

# p100<sup>Rb</sup> 和 p80<sup>Rb</sup> 过表达对细胞周期和凋亡的影响

李 强,李彩红,周 恒,乔 兵,刘建军,范礼斌

**摘要** 目的 探究视网膜母细胞瘤蛋白(Rb)截短体 p100<sup>Rb</sup> 和 p80<sup>Rb</sup> 对细胞周期、凋亡的影响。方法 构建 pcDNA3.1-p100<sup>Rb</sup>-FLAG、pcDNA3.1-p80<sup>Rb</sup>-FLAG 真核表达质粒;分别转染至 U2OS 细胞中,进行免疫荧光制片,检测 p100<sup>Rb</sup> 和 p80<sup>Rb</sup> 细胞定位情况;将 pcDNA3.1-RB1-FLAG、p100<sup>Rb</sup> 和 p80<sup>Rb</sup> 分别转染至 HEK 293T 细胞中,提取总蛋白进行免疫印迹,检测 Rb、p100<sup>Rb</sup> 和 p80<sup>Rb</sup> 的过表达;过表达 Rb、p100<sup>Rb</sup> 和 p80<sup>Rb</sup> 后利用流式细胞术检测细胞周期、凋亡。**结果** 成功构建 pcDNA3.1-p100<sup>Rb</sup>-FLAG 和 pcDNA3.1-p80<sup>Rb</sup>-FLAG 真核表达质粒;在 U2OS 细胞中 p100<sup>Rb</sup> 主要定位在细胞核,p80<sup>Rb</sup> 主要定位在细胞质;Rb、p100<sup>Rb</sup> 和 p80<sup>Rb</sup> 在 HEK 293T 细胞中可过表达;过表达 Rb、p80<sup>Rb</sup> 和 p100<sup>Rb</sup> 后,与对照组比较,过表达的 Rb 实验组和 p100<sup>Rb</sup> 实验组细胞周期 G<sub>1</sub> 期百分比升高,各实验组细胞的凋亡率均显著降低(均  $P < 0.05$ )。**结论** 过表达 p100<sup>Rb</sup> 可抑制 HEK 293T 细胞凋亡且阻滞细胞周期;过表达 p80<sup>Rb</sup> 可抑制 HEK 293T 细胞凋亡但对细胞周期无影响。

**关键词** 视网膜母细胞瘤蛋白;过表达;细胞周期;凋亡

**中图分类号** R 34;Q 28

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2022)09-1350-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.002

视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB)是一种早发的儿童恶性肿瘤,是由基因突变导致的<sup>[1]</sup>,基因分析表明 RB 的发生与 RB1 基因的突变有关<sup>[2]</sup>。RB1 基因由 27 个外显子和 26 个内含子组成,定位于 13q14 上,全长 178 143 bp,编码序列(coding sequence, CDS)全长 2 787 bp,编码 928 个氨基酸<sup>[3]</sup>。RB1 基因编码的 Rb 蛋白含有 3 个结构域,即 N 端结构域、A/B 口袋结构域和 C 端结构域<sup>[4]</sup>。Rb 蛋白在细胞内磷酸化的程度与其生物学功能密切相

关,例如低磷酸化或非磷酸化状态的 Rb 可与 E2F1 结合形成复合物,阻止 E2F1 转录因子的释放,使得 E2F1 介导的进入 S 期所必需的基因无法表达;而当 Rb 蛋白被 CDK 与周期蛋白复合物作用转变为超磷酸化状态时,Rb-E2F1 复合物解离,释放的 E2F1 作为转录因子调控下游靶基因的表达<sup>[5]</sup>。此外,Rb 蛋白在细胞的凋亡、染色质重塑等方面也有重要的作用<sup>[6]</sup>。已经发现在依托泊苷诱导的细胞凋亡过程中,Rb 被 caspase 裂解,去除掉 C 端的 42 个氨基酸残基,产生一个 100 ku 的蛋白 p100<sup>Rb</sup><sup>[7]</sup>。在人骨肉瘤细胞 Saos-2 中也发现了一种突变的 Rb 蛋白 p80<sup>Rb</sup>,其转录本与野生型 Rb 相比缺失了编码 C 端的 21~27 外显子<sup>[8]</sup>。目前尚无 p100<sup>Rb</sup> 和 p80<sup>Rb</sup> 相关生理功能的报道。为此,该研究构建了 pcDNA3.1-p100<sup>Rb</sup>-FLAG 和 pcDNA3.1-p80<sup>Rb</sup>-FLAG 真核表达载体,并过表达于 HEK 293T 细胞中,拟确定它们对细胞周期和凋亡的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒、菌株与细胞** pcDNA3.1-RB1-FLAG 和 pcDNA3.1 真核表达载体、TG1 菌株、HEK 293T 细胞均为安徽医科大学生命科学院范礼斌实验室自存,U2OS 细胞购于中国科学院上海细胞库。

