

肝炎病毒·分子生物学丛书

# 现代细胞周期分子生物学

成军 主编



科学出版社

www.sciencep.com

研友精英·分子生物学丛书

# 现代细胞周期分子生物学

高 翔 主编



科学出版社  
SCIENCE PRESS

肝炎病毒·分子生物学丛书

# 现代细胞周期分子生物学

成 军 主 编

科 学 出 版 社

北 京

## 内 容 简 介

本书共 38 章,详细介绍了以细胞周期素、细胞周期素依赖性蛋白激酶为核心的细胞周期调节分子的基因结构、表达和调控机制、生物学功能、调控网络、细胞外信号刺激识别、细胞内信号转导,以及上述活动与正常生理过程、疾病状态之间的相互关系等内容。

本书内容翔实、资料新颖,适合从事医学和生物学研究的科研工作者、研究生、本科生等参考使用。

### 图书在版编目(CIP)数据

---

现代细胞周期分子生物学 / 成军主编. —北京:科学出版社,2010.7

(肝炎病毒·分子生物学丛书)

ISBN 978-7-03-027943-9

I. 现… II. 成… III. 细胞生物学—分子生物学—研究 IV. Q7

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 115758 号

---

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

双青印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2010 年 7 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2010 年 7 月第一次印刷 印张:34

印数: 1—2 000 字数:803 000

定价: 138.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

# 肝炎病毒·分子生物学丛书

## 前 言

由甲型肝炎病毒(HAV)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、丁型肝炎病毒(HDV)和戊型肝炎病毒(HEV)等五种肝炎病毒感染引起的急性和慢性肝脏疾病在全球流行,严重影响人类健康,给世界各国带来了沉重的医疗和经济负担,影响深远。最终控制由肝炎病毒感染造成的疾病流行,必须通过综合的防治措施。事实上,作为一类流行病和传染病,通过公共卫生体系和临床医疗体系的共同努力,在一定程度上做出了尝试,并取得了一系列卓有成效的业绩。但是,我们还必须清醒地看到,在世界范围内,肝炎病毒感染引起的肝脏疾病的防治仍然是医学界一项长期的重要任务。

研究肝炎病毒感染引起的急、慢性病毒性肝炎,以及肝硬化(LC)、肝衰竭(LF)和肝细胞癌(HCC),可以有很多可能的切入角度。事实上,近三十年来现代生物学和医学理论与技术的不断发展,也的确为肝炎病毒感染相关性肝病的研究提供了全新的思路。特别是20世纪70年代以来,分子生物学的理论和技术迅猛发展,为肝炎病毒及其相关的肝脏疾病研究,提供了前所未有的推动和支持。因此,在肝炎病毒及其相关的肝脏疾病研究领域中,分子生物学理论和技术的应用,显著促进了肝炎病毒及其相关肝脏疾病的研究进展;同时,这些研究的成果,也进一步丰富了分子生物学理论和技术。因此,利用分子生物学理论和技术研究肝炎病毒及其相关肝脏疾病,始终是近三十年来最为活跃的领域之一。经过三十年的不断探索,肝炎病毒及其相关肝脏疾病领域积累了丰富的研究结果,同时为肝炎病毒感染相关肝脏疾病的治疗和预防提供了新的理论和技术手段,促进了肝炎病毒感染相关肝脏疾病的治疗和预防的进步。有鉴于此,为了更好地总结和利用已经取得的成就,促进这一领域的不断进步,我们与科学出版社一起策划了由八个分册组成的“肝炎病毒·分子生物学丛书”,将陆续出版。

从肝炎病毒感染以后引起的急、慢性肝病,以及迁延不愈造成的肝硬化、肝衰竭、肝细胞癌的发生、发展整个连续的过程,可以人为地分成几个不同的层次和阶段。从病原学角度来看,用分子生物学研究肝炎病毒取得了很大成就;肝炎病毒直接的致病作用不是主要的致病机制,主要是通过免疫学机制;在细胞水平上,细胞凋亡(apoptosis)、细胞自噬(autophagy)和细胞周期(cell cycle)都参与了肝脏疾病的发病机制;肝脏炎症迁延不愈,产生过量的炎症细胞因子引起肝脏中胶原和非胶原糖蛋白代谢紊乱,逐步形成了肝脏纤维化;在诸多因素长期、相互作用的基础上,最终发展为肝细胞癌。这就是肝炎病毒相关的肝脏疾病发展的一个比较完整的过程。分子生物学理论和技术,同时也为分子生物学水平的治疗提供了前所未有的机遇,这就是基因治疗(gene therapy)。因此,为了从病原学、发病机制、细胞学变化、肝脏纤维化、肝细胞癌和分子生物学水平的治疗等阶段全面反映分子生物学理论和技术在肝炎病毒相关性肝脏疾病中的应用和进展,我们为“肝炎病毒·分子生物学丛书”设计了八个

