

CDK11p58基因过表达抑制INS-1细胞的增殖

刘洋, 杨红旺, 孟雁

刘洋, 杨红旺, 孟雁, 中国医学科学院基础医学研究所 北京协和医学院基础学院生理学系 北京市 100005
刘洋, 北京协和医学院硕士, 主要从事疾病基因功能研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30870989
国家973计划基金资助项目, No. 2006CB503907
科技部专项基金资助项目, No. 2004CCA01400
北京市自然科学基金资助项目, No. 5062034
作者贡献分布: 刘洋与孟雁对此文献均等; 此课题由孟雁、刘洋及杨红旺设计; 研究过程由刘洋与杨红旺操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由孟雁提供; 数据分析由刘洋完成; 本论文写作由刘洋、杨红旺及孟雁完成。
通讯作者: 孟雁, 100005, 北京市东单三条5号, 中国医学科学院基础医学研究所, 北京协和医学院基础学院生理学系. ymengsmile@yahoo.com
电话: 010-65296492 传真: 010-65265315
收稿日期: 2009-03-02 修回日期: 2009-03-20
接受日期: 2009-03-23 在线出版日期: 2009-03-28

Over-expression of CDK11p58 gene suppresses the proliferation of rat insulinoma cell line INS-1

Yang Liu, Hong-Wang Yang, Yan Meng

Yang Liu, Hong-Wang Yang, Yan Meng, Department of Physiology, Institute of Basic Medical Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30870989; the National 973 Program, No. 2006CB503907; the Research Foundation from Ministry of Science and Technology of China, No. 2004CCA01400; and the Natural Science Foundation of Beijing, No. 5062034
Correspondence to: Dr. Yan Meng, Institute of Basic Medical Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China. ymengsmile@yahoo.com
Received: 2009-03-02 Revised: 2009-03-20
Accepted: 2009-03-23 Published online: 2009-03-28

Abstract

AIM: To observe the influences of CDK11p58 gene on the proliferation and cell cycle of rat insulinoma cell line INS-1.

METHODS: Rat insulinoma INS-1 cells were divided into three groups: the experimental group transfected with plasmid pcDNA3.0-CDK11p58; empty vector group transfected with pcDNA3.0; blank control group without any interference. After 48 hours, the expression of CDK11p58 was detected by Western blot. The proliferation activities of the INS-1 cells were assessed by

the MTT assay. Cell cycle was analyzed by flow cytometry.

RESULTS: In comparison with that in the empty vector group, the expression of CDK11p58 gene were significantly up-regulated in the experimental group after 48-h transfection ($P < 0.01$). Over-expression of CDK11p58 gene suppressed the growth of INS-1 cells ($P < 0.05$), and increased the G₁-phase cell proportion significantly ($69.87\% \pm 1.77\%$ vs $63.03\% \pm 2.66\%$, $P < 0.01$). INS-1 cells were partly blocked at G₁ phase.

CONCLUSION: CDK11p58 gene is involved in the proliferation activity of INS-1 cells. Over-expression of CDK11p58 gene may suppress INS-1 cell growth and the mechanisms may be due to the G₁ phase arrest.

Key Words: CDK11p58 gene; INS-1 cell; Cell proliferation; Cell cycle

Liu Y, Yang HW, Meng Y. Over-expression of CDK11p58 gene suppresses the proliferation of rat insulinoma cell line INS-1. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(9): 873-876

摘要

目的: 研究CDK11p58基因对大鼠胰岛瘤细胞INS-1增殖及周期的影响。

方法: INS-1细胞分为3组: 实验组转染pcDNA3.0-CDK11p58质粒; 空载体组转染pcDNA3.0空载体; 空白对照组不加任何干扰。48 h后, Western blot检测细胞中CDK11p58基因表达水平; MTT法检测转染CDK11p58基因对细胞增殖的影响; 流式细胞仪检测转染CDK11p58基因后细胞周期的变化。

结果: 转染48 h后, 与空载体组相比, 实验组CDK11p58基因的表达水平显著升高($P < 0.01$), INS-1细胞存活率下降($P < 0.05$), G₁期细胞比例显著上升($69.87\% \pm 1.77\%$ vs $63.03\% \pm 2.66\%$, $P < 0.01$), 细胞出现G₁期阻滞。

