英尘和标准二氧化钛尘 (中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所提供) 用 D-Hank's 液配成 2mg/ml 的粉尘悬液, 高温消毒后备用, 临用前将此悬液用 RPMI 1640 培养液稀释配成 100 μ g/ml 的粉尘悬液。

1.2 粉尘处理肺泡巨噬细胞 (AM) 的培养上清液的制备

用肺灌洗法收集新西兰大白兔 (由华西医科大学实验动物中心提供) 的 AM, 用 RPMI 1640 完全培养液调成细胞密度为 1 \times 10⁶ 个/ml 的细胞悬液, 接种于 24 孔培养板, 每孔 1ml, 置 37 $^{\circ}$ C 体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱 4h, 弃上层液, 用 D-Hank's 液洗 3 次, 加入含 100 μ g/ml 不同粉尘的无血清 RPMI 1640 培养液, 每孔 1ml, 培养 24h。吸取上清液, 4 $^{\circ}$ C 2 000r/min 离心 10min, 弃沉淀, 用 0.22 μ m 滤膜的针头过滤器过滤除菌, 收集滤液储于 1.5ml eppendorf 管中, 置于 -35 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 人胚肺成纤维细胞 (HEPF) 株的传代培养

人胚肺成纤维细胞株 (WI-38), 引自中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库, 用含 10% 新生小牛血清 + 青链霉素双抗的 RPMI 1640 培养基进行传代培养。

1.4 主要试剂与仪器

TPK 抑制剂 (genistein, GIBCOBRL 产品), PKC 抑制剂 (bisindolylmaleimide, C₂₅H₂₄N₄O₂, BOEHRING-ERMANNHEIM 产品), 5g/L 的皂角素, 小鼠抗人的 PCNA 抗体、P34cdc2 (CDK₁) 激酶抗体、Cyclin B₁ 抗体、Cyclin A 抗体 (NeoMarkers 产品) 和 Cyclin D₁ 抗体 (ZYMED Laboratories, INC), 兔抗人的 Cyclin E 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, INC), FITC 羊抗小鼠 IgG 单抗和 FITC 羊抗兔 IgG 单抗 (Jackson ImmunoResearch Laboratories INC)。流式细胞仪 (Flow Cytometry, FCM) 为美国 Coulter 公司产品, 用 Elite 软件分析。

1.5 分组设计

实验组: 用 UICC 青石棉尘处理 AM 的培养上清液处理 HEPF; 标准石英组: 用标准石英尘处理 AM 的培养上清液处理 HEPF; 二氧化钛组: 用标准二氧化钛尘处理 AM 的培养上清液处理 HEPF; AM 组: 用不被粉尘处理的 AM 的培养上清液处理 HEPF; 空白

对照组: 用不含血清的 RPMI 1640 培养液处理 HEPF。

1.6 制备流式细胞仪测定用的标本

1.6.1 细胞的处理: 取生长状况良好、接近汇合的人胚肺成纤维细胞, 2.5g/L 的胰蛋白酶消化, 用 RPMI 1640 (体积分数 10% 新生小牛血清和青链霉素双抗) 培养液调成细胞密度为 5 \times 10⁶ 个/ml。取洁净 100ml 培养瓶数个, 每瓶加入细胞悬液 100 μ l (5 \times 10⁵ 个细胞), 加入含 10% 新生小牛血清 RPMI 1640 培养液 4ml, 于 37 $^{\circ}$ C 体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养 24h。弃除培养液, 用 D-Hank's 洗 3 次, 加入无血清 RPMI 1640 培养液 4ml, 继续培养 4h, 使细胞稳定。去除培养液, 用 D-Hank's 液洗 3 次, 弃尽余液。分三种处理方式, 每种处理方式有 5 瓶 (第一种处理方式: 每瓶加入 100 μ g/ml 不同粉尘处理巨噬细胞的培养上清液 2ml + 含青链霉素双抗的无血清 RPMI 1640 培养液 2ml; 第二种处理方式: 在第一种处理方式的基础上加入 TPK 抑制剂 Genistein, 使终浓度为 25 μ g/ml; 第三种处理方式: 在第一种处理方式的基础上加入 PKC 抑制剂, 使终浓度为 0.96 μ mol/L), 置 37 $^{\circ}$ C 体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中继续培养 48h。

1.6.2 消化与洗涤: 收集培养液, 加入无钙镁 PBS 洗 3 次, 并收集洗液, 加入 2.5g/L 的 trypsin 2ml 消化 30 秒钟, 弃尽消化液, 加入体积分数 1% 新生小牛血清的无钙镁 PBS 混匀, 收集全部细胞于离心管中, 1 500r/min 离心 10min, 弃上清液, 加入 1ml 无钙镁 PBS 混匀, 1 500r/min 离心 5min, 弃上清液。

