

Progress in the Study of Cyclin E in Marine Invertebrates

Qian Hu¹, Huarong Guo^{1,2*}

¹Ministry of Education Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao Shandong

²Institute of Evolution and Marine Biodiversity, Ocean University of China, Qingdao Shandong
Email: huarongguo@ouc.edu.cn

Received: May 5th, 2020; accepted: May 21st, 2020; published: May 28th, 2020

Abstract

Cyclin E, a member of cyclin family, plays an important role in the progress of cell cycle. In this paper, the structure, biological function and mechanism of action of Cyclin E and its research progress in marine invertebrates are reviewed and prospected.

Keywords

Cyclin E, Structure, Function, Marine Invertebrates

细胞周期蛋白E (Cyclin E)在海洋无脊椎动物中的研究进展

胡 倩¹, 郭华荣^{1,2*}

¹中国海洋大学, 海洋生命学院, 海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室, 山东 青岛

²中国海洋大学, 海洋生物多样性与进化研究所, 山东 青岛
Email: huarongguo@ouc.edu.cn

收稿日期: 2020年5月5日; 录用日期: 2020年5月21日; 发布日期: 2020年5月28日

摘 要

细胞周期蛋白E (Cyclin E)是细胞周期蛋白家族成员之一, 其在细胞周期活动中发挥重要作用, 本文对

*通讯作者。

Cyclin E的结构、生物学功能与作用机制及其在海洋无脊椎动物中的研究进展进行了综述和展望。

关键词

细胞周期蛋白E, 结构, 功能, 海洋无脊椎动物

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

细胞周期(cell cycle)是指细胞从一次分裂完成开始到下一次分裂结束所经历的全过程, 分为间期(G₀/G₁、S 和 G₂)与分裂期(M)两个阶段。细胞周期蛋白(cyclin)是与细胞周期的调节有关的一组蛋白质, 包括 Cyclin A-I, 其丰度随细胞周期的时相不同而不同。细胞周期蛋白是一个大家族, 细胞周期蛋白 E (Cyclin E)是细胞周期蛋白家族的重要成员之一。Cyclin E 主要在 G₁ 和 G₁/S 期发挥作用, 于 G₁ 中期开始上调表达, G₁/S 期达到峰值, 对于缩短 G₁ 期, 推动细胞跨越 G₁/S 检测点(Checkpoint)进入 S 期, 并启动 DNA 合成起决定性作用[1]。本文将分别对 *Cyclin E* 基因的结构与功能、Cyclin E 调控细胞周期的作用机制及其在海洋无脊椎动物中的研究进展进行综述。

2. Cyclin E 的结构与生物学功能

2.1. Cyclin E 的结构

细胞周期蛋白 E (Cyclin E)是细胞周期蛋白(Cyclin)家族的重要成员之一。*Cyclin E* 最早是 1991 年由美国研究小组发现的。*Cyclin E* 基因位于人染色体 19q12-13, 含有 3 个内含子和 4 个外显子[2]。Cyclin E 蛋白的结构相对简单, 与周期蛋白家族一样拥有一个相对保守的周期蛋白盒(Cyclin box), 可与细胞周期依赖性激酶 2 (CDK2)结合, 共同发挥作用; 其 C 端较长且富含脯氨酸、谷氨酸、天冬氨酸和苏氨酸残基(PEST), PEST 区域被认为与该蛋白的更新与降解有关。研究者发现 PEST 中第 380 位苏氨酸可自身发生磷酸化, 这可能与泛素化降解有关[3]。Cyclin E 还含有核定位信号(NLS), 可协助 Cyclin E/CDK2 复合体定位于核内, 以调节与染色体相关的细胞功能, 参与基因复制与转录[4]。

