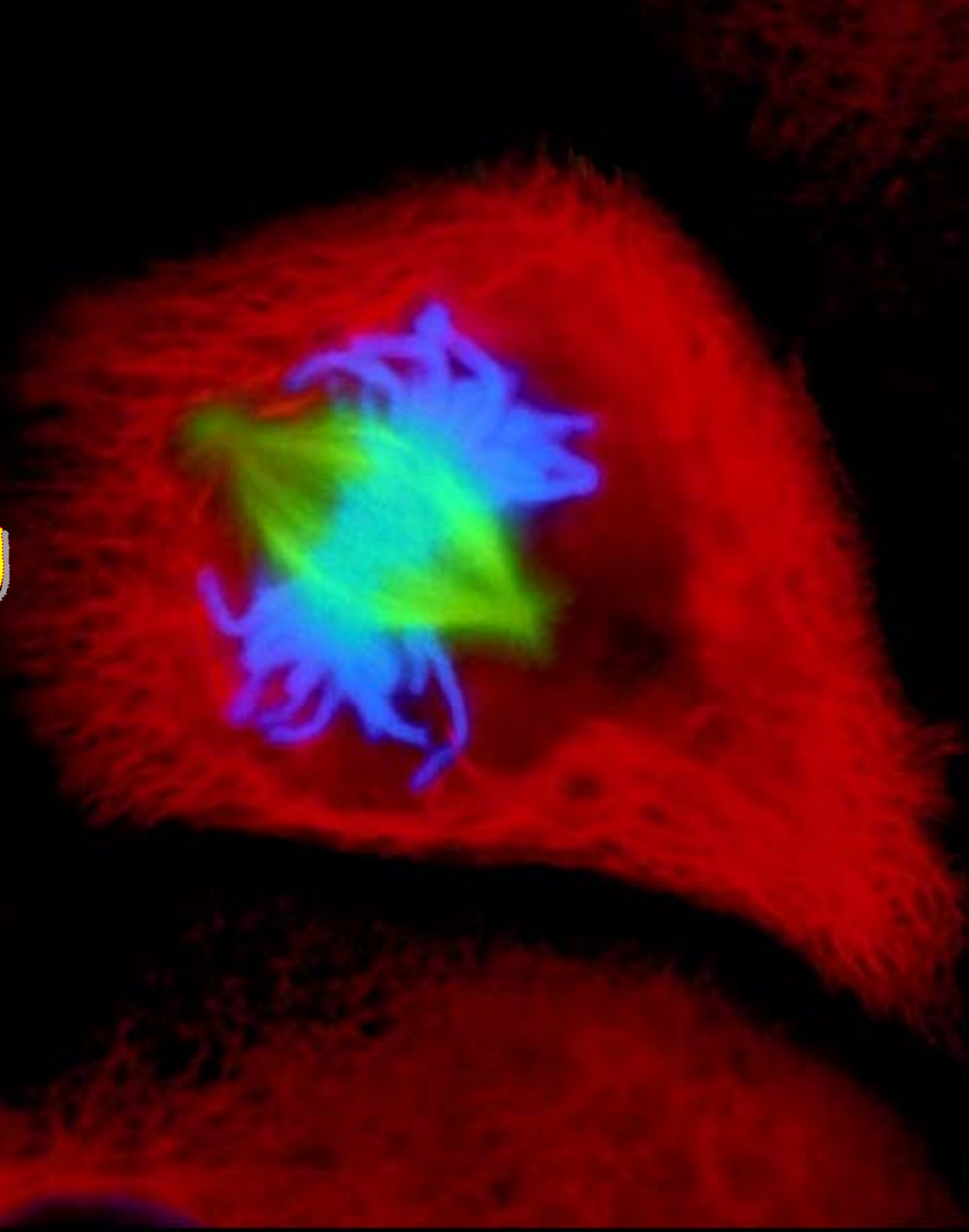


第十三章
细胞周期

CELL CYCLE



- 细胞增殖是生命的基本特征。
- 初生婴儿 10^{12} 个细胞，成人 10^{14} 个，约200种类型。
- 成人每秒钟有数百万新细胞产生。
- 一个大肠杆菌若按20分钟分裂一次，并保持这一速度，则两天即可超过地球的重量。





<http://www.cella.cn>

第一节 基本概念

MAJOR CONCEPTS



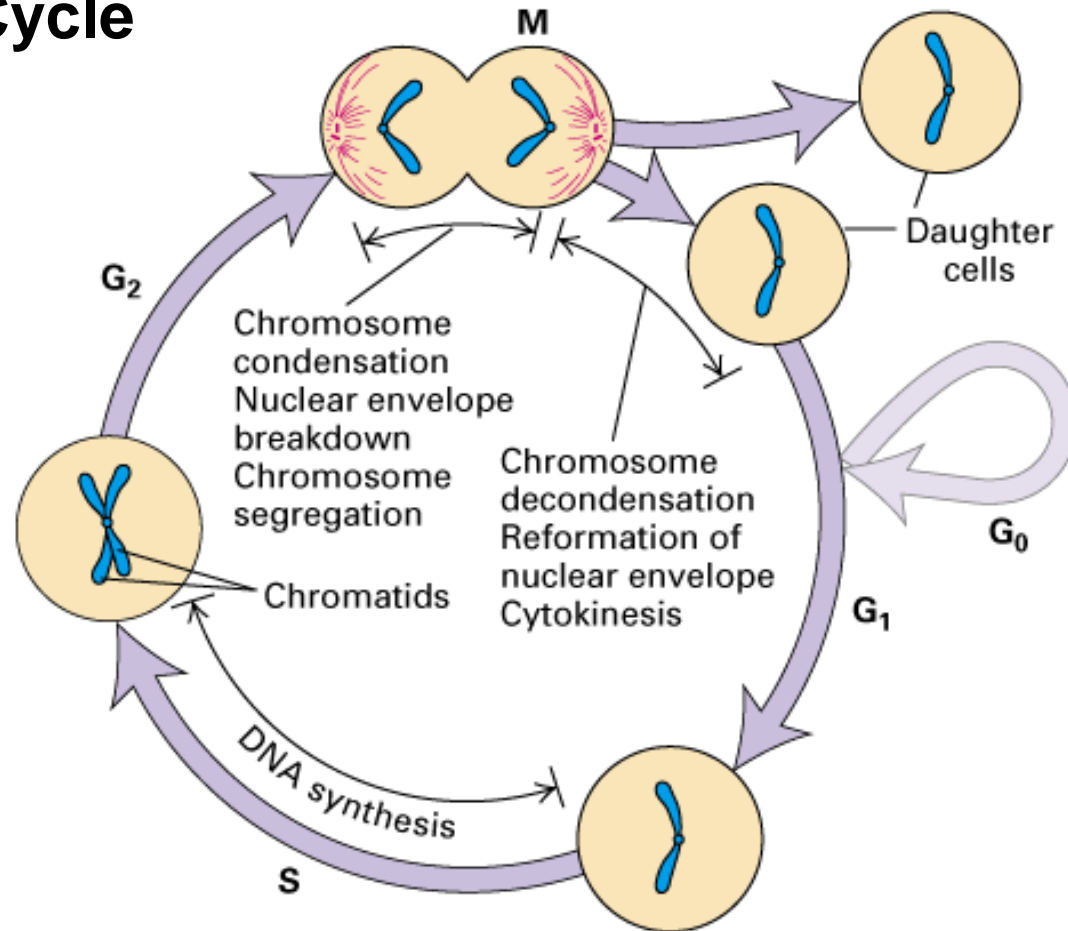
Dr Tian 2008

一、什么是细胞周期

- 细胞分裂结束到下一次细胞分裂结束所经历的过程。分为：
 - G1期(gap1), 分裂完成到DNA复制之前。
 - S期(synthesis phase), DNA复制阶段。
 - G2期(gap2), DNA复制完成到分裂之前。
 - M期, 又称D期, 分裂开始到结束。



Eucaryotic Cell Cycle



A typical mammalian cell has a cell cycle time of 24 hours, with 12 hr G₁, 6-8 hr S, 3-4 hr G₂, and 1 hr M

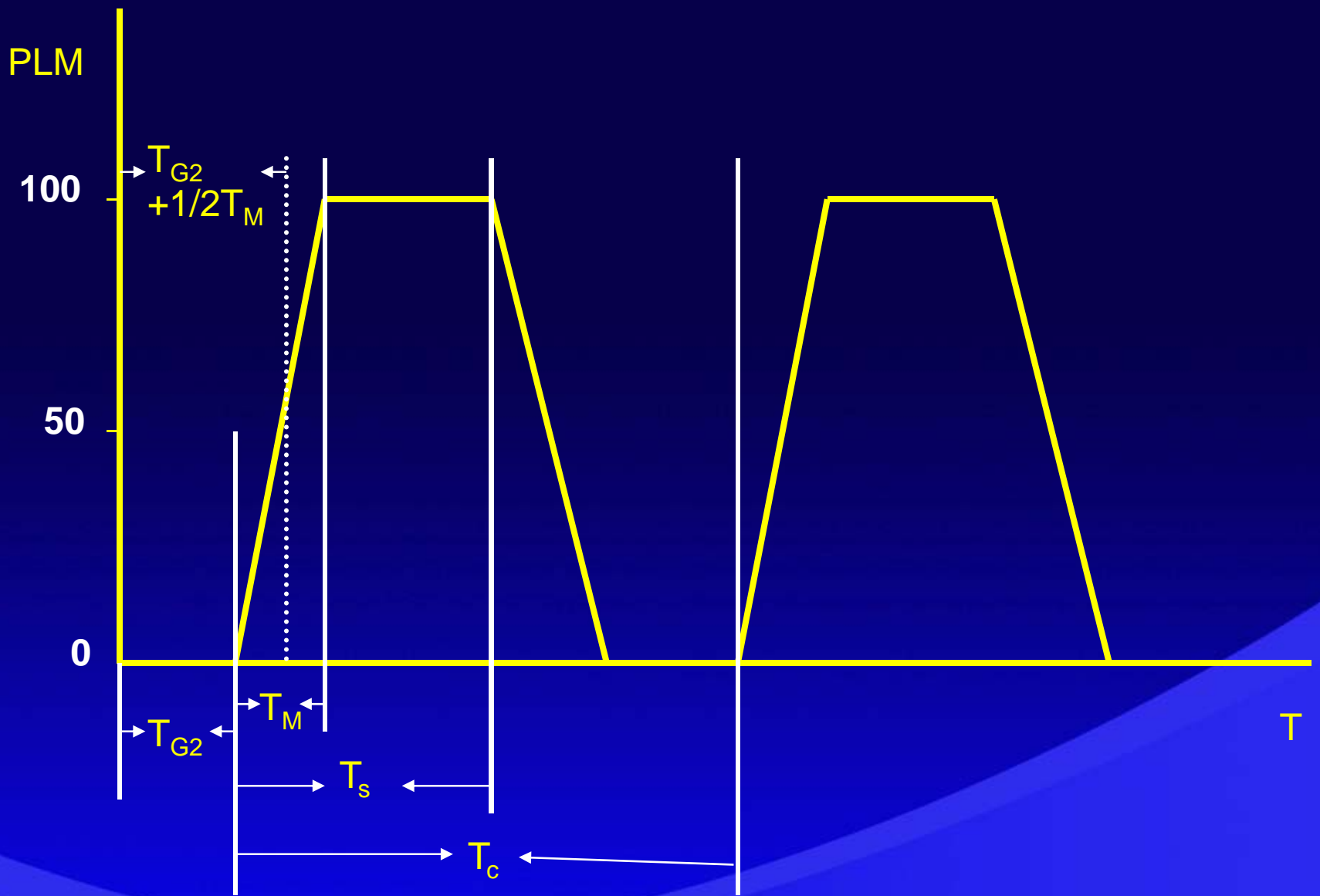
- 根据细胞周期可将高等动物细胞分为3类：
 - ①连续分裂细胞，如表皮生发层、骨髓干细胞。
 - ②休眠细胞，暂不分裂，适当刺激下可重新进入细胞周期，称 G_0 期细胞，如淋巴细胞、肝、肾细胞等。
 - ③不分裂细胞，又称终端细胞，不再分裂，如神经、肌肉、多形核细胞等。



二、细胞周期时间的测定

- G_1 期差异较大，M期最短，约0.5~4.5小时。
- 周期长短与物种/细胞类型有关。
- 测定方法：标记有丝分裂百分率法（PLM），用 ^3H TDR对测定细胞脉冲标记、定时取材，通过统计标记有丝分裂细胞百分数来测定细胞周期。





常以 $(T_{G2} + 1/2 T_M) - T_{G2}$ 的方式求出 T_M



三、细胞同步化

- (一) 自然同步化
 - 1. 多核体：粘菌、疟原虫。
 - 2. 水生动物受精卵：海胆、两栖类。
 - 3. 增殖抑制解除后的同步分裂：真菌休眠孢子。



(二) 人工同步化

- 1. 选择同步化
 - 1) 有丝分裂选择法
 - 优点：操作简单，同步化程度高，细胞不受药物伤害。
 - 缺点：获得的细胞数量较少（分裂细胞约占1%~2%）。
 - 2) 细胞沉降分离法
 - 优点：可用于任何悬浮培养的细胞。
 - 缺点：同步化程度较低。



- 2. 诱导同步化
- 1) DNA合成阻断法：用DNA合成抑制剂，可逆阻断细胞周期，然后释放。常用TDR双阻断法。
 - 优点：同步化程度高；
 - 缺点：产生非均衡生长，个别细胞体积增大。
- 2) 中期阻断法
- 用秋水仙素等微管抑制剂将细胞阻断在中期。优点是便于观察染色体，缺点是可逆性较差。





<http://www.cella.cn>

第二节 有丝分裂

MITOSIS



Dr Tian 2008

一、细胞分裂的类型

- 无丝分裂：又称直接分裂，由 Remark (1841) 发现于鸡胚血细胞，不涉及纺锤体形成及染色体变化。
- 有丝分裂：又称间接分裂，由 Fleming (1882) 和 Strasburger (1880) 发现。
- 减数分裂：DNA复制1次，细胞连续分裂2次。



