

· 基础研究 ·

钙周期素结合蛋白的细胞周期依赖性转位现象

陈 阳, 白 薇, 刘崇霞, 杨 芳, 路国华, 王晓明, 李 源, 宁晓暄*

(第四军医大学西京医院老年病科, 西安 710032)

【摘要】目的 研究钙周期素结合蛋白(CacyBP/SIP)在胃癌细胞SGC7901中亚细胞定位与细胞周期的关系。**方法** 利用双胸腺嘧啶脱氧核苷(胸苷)阻滞法将胃癌细胞SGC7901进行细胞周期同步化, 流式细胞术检测细胞周期同步化效果。免疫荧光染色法观察CacyBP/SIP在不同时期的亚细胞定位。蛋白质印迹法检测CacyBP/SIP总蛋白及核蛋白在不同时期的表达水平。**结果** 采用双胸苷阻滞法使SGC7901细胞阻滞于G₁/S期, 撤药后培养4h, 细胞进入S期。大多数细胞在8~12h时进入G₂/M期, 16h又重新进入G₁期。免疫荧光染色发现, 在G₁和S期时, CacyBP/SIP主要分布在细胞浆中, 而在以G₂期为主的细胞中, CacyBP/SIP聚集在核周或进入胞核, 说明CacyBP/SIP存在细胞周期依赖性的核转位。在细胞的各时相中CacyBP/SIP总蛋白无明显变化, 但在G₂期时CacyBP/SIP的核蛋白表达水平增高。**结论** CacyBP/SIP存在细胞周期依赖的转位现象, 可能参与了G₂/M期的调控作用。

【关键词】 胃癌细胞; 钙周期素结合蛋白; 细胞周期; 细胞定位

【中图分类号】 R735.2

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2013.00076

Cell cycle dependent translocation of calcyclin binding protein

CHEN Yang, BAI Wei, LIU Chong-Xia, YANG Fang, LU Guo-Hua, WANG Xiao-Ming, LI Yuan, NING Xiao-Xuan*

(Department of Geriatrics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032 China)

【Abstract】 Objective To investigate the relationship of the subcellular localization of calcyclin binding protein (CacyBP/SIP) with cell cycle in gastric cancer cell line SGC7901. **Methods** Double thymidine block was used to synchronize the cell cycle in SGC7901 cells. Flow cytometry was employed to identify the cell cycle synchronization. The localization of CacyBP/SIP protein was observed at the different phase of cell cycle by immunofluorescence staining. The expression levels of total protein and nucleoprotein CacyBP/SIP were detected by Western blotting at different cell cycles. **Results** Double thymidine block arrested the SGC7901 cells at G₁/S phase, then the cells were at S phase in 4h after drug withdrawal. Most of cells got into G₂ phase in 8 to 12h after culture and re-entered G₁ phase in 16h. Immunofluorescence staining found that CacyBP/SIP was mainly distributed in the cytoplasm at G₁/S phase, but then gathered into the perinuclear or nuclear at G₂ phase, which indicates that CacyBP/SIP had the characteristics of nuclear translocation of cell cycle dependence. The total expression level of CacyBP/SIP protein had no obvious change at each phase, but the nuclear CacyBP/SIP protein at G₂ phase was highest than at any other phases. **Conclusion** CacyBP/SIP displays cell cycle dependent translocation, and may participate in regulating G₂/M phase.

【Key words】 gastric cells; calcyclin binding protein; cell cycle; cellular localization

This study was supported by the National Nature Science Foundation of China (No.81272203, No.30872964) and the Science and Technology Research and Development Plan of Shaanxi Province (2012K-13-01-08).

钙周期素结合蛋白(calcyclin-binding protein, CacyBP/SIP)最初是由Filipek等人在小鼠艾氏腹水细胞瘤中作为S100A6的靶蛋白而发现^[1], 而后通过序列分析发现其与siah-1结合, 称作SIP(siah-1 interacting protein), 二者具有93%同源性, 所以SIP

即为人CacyBP/SIP^[2]。CacyBP/SIP可与S100A6、Siah-1、Skp1、微管蛋白、细胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2)等分子结合, 并且参与了组织细胞分化和抑制肿瘤细胞生长、增殖的作用。研究发现在神经元细胞中CacyBP/SIP还存在细胞内钙浓度依赖的