2.2. Cyclin E 的生物学功能

细胞周期蛋白(Cyclin)最先发现于海洋无脊椎动物的胚胎, 参与细胞分裂, 其催化亚基为细胞周期依赖性激酶(Cell cycle-dependent kinase, CDK), cyclin 和 CDK 特异性结合并在调节真核细胞的细胞周期活动中发挥重要作用。细胞周期包括间期和有丝分裂期(M 期), 间期包括 G₁、S 和 G₂ 期, G₁ 期为 DNA 合成做准备, S 期是 DNA 的合成阶段, G₂ 期合成有丝分裂相关的蛋白质, 为细胞分裂做准备。其中, cyclin 的丰度在细胞周期的不同时期中呈周期性波动, 但是 CDK 在细胞周期的不同时期中的丰度则保持不变。cyclin 具有底物专一性, 能够控制与活化与其结合的 CDK, 决定细胞周期的进程[1]。细胞周期的调控是高度保守并受到严格调控的。其中, 细胞周期检测点能够严格监视细胞周期时相之间的转换和每一个时期的进行, 并检测是否有适合分裂的细胞环境以及细胞分裂的质量, 检测纺锤体的组装和 DNA 损伤情况。G₁/S 和 G₂/M 期是分裂的关键过渡期。若外界条件适宜细胞分裂, 细胞将做出反应, 跨越 G₁ 期, 进入 S 期; 同样, 若 cyclin/CDK 活性失调将在 G₁ 期导致癌症的发生[5]。

其中, Cyclin E 在 G1/S 期活性最高, 是此过渡期的重要限速因子。Cyclin E 的生物学功能是与 CDK2 形成复合体后活化下游分子, 促进细胞分裂。

3. Cyclin E 调控细胞周期的作用机制

Cyclin E 与细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK2)形成复合物, CyclinE/CDK2 复合物通过磷酸化许多下游蛋白质来调节多种细胞过程。CyclinE/CDK2 复合物在 G1 期和 G1/S 期起着至关重要的作用。G1 期 Cyclin E/CDK 复合体调节的关键底物是视网膜母细胞瘤蛋白(Rb), Rb 是生长负性调节因子, Rb 与 E2F (一种可调控细胞周期 G1/S 期转换的转录因子)相互作用可抑制 DNA 合成, 而 Cyclin E/CDK2 复合物可以磷酸化 Rb, 过度磷酸化的 Rb 将不再与 E2F 相互作用, 从而释放 E2F, 促进 DNA 合成, 驱动细胞从 G1 进入 S 期[6]。CyclinE/CDK2 复合物也可磷酸化 Smad3, Smad3 在转化生长因子- β (TGF- β)途径中起到关键作用, Smad3 被 CyclinE/CDK2 复合物磷酸化后, TGF- β 的转录活性受到抑制, 从而促进了细胞周期的进行[7]。

Cyclin E 的蛋白表达和降解是受到严格调控的, 与其在细胞周期中的生物学功能相一致。Cyclin E 的异常表达包括过表达、表达水平与细胞周期不同步以及截短的低分子量 Cyclin E 的累积均与肿瘤发生有关, 涉及各种类型的癌症[8]。Cyclin E 在很多肿瘤中的表达水平都远远高于正常的生理水平, Cyclin E 的过表达将缩短 G1 期时间, 使细胞分裂不再依赖生长因子的刺激, 导致细胞分裂紊乱, 约 18%~22% 的乳腺癌是因 Cyclin E 的表达失调而导致的[9]。Cyclin E 也是乳腺癌预后的标志物, 其表达随着肿瘤分期和分级的增加而增加[10]。科学家们在乳腺肿瘤中发现了大量截短的低分子量 Cyclin E 蛋白表达, 这些 Cyclin E 蛋白能诱导 CDK2 产生活性, 并能更有效地促进细胞周期的进行。相关研究表明, 这些低分子量的 Cyclin E 蛋白不断累积是导致 Cyclin E 致癌的重要原因[11] [12]。Cyclin E 也是肺癌的一个预后指标。相关研究表明, Cyclin E 的过度表达与肺癌预后具有显著的相关性, Cyclin E 表达增加与预后不良有关[13]。