结论: CDK11p58基因与INS-1细胞增殖相关, 其高表达引起的细胞增殖速度放缓的作用机

■背景资料

CDK11是新近发现的中国人2型糖尿病的易感基因, CDK11p58基因功能为参与细胞周期调控和凋亡相关事件等。本研究发现CDK11p58基因与胰岛β细胞增殖相关, 其高表达引起的细胞增殖速度放缓机制可能与其所致的细胞G₁期延长有关。

■同行评议者

樊红, 副教授, 东南大学医学院发育与疾病相关基因教育部重点实验室

■研发前沿

2型糖尿病是严重威胁人类健康的重大疾病之一,目前在2型糖尿病的研究中,胰岛β细胞凋亡的机制得到广泛的重视。研究清楚CDK11p58基因在影响胰岛β细胞增殖及凋亡中发挥的作用,将为研究2型糖尿病发生发展提供了重要的实验基础。

制可能与其所致的细胞G₁期延长有关。

关键词: CDK11p58基因; INS-1细胞; 细胞增殖; 细胞周期

刘洋, 杨红旺, 孟雁. CDK11p58基因过表达抑制INS-1细胞的增殖. 世界华人消化杂志 2009; 17(9): 873-876

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/873.asp>

0 引言

CDK11(cyclin-dependent kinase 11)也称为CDC2L2(cell division cycle 2-like 2)是近年报道的一个中国人2型糖尿病易感基因,定位于人1号染色体的1p36.33区,其编码蛋白为CDK11P110和CDK11P58^[1]. Tsutsui *et al*研究发现,CDK11基因功能包括参与细胞周期调控、mRNA转录和凋亡信号传导等^[2-3]. 其中CDK11P58主要在G₂/M期表达,其功能为参与细胞周期调控和凋亡相关事件等. 在有丝分裂中,CDK11P58可以使姐妹染色单体聚合,促进中心粒成熟,促进纺锤丝的聚集和双极纺锤丝的形成等^[4-6]. 目前有关该基因在胰岛β细胞增殖及周期中是否发挥的作用未见报道. 本实验我们在高糖培养条件下,在大鼠胰岛瘤细胞INS-1中过表达CDK11p58基因,观察其对INS-1细胞增殖和细胞周期的影响,探讨CDK11p58基因与胰岛细胞增殖之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI 1640细胞培养基(钮因公司),胎牛血清(HyClone公司), Lipofectamine 2000(Invitrogen公司),蛋白酶和磷酸酶抑制剂(Roche公司), CDK11P58抗体(Santa Cruz公司),二抗(中杉金桥公司), PVDF膜(Millipore公司), ECL显色试剂盒(Pierce公司), MTT(华美公司),碘化丙啶(鼎国公司),其余试剂均为国产分析纯. 大鼠胰岛瘤INS-1细胞由中日友好医院临床医学研究所姜晋宁教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: INS-1细胞快速解冻后分装入60 mm培养皿中,加入含100 mL/L胎牛血清RPMI 1640完全培养基(含青霉素100 kU/L,链霉素100 mg/L, 50 μmol/L巯基乙醇, 10 mmol/L葡萄糖),单层培养和孵化于50 mL/L CO₂培养箱中, 37℃, 95%湿度条件下培养. 高糖培养葡萄糖浓度为20 mmol/L。

1.2.2 分组及转染: INS-1细胞分为3组: 实验

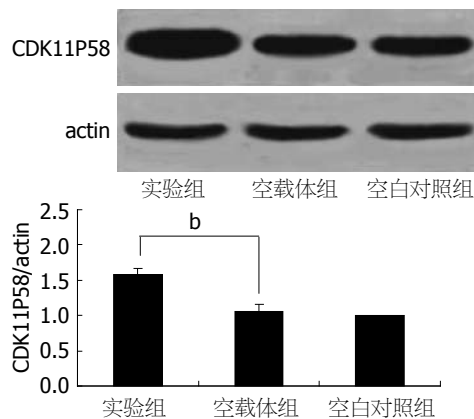


图1 转染48 h后INS-1细胞中CDK11p58基因的表达. ^bP<0.01 vs 空载体组.