分册,即《现代肝炎病毒分子生物学》、《现代肝炎病毒分子免疫学》、《现代细胞凋亡分子生物学》、《现代细胞自噬分子生物学》、《现代细胞周期分子生物学》、《现代细胞外基质分子生物学》、《现代肿瘤基因分子生物学》、《现代基因治疗分子生物学》。事实上,我们为这一计划已努力了18年之久。1993年,我们出版了这一系列的第一部专著《基因治疗》(学苑出版社),之后陆续出版了《现代肝炎病毒分子生物学》(人民军医出版社,1997)、《程序化细胞死亡与疾病》(北京医科大学出版社,1997)、《细胞外基质的分子生物学与临床疾病》(北京医科大学、协和医科大学联合出版社,1999)、《肿瘤相关基因》(北京医科大学、协和医科大学联合出版社,2000)。这些专著的顺利出版,为“肝炎病毒·分子生物学丛书”奠定了坚实基础。2009年,在科学出版社领导的关怀下,我们计划将八个分册陆续出齐,以形成“肝炎病毒·分子生物学丛书”的完整体系。2009年安排了《现代肝炎病毒分子生物学》(第二版)出版,2010年出版《现代细胞周期分子生物学》,2011年出版《现代肝炎病毒分子免疫学》和《现代细胞自噬分子生物学》,2012年出版《现代细胞凋亡分子生物学》(第二版)和《现代细胞外基质分子生物学》(第二版),2013年出版《现代肿瘤基因分子生物学》(第二版)和《现代基因治疗分子生物学》(第二版),从而最终完成“肝炎病毒·分子生物学丛书”八个分册的出版。在时机适当的时候,对每个分册陆续再版更新,以维持这套丛书不断更新的活力状态。

这一丛书的策划和出版,有幸得到了该领域内知名专家的肯定和鼓励。中国工程院院士庄辉教授、田波教授,肝病领域的资深专家斯崇文教授、徐道振教授、陈菊梅教授、翁心华教授欣然担任这套丛书的学术委员会委员,对这一套丛书的出版进行学术指导,从而保证了这一套丛书的学术质量。科学出版社也已将“肝炎病毒·分子生物学丛书”列为出版社的重点出版计划。相信这一计划将会取得圆满成功,丛书的出版也将会促进这一领域的进展。

这套丛书能够顺利出版,首先要感谢我的三位恩师:陈菊梅教授、斯崇文教授、Peter C. Melby教授,他们在我攻读硕士、博士学位以及进行博士后研究阶段给予了我无私帮助和悉心教育,他们的品德和修养、他们的胸怀和学识,永远是我学习的榜样。1997年我从美国得克萨斯大学完成博士后研究回国以来,在肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制研究方向上,共指导了120名硕士生、博士生及博士后研究人员。十几年的无数个日日夜夜,我们研究肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制,为之奋斗,为之痴狂,无怨无悔。感谢我的学生们的勤奋探索,使我有机会系统研究肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制。感谢无数个曾经在我人生的各个阶段给予我重要帮助的领导、师长、朋友和同事。没有他们的帮助,我就不能很好地学习和理解肝炎病毒的分子生物学致病机制,就不能很好地研究我将会为之奋斗一生的肝炎病毒和病毒性肝炎相关的课题。

一套信息量庞大的丛书的出版是一件十分艰难的事情,也是一项遗憾的艺术。面对陆续出版的分册,我们百感交集。一方面为我们取得的一点成绩而沾沾自喜,同时也为各个分册中存在的缺点乃至错误而惶恐不安。我们殷切期望本丛书的热心读者,能够直率地指出我们每一个分册中存在的问题和谬误,以便在再版时不断加以改进,共同促进分子生物学理论和技术在肝炎病毒和病毒性肝炎领域中的应用,为最终控制肝炎病毒感染及其相关的肝脏疾病而不断奋斗。

成军 博士、教授

首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所

2010年6月于北京

# 前 言

细胞的分裂(division)与死亡(death)是生命活动中的重要过程,其意义深远而广泛,涉及生物的发育(development)、生长(growth)、分化(differentiation)、衰老(aging)、疾病(disease)及环境应激(stress)等各个环节,而且是所有生物的共同特征。在这一系列的生命活动中,细胞周期(cell cycle)是生物学领域长期以来最引人关注的现象,与细胞坏死(necrosis)、细胞凋亡(apoptosis)、细胞自噬(aotuphagy)一样,都是重要的生命科学分支。

细胞周期是一个古老的概念。但是,在早期阶段,细胞周期研究得更多的是一个形态生物学概念,着重于细胞分裂过程中形态学特征和变化规律的描述。细胞周期的研究,其主要内容就是借助显微镜(尤其是电子显微镜)的细胞形态学研究,包括纺锤体、中心粒的形成等重要环节。随着分子生物学理论和技术的不断发展,特别是一系列细胞周期素(cyclin)、细胞周期素依赖性蛋白激酶(cyclin-dependent kinase, Cdk)基因的克隆化成功,细胞周期的研究进入了分子生物学阶段。因此,细胞周期分子生物学与经典的以细胞周期形态学为主要内容的概念有着本质的区别。

以细胞周期素、细胞周期素依赖性蛋白激酶为核心的一系列细胞周期调节分子,其基因的结构与功能、表达与调控、生物学功能、相互调控的网络、识别细胞外信号的刺激与细胞内的信号转导,以及这些活动与正常的生理过程、疾病状态之间的相互关系,构成了目前细胞周期分子生物学的主要内容。

本专著在详细介绍细胞周期素、细胞周期素依赖性蛋白激酶及其调节因素的基础上,详细阐述细胞周期分子生物学与生理过程和疾病状态的相互关系,希望细胞周期这个“老兵”有一个“新传”。由于编者对于这部分内容的认识肤浅、水平有限,在编写过程中难免存在不足甚至谬误之处,恳请广大读者给予批评指正。