收稿日期: 2012-12-04; 修回日期: 2013-02-18

基金项目: 国家自然科学基金(No.81272203, No.30872964); 陕西省科学技术研究发展计划项目(No.2012K-13-01-08)

通信作者: 宁晓暄, Tel: 029-84775239, E-mail: ningsun@fmmu.edu.cn

核转位现象。本研究将在胃癌细胞中观察CacyBP/SIP的亚细胞定位与细胞周期的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌细胞SGC-7901(为第四军医大学西京医院老年病科实验室长期保存)。

1.2 试剂和仪器

RPMI1640(美国赛默飞世尔公司);胎牛血清(美国Gibco公司);FITC标记抗鼠(北京中杉金桥公司);鼠抗CacyBP(美国Santa Cruz公司);Lamin-A多克隆抗体(美国ProteinTech公司);BCA蛋白定量试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司);同步化试剂胸腺嘧啶脱氧核苷(thymidine,简称胸苷,美国sigma公司);核蛋白提取试剂盒(碧云天公司)。流式细胞仪(美国赛默飞世尔公司);荧光显微镜(日本奥林巴斯公司);孵箱(美国赛默飞世尔公司)。

1.3 细胞同步化

取对数生长期的细胞用0.25%胰酶消化,以 2×10^8 细胞/L的密度铺于6孔板中,37℃,5%CO₂孵箱中培养;待细胞50%融合时,在完全培养基中加入同步化试剂胸苷,使其终浓度为2mmol/L,继续培养16h;弃去培养液,更换无药新鲜培养基,5%CO₂、37℃继续培养8h;再加入终浓度为2mmol/L的胸苷,继续培养16h;弃培养基,洗涤细胞2次,更换新鲜培养基进行释放,分别于0,4,8,12,16h用0.25%胰酶消化并获取细胞;PBS洗涤细胞2次;加入无水乙醇固定,上流式细胞仪进行细胞周期的检测。

1.4 免疫荧光染色

取对数生长期的细胞进行计数并调整密度至 $2 \sim 3 \times 10^7$ 细胞/L,接种于无菌盖玻片上,37℃、5%CO₂培养24~36h后进行细胞同步化,同时设只加入等药体积无血清培养基的无药对照组,在同步化后不同时间段,取出盖玻片,PBS冲洗3次,无水乙醇固定;PBS冲洗细胞爬片3次,5min/次,0.3%Trition-X-100通透细胞20min,PBS冲洗细胞爬片3次,5min/次,山羊血清室温封闭1h;在细胞爬片上加入抗CacyBP/SIP抗体,放入湿盒中4℃过夜,第2日室温复温1h,PBS冲洗细胞爬片3次,5min/次;加FITC标记的羊抗鼠二抗,湿盒中室温封闭1.5h;PBS冲洗3次,5min/次,DAPI染核3min;PBS冲洗3次,5min/次,防荧光淬灭剂封片,上机观察。

1.5 核蛋白提取

参考碧云天公司细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提

试剂盒说明书。

1.6 Western印记法

配置10%的下层胶和5%上层胶,根据不同蛋白浓度调整上样量,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。凝胶于电泳缓冲液中25mA,40min进行电泳,用半干转移系统将蛋白转移到NC膜上。用丽春红染液对NC膜染色,标记蛋白分子量标准各条带位置,按照目的蛋白大小剪膜。将剪好的NC膜放入用TBST配置的5%脱脂牛奶中室温封闭1h。一抗为鼠抗CacyBP/SIP抗体,1:200稀释于5%脱脂牛奶中,4℃孵育过夜。1倍TBST摇洗NC膜3次,5min/次。HRP标记的二抗1:1000稀释于5%脱脂牛奶中,室温孵育1h。1倍TBST摇洗NC膜3次,5min/次,最后ECL显色。

1.7 统计学处理

采用SPSS16.0软件进行LSD-t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞周期同步化

经过双胸苷阻滞法进行细胞周期同步化使其阻滞在G₁期,而后进行释放,在不同时间段提取细胞,并利用流式细胞仪进行检测。在释放0,4及16h,细胞主要处于G₁/S期,8,12h时则主要处于G₂期(图1)。

