

# 抑癌基因 p27<sup>Kip1</sup> 及其 Ser<sup>10</sup> 突变体对 HepG<sub>2</sub> 细胞周期和增生的影响

管晓翔, 陈龙邦, 张爱华, 王靖华, 德 伟

管晓翔, 陈龙邦, 王靖华, 南京军区南京总医院肿瘤科  
江苏省南京市 210002

张爱华, 南京医科大学儿童肾脏病研究中心 江苏省南京市 210002  
德伟, 南京医科大学分子与生物化学中心 江苏省南京市 210002

管晓翔, 男, 1972-09-18 生, 江苏省南通市人, 汉族, 2001 年南京医科大学  
博士. 现为南京军区南京总医院博士后, 主治医师, 主要从事肝脏肿瘤发病机制  
的基础研究.

中国博士后科学基金资助项目, No. 2003034383

项目负责人: 管晓翔, 210002, 江苏省南京市中山东路 305 号, 南京军区南京  
总医院肿瘤科. xxquan@hotmail.com

电话: 025-86062033

收稿日期: 2004-03-19 接受日期: 2004-04-29

## Role of phosphorylation of ser<sup>10</sup> of p27<sup>Kip1</sup> in its subcellular localization in HepG<sub>2</sub> cell lines

Xiao-Xiang Guan, Long-Bang Chen, Ai-Hua Zhang,  
Jian-Hua Wang, Wei De

Xiao-Xiang Guan, Long-Bang Chen, Jian-Hua Wang, Department of  
Oncology, General Hospital of Nanjing Military Command Area, Nanjing  
210002, Jiangsu Province, China

Ai-Hua Zhang, Institute of Pediatrics, Nanjing Medical University,  
Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Wei De, Department of Molecular Biochemistry, Nanjing Medical  
University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Xiao-Xiang Guan, Department of Oncology, Gen-  
eral Hospital of Nanjing Military Command Area, Nanjing 210002,  
Jiangsu Province, China. xxquan@hotmail.com

Received: 2004-03-19 Accepted: 2004-04-29

## Abstract

AIM: To investigate the influence of over-expression of exogenous p27<sup>Kip1</sup> gene on cell cycle and proliferation in HepG<sub>2</sub> cell line, and to elucidate the role of phosphorylation of ser<sup>10</sup> of p27<sup>Kip1</sup> protein in its subcellular localization.

METHODS: Both plasmids containing the wild type and S10A p27<sup>Kip1</sup> were transfected into HepG<sub>2</sub> cell lines with Lipofectamine separately. The exogenous p27<sup>Kip1</sup> protein expression and subcellular localization was monitored with immunofluorescence under laser confocal microscope. Its biological effects on cell cycle and proliferation were determined by FACS and growth curves.

RESULTS: Over-expression of p27<sup>Kip1</sup> protein was observed in transfected cells. As a result, the proliferation of HepG<sub>2</sub> cells was greatly inhibited and cell cycle was arrested in G<sub>1</sub> phase after exogenous p27<sup>Kip1</sup> expression. Both the wild type and S10A p27<sup>Kip1</sup> protein were distributed in the nucleus when synchronized at G<sub>0</sub> phase by serum deprivation for 96 hours. The wild type p27<sup>Kip1</sup> protein was translocated from nucleus to cytoplasm when the cell was restimulated by exposure to 20% serum for 8 h, whereas the S10A

p27<sup>Kip1</sup> still presented in the nucleus.

CONCLUSION: The overexpression of p27<sup>Kip1</sup> can inhibit the proliferation of HepG<sub>2</sub>, and phosphorylation of p27<sup>Kip1</sup> on serine<sup>10</sup> is required for its nuclear export.

