

G2/M 期 P53/CDK1 通路对卵巢癌细胞增殖和凋亡的影响

张瑞涛, 史惠蓉, 任芳, 曹媛, 姬鹏程, 王文文

摘要 目的 探讨细胞周期 G2/M 期 P53-P21WAF1-细胞周期依赖激酶 1(cyclin dependent kinases 1, CDK1) 通路与上皮性卵巢癌细胞增殖和凋亡的关系。方法 分别将 CDK1、p53 基因特异性 shRNA 质粒及阴性对照质粒转染卵巢上皮性癌 SK-OV-3、OVCAR-3 细胞, MTT 法、TUNEL 法和 FCM 法分别检测细胞增殖、凋亡和细胞周期分布情况, Western blot 法分别检测各组细胞中 CDK1、磷酸化 CDK1(Thr14/Tyr15)、P53、p-P53(ser15)、P21WAF1、CyclinB1 以及增殖和凋亡相关蛋白 Ki-67、Survivin、Caspase3 蛋白的表达。结果 分别沉默 CDK1、p53 基因后, SK-OV-3 和 OVCAR-3 细胞增殖受到抑制、凋亡增加、G2 期细胞数目增加; Ki-67、Survivin 蛋白表达减少, cleaved-Caspase3 蛋白表达增加。此外, 沉默 p53 基因可引起 p-P53(ser15) 和 P21WAF1 蛋白表达减少、p-CDK1(Thr14/Tyr15) 蛋白表达升高。结论 G2/M 检验点 P53/CDK1 信号通路可能参与卵巢癌上皮性细胞增殖和凋亡的调节。

关键词 G2/M 检验点; 细胞周期依赖激酶 1; 卵巢上皮性癌; 增殖; 凋亡

中图分类号 R 737.31

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)04-0502-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.04.003

细胞周期检验点是细胞进入有丝分裂前修复 DNA 损伤的重要关卡, 在 G2/M 期, 细胞损伤信号可激活 P53-P21WAF1 和 Chk1-CDC25 通路, 抑制 CyclinB1/细胞周期依赖激酶 1(cyclin dependent kinases 1, CDK1) 复合物的活性和进入细胞核, 引起 G2 期阻滞, 启动 DNA 损伤修复^[1]。CDK1 是 G2/M 期传导网络的核心因子, 野生型 p53 基因主要通过作用于其靶因子 P21WAF1 调节 CDK1 的活性来调节 G2/M 检验点^[2-3]。前期研究^[4-5]表明, 上皮性卵巢癌组织中存在 P53 蛋白高表达、P21WAF1 蛋白低表达和 CDK1 蛋白高表达, 随着患者临床分期的

增加, P53 表达逐渐增加、P21WAF1 表达逐渐减少, CDK1 高表达与临床分期无关, P53、P21WAF1 和 CDK1 可能协同参与了上皮性卵巢癌的发生发展。该研究利用小发卡 RNA 干扰技术研究 P53/CDK1 信号通路在卵巢上皮性癌细胞 SK-OV-3、OVCAR-3 细胞增殖和凋亡中发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂 人上皮性卵巢癌细胞 SK-OV-3、OVCAR-3 购自中国典型培养物保藏中心(武汉大学保藏中心); RPMI-1640 完全培养基购自美国 Hyclone 公司; 鼠抗人 CDK1 单克隆抗体、兔抗人磷酸化 CDK1(Thr14/Tyr15) 多克隆抗体、鼠抗人 CyclinB1 单克隆抗体、山羊抗人 Ki-67 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 鼠抗人 P53 单克隆抗体、兔抗人磷酸化 P53(ser15) 多克隆抗体、鼠抗人 P21WAF1 单克隆抗体、兔抗人 Survivin 单克隆抗体、鼠抗人 cleaved-Caspase3 单克隆抗体、Western blot 及 IP 蛋白裂解液、Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自江苏碧云天生物公司; 增强化学发光(ECL) 试剂盒、兔抗人 β 肌动蛋白(β -actin) 单克隆抗体、鼠抗兔单克隆 IgG、DAB 染色试剂盒均购自北京中杉金桥科技有限公司; TUNEL 检测试剂盒(POD 法) 购自美国 Roche 公司; CDK1、p53 基因特异性 shRNA 质粒、阴性对照 shRNA 质粒、shRNA 质粒转染试剂购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 细胞培养和转染 SK-OV-3、OVCAR-3 细胞用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基在 37℃、5% CO₂、相对湿度 90% 的培养箱中培养, 至对数生长期收集细胞用于后续实验。分别将 CDK1、p53 基因 shRNA 质粒及阴性对照质粒转染 SK-OV-3、OVCAR-3 细胞, 经嘌呤霉素(2 μ g/ml, 美国 Sigma 公司) 筛选, 扩增建株, 实验细胞分别命名为空白对照组、阴性对照组和沉默组。

1.3 Western blot 法 蛋白裂解液提取细胞样本总蛋白, 采用考马斯亮蓝法(Bradford 法) 进行蛋白定量。分别取 30 μ g 总蛋白进行 10% 十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶(PAGE) 电泳, 恒压 20

2017-12-14 接收

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目(编号: 201503067)