**1.1.2 主要仪器** Gelx-1620 凝胶成像分析系统(上海欧翔科学仪器有限公司);Axio Observer 倒置荧光显微镜(德国 Zeiss 公司);PTC-1148 小型梯度 PCR 仪(上海伯乐生命医学产品有限公司);BSC-II 级生物安全柜(美国 Thermo 公司);光吸收酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);CytoFlex 流式细胞仪、Microfuge 20R 高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司)。

**1.1.3 主要试剂** 胎牛血清(美国 Clark 公司);DMEM 培养基(澳洲 Hyclone 公司);Opti-MEM 低血清培养基、McCoy's5a 培养基(美国 Thermo Fischer Scientific 公司);胰酶细胞消化液(含 EDTA)、Western 细胞裂解液、苯甲基磺酰氟(PMSF)、一抗稀释液、Lipofectamine 8000 脂质体转染试剂(上海碧云

2022-01-10 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:11040606M170);安徽医科大学双肩挑干部学术恢复科研专项(编号:0112011109)

作者单位:安徽医科大学生命科学院生物系,合肥 230032

作者简介:李 强,男,硕士研究生;

范礼斌,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:lfan@ahmu.edu.cn;

刘建军,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:Liu3@gis.a-star.edu.sg

天生物技术有限公司);改良型 Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒、BamH I、Xho I 限制性内切酶、T4 连接酶(上海生工生物有限公司);DNA 聚合酶(日本 Takara 公司);胶回收、质粒小抽试剂盒(美国 Axygen 公司);0.2  $\mu\text{m}$  PVDF 膜(美国 BIO-RAD 公司);FLAG 抗体 F1804(美国 Sigma 公司);辣根酶标记山羊抗鼠 IgG(北京中杉金桥生物有限公司);Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒(上海贝博生物科技有限公司);细胞周期 PI 染液(美国 BD 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 质粒构建** 实验所用 PCR 引物由通用生物系统(安徽)有限公司合成,序列见表 1。以 pcDNA3.1-RB1-FLAG 真核表达质粒为模板,PCR 扩增出含有 FLAG 标签的 p80<sup>Rb</sup> 和 p100<sup>Rb</sup> 的 CDS 序列。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后,利用胶回收试剂盒获得纯化的 PCR 产物。纯化的 PCR 产物或 pcDNA3.1 载体用 BamH I 和 Xho I 限制性内切酶双酶切,酶切后的 PCR 产物和 pcDNA3.1 载体用 T4 连接酶连接,并用连接产物转化 TG1 感受态细胞。转化的感受态细胞置于含氨苄抗性的 LB 固体培养基中 37  $^{\circ}\text{C}$  培养约 10 h,分别挑取数个单克隆至含有氨苄抗性的 LB 液体培养基中扩大培养约 12 h,质粒抽提后,用 BamH I 和 Xho I 限制性内切酶进行酶切鉴定,最后测序酶切正确的重组质粒。

表 1 PCR 引物列表

质粒	引物序列(5'-3')
p80 <sup>Rb</sup>	F:CGGGATCCCGCCACCATGCGCCCAAAAACCC R:CCGCTCGAGCGGTCACTTATCGTCGTCATCCTGTAATCTGGTCCAAATGCCT
p100 <sup>Rb</sup>	F:CGGGATCCCGCCACCATGCGCCCAAAAACCC R:CCGCTCGAGCGGTCACTTATCGTCGTCATCCTGTAATCATCTGCTTCATCTGAT

**1.2.2 细胞培养** U2OS 细胞使用含有 10% FBS 的 McCoy's5a 培养基(100 U/ml 青霉素 + 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  链霉素)在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的恒温培养箱中进行培养;HEK 293T 细胞使用含有 10% FBS 的 DMEM 培养基(100 U/ml 青霉素 + 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  链霉素)。37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的恒温培养箱中进行培养。

**1.2.3 质粒瞬时转染** 将  $1 \times 10^6$  个细胞接种于 6 孔板中,待细胞密度达到约 70% ~ 80% 时,更换新鲜完全培养液。在无菌离心管中依次加入 125  $\mu\text{l}$  Opti-MEM<sup>®</sup> Medium、2.5  $\mu\text{g}$  质粒 DNA、4  $\mu\text{l}$  Lipofectamine<sup>™</sup> 转染试剂,充分混匀后分别均匀滴入上述

