

• 论 著 •

HSPC238 对肝癌细胞中 RB 基因表达的影响^{*}

袁春雷¹, 谭家余², 钟裕恒³, 黄 湘^{3△}, 陈敬林³

(南方医科大学附属中山博爱医院: 1. 检验科; 2. 中心 ICU; 3. 产前诊断中心, 广东中山 528400)

摘要:目的 观察 HSPC238 对肝癌细胞中 RB mRNA 和 pRb 蛋白水平的影响。方法 将 PcDNA3.1-HSPC238 质粒和 PLL3.7-HSPC238 干扰载体分别转染 HepG2 细胞, 用实时荧光定量 PCR 的方法检测 RB mRNA 的表达量; 采用 Western blotting 法检测 pRb 蛋白的表达。结果 和对照组相比, 转染高表达 HSPC238 载体时, HepG2 细胞中 RB 的 mRNA 水平和 pRb 表达量也增加; 相反地, 和对照组相比, 转染低表达 HSPC238 载体时, HepG2 细胞中 RB 的 mRNA 水平和 pRb 蛋白的表达量也减少。以上结果差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 在 HepG2 细胞中 HSPC238 对 RB 基因的表达存在正向调控作用。

关键词: HSPC238; RB 基因; 肝癌细胞; HepG2

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.18.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)18-2505-03

The effects of HSPC238 on the expression of RB in hepatoma carcinoma cells^{*}

YUAN Chunlei¹, TAN Jiayu², ZHONG Yuheng³, HUANG Xiang^{3△}, CHEN Jinglin³

(1. Department of Laboratory Medicine, Zhongshan Boai Hospital Affiliated to Southern Medical University, Zhongshan, 528400, China; 2. Central Intensive Care Unit, Zhongshan Boai Hospital Affiliated to Southern Medical University, Zhongshan, 528400, China; 3. Prenatal Diagnosis Center, Zhongshan Boai Hospital Affiliated to Southern Medical University, Zhongshan, 528400, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of up-regulation and down-regulation of HSPC238 on the RB gene mRNA and pRb protein. **Methods** PcDNA3.1-HSPC238 vector and PLL3.7-HSPC238 vector was transiently transfected into HepG2 cells respectively. The level of RB mRNA was detected by real-time PCR and pRb was detected by Western blotting. **Results** The level of RB mRNA and pRb in up-regulation group both increased compared with control groups respectively. Conversely, the level of RB mRNA and pRb in down-regulation group both decreased compared with control groups respectively. Above results were all statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** HSPC238 could have a positive effect on the expression of the RB gene.

Key words: HSPC238; RB gene; hepatoma carcinoma; HepG2

HSPC238 是由 LOC51255 基因编码的, 含有 153 个氨基酸的 C₃HC₄ 型锌指蛋白。该蛋白于 2000 年登录 Swiss-Prot 数据库。Brophy 在 2008 年发现, 该蛋白具有 E3 泛素连接酶活性^[1]。在此基础上, 本课题组于 2011 年通过体内外试验研究发现, HSPC238 能够抑制肝癌细胞的增殖^[2]。但迄今为止, 对 HSPC238 的功能认识仍然很少。为了进一步了解 HSPC238 在肝癌发病机制中的作用, 本课题组设计了实时荧光定量 PCR 试验和免疫印迹试验, 探讨外源性高表达或低表达 HSPC238 对 RB mRNA 和 RB 基因编码的蛋白 pRb 的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和载体 HepG2 细胞购自南京凯基生物科技发展有限公司。PcDNA3.1-HSPC238 重组质粒、PcDNA3.1 空质粒、PLL3.7-HSPC238 干扰载体和 PLL3.7 阴性干扰载体均由本实验室保存。

1.1.2 试剂 HSPC238、pRB 抗体和二抗均购自武汉三鹰生物技术有限公司。引物、组织 RNA 提取试剂盒均购自美国英杰生命技术有限公司。反转录及荧光定量 PCR 试剂购自 GeneCopia 公司。HSPC238 引物序列: 上游 5'-GTT GGT CCT GTG CGG TCA CT-3', 下游 5'-GAA AGG CGA ACG TCT CAA CCT-3'; RB 引物序列: 上游 5'-AAA AAG GTT CAA

CTA CGC GTG TAA-3', 下游 5'-GAG AGG TAG ATT TCA ATG GCT TCT G-3'; 内参序列 GAPDH (251 bp): 上游 5'-CCT GCA CCA CCA ACT GCT TAG-3'; 下游 5'-CAG TCT TCT GGG TGG CAG TGA-3'。HSPC238 的干扰序列为 5'-TGC TAT GAG CTG CCC ACT GAT TCA AGA GAT CAG TGG GCA GCT CAT AGC TTT TTT C-3'。引物均委托广州英俊生物公司合成。PCR 扩增仪为 ABI PRISM 7000 sequence detection system。