4. Cyclin E 在海洋无脊椎动物中的研究进展

4.1. Cyclin E 在海胆中的研究进展

海胆是生物科学史上最早被使用的模式生物, 它的卵子和胚胎对早期发育生物学的发展有举足轻重的作用。Sumerel 等(2001)从海胆中克隆了 *Cyclin E* 基因, 发现海胆的 *Cyclin E* 基因与人的 *Cyclin E* 基因有 60% 的同源性。通过免疫印记(Western Blot)和放射性标记, 发现在海胆卵细胞的发生过程中, Cyclin E 蛋白在生发泡中开始合成, 并在卵母细胞成熟时释放到卵细胞质中。通过 Northern 杂交和 Western Blot, 发现在海胆受精卵和早期胚胎中 *Cyclin E* 的表达水平较高, *Cyclin E* 转录出的 mRNA 含量较多, 但由于蛋白质的连续周转, Cyclin E 蛋白的含量较低。受精卵进入囊胚期后, 除了部分分裂旺盛的细胞仍有高水平的 Cyclin E 蛋白的表达, 其他细胞 Cyclin E 蛋白的表达量较低。Cyclin E 与 CDK2 结合, 使底物磷酸化从而促进细胞从 G1 进入 S 期, 通过免疫沉淀法检测海胆受精卵不同时期 Cyclin E 激酶活性时, 发现在海胆受精卵和早期胚胎中, Cyclin E 相关激酶的表达量较高, 随着发育的进行, Cyclin E 相关激酶的表达量逐渐降低[14]。Schnackenberg 等(2002)利用免疫荧光双标记和激光共聚焦显微镜技术, 发现在海胆受精卵形成过程中, Cyclin E 在受精后选择性地迅速进入精子头部, 并集中分布在雄性原核, 直到雄性原核和雌性原核融合, Cyclin E 才在整个合子核中分散开, 这表明 Cyclin E 可能参与精子头部基因组的重塑。另外, 在细胞有丝分裂过程中, Cyclin E 和 CDK2 富集于纺锤体, 对 CyclinE 和 CDK2 的定位分析表明他们定位在染色体上, 而且 Cyclin E 在整个有丝分裂过程中都没有从染色体上降解或解离, 这可能与 Cyclin E 将继续在染色体上启动下一轮 DNA 复制有关[15]。之后, Schnackenberg 等(2008)又利用免疫荧光技术和 Western Blot 发现在海胆受精卵中, CDK 抑制剂能阻断中心体(Centrosome)的复制, 表明中心体的复制需要 Cyclin E/CDK2 激酶活性, 在 S 期和 G1 期, Cyclin E/CDK2 激酶活性随 Cyclin E 表达量

的升高而升高。另外,当细胞中蛋白质的合成受到抑制时,Cyclin E 蛋白及其相关激酶的活性并没有受到影响,这可能是因为抑制蛋白质合成的同时也抑制了泛素连接酶家族成员之一:SCF 复合物(Skp1-Cull-F-box 蛋白)的活性,SCF 复合物能降解 Cyclin E,当 SCF 复合物的活性被抑制,Cyclin E 的更新降解则会被阻断[16]。

4.2. Cyclin E 在线虫中的研究进展

线虫动物门是动物界中最大的门之一,它们在海、淡水和陆地上随处可见。在许多动物中,受精卵分裂时的双极纺锤体的形成是由精子受精时提供的中心粒引导的,为了防止在受精卵中形成多极纺锤体,大多数生物的卵细胞在形成过程中即清除了其自身的中心体。Kim 等(2006)在线虫的研究中发现 Cyclin E 在线虫中心体的形成过程中发挥重要作用。作者通过 RNA 干扰方法将线虫卵细胞的 CDK 抑制因子(CDK inhibitor, CKI)基因沉默,结果发现卵细胞受精后形成的胚胎有多个中心体,形成多极纺锤体,胚胎细胞分裂后期呈非整倍体,而降低 Cyclin E 或 CDK2 的水平可改善这种现象。这表明在线虫卵细胞中,Cyclin E/CDK2 复合物的存在有利于中心体的形成,而 CKI 通过抑制 Cyclin E/CDK2 复合物的活性,来清除卵细胞中的中心体,从而保证卵细胞与精子受精后形成的受精卵中的中心体只来源于精子细胞,保证受精卵中形成的是双极纺锤体[17]。