细胞培养孔内,轻轻混匀。细胞培养 48 h 后用于蛋白表达和流式细胞术分析,培养 24 h 后用于免疫荧光观察。

**1.2.4 间接免疫荧光显微术** 取出有 U2OS 细胞盖玻片,用预冷的 PBS 溶液清洗, -20  $^{\circ}\text{C}$  预冷的甲醇固定 10 min,封闭液(1% 脱脂奶粉的 TBST 溶液)室温封闭 30 min,一抗溶液(1:100)室温孵育 2 h,TRITC 标记的二抗溶液(1:100)室温孵育 1 h,DAPI 染细胞核 5 min,最后将盖玻片固定至载玻片上,4  $^{\circ}\text{C}$  保存过夜后,荧光显微镜观察。

**1.2.5 Western blot 检测** 收集细胞沉淀并置于冰上裂解,20 min 后收集蛋白裂解液,14 000 r/min 离心 20 min,收集上清液并测定蛋白含量,取适量蛋白上清液加入 5  $\times$  SDS 上样缓冲液,100  $^{\circ}\text{C}$  变性 7 min、冰浴 3 min 后,进行 SDS-PAGE 电泳,252 mA 恒电流转 1.5 h 将蛋白转移至 PVDF 膜上,转移后的 PVDF 膜用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液室温封闭 1.5 h,加入相应的一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,二抗室温孵育 1.5 h,最后用 ECL 试剂盒显色并在化学发光仪(Gelx-1620)上进行显影。

**1.2.6 细胞周期** 离心收集的细胞沉淀用预冷的 PBS 溶液清洗,逐滴加入 500  $\mu\text{l}$  预冷的 70% 乙醇 -20  $^{\circ}\text{C}$  固定过夜,离心收集细胞,预冷的 PBS 溶液清洗,加入 500  $\mu\text{l}$  PI 染液,4  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 15 min 后用流式细胞仪检测细胞周期,不同时相的细胞百分比用 FlowJo 软件分析。

**1.2.7 细胞凋亡** 离心收集的细胞沉淀用预冷的 PBS 溶液清洗,再用 400  $\mu\text{l}$  AnnexinV 溶液与密度为  $10^6$  个/ml 的悬浮细胞孵育,再加入 5  $\mu\text{l}$  Annexin V-FITC 染色液,4  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 15 min 后,加入 10  $\mu\text{l}$  PI 染色液 4  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 5 min,立即用流式细胞仪检测细胞凋亡率,用 FlowJo 软件分析凋亡率。

**1.3 统计学处理** 采用 Graphpad Prism 8 软件进行统计学分析,所有计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 *t* 检验比较两组间均数。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 p100<sup>Rb</sup> 和 p80<sup>Rb</sup> 真核表达载体的构建** 利用 BamH I 和 Xho I 限制性内切酶对构建的 pcDNA3.1-p100<sup>Rb</sup>-FLAG 和 pcDNA3.1-p80<sup>Rb</sup>-FLAG 质粒进行酶切鉴定,结果见图 1A。图中可见,构建的质粒含有插入片段,而对照载体没有。酶切鉴定正确的质粒经测序,证明构建质粒的插入片段是正确的,见图 1B、C。

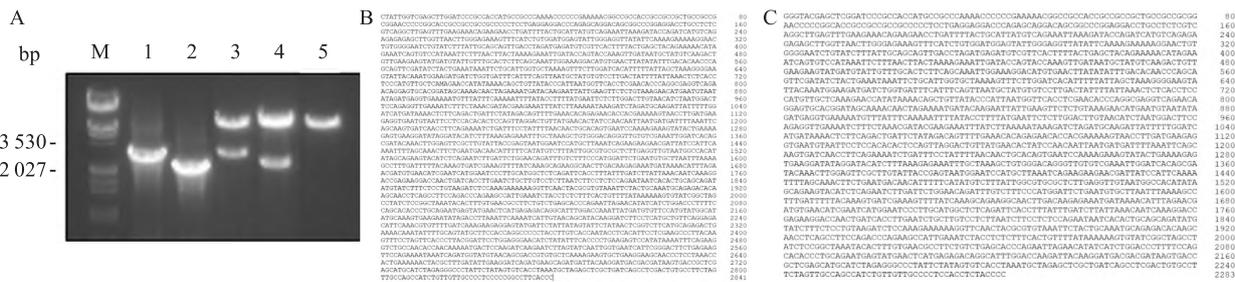


图1 pcDNA3.1-p100<sup>Rb</sup>-FLAG 和 pcDNA3.1-p80<sup>Rb</sup>-FLAG 重组质粒的酶切鉴定与测序结果

A: pcDNA3.1-p100<sup>Rb</sup>-FLAG 和 pcDNA3.1-p80<sup>Rb</sup>-FLAG 酶切鉴定图; B: pcDNA3.1-p100<sup>Rb</sup>-FLAG 测序结果图; C: pcDNA3.1-p80<sup>Rb</sup>-FLAG 测序结果图; M: Marker; 1: p100<sup>Rb</sup>-FLAG 的 PCR 产物; 2: p80<sup>Rb</sup>-FLAG 的 PCR 产物; 3: pcDNA3.1-p100<sup>Rb</sup>-FLAG 的酶切产物; 4: pcDNA3.1-p80<sup>Rb</sup>-FLAG 的酶切产物; 5: pcDNA3.1 的酶切产物