2.2 免疫荧光染色

经过双胸苷阻滞法对胃癌细胞SGC7901进行处理,使其阻滞在G₁期,而后释放,分别在释放0,4,8,12,16h时,利用免疫荧光染色后,荧光显微镜观察CacyBP/SIP分子的亚细胞定位。结果显示,实验组CacyBP/SIP在细胞周期同步化0,4,16h时(以G₁/S期细胞为主)主要分布在胞浆中(图2A、B和E),而在8h定位于核周,12h时则进入核内(图2C和D,以G₂期细胞为主),提示CacyBP/SIP存在细胞周期依赖的定位变化。而对照组在相同时间段并无入核转位现象(图2C'和D')。

2.3 Western印记法

将胃癌细胞SGC7901利用胸苷进行同步化后,分别在0,4,8,12,16h提取总蛋白与核蛋白,Western印记法检测CacyBP/SIP的表达水平,在细胞周期的不同时期,CacyBP/SIP的总蛋白并无明显变化($P > 0.05$;图3)。核蛋白表达水平在8,12h有所增高,与0,4,16h相比差异有统计学意义($P < 0.05$;图4)。Western印记法结果进一步证实,CacyBP/SIP在胃癌细胞的G₂期时发生了核转位。

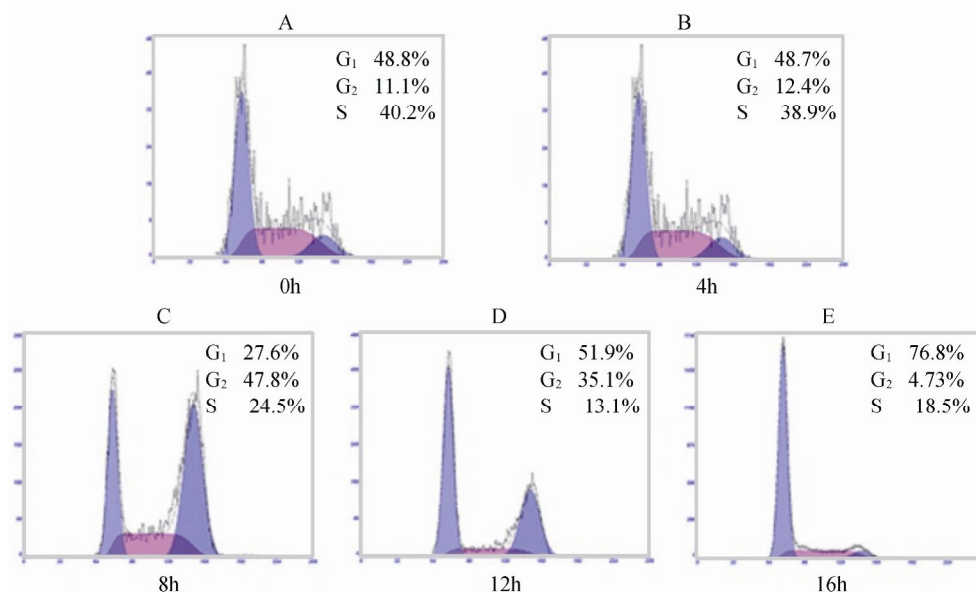


图1 细胞周期同步化效果
Figure 1 Effect of cell cycle synchronization

3 讨论

Filipek等在1996年从小鼠艾氏腹水细胞瘤中发现一个新分子,并命名为CacyBP/SIP,其分子量大小约30ku,编码229个氨基酸。CacyBP/SIP在脾脏及脑中高表达,肝、胃及心脏中呈中等程度表达,淋巴结、结肠及肾脏中则呈低水平表达^[1,3]。CacyBP/SIP不但可以配体形式与S100A6结合,而且还与S100家族中其他一些蛋白结合,例如S100A1、S100A2、S100B、S100P^[4]。