Guan XX, Chen LB, Zhang AH, Wang JH, De W. Role of phosphorylation of ser<sup>10</sup> of p27<sup>Kip1</sup> in its subcellular localization in HepG<sub>2</sub> cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(9):2041-2044

## 摘要

目的: p27<sup>Kip1</sup> 氨基端第10号位置的丝氨酸(Ser<sup>10</sup>)磷酸化位点是该蛋白分子中最重要的磷酸化位点, 探讨人工诱变该位点丝氨酸为丙氨酸(S10A)后对肝癌细胞株HepG<sub>2</sub>细胞周期以及细胞增生的影响. 同时比较野生型p27<sup>Kip1</sup>和Ser<sup>10</sup>突变型p27<sup>Kip1</sup>基因转染对肝癌细胞株HepG<sub>2</sub>细胞周期和增生的影响.

方法: 应用脂质体转染法将含人野生型和突变型p27<sup>Kip1</sup>质粒DNA瞬时转染HepG<sub>2</sub>细胞, 免疫细胞化学检测p27<sup>Kip1</sup>蛋白的表达和细胞内分布, 流式细胞计数仪分析细胞周期变化.

结果: 野生型和突变p27<sup>Kip1</sup>蛋白转基因后HepG<sub>2</sub>细胞均可以G<sub>0</sub>期阻滞, 且突变型的阻滞作用强于野生型(P<0.05), 细胞生长受到抑制. 无血清培养96 h同步化于G<sub>0</sub>期, 野生型和突变型p27<sup>Kip1</sup>均分布于细胞核; 而在20 mL/L血清继续培养8 h后野生型向细胞质转运而主要分布于细胞质, 突变型仍然滞留于细胞核.

结论: p27<sup>Kip1</sup>的过度表达可明显抑制HepG<sub>2</sub>细胞的增生, p27<sup>Kip1</sup>Ser<sup>10</sup>磷酸化可能介导其细胞核外转运的重要分子机制.

管晓翔, 陈龙邦, 张爱华, 王靖华, 德伟. 抑癌基因p27<sup>Kip1</sup>及其Ser<sup>10</sup>突变体对HepG<sub>2</sub>细胞周期和增生的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12(9):2041-2044  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2041.asp>

## 0 引言

肝细胞癌是人类常见的一种恶性肿瘤, 其发病机制则是目前人们研究的重点. 肝细胞癌的生物特征就是多种原癌基因的激活、抑癌基因的失活及一系列复杂的调控机制失常所导致的失控性生长<sup>[1-8]</sup>. 失控性生长的主要分子机制是细胞周期紊乱导致细胞增生过多和凋亡过少, 而p27<sup>Kip1</sup>作是一种重要的细胞周期素依赖性激酶的抑制因子, 是最有效的G<sub>1</sub>阻断剂<sup>[9]</sup>. p27<sup>Kip1</sup>的蛋

白表达水平及活性的改变与肿瘤的形成有关,在肝细胞肝癌等多种肿瘤组织中表达降低<sup>[10]</sup>。因此,调节p27<sup>kip1</sup>蛋白可能成为肿瘤生物治疗一个值得探讨的新靶点。我们探讨p27<sup>kip1</sup>及其突变体S10A过度表达对肝癌细胞周期的改变及其凋亡的影响,并进一步分析其分子机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 野生型和S10A突变型人p27<sup>kip1</sup>全长序列的cDNA由日本Kyushu大学Keiichi Nakayama教授馈赠,该载体在p27<sup>kip1</sup>基因上游包含了FLAG蛋白,从而形成p27<sup>kip1</sup>/FLAG融合蛋白。鼠源性的抗FLAG蛋白的抗体(M2)购自美国Sigma公司, FITC标记的羊抗鼠IgG购自美国Santa Cruz公司。质粒纯化试剂盒购自美国罗氏公司, Lipofectamine (LF2000)购自美国Gibco公司。将日本Kyushu(九州大学)分子和细胞生物学中心Keiichi Nakayama教授国外馈赠的含有p27<sup>kip1</sup>全长序列的cDNA转化到DH5a大肠杆菌感受态菌中,氨苄青霉素筛选后,挑取单个克隆在含100 mg/L的Amp的LB培养基内37℃, 200 r/min过夜培养,质粒抽提试剂盒抽提后用7 g/L的琼脂糖凝胶电泳2 h鉴定M<sub>r</sub>。基因测序证明开放性阅读框架及氨基酸序列正确无误。

