

# 维甲酸处理前后外胚间充质细胞中 Cyclin D1 蛋白表达的定量分析

吕红兵 金岩 Tipoe CL

**摘要** 目的:探讨维甲酸对胎鼠面突外胚间充质细胞的作用和 Cyclin D1 变化之间的关系。方法:原代培养 GD12<sup>15</sup> (妊娠第 12 天第 15 小时)胎鼠面突的外胚间充质细胞,原代培养细胞后,观察维甲酸处理前后细胞生长曲线的变化,采用免疫组织化学和图像分析仪对维甲酸处理后 Cyclin D1 蛋白的表达变化进行定量分析。结果:维甲酸处理后,外胚间充质细胞的生长受到抑制,正常的外胚间充质细胞中,Cyclin D1 的表达量较高,维甲酸处理后,其表达量显著降低。结论:维甲酸所引起的细胞生长抑制与 Cyclin D1 的表达降低之间密切相关,外胚间充质细胞的正常分裂需要 Cyclin D1 的正常表达。

**关键词** 维甲酸 细胞周期素 细胞培养 免疫组织化学

## The Quantitative Analysis of Cyclin D1 Expression in RA-treated and non- RA-treated Ectomesenchymal Cells in vitro

Lu Hongbing, Jin Yan

Department of Oral Pathology, Stomatology College, the Fourth Military Medical University

Tipoe CL

Department of Anatomy, Faculty of Medicine, the University of Hong Kong

### Abstract

**Objective:** To elucidate the alteration of Cyclin D1 protein between RA-treated and the non-RA-treated ectomesenchymal cells in embryonic mice. **Methods:** Ectomesenchymal cells in the developing orofacial processes were explanted from embryonic BALB/c mice on generation day 12<sup>15</sup> (the 15th hour of the 12th day). Primary cells were cultured using the tissue mass method. The variants of growth curves were examined in the RA-treated and normal groups. Protein of Cyclin D1 was detected using immunohistochemistry. The positive degree of Cyclin D1 staining was analyzed using image analysis. **Results:** The findings showed that the growth of ectomesenchymal cells was inhibited dramatically. Cyclin D1 expressed strongly in normal ectomesenchymal cells. However, its expression decreased evidently after RA-treated. There was significant difference between the test group and the normal group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Low expression of Cyclin D1 may contribute to the inhibition of ectomesenchymal cells. It is necessary for Cyclin D1 to express appropriately during the normal meiosis of ectomesenchymal cells.

**Key words:** tretinoin Cyclin cell culture immunohistochemistry

细胞周期是细胞生命活动的基本过程,细胞在周期时相的变迁中进入增殖、分化、衰老、死亡等生理状态。Cyclin D1 是重要的细胞周期调控蛋白,参与细胞周期的精确调控,维持细胞的正常生长发育平衡。一旦 Cyclin D1 基因发生改变,就可能使细

胞生长发生异常,引起细胞生长属性的改变<sup>1</sup>。在正常的腭部形成过程中,外胚间充质(EMS)细胞的生长对腭的正常发育至关重要,如果这些细胞的细胞周期受阻,则可能导致腭突的体积变小,引发腭裂的形成。对细胞周期的研究表明,细胞周期不同时相(G1、S、G2、M)之间存在着限制点(restriction point),这些限制点受细胞周期素依赖蛋白激酶(CDK) —细胞周期素(Cyclin) —细胞周期素依赖性

作者单位:710032 第四军医大学口腔医院病理科(吕红兵,金岩),香港大学医学院解剖系(Tipoe CL)

蛋白激酶抑制因子(DKI)网络系统所调节<sup>2</sup>。维生素A的衍生物——维甲酸(retinoic acid,RA)可诱发胎鼠形成腭裂,本文就它对胎鼠面突外胚间充质细胞的作用与Cyclin D1的改变之间有无关系进行了初步的探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞培养

未分化外胚间充质细胞的培养见参考文献<sup>3</sup>。

### 1.2 RA 诱导

每次将RA现加入培养液中,终浓度分别为5 μmol/L,对照组中加入等量的无水乙醇溶剂。每48 h换1次培养液(内含等量的RA或无水乙醇)。收集对数生长期细胞,并调整细胞浓度接种于24孔培养板(细胞数 $3 \times 10^4$ 个/孔),每次收集RA处理组和对照组各3孔,计数后取平均数,绘制细胞生长曲线,比较两组细胞的倍增时间。

### 1.3 免疫组织化学染色

细胞在40 g/L的多聚甲醛中固定20 min,2.5 ml/L的Triton-X-100和25 μg/ml的蛋白酶K37 分别处理10 min,然后用3 ml/L双氧水封闭内源性酶30 min,20 ml/L正常羊血清封闭背景30 min,加入Cyclin D1(1:100,DAKO公司)后,42 孵育过夜,PBS振洗5 min ×3次,生物素标记的二抗37 孵育1 h,随后加入生物素-抗毒素复合物,37 孵育30 min,0.5 mg/L的DAB显色5 min,苏木精未衬染核。