4.3. Cyclin E 在甲壳动物中的研究进展

Cyclin 在甲壳动物中的研究主要集中于配子形成和生殖腺发育等方面,在虾和蟹类中研究较为清楚的周期蛋白是 Cyclin B,科学家们对 Cyclin B 的组织表达谱的分析结果表明,Cyclin B 在生殖腺中有较高的 mRNA 表达量。但是,Cyclin E 在甲壳动物中的研究报道较少[18]。2014 年,赵超等利用对虾全基因组 cDNA 文库和 RACE 扩增技术成功克隆得到斑节对虾 *Cyclin E* 基因的 cDNA 全长,发现斑节对虾 *Cyclin E* 基因的开放阅读框全长 1263 bp,编码 420 个氨基酸,该氨基酸序列含有周期蛋白家族特有的 cyclin 保守区,并含有 N-糖基化位点和磷酸化位点;利用实时荧光定量 PCR 技术还检测到 *Cyclin E* 基因在斑节对虾眼柄、卵巢、肠、脑、肝胰腺、肌肉、淋巴、胃和心脏组织中均有 mRNA 表达,其中,卵巢组织中 *Cyclin E* 的表达量最高,眼柄和肠中 *Cyclin E* 的表达量也较高,表明 Cyclin E 蛋白可能参与卵巢的发育和眼柄的生成,肠是细胞更新较快的组织,这提示我们 Cyclin E 在对虾细胞增殖方面具有一定的作用。Cyclin E 基因在斑节对虾心脏、胃和肝胰腺中表达量相对较低。眼柄是甲壳动物神经内分泌的重要器官,在甲壳动物蜕皮过程中,眼柄分泌蜕皮抑制激素(MIH),抑制蜕皮过程。当给对虾注射 MIH 后,可在对虾卵巢组织中检测到 *Cyclin E* 基因的 mRNA 表达量下降;当将对虾眼柄切除后,MIH 的分泌会受到抑制,而对虾卵巢组织中 *Cyclin E* 基因的 mRNA 表达量却提高了,这表明 Cyclin E 与卵巢发育过程相关,因为切除眼柄使 MIH 的表达量下降后,能提高 *Cyclin E* 的表达量,从而促进对虾卵巢的发育,这为通过切除眼柄来促进斑节对虾卵巢发育的技术提供了分子层面的理论支持。以上研究结果为进一步探究斑节对虾卵巢的发育机理提供了理论依据[19]。

4.4. Cyclin E 在软体动物中的研究进展

软体动物身体柔软,且大多数都不分节,是无脊椎动物中数量和种类都非常多的一个门类。三角帆蚌是一类大型珍珠蚌,三角帆蚌中 *Cyclin E* 基因的开放阅读框长度为 391 bp,三角帆蚌 *Cyclin E* 基因与牡蛎和扇贝等贝类具有同源性,通过对 Cyclin E 蛋白的氨基酸序列分析,发现三角帆蚌 *Cyclin E* 并没有其他周期蛋白常有的周期蛋白框(cyclin box),Cyclin E 的靶蛋白预测结果表明,Cyclin E 在细胞周期调控中可与 CDK1、CDK2 和 CDK4 相互作用。三角帆蚌中的组织表达谱显示,*Cyclin E* 基因在三角帆蚌中

mRNA 的表达具有组织特异性, *Cyclin E* 在性腺中的 mRNA 表达量显著高于闭壳肌、斧足、外套膜、心脏、血液、内脏团和鳃($P < 0.05$), 并且具有显著雌雄差异, 这表明 *Cyclin E* 基因的高表达与三角帆蚌生殖细胞成熟及性腺细胞分裂活跃相关[20]。

5. 展望

Cyclin E 是一种核蛋白, 在细胞分裂过程中发挥重要作用。在医学研究中, *Cyclin E* 基因的过表达被认为是细胞恶性增殖和不良预后的标志。*Cyclin E* 在海洋无脊椎动物中的研究数量较少且不够深入, 基于 *Cyclin E* 在细胞分裂中的关键作用, 开展海洋动物 *Cyclin E* 的研究, 将有助于探索海洋动物细胞的分裂机制及其在生殖细胞发生和性腺成熟中的作用。利用一定的技术手段, 在海洋动物细胞中过表达 *Cyclin E* 基因, 将有助于建立海洋动物永生性细胞系, 为深入研究海洋动物奠定基础。

基金项目

国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”专项(2018YFD0901301)和中央高校基本科研业务费专项(201822018)资助。