作者单位: 郑州大学第一附属医院妇科, 郑州 450052

作者简介: 张瑞涛, 男, 副主任医师, 副教授, 博士, 责任作者, E-mail: z211019zhangruitao@126.com

V 半干转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,含5%脱脂奶粉、0.05%吐温20枸橼酸盐缓冲液(TBST)室温封闭2h,按说明书浓度分别用一抗、二抗4℃孵育过夜,IgG(1:2000)室温孵育2h。ECL发光试剂盒显色后曝光,Image Pro-Plus 6.0软件分析特异性目的条带的灰度值,将 β -actin设为内参照,分别计算其相对表达水平(目的蛋白灰度值/ β -actin灰度值),每组实验重复3次。

1.4 MTT法测定细胞增殖 将各组细胞按 1×10^4 个/孔接种于96孔板,每组细胞设3个复孔,另设3个空白对照孔,常规培养24h,此后每24h向每孔内加入5 mg/ml MTT 20 μ l,连续5d,加入MTT作用4h后弃去上清液,每孔加入150 μ l DMSO(美国Sigma公司)溶液,置于摇床上低速震荡10 min,酶标仪(美国Thermo公司)测量492 nm波长处各孔的吸光度(absorbance A)值(A_{492}),以培养时间为横坐标, A_{492} 为纵坐标,绘制生长曲线。

1.5 流式细胞术检测细胞早期凋亡率 每实验组收集 1×10^5 个细胞,弃上清液,加入195 μ l的Annexin V-FITC结合液重悬细胞,然后加入5 μ l Annexin V-FITC轻轻混匀后,再加入10 μ l碘化丙啶混匀,室温、避光孵育15 min,冰浴后立即采用FACSscan流式细胞仪(美国Becton-Dickinson公司)检测细胞早期凋亡情况,Cell Quest软件进行分析,本实验重复3次。

1.6 TUNEL法检测细胞晚期凋亡率 在载玻片上滴加单细胞悬液,培养4~6h至细胞贴壁,4%多聚甲醛(美国Sigma公司)固定25 min,PBS浸洗3次,0.2% Triton X-400孵育5 min,然后按TUNEL试剂盒说明书处理细胞,DAB染色后封片,高倍镜(400倍)下随机选取5个视野,计数每100个细胞中凋亡小体的数目,取均数计算细胞晚期凋亡率。

1.7 流式细胞术检测细胞周期分布情况 分别收集对数生长期的3组细胞各 1×10^6 个,PBS漂洗细胞两次,70%冰乙醇固定24h,洗涤离心后加入含100 mg/L RNaseA的碘化丙啶,室温避光染色后采用FACSscan流式细胞仪(美国Becton-Dickinson公司)检测细胞周期时相变化,Multipycle for windows软件分析结果。

1.8 统计学处理 使用SPSS17.0软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据间均数的差异性检验采用单因素方差分析(ANOVA)和Bonferroni分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CDK1基因沉默后对卵巢癌细胞增殖、凋亡和细胞周期的影响

2.1.1 CDK1基因沉默后对卵巢癌细胞增殖的影响 MTT结果显示,转染CDK1-shRNA质粒后SK-OV-3沉默组细胞($F = 417.027, P < 0.001$)和OVCAR-3沉默组细胞($F = 378.229, P < 0.001$)的增殖明显受到抑制,而在SK-OV-3空白对照组和SK-OV-3阴性对照组细胞之间、OVCAR-3空白对照组和OVCAR-3阴性对照组细胞之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图1。

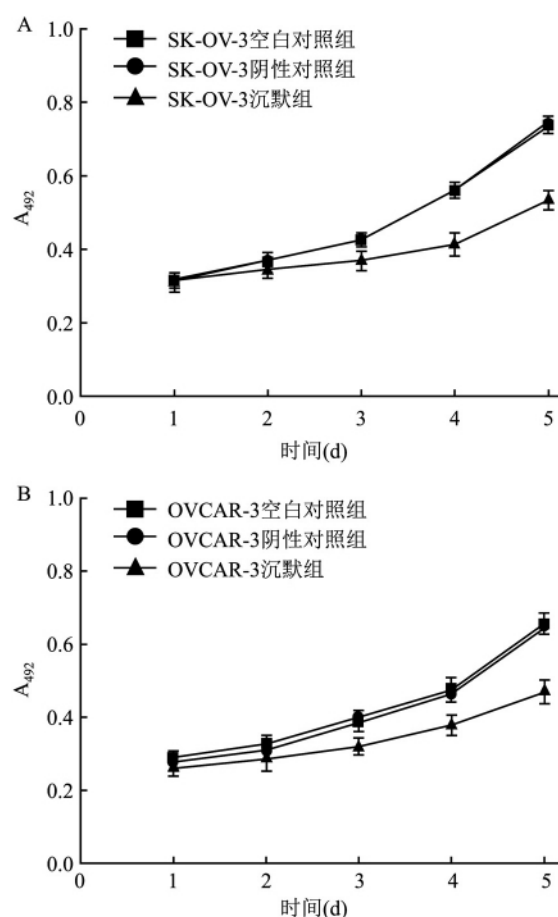


图1 CDK1基因沉默后对卵巢癌细胞增殖能力的影响

A: SK-OV-3细胞; B: OVCAR-3细胞

2.1.2 CDK1基因沉默后对卵巢癌细胞早期凋亡的影响 流式细胞术检测结果显示,转染CDK1-shRNA质粒后SK-OV-3沉默组和OVCAR-3沉默组细胞的早期凋亡率明显增加($P < 0.001$),而在SK-OV-3空白对照组和SK-OV-3阴性对照组细胞之间、OVCAR-3空白对照组和OVCAR-3阴性对照组细胞之间差异无统计学意义。见表1。

