Ras 蛋白在组蛋白乙酰化修饰介导的多头绒泡菌 (*Physarum polycephalum*)细胞周期调控中的作用

李晓雪 陆 军 赵艳梅 王秀丽 黄百渠*

(东北师范大学遗传与细胞研究所, 长春 130024. * 联系人, E-mail: huangbq705@nenu.edu.cn)

摘要 在天然同步化的多头绒泡菌(*Physarum polycephalum*)细胞中, 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 Trichostatin A (TSA) 阻断了细胞周期 S/G2, G2/M 以及走出有丝分裂期的转换, 同时影响了 2 种 *ras* 基因(*Ppras1* 和 *Pprap1*)的转录以及 Ras 蛋白的表达水平. 抗 Ras 蛋白的抗体中和实验结果表明, Ras 蛋白通过调节 Cyclin B1 的表达水平在细胞周期转换点的调控中起重要作用. 以上结果表明, 在多头绒泡菌细胞中 Ras 蛋白可能是参与组蛋白乙酰化修饰介导的细胞周期调控过程的一个关键因子.

关键词 **Ras** 蛋白 组蛋白乙酰化 **Trichostatin A (TSA)** 细胞周期调控 多头绒泡菌

真核生物的DNA与蛋白质共同形成染色质结构. 核小体是真核生物染色质结构的基本单位. 每个核小体由核心组蛋白八聚体和缠绕在八聚体之外的 146 bp DNA组成. 每个核心组蛋白八聚体包括二倍组蛋白H2A, H2B, H3 和H4. 对核心组蛋白N-端尾部的转录后修饰有很多种, 其中特异性赖氨酸残基ε-氨基的乙酰化修饰是一个可逆的酶促反应过程[1]. 正常细胞中组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferases, HAT)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDAC)共同维持着组蛋白的乙酰化水平[2]. 这 2 类酶在细胞周期调控中起重要作用. 组蛋白乙酰转移酶P300 和P/CAF参与了肌细胞生成和依赖于MyoD的细胞周期的阻滞过程[3,4]. 酵母中TAF II 的温度敏感型突变体在非允许温度下不能表达G1/S特异的细胞周期基因, 而被阻断在G1 期[5]. 在稳定转染的Swiss 3T3 细胞中, 过表达组蛋白去乙酰化酶HDAC1 将导致生长速度减缓以及G2 和M期的延迟[6].

HDAC抑制剂为研究组蛋白乙酰化修饰与细胞周期调控的关系提供了新的途径. 过去十年的研究发现, 许多组蛋白去乙酰化酶抑制剂使细胞停滞在G1 和G2 期, 同时改变了一些细胞周期调控因子的基因活性, 其中包括*p21*, *c-myc*, *Cyclins*和*cdks*[7~9]. 而目前有关组蛋白乙酰化修饰介导的细胞周期调控机制还知之甚少. 而对参与组蛋白乙酰化介导的细胞周期调控过程的分子进行鉴定和研究将是了解该过程的关键所在.

多头绒泡菌(*Physarum polycephalum*)是一种天然同步化的黏菌. 其原质团中的细胞核在自然条件下进行高度同步化的核内有丝分裂, 且在细胞周期各时相都具有独特的形态学特征, 通过光学显微镜即可确定其细胞周期进程. 它的细胞周期调控机制与哺乳动物细胞相似. 而且在这个低等真核生物中存在着哺乳动物细胞周期调控因子及其相关蛋白的类似物, 如Cyclin B1, P53, c-Fos, c-Jun和Ras蛋白等[10]. 另外, 有关多头绒泡菌中HAT和HDAC的鉴定和功能研究也取得了一定的进展[11~14]. 因此本文采用多头绒泡菌作为研究组蛋白乙酰化修饰介导的细胞周期调控机制的模式生物.

Ras蛋白是进化上较保守的信号转导GTP-结合蛋白. 已有研究证明, Ras和细胞周期存在一定的关系[15]. 本文研究结果表明, Ras蛋白不仅与细胞周期有关, 而且还参与了组蛋白乙酰化修饰介导的细胞周期调控.

