

刘丽华 ◆ 著

*Bombyx mori* cell cycle proteins  
and cell cycle regulation

家蚕细胞周期蛋白  
与细胞周期调控



 吉林大学出版社

通化师范学院学术著作出版基金资助出版

吉林省重点学科专项建设经费资助出版

# 家蚕细胞周期蛋白与 细胞周期调控

刘丽华/著



吉林  
大学  
出版社

## 图书在版编目(CIP)数据

家蚕细胞周期蛋白与细胞周期调控 / 刘丽华著.

—长春: 吉林大学出版社, 2013.10

ISBN 978-7-5677-0746-7

I. ①家… II. ①刘… III. ①家蚕-细胞周期-研究  
IV. ①Q969.435.102

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 250253 号

## 家蚕细胞周期蛋白与细胞周期调控

刘丽华 著

责任编辑: 段桂花 责任校对: 曲楠

封面设计: 张沐沉

吉林大学出版社出版、发行

长春科普快速印刷有限公司 印刷

开本: 787×1092 1/16

2013年10月 第1版

印张: 11.875 字数: 100千字

2013年10月 第1次印刷

ISBN 978-7-5677-0746-7

定价: 42.00元

版权所有 翻印必究

社址: 长春市明德路 501 号 邮编: 130021

发行部电话: 0431-89580026/28/29

网址: <http://www.jlup.com.cn>

E-mail: [jlup@mail.jlu.edu.cn](mailto:jlup@mail.jlu.edu.cn)

## 序 言

通化师范学院地处长白山区，为吉林省东南部地区唯一一所本科院校，学校突出长白山自然科学和长白山人文社会科学研究，尤其在高句丽历史文化研究、长白山非物质文化遗产研究和长白山生物资源研究方面取得了重要成果，在国内外引起了重要的反响。为吉林省东南部地区教育、文化、科技事业的发展提供了重要的智力支撑。

通化师范学院博士文库是集中学校博士教师完成的科研成果，由学校学术著作出版基金资助出版的系列学术著作，分批次进行出版，既有博士教师经过完善的博士学位毕业论文，又有承担的各级科研项目的研究成果。出版设立通化师范学院博士文库，一方面，为博士教师科研成果的发表搭建了平台，提高他们科研工作的积极性；另一方面，集中展示了学校学科建设和科研工作的研究成果，有助于扩大对外交流和宣传。

近年来，学校坚持教师教育及非教师教育多学科协调发展，在开展培养实践性应用型人才教学工作的同时，积极开展科学研究工作，不断提高科学研究水平。承担完成了多项国家级和省部级的自然科学和社会科学研究项目，出版了多部高水平有影响的学术著作，在国内外学术期刊杂志上发表了多篇学术论文，使学校的教学水平和科研水平不断提高，学校的知名度和影响力不断提升。尤其，年轻的博士教师，他们精力充沛，工作热情高，受过系统的科研训练，探究科学前沿能力强，研究方法先进，科研成果层次较高，已成为学校学科建设和科研工作的主力。

首次出版的15部学术著作，是从已经通过答辩并经过作者修改的博士论文中遴选出来的。作者在攻读博士学位期间，在导师和业内专家学者

的帮助指导下，克服困难，调查研究，科学实验，查阅大量国内外文献，进行归纳整理、比较鉴别、反复修改，形成自己的研究成果，并在各自研究的领域内取得专家学者的认可。相信各专业的同仁会从他们的著作中了解到研究的方向与轨迹，同时发现取得的成果和存在的不足。这对于开展学术交流、促进学术水平提高是很有好处的。此次出版的15部著作，涵盖化学、生物学、计算机科学、历史学、民俗学和社会学等学科。这些成果的集结与出版，对于我校学科建设和教学科研工作的深入开展具有重要意义。

今后，我们还将陆续资助出版博士教师的学术研究成果，促进我校的学术繁荣，使我校的教学和科研成果以更新的视角、更新的资料、更新的方法得以展现。

通化师范学院校长



2013年8月31日于通化师范学院

## 前 言

昆虫是地球上种类最多、分布最广的动物，复杂的发育变态以及迅速的繁殖能力是昆虫能在各种环境条件下得以生存的基本保障。研究昆虫的发育和变态是认识生物进化和自然演化的一个突破口，也是阐明细胞、组织、器官、个体的产生、生长和死亡分子机理的重要途径，并且可以更进一步了解昆虫和其生存环境之间的关系。并为害虫的综合防治以及益虫的利用提供理论依据。家蚕属于鳞翅目蚕蛾科，是一种重要的经济昆虫、文化载体和模式生物，其不但在蚕丝产业的发展 and 丝绸之路的文化传播中做出了卓越的贡献，在蚕丝纤维新材料、生物反应器和模式生物中也逐渐凸显出广阔的应用前景。