表1 分别沉默 CDK1 和 p53 基因对各实验组细胞早期凋亡率的影响($n=3$, % $\bar{x} \pm s$)

组别	CDK1 沉默	p53 沉默
SK-OV-3 空白对照	1.86 $\pm$ 0.48	1.84 $\pm$ 0.42
SK-OV-3 阴性对照	1.99 $\pm$ 0.46	1.88 $\pm$ 0.48
SK-OV-3 沉默	14.69 $\pm$ 1.71	9.60 $\pm$ 1.71
F 值	145.879	53.804
P 值	<0.001	<0.001
OVCAR-3 空白对照	3.50 $\pm$ 0.88	3.25 $\pm$ 0.97
OVCAR-3 阴性对照	4.93 $\pm$ 1.29	3.25 $\pm$ 0.90
OVCAR-3 沉默	15.36 $\pm$ 1.11	12.52 $\pm$ 1.23
F 值	102.872	78.785
P 值	<0.001	<0.001

2.1.3 CDK1 基因沉默后对卵巢癌细胞晚期凋亡的影响 TUNEL 结果显示,转染 CDK1-shRNA 质粒后 SK-OV-3 空白对照组、SK-OV-3 阴性对照组和 SK-OV-3 沉默组细胞的晚期凋亡率分别为 (4.67 $\pm$ 0.58) %、(5.00 $\pm$ 1.00) % 和 (26.67 $\pm$ 2.08) %,差异有统计学意义 ($F = 252.412$, $P < 0.001$)。OVCAR-3 空白对照组、OVCAR-3 阴性对照组和 OVCAR-3 沉默组细胞的晚期凋亡率分别为 (6.67 $\pm$ 1.53) %、(7.33 $\pm$ 0.58) % 和 (31.67 $\pm$ 3.06) %,差

异有统计学意义 ($F = 152.194$, $P < 0.001$) ,而在 SK-OV-3 空白对照组和 SK-OV-3 阴性对照组细胞之间、OVCAR-3 空白对照组和 OVCAR-3 阴性对照组细胞之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2。

2.1.4 CDK1 基因沉默后对卵巢癌细胞周期分布的影响 流式细胞术检查结果显示,转染 CDK1-shRNA 质粒后 SK-OV-3 空白对照组、SK-OV-3 阴性对照组和 SK-OV-3 沉默组细胞的 G2 期细胞数目分别为 (5.44 $\pm$ 0.68) %、(5.08 $\pm$ 1.57) % 和 (19.85 $\pm$ 1.95) %,差异有统计学意义 ($F = 94.991$, $P < 0.001$)。OVCAR-3 空白对照组、OVCAR-3 阴性对照组和 OVCAR-3 沉默组细胞的 G2 期细胞数目分别为 (8.16 $\pm$ 0.88) %、(7.60 $\pm$ 0.84) % 和 (23.33 $\pm$ 1.89) %,差异有统计学意义 ($F = 141.416$, $P < 0.001$)。而在 SK-OV-3 空白对照组和 SK-OV-3 阴性对照组细胞之间、OVCAR-3 空白对照组和 OVCAR-3 阴性对照组细胞差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3。

2.2 CDK1 基因沉默后对卵巢癌细胞 P53/CDK1

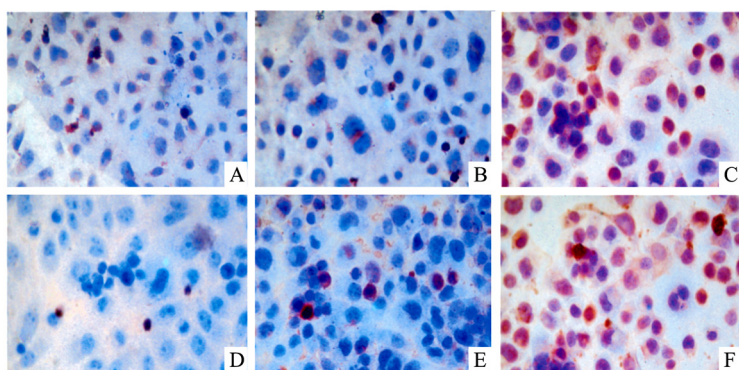


图2 CDK1 基因沉默后对卵巢癌细胞晚期凋亡率的影响 DAB 染色 $\times 400$

A、B、C: SK-OV-3 细胞空白对照组、阴性对照组、沉默组; D、E、F: OVCAR-3 细胞空白对照组、阴性对照组、沉默组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$

