

# PI3K 等 5 条信号通路对 NIH3T3 细胞 周期进程的调节作用研究

王一雯<sup>1,2,3</sup>, 王改平<sup>2,3</sup>, 耿小芳<sup>2,3</sup>, 秦丹<sup>1,2,3</sup>,  
张继红<sup>1,2,3</sup>, 和婷婷<sup>1,2,3</sup>, 徐存拴<sup>1,2,3</sup>

(1. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007; 2. 河南省一科技部共建细胞分化 国家重点实验室  
培育基地, 河南 新乡 453007; 3. 河南省生物工程重点实验室, 河南 新乡 453007)

**摘要:**为从基因转录水平解析信号通路对 NIH3T3 细胞周期进程的调控作用, 用小鼠基因表达谱芯片 Mouse Genome 4 302.0 检测信号通路相关基因表达丰度发现, PI3K, STAT3, 钙蛋白酶, Rho 家族鸟苷酸激酶和 VEGF 等 5 条信号通路的 105 个基因在该细胞的细胞周期中发生有意义的表达变化. 分析基因表达变化预示的信号通路作用表明, 上述 5 条信号通路依次促进 G<sub>1</sub> 期、G<sub>1</sub>/S 转换期、S 期、G<sub>2</sub>/M 转换期和 M 期进程. 结论: 上述 5 条信号通路促进 NIH3T3 细胞的细胞周期进程.

**关键词:** NIH3T3 细胞; 信号通路; 基因转录; 细胞周期

**中图分类号:** Q257

**文献标志码:** A

一般认为, 细胞增殖按 G<sub>1</sub> 期, G<sub>1</sub>/S 转换期, S 期, G<sub>2</sub> 期, G<sub>2</sub>/M 转换期和 M 期的顺序进行, 是高度有组织的时空调控过程, 是保证遗传物质均等分配和遗传稳定的基础<sup>[1]</sup>. 为从转录组水平解析信号通路调节 NIH3T3(小鼠胚胎成纤维细胞)细胞周期进程的途径和方式, 本文用血清饥饿法同步化细胞, 用小鼠全基因组表达谱芯片 Mouse Genome 430 2.0 检测细胞同步化后 0 h, 5 h, 15 h, 21 h, 22 h 和 23.5 h(依次对应于上述 5 个时期) NIH3T3 细胞的基因转录丰度, 用 qRT-PCR 验证芯片检测结果的可靠性, 用 IPA 软件和 KEGG PATHWAY 等网站资料分析基因表达变化预示的信号通路对细胞周期进程的调节作用. 结果表明, 在 NIH3T3 细胞周期进程中, 105 个信号通路相关基因和 891 个细胞周期进程相关基因发生了有意义的表达变化. 基因协同作用( $E_p(t)$ )分析发现, 上述 5 条信号通路分别促进 G<sub>1</sub> 期, G<sub>1</sub>/S 转换期, S 期, G<sub>2</sub>/M 转换期和 M 期周期的 NIH3T3 细胞周期进程, 现将有关结果报道如下.

## 1 材料与方 法

### 1.1 NIH3T3 细胞培养与细胞周期模型制备

将密度为  $1 \times 10^4$  个 NIH3T3 细胞/mL 接种于含 10% 小牛血清的 DMEM 高糖培养基里, 培养于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, pH 7.2 和相对饱和湿度为 95% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱里, 培养 3 d. 细胞生长到对数期, 换成含 1% 小牛血清的 DMEM 高糖培养基, 继续培养 48 h<sup>[2]</sup>. 然后又换成含 10% 小牛血清的 DMEM 高糖培养基继续培养, 并于培养的 0 h, 5 h, 15 h, 21 h, 22 h 和 23.5 h 分别收集细胞<sup>[3]</sup>, 保存于 -80 °C 冰箱备用.

收稿日期: 2015-01-10

基金项目: 国家 973 前期研究专项(2012CB722304); 河南省重大科技攻关项目(111100910600); 河南省基础与前沿技术研究项目(142300413212).

作者简介: 王一雯(1989-), 女, 河南平顶山人, 河南师范大学硕士研究生, 研究方向: 细胞分化调控.

通信作者: 徐存拴(1958-), 男, 河南林州人, 河南师范大学教授, 博士生导师, 主要从事再生生物学与再生医学研究,  
E-mail: xucs@263.net.

## 1.2 Mouse Genome 430 2.0 芯片检测与检测数据分析

按本课题组先前报道的方法提取 NIH3T3 细胞的总 RNA<sup>[4]</sup>. 简要地说,通过 SuperScript II RT 反转录系统合成 cDNA 第一条链,按 Affymetrix cDNA 单链合成试剂盒的操作指南合成 cDNA 第二条链. 按 GeneChip IVT 标记试剂盒操作指南合成生物素标记的 cRNA. 用片段化试剂对 cRNA 进行片段化处理,获得长度为 35~200 bp 的 cRNA 片断. 按 Affymetrix 公司(USA)提供的操作方法将上述 cRNA 片断与经过预杂交处理的 Mouse Genome 430 2.0 芯片杂交. 然后,用全自动洗涤工作站 GeneChip450 对芯片进行洗涤和染色,用高分辨芯片扫描仪 3000 扫描芯片和获得扫描图像,用 Affymetrix GCOS 2.0 软件将上述扫描图像转化为信号值,根据信号的  $p$ -值确定基因表达( $P < 0.05$ ),临界表达( $0.05 < P < 0.065$ )和不表达( $P > 0.065$ ). 均一化处理各张芯片的信号值后,用对照组的均一化值除以实验组得到两者的比值(ratio 值). 为减少实验操作和芯片分析产生的误差,每个时间点至少重复检测 3 次,后续分析中用它们的平均值.

## 1.3 实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)

为验证 Mouse Genome 430 2.0 芯片检测结果的可靠性,本文用 qRT-PCR 检测 CCNA2,CCNB1,CCND1 等 8 个基因在 NIH3T3 细胞增殖中的表达变化. 简要过程如下:从 GenBank 查找上述基因和内参  $\beta$ -actin 的序列号,用 primer 5.0 软件设计它们的上游和下游引物. 用本文“1.2”制备的 NIH3T3 细胞总 RNA 为模板,按照 AMV 反转录试剂盒(Promega, USA)操作说明进行反转录得到 cDNA 第一链. 以此为模板进行 PCR 反应,模板,引物和 Sybr Green I 染料用量分别为  $1 \mu\text{L}$ ,  $0.5 \mu\text{L}$  和  $1 \mu\text{L}$ ,反应时,先  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  2 min,后进行  $95 \text{ }^\circ\text{C}/15 \text{ s}$ ,  $60 \text{ }^\circ\text{C}/15 \text{ s}$  和  $72 \text{ }^\circ\text{C}/30 \text{ s}$  等 40 个循环,每个基因做 3 个平行实验.