家蚕的发育是典型的完全变态发育过程，一个世代要经历卵、幼虫、蛹和成虫四个完全不同的发育时期，此外由于家蚕发育周期短、个体大小适中、易饲养、繁殖能力较强等特点，使得家蚕成为研究昆虫完全变态发育的理想模式生物，变态发育是一个极为复杂的发育过程，涉及保幼激素和蜕皮激素调控下的数级网络，而在其发挥作用的基因及蛋白更是不计其数。其中以细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖性激酶为核心的细胞周期网络调控系统，严格、精确地调控细胞周期有条不紊地进行，阐明这些调

控因子在其所组成的级联调控网络中的作用与地位，是认识细胞分裂、增殖、分化等生命现象的基础。

本专著在介绍细胞周期蛋白、细胞周期蛋白激酶及其调节因素的基础上，详细阐述了家蚕细胞周期蛋白的种类、作用及杆状病毒对宿主细胞周期及细胞周期蛋白的影响。希望有助于解析细胞周期蛋白在调控家蚕生长、蜕皮、变态过程中的作用，拓展细胞周期蛋白在生物中的调控机制研究。由于编写时间紧，本书所引用部分内容未能与相关单位、作者一一联系，深表歉意。再者，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。

刘丽华

2013年8月于通化

# 目 录

## 第一章

细胞周期调控原理 .....	/003
第一节 细胞周期概述 .....	/003
第二节 细胞周期调控系统 .....	/010
第三节 细胞周期调控的分子机制 .....	/031
第四节 细胞周期蛋白与肿瘤 .....	/034
第五节 植物细胞周期蛋白 .....	/040

## 第二章

家蚕作为模式生物在现代生物学中的应用 .....	/065
--------------------------	------

## 第三章

家蚕细胞周期蛋白 .....	/077
第一节 家蚕细胞周期蛋白 A .....	/078



第二节	家蚕细胞周期蛋白 B 和细胞周期蛋白 B3	.....	/082
第三节	家蚕细胞周期蛋白 E	.....	/088
第四节	家蚕其他细胞周期蛋白	.....	/092

---

 第四章 

---

<b>杆状病毒对宿主细胞周期及细胞周期蛋白的影响</b>		.....	/103
第一节	杆状病毒	.....	/103
第二节	杆状病毒的宿主域	.....	/109
第三节	杆状病毒感染性的检测	.....	/118
第四节	杆状病毒的应用	.....	/124
第五节	NPV 对细胞周期及细胞周期蛋白的影响	.....	/157

# 第一章

DIYIZHANG





# 细胞周期调控原理

## 第一节 细胞周期概述

细胞是生命的基本单位，细胞增殖是生物繁育的基础。单细胞生物如酵母，细胞增殖将直接导致生物个体数量的增加。多细胞生物是由许多单细胞有机结合起来而形成的生物体，它的产生是需要许多次甚至无数次的细胞增殖，并经过复杂的细胞分化过程。成体生物每天都有大量的细胞衰老、死亡，为维持细胞正常数量的平衡和机体的正常功能，必须依赖细胞增殖。又如机体创伤愈合、细胞再生、病理细胞修复等都要依赖细胞增殖。细胞增殖是一种极为复杂的生物学现象，包括细胞生长、DNA 复制和细胞分裂三个组成部分。

细胞增殖是通过细胞周期（cell cycle）来实现的。细胞周期普遍存在于高等生物中。细胞周期是上个世纪 50 年代细胞学的重大发现之一。1953 年，Havard 和 Polle 以蚕豆根端细胞为材料，用 P32 研究有丝分裂后提出了完整的细胞周期概念。

### 一、细胞周期概念

细胞周期是指亲代细胞分裂结束到子细胞分裂结束之间的间隔时间，

即细胞完成一个循环的过程。分为间期与分裂期两个阶段。间期又分为三期，即 DNA 合成前期（ $G_1$  期）、DNA 合成期（S 期）与 DNA 合成后期（ $G_2$  期）。

$G_1$  期是指从有丝分裂完成到 DNA 复制之前的间隙时间。 $G_1$  期可再细分为可变期和稳定期。所有分裂后的子细胞都先进入  $G_1$  期的可变期，亦称  $G_0$  期，即脱离细胞周期暂时停止分裂的一个阶段。此时，细胞不再分裂或基本不再分裂。细胞在  $G_0$  期进入分化过程，只有向 S 期继续前进的细胞才进入  $G_1$  期的稳定期。有实验认为可能在  $G_1$  期中存在一个限制点（restriction point, R 点）或检验点（checkpoint）。根据环境条件，细胞可由此停止生长，脱离细胞周期进入  $G_0$  期，如能通过 R 点则可继续生长，进入 S 期，完成细胞分裂。肿瘤细胞和转化细胞则失去这种控制。限制点可能受一系列特异或非特异环境信号的影响，从分子水平看，可能是基于一些基因与其产物对外界信号的反应，但其全事件过程尚未完全阐明。