组、空载体组和空白对照组. 实验组细胞转染pcDNA3.0-CDK11p58质粒, 空载体组转染pcDNA3.0空载体, 空白对照组不加任何干扰. 在细胞融合率达到70%-80%时进行转染, 转染前24 h将培养基换为无抗生素培养基, 转染步骤按照Lipofectamine 2000说明书进行。

1.2.3 蛋白表达检测: 上述各组INS-1细胞转染48 h后, 用PBS清洗, 离心收集细胞, 加入新鲜配制的细胞裂解液, 离心后收集上清, 测定蛋白含量. 取等量总蛋白与上样缓冲液混合, 变性后上样, SDS-PAGE电泳, 转移蛋白至PVDF膜上. 用含50 g/L脱脂奶粉的PBST溶液封闭, 兔抗鼠CDK11P58多克隆抗体(1:1000)孵育过夜, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体(1:2000)室温孵育1 h, ECL发光显色。

1.2.4 细胞存活率检测: 取对数生长期细胞, 接种于96孔板, 细胞贴壁后转染pcDNA3.0-CDK11p58质粒及pcDNA3.0空载体. 设空白对照组, 另设培养液对照孔, 加150 μL培养液作为调零孔. 分别培养24、48和72 h后, 每孔加20 μL MTT(5 g/L), 在CO₂培养箱中避光培养3 h. 弃培养液, 每孔加入150 μL的DMSO, 室温下避光振荡10 min, 使结晶物充分融解. 用酶标仪在490 nm处测定吸光度值. 记录结果, 绘制细胞生长曲线。

1.2.5 细胞周期检测: 上述各组细胞经转染48 h后, 终止培养. 消化成单细胞悬液, 离心10 min后弃上清, PBS洗涤2次, 用4℃预冷的700 mL/L乙醇4℃固定24 h. 固定后经PBS洗涤2次, 加入RNaseA至终浓度50 mg/L, 37℃水浴30 min, 然后加入PI至终浓度为50 mg/L, 避光染色10 min. 尼龙网过滤, 在流式细胞仪上检测细胞周期分布。

统计学处理 采用SPSS11.5统计软件, 计量

■相关报道

国内外有关报道提示CDK11p58基因参与细胞凋亡相关事件, 本实验室前期的研究证明其过表达与胰岛β细胞凋亡相关, 但引起胰岛β细胞凋亡的具体机制尚缺乏研究报道。

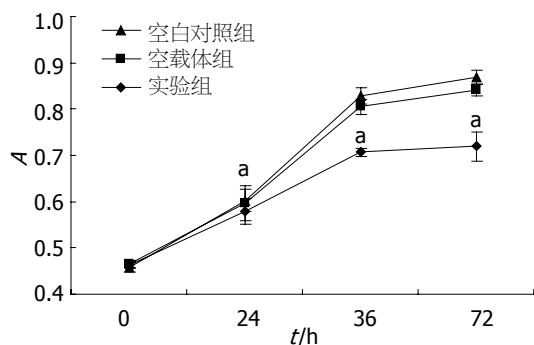


图2 过表达*CDK11p58*基因对INS-1细胞增殖的影响。
* $P < 0.05$ vs 空载体组。

表1 过表达*CDK11p58*基因对INS-1细胞周期的影响 (% mean \pm SD, $n = 3$)

分组	细胞周期		
	G ₁	S	G ₂ /M
实验组	69.87 \pm 1.77 ^b	18.50 \pm 1.64	11.63 \pm 2.50
空载体组	63.03 \pm 2.66	18.90 \pm 1.83	18.03 \pm 4.50
空白对照组	63.63 \pm 2.02	23.33 \pm 1.99	14.00 \pm 2.43

^b $P < 0.01$ vs 空载体组。

资料均采用mean \pm SD表示, 采用 t 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 转染后各组*CDK11p58*基因表达 Western blot结果显示, 转染*CDK11p58*基因48 h后, 与空载体组相比, 实验组INS-1细胞中CDK11P58蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$), 约为空载体组的1.6倍(图1)。