成军 博士、教授

首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所

2010年3月于北京

# 目 录

<b>第一章 细胞周期素 A</b> .....	(1)
第一节 细胞周期素 A 的结构与功能 .....	(1)
第二节 细胞周期素 A 与转录因子 E2F .....	(8)
第三节 细胞周期素 A 与病毒蛋白调节 .....	(11)
<b>第二章 细胞周期素 B</b> .....	(18)
第一节 细胞周期素 B 的结构与功能 .....	(18)
第二节 细胞周期素 B/Cdk 复合物的功能与调节 .....	(25)
<b>第三章 细胞周期素 C</b> .....	(35)
第一节 细胞周期素 C 的结构 .....	(35)
第二节 细胞周期素 C 的基因表达及蛋白质水平调节 .....	(36)
第三节 与细胞周期素 C 结合的细胞周期素依赖性激酶 .....	(37)
第四节 细胞周期素 C 的作用 .....	(38)
第五节 细胞周期素 C 与疾病 .....	(42)
<b>第四章 细胞周期素 D</b> .....	(45)
第一节 细胞周期素 D 的结构及表达分布 .....	(45)
第二节 细胞周期素 D 的功能及作用机制 .....	(47)
第三节 细胞周期素 D 与疾病 .....	(53)
<b>第五章 细胞周期素 E</b> .....	(59)
第一节 细胞周期素 E 的结构与功能 .....	(59)
第二节 细胞周期素 E/Cdk 复合物的功能与调节 .....	(63)
<b>第六章 细胞周期素依赖性激酶 1</b> .....	(74)
第一节 Cdk1 基因及编码产物 .....	(75)
第二节 Cdk1 基因的染色体定位 .....	(76)
第三节 Cdk1 蛋白的亚细胞定位 .....	(76)
第四节 Cdk1 基因表达的调节 .....	(76)
<b>第七章 细胞周期素依赖性激酶 2</b> .....	(80)
第一节 Cdk2 的基因结构与功能 .....	(80)
第二节 Cdk2 的功能与调节 .....	(85)
<b>第八章 细胞周期素依赖性激酶 3</b> .....	(96)
第一节 Cdk3 的发现 .....	(96)
第二节 Cdk3 与细胞周期 .....	(97)



第三节	Cdk3 与细胞周期素	(99)
第四节	Cdk3 与细胞周期依赖性蛋白激酶抑制物	(99)
第五节	Cdk3 与疾病	(99)
第六节	展望	(100)
<b>第九章</b>	<b>细胞周期素依赖性激酶 4</b>	<b>(103)</b>
第一节	Cdk4 的基因结构与蛋白晶体结构	(103)
第二节	Cdk4 的功能与调节	(105)
第三节	Cdk4 抑制剂与肿瘤治疗	(113)
<b>第十章</b>	<b>细胞周期素依赖性激酶 5</b>	<b>(117)</b>
第一节	概述	(117)
第二节	Cdk5 的调节分子	(118)
第三节	Cdk5 在神经系统发育中的生物学功能及其与疾病的关系	(121)
第四节	Cdk5 在细胞周期调节中的作用及其机制	(125)
<b>第十一章</b>	<b>细胞周期素依赖性激酶 6</b>	<b>(130)</b>
第一节	概述	(130)
第二节	Cdk6 与细胞周期	(131)
第三节	Cdk6 的功能及其与细胞周期的关系	(133)
第四节	Cdk6 的药物开发及在疾病诊断中的应用展望	(138)
<b>第十二章</b>	<b>细胞周期素调节</b>	<b>(141)</b>
第一节	细胞周期素的产生	(141)
第二节	细胞周期素的降解	(145)
第三节	细胞周期素的作用	(149)
<b>第十三章</b>	<b>细胞周期素依赖性激酶调节</b>	<b>(157)</b>
第一节	细胞周期素与 Cdk 的结合	(157)
第二节	Cdk 分子 Thr161/160 位点的修饰	(160)
第三节	Cdk 分子 Thr14/Tyr15 位点的修饰	(164)
<b>第十四章</b>	<b>细胞周期抑制蛋白 p15</b>	<b>(173)</b>
第一节	概述	(173)
第二节	p15 蛋白抑制细胞周期的机制	(174)
第三节	p15 基因失活的机制	(175)
第四节	p15 与肿瘤相关疾病	(175)
<b>第十五章</b>	<b>细胞周期抑制蛋白 p16</b>	<b>(179)</b>
第一节	p16 基因的发现与结构特点	(179)
第二节	p16 蛋白与细胞周期调节	(180)
第三节	p16 基因异常与肿瘤	(180)
第四节	p16 基因与细胞衰老	(181)
<b>第十六章</b>	<b>细胞周期抑制蛋白 p19</b>	<b>(184)</b>
第一节	p19 的基因结构及功能	(184)
第二节	p19 与干细胞的自我更新	(185)