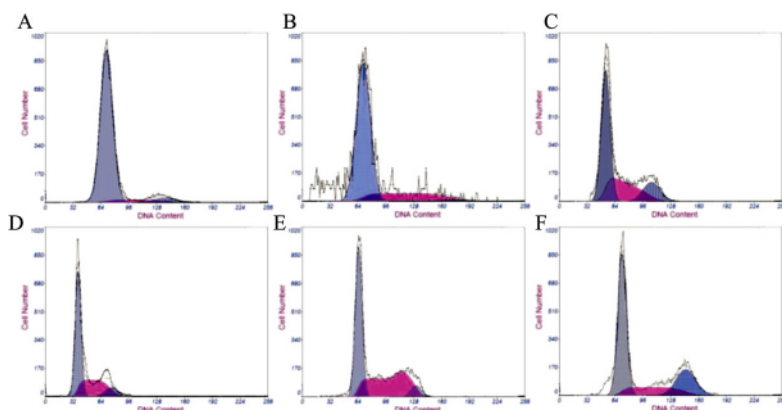
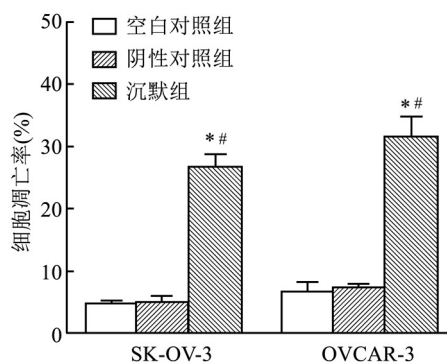
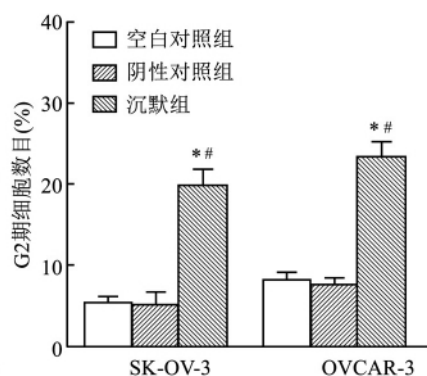


图3 CDK1 基因沉默后对卵巢癌细胞 G2 期细胞数目的影响

A、B、C: SK-OV-3 细胞空白对照组、阴性对照组、沉默组; D、E、F: OVCAR-3 细胞空白对照组、阴性对照组、沉默组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$



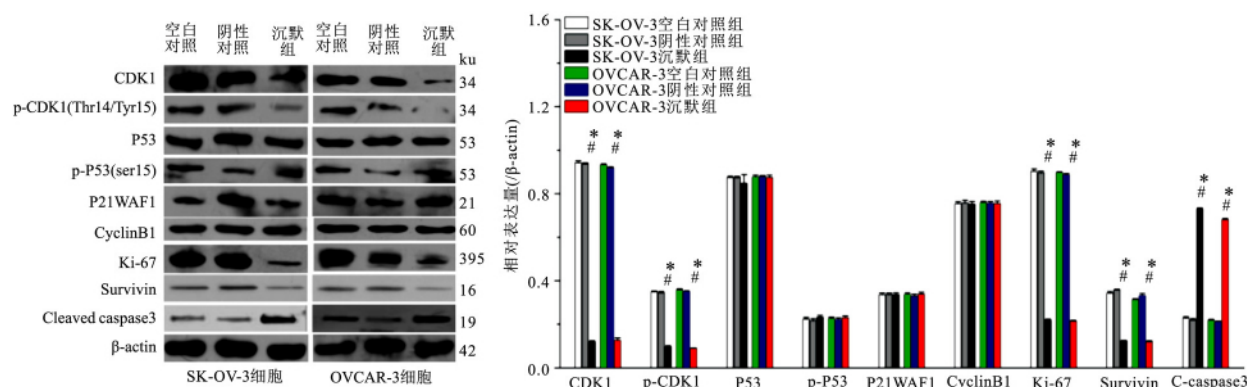


图4 CDK1 基因沉默后对卵巢癌细胞 G2/M 检验点相关蛋白表达的影响
与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$

通路相关蛋白表达的影响 Western blot 结果显示, CDK1 基因沉默后 SK-OV-3、OVCAR-3 细胞中 CDK1 和 p-CDK1(Thr14/Tyr15) 蛋白表达明显减少 ($P < 0.05$), 而 P53、p-P53(ser15)、P21WAF1、CyclinB1 蛋白的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。此外, 在 SK-OV-3 沉默组和 OVCAR-3 沉默组细胞中检测到 Ki-67、Survivin 蛋白表达减少 ($P < 0.05$), cleaved-Caspase3 蛋白表达增加 ($P < 0.05$)。上述蛋白的表达在 SK-OV-3 空白对照组和 SK-OV-3 阴性对照组细胞之间、OVCAR-3 空白对照组和 OVCAR-3 阴性对照组细胞之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 4。