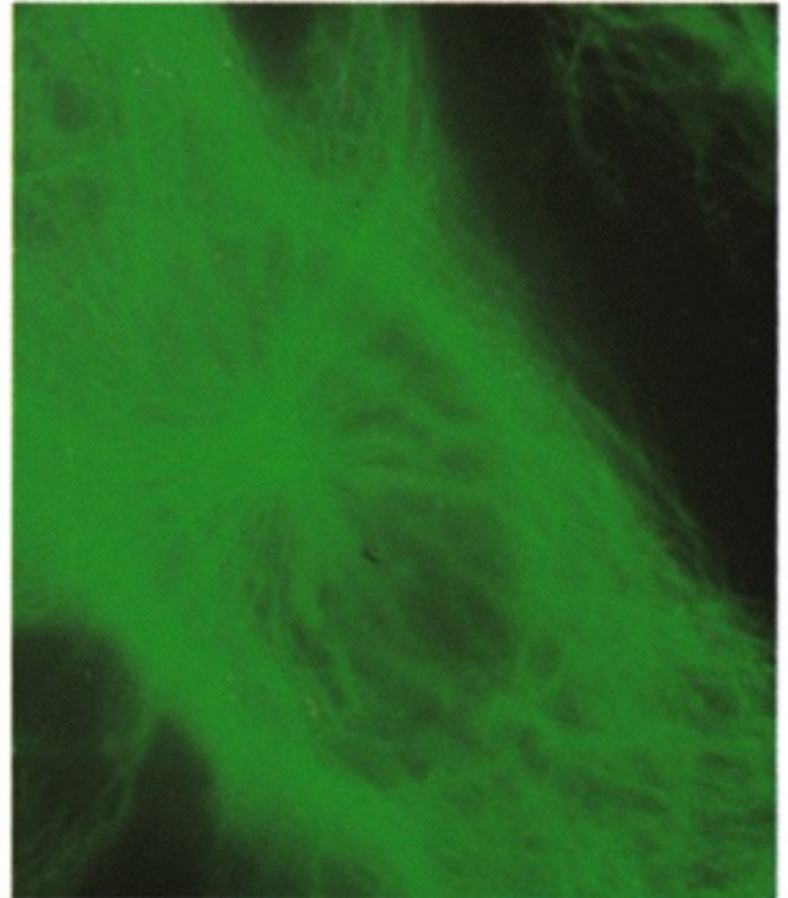
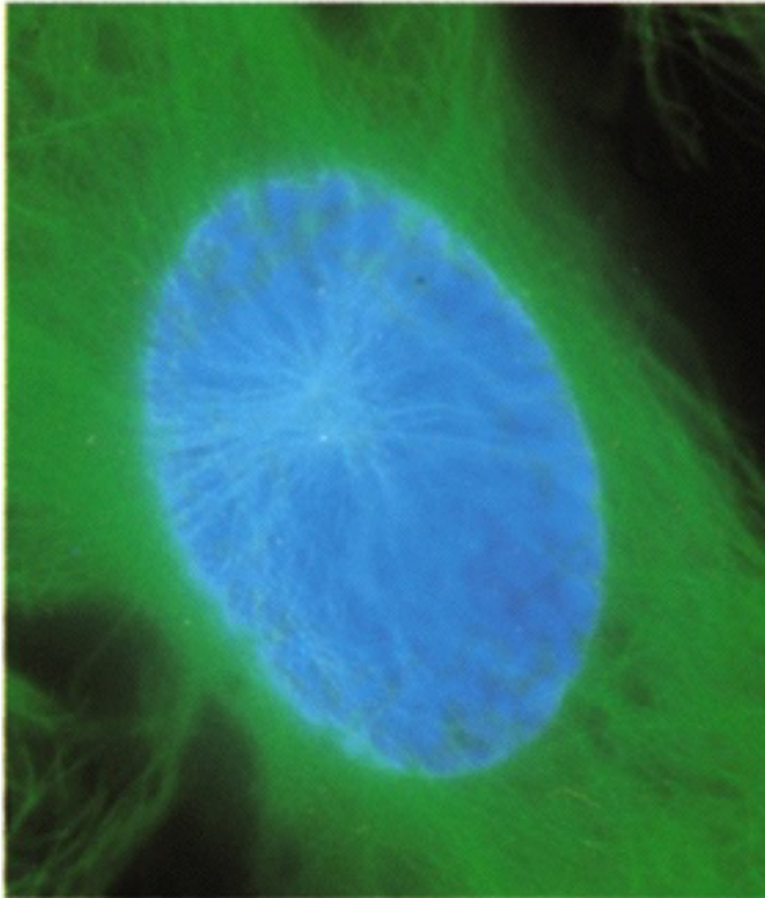
二、有丝分裂过程

- 为了便于描述人为的划分为六个时期：
 - 间期 (interphase) ; 前期(prophase); 前中期 (premetaphase); 中期(metaphase); 后期 (anaphase); 末期(telophase)。
- 间期包括G₁期、S期和G₂期, 进行DNA、中心体复制, 细胞体积增大等准备工作。



- (一) 前期

- ①染色质凝缩, ②分裂极确立与纺锤体开始形成, ③核仁解体, ④核膜消失。





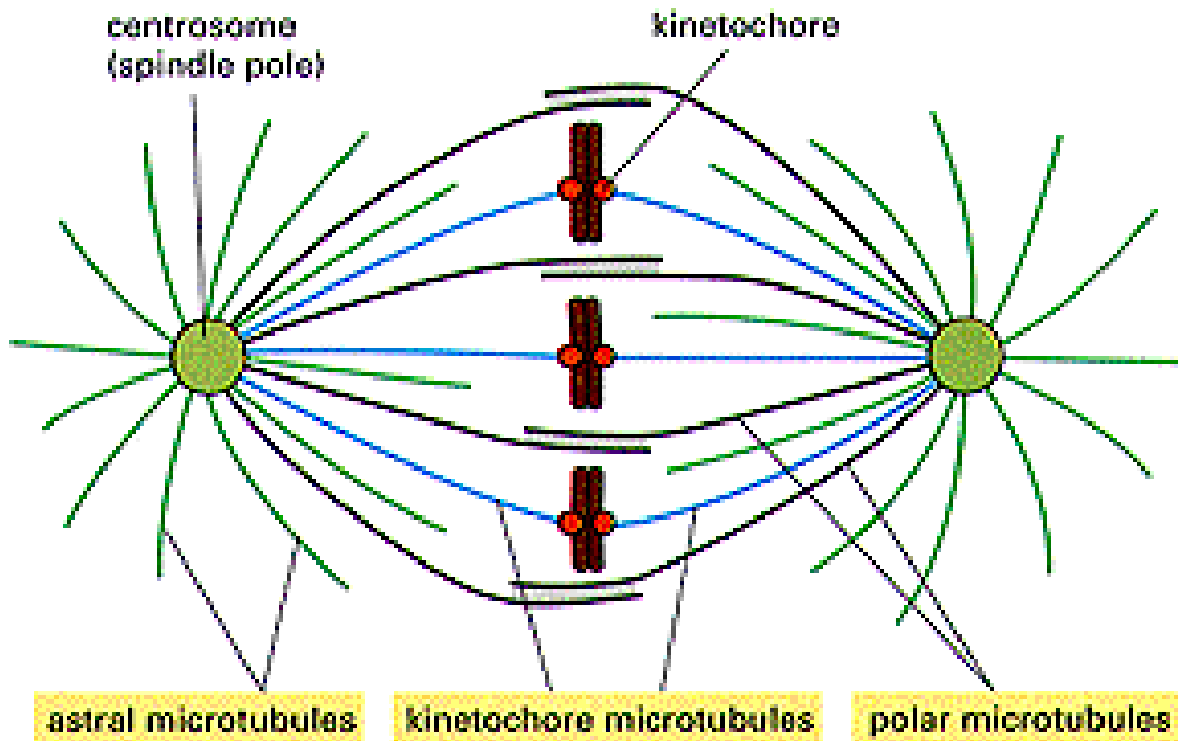
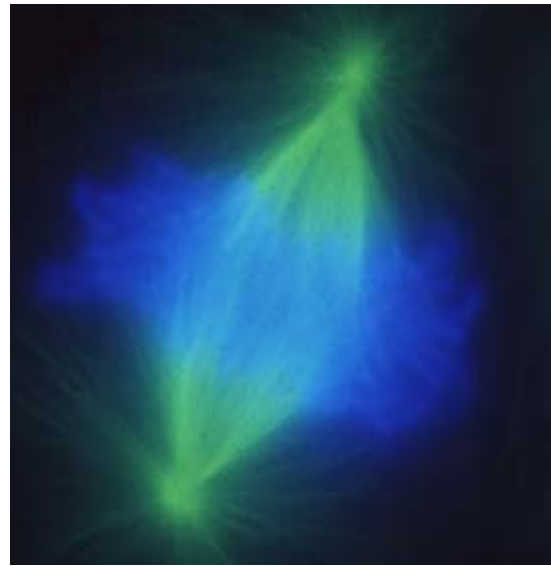
- S期中心粒已完成复制，核膜解体时，中心粒已到达两极，并形成纺锤体。
- 纺锤体的三种微管结构：
 - ①极体微管（polar mt）；
 - ②着丝点微管（kinetochore mt；
 - ③星体微管（astral mt）。



Two centrosomes, and their forming radial arrays of astral microtubules separating on the surface of an early prophase newt lung cell nucleus.

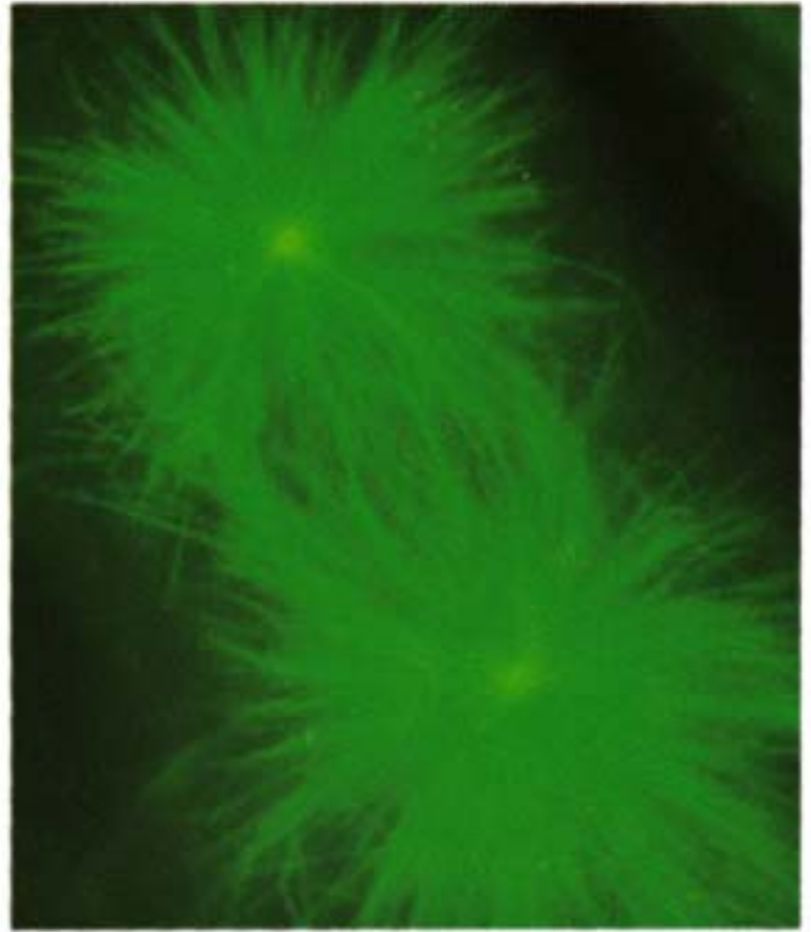
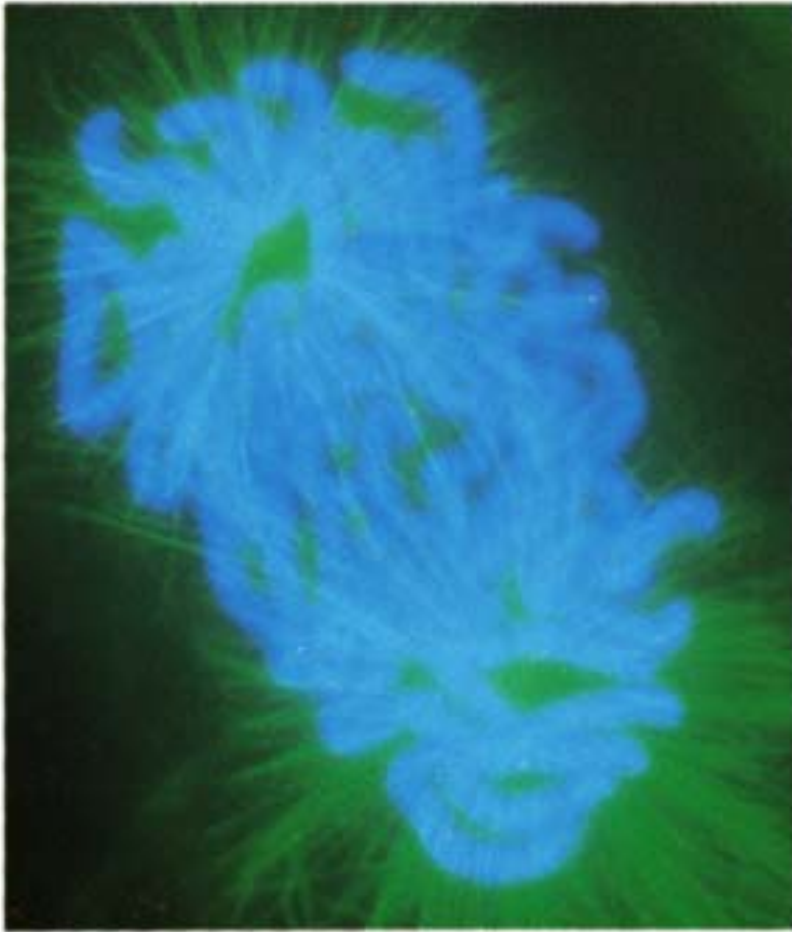


图片来自 <http://www.wadsworth.org/>



- (二) 前中期

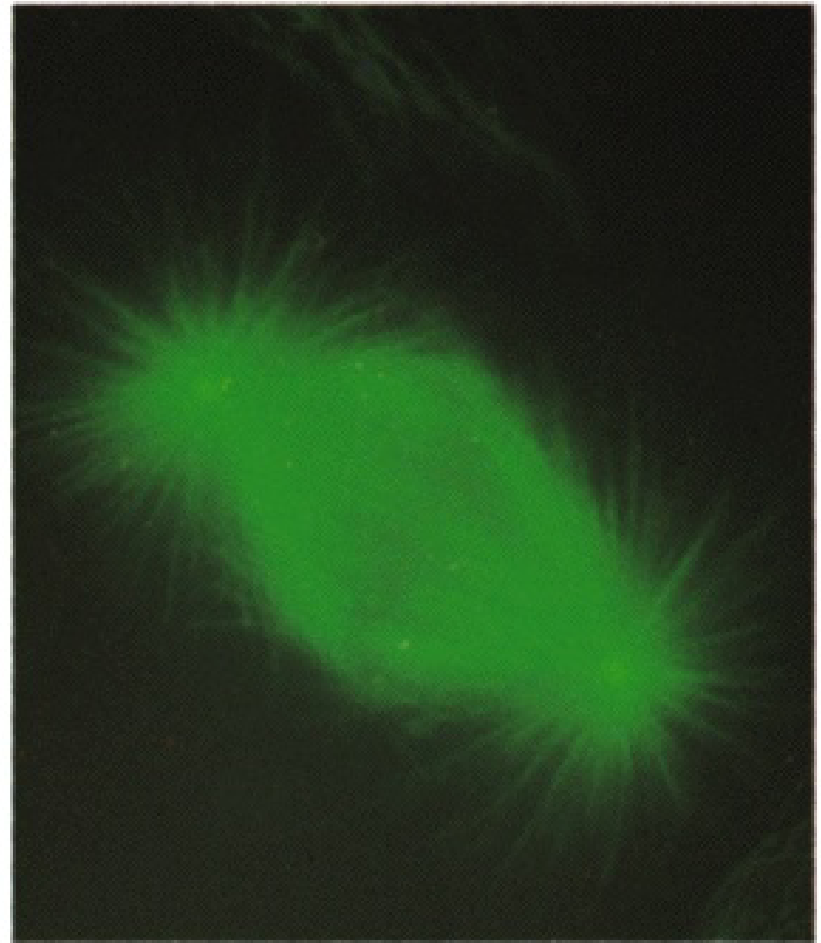
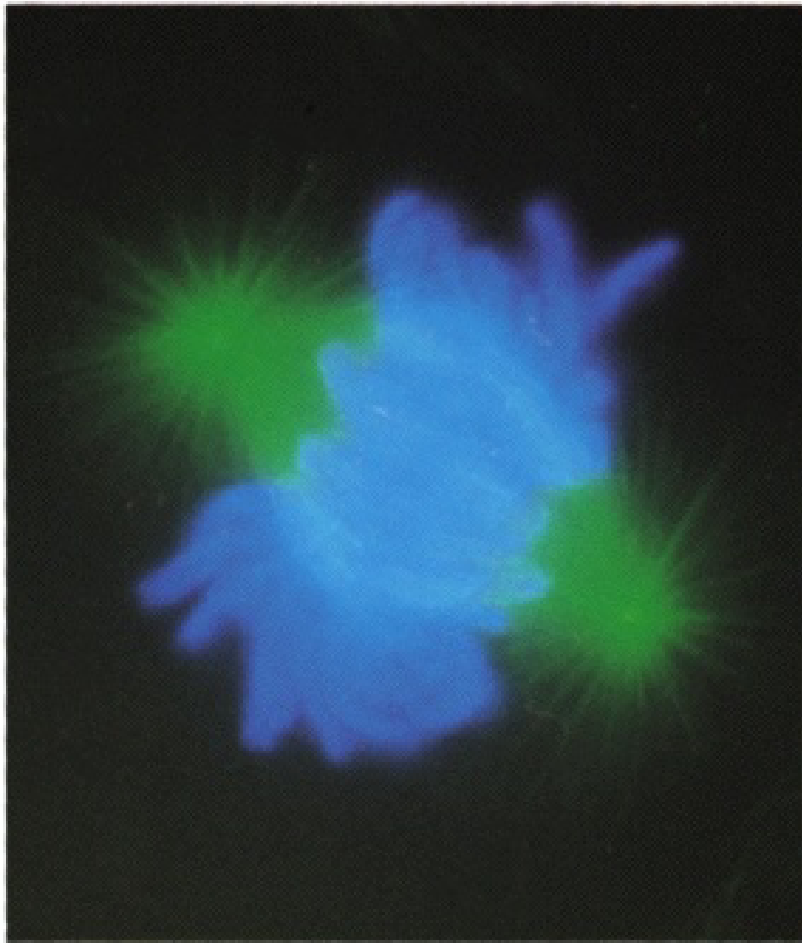
- 从核膜解体到染色体排列到赤道面上。