$G_1$  期细胞代谢比较活跃，细胞内进行一系列极其复杂的生物化学合成，为进行 DNA 复制及蛋白质合成作准备。RNA 在  $G_1$  期大量合成，包括 tRNA、mRNA、rRNA 等明显增加。RNA 合成又导致结构蛋白和酶蛋白的形成，这些酶又控制着形成新细胞成分的代谢活动。S 期所需的 DNA 复制相关的酶系，如 DNA 聚合酶以及与  $G_1$  期向 S 期转变相关的蛋白质如触发蛋白、钙调蛋白（calmodulin）、细胞周期蛋白（cyclin）等均在此期合成。触发蛋白是一种不稳定蛋白（unstable protein），它对细胞从  $G_1$  期进入 S 期是必需的，只有当其含量积累到临界值时，细胞周期才能朝 DNA 合成方向进行。钙调蛋白是真核细胞内重要的  $Ca^{2+}$  受体，它调节细胞内的  $Ca^{2+}$  水平。钙调蛋白的含量在  $G_1$  晚期时可达到峰值，用抗钙调蛋白药

物处理细胞，可延缓其从  $G_1$  期到 S 期的过程。

蛋白的磷酸化和去磷酸化是控制细胞周期和有丝分裂调节因子活性的最主要因素。蛋白的磷酸化作用在  $G_1$  期较为突出。组蛋白（是真核细胞特有的一类碱性蛋白质）的磷酸化在  $G_1$  期开始增加，这将有利于  $G_1$  晚期染色体结构成分的重排。非组蛋白（是真核细胞特有的一类酸性蛋白质）、一些蛋白激酶在  $G_1$  也发生磷酸化。在  $G_1$  末期，中心粒分离，为进行中心体复制作准备，一旦准备就绪，在诱导因子作用下，细胞随即进入 S 期。

S 期指 DNA 合成时期，DNA 含量加倍，大量的蛋白质也在 S 期合成，提供 DNA 复制所需要的酶及构成染色体所需要的蛋白质。DNA 复制的起始和过程受到多种细胞周期调节因素的严密控制，同时，DNA 复制与细胞核骨架、核纤层核膜等密切相关。S 期 DNA 损伤的检查点机制尚不明确，但研究表明，DNA 链复制的起始和延长过程都可以受到抑制，也有研究显示，S 期阻滞需要 ATM 介导的 NBS1 的磷酸化作用。

$G_2$  期指 DNA 复制完成到有丝分裂开始之前的一段时间，主要合成有丝分裂中新细胞所必需的物质，如作为细胞骨架重要成分的微管蛋白等。

分裂期即 M 期，指细胞分裂开始到结束，细胞染色体形成并发生细胞分裂，新细胞在此期形成。分为前期、中期、后期、末期四个时期。

前期：染色质高度螺旋化，逐渐形成染色体。染色体短而粗，强嗜碱性。两个中心体向相反方向移动，在细胞中形成两极；而后以中心粒随体为起始点开始合成微管，形成纺锤体。核仁随染色质的螺旋化而逐渐消失。核膜开始瓦解为离散的囊泡状内质网。

中期：细胞变为球形，核仁与核膜已完全消失。染色体移到细胞的赤道面，从纺锤体两极发出的微管附着于每一个染色体的着丝点上。

后期：着丝点纵裂，每一染色体的两个染色单体分开，向相反方向移

动，接近各自的中心体。

末期：染色单体逐渐解螺旋，重新出现染色质丝与核仁、核膜，最后完全分裂为两个子细胞。

细胞周期有两个限制点，分别是  $G_1/S$  限制点和  $G_2/M$  限制点。 $G_1/S$  限制点是控制细胞从  $G_1$  期进入 S 期，可以防止受损的碱基复制，修复染色体中的突变，而  $G_2/M$  限制点是细胞一分为二的控制点，能够使细胞在进入分裂期之前修复已复制好的 DNA 上出现的损伤。细胞通过限制点后，不再对胞外丝裂原发生反应，依次通过 4 个时相，最终形成一定类型的两个子细胞。关于  $G_2 \rightarrow M$  期的转换，由于其调控机制具有更强的进化保守性，因此也更易于研究和分析，对其了解也更为透彻。但是， $G_1 \rightarrow S$  期的转换机制作用则比  $G_2 \rightarrow M$  期重要得多，在这个转换点之前或与此同时，细胞要作出是停留于  $G_0$ ，还是继续进入另一轮分裂的抉择，因此，其调控机制要复杂得多。 $G_0$  和  $G_1$  之间的转换是一个可逆过程， $G_1 \rightarrow G_0$  表示细胞退出有丝分裂进入静止状态或分化过程，而  $G_0 \rightarrow G_1$  则表示细胞重新进入增殖状态，在这种情况下，其介导因子主要有癌基因和有丝分裂原等。正是由于这一转换过程，才赋予了生命机体和组织的细胞多样性，才有了分别处于分裂的周期细胞、静止的  $G_0$  细胞和终末分化细胞等混合细胞群体的存在，因此，其调控的复杂性和进化多样化也就可想而知了。