2.3 p53 基因沉默后对卵巢癌细胞增殖、凋亡和细胞周期的影响

2.3.1 p53 基因沉默后对卵巢癌细胞增殖的影响

MTT 结果显示, 转染 p53-shRNA 质粒后 SK-OV-3 沉默组细胞 ($F = 267.038$, $P < 0.001$) 和 OVCAR-3 沉默组细胞 ($F = 307.124$, $P < 0.001$) 的增殖明显受到抑制, 而在 SK-OV-3 空白对照组和 SK-OV-3 阴性对照组细胞之间、OVCAR-3 空白对照组和 OVCAR-3 阴性对照细胞之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 5。

2.3.2 p53 基因沉默后对卵巢癌细胞早期凋亡的影响

流式细胞术检测结果显示, 转染 p53-shRNA 质粒后 SK-OV-3 沉默组和 OVCAR-3 沉默组细胞的早期凋亡率明显增加 ($P < 0.001$), 而在 SK-OV-3 空白对照组和 SK-OV-3 阴性对照组细胞之间、OVCAR-3 空白对照组和 OVCAR-3 阴性对照细胞之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

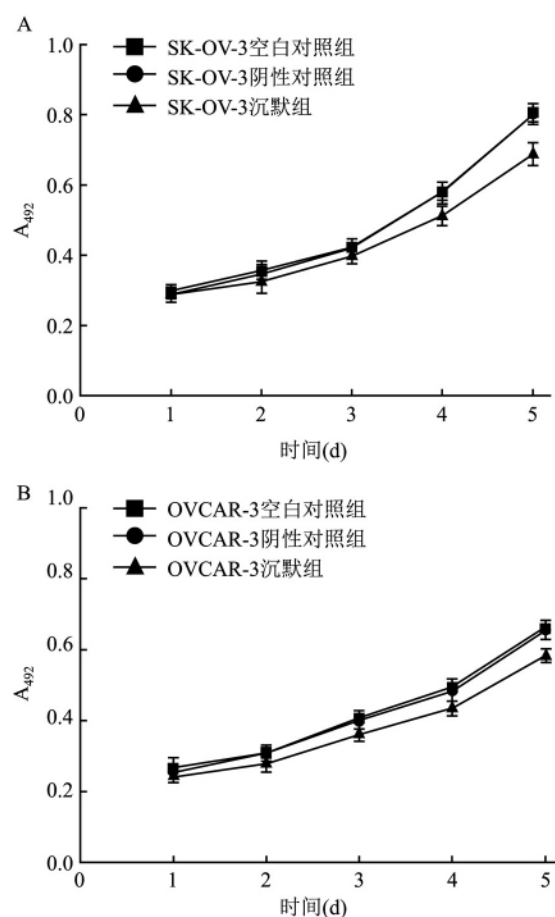


图5 沉默 p53 基因后对卵巢癌细胞增殖能力的影响
A: SK-OV-3 细胞 B: OVCAR-3 细胞

2.3.3 p53 基因沉默后对卵巢癌细胞晚期凋亡的影响

TUNEL 结果显示, 转染 p53-shRNA 质粒后 SK-OV-3 空白对照组、SK-OV-3 阴性对照组和 SK-OV-3 沉默组细胞的晚期凋亡率分别为 $(4.64 \pm 0.56)\%$ 、 $(6.00 \pm 1.00)\%$ 和 $(23.67 \pm 1.99)\%$, 差异有统计学意义 ($F = 178.647$, $P < 0.001$)。

OVCAR-3 空白对照组、OVCAR-3 阴性对照组和 OVCAR-3 沉默组细胞的晚期凋亡率分别为 $(6.33 \pm 1.46)\%$ 、 $(7.00 \pm 1.00)\%$ 和 $(27.33 \pm 2.52)\%$ ，差异有统计学意义 ($F = 132.655, P < 0.001$)，而在 SK-OV-3 空白对照组和 SK-OV-3 阴性对照组细胞之间、OVCAR-3 空白对照组和 OVCAR-3 阴性对照组细胞之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 6。

2.3.4 p53 基因沉默后对卵巢癌细胞周期分布的影响 流式细胞术检测结果显示，转染 p53-shRNA 质粒后 SK-OV-3 空白对照组、SK-OV-3 阴性对照组和 SK-OV-3 沉默组细胞的 G2 期细胞数目分别为 $(3.50 \pm 0.61)\%$ 、 $(3.44 \pm 0.75)\%$ 和 $(12.00 \pm 2.33)\%$ ，差异有统计学意义 ($F = 34.229, P = 0.001$)。OVCAR-3 空白对照组、OVCAR-3 阴性对照组和 OVCAR-3 沉默组细胞的 G2 期细胞数目分别为 $(5.81 \pm 1.24)\%$ 、 $(5.88 \pm 1.18)\%$ 和 $(28.26 \pm 2.06)\%$ ，差异有统计学意义 ($F = 210.030, P <$

0.001)。而在 SK-OV-3 空白对照组和 SK-OV-3 阴性对照组细胞之间、OVCAR-3 空白对照组和 OVCAR-3 阴性对照组细胞之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 7。