参考文献

- [1] Ohtsubo, M., Theodoras, A.M., Schumacher, J., Roberts, J.M. and Pagano, M. (1995) Human Cyclin E, a Nuclear Protein Essential for the G1-to-S Phase Transition. *Molecular and Cellular Biology*, **15**, 2612-2624. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.5.2612>
- [2] 黄玫. 周期蛋白 E 在细胞周期调节中的作用[J]. 国外医学·遗传学分册, 2000, 23(1): 40-43.
- [3] Won, K.A. and Reed, S.I. (1996) Activation of Cyclin E/Cdk2 Is Coupled to Site-Specific Autophosphorylation and Ubiquitin-Dependent Degradation of Cyclin E. *EMBO Journal*, **15**, 4182-4193. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00793.x>
- [4] Moore, J.D., Yang, J. and Kornbluth, T.S. (1999) Nuclear Import of Cdk/Cyclin Complexes: Identification of Distinct Mechanisms for Import of Cdk2/Cyclin E and Cdc2/Cyclin B1. *The Journal of Cell Biology*, **144**, 213-224. <https://doi.org/10.1083/jcb.144.2.213>
- [5] Classon, M. and Harlow, E. (2002) The Retinoblastoma Tumour Suppressor in Development and Cancer. *Nature Reviews Cancer*, **2**, 910-917. <https://doi.org/10.1038/nrc950>
- [6] Hinds, P.W., Mittnacht, S., Dulic, V., Arnold, A., Reed, S.I. and Weinberg, R.A. (1992) Regulation of Retinoblastoma Protein Functions by Ectopic Expression of Human Cyclins. *Cell*, **70**, 993-1006. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90249-C](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90249-C)
- [7] Cooley, A., Zelivianski, S. and Jeruss, J.S. (2010) Impact of Cyclin E Overexpression on Smad3 Activity in Breast Cancer Cell Lines. *Cell Cycle*, **9**, 4900-4907. <https://doi.org/10.4161/cc.9.24.14158>
- [8] Donnellan, R. and Chetty, R. (1999) Cyclin E in Human Cancers. *FASEB Journal*, **13**, 773-780. <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.8.773>
- [9] Ohtsubo, M. and Roberts, J. (1993) Cyclin-Dependent Regulation of G1 in Mammalian Fibroblasts. *Science*, **259**, 1908-1912. <https://doi.org/10.1126/science.8384376>
- [10] Keyomarsi, K., O'Leary, N., Molnar, G., Lees, E., Fingert, H.J. and Pardee, A.B. (1994) Cyclin E, a Potential Prognostic Marker for Breast Cancer. *Cancer Research*, **54**, 380-385.
- [11] Wang, X.D., Rosales, J.L., Magliocco, A., Gnanakumar, R. and Lee, K.Y. (2003) Cyclin E in Breast Tumors Is Cleaved into Its Low Molecular Weight Forms by Calpain. *Oncogene*, **22**, 769-774. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206166>
- [12] Spruck, C., Sun, D., Fiegl, H., Marth, C., Mueller-Holzner, E., Goebel, G., Widschwendter, M. and Reed, S.I. (2006) Detection of Low Molecular Weight Derivatives of Cyclin E1 is a Function of Cyclin E1 Protein Levels in Breast Cancer. *Cancer Research*, **66**, 7355-7360. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3240>
- [13] Huang, L., Wang, D., Chen, Y., Li, W., Hu, F., Gong, B., Zhao, C. and Jia, W. (2012) Meta-Analysis for Cyclin E in Lung Cancer Survival. *Clinica Chimica Acta*, **413**, 663-668. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.12.020>
- [14] Sumerel, J.L., Moore, J.C., Schnackenberg, B.J., Nichols, J.A., Canman, J.C., Wessel, G.M. and Marzluff, W.F. (2001)

- Cyclin E and Its Associated CDK Activity Do Not Cycle during Early Embryogenesis of the Sea Urchin. *Developmental Biology*, **234**, 425-440. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0260>
- [15] Schnackenberg, B.J. and Marzluff, W.F. (2002) Novel Localization and Possible Functions of Cyclin E in Early Sea Urchin Development. *Journal of Cell Science*, **115**, 113-121.
- [16] Schnackenberg, B.J., Marzluff, W.F. and Sluder, G. (2008) Cyclin E in Centrosome Duplication and Reduplication in Sea Urchin Zygotes. *Journal of Cellular Physiology*, **217**, 626-631. <https://doi.org/10.1002/jcp.21531>
- [17] Kim, D.Y. and Roy, R. (2006) Cell Cycle Regulators Control Centrosome Elimination during Oogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Cell Biology*, **174**, 751-757. <https://doi.org/10.1083/jcb.200512160>
- [18] 韩坤煌, 张子平, 王艺磊. Cyclin-CDK-CKI 及 UPP 参与生殖调控及在甲壳动物性腺发育中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2010(7): 48-54.
- [19] 赵超, 傅明骏, 江世贵, 邹志华. 斑节对虾细胞周期蛋白 E 基因的克隆与表达分析[J]. 中国水产科学, 2014, 21(3): 464-473.
- [20] 刘佳敏. 三角帆蚌细胞周期蛋白筛选及其功能的初步分析[D]: [硕士学位论文]. 上海: 上海海洋大学, 2019.