1.2 方法

1.2.1 HepG2 细胞培养和质粒转染 将 HepG2 细胞接种于 6 孔细胞培养板, 放在 37℃、5% CO₂ 培养箱进行培养 24 h。等细胞的汇合度达到 70%~80% 时, 按照 Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒说明书将 PcDNA3.1-HSPC238 质粒、PcDNA3.1 空质粒、PLL3.7-HSPC238 干扰载体和 PLL3.7 阴性对照载体分别转染至 HepG2 细胞。各组在相同条件下培养 48 h, 然后进行后续试验。

1.2.2 RT-qPCR 检测 HSPC238 mRNA 表达 (1) 按试剂盒说明书, 将 HSPC238 高表达组 (HepG2/HSPC238)、高表达对照组 (HepG2/empty)、低表达组 (HepG2/KD) 和低表达对照组

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81101534); 广东省自然科学基金资助项目 (S2012010010824)。

作者简介: 袁春雷, 男, 副主任技师, 主要从事临床检验方面的研究。△ 通讯作者, E-mail: 340382761@qq.com。

(HepG2/NC)各组细胞分别提取 RNA。将提取所得的 RNA 在紫外分光光度计上检测其 A_{260}/A_{280} 比值和 RNA 浓度。当 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.0 的时候,表明纯度和浓度符合检测标准。再用 1% 浓度的琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的质量。(2)进行反转录反应,获得的 cDNA -20℃ 保存。(3)参照 qPCR 反应体系进行 qPCR 反应,以 GAPDH 作为内参与 HSPC238 同时进行 PCR,每例样本设置 3 个重复管。(4)将 PCR 产物作溶解曲线分析,确定产物特异性。

1.2.3 免疫印迹试验(Western blotting) 样品处理后上样,每例样本设 3 个复孔,GAPDH 作为内参,然后电泳,转膜,加一抗(1:500)反应 1.5 h,最后用辣根过氧化物酶标记的相应二抗孵育后发光显色。

1.3 统计学处理 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示相对定量结果:以 GAPDH 作为内参,根据公式 $\Delta Ct = [Ct(HSPC238)] - [Ct(GAPDH)]$, $\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct(试验组)] - [\Delta Ct(对照组)]$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示试验组 HSPC238 相对于对照组原始拷贝数的倍数差异,采用 SPSS19.0 统计软件包进行 *t* 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HepG2/HSPC238 组的 HSPC238 mRNA 表达水平 是 HepG2/empty 组的(5.07±1.580)倍;HepG2/KD 组的 HSPC238 mRNA 表达水平是 HepG2/NC 的(0.02±0.007)倍,差异均有统计学意义($P < 0.05$),如图 1a。HepG2/HSPC238 组的 RB mRNA 表达水平是 HepG2/empty (4.41±0.360)倍,差异有统计学意义($P < 0.05$);HepG2/KD 组的 RB mRNA 表达水平是 HepG2/NC 的(0.71±0.110)倍,差异有统计学意义($P < 0.05$),如图 1b。

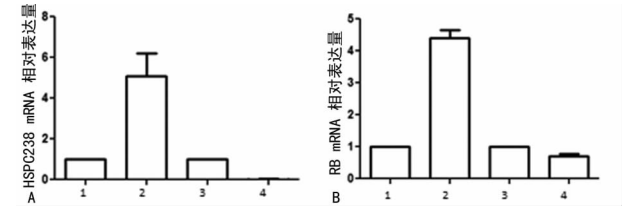


图 1 HSPC238、RB 的 mRNA 相对表达量

2.2 HepG2/HSPC238 组的 pRb 表达水平 高于 HepG2/empty 组;HepG2/KD 组的 pRb 表达水平低于 HepG2/NC 组,如图 2。

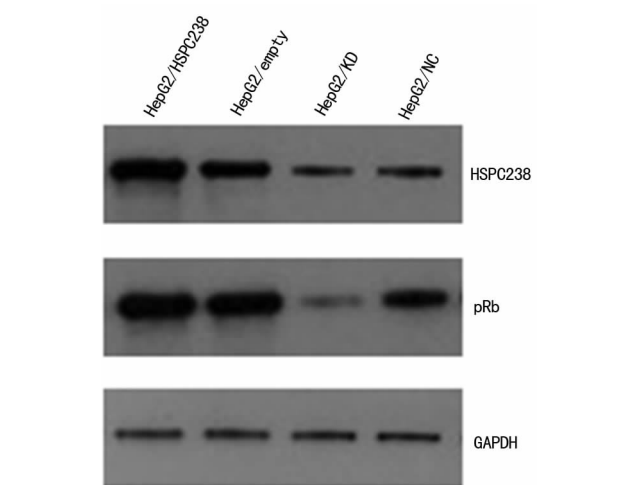


图 2 免疫印迹试验 HSPC238 和 pRb 蛋白检测的表达水平

3 讨 论

HSPC238 编码的蛋白长度为 153 个氨基酸,包含 1 个 RING 指结构域,属于 C₃HC₄ 型锌指蛋白,它具有 E3 泛素蛋白连接酶活性。锌指蛋白是一类重要的转录调控因子,锌指蛋白可以通过 RING 指结构介导蛋白与蛋白之间的相互作用,参与肿瘤的形成、信号转导、病毒复制等多种生物学过程(如 RNF5、RNF125、mel-18 等)^[3-5]。