1.6.3 固定: 在上述离心管中每管加 0.5ml 无钙镁 PBS 混匀, 加入同体积的 1% 多聚甲醛混匀, 4 $^{\circ}$ C 固定 1h 以上。

1.6.4 免疫组化染色: 1 500r/min 离心 5min, 弃固定液, 用含 2.5g/L 皂角素的无钙镁 PBS 洗 1 次, 加入 50 μ l 一抗 (一抗分别用 5g/L 皂角素按 1:50 稀释) 混匀, 4 $^{\circ}$ C 置 1h, 离心, 弃上清液, 用含 2.5g/L 皂角素的无钙镁 PBS 洗 1 次。加入 50 μ l 相应的带荧光素 FITC 标记的二抗 (二抗分别用 5g/L 皂角素按 1:50 稀释) 混匀, 4 $^{\circ}$ C 置 1h, 离心, 用无钙镁 PBS 洗 1 次。加入 0.5ml 无钙镁 PBS 混悬, 经细网筛过滤, 用作 FCM 测定。同时以不加一抗而其他步骤完全相同作为调零管。

1.7 流式细胞仪测定

将准备好的样品置流式细胞仪上分析, 每个样品被测定的细胞总数约为 10 000 个, 结果用特异染色阳性细胞数占总测定细胞的百分数作为细胞周期调控蛋

白的阳性表达率。

1.8 统计分析

用行×列 χ^2 检验进行各组间细胞周期调控蛋白阳性表达率的比较和同一组中各细胞周期调控蛋白阳性表达率的比较。

2 结果

2.1 细胞周期调控蛋白在青石棉所致人胚肺成纤维

表 1 细胞周期调控蛋白在青石棉所致 HEPF 增殖中的阳性表达率 (%)

细胞周期调控蛋白	空白对照	AM 组	二氧化钛	标准石英	青石棉	χ^2_1
P34cdc2 激酶	80.8	80.3	77.9	85.3	81.6	1.89
Cyclin B ₁	95.9	95.8	97.9	96.5	98.8	2.37
PCNA	88.7	87.0	89.7	78.7	72.2	16.37**
Cyclin A	92.1	87.5	89.9	90.0	61.5	49.21**
Cyclin D ₁	63.8	32.3	19.6	47.2	8.4	85.19**
Cyclin E	74.2	64.4	33.9	51.4	19.0	80.26**
χ^2_2	50.86**	142.06**	250.98**	113.50**	261.38**	

χ^2_1 : 每种细胞周期调控蛋白在组间比较; χ^2_2 : 每组中各细胞周期调控蛋白的比较; **: $P < 0.01$ 。

2.2 TPK 抑制剂和 PKC 抑制剂对 P34cdc2 激酶在青石棉所致 HEPF 增殖中表达的影响

细胞增殖中的表达

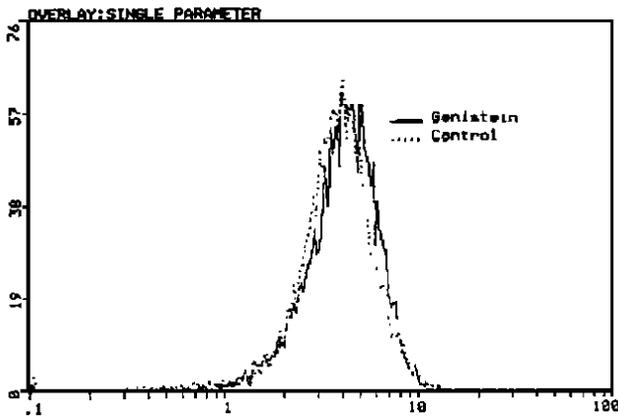
结果见表 1, 在青石棉组 PCNA、Cyclin A、Cyclin D₁ 和 Cyclin E 的阳性表达率较空白对照明显减少 ($P < 0.01$), 其中 Cyclin D₁ 和 Cyclin E 的阳性表达率较 PCNA 和 Cyclin A 低 ($P < 0.01$); 而 P34cdc2 激酶和 Cyclin B₁ 的阳性率较空白对照组稍增加。

由表 2 和图 1 可见, TPK 抑制剂 Genistein 可致青石棉所致人胚肺成纤维细胞增殖时的 P34cdc2 激酶阳性表达率较无 TPK 抑制剂组减少 ($P < 0.01$)。PKC 抑制剂对其影响不明显 ($P > 0.05$)。