第三节	p19 与细胞周期 .....	(186)
第四节	p19 与细胞凋亡 .....	(190)
第五节	p19 与生长发育 .....	(191)
第六节	p19 与肿瘤 .....	(193)
第七节	p19 与衰老 .....	(199)
<b>第十七章</b>	<b>细胞周期抑制蛋白 p21</b> .....	(203)
第一节	概述 .....	(203)
第二节	p21 蛋白与细胞周期调节 .....	(204)
第三节	p21 的其他生物学活性 .....	(209)
第四节	p21 与肿瘤 .....	(212)
<b>第十八章</b>	<b>细胞周期抑制蛋白 p27</b> .....	(217)
第一节	p27 的生物学特征 .....	(217)
第二节	p27 的生物学功能 .....	(218)
第三节	p27 与细胞周期 .....	(218)
第四节	p27 表达的调控机制 .....	(220)
第五节	p27 在肿瘤中的相关研究 .....	(222)
第六节	总结与展望 .....	(223)
<b>第十九章</b>	<b>细胞周期抑制蛋白 p53</b> .....	(226)
第一节	概述 .....	(226)
第二节	p53 与细胞周期 .....	(230)
第三节	生长阻滞还是细胞凋亡 .....	(237)
第四节	结束语 .....	(238)
<b>第二十章</b>	<b>细胞周期抑制蛋白 pRB</b> .....	(242)
第一节	pRB 蛋白家族 .....	(242)
第二节	pRB 蛋白与细胞周期调控 .....	(243)
第三节	pRB 与细胞信号转导通路 .....	(245)
第四节	pRB 与肿瘤发生 .....	(247)
第五节	pRB 蛋白和抗代谢药物 .....	(251)
<b>第二十一章</b>	<b>细胞周期抑制蛋白 p107</b> .....	(256)
第一节	p107 及 pRB 蛋白家族 .....	(256)
第二节	p107 与肿瘤 .....	(258)
第三节	p107 蛋白与细胞周期调控 .....	(261)
第四节	p107 与相关因子调控细胞周期 .....	(263)
<b>第二十二章</b>	<b>泛素与泛素连接酶</b> .....	(272)
<b>第二十三章</b>	<b>CAK 与细胞周期调节</b> .....	(285)
第一节	概述 .....	(285)
第二节	CAK 的调控功能和机制 .....	(287)
第三节	CAK 自身活性的调节 .....	(290)
第四节	CAK: 药物靶点 .....	(291)

第五节 问题与展望	(292)
<b>第二十四章 INH/PP2A 与细胞周期调节</b>	(295)
第一节 INH/PP2A	(295)
第二节 INH/PP2A 与细胞周期调节	(300)
<b>第二十五章 细胞周期的转变及检验点</b>	(313)
第一节 细胞周期的转变	(313)
第二节 细胞周期的检验点	(320)
<b>第二十六章 癌基因与细胞周期调节</b>	(329)
第一节 癌基因、原癌基因与肿瘤的耐药基因	(329)
第二节 癌基因与细胞周期调节	(338)
<b>第二十七章 病毒蛋白与细胞周期调节</b>	(345)
<b>第二十八章 DNA 甲基化与细胞周期调节</b>	(350)
第一节 细胞 DNA 甲基化和表观遗传学修饰	(350)
第二节 DNA 甲基化的起源和机制	(351)
第三节 RNAi 与基因组甲基化	(352)
第四节 DNA 甲基化致转座元件沉默	(354)
第五节 甲基化在复制叉遗传中的作用	(354)
第六节 甲基化在肿瘤细胞周期中的作用	(355)
第七节 DNA 甲基化和 microRNA 对细胞周期的影响	(356)
第八节 去甲基化作用在细胞周期中的作用	(357)
第九节 甲基化与早期胚胎形成中遗传印记的维持	(359)
第十节 小结	(360)
<b>第二十九章 反义技术与细胞周期</b>	(362)
第一节 反义分子的类型	(362)
第二节 反义分子的作用原理	(365)
第三节 反义技术的应用	(367)
<b>第三十章 蛋白质糖基化修饰与细胞周期调控</b>	(371)
第一节 糖基化修饰的基本生物学功能	(371)
第二节 O-GlcNAc 修饰与细胞周期调控	(372)
第三节 其他类型的糖基化修饰对细胞周期的影响	(374)
第四节 Notch 信号系统糖基化修饰与细胞周期调控	(375)
第五节 细胞周期对糖基化修饰及蛋白穿行的影响	(378)
<b>第三十一章 微小 RNA 与细胞周期调节</b>	(382)
第一节 微小 RNA 的结构与功能	(382)
第二节 微小 RNA 与细胞周期调节	(390)
<b>第三十二章 端粒酶与细胞周期调节</b>	(405)
第一节 端粒与端粒酶	(405)
第二节 端粒酶在细胞周期中对细胞增殖及凋亡的影响	(408)
第三节 端粒相互作用蛋白与端粒	(413)

<b>第三十三章 细胞因子与细胞周期调节</b> .....	(421)
第一节 细胞因子概述.....	(421)
第二节 细胞周期调控概述.....	(423)
第三节 细胞因子受体信号转导与调控.....	(425)
第四节 细胞因子与细胞周期调节.....	(428)
<b>第三十四章 活性氧与细胞周期调节</b> .....	(433)
第一节 氧化应激与活性氧.....	(433)
第二节 ROS 调控细胞周期.....	(453)
<b>第三十五章 细胞程序化死亡与细胞周期</b> .....	(461)
第一节 细胞程序化死亡的概念与机制.....	(461)
第二节 细胞周期与细胞程序化死亡的关系.....	(469)
<b>第三十六章 细胞自噬与细胞周期</b> .....	(476)
第一节 细胞死亡的分类.....	(476)
第二节 自噬的形态学特点和分类.....	(478)
第三节 自噬相关基因.....	(480)
第四节 自噬的分子机制.....	(482)
第五节 自噬过程中的信号转导途径.....	(484)
第六节 自噬的功能.....	(486)
第七节 自噬的检测方法.....	(488)
第八节 细胞自噬与细胞周期.....	(489)
<b>第三十七章 细胞周期与肿瘤</b> .....	(497)
第一节 肿瘤的诱生因素.....	(497)
第二节 细胞周期与肿瘤的发生.....	(503)
<b>第三十八章 细胞周期与基因治疗</b> .....	(512)
第一节 基因治疗的概念.....	(512)
第二节 基因治疗的策略.....	(513)
第三节 基因治疗的条件.....	(514)
第四节 基因治疗的程序.....	(519)
<b>索引</b> .....	(524)