- (三) 中期

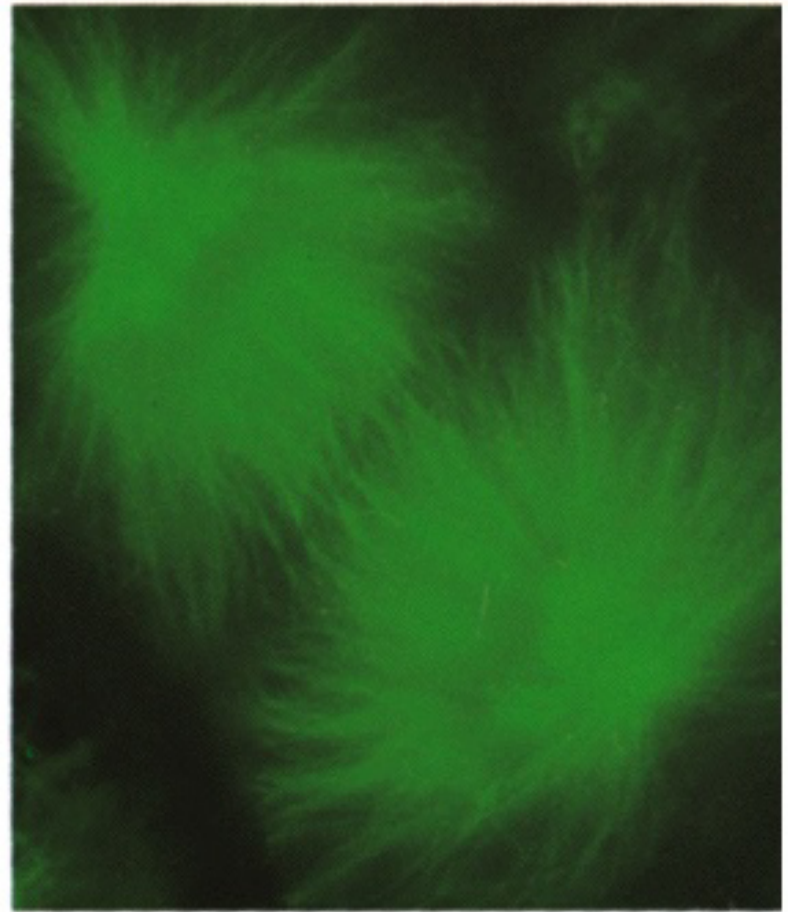
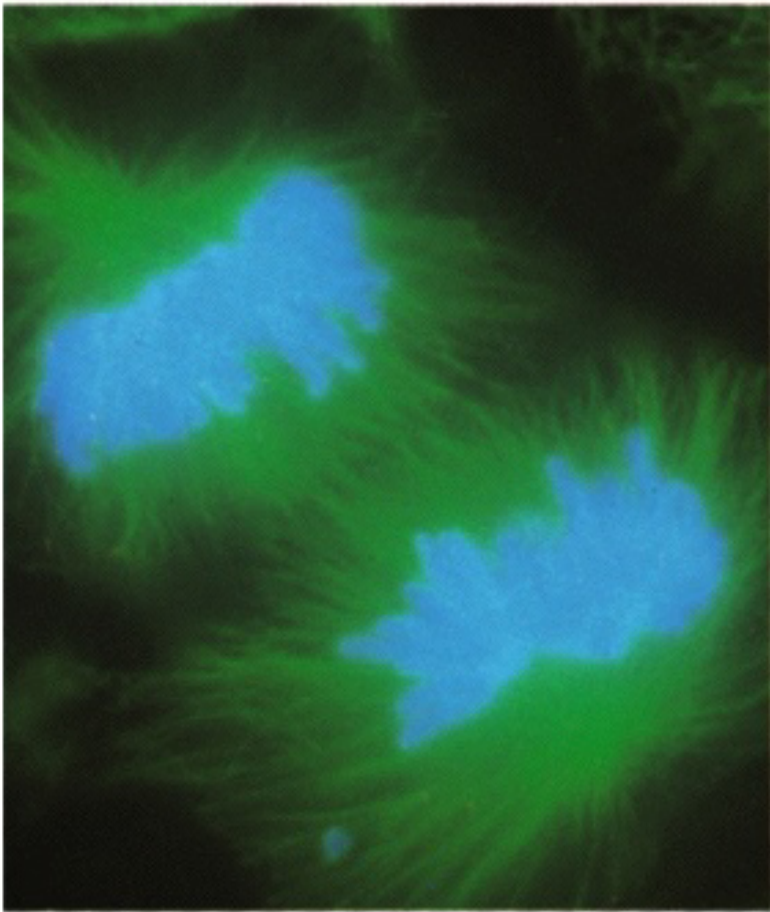


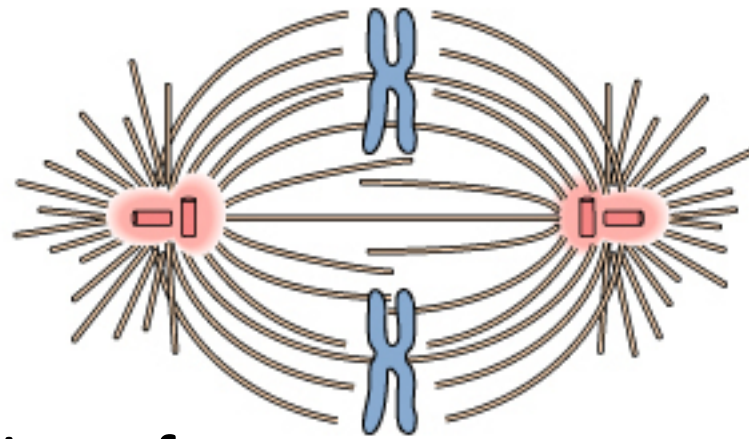
- 染色体排列到赤道面上。



- (四) 后期

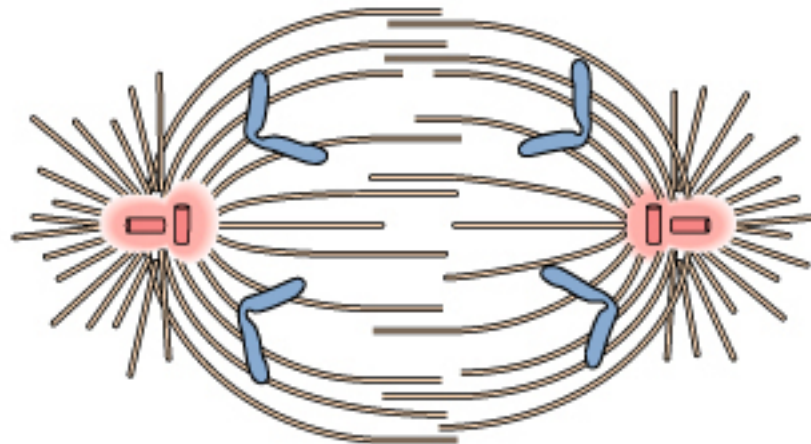
- 指妹妹染色体单体分开并移向两极的时期。
分为后期A、后期B两个过程。

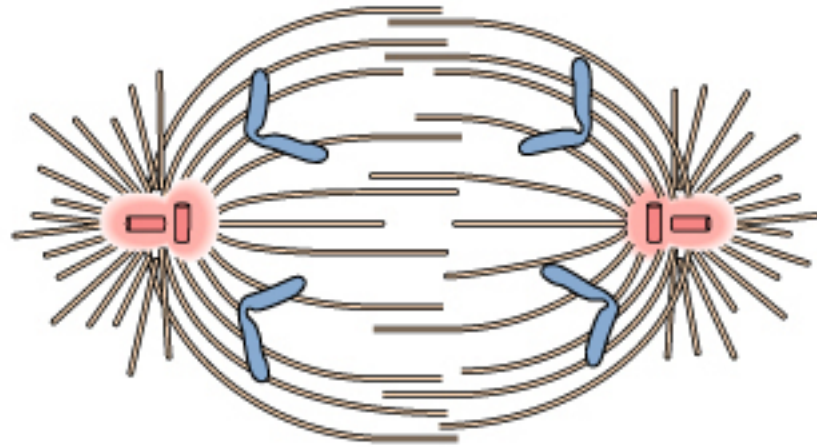




- Anaphase A: separation of the sister chromatids.

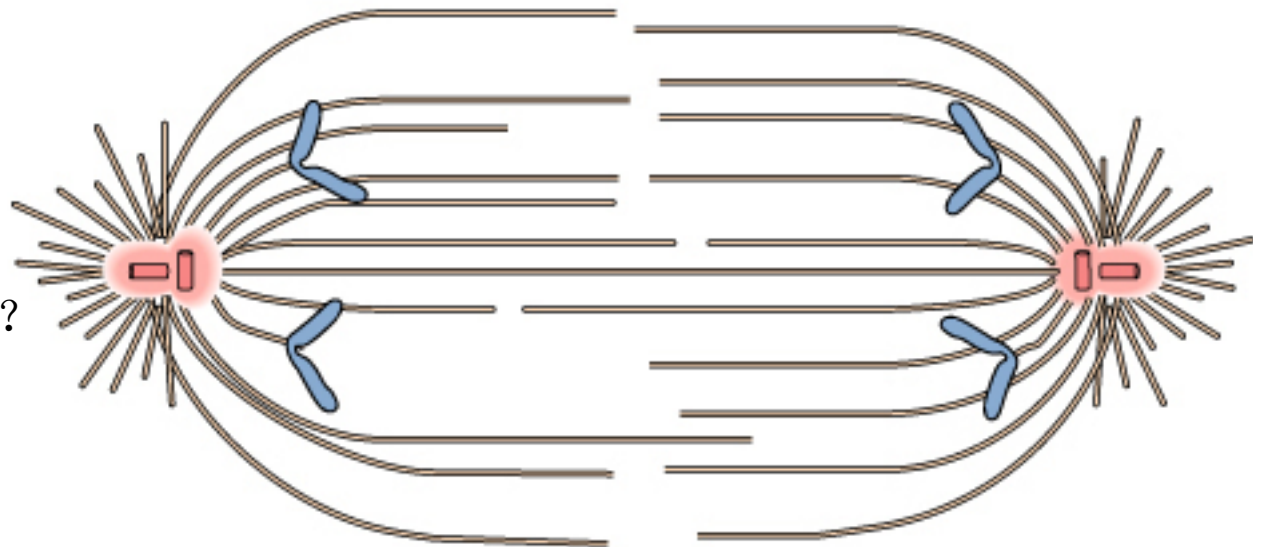
Anaphase A
(chromosome-to-pole
movement)





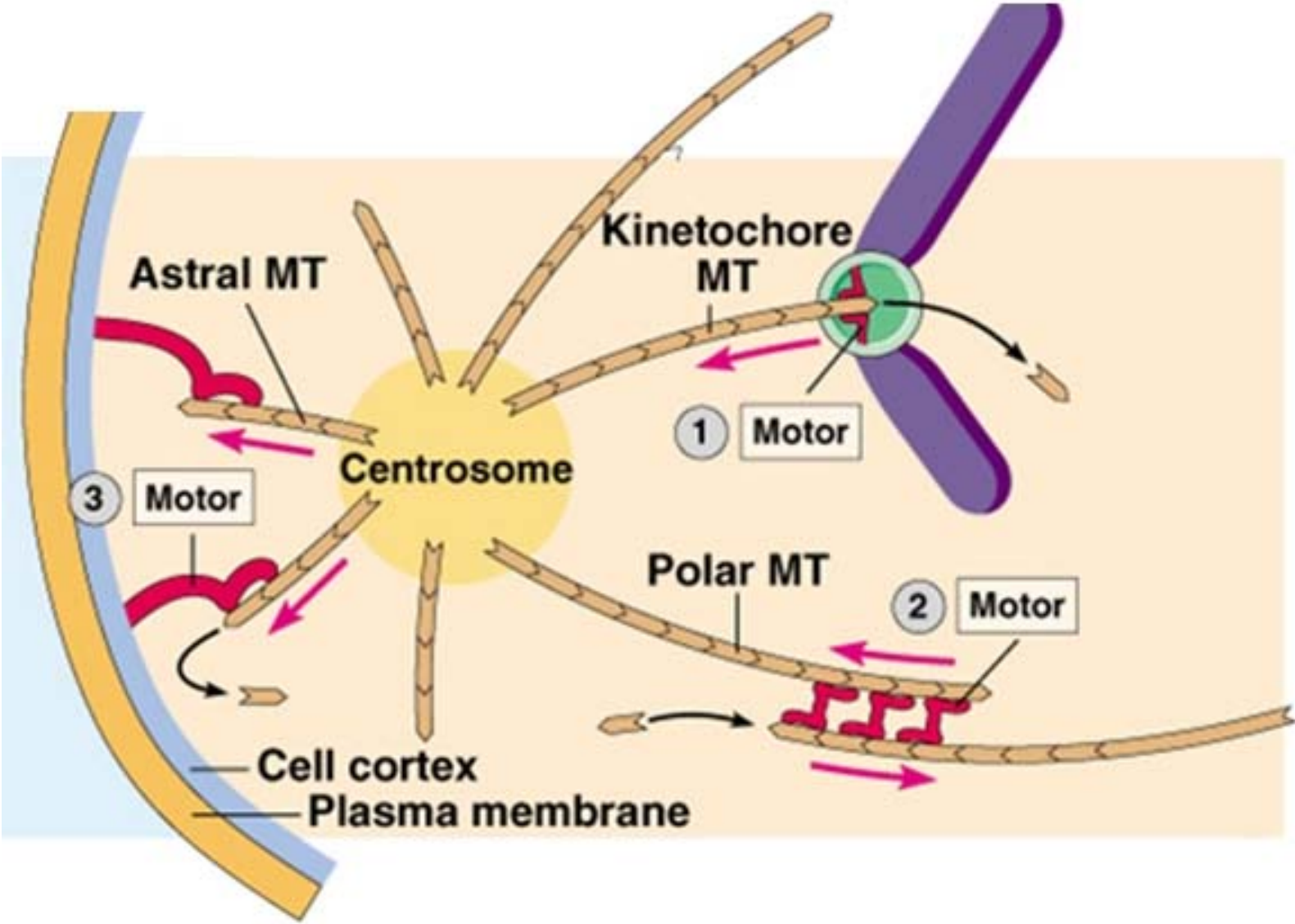
- Anaphase B: separation of the poles.