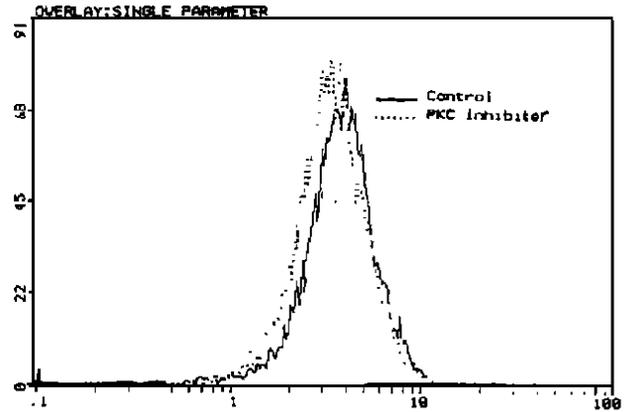
表 2 TPK 抑制剂和 PKC 抑制剂对 P34cdc2 激酶在青石棉所致 HEPF 增殖中表达率的影响 (%)

蛋白激酶抑制剂	空白对照	AM 组	二氧化钛	标准石英	青石棉
对照 [#]	92.7	95.0	96.4	95.5	95.8
TPK 抑制剂	76.1	67.9	83.0	78.7	90.5
PKC 抑制剂	91.4	91.4	96.5	91.5	94.2
χ^2_1	104.64**	243.04**	97.17**	125.60**	22.01**
χ^2_2	1.16	10.23	0.02	13.16**	2.70

[#]: 没有加蛋白激酶抑制剂; **: $P < 0.01$; χ^2_1 : TPK 抑制剂与对照[#]间的比较; χ^2_2 : PKC 抑制剂与对照[#]间的比较。



A TPK 抑制剂



B PKC 抑制剂

图 1 蛋白激酶抑制剂对 P34cdc2 激酶在青石棉所致 HEPF 增殖中表达率的影响

2.3 TPK 抑制剂和 PKC 抑制剂对 PCNA 在青石棉所致 HEPF 增殖中表达的影响

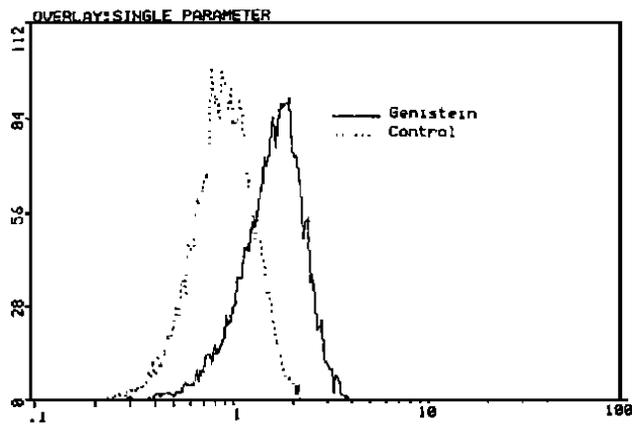
由表 3 和图 2 可见, 与不加入蛋白激酶抑制剂组比, TPK 抑制剂不仅没有抑制 PCNA 在青石棉组的表

达, 反而还使其表达的阳性率增高 ($P < 0.01$); 而 PKC 抑制剂明显地抑制 PCNA 在青石棉组的表达 ($P < 0.01$)。

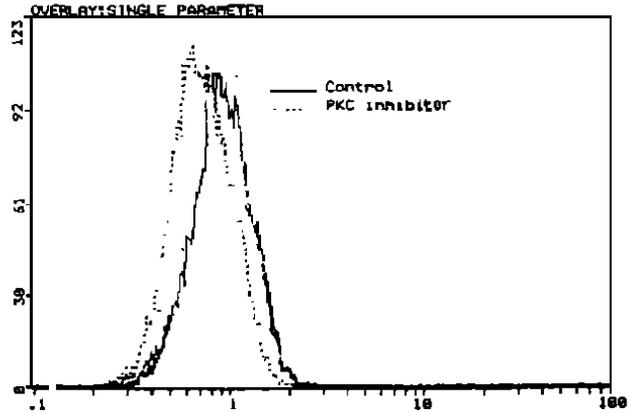
表 3 TPK 抑制剂和 PKC 抑制剂对 PCNA 在青石棉所致 HEPF 增殖中表达率的影响 (%)