**1.2 方法** HepG<sub>2</sub>细胞培养用含100 mL/L小牛血清DMEM培养37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>标准条件下培养。转化前24 h,以1.25 g/L胰酶消化细胞,2 × 10<sup>5</sup>每孔浓度接种6孔板。转化采用脂质体(Lipofectamine 2000)法,将5 μg质粒DNA和脂质体10 μL分别加入无FCS的DMEM培养剂100 μL中,再将以上两种液体轻轻混匀,室温静置20 min,摇匀后,滴加至6孔板的每1孔,标准条件下培养4-6 h后更换新鲜完全培养液继续培养。细胞分两组,一组在培养48 h后,用流式细胞仪分析细胞周期。另外一组在转染24 h后以1 mL/L血清培养基培养96 h使其同步化G<sub>0</sub>期,然后再以含200 mL/L小牛血清培养基培养8 h,使细胞进入S期,激光共聚焦显微镜观察以上两期p27<sup>kip1</sup>分布改变。细胞基因转染后在标准条件下培养48 h,用1 g/L胰蛋白酶消化后收集细胞,将细胞用PBS制成2 × 10<sup>8</sup>/L的单细胞悬液,7 001 mL/L乙醇固定16 h,加少量RNA酶和10 g/L碘化丙啶孵育30 min,应用流式细胞仪FACS(美国Becton-

Dickinson公司)进行细胞周期分析。转化细胞以3 × 10<sup>5</sup>/孔的密度种于6孔板,按实验设计的要求处理细胞后,丙酮固定,加入1:300稀释的抗FLAG mAb, 37℃结合1 h, 0.1 mol/L的PBS洗3次,每次10 min,再与FITC标记的羊抗鼠IgG(1:1 000) 37℃孵育30 min,再以0.1 M的PBS洗三次后封片。激光共聚焦显微镜下观察选择488 nm观察p27<sup>kip1</sup>蛋白的分布。1 × 10<sup>5</sup>沉淀细胞中用1 μl/ml的Hoechst33258染色, 37℃染色10 min,荧光显微镜下观察,蓝色荧光均匀者为正常细胞,而核染色质浓集或成团者为凋亡细胞<sup>[11]</sup>。以细胞动态计数来分析细胞增生状况,每组设3复孔,分别在基因转染后24, 48及72 h收集细胞计数并描绘生长曲线。每组试验结果采用SPSS10.0统计软件分析。所得数据以mean±SD表示, P<0.05为差异有显著性。

## 2 结果

**2.1 p27<sup>kip1</sup>基因转化对HepG<sub>2</sub>细胞周期的影响** 流式细胞仪分析显示,野生型和S10A突变型人p27<sup>kip1</sup>基因转染的HepG<sub>2</sub> 48 h后,44.3%的未转化细胞处于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期,而野生型和S10A突变型转染细胞处于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期分别为59.7%和62.1%。表明野生型和S10A突变型外源性p27<sup>kip1</sup>蛋白在HepG<sub>2</sub>细胞高表达可抑制细胞由G<sub>1</sub>期向S期过度。组间差异非常显著(P<0.01),而两转化组间差异亦显著(P<0.05)。此外两组转染p27<sup>kip1</sup>基因后的HepG<sub>2</sub>出现凋亡峰(图1)。Hoechst33258染色荧光显微镜下可见部分凋亡细胞核染色质浓集或成团者分布(图2)。提示过度表达p27<sup>kip1</sup>蛋白可能促进HepG<sub>2</sub>细胞凋亡。