Anaphase B
(pole-pole separation)

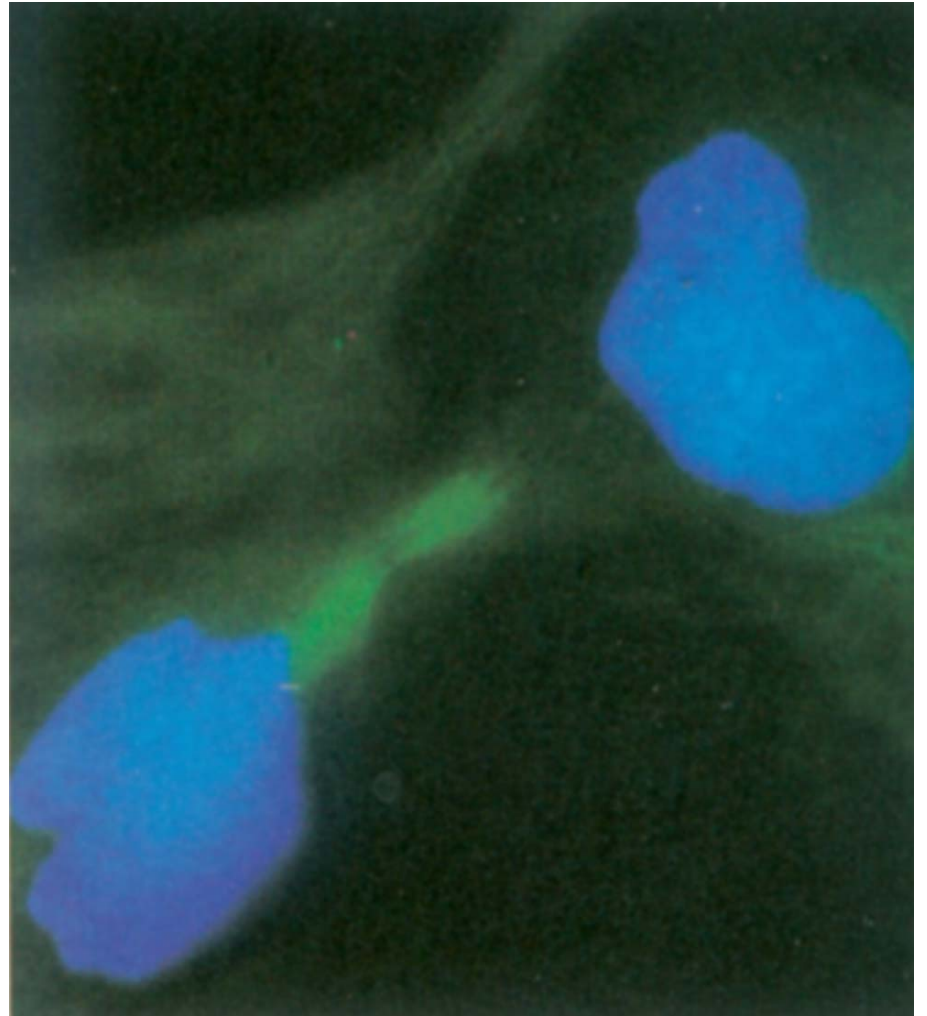


植物细胞有没有后期B？

Microtubules and Motors in the spindle



- (五) 末期
- 从子染色体到达两极，至形成两个新细胞为止的时期。涉及子核的形成和胞质分裂两个方面。

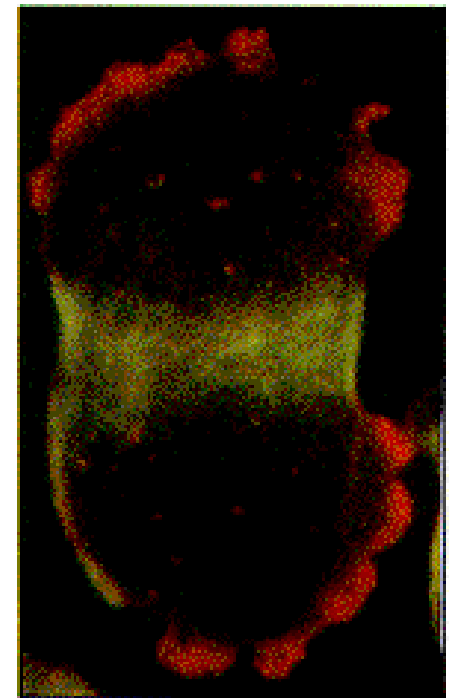
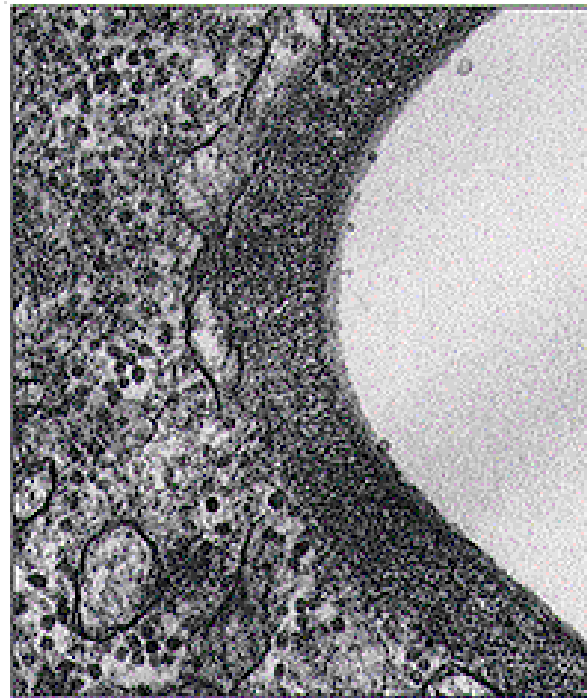
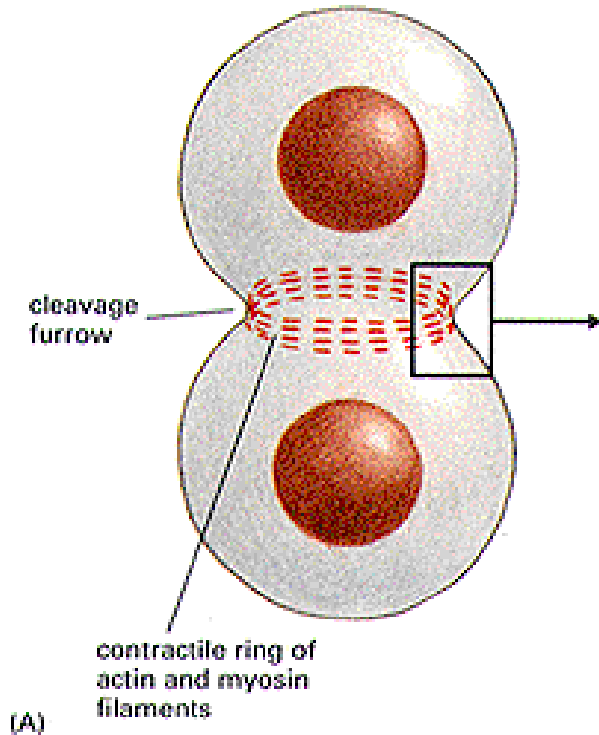


子核的形成与胞质分裂

- 末期核纤肽**B**去磷酸化，介导核膜重新装配，同时染色体解聚缩，核仁出现和核膜重新形成。
- 核分裂与胞质分裂是相继发生的，属于两个分离的过程，如：
 - 大多数昆虫的卵，核可进行多次分裂而无胞质分裂，某些藻类的多核细胞可长达数尺，以后胞质才分裂形成单核细胞。

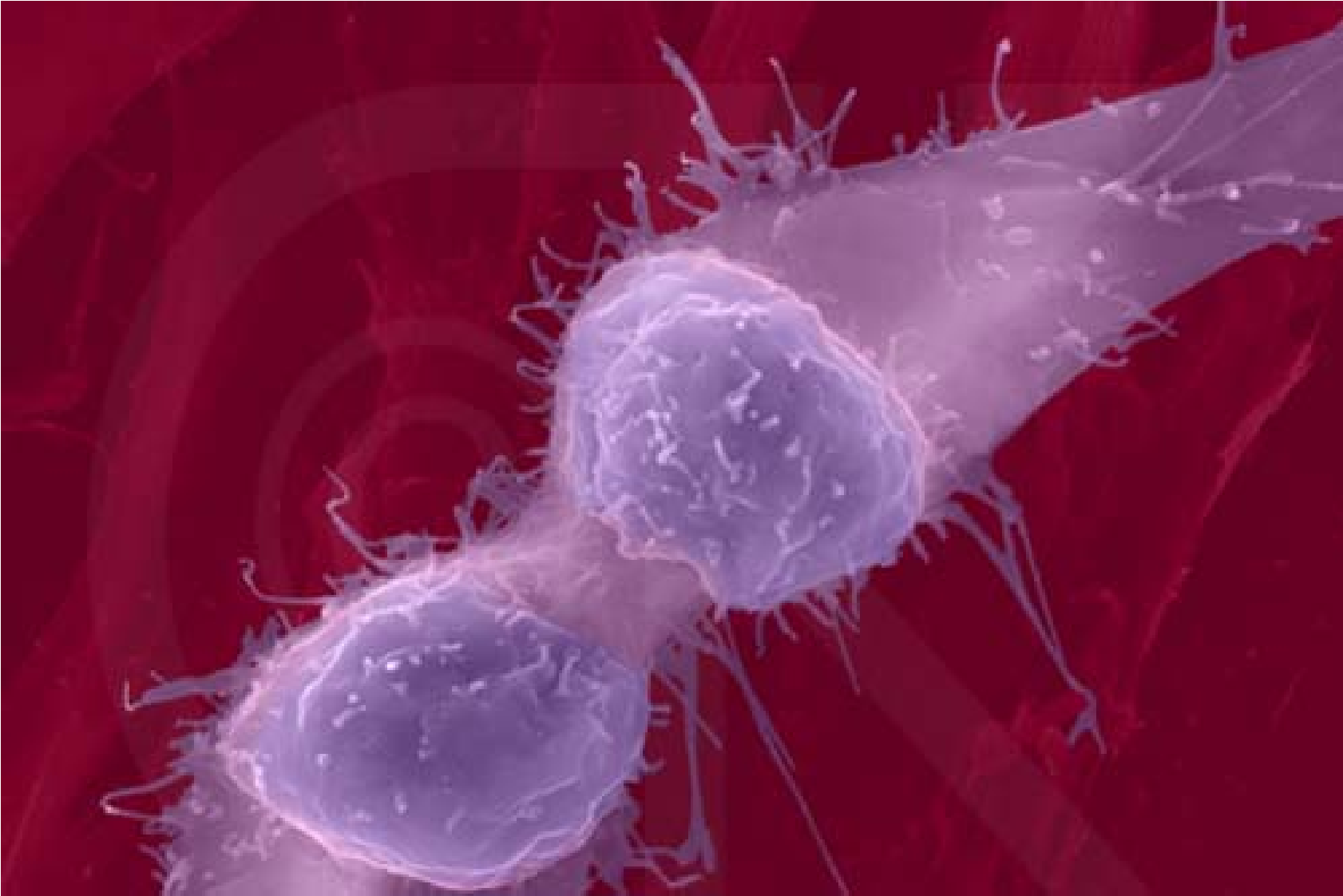


- 动物的胞质分裂通过胞质收缩环的收缩实现，收缩环由平行排列的肌动蛋白组成。

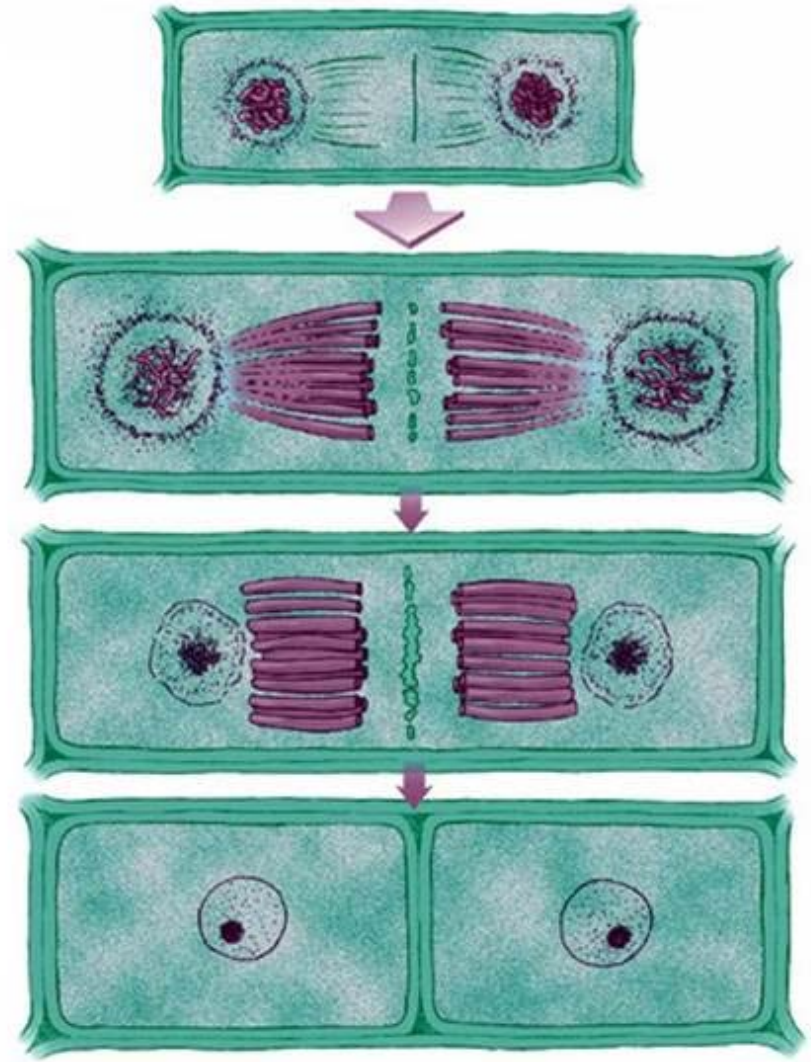


- 用细胞松弛素处理这一时期的细胞，会出现什么现象？

Dividing Muscle Myoblast (primitive muscle cell) (SEM x8,000)



- 植物细胞末期近两极处纺锤丝消失，中间微管保留，形成成膜体。
- 来自高尔基体囊泡沿微管转运到成膜体中间。融合形成细胞板，囊泡的内含物形成初生壁和中胶层，囊泡膜形成质膜，融合留下的管道形成胞间连丝。

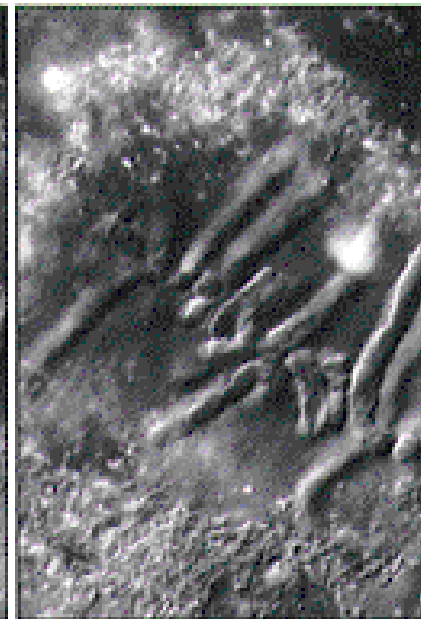
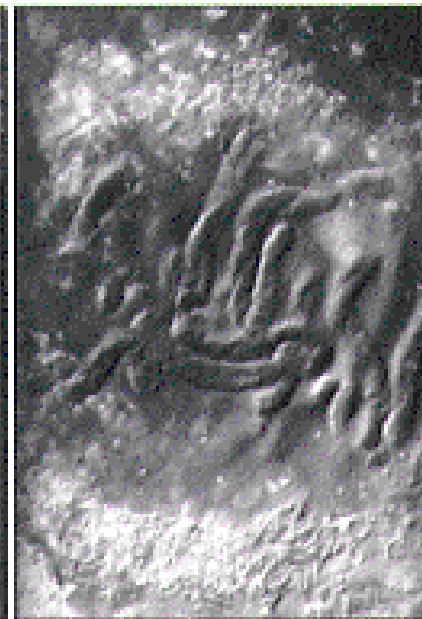