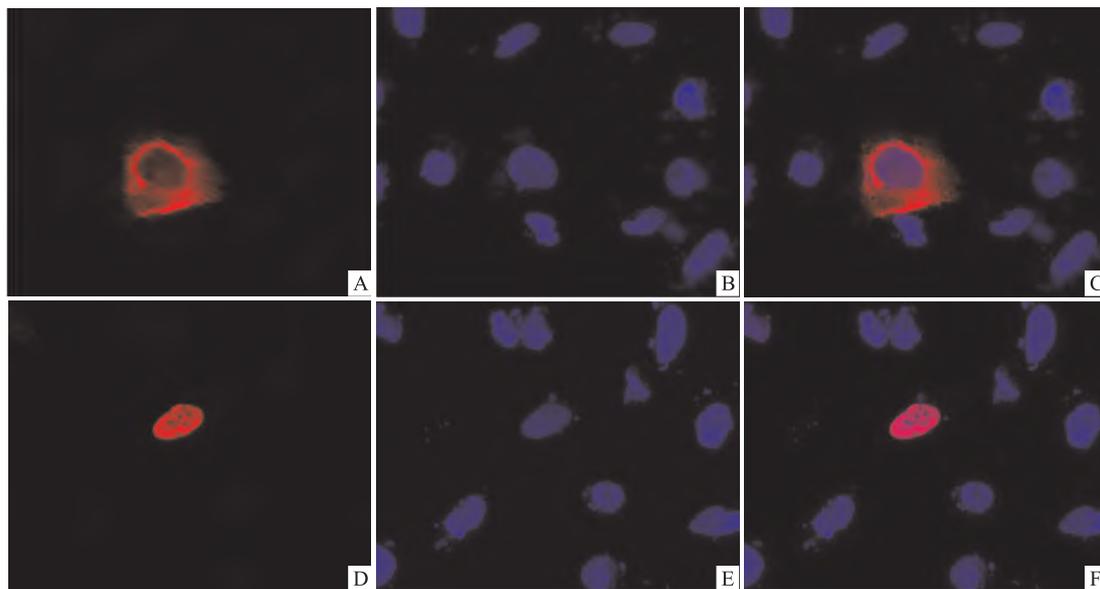


图2 p100<sup>Rb</sup>和 p80<sup>Rb</sup>在 U2OS 细胞中的荧光定位图 ×400

A: p100<sup>Rb</sup>-FLAG 在 U2OS 细胞中荧光定位; B: p100<sup>Rb</sup>过表达细胞 DAPI 染色表示细胞核; C: A 和 B 的图像叠加; D: p80<sup>Rb</sup>-FLAG 在 U2OS 细胞中荧光定位; E: p80<sup>Rb</sup>过表达细胞 DAPI 染色表示细胞核; F: D 和 E 的图像叠加

### 2.2 p100<sup>Rb</sup>和 p80<sup>Rb</sup>在 U2OS 细胞中的荧光定位

分别转染 pcDNA3.1-p80<sup>Rb</sup>-FLAG 和 pcDNA3.1-p100<sup>Rb</sup>-FLAG 至 U2OS 细胞,转染后 24 h 将盖玻片取出并进行免疫荧光制片,荧光显微镜下观察 p100<sup>Rb</sup>和 p80<sup>Rb</sup>在 U2OS 细胞中的分布。结果表明 p100<sup>Rb</sup>均主要分布在细胞核中,而 p80<sup>Rb</sup>分布细胞质且聚集在核膜侧,见图 2。

### 2.3 p100<sup>Rb</sup>和 p80<sup>Rb</sup>在 HEK 293T 细胞中的过表达

将 pcDNA3.1-RB1-FLAG, pcDNA3.1-p100<sup>Rb</sup>-FLAG 和 pcDNA3.1-p80<sup>Rb</sup>-FLAG 真核表达质粒瞬时转染至 HEK 293T 细胞中,转染后 48 h 收集细胞并裂解,进行 Western blot 检测。结果可见 Rb、p100<sup>Rb</sup>和 p80<sup>Rb</sup>分子量相应的条带,而对照组(未处理和转染 pcDNA3.1 载体的细胞裂解液)未见任何条带,表明 Rb、p100<sup>Rb</sup>和 p80<sup>Rb</sup>在 HEK 293T 细胞中可以表达,见图 3。