**2.2 转化细胞中p27<sup>kip1</sup>的表达及分布** 应用激光共聚焦显微镜观察发现转染细胞内有,无血清培养基孵育96 h细胞阻滞G<sub>0</sub>期,野生型和突变型p27<sup>kip1</sup>蛋白均主要分布细胞核(图3),而在200 mL/L血清刺激后野生型p27<sup>kip1</sup>分布细胞质,S10A突变型p27<sup>kip1</sup>仍然分布于细胞核(图4)。

**2.3 实验组细胞生物学性状的变化** 对照组细胞增生旺盛,镜下可见较多核分裂相,倍增快;而实验组细胞的增生停滞,镜下看不出分裂的迹象,细胞形态变大,核浆比减小。随着培养时间的延长,p27<sup>kip1</sup>转化组细胞增生明显慢于空载体对照组(P<0.01,图5)。

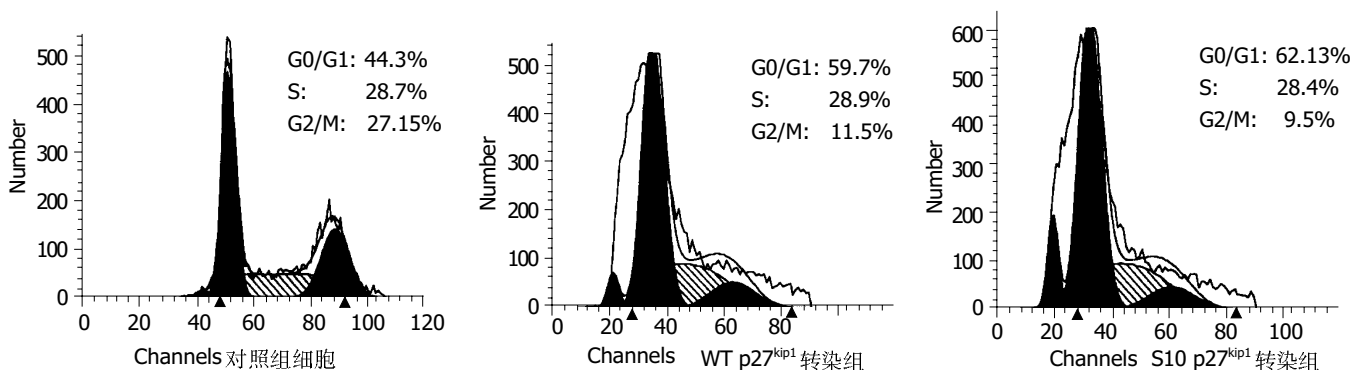
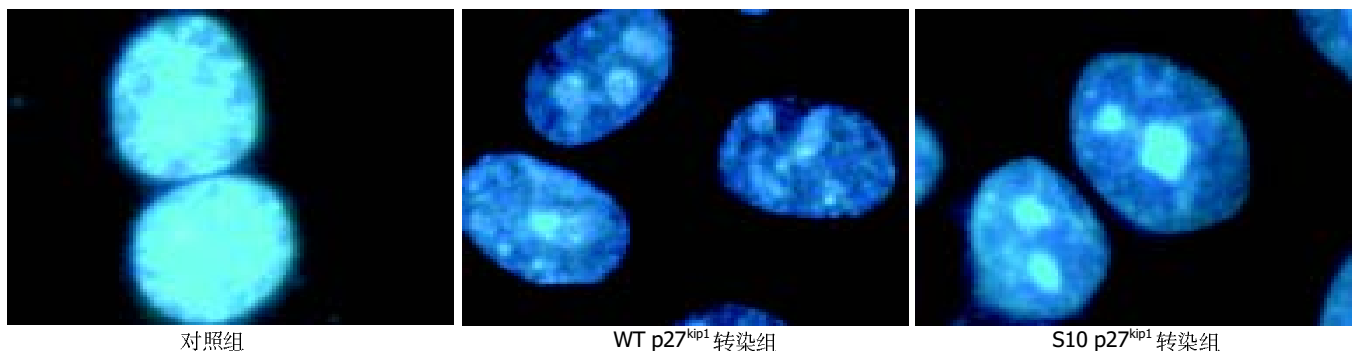
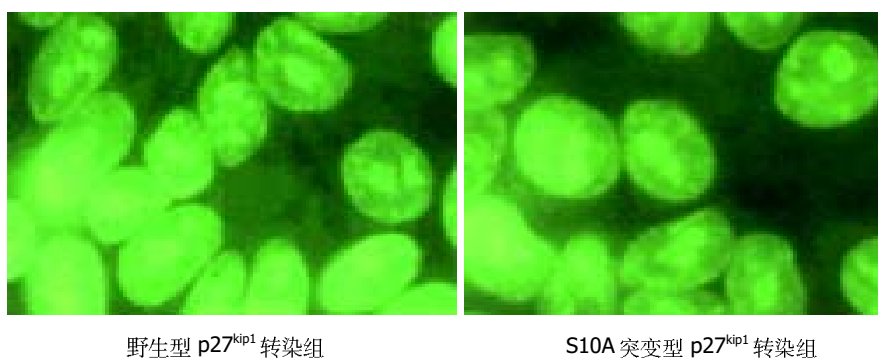
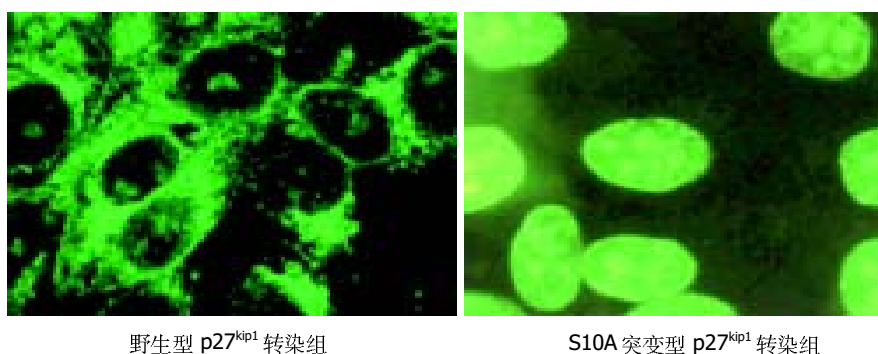
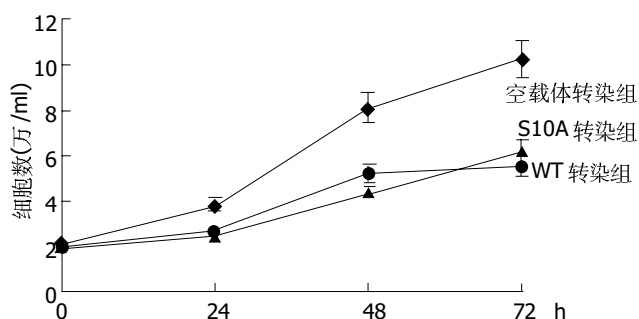