2.2 过表达*CDK11p58*基因对INS-1细胞增殖的影响 转染*CDK11p58*基因24 h后, 与空载体组相比, 实验组INS-1细胞的凋亡率显著增加、存活率在率明显减少($P < 0.05$), 至72 h, 上述变两组间仍存在显著性差异($P < 0.05$, 图2)。

2.3 过表达*CDK11p58*基因对INS-1细胞周期的影响 流式细胞仪检测结果显示, 转染48 h后, 实验组INS-1细胞G₁期细胞比例(69.87 \pm 1.77)上升, 与空载体组(63.03 \pm 2.66)相比存在显著差异($P < 0.01$); 而空载体组G₁期细胞比例与空白对照组(63.63 \pm 2.02)相比无显著差异(表1, 图3)。

3 讨论

2型糖尿病已成为严重威胁人类健康的重大疾病之一, 其发病的主要原因是肥胖、脂质代谢紊乱和炎症等因素引起的机体组织对胰岛素不

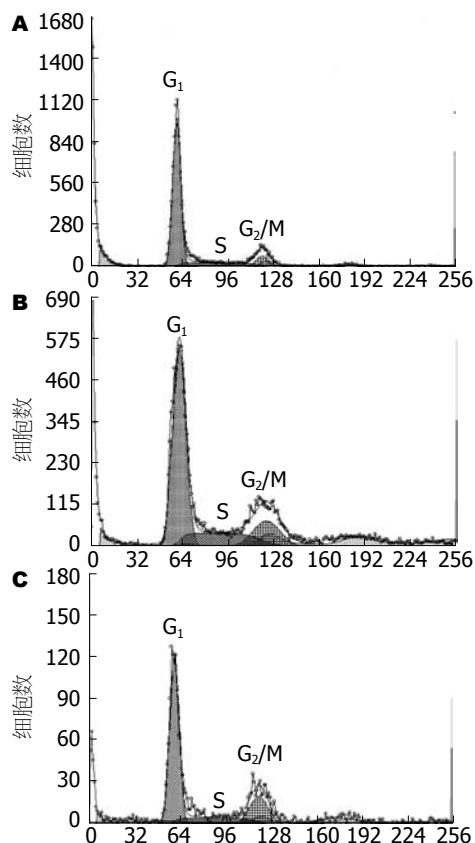


图3 过表达*CDK11p58*基因对INS-1细胞周期的影响. A: 实验组; B: 空载体组; C: 空白对照组。

敏感所致的胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞凋亡引起的胰岛功能受损。目前在2型糖尿病的研究中, β 细胞凋亡的机制受到越来越广泛的重视。

细胞增殖与凋亡密切相关, 细胞周期阻滞后, 机体可通过诱导细胞凋亡来清除体内损伤的细胞, 同时, 细胞凋亡也常伴有细胞生长阻滞。*CDK11(CDC2L2)*是新近发现的中国北方汉族人群2型糖尿病的易感基因, 其与老龄人群2型糖尿病发病的易感性关系密切^[7]。研究表明, 采用高糖条件培养INS-1细胞可引起细胞内糖毒性, 致使 β 细胞出现功能异常, 模拟病理情况^[8-9]。*CDK11p58*基因已被证实参与细胞凋亡事件, 我们在前期的研究中已表明, 过表达*CDK11p58*基因可以引起INS-1细胞的凋亡, 但是其与参与INS-1细胞周期及细胞增殖的调控情况尚不清楚。本实验我们采用高糖培养大鼠胰岛瘤细胞INS-1, 过表达*CDK11p58*基因, 利用MTT及流式细胞仪检测等方法观察*CDK11p58*基因对INS-1细胞细胞周期及增殖的影响。