## 1.4 NIH3T3 细胞周期进程相关基因的查找

通过 3 种方式确认生理活动相关基因<sup>[5]</sup>. 1) 分别将“signaling”, “cell cycle”等词输入 GO, NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)和 RGD(rgd.mcu.edu)等网站查找大鼠,小鼠和人的相应基因. 2) 根据 IPA 软件和 GENMAPP(www.genmapp.org), KEGG(www.genome.jp/kegg/pathway.html)以及 QIAGEN(www.qiagen.com/geneglobe/pathways.aspx)等网站的生理活动途径图汇总上述基因. 3) 通过查阅相关文献资料,补充完善有关生理活动基因. 整合上述 3 种方式获得的基因,去重复后得到每种生理活动的基因种类和数量.

## 1.5 调节 NIH3T3 细胞周期进程的信号通路及其相关基因的确认

通过两种方式确认调节细胞周期进程的相关信号通路<sup>[5]</sup>. 1) 将“cell cycle”一词输入 QIAGEN 和 KEGG 网站,获得调节细胞周期进程的相关信号通路. 2) 将调节细胞周期进程的信号通路基因上传至生物通路及相互作用分析软件(Ingenuity Pathway Analysis, 简称 IPA)的“Canonical Pathway”框,得到细胞周期进程相关信号通路. 将两者均涉及的信号通路合并,视为调节细胞周期进程的信号通路.

## 1.6 信号传导活动与细胞周期进程的相关性分析

用谱函数  $E_p(t)$  分析基因的协同作用和生理活动强弱<sup>[6]</sup>. 简要地说,分别将调节 NIH3T3 细胞周期进程信号通路相关基因的 ratio 值和 NIH3T3 细胞周期进程相关基因的 ratio 值代入谱函数( $E_p(t)$ )公式,计算它们的协同作用值( $E_p(t)$ 值). 当实验组的  $E_p(t)$  值与对照相同或相近时,预示生理活动(包括信号传导和细胞周期进程)同对照. 当  $E_p(t)$  值比对照  $\geq 2$  时,预示生理活动强于对照. 当  $E_p(t)$  值比对照  $\leq 0.5$  时,预示生理活动弱于对照. 将 NIH3T3 细胞周期中细胞周期信号通路信号传导活动的  $E_p(t)$  值与细胞周期活动的  $E_p(t)$  值进行比对,当两种活动的趋势一致时,视为细胞周期信号通路调节细胞周期活动. 当两者的趋势不一致或相反时,视为细胞周期信号通路未参与细胞周期调节.

$$E_p(t) = \frac{\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{k=i+1}^n [(X_i(t) + X_k(t)) \cdot |r_{ik}|]}{C_n^2} = \frac{\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{k=i+1}^n [(X_i(t) + X_k(t)) \cdot |r_{ik}|]}{\frac{n(n-1)}{2}}$$

其中,  $n$  表示  $t$  时刻某一生理活动相关基因的个数. 上述谱函数  $E_p(t)$  描述了  $t$  时刻基因协同生理活动的效能大小,通过分析与对照的差异性,预测该时刻生理活动的进行情况.

## 2 结果

### 2.1 NIH3T3 细胞周期进程相关基因表达变化

收集 NIH3T3 细胞同步化后的 0 h, 5 h, 15 h, 21 h, 22 h 和 23.5 h 等 6 个时间点, 即处于 G<sub>1</sub> 期, G<sub>1</sub>/S 转换期, S 期, G<sub>2</sub> 期, G<sub>2</sub>/M 转换期和 M 期时间点的细胞, 用小鼠基因表达谱芯片 Mouse Genome 430 2.0 检测相关基因的表达丰度和计算实验组与对照组的比值(ratio 值)表明, 4 659 个基因的 ratio 值高于或低于对照 3 倍, 视为有意义表达变化基因. GO 分类分析发现, 上述 4 659 个基因涉及 33 种生理活动(见表 1). 其中, PI3K, STAT3, Rho 家族鸟苷酸激酶, VEGF 等 5 条信号通路的 105 个重要基因在 NIH3T3 细胞周期的 G<sub>1</sub> 期, G<sub>1</sub>/S 转换期, S 期, G<sub>2</sub> 期, G<sub>2</sub>/M 转换期和 M 期等 5 个时期发挥促进作用(见表 2), 891 个基因与细胞周期相关.

表 1 NIH3T3 细胞有意义表达变化基因参与的各项生理活动统计(个)

生理活性	同步化后恢复时间/h					统计	总计
	5	15	21	22	23.5		
cell cycle	267/156	327/170	327/161	312/144	308/135	548/336	884
cell proliferation	276/222	249/214	240/218	269/180	249/205	546/513	1059
cell cycle checkpoint	7/13	61/31	61/30	36/13	34/14	138/78	216
carbohydrate metabolic process	100/76	79/82	77/89	89/62	68/80	190/195	385
cell communication	363/259	292/284	285/309	339/222	282/276	698/669	1367
cell death	226/161	188/171	193/197	223/155	207/189	444/413	857
cell differentiation	264/188	248/209	243/225	263/183	255/211	549/477	1026
cell growth	91/63	72/79	75/78	87/71	77/76	174/168	342
cell junction organization	16/8	6/12	6/15	8/8	13/10	24/26	50
cellular homeostasis	176/123	139/128	127/156	165/101	143/126	350/292	642
cellular membrane organization	38/17	30/21	28/23	43/13	30/21	75/49	124
cytoplasm organization	97/60	88/70	76/79	98/58	85/73	194/156	350
cytoskeleton organization	49/16	51/13	53/15	48/15	55/17	99/43	142
biological adhesion/localization	29/34	25/34	24/29	27/24	26/28	65/74	139
developmental process	414/288	369/310	340/334	400/263	362/302	822/717	1539
extracellular matrix organization	11/7	9/11	7/12	8/11	10/14	19/24	43
hormone metabolic process	37/13	21/18	18/21	24/15	23/20	58/43	101
immune response	163/123	120/134	109/146	158/116	134/132	312/306	618
inflammatory response	167/141	131/144	109/153	158/121	135/146	330/328	658
lipid metabolic process	200/132	131/143	135/157	161/113	129/147	336/311	677
locomotion	132/99	92/93	85/99	108/83	93/103	246/224	470
nucleic acid metabolic process	324/254	332/241	335/257	360/210	335/232	690/571	1261
nucleus organization	9/1	13/6	16/6	14/2	15/3	26/9	35
organ development	334/229	283/263	265/266	296/206	270/247	627/578	1205
organelle organization	52/23	79/19	94/21	95/20	94/20	144/61	205
organic acid metabolic process	79/59	66/67	59/66	77/54	64/60	160/152	312
protein metabolic process	266/215	258/232	265/235	300/192	256/226	584/528	1112
regeneration	27/17	18/21	17/31	19/23	21/34	48/54	102
response to stimulus	513/364	437/283	388/408	489/311	419/371	1003/922	1925
signaling	368/261	294/289	284/316	339/226	285/280	706/684	1390
signaling molecules	122/83	77/100	81/109	105/73	83/100	217/229	446
transcription factors	103/90	96/94	99/76	96/76	92/77	208/194	402
transport	277/154	228/179	216/200	268/147	226/175	526/430	956
vitamin metabolic process	16/9	16/12	15/10	13/14	14/11	34/22	56
other	246/227	189/239	185/255	236/173	207/13	483/531	1014
Total	1164/835	1013/942	991/959	1152/923	1034/879	2349/2255	4604

\* 斜线左侧数值表示上调基因数目, 斜线右侧数值表示下调基因数目.