(A) 0 minutes

(B) 15 minutes

(C) 17 minutes

(D) 54 minutes



(E) 83 minutes

(F) 124 minutes

(G) 169 minutes

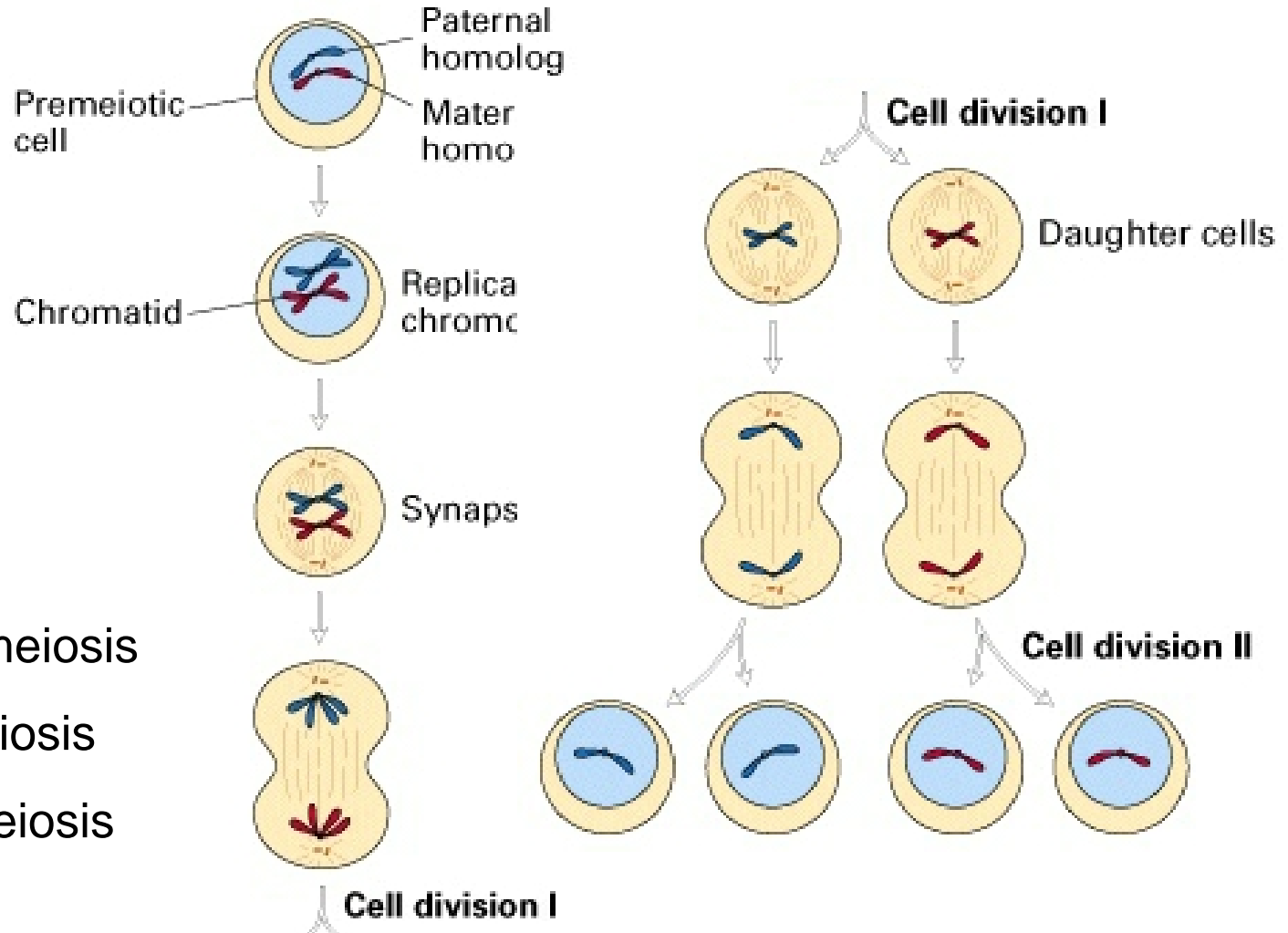
(H) 199 minutes

第三节 减数分裂Meiosis

- 由连续两次分裂构成：
 - 通常减数分裂I分离的是同源染色体，所以称为异型分裂（heterotypic division）或减数分裂（reductional division）。
 - 减数分裂II分离的是姊妹染色体，类似于有丝分裂，所以称为同型分裂（homotypic division）或均等分裂（equational division）。
- 为了描述方便将减数分裂分为不同时期。



Meiosis



Concepts:

1. Gametic meiosis
2. Sporic meiosis
3. Zygotic meiosis

一、间期

- 称前减数分裂间期或前减数分裂期 (premeiosis), 也分为G1、S和G2期。
- G2期是有丝分裂向减数分裂转化的关键时期。
- S期时间较长, 部分DNA (约0.3%左右) 是在合线期合成的。



二、分裂期

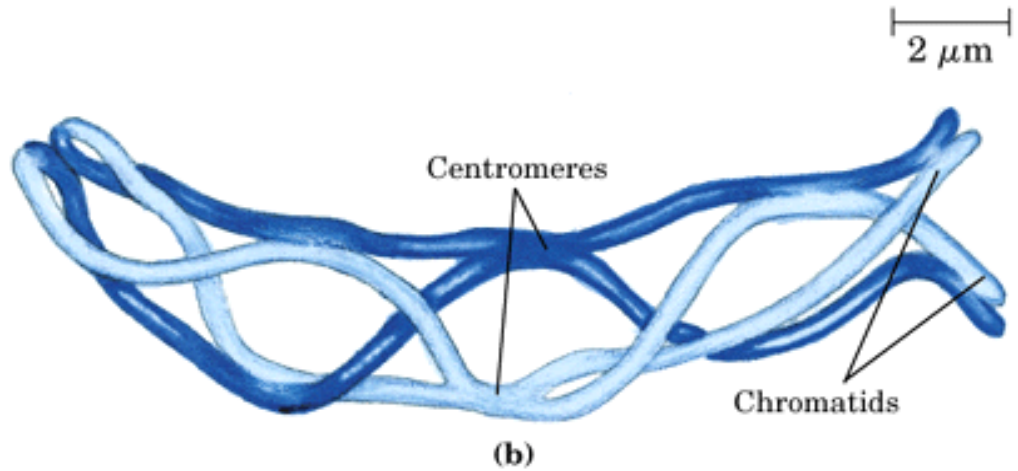
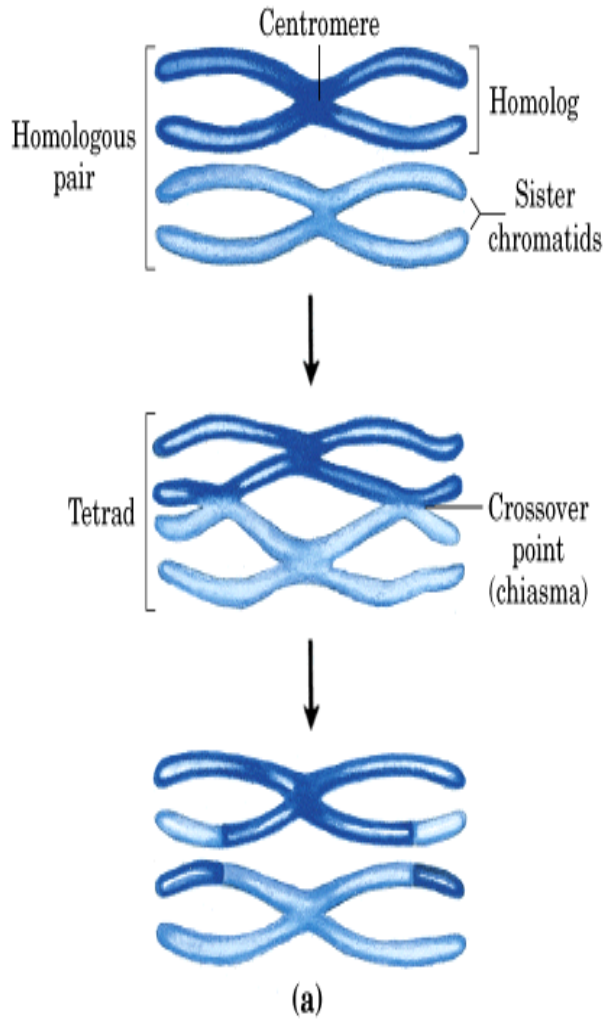
- (一) 减数分裂I
- 1. 前期I
- 通常分为5个时期：①leptotene，②zygotene，③pachytene，④diplotene，⑤diakinesis。



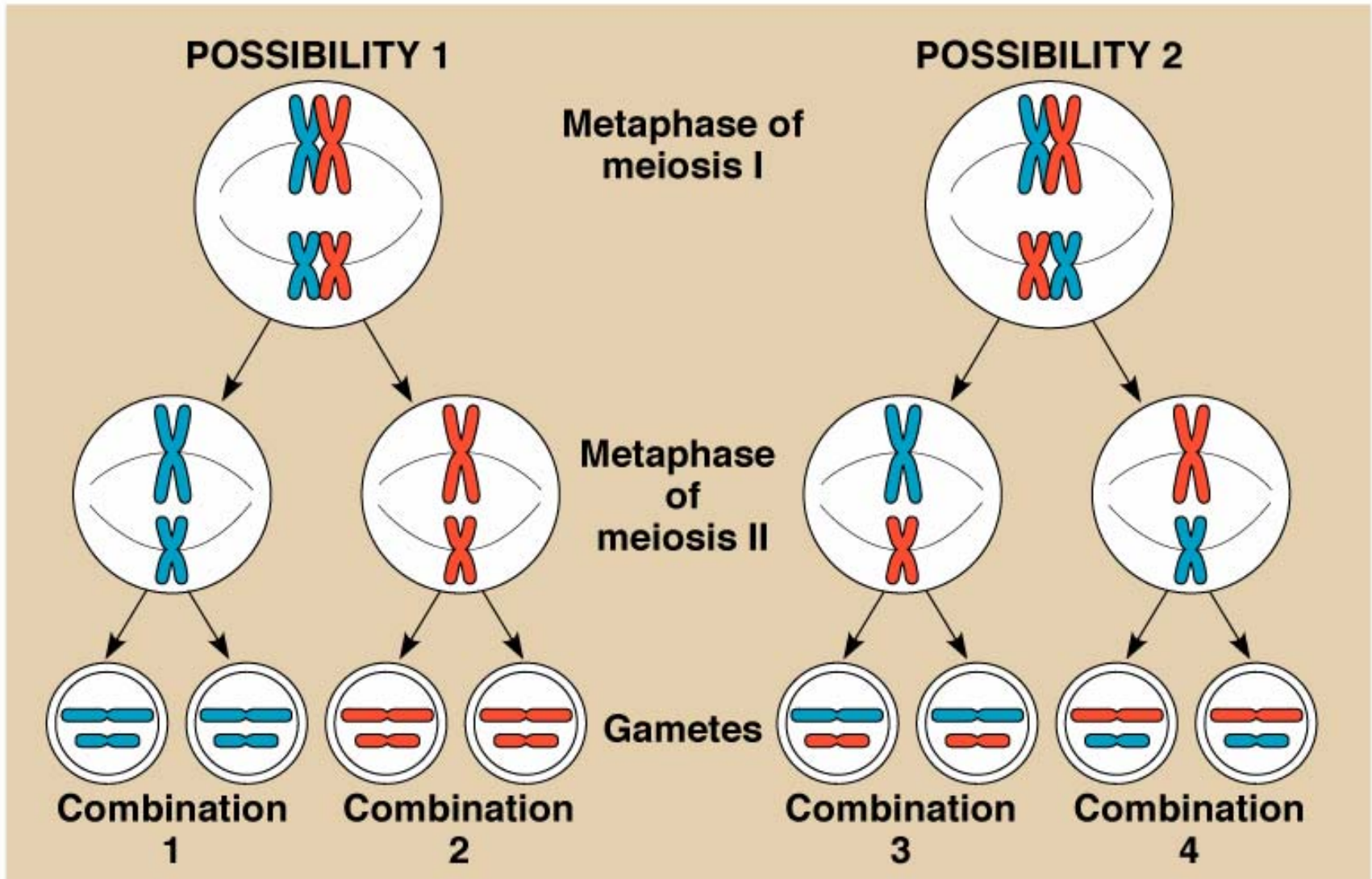
- 2. 中期
- 3. 后期I: 同源染色体随机分向两极, 染色体重组, 人类染色体重组概率有 2^{23} 个。
- 4. 末期
- 5. 减数分裂间期。
- (二) 减数分裂II
- 可分为前、中、后、末四个四期, 与有丝分裂相似。
- 一个精母细胞形成4个精子; 一个卵母细胞形成一个卵子及2-3个极体。



Chromosome recombination 1



Chromosome recombination 2



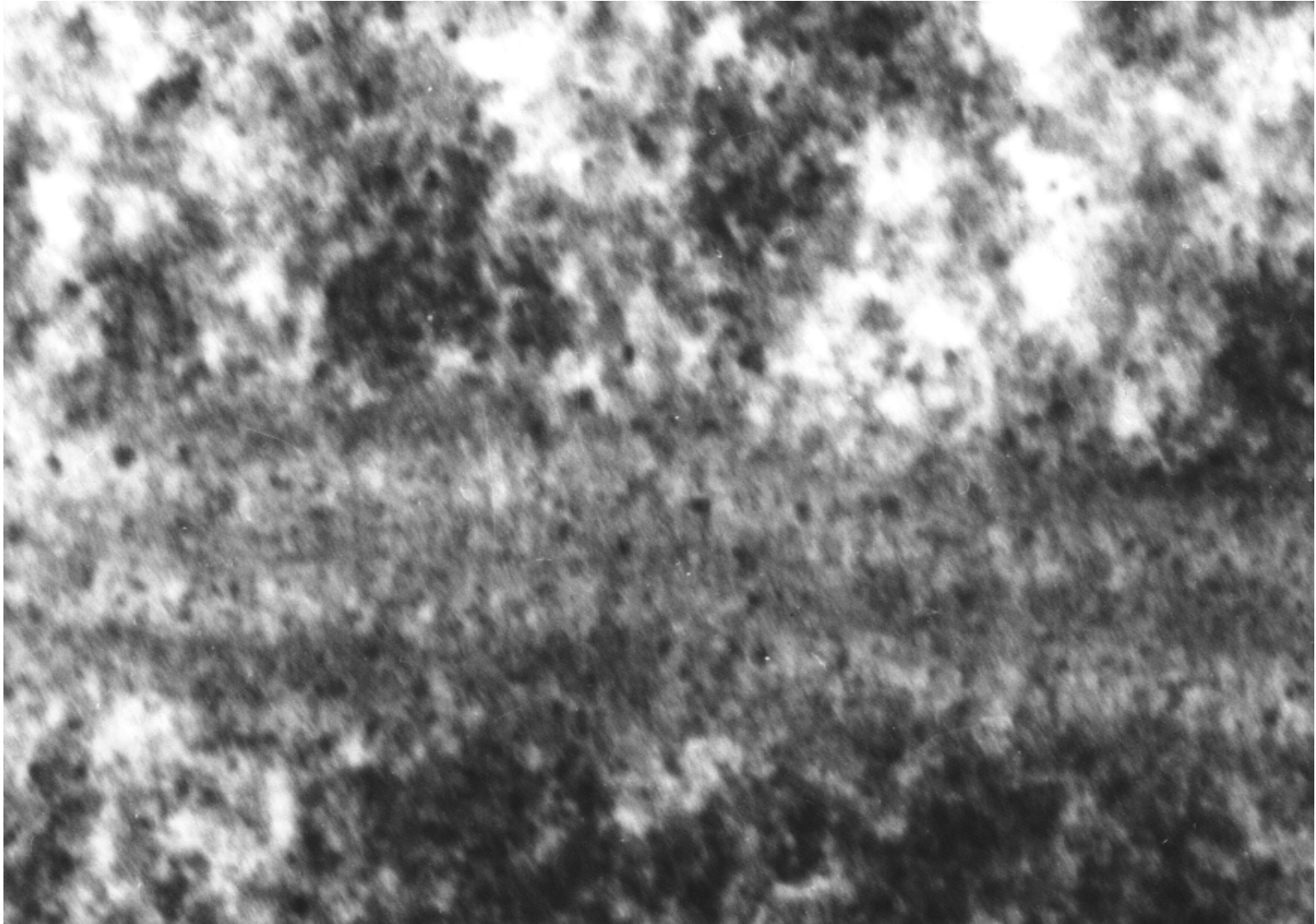
Minimum number of gamete types = 2^n , In humans, $n = 23$