1 材料与方法

(ⅰ) 材料. 多头绒泡菌(*Physarum polycephalum*)TU291 菌株, 由法国利母慈大学细胞生物学实验室Philipe Albert博士惠赠. 参照Daniel和Baldwin[16]的方法进行多头绒泡菌的悬浮和同步化培养.

(ⅱ) TSA处理实验. 多头绒泡菌的细胞周期由S期, G2 期和M期组成, 缺少G1 期[17]. 其细胞周期进程的时间和细胞核形态见图 1. 分别将S期(1.5 h)、G2 期(6 h)和前期(9.5 h)的原质团分成相应的等份. 这些样品仍能在接下来的 3 个细胞周期内保持同步化状态. 将这些样品分别在含有和不含有HDAC抑制剂TSA的培养基上进行培养(TSA的终浓度为 10

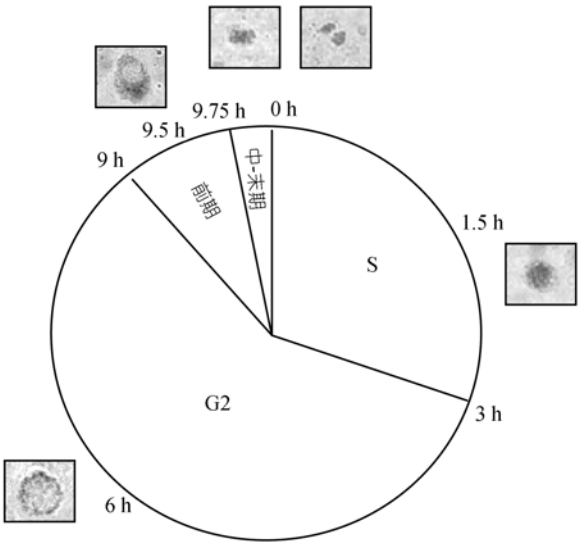

图 1　多头绒泡菌原质团的细胞周期进程示意图

μmol/L). 没有进行 TSA 处理的为对照组. 然后通过光学显微镜跟踪观察对照组和实验组的细胞周期进程.

(ⅲ) 半定量的 RT-PCR. PCR 引物分别是: *Ppras1*, 5′-gacgagtatgaccccacc-3′和 5′-tcttgccacccttttcc-3′; *Pprap1*, 5′-atatggttcggacaaatg-3′和 5′-tatagaataatag-taggcaacag-3′; ssurRNA, 5′-tcggctccagaccttc-3′和 5′-ggcgagctaacctgtc-3′.

多头绒泡菌的原质团经过 TSA 处理后(处理方法同(ⅱ)), 通过 RNA 提取试剂盒(上海生工)提取总 RNA, 然后进行 RT-PCR 反应(RT-PCR 试剂盒, Promega). RT-PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳进行分离. 利用 RT-PCR 产物 *Ppras1*(或 *Pprap1*)与内参对照 ssurRNA 的相对光密度比值, 对 RT-PCR 产物进行半定量分析.

(ⅳ) 蛋白免疫印迹分析. 经过 TSA 处理的原质团(处理方法见(ⅱ))以 1∶3(质量体积比)加入 1×PBS 溶液, 然后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE). 将电泳分离的蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 分别与一抗和二抗共孵育. 一抗分别是抗 Ras 和抗 actin 的多克隆抗体(北京中山); 二抗为偶联 HRP 的羊抗兔 IgG 抗体(北京中山), 然后以 AEC 进行染色. Ras 蛋白水平通过 Ras 蛋白与内参对照 actin 的相对光密度比值进行半定量分析.

(ⅴ) 抗体中和实验. 以抗 Ras 蛋白的抗体分别处理 S 期, G2 期和前期的多头绒泡菌原质团(处理方法与 TSA 处理方法相同). 抗体以 1∶25 溶解在培养基中. 没有经过抗体处理的样品为对照组. 然后通过光学显微镜跟踪观察对照组和实验组的细胞周期进程.