细胞周期时间在不同生物和不同组织的细胞间存在较大差异，同种细胞的细胞周期时间长短相近或相同；不同细胞种类之间，细胞周期长短常差别很大。区别只在  $G_1$  期，其他各期时间都是固定的。典型的细胞周期为  $G_1$  期 12 h、S 期 6 h、 $G_2$  期 6 h、M 期 0.5 h。

从增殖的角度可将高等动物的细胞分为三类：（1）周期性细胞：在细胞周期中连续分裂的细胞，如上皮基底层细胞、部分骨髓细胞，这类细胞

的分裂对细胞的更新有重要意义。(2)  $G_0$  期细胞：又称暂不增殖的细胞或静止期细胞，在一般情况下不分裂，但受到一定刺激后，即可进入细胞周期，开始分裂。如高等动物中的肝脏、肾脏等器官的实质细胞。 $G_0$  期细胞一旦得到信号指使，会快速返回细胞周期，分裂增殖。对  $G_0$  期细胞的生物学和其重返细胞周期的机制研究已越来越受到科学界的重视，它不仅是对细胞分化和细胞增殖调控过程的探讨，而且对肿瘤的发生和治疗药物的设计及筛选都具有重要指导意义。(3) 终末分化细胞：不可逆地脱离细胞周期，不再分裂的细胞。如神经、肌肉细胞等等。 $G_0$  期细胞和终末分化细胞的界限有时很难划分，有的细胞过去认为属于终末分化细胞，现在可能被认为是  $G_0$  期细胞。

正常的细胞周期保证 DNA 在 S 期能得到准确复制，产生两套完全相同的染色体，平均分配到两个子细胞中去。经过一个完整的细胞周期后，有的细胞则继续增殖，而有的细胞可能暂不增殖或永不增殖。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、衰老和死亡等生理状态。

## 二、细胞周期常用的研究方法

无论是研究细胞周期的生化变化或是测定细胞周期中的一些动力参数都需要一定的方法。但在一般培养条件下，群体中的细胞处于细胞周期不同的时相之中，不同阶段的细胞其形态学和生化特性均有所不同，为了研究某一时相的细胞，常需要采取一些方法使细胞处于细胞周期的同一时相，这就是细胞同步化技术。

细胞同步化法是研究细胞周期的一个很重要的方法。就是将细胞群体



阻滞在细胞周期同一时相的方法，使处于细胞周期不同阶段的细胞进入周期的某一特定阶段。经同步化后的细胞具有形态和生化上的相似特点，这对细胞周期的动力学和细胞周期的调控等研究非常有利，细胞同步化包括自然同步化和人工同步化。

### 1. 自然同步化

在自然界中，有些生物本身存在部分的或短时间的细胞分裂同步化现象，如研究细胞繁殖上应用最广的天然同步化系统是海胆（棘皮动物门）胚胎的分裂，其特点是不仅卵的数量多，而且可以同时受精，其最初三次分裂的同步性很高，在512个细胞之前，其分裂是同步的。由于自然同步法的细胞数量仍然太少，限制性也很大，以及不够作研究之用，若需大量细胞则需采用人工同步法。

### 2. 人工同步化

人为地将处于不同时期的细胞分离开来，从而获得不同时期的细胞群体。

#### (1) 有丝分裂摇落法（选择同步法）

即用人工方法从细胞群体中选出某一时相的细胞，此法多用于贴瓶培养的动物细胞。在体外培养条件下，培育成单层动物细胞有一特点，即进入M期的细胞，因其胞体变圆（G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>期的细胞扁平，故与培养瓶壁紧密粘连），与附着底物间接触面积减少，因此，对底物的贴附性降低，此时，轻轻振荡培养器皿，细胞即会脱离器皿壁，悬浮于培养液中，离心后即可得到同步于M期的细胞，此法过程简单，细胞同步化程度高（可达95%），而且形态、生化特性未受药物的影响。由于在一个非同步培养的细胞群体中，任何时刻仅有约4%细胞是处于M期，因此，为需要获得大量可供进行分子生物学分析的同步化细胞，就必须连续进行多次