在对小鼠神经细胞瘤NB2a及人神经细胞瘤SH-SY5Y研究中发现,当细胞内钙离子浓度升高时,CacyBP/SIP分子可以从胞浆向胞核及核周转位。进一步研究证实,CacyBP/SIP的这种钙依赖核转位现象是由于丝氨酸磷酸化所致^[5]。目前已知,CacyBP/SIP与细胞的分化、增殖等有着密切的联系。研究发现,CacyBP/SIP与ERK1/2结合可以使得Elk-1的转录活性降低,影响细胞的分化,并且可与微管蛋白结合并参与细胞的骨架重构^[6]。在神经元衰老过程中,CacyBP/SIP还发生了定位变化,这可能与自身磷酸化或与磷酸化微管蛋白的结合有一定关系^[7]。p27蛋白不仅参与细胞周期的调节,还影响细胞迁移,而Nagano等^[8]发现CacyBP/SIP可以通过降解成纤维细胞中p27蛋白,从而降低细胞的迁移能力。另有研究表明,抑制子宫基质细胞中CacyBP/SIP的表达可以抑制细胞凋亡,从而使得细胞生长能力明显提高^[9]。而CacyBP/SIP基因缺失的淋巴细胞会出现pre-TCR检测点受损,不能进行TCR β 基因重排,

而且凋亡增加,进而导致胸腺细胞数减少^[10]。

CacyBP/SIP与Siah-1、Skp1、Ebi结合形成泛素连接酶复合物,参与了非磷酸化 β -catenin的降解。 β -catenin是Wnt信号通路的关键分子,在肿瘤的发生、侵袭和转移中有重要作用^[11]。因此,我们首先研究了CacyBP/SIP在胃癌细胞发生中的作用,结果发现,CacyBP/SIP上调可以抑制胃癌细胞的生长和成瘤性,降低胃癌细胞的侵袭力,可诱发胃癌细胞凋亡^[12]。我们的进一步研究显示,S100A6与CacyBP/SIP结合可以负向调控CacyBP/SIP对 β -catenin的降解作用^[13]。此外,我们还发现CacyBP/SIP在肾癌细胞及肾癌组织中的表达显著低于正常的肾小管上皮细胞和癌旁组织。上调肾癌细胞中CacyBP/SIP可以通过促进 β -catenin的降解进而影响cyclin D1的转录,导致肾癌细胞发生G₁期阻滞^[14]。

由于泛素化降解途径在细胞周期的调控中发挥重要作用,所以我们推测CacyBP/SIP可能从不同途径参与细胞周期的调控。为此我们首先研究了CacyBP/SIP在细胞周期中的定位。我们用双thymidine阻滞法使胃癌细胞SGC7901有效阻滞于G₁/S期,并在8和12h主要进入G₂/M期。免疫荧光显示,CacyBP/SIP在G₁/S期主要定位于胞浆,G₂期发生转位并定位于核周及核内。而对照组在相同时间段并无CacyBP/SIP的核转位现象,这说明观察的结果与双thymidine阻滞法的处理有关。通过对细胞核蛋白的检测进一步证实CacyBP/SIP在G₂期进入胞核,表明CacyBP/SIP存在细胞周期依赖的转位现象。另外,在各细胞周期中CacyBP/SIP总蛋白表达无明