蛋白激酶抑制剂	空白对照	AM 组	二氧化钛	标准石英	青石棉
对照 [#]	58.5	35.1	15.0	36.1	25.3
TPK 抑制剂	50.0	71.2	71.9	68.4	72.0
PKC 抑制剂	33.5	13.6	27.1	44.2	18.2
χ^2_1	14.56**	286.64**	697.69**	209.08**	436.50**
χ^2_2	125.81**	99.12**	44.05**	13.65**	14.81**

#: 没有加蛋白激酶抑制剂; *: $P < 0.01$; χ^2_1 : TPK 抑制剂与对照[#]间的比较; χ^2_2 : PKC 抑制剂与对照[#]间的比较。



A TPK 抑制剂



B PKC 抑制剂

图 2 蛋白激酶抑制剂对 PCNA 在青石棉所致 HEPF 增殖中表达率的影响

2.4 TPK 抑制剂和 PKC 抑制剂对 PCNA 和 P34cdc2 激酶在青石棉所致 HEPF 增殖中表达影响的比较

上述结果可见, 当阻断 TPK 信号通路后, 青石棉所致人胚肺成纤维细胞增殖中 PCNA 表达的阳性率较不加蛋白激酶抑制剂组增高 ($P < 0.01$), 而 P34cdc2 激酶表达的阳性率降低 ($P < 0.01$)。当 PKC 信号通路被阻断后, PCNA 在青石棉组表达的阳性率明显比不加蛋白激酶抑制剂组低 ($P < 0.01$), P34cdc2 激酶的阳性表达率的改变不明显 ($P > 0.05$)。

3 讨论

哺乳动物体细胞的细胞周期各时相的 cdc 蛋白 (细胞分裂周期基因, cell-division cycle genes, cdc) 和细胞周期蛋白 (Cyclin) 均不同; Cyclin 至少有 5 种 (A→E), 其中 Cyclin D 又分为 Cyclin D₁、D₂、D₃。当细胞生长因子等刺激时, 细胞周期自静止状态的 G₀→G₁, 此时 Cyclin D₁、D₂、D₃ 及 Cyclin E 的表达均增

加, 称为 G₁ Cyclin。各亚型的 Cyclin D 在不同的细胞中表达的比例不同, 它们可以相互代替, 只要有 1 种亚型的水平达到足够高即可。当细胞周期由 G₁→S 时, Cyclin D 及 E 降解, 而 Cyclin A 的合成增加, 即 Cyclin A 为 S 期时的特征性细胞周期蛋白。G₂ 期 Cyclin 主要是 Cyclin B, 其次为 Cyclin A。Cyclin 必须与相应的 CDK 蛋白 (cyclin-dependent kinases) 结合, 并经磷酸化/脱磷酸化后方具活性。当处于静止期 G₀ 的细胞受生长因子等刺激后, 首先出现 Cyclin D, 并同时诱导 CDK₂、CDK₄、CDK₅ 的表达, 分别结合成为 CDK₂-Cyclin D、CDK₄-Cyclin D 及 CDK₅-Cyclin D, 促使细胞通过细胞周期 G₁ 的限制点 (restriction point), 其中以 CDK₄-Cyclin D 的作用为主。与此同时有 Cyclin E 的合成积累, 并与 CDK₂ 结合成 CDK₂-Cyclin E, 使 DNA 复制的启动因子磷酸化而被激活, 促使 G₁→S 期。S 期时, 以 CDK₂-Cyclin A 的作用为主, G₂→M 期

时则为 cdc2, 以 cdc2-Cyclin B 及 cdc2-Cyclin A 为主, 当细胞进入 M 期时, Cyclin B 逐渐降解, cdc2 活性达最大^[4]。