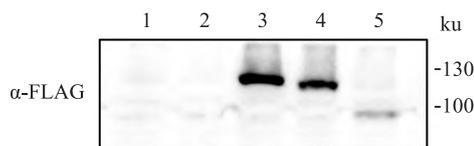


图3 p100<sup>Rb</sup>和 p80<sup>Rb</sup>在 HEK 293T 细胞中的过表达

1: 空白对照组; 2: pcDNA3.1 载体对照组; 3: Rb 过表达组; 4: p100<sup>Rb</sup>过表达组; 5: p80<sup>Rb</sup>过表达组

### 2.4 p100<sup>Rb</sup>和 p80<sup>Rb</sup>对 HEK 293T 细胞周期的影响

分别将 pcDNA3.1-RB1-FLAG, pcDNA3.1-p100<sup>Rb</sup>-FLAG, pcDNA3.1-p80<sup>Rb</sup>-FLAG 和 pcDNA3.1 转染至 HEK 293T 细胞中,约 48 h 后收集细胞,分别进行 PI 单染,然后流式细胞仪检测细胞周期(表 2)。与 pcDNA3.1 载体对照组比较,Rb 和 p100<sup>Rb</sup>过表达组 G<sub>1</sub> 期百分比升高,差异有统计学意义(P < 0.05);

p80<sup>Rb</sup> 过表达 G<sub>1</sub> 期百分比无明显变化, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。表明过表达的 Rb 和 p100<sup>Rb</sup> 使 HEK 293T 细胞周期阻滞在 G<sub>1</sub> 期, 而过表达的 p80<sup>Rb</sup> 对 HEK 293T 细胞周期无影响, 见图 4。

表 2 p100<sup>Rb</sup> 和 p80<sup>Rb</sup> 对 HEK 293T 细胞周期的影响 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	G <sub>1</sub> 期	S 期	G <sub>2</sub> 期
pcDNA3.1 载体对照	25.77 ± 3.55	52.00 ± 2.52	19.00 ± 3.06
Rb 过表达	34.33 ± 3.95 *	47.43 ± 5.62	15.20 ± 1.23
p100 <sup>Rb</sup> 过表达	35.67 ± 4.50 *	47.60 ± 5.79	14.10 ± 0.92
p80 <sup>Rb</sup> 过表达	27.97 ± 3.67	50.83 ± 1.82	16.03 ± 3.04

与 pcDNA3.1 载体对照组比较: \*  $P < 0.05$

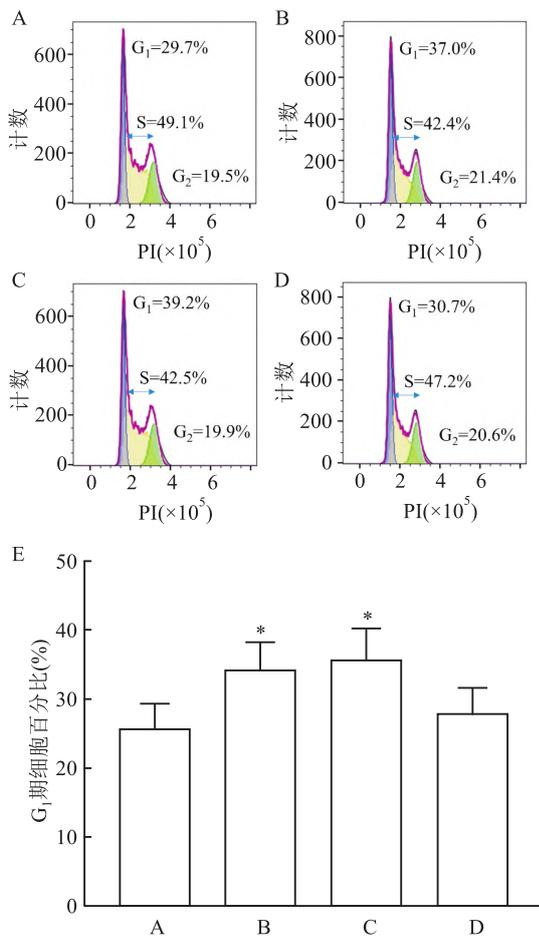


图 4 p100<sup>Rb</sup> 和 p80<sup>Rb</sup> 过表达后 HEK 293T 细胞的细胞周期图

A: pcDNA3.1 载体对照组; B: Rb 过表达组; C: p100<sup>Rb</sup> 过表达组; D: p80<sup>Rb</sup> 过表达组; E: 各组 G<sub>1</sub> 期细胞百分比统计表, 与 pcDNA3.1 载体对照组比较: \*  $P < 0.05$