前期研究发现,HSPC238 可以通过影响 ERK/MAPK 通路抑制肝癌细胞的生长,上调 HSPC238 使磷酸化的 ERK1/2 水平降低,反之使磷酸化 ERK1/2 水平增加,但 HSPC238 的改变不影响 ERK1/2 的总水平^[2]。肝癌的发生发展机制中,ERK/MAPK 信号通路的异常是至关重要的。pRb/E2F-1 是 ERK/MAPK 通路的下游调控通路,是 G1/S 调控点的中心。前期通过流式细胞仪检测细胞周期的方法显示,过表达 HSPC238 可延缓 Bel7402 细胞株从 G1 期进入 S 期,表明 HSPC238 可能通过影响细胞周期来抑制肝癌细胞 Bel7402 的生长^[6]。现在通过本研究发现,在肝癌细胞 HepG2 中,过表达 HSPC238 可以同时使 RB mRNA 和 pRb 蛋白水平上升,低表达 HSPC238 可以使之下降,表明 HSPC238 可以通过调节 RB mRNA 和 pRb 的水平影响 HepG2 细胞 G1/S 进程。结合之前的研究结果,说明 HSPC238 可以从胞浆到细胞核影响 ERK/MAPK 到 pRb 的通路,从而调控 G1/S 进程。

P53 也是细胞周期的重要调控点,研究发现,高表达 RPS27a 可以显著抑制通过 MDM2 介导的 P53 蛋白的泛素化降解,使得 P53 蛋白的分解显著减少,然后引起细胞周期阻滞^[7]。在前期研究中发现,在肝癌细胞中 HSPC238 可以与 RPS27a 结合,同时可以正向调节 RPS27a 的表达,因此推测,在肝癌中 HSPC238 很可能通过结合并调节 RPS27a,进而阻碍 MDM2 泛素化降解 p53^[8-9]。如此而言,HSPC238 很可能是 pRb 通路和 p53 通路的 1 个新连接点,像 MDM2、p21、E2F-1、E2F7 这些连接点一样,在 p53 和 pRb 相互作用的复杂网络中起协调作用^[10-13]。

由于本研究内容有限,HSPC238 能否影响 p53 的表达水平,具体通过什么方式调节 RB mRNA 和 pRb 蛋白水平,还不得而知,是通过直接影响 RB 基因的启动子或增强子起作用,还是通过 MDM2、p21、E2F-1、E2F7 这些连接点间接调节 pRb,还需要大量研究证实,这也为后续研究提供了线索和方向。

参考文献

[1] Brophy TM, Raab M, Daxecker H, et al. RN181, a novel ubiquitin E3 ligase that interacts with the KVGFFKR motif of platelet integrin alpha (IIb) beta3[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 369(4): 1088-1093.

[2] Wang S, Huang X, Li Y, et al. RN181 suppresses hepatocellular carcinoma growth by inhibition of the ERK/MAPK pathway[J]. Hepatology, 2011, 53(6): 1932-1942.

[3] Jeon YJ, Khelifa S, Ratnikov B, et al. Regulation of glutamine carrier proteins by RNF5 determines breast cancer response to ER Stress-Inducing chemotherapies[J]. Cancer Cell, 2015, 27(3): 354-369.

[4] Yang LZ, Zhou B, Li XR, et al. RNF125 (下转第 2510 页)

遗传模式下与 T2D 的易感性密切相关,可能增加个体患 T2D 的风险,支持上述文献的研究结论。此外,有文献还报道,印第安人群 rs2268573 突变与 T2D 有相关性,而 rs2268569 突变在西班牙人、欧洲裔美国人、非裔美国人、中国人群与空腹血糖的水平有关,rs1476891 则与空腹血糖的水平无关^[10-12]。本研究发现,GCK 位点 rs2268569、rs2268573、rs1476891 等位基因及基因型分布频率与健康人群相比较差异无统计学意义(表 2),与上述研究不完全一致,提示这些基因与糖尿病及糖代谢的关系尚需深入研究。单体型研究结果显示,rs12702070、rs1476891 和 rs2268569 形成了 LD 域,表达显著关联($P < 0.05$),表明在这 3 个 SNP 位点中有基因-基因相互作用。

总之,本研究初步验证了在汉族人群中,GCK 基因区域的 rs12702070 位点与糖尿病遗传易感性密切相关,而 rs2268573、rs2268569、rs1476891 位点与糖尿病遗传易感性无明确相关性。rs12702070、rs1476891 和 rs2268569 的 LD 域有基因-基因相互作用。但这些突变基因的具体作用机制仍不明确,值得深入研究,可在今后结合更多临床资料及数据进一步对比分析。

参考文献

[1] 刘子杰,晋臻,段勇. HbA1c 常规工作中引入测量不确定度的意义和存在的困难[J]. 中华检验医学杂志,2014,37(12):884-886.