# 第一章 细胞周期素 A

细胞周期素、细胞周期素依赖性激酶及其结合成的复合物形式,位于细胞周期调节的中心。细胞周期素及细胞周期素依赖性激酶种类很多,在细胞周期调节中的地位和作用不同,而且大部分是细胞周期阶段特异性的。人细胞中的细胞周期素 A(cyclin A)即为其中的一种。Wang 等在研究人原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)的发病机制时,发现乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)DNA 整合的位点可以将一种基因插入并打断。从序列分析研究表明,这种基因序列与果蝇(*Drosophila*)等的细胞中所克隆的细胞周期素 A 具有很高的同源性(homology)。因此,从正常的肝细胞 cDNA 文库(library)中克隆了正常的人细胞周期素 A 的 cDNA,对于细胞周期素 A 在细胞周期调节中的作用以及在肿瘤发生、发展中的作用有了进一步的认识。

细胞周期素 A 是蛋白激酶的一个组成成分,参与细胞周期的调节,在细胞周期的 G<sub>2</sub> 期和 S 期具有不同的功能。在 G<sub>2</sub> 期与 S 期不同的阶段分别与 p34<sup>cdc2</sup> 和 p33<sup>Cdk2</sup> 结合成具有蛋白激酶活性的复合物,参与细胞周期的调节。细胞周期素 A 还可与细胞的转录因子(transcription factor)E2F 结合并对其产生影响,而且是细胞周期阶段依赖性的一种方式。从细胞周期 S 期分离到的细胞周期素 A 复合物,其组成成分除了细胞周期素 A 及 p33<sup>Cdk2</sup> 之外,还有 p107 这种 pRB 家族的成员蛋白质成分。SV40 病毒、腺病毒(adenovirus)以及人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)等类型的病毒蛋白与细胞周期素 A 的功能调节有关,并参与不死性细胞系及肿瘤形成的过程。

## 第一节 细胞周期素 A 的结构与功能

细胞周期素 A 的 cDNA 首先从正常的人肝细胞 cDNA 文库中克隆成功。其结合的细胞周期依赖性激酶蛋白质分子类型在不同的细胞周期阶段是不同的,在 G<sub>2</sub> 期与 p34<sup>cdc2</sup> 结合,在 S 期与 p33<sup>Cdk2</sup> 结合,参与 S 期、G<sub>1</sub>/S 期及 G<sub>2</sub> 期的调控。pRB 蛋白的家族成员参与细胞周期素 A、p34<sup>cdc2</sup> 或 p33<sup>Cdk2</sup> 复合物的形成,与转录因子 E2F 的活性调节有密切的关系,并通过增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)对细胞的 DNA 合成等活动进行调控。细胞周期素 A 是细胞周期调节的一种重要蛋白质分子。

### 一、细胞周期素 A 的基因结构

Wang 等对一例极早期高度分化的原发性肝细胞癌(primary hepatocellular carcinoma, PHC)的细胞进行了研究。此例肝癌不伴有肝硬化(liver cirrhosis, LC),血清中的乙型肝炎病毒表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)呈阳性。从此例患者的肿瘤及非肿瘤组织中提取制备了 DNA,以 HBV DNA 作为探针进行 Southern 吸印杂交,在非肿瘤组织

中仅发现游离状态的 HBV DNA,但肿瘤细胞提取的 DNA 则呈单一的杂交带型。以肿瘤细胞 DNA 构建了文库,对 HBV 前病毒(provirus)DNA 及其侧翼的细胞 DNA 的序列进行了测定。整合的 HBV DNA 序列中不包含重复序列(repetitive sequence),而且未发现基因重排(gene rearrangement)。病毒-细胞 DNA 的连接处都位于 HBV DNA 双链的黏性末端区(cohesive ends region),即 HBV DNA 1840、1617 位核苷酸的位置上,分别位于 HBV DNA 核心基因及 X 基因的开放读码框架(open reading frame, ORF)之内。以这种病毒-细胞连接的 DNA 片段作为探针,从正常的肝细胞 cDNA 文库中克隆了 HBV DNA 插入并打断的基因序列,序列分析表明是细胞周期素 A 的 cDNA 克隆。