### 1.4 图像分析和统计分析

每组选取不重复的视野对外胚间充质细胞中Cyclin D1的阳性程度进行测量,每组的细胞总数为10个。用平均光度值来表示阳性程度的强弱。采用第四军医大学统计学教研室开发的SPLM统计软件进行分析,处理组和对照组比较时采用*t*检验, $P < 0.01$ 认为有显著差异。

## 2 结 果

### 2.1 RA 处理后未分化外胚间充质细胞生长曲线的变化

RA处理后,未分化外胚间充质细胞生长受到抑制,其抑制作用始于处理后2 d。计算两组的倍增时间可得知,正常组的倍增时间为29.04 h,而RA处理组为47.34 h(图1)。

### 2.2 免疫组化染色及图像分析

阳性信号为棕黄色颗粒,Cyclin D1的染色结果位于胞核内。正常组中,Cyclin D1蛋白的表达水平较高(图2),RA处理之后,其表达水平下降(图3)。Cyclin D1蛋白表达水平的变化用图像分析仪进行

的平均光度值之间有显著差异( $P < 0.01$ )。

表1 RA处理前后各组Cyclin D1蛋白的平均光度值( $\bar{x} \pm s$ )

编号	正常组	RA处理组
1	0.239 ± 0.012	0.128 ± 0.010
2	0.252 ± 0.006	0.135 ± 0.013
3	0.221 ± 0.014	0.101 ± 0.011
4	0.193 ± 0.008	0.092 ± 0.006
5	0.258 ± 0.007	0.113 ± 0.012
6	0.204 ± 0.009	0.107 ± 0.008
7	0.185 ± 0.010	0.126 ± 0.010
8	0.237 ± 0.006	0.135 ± 0.008
9	0.246 ± 0.012	0.089 ± 0.006
10	0.188 ± 0.011	0.107 ± 0.007
11	0.203 ± 0.009	0.110 ± 0.011
12	0.247 ± 0.013	0.104 ± 0.009
13	0.210 ± 0.005	0.099 ± 0.008
14	0.211 ± 0.007	0.111 ± 0.006
15	0.183 ± 0.008	0.108 ± 0.013
16	0.199 ± 0.006	0.097 ± 0.005
17	0.251 ± 0.010	0.124 ± 0.007
18	0.237 ± 0.011	0.106 ± 0.011
19	0.196 ± 0.009	0.116 ± 0.006
20	0.195 ± 0.012	0.102 ± 0.008

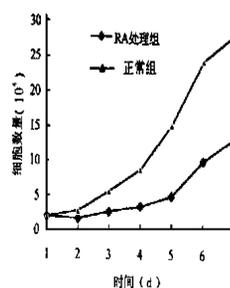


图1 RA处理后EMS细胞生长曲线的变化

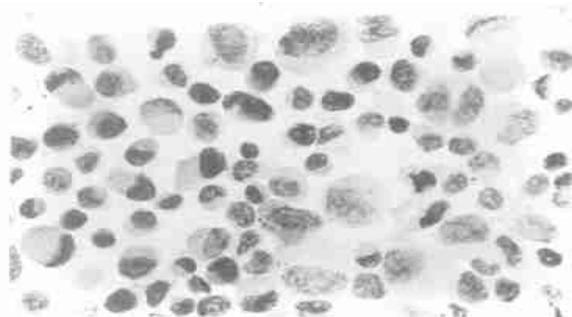


图2 正常EMS细胞,Cyclin D1蛋白表达较高

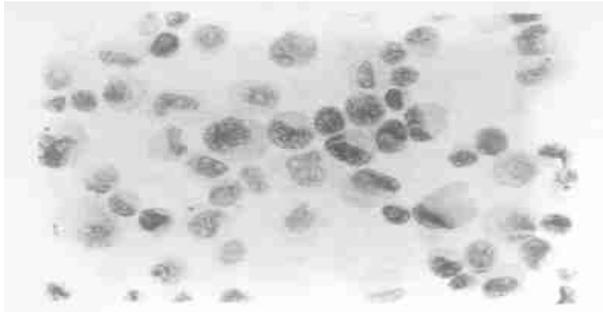


图3 RA处理后,EMS细胞中的 Cyclin D1  
阳性染色明显减弱 ISH  $\times 200$

### 3 讨 论

现在常用 RA 来治疗急性早幼粒细胞性白血病,RA 同时也是一种致畸因子,动物实验中已发现 RA 可诱发腭裂的发生,但 RA 的致畸机理一直不甚清楚。生长曲线测定结果表明,RA 处理后,细胞的群体倍增时间由 29.04 h 延长至 47.34 h,提示外胚间充质细胞的生长受到抑制,正常分裂的细胞数量大大减少。目前对细胞周期的研究表明,细胞周期的 G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub> 和 M 期之间均存在着限制点。这些限制点受 CDK-Cyclin-DKI 网络系统的调节<sup>1,2</sup>,细胞周期各限制点如果受到负调节,就会导致细胞分裂停滞于细胞周期的各个时相。