图1 流式细胞仪分析比较转化p27<sup>kip1</sup>基因对HepG<sub>2</sub>细胞周期的影响。

图2 Hoechst33258 染色比较转染 p27<sup>Kip1</sup> 基因对 HepG<sub>2</sub> 细胞凋亡的影响.图3 HepG<sub>2</sub> 细胞转染 p27<sup>Kip1</sup> 基因 24 h 后无血清培养 96 h 外源性 p27<sup>Kip1</sup> 细胞内的分布.图4 p27<sup>Kip1</sup> 基因转染的 HepG<sub>2</sub> 细胞无血清培养 96 h 后 200 mL/L 血清刺激 8 h 外源性 p27<sup>Kip1</sup> 细胞内分布.图5 p27<sup>Kip1</sup> 基因转染的 HepG<sub>2</sub> 细胞增生情况.

### 3 讨论

p27<sup>Kip1</sup> 蛋白是一种细胞周期调控的抑制因子, 与多种肿瘤发生、发展和预后密切相关<sup>[12-13]</sup>. 在肿瘤细胞 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白通常地表达或无表达, 而过度表达则抑制肿瘤细胞过度增生. 我们也证实 p27<sup>Kip1</sup> 转染肝癌细胞株 HepG<sub>2</sub>

后生长明显抑制, 流式细胞仪也出现凋亡峰, 提示 p27<sup>Kip1</sup> 转染后过度表达可能诱导细胞的凋亡, 在乳腺癌细胞株 MDA-MB-231<sup>[14]</sup> 和食管癌裸鼠模型的研究也发现 p27<sup>Kip1</sup> 过度表达可以促使细胞凋亡.

p27<sup>Kip1</sup> 基因是高度保守的抑癌基因, 其与其他抑癌基因如 p53 的高突变率不同, p27<sup>Kip1</sup> 基因少有或没有突变<sup>[15]</sup>. 关于 S10A 突变型 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白对细胞周期调控的影响目前尚未有报道. 本文首次发现 S10A 突变型 p27<sup>Kip1</sup> 同样可以促进细胞周期阻滞于 G<sub>0</sub>, 而且强于野生型. 该研究似乎提示 S10A 突变是一个无义突变, 该突变对 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白本身功能影响意义不明显. 然而, Ser<sup>10</sup> 的磷酸化占总蛋白几乎 70%, 可能是最主要的功能调节机制<sup>[15]</sup>. p27<sup>Kip1</sup> 蛋白细胞周期 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 阻滞的主要分子<sup>[9]</sup>, 而 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白发挥其生物学功能除了依赖其表达水平还与其在细胞内分布密切相关<sup>[16]</sup>, 细胞周期 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 阻滞时 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白主要分布于细胞核, 而在 M 和 S 期开始时,

则由胞核穿过核膜进入细胞质. 我们发现S10A 突变型 p27<sup>kip1</sup> 不能由细胞核向细胞质转运, 提示 p27<sup>kip1</sup> 蛋白主要分布细胞核, 而丧失了向胞质转运的功能. 而S10A 突变型 p27<sup>kip1</sup> 在细胞核滞留似乎更有利于其发挥细胞周期 G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> 阻滞, p27<sup>kip1</sup> 蛋白在细胞核的分布是其发挥细胞 G<sub>1</sub> 期阻滞的分子基础.

细胞周期的不同时期, p27<sup>kip1</sup> 存在精确的细胞内亚定位调控机制, 但确切的分子机制并没有阐明. 我们发现 S10A 突变型 p27<sup>kip1</sup> 丧失了由细胞核向细胞质转运功能, 说明 Ser<sup>10</sup> 磷酸化可能是介导其细胞核外转运的重要分子基础. 国外最新研究也证实 p27<sup>kip1</sup> 蛋白可以和 CRM1 蛋白相互作用, 并且这种作用是依赖 Ser<sup>10</sup> 磷酸化<sup>[17]</sup>, 而 CRM1 是一种广谱的核外运蛋白 (exportin), 可以介导 p27<sup>kip1</sup> 蛋白的细胞核外转运<sup>[18]</sup>.

阐明 p27<sup>kip1</sup> 分子的生物学特性及其在肝癌细胞周期调控中的作用, 在理论可以为进一步认识肝癌细胞增生失控的分子机制, 并为临床治疗提供新的思路.