## 2.5 p100<sup>Rb</sup> 和 p80<sup>Rb</sup> 对 HEK 293T 细胞凋亡的影响

分别将 pcDNA3.1-RB1-FLAG, pcDNA3.1-p100<sup>Rb</sup>-FLAG, pcDNA3.1-p80<sup>Rb</sup>-FLAG 和 pcDNA3.1 转染至 HEK 293T 细胞中, 约 48 h 后收集细胞, 分别进行 Annexin V-FITC/PI 双染, 然后流式细胞仪检测凋亡 (表 3)。结果表明, 与 pcDNA3.1 载体对照组比较, Rb、p100<sup>Rb</sup> 和 p80<sup>Rb</sup> 过表达组细胞凋亡率降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 表明 Rb、p100<sup>Rb</sup> 和 p80<sup>Rb</sup> 能够有效抑制 HEK 293T 细胞的凋亡, 见图 5。

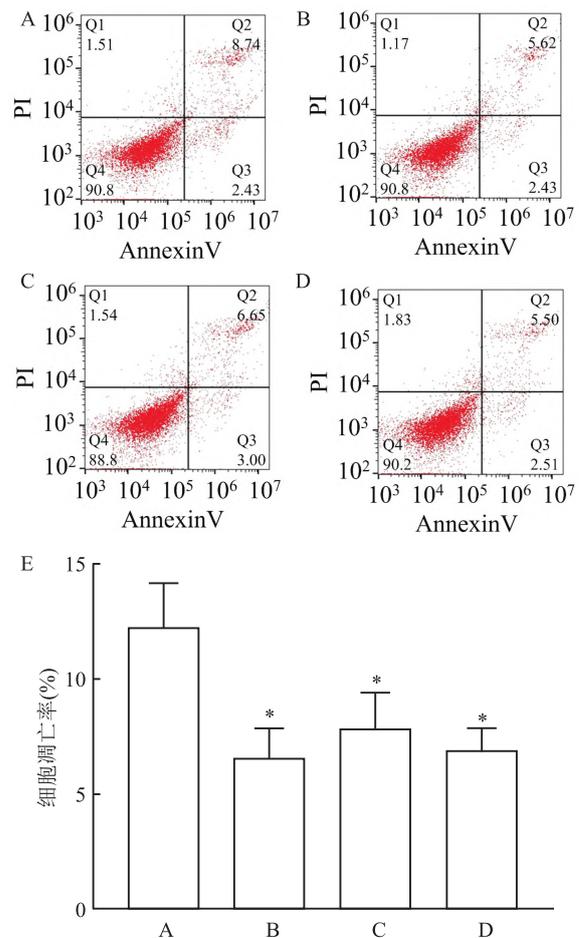


图 5 p100<sup>Rb</sup> 和 p80<sup>Rb</sup> 过表达后 HEK 293T 细胞的凋亡图

A: pcDNA3.1 载体对照组; B: Rb 过表达组; C: p100<sup>Rb</sup> 过表达组; D: p80<sup>Rb</sup> 过表达组; E: 各组细胞凋亡率统计表, 与 pcDNA3.1 载体对照组比较: \*  $P < 0.05$

表 3 Rb 截短体对细胞的影响

组别	凋亡率 (%)			平均凋亡率 (% , $\bar{x} \pm s$ )	与 pcDNA3.1 载体对照组比较	
	1	2	3		t 值	P 值
pcDNA3.1 载体对照	13.43	13.30	10.07	0.122 7 ± 0.019 0	-	-
Rb 过表达	8.05	5.75	5.91	0.065 7 ± 0.012 8	4.297	<0.05
p100 <sup>Rb</sup> 过表达	9.65	6.92	6.98	0.078 5 ± 0.015 6	3.109	<0.05
p80 <sup>Rb</sup> 过表达	8.01	6.36	6.40	0.069 2 ± 0.009 4	4.358	<0.05

### 3 讨论

现在已经发现 Rb 蛋白不仅在细胞周期调控方面起关键的作用,而且在染色质重塑、凋亡、衰老以及分化等方面也具有重要的作用<sup>[9]</sup>。细胞凋亡是细胞程序性死亡的过程,可诱导蛋白质水解和 DNA 断裂<sup>[10]</sup>。用凋亡诱导剂依托泊苷处理后,Rb 的 C 端 42 个氨基酸被 caspase 切割产生 p100<sup>Rb</sup> 的截短体<sup>[7]</sup>。另外,早期的研究<sup>[8]</sup>表明 Saos-2 细胞中没有全长的 Rb 蛋白,但是含有一个 Rb 蛋白的缺失突变体 p80<sup>Rb</sup> (缺失 21 ~ 27 外显子)。Rb 蛋白定位于细胞核,其核定位信号为羧端的<sup>860</sup> KRSAEGSNPP KPLKCLR<sup>876</sup><sup>[11]</sup>。p100<sup>Rb</sup> 含有这个核定位序列,但 p80<sup>Rb</sup> 缺失这个序列,本研究结果也表明 p100<sup>Rb</sup> 定位在细胞核,而 p80<sup>Rb</sup> 定位在细胞质。Rb 蛋白的口袋结构域可与 E2F1 结合,调控细胞周期的进程<sup>[12]</sup>。口袋结构域中的 T373 和 S608/S612 的磷酸化可导致与 Rb 蛋白结合的 E2F1 释放出来,E2F1 刺激进入 S 期的相关基因的表达,从而促进细胞进入 S 期<sup>[12]</sup>。p100<sup>Rb</sup> 含有完整 Rb 口袋结构域,能与 E2F1 结合;而 p80<sup>Rb</sup> 不含有完整的口袋结构域,不能与 E2F1 结合<sup>[7-8]</sup>。本研究结果表明 p100<sup>Rb</sup> 阻滞细胞周期进程,而 p80<sup>Rb</sup> 对细胞周期进程没有影响,原因可能是前者能结合 E2F1,而后者不能结合 E2F1。