### 2.2 Mouse Genome 430 2.0 芯片检测结果的可靠性验证

为验证 Mouse Genome 430 2.0 芯片检测数据的可靠性, 本文用 qRT-PCR 检测了 CCNA2, CCNB1,

CCND1, CCNE1, CHEK1, PIK3R1 和  $\beta$ -actin 等 7 个基因的表达变化, 以  $\beta$ -actin 为内参. 结果显示, 在 NIH3T3 细胞周期中, 细胞周期蛋白 CCNA2 在细胞同步化后 5~12 h 表达上调, 细胞周期蛋白 CCNB1 在 22 h 表达量最高, 细胞周期蛋白 CCND1 在 5 h 开始上调, 细胞周期蛋白 CCNE1 在 15 h 表达上调, 检验点蛋白 CHEK1 在 22 h 表达量最高, 磷脂酰肌醇激酶 PIK3R1 在 5~23.5 h 均表达上调, 在 15 h 表达量最高. 芯片检测的基因表达趋势基本与 qRT-PCR 检测结果一致, 表明芯片检测的数据可靠(见图 1).

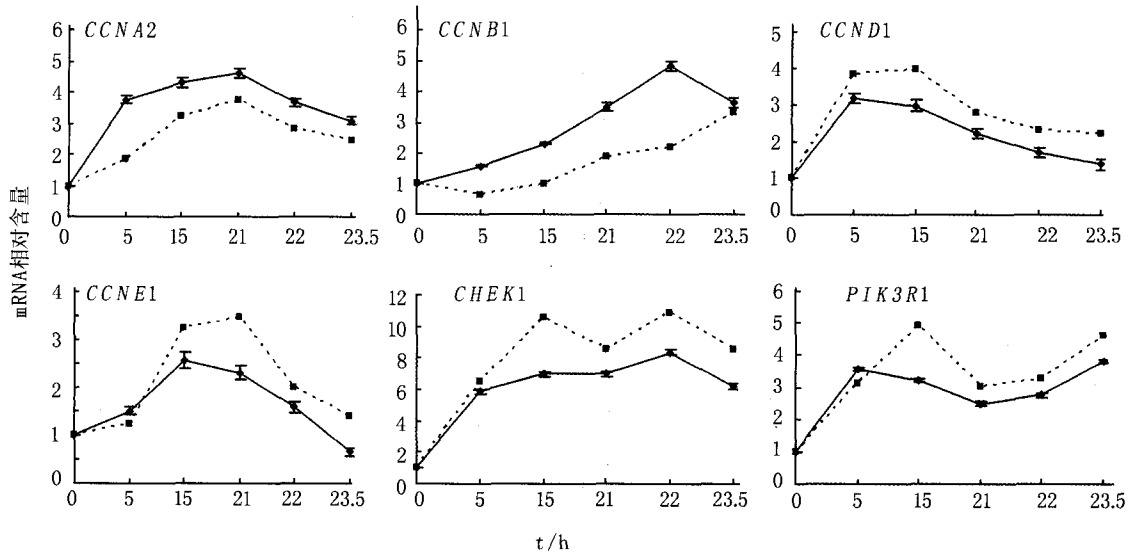


图1 qRT-PCR检测结果与芯片检测结果比较

### 2.3 NIH3T3 细胞的 PI3K, STAT3, 钙蛋白酶, Rho 家族鸟苷酸激酶和 VEGF 等 5 条信号通路相关基因的表达变化预示的信号传导活动

PI3K 信号通路中, 生长因子 *FGF4* 和 *FGF12* 表达上调, 受体 *FGFR3* 和 *EGFR* 上调, 下游分子 *SOS1* 和 *PIK3R1* 表达上调, 与细胞周期相关的转录因子 *CCND1* 在 5 h 表达上调(见表 2).  $E_p(t)$  值分析 PI3K 信号通路传导活动在 5 h 处明显增强(见表 3). 在 STAT3 信号通路中, 细胞因子 *BMP5* 和 *IL7* 表达上调, 其相应受体 *IL7R* 表达上调, 下游分子 *STAT3* 和 *STAT4* 表达上调, 转录因子 *MYC* 表达上调(见表 2). 谱函数  $E_p(t)$  值分析 STAT3 信号通路的传导活动在 15 h 处显著强于对照(见表 3). 在钙蛋白酶通路中, 整合素 *ITGA9* 和 *ITGAD* 表达上调, 下游激酶 *SRC* 表达上调, 钙蛋白酶相关基因 *CAPN6*, *CAPN7* 和 *CAPN9* 均表达上调, 细胞周期蛋白 *CCNA2* 在细胞周期 S 期表达上调(见表 2). 谱函数  $E_p(t)$  值分析钙蛋白酶通路信号传导活动在 NIH3T3 细胞周期 21 h 显著强于对照. 在 Rho 家族鸟苷酸激酶信号通路中, G 蛋白家族成员 *GNAT1* 表达上调, 下游的鸟苷酸交换因子 *GEFS* 表达上调, Rho 家族表达上调, Rho 家族相关蛋白激酶 *ROCK2* 表达上调, 细胞周期蛋白激酶 *CDC25* 在 22 h 表达上调(见表 2). 谱函数  $E_p(t)$  值分析 Rho 家族鸟苷酸激酶信号通路信号传导活动在 NIH3T3 细胞周期 22 h 显著强于对照(见表 3). VEGF 信号通路中信号分子 *VEGF* 及其受体 *VEGFR* 细胞分裂期表达上调, 下游分子酪氨酸激酶 *FAK*, *MKK* 家族表达上调, 蛋白激酶 *SLK* 表达上调, polo 样激酶 *PLK* 表达上调, 延迟细胞周期进程的检验点激酶 *CHEK2* 未发生明显变化, DNA 损伤应答蛋白 *NBS1* 在 NIH3T3 细胞周期过程中含量未发生显著变化. 细胞周期蛋白 *CDC25* 在有丝分裂期表达上调, 细胞周期蛋白 *CCNB1* 和 *CCNB2* 继续表达上调, 引发染色体紊乱的极光激酶 *AURKB* 基因则表达下调(见表 2). 谱函数  $E_p(t)$  值分析 VEGF 信号通路在细胞分裂期的信号传导活动发现其活性强于对照(见表 3).