本研究发现当青石棉诱导的肺泡巨噬细胞因子处理人胚肺成纤维细胞 48h 后, Cyclin D₁、Cyclin E、Cyclin A 和 PCNA 的阳性表达率明显低于空白对照组 ($P < 0.01$), Cyclin D₁ 和 Cyclin E 的阳性表达率较 Cyclin A 和 PCNA 低 ($P < 0.01$); 而 Cyclin B₁ 和 P34cdc2 激酶的阳性表达率较空白对照组略高。这一结果与我们先前用青石棉处理兔肺泡巨噬细胞的培养上清液致 HEPF 增殖的细胞周期时相的变化基本一致, 即 G₂/M 期的细胞百分比明显较对照增加, 而 Cyclin B₁、P34cdc2 激酶主要表达在 G₂/M 期, 故 Cyclin B₁、P34cdc2 激酶 (CDK1) 的阳性表达率较对照高; 由于细胞进入 G₂/M 期较多, 故 S 期相对减少, 而 Cyclin A 和 PCNA 主要表达于 S 期, 在 G₂ 期下降, 故 PCNA、Cyclin A 的阳性表达率较对照低; 青石棉组 G₁ 期细胞百分比较对照组低, Cyclin D、Cyclin E 的阳性表达率也较对照明显低下。可见 Cyclin D₁、Cyclin E、Cyclin A、PCNA 和 Cyclin B₁、P34cdc2 激酶在细胞周期各阶段的表达均受到青石棉处理肺泡巨噬细胞的培养上清液的影响, 它们可能均参与了青石棉所致人胚肺成纤维细胞增殖过程。已知道 P34cdc2 激酶在细胞促分裂过程中起着核心作用, 它的活性直接影响细胞周期的运转。PCNA 是一种参与 DNA 合成的蛋白质, 在 G₁/S 期出现, 在 S 期合成量最大; 双向电泳表明 PCNA 是 DNA 聚合酶的辅助蛋白, 有促进 DNA 延伸 DNA 链的作用; 其在细胞周期中的合成与降解与 Cyclin A 有类似的现象, 因此和 Cyclin A 一样在本次研究中在青石棉组的阳性表达率较对照低; 因 PCNA 在 S 期的合成最多, 所以在研

究细胞增殖动力学时, 用标记 PCNA 以显示进入 S 期细胞。由于细胞周期调控蛋白的生物活性还必须受到上游信号的调节, 此研究就 TPK 和 PKC 信号通路与 P34cdc2 激酶和 PCNA 表达的联系作了进一步探讨。

研究发现当 PKC 信号通路被 PKC 抑制剂阻断后, PCNA 在青石棉组表达的阳性率较未加 PKC 抑制剂组明显低下 ($P < 0.01$), 而对 P34cdc2 激酶影响不大, 这与我们先前发现的 PKC 抑制剂能使青石棉介导的 HEPF 细胞的 S 期细胞百分比下降相一致。而阻断 TPK 信号通路后, 青石棉所致人胚肺成纤维细胞增殖中 PCNA 表达的阳性率增高, 而 P34cdc2 激酶表达的阳性率降低, 推测是 TPK 抑制剂阻止了青石棉所致人胚肺成纤维细胞的分裂, 而 S 期 DNA 合成能正常进行, 使细胞被阻留于 G₂/M 期, G₁ 期细胞减少, 这和我们先前发现的阻断 TPK 后 G₂/M 期细胞百分比明显增加、G₁ 期减少相一致。可见, TPK 信号通路在青石棉所致人胚肺成纤维细胞增殖中可能通过影响 P34cdc2 激酶在 G₂/M 期的表达来实现, 而 PKC 信号通路在青石棉所致人胚肺成纤维细胞增殖中的作用可能是通过 PCNA 来调节 S 期 DNA 合成来实现的。提示 P34cdc2 激酶和 PCNA 在青石棉所致人胚肺成纤维细胞增殖中表达的改变与上游 TPK 和 PKC 信号通路有着密切的联系。

参考文献:

- [1] 田生礼, 冯彪云. 细胞周期素与细胞增殖的调控 [J]. 国外医学分子生物学分册, 1995, 17 (3): 109-112.
- [2] 陈诗书, 杨雪明. 细胞增殖的调节: 医学细胞与分子生物学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1995. 320-328.
- [3] 雷松, 魏于全. 流式细胞术的基本原理 [J]. 华西医学, 1996, 11 (4): 133-136.
- [4] 杜国光, 李平凤. 细胞周期及调节: 细胞信息与调控 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998. 318-325.

《中国综合临床》杂志 2001 年征订启事

《中国综合临床》(原名《综合临床医学》)杂志, 系中华人民共和国卫生部主管、主办的国家临床医学类核心期刊, 国内外公开发行。办刊宗旨: 面向全国, 突出实用, 及时传播医学各科进展, 帮助广大临床医师提高医疗水平, 解决临床中遇到的具体问题。辟有综述讲座、论著与经验、病例讨论、临床用药、误诊误治、短篇与个例等栏目。适合于广大临床医务人员阅读与参考。

《中国综合临床》标准刊号: ISSN 1008-6315, CN 13-1224/R。彩色封面, 大 16 开, 80 页。月刊, 每月 15 日出版。每期订价 6 元, 全年 72 元。全国各地邮局均可订阅。邮发代号: 18-55。亦可直接向《中国综合临床》杂志社直接订阅。

联系地址: 河北省唐山市建设南路 57 号《中国综合临床》杂志社。邮编 063000, 电话 (0315) 3725988、

3725710