E2F1 不仅能够与 Rb 蛋白结合调控细胞周期的进程,还具有诱导细胞凋亡的功能<sup>[13]</sup>。研究发现 E2F1 不仅与口袋结构域结合,还可与 Rb 的 C 末端 825 ~ 860 氨基酸区域结合,该部位与 E2F1 诱导的凋亡反应有关<sup>[14]</sup>。本研究结果表明 p80<sup>Rb</sup> 和 p100<sup>Rb</sup> 抑制凋亡,而两个截短体 C 端均缺失了 E2F1 的结合部位,提示它们的抗凋亡作用并不是通过 E2F1 进行的。近年来,发现 Rb 也可定位于线粒体,并通过与凋亡蛋白 Bax 的结合,直接诱导线粒体介导的凋亡<sup>[15]</sup>。p80<sup>Rb</sup> 和 p100<sup>Rb</sup> 抑制凋亡表明这两个蛋白可能并不与 Bax 结合。

综上所述,过表达 p100<sup>Rb</sup> 阻滞 HEK 293T 细胞

周期且抑制凋亡;过表达 p80<sup>Rb</sup> 对 HEK 293T 细胞周期无影响但可抑制凋亡。

### 参考文献

- [1] Knudson A G. Mutation and cancer; statistical study of retinoblastoma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1971, 68(4): 820 - 3.
- [2] Friend S H, Bernards R, Rogelj S, et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma [J]. *Nature*, 1986, 323(6089): 643 - 6.
- [3] Hong F D, Huang H J, To H, et al. Structure of the human retinoblastoma gene [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86(14): 5502 - 6.
- [4] Dick F A, Rubin S M. Molecular mechanisms underlying RB protein function [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(5): 297 - 306.
- [5] Burkhart D L, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(9): 671 - 82.
- [6] Dannenberg J H, Riele H P. The retinoblastoma gene family in cell cycle regulation and suppression of tumorigenesis [J]. *Results Probl Cell Differ*, 2006, 42: 183 - 225.
- [7] Chen W D, Otterson G A, Lipkowitz S, et al. Apoptosis is associated with cleavage of a 5 kDa fragment from Rb which mimics dephosphorylation and modulates E2F binding [J]. *Oncogene*, 1997, 14(10): 1243 - 8.
- [8] Shew J, Lin B T, Chen P L, et al. C-terminal truncation of the retinoblastoma gene product leads to functional inactivation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87(1): 6 - 10.
- [9] Dick F A, Goodrich D W, Sage J, et al. Non-canonical functions of the RB protein in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(7): 442 - 51.
- [10] D'Arcy M S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy [J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(6): 582 - 92.
- [11] Zacksenhaus E, Bremner R, Phillips R A, et al. A bipartite nuclear localization signal in the retinoblastoma gene product and its importance for biological activity [J]. *Mol Cell Biol*, 1993, 13(8): 4588 - 99.
- [12] Rubin S M. Deciphering the retinoblastoma protein phosphorylation code [J]. *Trends Biochem Sci*, 2013, 38(1): 12 - 9.
- [13] Shan B, Lee W H. Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis [J]. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(12): 8166 - 73.
- [14] Julian L M, Palander O, Seifried L A, et al. Characterization of an E2F1-specific binding domain in pRB and its implications for apoptotic regulation [J]. *Oncogene*, 2008, 27(11): 1572 - 9.
- [15] Hilgendorf K I, Leshchiner E S, Nedelcu S, et al. The retinoblastoma protein induces apoptosis directly at the mitochondria [J]. *Genes Dev*, 2013, 27(9): 1003 - 15.