### 2.4 NIH3T3 细胞的 G<sub>1</sub> 期, G<sub>1</sub>/S 转换期, S 期, G<sub>2</sub>/M 转换期和 M 期进程相关基因表达变化预示的细胞周期进程

实验数据表明, 在 NIH3T3 细胞同步化后恢复到细胞周期进程的第 5 h, 15 h, 21 h, 22 h 和 23.5 h 等 5 个时间点中, 共有 891 个细胞周期相关基因发生表达差异变化, 其中包括 G<sub>1</sub> 期的 423 个基因, G<sub>1</sub>/S 期的

497个基因,S期的488个基因以及G<sub>2</sub>/M期的456个基因和M期的443个基因各自发生显著变化。

表2 NIH3T3细胞周期中5条信号通路相关基因的表达变化

基因	同步化后时间/h					基因	同步化后时间/h				
	5	15	21	22	23.5		5	15	21	22	23.5
PI3K信号通路(G <sub>1</sub> 期)						钙蛋白酶信号通路(S期)					
PDGFRB	13.00	2.46	1.32	1.41	9.85	CDC2L1	4.29	6.96	6.50	4.59	8.00
ITGAD	12.13	1.41	4.92	2.30	2.00	ITGA9	2.53	1.34	3.79	1.22	0.90
ERBB4	10.56	4.29	3.48	3.48	2.83	ITGAD	12.13	1.41	4.92	2.30	2.00
FLT1	8.00	2.64	4.59	2.30	1.74	SRC	1.36	2.76	3.01	1.08	0.89
EGFR	4.35	0.69	0.78	1.43	0.74	CAPN6	0.35	3.29	6.23	4.22	3.25
INSRR	3.99	0.95	1.20	1.16	1.05	CAPN7	1.08	5.44	5.16	0.38	2.27
NTRK1	3.96	2.33	2.27	4.19	4.10	CAPN9	1.07	6.25	8.04	0.53	1.07
ITGB5	3.73	0.71	0.81	1.07	0.71	CCNA2	1.87	3.25	3.73	2.83	2.46
FGFR3	3.54	2.03	3.29	4.06	4.17	Rho家族鸟苷酸激酶信号通路(G <sub>2</sub> /M期)					
GDNF	3.25	5.66	18.38	4.59	1.00	GNAT1	5.66	3.25	6.96	0.66	2.46
FLT3	0.29	0.23	0.25	0.23	0.27	GNG10	0.93	3.73	1.32	4.59	3.48
ERBB2	0.27	0.50	1.07	1.00	0.25	GNAZ	1.04	3.72	0.91	2.61	0.87
PDGFRA	0.23	0.23	0.18	0.18	0.19	ARHGEF7	5.44	1.06	1.80	0.97	2.85
ITGA1	0.07	0.09	1.41	1.23	0.76	ARHGEF11	1.23	1.15	4.92	1.41	1.15
BMP2	3.14	1.46	0.52	3.35	1.12	ARHGEF9	0.82	6.16	0.94	0.77	0.77
CCL2	4.92	1.32	0.81	0.71	0.54	ARHGEF3	13.00	2.00	1.15	6.96	8.57
CCL5	5.66	0.66	0.87	1.00	0.87	MCF2L	1.23	2.00	4.29	1.07	0.81
CSF2RB	3.48	2.14	2.00	3.03	1.41	ARHGEF4	0.23	0.54	0.18	1.00	0.93
EGFR	4.35	0.69	0.78	1.43	0.74	RHOA	3.23	1.41	3.41	4.07	1.62
ELF3	8.57	8.00	14.93	11.31	4.00	RHOG	0.81	0.81	1.00	4.81	0.87
FGF12	3.69	0.75	1.09	1.29	0.48	RHOB	0.81	0.76	3.15	3.93	1.07
FGF4	3.48	0.66	0.81	0.87	0.76	RHOH	0.87	0.76	0.71	3.87	0.57
FGFR3	3.54	2.03	3.29	4.06	4.17	RHOD	1.15	1.32	1.15	1.87	1.23
IL3	4.29	2.83	2.00	2.83	2.30	RHOC	1.87	1.32	3.41	3.15	1.15
IL6	4.00	0.76	0.62	0.81	0.81	CCNB2	5.66	4.29	16.00	18.38	18.38
IL7R	3.08	1.61	1.05	2.64	1.07	ROCK2	3.00	1.08	2.57	3.54	3.30
NGFR	3.25	0.87	0.81	0.87	0.66	CDC25A	2.27	0.64	1.70	3.50	3.75
PRKCH	3.05	2.97	0.89	3.25	2.54	CHEK2	0.27	1.23	1.41	1.41	1.87
PDGFA	3.37	1.88	1.39	1.14	1.37	VEGF信号通路(M期)					
RAB5A	3.03	2.30	3.03	1.52	3.48	VEGFA	3.87	2.03	1.37	3.01	4.54
SOS1	4.33	1.73	1.70	2.17	1.54	KDR	3.81	2.41	2.62	3.93	4.76
ALK	1.23	3.73	4.00	3.48	8.00	CDC25A	2.27	0.64	1.70	3.50	3.75
CCND1	3.84	3.97	2.80	2.31	2.22	CDC2L1	4.29	6.96	6.50	4.60	8.00
COL7A1	7.46	6.96	3.48	8.57	8.00	CDC14A	13.93	10.56	4.59	13.93	6.50
COL9A1	0.87	5.28	0.76	8.57	0.76	SLK	11.31	5.28	4.00	6.96	5.66
CDH5	6.06	3.03	4.00	1.32	1.15	PLK1	1.07	11.31	1.74	18.38	22.63
EPHB1	1.32	3.25	0.62	1.07	0.76	APC	1.15	1.07	3.03	1.07	3.73
ERBB4	10.56	4.29	3.48	3.48	2.83	BUB1	1.15	6.06	8.00	9.85	12.13
GNAT1	5.66	3.25	6.96	0.66	2.46	CCNB1	0.65	0.98	1.86	2.18	3.33
GNAZ	1.04	3.72	0.91	2.61	0.87	CDC20	2.14	3.25	4.76	7.25	12.92
LAMC2	4.29	4.05	5.94	5.05	4.80	CDC2A	1.07	2.64	6.06	5.28	5.28
PIK3C2B	6.06	10.56	1.87	2.00	2.00	AURKB	1.41	0.93	0.07	1.41	0.15
PIK3R1	3.10	4.92	3.03	3.25	4.59	PTK2	4.99	3.68	2.57	3.65	3.79
ROS1	2.46	3.25	2.30	3.48	4.00	PTK2B	3.74	5.50	2.46	2.87	3.32
STAT3信号通路(G <sub>1</sub> /S期)						PXN	0.71	0.66	0.81	2.07	3.00
BMP5	6.06	8.00	5.66	21.11	22.63	MAP2K3	1.32	0.87	0.76	3.87	0.81
IL7R	3.08	1.61	1.05	2.64	1.07	MAP2K6	0.47	0.57	1.62	3.00	4.00
IL7	1.07	1.08	1.61	1.54	3.30	MAPK11	1.74	1.41	2.30	3.41	4.17
STAT3	1.74	0.66	3.73	1.41	4.29	MAPK14	1.15	0.47	2.47	1.81	3.54
MYCL1	6.06	1.07	0.87	8.00	0.81	MAPKAPK2	1.52	1.23	2.25	3.81	2.93
MYCN	1.07	4.59	5.66	8.00	13.00	HSPA1A	2.61	0.64	2.53	3.25	4.82
CCNE1	1.23	3.25	3.48	2.00	1.41	ACTA1	8.57	4.59	2.00	1.74	2.00
CCNE2	6.06	13.00	22.63	22.63	12.13	ACTA2	6.50	6.06	5.66	3.48	2.46
ESPL1	1.07	6.06	11.31	16.00	18.38	ACTG2	4.59	3.73	6.06	5.28	3.73