三、联会复合体

- SC由两条同源染色体沿纵轴形成，外观呈梯子状。
- SC帮助交换的完成，SC上有重组节，是交换发生的部位。
- SC主要由碱性蛋白质和RNA组成，含有少量DNA。
- SC形成合线期，成熟于粗线期，消失于双线期。
在细线期/合线期加入DNA合成抑制剂，则抑制SC形成。



synaptonemal complex





<http://www.cella.cn>

第四节 细胞周期调控

CELL CYCLE CONTROL



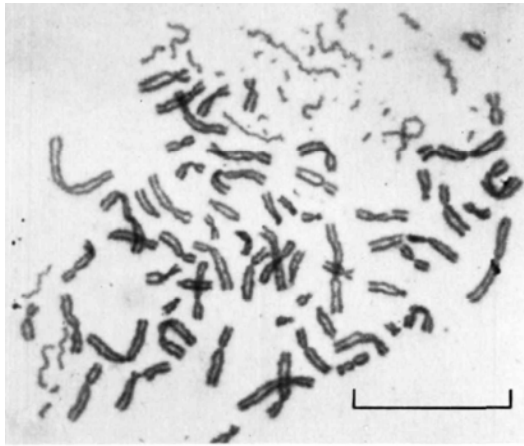
Dr Tian 2008

一、研究背景

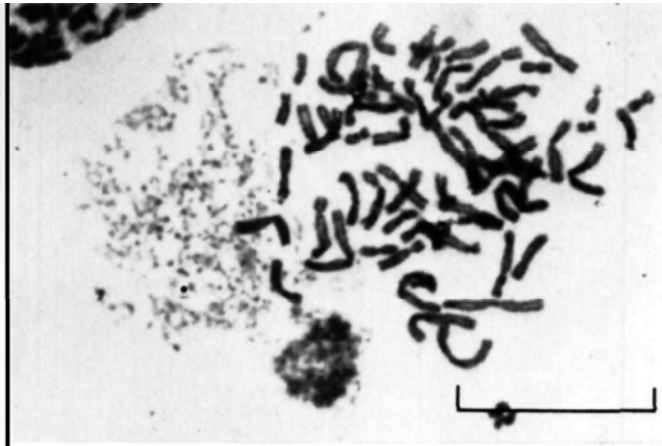
- 1970s Rao等发现与M期细胞(Hela)融合的间期细胞染色体发生凝缩，称为早熟凝集染色体。
 - G1期PCC为单线状，因DNA未复制。
 - S期PCC为粉末状，因DNA由多个部位开始复制。
 - G2期PCC为双线染色体，说明DNA复制已完成。
- 不同类的M期细胞也可诱导PCC产生，说明M期细胞具有促进间期细胞进行分裂的因子，即成熟促进因子(MPF)。



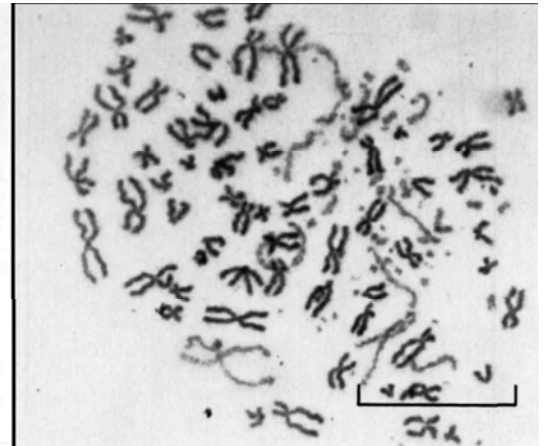
prematurely condensed chromosome, PCC



G1



S



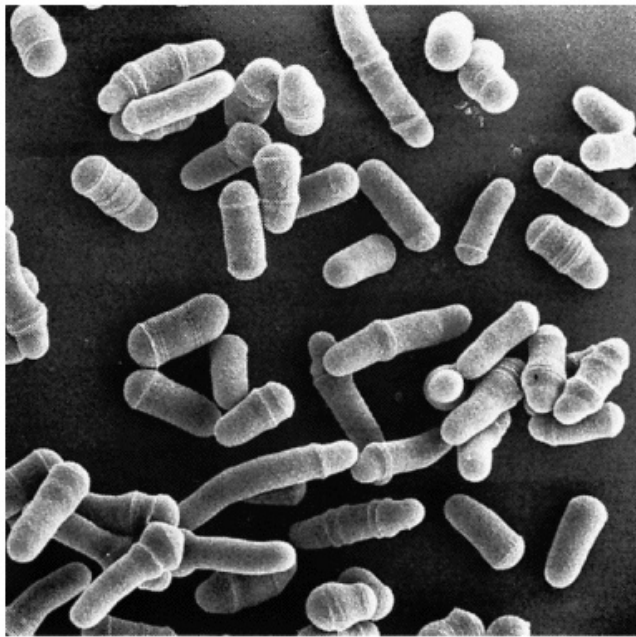
G2

- Hartwell 1960s, Nurse 1970s 分别以芽殖酵母和裂殖酵母为材料，利用温度敏感突变株，发现许多与细胞分裂有关的基因(cdc)。如：
 - 裂殖酵母cdc2、 芽殖酵母cdc28突变型在限制温度下无法分裂；
 - wee1突变型则提早分裂， cdc25突变型细胞体积增大而不分裂；
 - cdc2和cdc28都编码34KD的蛋白激酶，促进细胞周期进行， wee1和cdc25分别表现为抑制和促进cdc2的活性。

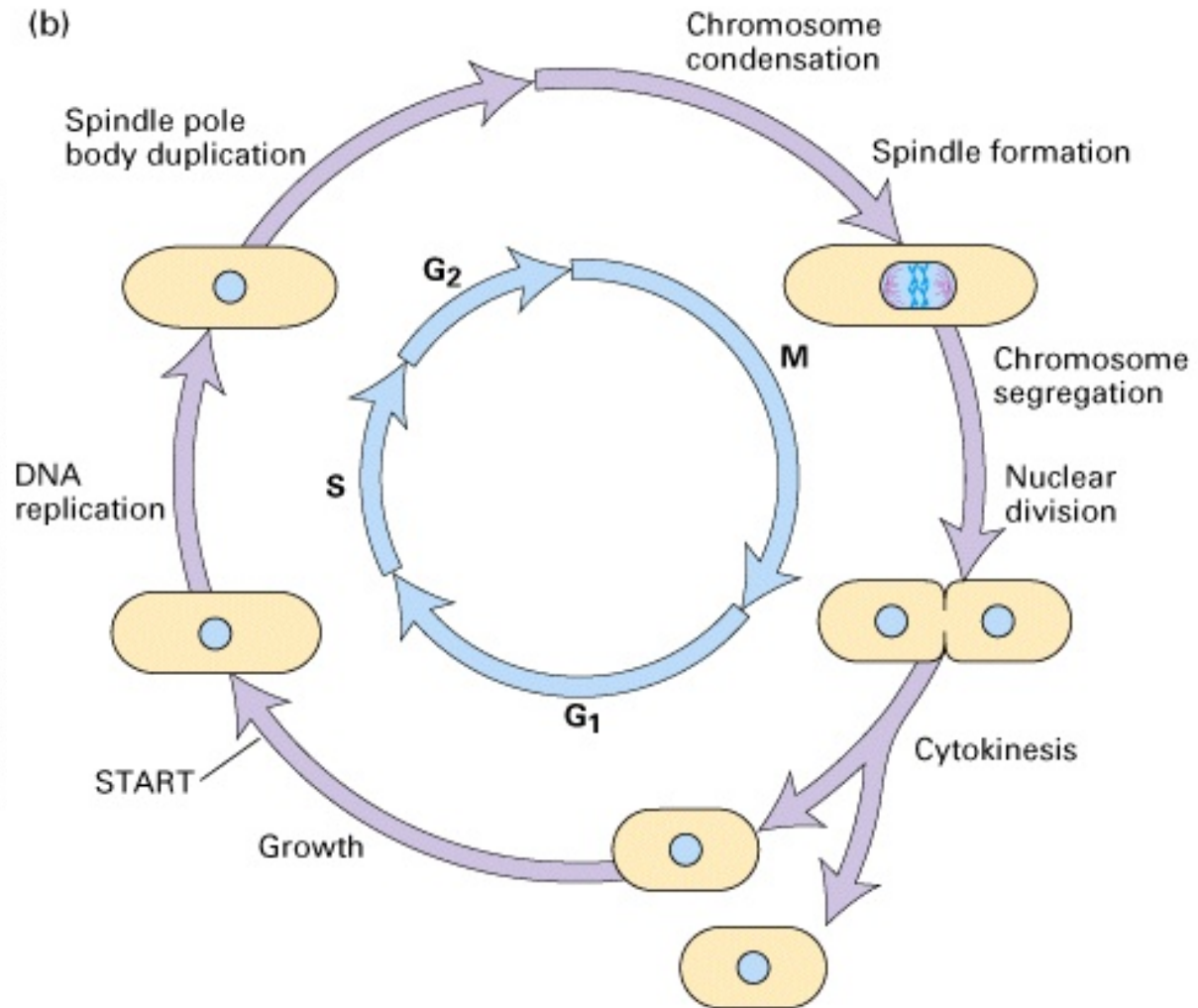


FISSION YEAST

(a)

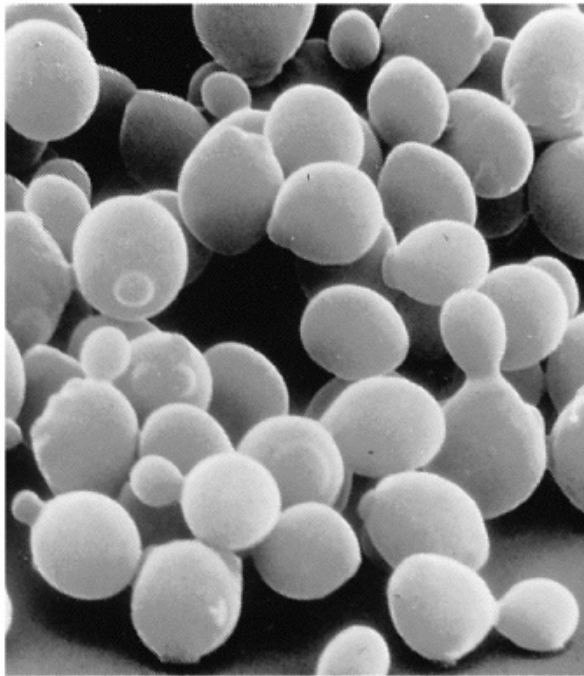


(b)

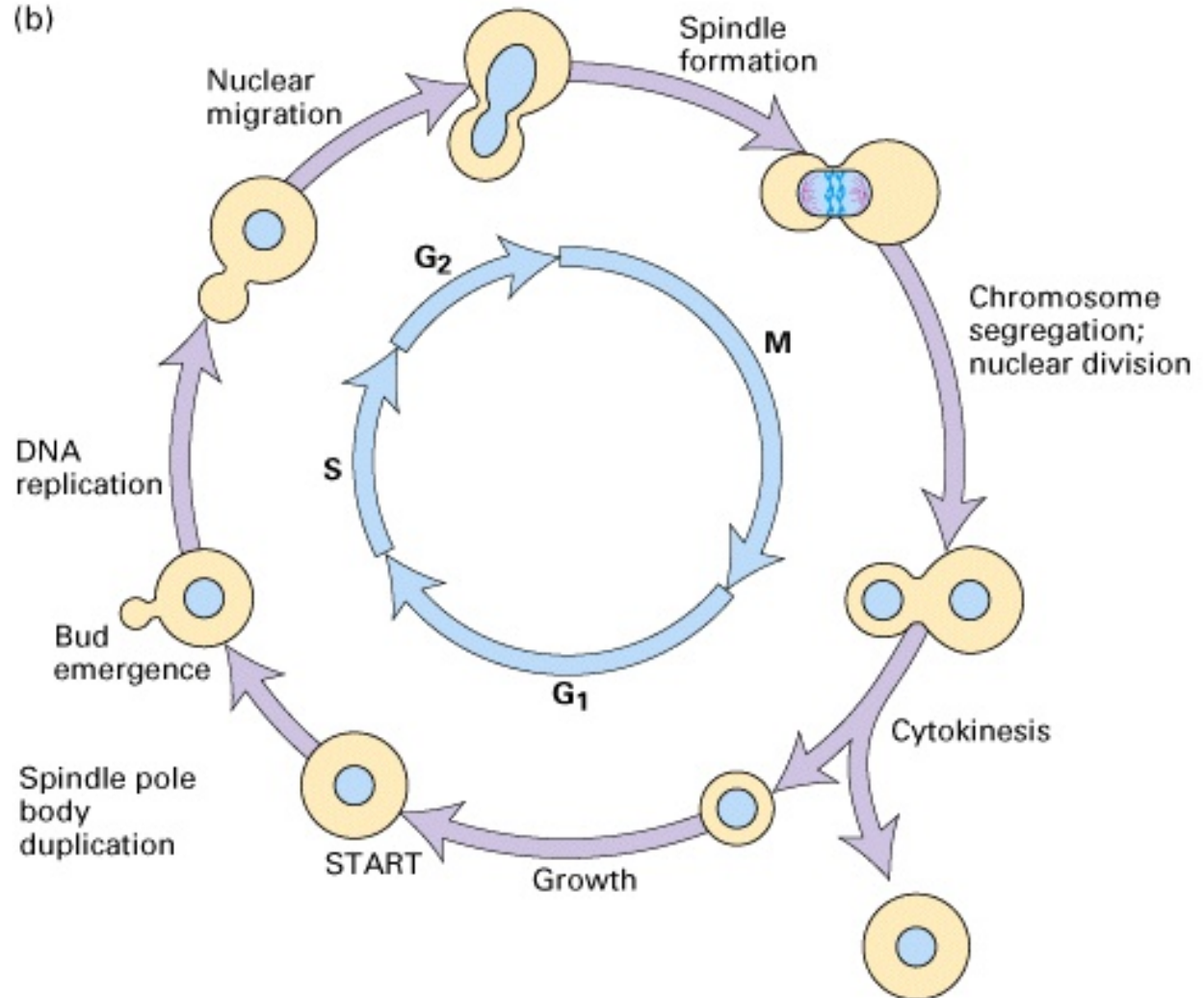


BUDDING YEAST

(a)



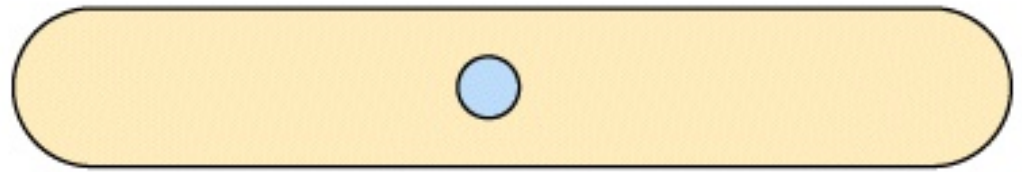
(b)



Cdc 25 & Wee1 mutant

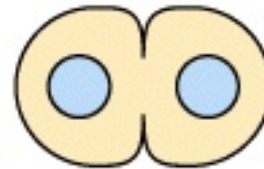
(a)