将各样品中的蛋白通过 SDS-PAGE 进行分离, 然后转移到硝酸纤维素膜上进行蛋白免疫印迹分析. 一抗分别为抗 Cyclin B1 (Santa Cruz)和抗 actin 的多克隆抗体. Cyclin B1 蛋白的半定量分析与 Ras 蛋白相同(见(ⅳ)).

2　结果与讨论

2.1　TSA 阻断了细胞周期 S/G2, G2/M 以及走出 M 期的转换

有研究表明, 组蛋白去乙酰化酶抑制剂TSA在体外和体内能够抑制组蛋白去乙酰化酶的活性, 使细胞生长停滞, 进入分化, 并诱导细胞凋亡或死亡[18,19]. 本研究首先通过光学显微镜跟踪观察了 10 μmol/L TSA处理的S期、G2 期和前期多头绒泡菌原质团的细胞周期进程. 发现没有经过TSA处理的S期, G2 期和前期的原质团细胞分别经过 8, 4 和 0.5 h后进入下一次有丝分裂, 而经过TSA处理的原质团细胞则不能进行正常的有丝分裂, 分别被阻断在原细胞周期时相(表 1). 这说明TSA阻断了多头绒泡菌细胞周期S/G2, G2/M以及走出M期的转换.

表 1　TSA处理对多头绒泡菌细胞周期进程的影响[a)]

处理时间/h	S 期细胞		G2 期细胞		前期细胞	
	对照组	处理组	对照组	处理组	对照组	处理组
0	S	S	G2	G2	前期	前期
0.5	S	S	G2	G2	M2	前期
1	S	S	G2	G2	S(2)	前期
2	G2	S	G2	G2	S(2)	前期
4	G2	S	M2	G2	G2(2)	前期
5	G2	S	S(2)	G2	G2(2)	前期
6	G2	S	S(2)	G2	G2(2)	前期
8	M2	S	S(2)	G2	G2(2)	前期

a) M2, 下一次有丝分裂; S(2), 下一次细胞周期的 S 期; G2(2), 下一次细胞周期的 G2 期

TSA最初是一种抗真菌试剂. 它在纳摩级浓度就能抑制组蛋白去乙酰化酶的活性, 使哺乳动物细胞周期停留在G1 和G2 期[7~9]. 我们发现以 10 nmol/L TSA分别处理S期、G2 期和前期的多头绒泡菌原质团, 可以明显地推迟其进入有丝分裂的时间(结果未显示), 这同其他研究者[11]的结果相一致. 本研究结果表明, 当TSA的浓度提高到 10 μmol/L时, 不仅可以

阻断G2/M的转换，还能够阻断S/G2 以及走出M期的转换.

2.2 TSA 对 *Pprap1* 和 *Ppras1* 的转录以及 Ras 蛋白表达水平的影响

有研究表明，组蛋白去乙酰化酶抑制剂只能影响哺乳动物细胞中少量基因(大约 2%)的活性[20]. 其中包括一些细胞周期调控因子，如$p21^{waf1}$，*c-myc*和*cyclin E*[7~9]. Ras蛋白通过信号转导途径与细胞周期调控相关[15]. 本文通过半定量RT-PCR分析了TSA处理后 2 个*ras*基因(*Pprap1* 和*Ppras1*)转录水平的变化. 图 2(a)结果表明TSA影响了细胞内*Pprap1* 和*Ppras1* 基因的转录. 图 2(b)的分析结果显示, 10 μmol/L TSA 提高了S期和G2 期细胞*Pprap1* 的转录水平，降低了前期细胞*Pprap1* 的转录水平; 使S期细胞*Ppras1* 的转录水平提高，G2 期和前期细胞*Ppras1* 的转录水平下降.