\*数值大于3.00表示基因上调,数值小于0.33表示基因下调

表3 5条信号通路的基因表达变化及信号传导活性

基因表达变化(上调/下调)信号传导活性	同步化后时间/h					总计
	5	15	21	22	23.5	
* PI3K 信号通路 PI3K 信号通路活性	35/4 +	16/3 ~	15/2 ~	16/2 ~	11/3 ~	35/4
* STAT3 信号通路 STAT3 信号通路活性	5/0 ~	6/0 +	7/0 +	6/0 ~	7/0 ~	6/0
* 钙蛋白酶信号通路 钙蛋白酶信号通路活性	1/0 ~	4/0 ~	7/0 +	1/0 ~	1/0 ~	7/0
* Rho 家族鸟苷酸激酶信号通路 Rho 家族鸟苷酸激酶信号通路活性	6/2 ~	5/0 ~	7/0 ~	11/0 +	5/0 +	11/2
* VEGF 信号通路 VEGF 信号通路活性	10/0 ~	11/0 ~	9/1 ~	18/0 ++	20/1 ++	20/1

\*“+”和“++”表示活性强于对照;“~”表示活性与对照无显著差异

在G<sub>1</sub>期,血小板源生长因子受体 *PDGFRB*、细胞周期蛋白 *CCND* 和转录因子 *NF-κB* 等 268 个细胞周期相关基因表达上调;转录因子 *TCF4*,引发免疫反应的细胞质内模式蛋白 *NOD1* 和自水解酶 *ABHD14A* 等 156 个细胞周期相关基因表达下调. 在G<sub>1</sub>/S转换期中,细胞周期蛋白 *CCND1*,细胞周期蛋白 *CCNE* 和原癌基因 *c-myc* 等 329 个细胞周期相关基因表达上调,结合蛋白 *CEBPA*,伸长因子结合蛋白 *ABTB1* 和 B 细胞迁移基因 *BTG2* 等 169 个细胞周期相关基因表达下调. S 期的转录因子 *TRP63*、细胞周期蛋白 *CCNA2* 和微丝结合蛋白 *TWF1* 等 327 个细胞周期相关基因表达上调,补体因子 *CFH*、核受体亚家族 *NR3C2* 和整合素 *ITGB2* 等 159 个基因表达下调. 在G<sub>2</sub>/M转换期,455 个基因的对数值发生明显改变. CDC 家族 *CDC123*、*CDC25A* 和 *polo* 家族 *PLK1* 等 313 个基因表达上调,丝氨酸蛋白酶抑制剂 *SPINK1*、B 细胞迁移基因 *BTG2* 和转录因子 *ALF1* 等 142 个基因表达下调. M 期的 444 个基因参与了细胞周期过程. CDC 磷酸酶家族 *CDC20*、微管相关蛋白激酶 *SLK* 和细胞周期蛋白 *CCNB* 等 310 个基因上调,早期生长应答因子 *EGR1*,不参与细胞增殖的双特异性磷酸酶 *DUSP11* 以及无孢蛋白 *ASPN* 等 134 个基因下调, *polo* 家族成员 *PLK3* 无明显变化(见表 2). *E<sub>p</sub>(t)* 值分析细胞周期五个时期的生理活性均显著强于对照(见表 4).

2.5 NIH3T3 细胞的 PI3K 等 5 条通路的信号传导活动与细胞周期进程的相关性

比较 PI3K 通路的信号传导活动与 G<sub>1</sub> 期细胞周期活动的相关性,发现二者在 NIH3T3 细胞周期的第 5 h 生理活动趋势相同. 在 15 h, STAT3 信号通路的传导活性强于对照,与 G<sub>1</sub>/S 转换期生理活性趋势一致. S 期的细胞周期相关基因生理活性与钙蛋白酶信号通路活性均强于对照,呈正相关. 在 G<sub>2</sub>/M 转换期, Rho 家族鸟苷酸激酶信号通路活性与该时期细胞周期活性呈正相关. 细胞有丝分裂期的细胞周期生理活性与 VEGF 信号通路生理活性均显著强于对照,并且呈正相关(见表 5).

表4 NIH3T3 细胞周期 5 个时间点的相关基因表达变化及活性

基因表达变化(上调/下调)生理活性	同步化后时间/h					总计
	5	15	21	22	23.5	
* G <sub>1</sub> 期 G <sub>1</sub> 期生理活性	13/7 +	5/3 ~	6/3 ~	9/2 ~	8/2 ~	13/7
* G <sub>1</sub> /S 转换期 G <sub>1</sub> /S 转换期生理活性	44/18 ~	61/31 +	43/22 ~	38/17 ~	38/20 ~	61/31
* S-期 S-期生理活性	24/12 ~	43/16 +	61/30 ++	43/14 +	41/18 ~	61/30
* G <sub>2</sub> /M 转换期 G <sub>2</sub> /M 转换期生理活性	12/6 ~	23/5 ~	23/6 ~	36/13 ++	26/7 ++	36/13
* M-期 M-期生理活性	8/7 ~	18/6 ~	22/7 ~	29/7 +	34/14 ++	34/14

\*“+”和“++”表示活性强于对照;“~”表示活性与对照无显著差异

表5 NIH3T3 细胞周期与相应信号通路的信号传导活动相关性

基因表达变化(上调/下调)生理活性	同步化后时间/h				
	5	15	21	22	23.5
PI3K 信号通路活性	+	~	~	~	~
G <sub>1</sub> 期生理活性	+	~	~	~	~
STAT3 信号通路活性	~	+	~	~	~
G <sub>1</sub> /S 转换期生理活性	~	+	~	~	~
钙蛋白酶信号通路活性	~	~	+	~	~
S-期生理活性	~	+	++	+	~
Rho 家族鸟苷酸激酶信号通路活性	~	~	~	+	+
G <sub>2</sub> /M 转换期生理活性	~	~	~	++	++
VEGF 信号通路活性	~	~	~	++	++
M-期生理活性	~	~	~	+	++