#### 4 参考文献

- 1 Lin GY, Chen ZL, Lu CM, Li Y, Ping XJ, Huang R. Immunohistochemical study on p53, H-rasp21, c-erbB-2 protein and PCNA expression in HCC tissues of Han and minority ethnic patients. *World J Gastroenterol* 2000;6:234-238
- 2 Feng DY, Zheng H, Tan Y, Cheng RX. Effect of phosphorylation of MAPK and Stat3 and expression of c-fos and c-jun proteins on hepatocarcinogenesis and their clinical significance. *World J Gastroenterol* 2001;7:33-36
- 3 Guo XZ, Shao XD, Liu MP, Xu JH, Ren LN, Zhao JJ, Li HY, Wang D. Effect of bax, bcl-2 and bcl-xL on regulating apoptosis in tissues of normal liver and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:1059-1062
- 4 Liu LH, Xiao WH, Liu WW. Effect of 5-Aza-2-deoxycytidine on the P16 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *World J Gastroenterol* 2001;7:131-135
- 5 Cui J, Yang DH, Bi XJ, Fan ZR. Methylation status of c-fms oncogene in HCC and its relationship with clinical pathology. *World J Gastroenterol* 2001;7:136-139
- 6 Jiang Y, Zhou XD, Liu YK, Wu X, Huang XW. Association of hTcf-4 gene expression and mutation with clinicopathological characteristics of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:804-807
- 7 Qin LL, Su JJ, Li Y, Yang C, Ban KC, Yian RQ. Expression of IGF- II, p53, p21 and HBxAg in precancerous events of hepatocarcinogenesis induced by AFB1 and/or HBV in tree shrews. *World J Gastroenterol* 2000;6:138-139
- 8 Sun BH, Zhang J, Wang BJ, Zhao XP, Wang YK, Yu ZQ, Yang DL, Hao LJ. Analysis of in vivo patterns of caspase 3 gene expression in primary hepatocellular carcinoma and its relationship to p21(WAF1) expression and hepatic apoptosis. *World J Gastroenterol* 2000;6:356-360
- 9 Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994;78:59-66
- 10 Ito Y, Matsuura N, Sakon M, Miyoshi E, Noda K, Takeda T, Umeshita K, Nagano H, Nakamori S, Dono K, Tsujimoto M, Nakahara M, Nakao K, Taniguchi N, Monden M. Expression and prognostic roles of the G1-S modulators in hepatocellular carcinoma: p27 independently predicts the recurrence. *Hepatology* 1999;30:90-99
- 11 Negri C, Donzelli M, Bernardi R, Rossi L, Burkle A, Scovassi AI. Multiparametric staining to identify apoptotic human cells. *Exp Cell Res* 1997;234:174-177
- 12 Rahman A, Maitra A, Ashfaq R, Yeo CJ, Cameron JL, Hansel DE. Loss of p27 nuclear expression in a prognostically favorable subset of well-differentiated pancreatic endocrine neoplasms. *Am J Clin Pathol* 2003;120:685-690
- 13 Barnes A, Pinder SE, Bell JA, Paish EC, Wencyk PM, Robertson JF, Elston CW, Ellis IO. Expression of p27kip1 in breast cancer and its prognostic significance. *J Pathol* 2003;201:451-459
- 14 Katayose Y, Kim M, Rakkar AN, Li Z, Cowan KH, Seth P. Promoting apoptosis: a novel activity associated with the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Cancer Res* 1997;57:5441-5445
- 15 Ponce-Castaneda MV, Lee MH, Latres E, Polyak K, Lacombe L, Montgomery K, Mathew S, Krauter K, Sheinfeld J, Massague J. p27Kip1: Chromosomal mapping to 12p12-12p13.1 and absence of mutations in human tumor. *Cancer Res* 1995;55:1211-1214
- 16 Ishida N, Kitagawa M, Hatakeyama S, Nakayama K. Phosphorylation at serine 10, a major phosphorylation site of p27Kip1, increases its protein stability. *J Biol Chem* 2000;275:25146-25154
- 17 Connor MK, Kotchetkov R, Cariou S, Resch A, Lupetti R, Beniston RG, Melchior F, Hengst L, Slingerland JM. CRM1/Ran-mediated nuclear export of P27(kip1) involves a nuclear export signal and links p27 export and proteolysis. *Mol Biol Cell* 2003;14:201-213
- 18 Kudo N, Khochbin S, Nishi K, Kitano K, Yanagida M, Yoshida M, Horinouchi S. Molecular cloning and cell cycle-dependent expression of mammalian CRM1, a protein involved in nuclear export of proteins. *J Biol Chem* 1997;272:29742-29751