2.4 p53 基因沉默后对卵巢癌细胞 P53-CDK1 通路相关蛋白表达的影响 Western blot 结果显示，p53 基因沉默后 SK-OV-3、OVCAR-3 细胞中 P53、p-P53 (ser15)、P21WAF1 蛋白表达明显减少 ($P < 0.05$)，p-CDK1 (Thr14/Tyr15) 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$)，而 CDK1、CyclinB1 蛋白的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。此外，在 SK-OV-3 沉默组和 OVCAR-3 沉默组细胞中检测到 Ki-67、Survivin 蛋白表达减少 ($P < 0.05$)，cleaved-Caspase3 蛋白表达增加 ($P < 0.05$)。上述蛋白的表达在 SK-OV-3 空白对照组和 SK-OV-3 阴性对照组细胞之间、OVCAR-3 空白对照组和 OVCAR-3 阴性对照组细胞之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 8。

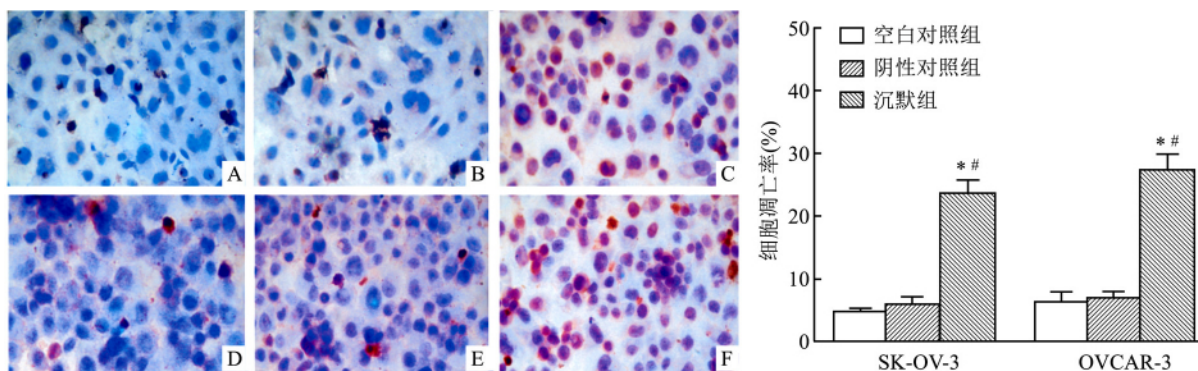


图 6 沉默 p53 基因后对卵巢癌细胞凋亡能力的影响 DAB 染色 $\times 400$

A、B、C: SK-OV-3 细胞空白对照组、阴性对照组、沉默组; D、E、F: OVCAR-3 细胞空白对照组、阴性对照组、沉默组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$

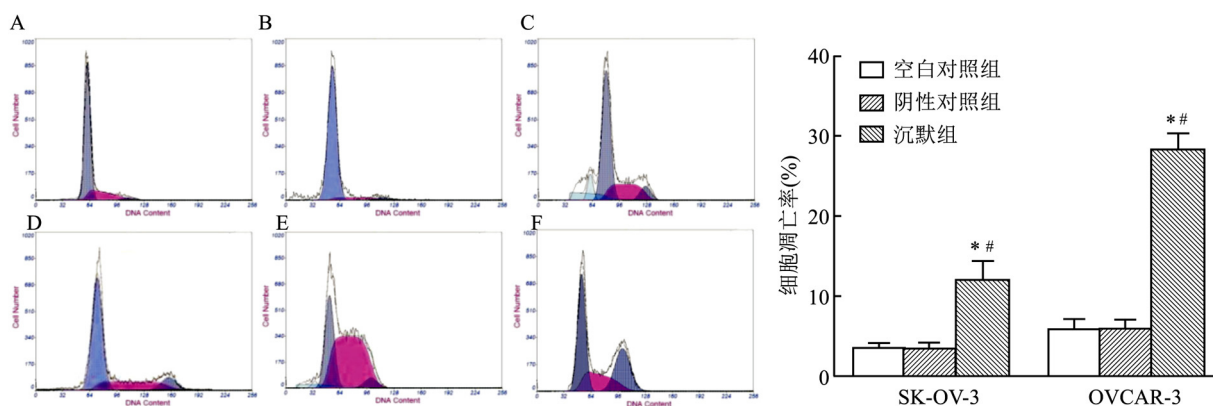


图 7 沉默 p53 基因后对卵巢癌细胞 G2 期细胞数目的影响

A、B、C: SK-OV-3 细胞空白对照组、阴性对照组、沉默组; D、E、F: OVCAR-3 细胞空白对照组、阴性对照组、沉默组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$