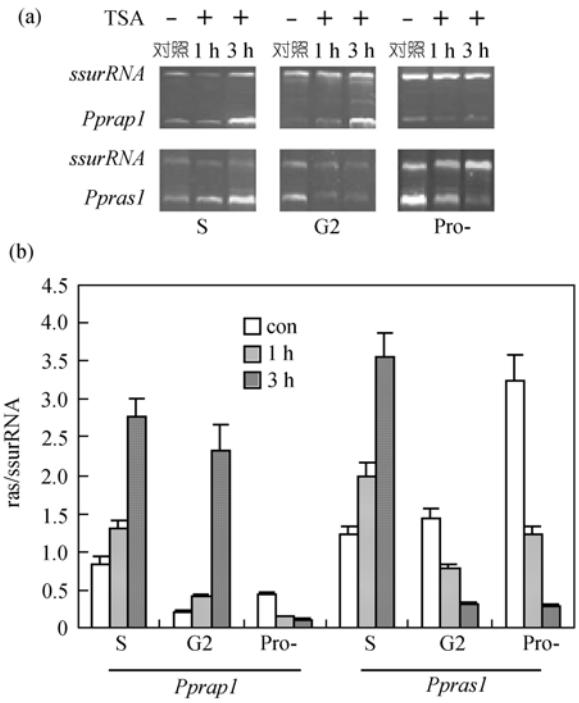

图 2 TSA 处理对多头绒泡菌 *ras* 基因转录的影响

(a) 分别将S期, G2和前期的多头绒泡菌原质团在含有 10 μmol/L TSA 的培养基上培养 1 和 3 h，然后提取 RNA 进行 RT-PCR 反应. 琼脂糖凝胶电泳显示的 RT-PCR 产物分别为 *Pprap1*, *Ppras1* 和内参对照 ssurRNA. (b) RT-PCR 产物的相对光密度值分析结果，表明 TSA 提高了 S 期和 G2 期细胞 *Pprap1* 的 mRNA 水平，降低了前期细胞 *Pprap1* 的 mRNA 水平; TSA 使 S 期细胞 *Ppras1* 的 mRNA 水平上升，使 G2 期和前期细胞 *Ppras1* 的 mRNA 水平下降. con，未经 TSA 处理的对照组细胞; Pro-，前期细胞

TSA 是否能改变多头绒泡菌细胞 Ras 蛋白的表达水平? 图 3(a)通过蛋白免疫印迹分析了 10 μmol/L TSA 处理后 S 期、2 期和前期的原质团细胞 Ras 蛋白的表达水平. 光密度分析结果表明 TSA 降低了 S 期, G2 期和前期细胞 Ras 蛋白的表达水平(图 3(b)).

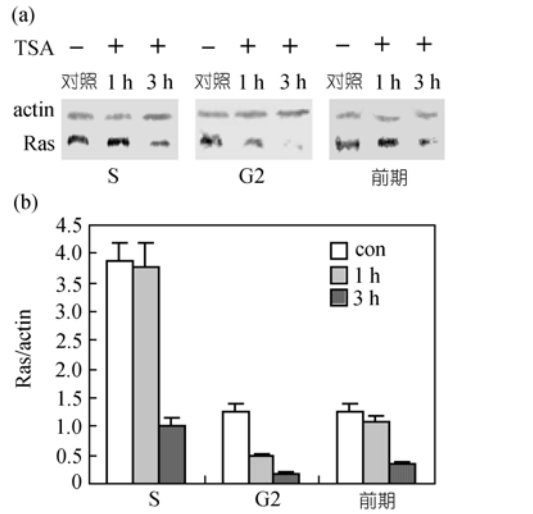

图 3 TSA 处理对多头绒泡菌细胞不同时相 Ras 蛋白表达的影响

(a) 分别以 10 μmol/L TSA 处理 S 期, G2 和前期的多头绒泡菌细胞 1 和 3 h. 细胞中的蛋白经 SDS-PAGE 分离后进行免疫印迹分析. 图中显示了 Ras 蛋白和内参对照 actin 蛋白的免疫印迹结果. (b) 蛋白免疫印迹的相对光密度值分析结果，表明 TSA 降低了 S 期, G2 期和前期细胞 Ras 蛋白的表达水平. con，未经 TSA 处理的对照组细胞

多头绒泡菌中已鉴定的 3 个*ras*基因分别是*Pprap1*, *Ppras1* 和*Ppras2*. 其中*Ppras2* 在原质团时期不表达，在原质团的同步化分裂时期*Pprap1* 和*Ppras1* 的表达水平恒定[21]. 本研究结果表明，细胞周期进程的不同时期(S期、G2 期和前期, 图 2(a)), TSA 对*Pprap1* 和*Ppras1* mRNA水平的影响是不同的，说明在多头绒泡菌中组蛋白乙酰化修饰可能通过调节*ras* 基因的转录水平影响细胞周期进程.