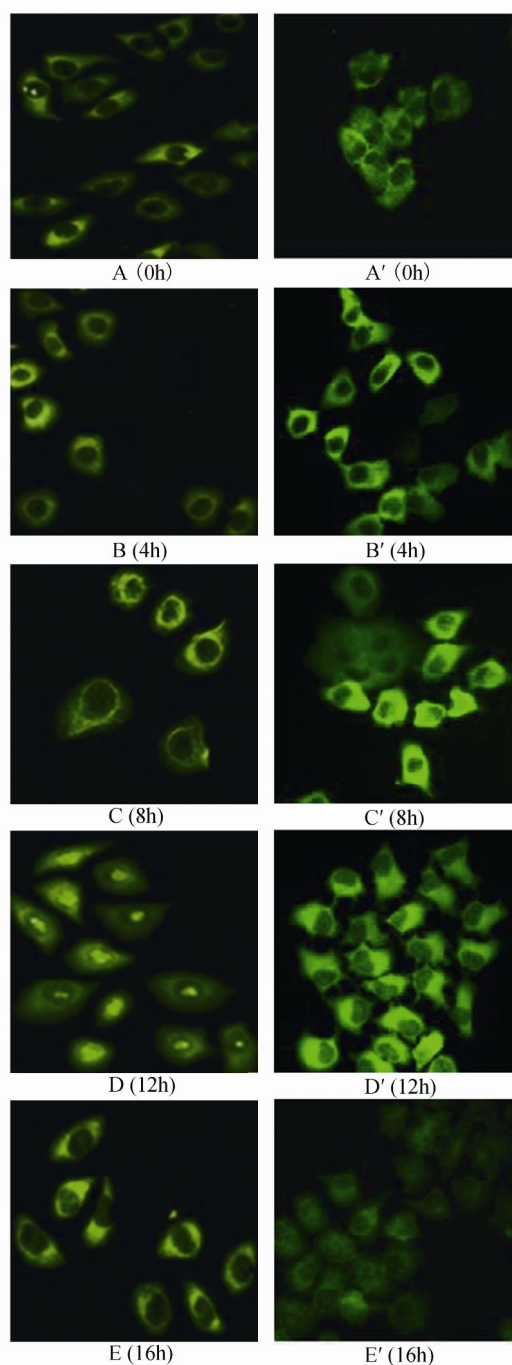


图2 细胞周期对CacyBP/SIP细胞内定位的影响

Figure 2 Influence of cell cycle on intra-cellular location of CacyBP/SIP ($\times 40$)

A, B, C, D, E: 经双胸苷阻滞法处理后0, 4, 8, 12, 16h; A', B', C', D', E': 未经药物处理的对照组0, 4, 8, 12, 16h

显变化,提示CacyBP/SIP并未有细胞周期相关的表达改变,只是定位变化。目前CacyBP/SIP在细胞周期的定位及其作用还未见文献报道,其调控机制还不清楚,我们推测CacyBP/SIP可能通过以下机制调控细胞周期 G_2/M 期:(1)泛素连接酶活性的变化:CacyBP/SIP向核周及胞核转位后,发生磷酸化,同时泛素连接酶的活性增强,从而降解细胞周期相关分子;(2)通过定位变化使特定部位的蛋白降解:CacyBP/SIP向核周及胞核转位后,可能引起核周和胞核中一些蛋白的降解;

(3)定位变化可能使其结合的某些蛋白进入特定部位发挥作用:CacyBP/SIP可以与微管蛋白发生结合,将其携带至细胞核,使微管蛋白在胞核聚合成微管而发生作用。上述的推测还需进一步证实。另外CacyBP/SIP是否受到细胞周期相关激酶的调控而发生转位也需要深入研究。CacyBP/SIP是细胞周期调控分子,可能通过蛋白降解或其他途径影响细胞分裂周期,特别是 G_2/M 期,从而参与细胞周期的调控,进而影响胃癌细胞的增殖。

综上所述,CacyBP/SIP可能是一种细胞周期调控分子,可能通过多种途径影响细胞周期进程,进而参与了细胞的多种病理生理活动,但其更多的生物学功能仍需要更进一步研究。