Deficit of Cdc25
Excess of Wee1



Elongated cells
(Increased G_2)

Excess of Cdc25
Deficit of Wee1



Small cells
(Decreased G_2)

- T. Hunt 1980s发现海胆的卵裂过程中两种蛋白质的含量随细胞周期振荡，命名为cyclin A和B，其mRNA能诱导蛙卵成熟。
- 1988年Lohka将非洲爪蟾的MPF纯化。经鉴定MPF由32KD和45KD两种蛋白组成，是一种丝氨酸/苏氨酸激酶。进一步的研究发现
MPF=cdc2+clyclin B



•2001年10月8日美国人Leland Hartwell、英国人Paul Nurse、Timothy Hunt因对细胞周期调控机理的研究而获诺贝尔生理医学奖。



Leland H. Hartwell



R. Timothy (Tim) Hunt



Sir Paul M. Nurse



二、CDK

- **cdc2**与细胞周期蛋白结合才具有激酶的活性，故名细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)。
- **cdc2**又称**CDK1**，可将特定蛋白磷酸化，如：
 - 将核纤肽磷酸化导致核纤层解体、核膜消失；
 - 将**H1**磷酸化导致染色体的凝缩等。
- 在动物中已知**7种CDK**。均含**PSTAIRE**保守序列，与周期蛋白的结合有关。



三、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子

- CKI对细胞周期起负调控作用，分为：
 - ①Ink4: 抑制cdk4·cyclin D1, cdk6·cyclin D1。
 - ②Kip: 抑制大多数CDK。其中P21^{cip1}还能与DNA聚合酶 δ 的辅助因子PCNA结合，直接抑制DNA的合成。



四、细胞周期蛋白cyclin

- 特点：在细胞周期中呈周期性变化。含有一段约100个氨基酸的保守序列，称为周期蛋白框，介导与CDK结合。
- 作用：激活和引导CDK作用于不同底物。
- 已知30余种，分为4类：G1型、G1/S型、S型、M型。



不同类型的CDK/cyclin复合体

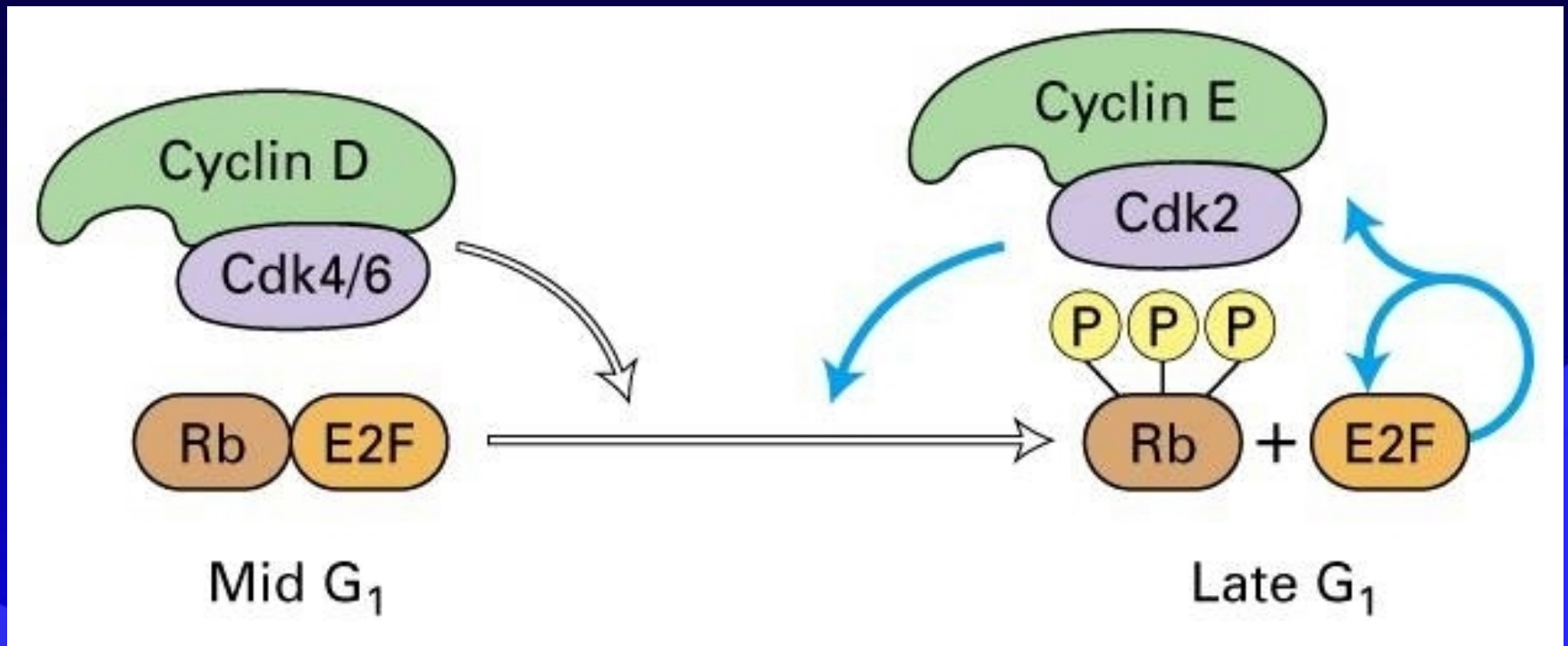
激酶复合体	脊椎动物		芽殖酵母	
	Cyclin	CDK	Cyclin	CDK
G ₁ -CDK	Cyclin D*	CDK4 、 6	Cln 3	CDK1(CDC28)
G ₁ /S-CDK	Cyclin E	CDK2	Cln 1、2	CDK1(CDC28)
S-CDK	Cyclin A	CDK2	Clb 5、6	CDK1(CDC28)
M-CDK	Cyclin B	CDK1(CDC2)	Clb 1-4	CDK1(CDC28)

- *包括D1-3，各亚型cyclin D在不同细胞中的表达量不同，但具有相同的功效。

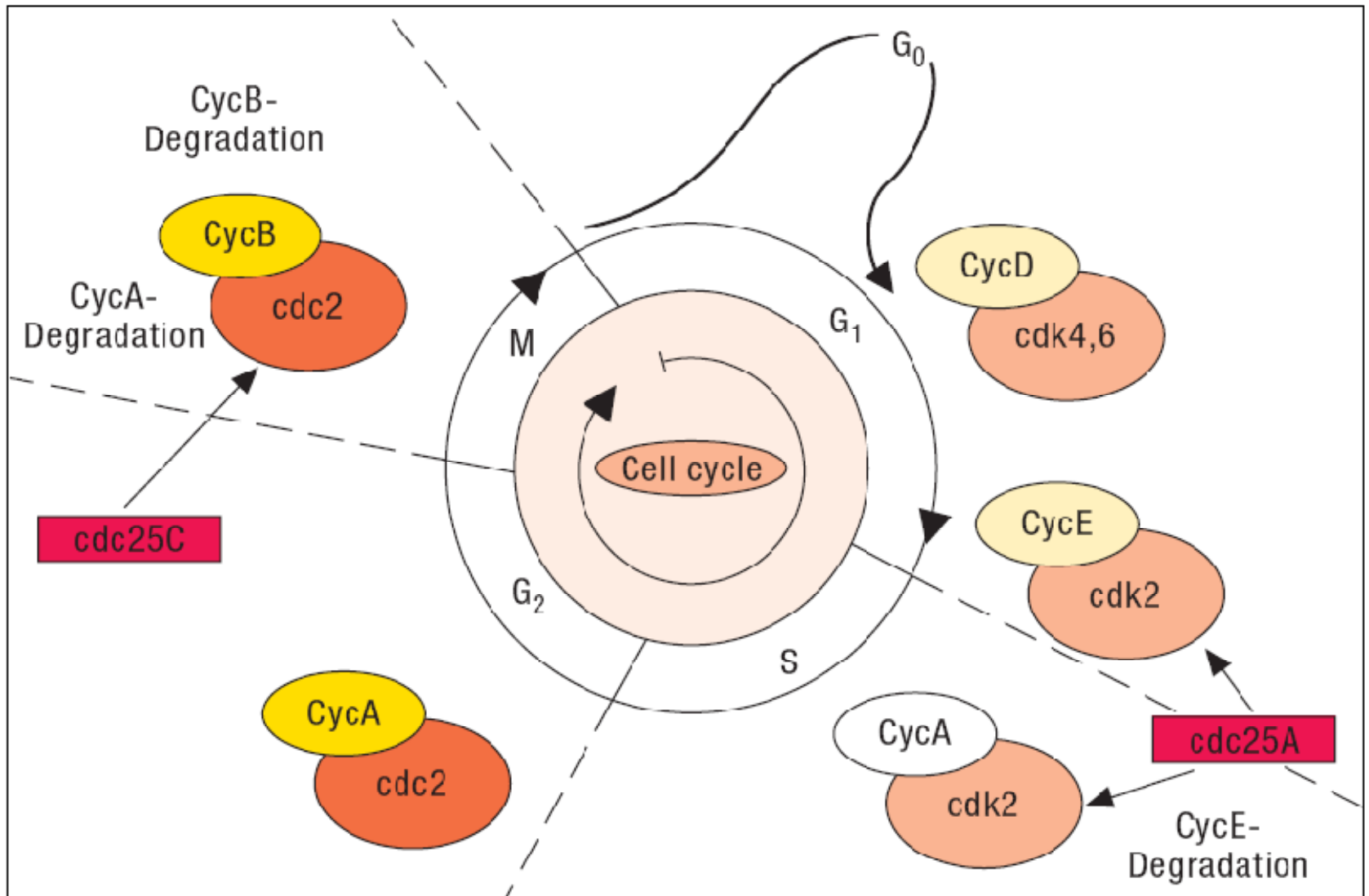
- G1期，在生长因子的刺激下，cyclin D表达，并与CDK4、CDK6结合，使下游的蛋白质如Rb磷酸化，释放转录因子E2F，促进许多基因的转录，如编码cyclinE、A和CDK1的基因。
- G1-S期，cyclinE与CDK2结合，激活DNA复制。
- G2-M期，cyclinA、cyclinB与CDK1结合，CDK1引起染色体凝缩、核膜解体等。



- G1 CDK activate transcription factor E2F



•CELL CYCLE REGULATION



- 中期当MPF活性达到最高时，激活APC，通过泛素化途径降解cyclin B，完成细胞周期。
 - 分裂期周期蛋白N端具有降解盒。
 - 泛素由76个氨基酸组成，高度保守。共价结合泛素的蛋白能被蛋白酶体识别和降解，是细胞内短寿命蛋白和异常蛋白降解的普遍途径。



Destruction Box in Cyclins

(a) Mitotic cyclin destruction box

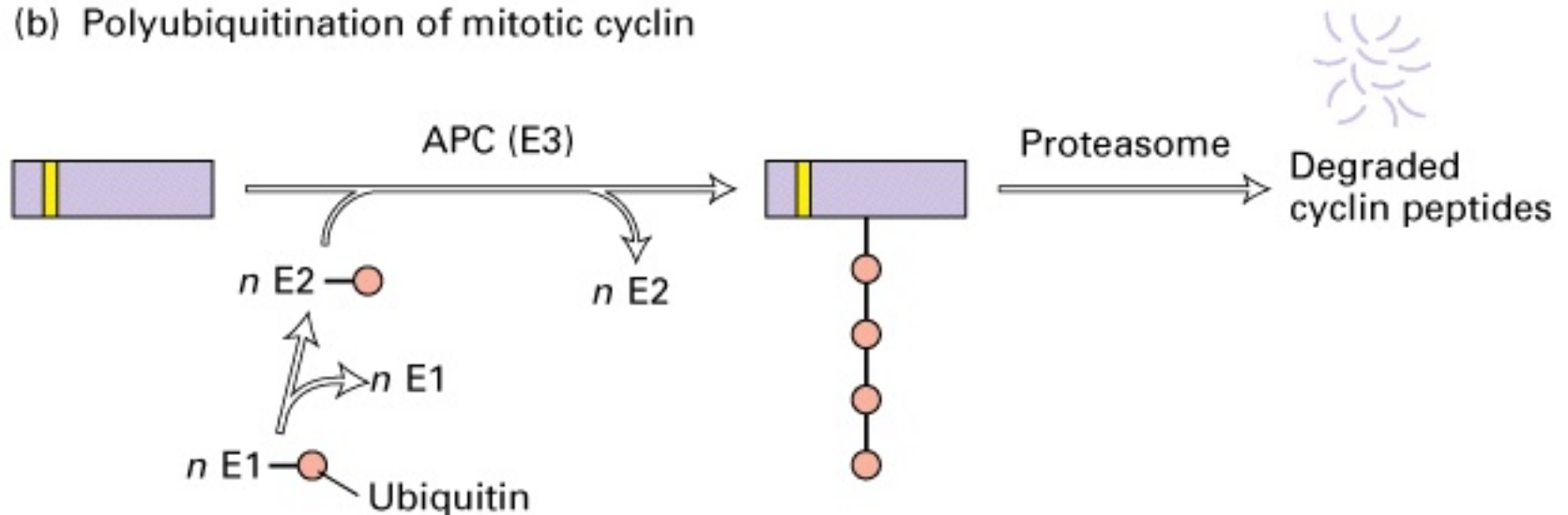


Cyclin A **Arg—Thr—Val—Leu—Gly—Val—Ile—Gly—Asp**

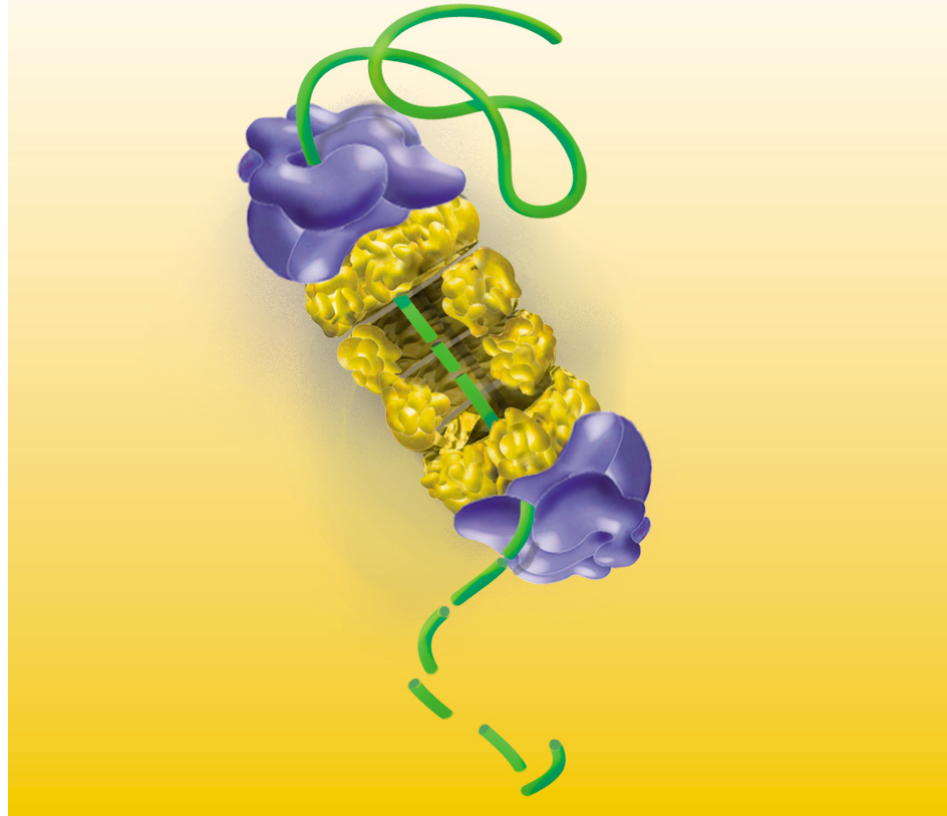
Cyclin B1 **Arg—Thr—Ala—Leu—Gly—Asp—Ile—Gly—Asn**