研究结果显示, 转染48 h后, 与空载体组和空白对照组相比, 实验组INS-1细胞中*CDK11p58*基因表达水平明显升高, 细胞的凋亡

应用要点

本实验的研究结果为进一步探讨*CDK11p58*基因在诱导 β 细胞凋亡及在2型糖尿病发生发展中的作用提供了重要的实验基础。

■同行评价

本文立意有一定的创新性,设计方法尚可,结果可信,但讨论不够深入。

率增加、存活率显著下降,同时,细胞的增殖速度放缓,G₁期的细胞比例显著上升,即部分细胞被阻滞于G₁期。

以上结果表明,CDK11p58基因的过表达可导致INS-1细胞周期的异常,从而引起INS-1细胞的生长受阻、凋亡增加和存活率降低。其作用机制可能是:过表达的CDK11p58基因影响了INS-1细胞内某些细胞周期调控因子的合成,从而导致相应的细胞周期相关蛋白表达异常,使部分INS-1细胞的生长被阻滞于G₁期,不能继续完成正常的分裂过程,进而使进入S期的细胞数目减少,DNA复制合成受阻,细胞增殖速度放缓,从而引起细胞的凋亡和存活率下降。至于CDK11p58基因的过表达能引起INS-1细胞中何种细胞周期调控因子的异常表达还需进一步的实验证明。

本实验的研究结果为进一步探讨CDK11p58基因在诱导胰岛β细胞凋亡及在2型糖尿病发生发展中的作用提供了重要的实验基础。

4 参考文献

- 1 Gururajan R, Grenet J, Lahti JM, Kidd VJ. Isolation and characterization of two novel metalloproteinase genes linked to the Cdc2L locus on human chromosome 1p36.3. *Genomics* 1998; 52: 101-106
- 2 Tsutsui T, Umemura H, Tanaka A, Mizuki F, Hirose

Y, Ohkuma Y. Human mediator kinase subunit CDK11 plays a negative role in viral activator VP16-dependent transcriptional regulation. *Genes Cells* 2008; 13: 817-826

- 3 Yun X, Wu Y, Yao L, Zong H, Hong Y, Jiang J, Yang J, Zhang Z, Gu J. CDK11(p58) protein kinase activity is associated with Bcl-2 down-regulation in pro-apoptosis pathway. *Mol Cell Biochem* 2007; 304: 213-218
- 4 Hu D, Valentine M, Kidd VJ, Lahti JM. CDK11(p58) is required for the maintenance of sister chromatid cohesion. *J Cell Sci* 2007; 120: 2424-2434
- 5 Yokoyama H, Gruss OJ, Rybina S, Caudron M, Schelder M, Wilm M, Mattaj IW, Karsenti E. Cdk11 is a RanGTP-dependent microtubule stabilization factor that regulates spindle assembly rate. *J Cell Biol* 2008; 180: 867-875
- 6 Petretti C, Savoian M, Montembault E, Glover DM, Prigent C, Giet R. The PITSLRE/CDK11p58 protein kinase promotes centrosome maturation and bipolar spindle formation. *EMBO Rep* 2006; 7: 418-424
- 7 Li Y, Wu G, Zuo J, Gao J, Chang Y, Fang FD. Genetic variations of the CDC2L2 gene are associated with type 2 diabetes in a Han Chinese cohort. *Diabetes Metab Res Rev* 2007; 23: 455-461
- 8 Collier JJ, Zhang P, Pedersen KB, Burke SJ, Haycock JW, Scott DK. c-Myc and ChREBP regulate glucose-mediated expression of the L-type pyruvate kinase gene in INS-1-derived 832/13 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E48-E56
- 9 Ubeda M, Rukstalis JM, Habener JF. Inhibition of cyclin-dependent kinase 5 activity protects pancreatic beta cells from glucotoxicity. *J Biol Chem* 2006; 281: 28858-28864

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志名词术语标准

本刊讯 本刊名词术语一律标准化,前后统一,如原词过长且多次出现者,可于首次出现时写出全称加括号内注简称,以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准,药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准,国家食品药品监督管理局批准的新药,采用批准的药名;创新性新药,请参照我国药典委员会的“命名原则”,新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称),如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD₅₀, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误,外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则:(1)有对等词者,直接采用原有英语词,如中风stroke,发热fever;(2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词,如八法eight principal methods;(3)英语中没有对等词或相应词者,宜用汉语拼音,如阴yin,阳yang,阴阳学说yinyangology,人中renzhong,气功qigong;汉语拼音要以词为单位分写,如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸),guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。(常务副总编辑:张海宁 2009-03-28)