人细胞周期素 A cDNA 全长为 1649 个核苷酸,含有单一的 ORF,编码的人细胞周期素 A 由 432 个氨基酸残基组成,计算分子质量为 48 536Da,ORF 中 AUG 上游 30bp 处有一个终止密码子(stop codon)。此 cDNA 中并不包含多聚腺苷酸(poly A)信号序列。对克隆的人细胞周期素 A cDNA 序列进行计算机分析,发现从其蛋白质分子羧基末端的部分,即 210~359 氨基酸残基部分大约由 150 个氨基酸残基组成的一段多肽序列,即为典型的细胞周期素盒(cyclin box)结构。将人细胞周期素 A 的细胞周期素盒结构与其他类型的细胞周期素的相应序列进行比较分析,表明 150 个氨基酸残基中有 77 个是保守的。因此,细胞周期素 A 基因在进化过程中是一高度保守的基因类型。150 个氨基酸残基中仅 54 个氨基酸残基与细胞周期素 B 蛋白质分子相同。细胞周期素 A 的氨基末端部分的序列,与已知的蛋白质序列没有显著的同源性。在人细胞周期素 A 蛋白质一级结构中发现了 3 个 Lys-Tyr、3 个 Lys-Lys 及 1 个 Arg-Arg 序列,提示细胞周期素 A 蛋白质可被胰蛋白酶(trypsin)样蛋白裂解酶类消化裂解。事实上,细胞周期素 A 与其他类型的细胞周期素一样,其降解过程是一种泛素(ubiquitin)依赖性的蛋白降解过程。细胞周期素 A 的产生与降解速度平衡的结果,决定其在细胞周期各个阶段的浓度及作用地位。

## 二、细胞周期素 A 的亚细胞分布

人细胞周期素 A mRNA 在肝脏中有 1.8 kb 与 2.7 kb 两种形式,编码一种分子质量为 48 kDa 的蛋白质分子。细胞周期素 A 蛋白虽然在细胞的其他组分中也发现了它的存在,但主要的亚细胞分布(subcellular localization)是细胞核。因此,细胞周期素 A 是一种核蛋白。

Castro 等采用部分肝切除(partial hepatectomy)方法刺激大鼠肝细胞的增殖,并对其中的细胞周期素 A 与 Cdk2 蛋白在肝细胞中的亚细胞定位进行了研究。以 Western 免疫杂交分析表明,细胞周期素 A 从肝切除以后 6 小时,即 G<sub>1</sub> 期即开始表达,肝切除 18 小时即 S 期达到最高水平。Cdk2 蛋白也是 G<sub>1</sub> 期表达水平开始升高,S 期达到最高水平。细胞周期素 A 主要位于微粒体(microsome)中,但细胞浆、质膜以及细胞核中都发现了细胞周期素 A 的存在。从微粒体中可以分离到具有蛋白激酶活性的 Cdk2/cyclin A 复合物,而且这种微粒体中的复合物形式,也以抗-Cdk2 抗体的免疫沉淀(immunoprecipitation)法得到了证实。因此,认为 Cdk2/cyclin A 复合物与细胞的 DNA 合成活动有关,而且与 S 期的细胞微粒体的功能是分不开的。

Pines 等应用免疫荧光染色(immunofluorescence staining)技术对细胞周期素 A 与 B1 的亚细胞分布进行了研究。在人原代成纤维细胞和上皮肿瘤细胞中,从 S 期开始细胞周期素 A 主要存在于核中。但细胞周期素 B1 主要位于细胞浆中,只有在有丝分裂开始时才进

人到细胞核中。细胞周期素 A 在细胞分裂中期(metaphase)开始降解,而细胞周期素 B1 则在细胞分裂中期向细胞分裂间期(anaphase)转变时开始降解。免疫沉淀等技术研究表明,细胞周期素 A 与 B1 都与含有 PSTAIRE 结构的蛋白质分子有关。细胞核中的细胞周期素 A 可以与 33kDa 的含有 PSTAIRE 结构的 Cdk 蛋白质分子结合,但位于细胞浆中的细胞周期素 A 则不能与之结合。因此,认为细胞周期素 A 与 B1 不同的亚细胞分布决定了这两种有丝分裂细胞周期素(mitotic cyclin)可以与不同的 Cdk 分子结合,对细胞周期具有不同的调控作用。为了研究细胞周期素 A 与 B1 具有不同的亚细胞分布的机制,构建了一系列的缺失突变体以及两种细胞周期素的嵌合体(chimera),体外转染培养的细胞进行瞬时表达研究。结果发现,细胞周期素 B1 的氨基末端的一段由 42 个氨基酸残基组成的片段区可使正常情况下位于细胞核中的细胞周期素 A 迟滞于细胞浆中。同样道理,从细胞周期素 B1 分子中将胞浆迟滞信号区(cytoplasmic retention signal region)缺失之后,细胞周期素 A 则进入细胞核中。细胞周期素 B2 中有关胞浆迟滞信号区片段位于细胞周期素盒结构之外,但这一段序列却是高度保守的一级结构。细胞周期素 B2 分子中的这一结构足以使其分布于胞浆中,而且也是其亚细胞分布所必需的结构。细胞周期素 B 则仍留在胞浆中,因为细胞周期素 A 与 B 的分子结构不同,后者分子中氨基末端的 42 个氨基酸残基序列是将其固定在胞浆中的结构基础。