Cyclin B2 **Arg—Ala—Ala—Leu—Gly—Glu—Ile—Gly—Asn**

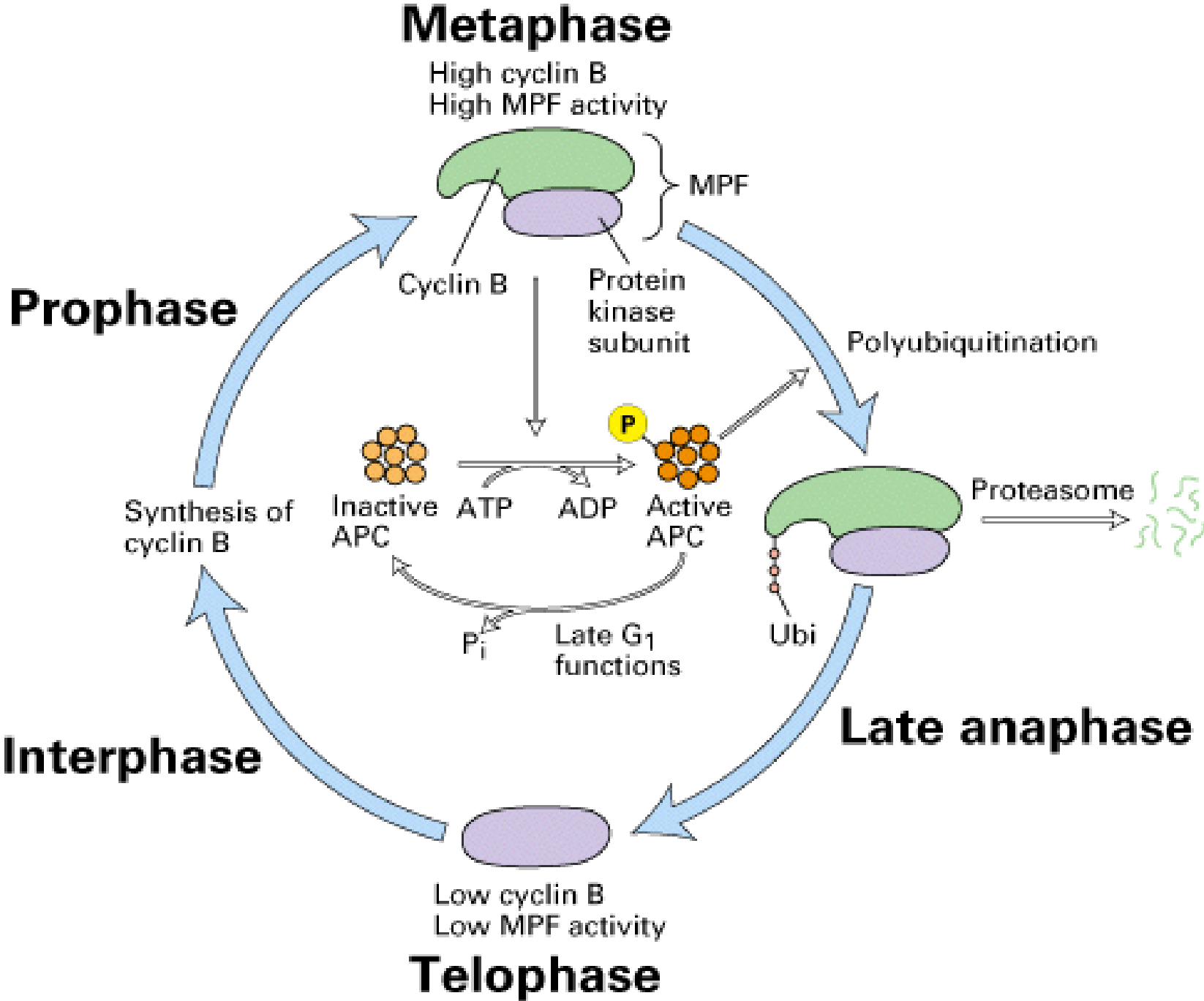
(b) Polyubiquitination of mitotic cyclin



PROTEASOME

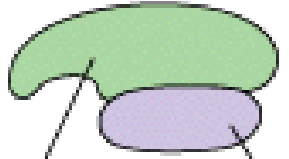


26S蛋白酶体是大型的蛋白酶，可将泛素化的蛋白质分解成短肽。



Metaphase

High cyclin B
High MPF activity



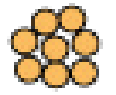
MPF

Cyclin B

Protein kinase subunit

Prophase

Synthesis of cyclin B



Inactive APC

ATP

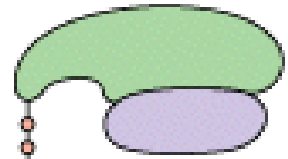
ADP



Active APC

→

Polyubiquitination



Proteasome



Interphase

Low cyclin B
Low MPF activity



Telophase

Late G₁ functions

P_i

Late anaphase

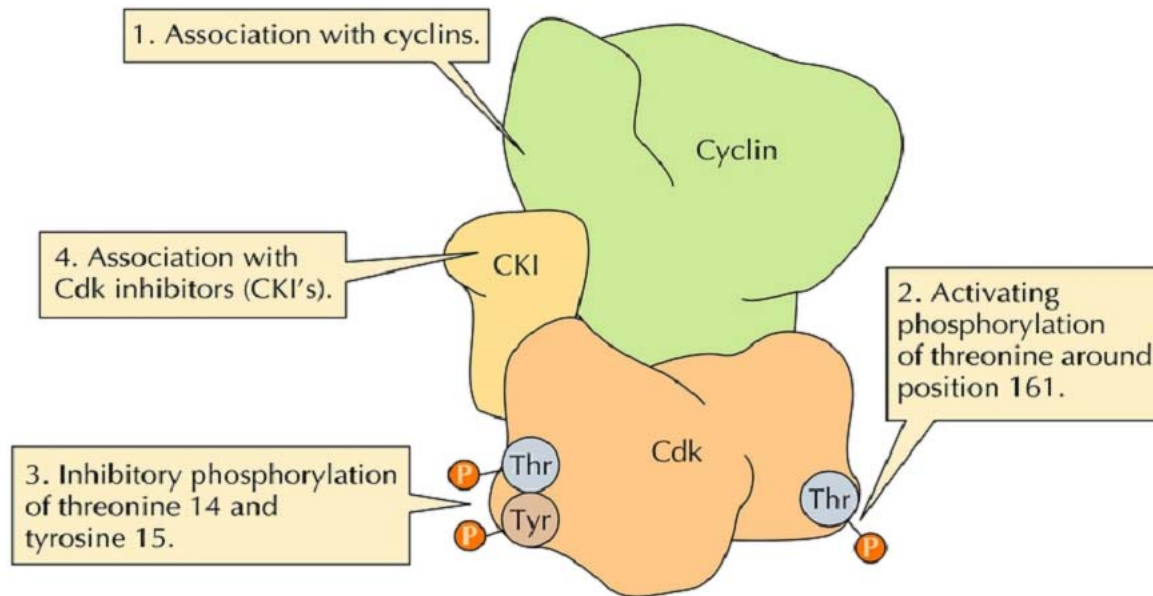
Ubi

五、M期CDK的激活

- M期CDK的激活起始于分裂期cyclin的积累。
- 结合cyclin B的CDK1被Wee1将Thr14和Tyr15磷酸化而不具有活性，使CDK/cyclin不断积累。
- 在M期，Wee1的活性下降，cdc25使CDK去磷酸化，去除了CDK活化的障碍。
- CDK的激活需要Thr161的磷酸化，它是在CDK激酶(CDK activating kinase CAK)的作用下完成的。



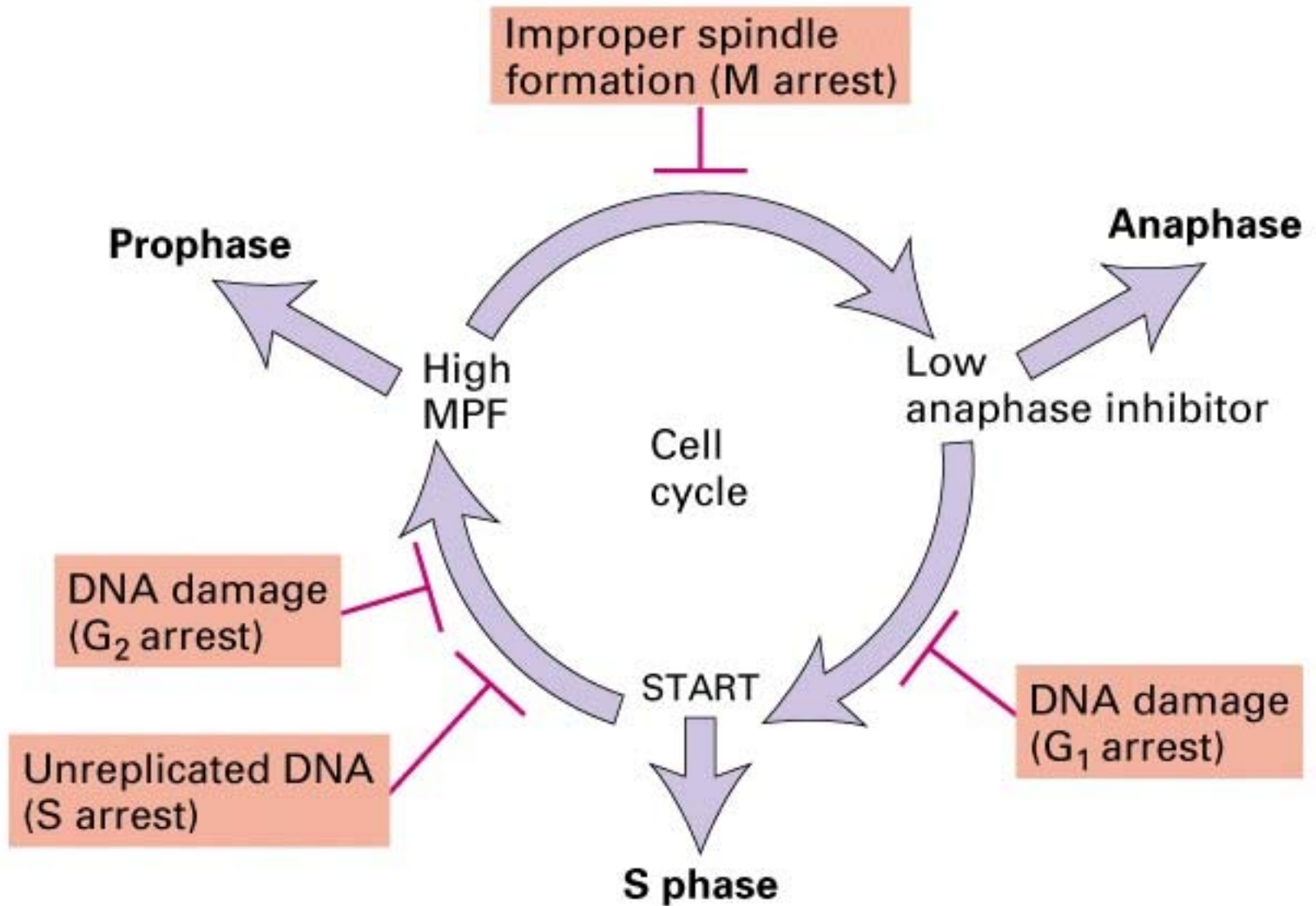
CDK ACTIVATING



六、细胞周期检验点 (check point)

- 组成：感受器、信号传导通路、效应器。
- 主要检验点：
 - G1/S检验点：DNA是否损伤？细胞外环境是否适宜？细胞体积是否足够大？在酵母中称start点，在哺乳动物中称R点(restriction point)。
 - S期检验点：DNA复制是否完成？
 - G2/M检验点：DNA是否损伤？细胞体积是否足够大？
 - 中-后期检验点：纺锤体组装检验点。

FOUR CHECKPOINTS



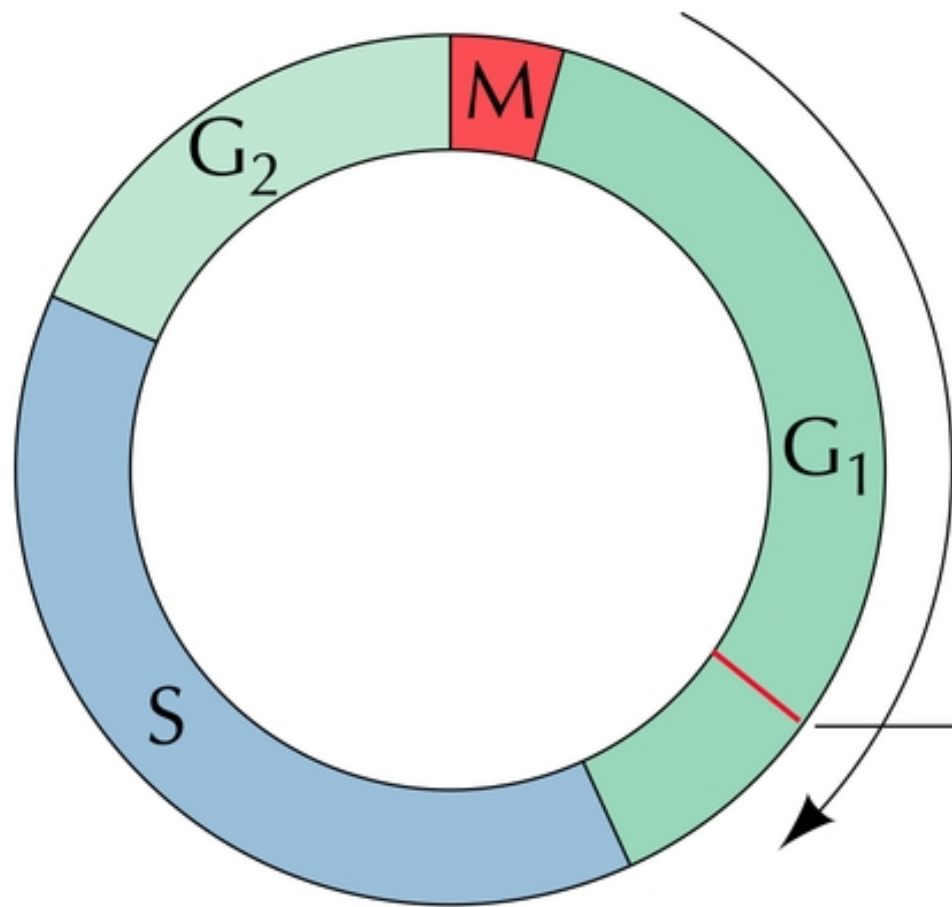
- ATM (ataxia telangiectasia-mutated gene)
 - 最早发现于毛细血管扩张性共济失调症患者，人类中大约有1%的人是ATM缺失的杂合子，表现出对电离辐射敏感和易患癌症。
- ATM编码一个蛋白激酶，结合在损伤的DNA上，其信号通路有两条。
 - ①激活Chk1 (checkpoint kinase), 使cdc25的Ser216磷酸化失去活性，抑制M-CDK的活性，中断细胞周期。
 - ②激活Chk2, 使P53被磷酸化而激活，然后P53作为转录因子，导致P21表达，P21抑制G1-S期CDK的活性，中断细胞周期。



七、生长因子对细胞增殖的影响

- 生长因子是与细胞增殖有关的信号物质，已知几十种，多数能促进细胞增殖。
- 作用方式：旁分泌。
- 信号通路：ras、cAMP、磷脂酰肌醇途径。
 - 如通过ras途径，激活MAPK，MAPK进入细胞核内，激活c-myc，myc作为转录因子促进cyclin D、SCF、E2F等G1-S有关的基因表达，细胞进入G1期。



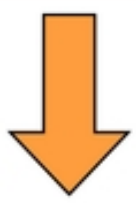


Growth factors



Ras/Raf/ERK

Synthesis of D-type cyclins



Cdk4, 6/CycD

Restriction point

See you!