*Rap*基因是*ras*基因超家族的成员. Ras和Rap蛋白存在的保守区域表明这 2 个家族的成员可能与相同的功能分子相作用从而调控基本细胞过程，如调控与细胞增殖和分化有关的信号转导[22]. 但是在某些细胞中(NIH3T3 和非洲爪蟾卵细胞)，Rap蛋白可能通过竞争性地结合一些因子，如ras GTPase激活蛋白和c-Raf1，而拮抗Ras蛋白的功能[23]. RT-PCR结果表明,

TSA增强了S期细胞*Pprap1* 和*Ppras1* 的转录，减弱了前期细胞*Pprap1* 和*Ppras1* 的转录；但在G2 期对这 2 个基因的作用却是不同的，它提高了*Pprap1* 的转录水平，却抑制*Ppras1* 的转录. 由此表明，在组蛋白乙酰化修饰介导的细胞周期调控过程中，*Pprap1* 和*Ppras1* 在S期和前期细胞中的作用可能是相互的，但在G2 期两者的作用可能是相对的.

2.3　Ras 蛋白在细胞周期调控中的作用

TSA 不仅阻断了多头绒泡菌细胞周期转换点的转换，而且影响了 2 个 *ras* 基因(*Pprap1* 和 *Ppras1*)的转录以及 Ras 蛋白的表达水平，因此 Ras 蛋白与多头绒泡菌细胞周期调控的关系成为值得关注的问题. 为了研究 Ras 蛋白在细胞周期调控中的作用，本文以抗 Ras 蛋白抗体抑制细胞内 Ras 蛋白的功能，然后监测其细胞周期进程和细胞内 Cyclin B1 蛋白表达水平的变化.

抗体中和实验结果表明，抗体处理使 S 期和前期细胞的细胞周期进程受阻，无法进入下一次有丝分裂，并延迟了 G2 期细胞进入有丝分裂的时间(表 2). 而没有经过抗体处理的对照组细胞仍进行正常的有丝分裂. 同时将从原质团中提取的 Ras 蛋白与抗 Ras 蛋白抗体组成混合物处理多头绒泡菌细胞，其细胞周期进程与对照组的相同(结果未显示)，说明该抗体能与细胞内的 Ras 蛋白发生特异性作用. 上述结果表明 Ras 蛋白在细胞周期转换点的调控过程中起一定的作用. 封闭细胞内 Ras 蛋白的功能将导致 S 期和前期的阻断以及 G2 期的延迟.

表 2　抗Ras蛋白抗体处理对多头绒泡菌细胞周期进程的影响[a)]

处理时间/h	S 期细胞		G2 期细胞		前期细胞	
	对照组	处理组	对照组	处理组	对照组	处理组
0	S	S	G2	G2	前期	前期
1	S	S	G2	前期	*S*(2)	前期
2	S	S	中期	前期	S(2)	前期
2.5	S	S	S(2)	中期		
3	*S late*	S				
3.5	S late	S				
4	G2	S				

a) 对照组细胞周期转换的时期和时间用斜体表示. S late，晚 S 期; S(2)，下一次细胞周期的 S 期

细胞内 Ras 蛋白的功能失去是否会引起细胞周期调控因子表达水平的变化？蛋白免疫印迹(图 4(a))