细胞周期素 A 是一种核蛋白,与 p34<sup>cdc2</sup> 或 p33<sup>Cdk2</sup> 形成一种激酶复合物,并与真核细胞 G<sub>1</sub>/S 以及 G<sub>2</sub>/M 期的转变(trassition)有着极为密切的关系。为了研究细胞周期素 A 与 DNA 复制(replication)之间的关系,对处于指数生长期的 HeLa 细胞中细胞周期素 A 核增殖细胞核抗原进行了双重染色,结果表明细胞周期素 A 位于 DNA 复制的位点。因而推测细胞周期素 A 及其与 p34<sup>cdc2</sup>/p33<sup>Cdk2</sup> 分子形成的激酶复合物,对于 DNA 复制位点区蛋白质的磷酸化修饰具有十分重要的作用。研究者克隆了鸡细胞周期素 A 的 cDNA,并构建了一系列的缺失突变表达载体,发现细胞周期素 A 的氨基末端 100 个以上的氨基酸残基的缺失突变都不会影响细胞周期素 A 的细胞核内分布的性质,但羧基末端的缺失突变范围达 15 个氨基酸残基之后,或细胞周期素盒结构的部分缺失突变,都将会改变细胞周期素 A 在细胞核中分布的性质。这一结果表明,细胞周期素 A 的细胞核分布的性质决定于其与 Cdk 分子进行结合的结构区域的完整性。

### 三、细胞周期素 A 基因的表达调控

在细胞周期的调节中,Cdk 分子的水平在细胞周期的各个阶段变化不大,其活性调节主要是借助于与细胞周期素分子结合,Thr14/Tyr15 以及 Thr160/161 位点上的磷酸化(phosphorylation)及去磷酸化(dephosphorylation),以及 Cdk 激酶的抑制剂(Cdk kinase inhibitor,CKI)作用等几个方面来决定的,但细胞周期素水平的变化则非常显著。决定细胞周期素水平的两个因素是产生速度与降解速度,细胞周期素 A 的降解过程也是一种泛素依赖性蛋白质降解的过程,因而细胞周期素 A 基因的表达调控也是决定其实际水平的一个重要因素。

为了研究细胞周期素 A 基因表达调控特点,Nakamura 等从人的基因组文库(genomic library)中,以人细胞周期素 A cDNA 的 5'-末端部分为探针,克隆了细胞周期素 A 基因 -1036~+30 一段的基因序列。应用计算机分析,-800~+1 一段的调节序列中,分别发

现了 Oct1、Sp1、ATF、C/EBP 和 p53 等转录因子(TF)的结合位点核苷酸序列区。同时,以氯霉素乙酰化酶(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)编码基因作为一种报道基因(reporter gene),与细胞周期素 A 基因编码区上游部分构建了一系列不同程度突变的表达载体,转染未分化的睾丸生殖细胞肿瘤细胞系 NEC14,以 CAT 表达水平对细胞周期素 A 基因结构中的启动子(promoter)序列进行了研究。结果表明,-608~+1 一段核苷酸序列对于细胞周期素 A 的表达是必需的结构部分,当缺失突变进一步达到-259 位核苷酸上时,其启动子活性则下降一半,而缺失突变到-194 位上的核苷酸上时,基本上测不到启动子的活性。这一结果表明,-258~-194 核苷酸之间的序列含有细胞周期素 A 基因启动子转录的正性调节因子。这一段序列中含有 ATF/CRE 结构以及 CAAT 盒式结构,而-1100~+1 之间的序列作为启动子时,报道基因的表达水平比以-608~+1 之间的序列作为启动子时的表达水平还要低。

以诱导 NEC14 细胞系进行分化的药物处理 48 小时之后,细胞周期素 A 的转录水平则显著下降,仅相当于处理前的 1/10。应用报道基因以及 DNA-蛋白相互作用的研究方法,对细胞周期素 A 基因中启动子序列有关负调控的部分进行了研究。证明-608~-259 核苷酸之间的一段序列含有 3 个 GC 盒式结构,可使启动子的活性降低一半。当缺失突变达-194 位置上的核苷酸时,破坏了 ATF/CRE 位点,则可使启动子活性降低十分之一。上述序列与分化状态 NEC14 细胞中细胞周期素 A 启动子活性的负调控有关。从分化与未分化的细胞中分离的 DNA-蛋白质复合物,以检查 ATF/CRE 位点的功能,结果有相同的足迹(footprint)。以 ATF-1 和 ATF-2 的特异性抗体进行迁移(shift)实验,证明未分化的 NEC14 细胞中 ATF-1 与 ATF-2 两种转录因子都减少。ATF/CRE 位点以及 GC 盒式结构都与细胞周期素 A 的启动子正性调控有关。

ets-2 是一种转录因子,与细胞增殖、细胞分化以及发育过程中相关的基因表达调控有关。p34<sup>cdc2</sup> 蛋白激酶是哺乳动物细胞发生有丝分裂的重要调节因子,ets-2 可以反式激活(transactivation)这种 p34<sup>cdc2</sup> 的编码基因。这种反式激活的过程中含多个 ets-2 转录因子蛋白质分子与 cdc2 基因启动子区结合。持续表达 ets-2 的 BALB/c3T3 成纤维细胞系在 10% 或 0.5% 浓度的血清培养基中进行培养,cdc2 相关的组蛋白 H1 激酶活性与对照组的细胞相比显著升高。这种 cdc2 激酶活性的升高与细胞周期素 A 的表达水平升高有关,但与细胞周期素 B1 无关。以 ets-2 基因转导的 BALB/c 3T3 细胞可以在含有低浓度血清的培养基中生长,但未用 ets-2 基因转导的细胞则不能生长。因此,ets-2 直接参与了 cdc2 基因表达的正调节,同时可促使细胞周期素 A 的表达水平升高。