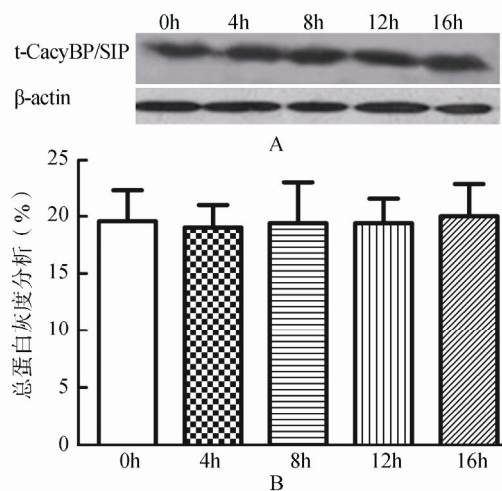


图3 细胞周期对CacyBP/SIP总蛋白表达的影响

Figure 3 Influence of cell cycle on expression of total CacyBP/SIP protein

A: Western印记法检测CacyBP/SIP不同时期总蛋白表达; B: 总蛋白灰度分析

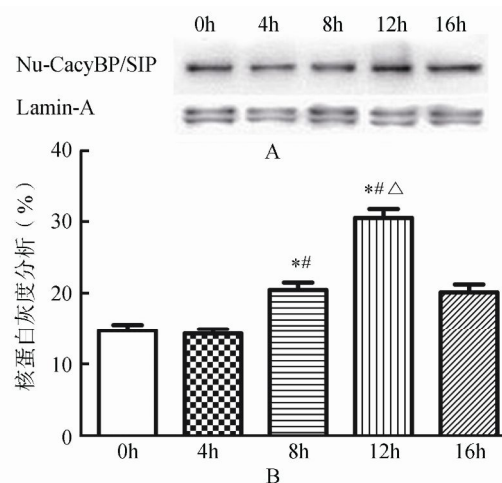


图4 细胞周期对CacyBP/SIP核蛋白表达的影响

Figure 4 Influence of cell cycle on expression of nuclear CacyBP/SIP protein

A: Western印记法检测CacyBP/SIP不同时期核蛋白表达; B: 核蛋白灰度分析。与0h比较, * $P < 0.05$; 与4h比较, # $P < 0.05$; 与16h比较, △ $P < 0.05$

【参考文献】

- [1] Filipek A, Wojda U. p30, a novel protein target of mouse calcyclin (S100A6)[J]. *Biochem J*, 1996, 320(2): 585-587.
- [2] Matsuzawa SI, Reed JC. Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses[J]. *Mol Cell*, 2001, 7(5): 915-926.
- [3] Filipek A, Kuznicki J. Molecular cloning and expression of a mouse brain cDNA encoding a novel protein target of calcyclin[J]. *J Neuro-chem*, 1998, 70(5): 1793-1798.
- [4] Filipek A, Jastrzebska B, Nowotny M, *et al.* CacyBP/SIP, a calcyclin and Siah-1-interacting protein, binds EF-hand proteins of the S100 family[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(32): 28848-28852.
- [5] Filipek A, Jastrzebska B, Nowotny M, *et al.* Ca²⁺-dependent translocation of the calcyclin-binding protein in neurons and neuroblastoma NB-2a cells[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(23): 21103-21109.
- [6] Schneider G, Nieznanski K, kilanczyk E, *et al.* CacyBP/SIP interacts with tubulin in neuroblastoma NB2a cells and induces formation of globular tubulin assemblies[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773(11): 1628-1636.
- [7] Filipek A, Schneider G, Mietelska A, *et al.* Age-dependent changes in neuronal distribution of CacyBP/SIP : comparison to tubulin and the tau protein[J]. *J Neural Transm*, 2008, 115(9): 1257-1264.
- [8] Nagano Y, Fukushima T, Okemoto, K, *et al.* Siah1/SIP regulates p27kip1 stability and cell migration under metabolic stress[J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(15): 2592-2602.
- [9] Yang YJ, Liu WM, Zhou JX, *et al.* Expression and hormonal regulation of calcyclin-binding protein (CacyBP/SIP) in the mouse uterus during early pregnancy[J]. *Life Sci*, 2006, 78(7): 753-760.
- [10] Fukushima T, Zapata JM, Singha NC, *et al.* Critical function for SIP, a ubiquitin E3 ligase component of the beta-catenin degradation pathway, for thymocyte development and G₁ checkpoint[J]. *Immunity*, 2006, 24(1): 29-39.
- [11] Lowy AM, Clements WM, Bishop J, *et al.* Beta-catenin/Wnt signaling regulates expression of the membrane type 3 matrix metalloproteinase in gastric cancer[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(9): 4734-4741.
- [12] Ning X, Sun S, Hong L, *et al.* Calcyclin-binding protein inhibits proliferation, tumorigenicity, and invasion of gastric cancer[J]. *Mol Cancer Res*, 2007, 5(12): 1254-1262.
- [13] Ning XX, Sun SR, Zhang K, *et al.* S100A6 protein negatively regulates CacyBP/SIP-mediated inhibition of gastric cancer cell proliferation and tumorigenesis[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(1): e30185.
- [14] Sun S, Ning X, Liu J, *et al.* Overexpressed CacyBP/SIP leads to the suppression of growth in renal cell carcinoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 356(4): 864-871.

(编辑: 胡晓晖)

· 消 息 ·

重要通知

本刊坚持用稿付酬、及时付酬规定。但本刊时常会收到“逾期退汇”的稿费单,此为作者收到稿费通知单后延误取款导致。即便如此,本刊坚持为作者重新邮寄。但由于“逾期退汇”的稿费再次发放程序繁琐,希望作者在收到稿费通知单后,尽快领取。如有不便,可及时与编辑部联系。谢谢!

《中华老年多器官疾病杂志》编辑部
2013-04-28