Cyclin 和 DKI 对 CDK 可进行正负调节。Cyclin D1 是在研究甲状腺癌时发现的,整个基因有 5 个外显子,全长 15 kb<sup>4</sup>,位于 6 q21 的 CCND<sub>3</sub> 基因编码区。Cyclin D1 对细胞周期进行正调控,与细胞生长、发育及肿瘤的发生关系密切。Cyclin 可分为 G<sub>1</sub> 期和 M 期两种类型,Cyclin D1 属于 G<sub>1</sub> 期,在调控细胞由 G<sub>1</sub> 期向 S 期过渡中具有关键性的作用<sup>5,6</sup>。本研究中,RA 处理前,外胚间充质细胞正常生长,Cyclin D1 的表达较高;RA 处理后,外胚间充质细胞的生长受到严重抑制,同时 Cyclin D1 的蛋白表达水平也明显降低;上述结果表明:高水平的 Cyclin D1 表达为外胚间充质细胞的正常生长所必须。在对细胞周期限制点的调节中,Cyclin D1 与 CDK4/6 结合后可激活 CDK4/6,引起视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, RB) 蛋白的磷酸化,解除 RB 对 E2 启动子结合因子 (E2-promotor binding factor, E2F) 抑制效应,使 E2F 游离出来。E2F 是一种转录因子,可调

节一系列具有特殊序列的基因启动子区 (如 c-myc、b-myc、二氢叶酸还原酶基因、TK 基因及 E2F-1 基因的启动子区),促进这些基因的表达,这些基因产物能促使细胞通过 G<sub>1</sub> 期至 S 期的细胞周期限制点,顺利进入细胞的自主分裂程序<sup>7-9</sup>。外胚间充质细胞中 Cyclin D1 蛋白表达含量的降低,可使间充质细胞的细胞周期停滞于 G<sub>1</sub> 期,不能进入合成期,阻碍细胞的正常分裂。如果这种情况存在于体内,则可能会使正常分裂的外胚间充质细胞数目减少,腭突的体积也会因此而减小,最终可诱发腭裂。

综上所述,Cyclin D1 可使细胞通过 G<sub>1</sub> 期至 S 期之间的限制点,使外胚间充质细胞正常分裂,Cyclin D1 表达降低,使得细胞周期停滞于 G<sub>1</sub> 期,抑制细胞的生长。

### 参考文献

- 1 Pedram A, Razan M, Hu RM, et al. Astrocyte progression from G<sub>1</sub> to S phase of the cell cycle depends upon multiple protein interactions. *J Biol Chem*, 1998, 273 (22) :13966 ~ 13972
- 2 Harper JW. Cyclin dependent kinase inhibitors. *Cancer Surv*, 1997, 29:91 ~ 107
- 3 吕红兵,金岩,李媛. BALB/c 胎鼠面突分化间充质细胞的体外培养. *实用口腔医学杂志*, 1999, 15 (1) :49 ~ 50
- 4 Xiong Y, Menninger J, Beach D, et al. Molecular cloning and chromosomal mapping of CCND genes encoding human D-type cyclins. *Genomics*, 1992, 13 (3) :575 ~ 584
- 5 Guo W, Baluda MA, Park NH, et al. Ethanol upregulates the expression of p21 WAF1/CIP1 and prolongs G<sub>1</sub> transition via a p53-independent pathway in human epithelial cells. *Oncogene*, 1997, 15 (10) :1143 ~ 1149
- 6 Hengstschlager M, Braun K, Soucek T, et al. Cyclin-dependent kinases at the G<sub>1</sub>-S transition of the mammalian cell cycle. *Mutat Res*, 1999, 436 (1) :1 ~ 9
- 7 Inaba T, Matsushime H, Valentine M, et al. Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes. *Genomics*, 1992, 13 (3) :565 ~ 574
- 8 Muller H, Moroni MC, Vigo E, et al. Induction of S-phase entry by E2F transcription factors regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, 8 (1) :28 ~ 35
- 9 Nevins JR, Leone G, DeGregori J, et al. Role of the Rb/E2F pathway in cell growth control. *J Cell Physiol*, 1997, 173 (2) :233 ~ 236

(1999-08-27 收稿,2000-04-10 修回)