\*“+”和“++”表示活性强于对照;“~”表示活性与对照无显著差异。

### 3 讨论

细胞周期进程由一组高度保守的协调运转机制共同完成,包括 mRNA 转录、蛋白磷酸化、蛋白互作、核内外的交换运输以及蛋白的泛素化、翻译后的修饰等过程。CDC25 磷酸酶、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖性激酶及其抑制子、细胞周期检查点激酶、视网膜硫蛋白、转录因子 E2F 和 p53 等是构成细胞周期过程中的重要调节因子<sup>[7]</sup>,这些蛋白因子受一系列的信号通路调节,确保细胞周期稳定运行,完成细胞增殖<sup>[8]</sup>,过渡的细胞分裂或者失活的细胞周期均能导致疾病的产生甚至恶化<sup>[9-10]</sup>。

同步化是目前在保证细胞继续存活状态下打破细胞周期保守机制的唯一途径。人工同步化则是目前同步化的主要手段,常用方法有 DNA 合成抑制法、中期阻断法、有丝分裂选择法、离心淘洗法、氨基酸饥饿法、血清饥饿法和低温冷藏法等,这些技术能将细胞周期稳定同步于特定的周期时段,且细胞同步化率可达 95% 以上<sup>[11-12]</sup>。本实验室选择血清饥饿法将 NIH3T3 细胞同步化至细胞周期的 G<sub>0</sub> 期,步骤简单且同步化率极高,是细胞周期 G<sub>0</sub> 期同步化的经典实验方法。

借助基因芯片技术分析参与细胞周期调控的信号通路是目前研究细胞内信号通路的最常用手段<sup>[13]</sup>。细胞周期增殖基因表达谱对癌症的治疗亦有极高的预测价值<sup>[14]</sup>。当前的肿瘤分类技术高度依赖病理学工作者对肿瘤组织的主观判断,而基于基因芯片的高通量分析实验,即使一些组织没有显著变化,利用基因表达谱也能够对之做出早期诊断。其具有的强灵敏度、广检测度和高可信度等优点是本论文用基因芯片检测技术对 NIH3T3 细胞周期进程中的相关信号通路进行分析的可靠保证。

在 PI3K 信号通路中,胞外基质蛋白、胶原蛋白和生长因子等信号分子与其相应受体 CDH5、GDFR 结合后,可激活 PI3K 激酶<sup>[15]</sup>。PI3K 又将 PIP2 磷酸化为 PIP3,经 MAPK/ERK 途径活化细胞周期蛋白 CCND。细胞周期蛋白激酶 CDK4/6 与周期蛋白 CCND 互作形成 CDK4/6-cyclin D 复合物,促使细胞从静止期进入到细胞周期 G<sub>1</sub> 期,使细胞周期开始运转。其信号途径为 FGF→FGFR→PI3K→SOS1→RAC→MEKS→MAPK/ERKS→CCND。E<sub>p</sub>(t)值分析表明 PI3K 信号通路与 G<sub>1</sub> 期生理活性正相关,促进 G<sub>1</sub> 期的细胞周期进程。

信号传导与转录激活子 STAT3 被白介素 7 激活后,能活化核内原癌基因 c-myc<sup>[16]</sup>,c-myc 上调 CDC25A 的表达,从而激活细胞周期蛋白 E,CCNE 与 CDK2 形成复合物共同促进 G<sub>1</sub>/S 转换<sup>[17-19]</sup>。信号通路途径为 IL7→IL7R→STAT→c-Myc→CDC25A→CCNE。芯片数据表明,G<sub>1</sub>/S 转换期相关基因 CCNE1 和 CCNE2 在 15 h 表达上调。谱函数分析 STAT3 信号通路相关基因与 G<sub>1</sub>/S 转换期生理活性相关基因的协同作用表明二者在 15 h 处均显著强于对照且趋势一致,说明 STAT3 信号通路在 NIH3T3 细胞周期过程中促进了 G<sub>1</sub>/S 期的转换。

在钙蛋白酶信号通路中,整合素经跨膜运输后与胞内激酶 SRC 家族结合活化下游分子胞外信号调节激酶(ERK)以激活钙蛋白酶。通过提高钙蛋白酶的活性促进 Rb 蛋白过磷酸化增加细胞周期蛋白 CCNA 和细胞周期蛋白激酶 CDK2 的含量。CDK2 连接细胞周期蛋白(cyclin A)形成 CDK2-cyclin A 复合物,促进细胞

顺利通过S期<sup>[20]</sup>.其信号途径为ITGAD→SRC→ERK→Calpain→Rb→CDK2-CCNA复合物→调控S期靶基因,促进S期活性.谱函数分析表明钙蛋白酶通路中的基因与细胞周期S期生理活性中的基因协同作用均强于对照,说明钙蛋白酶信号通路促进细胞周期的S期正常进行.

G<sub>2</sub>/M转换期发生的主要事件是细胞周期蛋白激酶CDC25的激活.Rho相关蛋白激酶ROCK2调控的靶基因即为CDC25<sup>[21]</sup>.Rho相关激酶ROCK2与细胞有丝分裂时的中心体扩增关系密切<sup>[22]</sup>.在Rho家族鸟苷酸激酶信号通路中,G蛋白家族作为信号分子激活下游的鸟苷酸交换因子GEFS家族,经Rho家族(转录结束中止因子家族)激活ROCK2后,将CDC25磷酸化.作为M期诱导物,被磷酸化的CDC25将磷酸基团传递给细胞周期蛋白激酶CDC2后失活,CDC2在有丝分裂期期再与CCNB2形成复合物促进细胞进行有丝分裂.细胞周期蛋白CCNB2在G<sub>2</sub>/M转换中开始起作用<sup>[23]</sup>.由CCNB2与细胞周期蛋白激酶CDC2结合形成成熟促进因子MPF复合物促使细胞由G<sub>2</sub>期进入M期.芯片检测结果表明,Rho家族鸟苷酸激酶信号通路中的GNAT1,GNAZ,Rho家族和ROCK等相关基因表达上调,G<sub>2</sub>/M转换期的相关基因CDC25和CCNB2表达上调,参与检测G<sub>2</sub>/M期转换的检验点激酶CHEK2在整个细胞周期过程中表达量没有明显差异,一旦发生DNA损伤由CHEK2激活的应答转录因子NBS1<sup>[24]</sup>在整个细胞周期中也没有明显表达变化,通过促进凋亡抑制G<sub>2</sub>/M期转换的PLK3在NIH3T3细胞周期的6个时间点均没有表达上调,暗示NIH3T3细胞周期在正常运行.其信号途径为GNAT1→GEFS→Rho→ROCK→CDC25→CCNB.谱函数分析表明Rho家族鸟苷酸激酶信号通路与G<sub>2</sub>/M转换期二者生理活动趋势相同,说明Rho家族鸟苷酸激酶通路促进NIH3T3细胞由G<sub>2</sub>期向M期转换.