## Effects of p100<sup>Rb</sup> and p80<sup>Rb</sup> overexpression on cell cycle and apoptosis of HEK 293T cells

Li Qiang, Li Caihong, Zhou Heng, Qiao Bing, Liu Jianjun, Fan Libin

(Dept of Biology, School of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the effects of p100<sup>Rb</sup> and p80<sup>Rb</sup> truncated forms of retinoblastoma protein (Rb)

# 钛表面新型抗菌涂层的生物相容性研究

庞诗梦,夏荣,李趁趁,余金兰

**摘要** 目的 探究钛表面聚二甲基硅氧烷/葡萄糖酸氯己定(PDMS/CHG)涂层的生物相容性。方法 将不同浓度CHG通过PDMS共价接枝到钛表面,分为5组。钛组:空白对照组;PDMS组:仅用PDMS处理组;C1组:用PDMS和0.2 mg/ml CHG处理组;C2组:用PDMS和0.4 mg/ml CHG处理组;C3组:用PDMS和0.8 mg/ml CHG处理组;使用扫描电子显微镜(SEM)观察各组钛片表面形貌,并将大鼠牙龈成纤维细胞(RGFs)接种至样品表面共培养,FITC标记的鬼笔环肽和AO/EB染色后,激光扫描共聚焦显微镜(CLSM)观察各组钛片表面细胞形态和细胞状态,CCK-8实验检测细胞增殖。结果 SEM下可见各实验组钛片表面均已成膜,结合元素分析可得,C2、C3组表面的膜均匀且致密;CLSM显示各实验组细胞形态与钛组一致,伸展较好,且AO/EB染色结果表明,各组均有大量绿色荧光,且细胞形态良好;CCK-8结果显示各组OD值差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 钛表面结合浓度不超过0.8 mg/ml的PDMS/CHG涂层具有良好的生物相容性。

**关键词** 聚二甲基硅氧烷;氯己定;抗菌涂层;种植体周围炎  
中图分类号 R 781.42

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)09-1355-05  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.003

种植义齿修复具有成功率高、不损伤邻牙等优点,是替代缺失牙的金标准<sup>[1]</sup>,被称为“人类的第三副牙齿”<sup>[2]</sup>。而钛基材料本身不具备抗菌性能,若发生微生物感染,则可能导致种植体周围疾病,是导致种植失败的主要因素之一<sup>[3]</sup>。近年来有学者通过在种植体表面上制备纳米粒子涂层以达到抗菌效果<sup>[4-5]</sup>;Faramarzi et al<sup>[6]</sup>将米诺环素与种植体相结合,3个月内种植体周围牙龈卟啉单胞菌的数量明显减少;Carinci et al<sup>[7]</sup>研究了涂覆聚二甲基硅氧烷/葡萄糖酸氯己定(polydimethylsiloxane/chlorhexidine gluconate,PDMS/CHG)内涂层的种植体的抗菌性,结果表明该涂层具有良好抗菌性能,但无法持续释放药物。该研究拟在钛片表面构筑PDMS/CHG复合涂层,模拟愈合基台高度光滑的表面,观察该复合涂层不同浓度下对成纤维细胞的影响,探究涂层的生物相容性,以期为今后在愈合基台表面构建抗菌涂层提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂 医用钛片 TA1(宝鸡泰宇鑫金属

2021-12-30 接收

基金项目:国家重点研发计划项目(编号:2018YFB0407204);安徽省学术和技术带头人科研活动经费资助项目(编号:2021H253)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院口腔科,合肥 230601

作者简介:庞诗梦,女,硕士研究生;

夏荣,男,博士,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:xiarongqh@aliyun.com

on HEK 293T cell cycle and apoptosis. **Methods** The eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-p100<sup>Rb</sup>-FLAG and pcDNA3.1-p80<sup>Rb</sup>-FLAG were constructed, plasmid was transfected into U2OS cells and immunofluorescence was performed to define the localization of p100<sup>Rb</sup> and p80<sup>Rb</sup> in cells. Plasmid was also transfected into HEK 293T cells, and the total protein was extracted for Western blotting to detect the protein expression level. After overexpression of Rb, p100<sup>Rb</sup> and p80<sup>Rb</sup> in HEK 293T cells, cell cycle and apoptosis were measured by flow cytometry. **Results** The eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-p100<sup>Rb</sup>-FLAG and pcDNA3.1-p80<sup>Rb</sup>-FLAG were constructed successfully. p100<sup>Rb</sup> was mainly located in the nucleus while p80<sup>Rb</sup> was mainly located in the cytoplasm, in U2OS cells. Rb, p100<sup>Rb</sup> and p80<sup>Rb</sup> could be overexpressed in HEK 293T cells. Following overexpression of Rb, p100<sup>Rb</sup> in HEK 293T cells, the percentage of G<sub>1</sub> phase of cell cycle significantly increased compared with the control group, and p100<sup>Rb</sup> and p80<sup>Rb</sup> inhibited apoptosis compared with control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Overexpression of p100rb can inhibit the apoptosis of HEK 293T cells and block the cell cycle. Overexpression of p80rb can inhibit the apoptosis of HEK 293T cells, but has no effect on cell cycle.

**Key words** retinoblastoma protein; overexpression; cell cycle; apoptosis