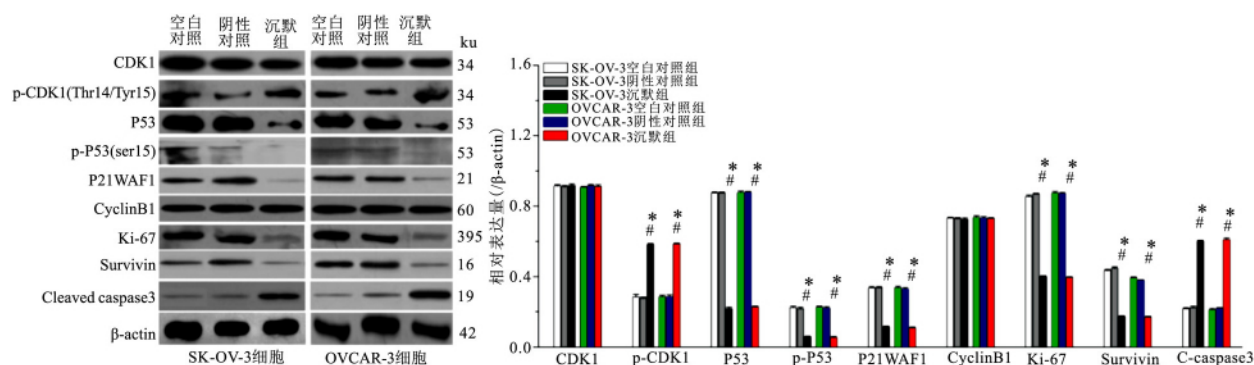


图8 沉默 p53 基因后对卵巢癌细胞 G2/M 检验点相关蛋白表达的影响

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

卵巢上皮性癌是常见的女性生殖系统恶性肿瘤,由于卵巢居于盆腔深处、发病隐匿、疾病症状不典型等因素影响,大部分卵巢癌患者被诊断时已到疾病晚期,虽然可行系统的肿瘤细胞减灭术和以铂类为基础的联合化疗进行治疗,但其死亡率仍高居妇科恶性肿瘤之首^[6]。研究^[7]表明,细胞周期调节异常和信号通路传导异常与卵巢癌的发生发展关系密切。

G2/M 检验点是细胞周期中除 G1/S 检验点之外最重要的细胞检测点,是决定细胞一分为二的控制点,是细胞进入有丝分裂前修复 DNA 损伤的最后时机^[3]。CDK1 与 CyclinB1 结合形成异源二聚体 CyclinB1/CDK1,又称为细胞成熟促进因子(maturation promoting factor, MPF),MPF 是真核细胞有丝分裂 G2/M 期转换所必需的蛋白激酶,只有活化的 MPF 才能触发有丝分裂^[8]。CDK1 又名 P34CDC2,是 CDC2 基因编码的 34 ku 的蛋白质,其 N 末端第 161 个氨基酸苏氨酸(Thr161)、第 15 个氨基酸酪氨酸(Tyr15)和第 14 个氨基酸苏氨酸(Thr14)的磷酸化状态对其活性的影响至关重要,其中 Thr14/Tyr15 位点的磷酸化和去磷酸化是调节 CDK1 活性的关键,CDK1 去磷酸化激活后进而调节 CyclinB1/CDK1 复合物的活性,推动细胞进入有丝分裂期^[9-10]。细胞 DNA 损伤时可使 CDK1 失活,最终导致细胞周期阻滞在 G2 期。

研究表明,在喉癌^[11]、肺癌^[12]、结直肠癌^[13]和肾癌^[14]等多种癌组织中均检测到 CDK1 的高表达,其高表达与上述恶性肿瘤的预后有关,CDK1 可能在上述恶性肿瘤的发生发展中发挥重要作用。抑制 CDK1 基因的表达后,卵巢癌细胞的增殖明显受到抑制、凋亡明显增加、G2 期细胞数目增加,提示 CDK1 的异常表达与上皮性卵巢癌细胞的增殖和凋

亡关系密切。进一步研究显示,抑制 CDK1 基因表达对 SK-OV-3、OVCAR-3 细胞中 P53、p-P53(ser15)、P21WAF1、CyclinB1 蛋白的表达无明显影响,而 CDK1 和 p-CDK1(Thr14/Tyr15)蛋白表达则明显降低,同时细胞增殖相关蛋白 Ki-67 表达减少、凋亡抑制基因 Survivin 蛋白表达减少、凋亡相关蛋白 cleaved-Caspase3 蛋白表达增加,提示 CDK1 基因沉默后对卵巢癌细胞增殖、凋亡和细胞周期的影响可能与 CDK1 蛋白的表达受到抑制有关。

多数恶性肿瘤细胞中存在 p53 基因突变和突变型 P53 蛋白高表达,p53 基因在细胞周期 G1/S 期转换、G2/M 期转换等多个环节中发挥重要作用,P21WAF1 基因是野生型 p53 基因的主要靶因子之一^[15]。抑制 p53 基因表达后,卵巢癌细胞的增殖明显受到抑制、凋亡明显增加、G2 期细胞数目增加,提示 P53 蛋白异常表达与卵巢癌细胞的增殖和凋亡关系密切。进一步研究显示,沉默 p53 基因后 SK-OV-3、OVCAR-3 细胞中 P53、p-P53(ser15)、P21WAF1 蛋白表达明显减少,p-CDK1(Thr14/Tyr15)蛋白表达明显升高,而 CDK1、CyclinB1 蛋白的表达无明显改变,同时 Ki-67 表达减少、Survivin 表达减少、cleaved-Caspase3 表达增加,上述结果说明抑制 P53 蛋白表达后可引起 P21WAF1 蛋白表达减少、CDK1 蛋白的 Thr14/Tyr15 位点磷酸化增加、CDK1 活性受到抑制,提示可能是通过 P53-P21WAF1 信号通路引起 CyclinB1/CDK1 复合物活性受到抑制,导致被阻滞在 G2 期的卵巢癌细胞数目增加,进而引起其下游细胞增殖和凋亡相关蛋白表达异常,最终引起卵巢癌细胞增殖抑制、凋亡增加。