分裂前期细胞中心体上的polo样激酶PLK是有丝分裂期重要的调控因子,在维持基因组完整性以及在真核细胞周期的M期能够引发纺锤体形成、染色体分离和细胞质分裂等多样性的生理生化反应<sup>[25-27]</sup>.PLK是极性纺锤体形成必不可少的蛋白因子,在细胞有丝分裂前期激活CDC25c的活性,引发CDK1-CCNB复合物的形成,促进G<sub>2</sub>/M期转换.在有丝分裂后期polo样激酶与后期促进复合物Anaphase Promoting Complex/Cyclosome(APC/C)互作促使细胞从分裂中期向分裂后期转变,降解细胞周期蛋白CCNB,并开始调控细胞质的分裂<sup>[28-30]</sup>.研究表明,在有丝分裂过程中,经纤连蛋白与微管相连的蛋白激酶SLK被酪氨酸激酶磷酸化后活化PLK1,PLK1再磷酸化细胞周期蛋白激酶CDK1,促进CDK1-CCNB(MPF复合体)的形成<sup>[31-35]</sup>.热休克蛋白HSP作为分子伴侣也参与细胞周期的调控.实验表明,当HSP被其抑制子PEITC抑制后,细胞周期蛋白CCNB1,细胞周期蛋白激酶CDK1和CDC25C,PLK激酶均表达下调;同时,抑制细胞周期运转的P21转录因子随HSP的抑制而发生上调<sup>[36-38]</sup>.在血管内皮生长因子VEGF通路中,肝素结合糖蛋白同型二聚体VEGF经内皮特异性分子酪氨酸激酶受体VFEGR将信号传递至胞内后产生两条途径:一是经MKK3/6→P38→MAPKAP2/3→HSP→PLK,二是经FAK→SLK→PLK.两条途径活化PLK,进一步激活细胞周期蛋白激酶CDC25,磷酸化的CDC25再激活CDK1,促进细胞周期有丝分裂的进行.同时,M期检验点相关蛋白MAD1,MAD2,BUB1,BUB3和CDC20在动粒处经PLK激酶的磷酸化作用形成M期检验点复合体(MCC)<sup>[39-42]</sup>,直接抑制分裂后期促进复合物(APC/C)的泛素连接酶活性,避免早熟的染色体分离,保证遗传物质正确分配<sup>[43]</sup>.基因芯片数据显示,M期检验点相关蛋白BUB1和CDC20在NIH3T3细胞周期的23.5h处含量显著高于对照,作为真核细胞有丝分裂中必不可少的蛋白因子CCNB1和CCNB2在有丝分裂期也表达上调.谱函数分析表明VEGF信号通路促进NIH3T3细胞的有丝分裂过程.

细胞周期蛋白和细胞周期蛋白依赖性激酶是细胞周期进程的主要调控因子,细胞周期检验点是维护细胞周期进程有序运行的负反馈调节机制.对细胞周期蛋白CCNB和细胞周期检验点中的关键蛋白做深入研究依然是未来分子细胞生物学的热门研究方向<sup>[44]</sup>.综上所述,PI3K,STAT3,钙蛋白酶,Rho家族鸟苷酸激酶,VEGF等5条信号通路分别在转录组水平通过调节G<sub>1</sub>期,G<sub>1</sub>/S期转换,S期,G<sub>2</sub>/M转换期和M期共同调控NIH3T3的细胞周期进程,保证NIH3T3细胞周期活动的正常运转.通过基因芯片技术对参与细胞周期中的单一基因或蛋白的个体研究转为对多个基因,蛋白的系统分析,补充完善了细胞周期调控作用的研究方法,验证了芯片数据的可靠性,为下阶段的基因敲除与过表达,RNA干涉等研究细胞周期关键蛋白抑制NIH3T3细胞增殖实验提供可靠的数据资料和理论基础.



## 参 考 文 献

- [1] 陈晓波,王永朝. 细胞周期检验点调控研究进展[J]. 科学通报,1998(7):17-25.
- [2] Shinji H, Kiyoko K, Shin S, et al. Expression of progesterone receptor B is associated with G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest of the cell cycle and growth inhibition in NIH3T3 cells[J]. *Exp Cell Res*,2005,305(2):233-243.
- [3] Masahiro H, Dennis W S. Ras-dependent cell cycle commitment during G<sub>2</sub> phase[J]. *FEBS Letters*,2001,490:123-131.
- [4] Wang G P, Xu C S. Reference gene selection for real-time RT-PCR in eight kinds of rat regenerating hepatic cells[J]. *Mol Biotechnol*,2010,46(1):49-57.
- [5] 徐存栓,黄 茨,江 云,等. 建立基因协同作用算法解析大鼠肝再生中基因表达丰度预示的细胞增殖活动[J]. *河南科学*,2013(10):1615-1619.
- [6] 李朝军. 细胞周期调控原理[M]. 北京:科学出版社,2010(04):1-50.
- [7] Dante R A, Larkins B A, Sabelli P A. Cell cycle control and seed development[J]. *Front Plant Sci*,2014,5:493.
- [8] Henderson L, Bortone D S, Lim C, et al. Classic "broken cell" techniques and newer live cell methods for cell cycle assessment[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*,2013,304(10):C927-938.
- [9] Jin Y J, Lee J H, Kim Y M, et al. Macrophage inhibitory cytokine-1 stimulates proliferation of human umbilical vein endothelial cells by up-regulating cyclins D1 and E through the PI3K/Akt-, ERK-, and JNK-dependent AP-1 and E2F activation signaling pathways[J]. *Cell Signal*,2012,24(8):1485-1495.
- [10] Meyer C A, Jacobs H W, Datar S A, et al. Drosophila Cdk4 is required for normal growth and is dispensable for cell cycle progression[J]. *EMBO J*,2000,19(17):4533-4542.
- [11] Vassilev LT. Cell cycle synchronization at the G<sub>2</sub>/M phase border by reversible inhibition of CDK1[J]. *Cell Cycle*,2006,5(22):2555-2556.
- [12] 高世勇,曲笑莹. 细胞周期同步化研究进展[J]. *中国药理学通报*,2014,30(1):17-21.
- [13] 王媛媛. 大肠癌干细胞基因表达谱特点及其信号通路的筛选鉴定[D]. 广州:南方医科大学,2011.
- [14] 宛 梅. 细胞周期增殖基因表达谱有预测价值[N]. *医师报*,2011-03-19.
- [15] Meyer C A, Jacobs H W, Datar S A, et al. Drosophila Cdk4 is required for normal growth and is dispensable for cell cycle progression[J]. *EMBO J*,2000,19(17):4533-4542.
- [16] Barré B, Avril S, Coqueret O. Opposite regulation of myc and p21 waf1 transcription by STAT3 proteins[J]. *J Biol Chem*,2003,278(5):2990-2996.
- [17] Liu D, Liu A. Superoxide dismutase induces G<sub>1</sub>-phase cell cycle arrest by down-regulated expression of Cdk-2 and cyclin-E in murine sarcoma S180 tumor cells[J]. *Cell Biochem Funct*,2013,31(4):352-359.
- [18] Pok S, Wen V, Shackel N, et al. Cyclin E facilitates dysplastic hepatocytes to bypass G<sub>1</sub>/S checkpoint in hepatocarcinogenesis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*,2013,28(9):1545-1554.
- [19] Shen T, Huang S. The role of Cdc25A in the regulation of cell proliferation and apoptosis[J]. *Anticancer Agents Med Chem*,2012,12(6):631-639.
- [20] Qin Q Y, Liao G H, Baudry M, et al. Role of calpain-mediated p53 truncation in semaphorin 3A-induced axonal growth regulation[J]. *P Natl Acad Sci USA*,2010,107(31):13883-13887.
- [21] Liu T, Yu X, Li G, Yuan R, et al. Rock2 regulates Cdc25A through ubiquitin proteasome system in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Exp Cell Res*,2012,318(16):1994-2003.
- [22] Ling H, Hanashiro K, Luong TH, et al. Functional Relationship among PLK2, PLK4 and ROCK2 to Induce Centrosome Amplification[J]. *Cell Cycle*,2015,15:1100-1115.
- [23] Hanashiro K, Brancaccio M, Fukasawa K. Activated ROCK II by-passes the requirement of the CDK2 activity for centrosome duplication and amplification[J]. *Oncogene*,2011,30(19):2188-2197.
- [24] Huang Y H, Sramkoski R M, Jacobberger J W. The Kinetics of G<sub>2</sub> and M Transitions Regulated by B Cyclins[J]. *PLoS ONE*,2013,8(12):e80861.
- [25] Buscemi G, Savio C, Zannini L, et al. Chk2 activation dependence on Nbs1 after DNA damage[J]. *Mol Cell Biol*,2001,21(15):5214-5222.
- [26] Wang Q, Xie S, Chen J, et al. Cell cycle arrest and apoptosis induced by human Polo-like kinase 3 is mediated through perturbation of microtubule integrity[J]. *Mol Cell Biol*,2002,22(10):3450-3459.
- [27] Lee K S, Song S, Erikson R L. The polo-box-dependent induction of ectopic septal structures by a mammalian polo kinase, plk, in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,1999,96(25):14360-14365.
- [28] Simizu S, Osada H. Mutations in the Plk gene lead to instability of Plk protein in human tumour cell lines[J]. *Nat Cell Biol*,2000,2(11):852-854.