转化生长因子  $\beta 1$ (transforming growth factor  $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ ) 是一种细胞生长的抑制因子,其机制是参与细胞周期的调控,其中包括了对 B-myb 原癌基因(proto-oncogene)以及细胞周期素 A 表达的直接抑制作用。Satterwhite 等以 TGF- $\beta 1$  处理小鼠角质细胞(mouse keratinocyte, MK)以及水貂肺上皮细胞 Mv1Lu,可出现 G<sub>1</sub> 晚期的细胞周期阻滞。以 Northern 吸印杂交技术检测,证明 TGF- $\beta 1$  可以抑制 B-myb 及细胞周期素 A 在两种细胞系中的转录表达水平,并认为对于 B-myb 及细胞周期素 A 的转录表达抑制是 TGF- $\beta 1$  对细胞生长抑制的重要机制之一。此外,蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)可以抑制血管内皮细胞的增生,对其中的细胞周期素 A 表达水平进行研究,发现细胞周期素 A 的表达水平降低,可能是 PKC 抑制血管内皮细胞生长的机制。



电离辐射(ionizing radiation)可以诱导哺乳动物发生  $G_2$  期阻滞。因为有丝分裂细胞周期素是诱导细胞从  $G_2$  期向有丝分裂期转变所必需的,因此,Muschel 等对经辐射的 HeLa 细胞中的细胞周期素表达水平的变化进行了研究。在处于正常细胞周期的细胞中,细胞周期素 A 与 B 的 mRNA 与蛋白质水平都是在  $G_2$ /M 期显著升高,有丝分裂期完成以后也随之下降。细胞周期素 A 的 mRNA 转录水平的升高位于 S/ $G_2$  交界点,较细胞周期素 B mRNA 的转录水平升高稍早。尽管细胞周期素 A 的 mRNA 及蛋白表达高峰具有相当的重叠,但前者表达水平仍然稍稍早于后者。将处于 S 期的细胞电离辐射之后,细胞周期素 A mRNA 以及蛋白质的表达水平与对照组的细胞是一样升高,但最终还是对照组未照射的细胞中 mRNA 及蛋白质水平更高一些。电离辐射之后,细胞周期素 mRNA 水平及蛋白质水平高峰一直保持到整个  $G_2$  期过程。相反,细胞周期素 B 的 mRNA 以及蛋白质水平在  $G_2$ /M 期并不升高,只有当细胞即将结束  $G_2$ /M 期时才升高到未照射的细胞中细胞周期素 B 的表达水平。细胞周期素 B 的 mRNA 及蛋白质表达水平下降的程度与辐射剂量成反比。这一结果表明,电离辐射所引起的  $G_2$  期阻滞,似乎是在细胞周期素 A 产生之后,细胞周期素 B 基因完全表达之前,直到细胞周期素 B 又重新表达之后才可以克服这种细胞周期阻滞。因此,细胞周期素 A 与细胞周期素 B 两种基因的表达对于细胞受到电离辐射的应答方式是不一样的,细胞周期素 A 可正常地升高,甚至高于对照组的水平,而细胞周期素 B 的表达则可有暂时延迟。

#### 四、细胞周期素 A 结合的 Cdk

细胞周期素与 Cdk 分子结合成复合物形式才具有蛋白激酶的催化作用。与细胞周期素 A 结合的 Cdk 分子有两种,包括  $p34^{cdc2}$  和  $p33^{Cdk2}$ 。细胞周期素 A 在不同阶段具有不同的表达水平,与  $p34^{cdc2}$  或  $p33^{Cdk2}$  结合成复合物形式,具有组蛋白  $H_1$  激酶的活性,催化一系列蛋白质的磷酸化修饰,参与细胞周期的调节。

Roy 等对细胞周期素 A 激活  $p34^{cdc2}$  的作用进行了研究,首先以杆状病毒(baculovirus)载体表达出 clam 细胞的细胞周期素 A 及 B 两种蛋白质。将这两种重组的细胞周期素加入到减数分裂的爪蟾卵细胞中,可以诱导减数分裂(meiosis) I 期与 II 期,没有蛋白质的合成情况下也能完成这种诱导过程。细胞周期素 A 与 B 半数最大诱导的浓度分别为 50nmol/L 及 250nmol/L。向处于细胞周期阻滞的爪蟾卵母细胞提取物中加入 25nmol/L 的细胞周期素 A 则可以激活  $cdc2$  蛋白激酶,达到细胞分裂中间的水平,可以刺激细胞进行一个完整的细胞周期。更高水平的细胞周期素 A 可导致  $cdc2$  激酶的过度激活,使细胞在细胞周期的一个时间点上出现阻滞状态。细胞周期 A 的动力学研究表明,加入细胞周期素 A 之后,对蛋白激活过程所需的 10 分钟退滞期没有什么影响,对于其最高活性的维持时间也没有太大的影响。但是,加入的细胞周期素 A 却对于有丝分裂期即将完成时的  $cdc2$  蛋白激酶的灭活(deactivation)速度一定的影响。另外,加入的外源重组的 clam 细胞周期素 A 可以抑制爪蟾细胞内源性细胞周期素 A 和 B 的降解过程,证明细胞周期素 A 结合与激活的 Cdk 分子之一是  $p34^{cdc2}$ 。

Cdk 分子的激活需要与细胞周期素分子结合,同时需要不同位点的磷酸化修饰。但是,有关 Cdk 分子磷酸化修饰对于其与细胞周期素分子结合的影响,细胞周期素分子与 Cdk 分子结合以后对于 Cdk 分子磷酸化修饰的影响,都不十分清楚。Connell-Crowley 等的结果