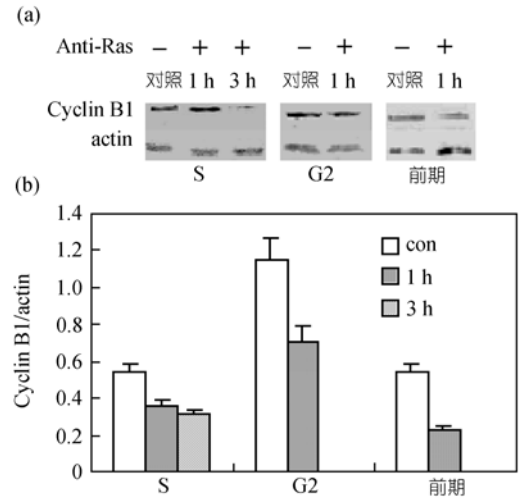

图 4　抗 Ras 蛋白抗体处理后多头绒泡菌细胞 Cyclin B1 蛋白表达的变化

(a) S 期、G2 和前期的多头绒泡菌细胞经抗 Ras 蛋白抗体处理后，分别进行 SDS-PAGE 以及 Cyclin B1 和内参对照 actin 的蛋白免疫印迹分析. (b) Cyclin B1 蛋白免疫印迹的相对光密度值分析结果，表明抗 Ras 蛋白抗体处理降低了 S 期、G2 期和前期细胞内 Cyclin B1 的蛋白水平. con，未经抗 Ras 蛋白抗体处理的对照组细胞

和光密度分析结果(图 4(b))显示，抗Ras蛋白抗体处理后，S期、G2 期和前期细胞内Cyclin B1 的蛋白水平降低. 已知Cyclin B1 在细胞周期进程中周期性地合成和降解，并与cdk2 形成Cyclin B1-cdk2 复合物调控哺乳动物细胞周期进程[24]. 已有研究发现，多头绒泡菌中Cyclin B1 在S期合成，然后逐渐增加，有丝分裂中期达到高峰，末期降解. 缺少Cyclin B1 将导致细胞周期受阻[17]. 本研究结果表明，*ras*基因的转录和Ras蛋白的表达都受组蛋白乙酰化修饰的调控(图 2 和 3). 由于TSA和抗Ras蛋白抗体处理都阻断了细胞周期S/G2，G2/中期以及走出M期过程的转 换，我们推测多头绒泡菌中Ras蛋白在组蛋白乙酰化修饰介导的细胞周期调控过程中起重要作用. 但Ras蛋白的作用机制仍不清楚. 曾有报道表明组蛋白 去乙酰化酶抑制剂能激活哺乳动物细胞中MAP激酶(MAPK)的活性[25]. 由于MAPK能够被Ras信号转 导通路中的上游激酶磷酸化，而且MAPK又能激 活cdc2-cyclin 复合物[26]，因此Ras蛋白很可能通 过Ras-MAPK通路参与组蛋白乙酰化修饰介导的 细胞周期调控. 但该过程的具体路径还有待于深入研究.

致谢　本工作为国家自然科学基金(批准号: 30370316)、国家重点基础研究发展规划(批准号: G1999053902)和东北师范大学青年教师基金(批准号: 111494025)资助项目.

参 考 文 献

1 Spencer V A, Davie J R. Role of covalent modification of histones in regulating gene expression. Gene, 1999, 240: 1~12[DOI]

2 Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. Nature, 1997, 389: 349~352[DOI]

3 Puri P L, Avantaggiati M L, Balsano C, et al. p300 is required for MyoD-dependent cell cycle arrest and muscle-specific gene transcription. EMBO J, 1997, 16: 369~383[DOI]

4 Puri P L, Sartorelli V, Yang X, et al. Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. Mol Cell, 1997, 1: 35~45[DOI]

5 Suzuki-Yagawa Y, Guemah M, Roeder R G. The ts13 mutation in the TAF Ⅱ250 subunit (CCG1) of TF Ⅱ D directly affects transcription of D-type cyclin genes in cells arrested in G1 at the nonpermissive temperature. Mol Cell Biol, 1997, 90: 607~614