- [29] Baran V, Solc P, Kovarikova V, et al. Polo-like kinase 1 is essential for the first mitotic division in the mouse embryo[J]. *Mol Reprod Dev*, 2013, 80(7):522-534.
- [30] Serrano D, D'Amours D. When genome integrity and cell cycle decisions collide: roles of polo kinases in cellular adaptation to DNA damage[J]. *Syst Synth Biol*, 2014, 8(3):195-203.
- [31] Qian Y W, Erikson E, Taieb F E, et al. The polo-like kinase Plx1 is required for activation of the phosphatase Cdc25C and cyclin B-Cdc2 in *Xenopus* oocytes[J]. *Mol Biol Cell*, 2001, 12(6):1791-1799.
- [32] Qian Y W, Erikson E, Maller J L. Mitotic effects of a constitutively active mutant of the *Xenopus* polo-like kinase Plx1[J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(12):8625-8632.
- [33] O'Reilly P G, Wagner S, Franks D J, et al. The Ste20-like kinase SLK is required for cell cycle progression through G2[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(51):42383-42390.
- [34] Wagner S, Storbeck C J, Roovers K, et al. FAK/src-family dependent activation of the Ste20-like kinase SLK is required for microtubule-dependent focal adhesion turnover and cell migration[J]. *PLoS One*, 2008, 3(4):e1868.
- [35] Luhovy A Y, Jaberi A, Papillon J, et al. Regulation of the Ste20-like kinase, SLK: involvement of activation segment phosphorylation[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(8):5446-5458.
- [36] Wagner S, Flood T A, O'Reilly P, et al. Association of the Ste20-like kinase (SLK) with the microtubule[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(40):37685-37692.
- [37] Al-Zahrani K N, Sekhon P, Tessier DR, et al. Essential role for the SLK protein kinase in embryogenesis and placental tissue development[J]. *Dev Dyn*, 2014, 243(5):640-651.
- [38] Sarkars R, Mukherjee S, Roy M. Targeting heat shock proteins by phenethyl isothiocyanate results in cell-cycle arrest and apoptosis of human breast cancer cells[J]. *Nutr Cancer*, 2013, 65(3):480-493.
- [39] Blank M, Mandel M, Keisari Y, et al. Enhanced ubiquitinylation of heat shock protein 90 as a potential mechanism for mitotic cell death in cancer cells induced with hypericin[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(23):8241-8247.
- [40] Reynolds N, Ohkura H. Polo boxes form a single functional domain that mediates interactions with multiple proteins in fission yeast polo kinase[J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(Pt7):1377-1387.
- [41] Wong O K, Fang G. Plx1 is the 3F3/2 kinase responsible for targeting spindle checkpoint proteins to kinetochores[J]. *J Cell Biol*, 2005, 170(5):709-719.
- [42] Vanoosthuysse V, Hardwick, K G. A novel protein phosphatase 1-dependent spindle checkpoint silencing mechanism[J]. *Curr Biol*, 2009, 19(14):1176-1181.
- [43] Collin P, Nashchekina O, Walker R, et al. The spindle assembly checkpoint works like a rheostat rather than a toggle switch[J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(11):1378-1385.
- [44] 王建英, 兰邹然, 杨桂文, 等. 纺锤体检验点的信号通路及其作用[J]. *山东医药*, 2006, 46(16):95-96.
- [45] 张 伶, 陈日晷, 张 涛, 等. 靶向细胞周期蛋白 B1 的抗肿瘤研究[J]. *细胞生物学杂志*, 2008(30):574-580.
- [46] Ou Y, Ma L, Ma L, et al. Overexpression of cyclin B1 antagonizes chemotherapeutic-induced apoptosis through PTEN/Akt pathway in human esophageal squamous cell carcinoma cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2013, 14(1):45-55.

## Role of 5 Signaling Pathways in Regulating NIH3T3 Cell Cycle

WANG Yiwen<sup>1,2,3</sup>, WANG Gaiping<sup>2,3</sup>, GENG Xiaofang<sup>2,3</sup>, QIAN Dan<sup>1,2,3</sup>,  
ZHANG Jihong<sup>1,2,3</sup>, HE Tingting<sup>1,2,3</sup>, XU Cunshuan<sup>1,2,3</sup>

(1. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 53007, China; 2. State Key Laboratory Cultivation Base for Cell Differentiation Regulation, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China; 3. Henan Engineering Laboratory for Bioengineering and Drug Development, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

**Abstract:** In order to study the function of signalling pathway to the NIH3T3 cell cycle at the transcriptome level, the expression changes of genes were detected using Mouse Genome 4 302.0 array. The results show that the expressions of 105 genes associated with PI3K, STAT3, Calpain, Rho and VEGF signaling pathways changed remarkably. The signalling pathways above all promote the G1-phase, G1/S-phase, S-phase, G2/M-phase and M-phase in NIH3T3 cell cycle, respectively. Conclusion: The above five signaling pathways promote the progression of the NIH3T3 cell cycle.

**Keywords:** NIH3T3 cell; signalling pathway; gene transcription; cell cycle