综上所述,本研究通过体外实验显示 CDK1 蛋白的异常表达与上皮性卵巢癌细胞的增殖和凋亡相关,G2/M 检验点 P53-P21WAF1-CDK1 信号通路可能参与调节卵巢癌细胞的增殖和凋亡。在本研究基

础上进一步探讨 CDK1 及 G2/M 检验点与卵巢癌的关系,有助于阐明卵巢癌发病与细胞周期调节异常的关系,也可作为卵巢癌的临床靶向治疗提供潜在的治疗靶点。

参考文献

- [1] Charrier-Savournin F B, Chateau M T, Gire V, et al. p21-mediated nuclear retention of cyclinB1-CDK1 in response to genotoxic stress[J]. *Mol Biol Cell* 2004, 15(9): 3965–76.
- [2] Evan G I, Vousden K H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer[J]. *Nature* 2001, 411(6835): 342–8.
- [3] Stark G R, Taylor W R. Control of the G2/M transition[J]. *Mol Biotechnol* 2006, 32(3): 227–48.
- [4] 史惠蓉, 张瑞涛. P53、P21WAF1 和 CDK1 在卵巢上皮性癌组织中的表达及意义[J]. *癌症*, 2009, 28(8): 882–5.
- [5] 张瑞涛, 史惠蓉, 刘慧冰, 等. 卵巢上皮性癌中 P21WAF1 和 CDK1 的表达[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2009, 44(2): 334–6.
- [6] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2016 [J]. *CA Cancer J Clin* 2016, 66(1): 7–30.
- [7] Laiho M, Latonen L. Cell cycle control, DNA damage checkpoints and cancer[J]. *Ann Med*, 2003, 35(6): 391–7.
- [8] Frouin I, Touille M, Ferrari E, et al. Phosphorylation of human DNA polymerase λ by the cyclin-dependent kinase Cdk2/cyclin A complex is modulated by its association with proliferating cell nuclear antigen [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(16): 5354–61.
- [9] Marraccino R L, Firpo E J, Roberts J M. Activation of the p34 CDC2 protein kinase at the start of S phase in the human cell cycle [J]. *Mol Biol Cell*, 1992, 3(4): 389–401.
- [10] Obaya A J, Sedivy J M. Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells [J]. *Cell Mol Life Sci* 2002, 59(1): 126–42.
- [11] Yang J Q, Liu H X, Liang Z, et al. Over-expression of p53, p21 and Cdc2 in histologically negative surgical margins is correlated with local recurrence of laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(7): 4295–302.
- [12] Zhang C, Elkahoul A G, Robertson M, et al. Loss of cytoplasmic CDK1 predicts poor survival in human lung cancer and confers chemotherapeutic resistance [J]. *PLoS One* 2011, 6(8): e23849.
- [13] Sung W W, Lin Y M, Wu P R, et al. High nuclear/cytoplasmic ratio of Cdk1 expression predicts poor prognosis in colorectal cancer patients [J]. *BMC Cancer* 2014, 14: 951.
- [14] Hongo F, Takaha N, Oishi M, et al. CDK1 and CDK2 activity is a strong predictor of renal cell carcinoma recurrence [J]. *Urol Oncol* 2014, 32(8): 1240–6.
- [15] Taylor W R, Stark G R. Regulation of the G2/M transition by p53 [J]. *Oncogene*, 2001, 20(15): 1803–15.

Roles of P53/CDK1 pathway of G2/M checkpoint on proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells

Zhang Ruitao, Shi Huirong, Ren Fang, et al

(Dept of Gynecology, The First Affiliated Hospital of Zhenzhou University, Zhengzhou 450052)

Abstract Objective To explore the role of P53-P21WAF1-cyclin dependent kinases 1 (CDK1) pathway of cell cycle G2/M checkpoint on the proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells. **Methods** The specific short-hair RNA (shRNA) plasmids and negative control plasmid of CDK1 and p53 genes were transfected into SK-OV-3 and OVCAR-3 cells respectively. Cell proliferation, cell apoptosis rate and cell cycle distribution were measured by MTT, TUNEL and FCM assay respectively. Expressions of CDK1, phospho-CDK1 (Thr14/Tyr15), P53, p-P53 (ser15), P21WAF1, CyclinB1, Ki-67, Survivin and cleaved-Caspase3 proteins were examined by Western blot. **Results** After silencing the CDK1 and p53 genes by RNAi respectively, the proliferation of SK-OV-3 and OVCAR-3 cells were inhibited, the apoptosis increased and the number of G2 phase cells increased, expressions of Ki-67 and Survivin protein were downregulated, expressions of cleaved-Caspase3 were upregulated. Moreover, the levels of p-P53 (ser15) and P21WAF1 were decreased, p-CDK1 (Thr14/Tyr15) were increased after p53 gene knock-down. **Conclusion** P53/CDK1 pathway of G2/M checkpoint may be implicated in the proliferation and apoptosis regulation of ovarian cancer cells.

Key words G2/M checkpoint; cyclin dependent kinases 1; epithelial ovarian cancer; proliferation; apoptosis