6 Bartl S, Taplick J, Laggerm G, et al. Identification of mouse histone deacetylase 1 as a growth factor-inducible gene. Mol Cell Biol, 1997, 17: 5033~5043

7 Sambucetti L C, Fischer D D, Zabludoff S, et al. Histone deacetylase inhibition selectively alters the activity and expression of cell cycle proteins leading to specific chromatin acetylation and antiproliferative effects. J Biol Chem, 1999, 274: 34940~34947[DOI]

8 Sandor V, Senderowicz A, Sackett D, et al. P21-dependent G1 arrest with downregulation of cyclin D1 and upregulation of cyclin E by the histone deacetylase inhibitor FR901228. British J Cancer, 2000, 83: 817~825[DOI]

9 Siavoshian S, Blottiere H M, Cherbut C, et al. Butyrate stimulates cyclin D and p21 and inhibits cyclin-dependent kinase Ⅱ expression in HT-29 colonic epithelial cell. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 232: 169~172[DOI]

10 Loidl A, Loidl P. Oncogene- and tumor-suppressor gene-related proteins in plants and fungi. Crit Rev Oncog, 1996, 7: 49~64

11 Brandtner E M, Lechner T, Loidl P, et al. Molecular identification of PpHDAC1, the first histone deacetylase from the slide mold *Physarum polycephalum*. Cell Biol Int, 2002, 26 (9): 783~789[DOI]

12 Golderer G, Loidl P, Grobner P. Histone acetyltransferase activity during the cell cycle. FEBS Lett, 1987, 222 (2): 322~326[DOI]

13 Lopez-Rodas G, Brosch G, Golderer G, et al. Enzymes involved in the dynamic equilibrium of core histone acetylation of *Physarum polycephalum*. FEBS Lett, 1992, 296 (1): 82~86[DOI]

14 Lusser A, Brosch G, Lopez-Rodas G, et al. Histone acetyltransferases during the cell cycle and differentiation of *Physarum polycephalum*. Eur J Cell Biol, 1997, 74: 102~110

15 Winston J T, Coats S R, Wang Y Z, et al. Regulation of the cell cycle machinery by oncogenic ras. Oncogene, 1996, 12: 127~130

16 Daniel J W, Baldwin H H. Methods of culture of plasmodial myxomycetes. In: Prescott D M, ed. Methods in Cell Physiology, New York: Academic Press, 1964. 61~110

17 Li G Y, Xing M, Li X X. Variation of Cyclin B1-like protein during the cell cycle of *Physarum polycephalum* L. Acta Botanica Sinica, 2003, 45: 445~451

18 Yoshida M, Kijima M, Akita M, et al. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A. J Biol Chem, 1990, 265: 17174~17179

19 Marks P A, Richon V M, Rifkind R A. Histone deacetylase inhibitors: Inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. J Natl Cancer Inst, 2000, 92: 1210~1216[DOI]

20 van Lint C, Emiliani S, Verdin E. The expression of a small fraction of cellular gene is changed in response to histone hyperacetylation. Gene Expr, 1996, 5: 245~253

21 Fronk J. Expression of ras-family genes in the cell cycle and during differentiation of the lower eukaryote *Physarum polycephalum*. Acta Biochem Pol, 1999, 46: 197~202

22 Noda M. Structures and functions of the K rev-1 transformation suppressor gene and its relatives. Biochim Biophys Acta, 1993, 1155: 97~109

23 Nassar N, Horn G, Herrmann C, et al. The 2.2 A crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue. Nature, 1995, 375: 554~560[DOI]

24 Miller M E, Cross F R. Cyclin specificity: how many wheels do you need on a unicycle? J Cell Sci, 2001, 114: 1811~1820

25 Zhong S, Goto H, Inagaki M, et al. Phosphorylation at serine 28 and acetylation at lysine 9 of histone H3 induced by trichostatin A. Oncogene, 2003, 22: 5291~5297[DOI]

26 Avruch J A. Raf meets Ras: Completing the framework of signal transduction pathway. TIBS, 1994, 19: 279~283

(2005-03-02 收稿, 2005-07-04 收修改稿)