[2] Sladek R,Rochelleau G,Rung J, et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes[J]. Nature,2007,445(7130):881-885.

[3] Billings LK,Florez JC. The genetics of type 2 diabetes: what have we learned from GWAS[J]. Ann N Y Acad Sci,2010,1212:59-77.

[4] Bao XY,Peng B,Yang MS. Replication study of novel risk variants in six genes with type 2 diabetes and related quantitative traits in the Han Chinese lean individuals[J].

Mol Biol Rep,2012,39(3):2447-2454.

[5] Matschinsky F,Liang Y,Kesavan P, et al. Glucokinase as pancreatic beta-cell glucose sensor and diabetes gene[J]. Journal of Clinical Investigation,1993,92(5):2092-2098.

[6] Iynedjian PB. Mammalian glucokinase and its gene[J]. Biochem J,1993,293(Pt 1):1-13.

[7] WHO. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus[S]. WHO, Geneva, 1999: 1-59.

[8] 张秀明,黄宪章,曾方银,等. 临床生化检验诊断学[M]. 北京:人民卫生出版社,2012:866.

[9] Borowiec M,Antosik K,Fendler W, et al. Novel glucokinase mutations in patients with monogenic diabetes-clinical outline of GCK-MD and potential for founder effect in Slavic population[J]. Clin Genet,2012,81(3):278-283.

[10] Echouffo-Tcheugui JB,Dieffenbach SD,Kengne AP. Added value of novel circulating and genetic biomarkers in type 2 diabetes prediction:a systematic review[J]. Diabetes Res Clin Pract,2013,101(3):255-269.

[11] Rasmussen-Torvik LJ,Guo XQ,Bowden DW, et al. Fast-ing glucose GWAS candidate region analysis across ethnic groups in the multiethnic study of atherosclerosis(Mesa) [J]. Genet Epidemiol,2012,36(4):384-391.

[12] Weedon MN,Clark VJ,Qian YA, et al. A common haplo-type of the glucokinase gene alters fasting glucose and birth weight: Association in six studies and population-genetics analyses[J]. Am J Hum Genet,2006,79(6):991-1001.

(收稿日期:2016-03-12 修回日期:2016-05-20)

(上接第 2506 页)

is a Ubiquitin-Protein ligase that promotes p53 degradation[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2015, 35(1):237-245.

[5] Lee JY,Kong G. MEL-18, a tumor suppressor for aggressive breast cancer[J]. Oncotarget, 2015, 6(18):15710-15711.

[6] 黄湘,谭家余,王穗海,等. 过表达 HSPC238 对 Bel7402 细胞周期的影响[J]. 中国免疫学杂志,2011,27(2):120-125.

[7] Sun XX,Devine T,Challagundla KB, et al. Interplay between ribosomal protein S27a and MDM2 protein in p53 activation in response to ribosomal stress[J]. J Biol Chem,2011,286(26):22730-22741.

[8] Tan JY,Chen JL,Huang X, et al. Screening and verification of proteins that interact with HSPC238[J]. Oncol Rep,2015,34(6):3097-3103.

[9] 谭家余,黄湘,陈敬林,等. HSPC238 对 HMOX1、RPS27a、

MT2A、UBB 调节的初步研究[J]. 中国免疫学杂志,2016, 32(4):509-512.

[10] Yin YX,Solomon G,Deng CX, et al. Differential regulation of p21 by p53 and Rb in cellular response to oxidative stress[J]. Mol Carcinog,1999,24(1):15-24.

[11] Schwartzman JM,Duijf PH,Sotillo RA, et al. Mad2 is a critical mediator of the chromosome instability observed upon Rb and p53 pathway inhibition[J]. Cancer Cell, 2011,19(6):701-714.

[12] Iaquinta PJ,Aslanian A,Lees JA, et al. Regulation of the Arf/p53 tumor surveillance network by E2F[J]. Cold Spring HaRb Symp Quant Biol,2005,70:309-316.

[13] Aksoy O,Chicas A,Zeng TY, et al. The atypical E2F family member E2F7 couples the p53 and RB pathways during cellular senescence[J]. Genes Dev,2012,26(14): 1546-1557.

(收稿日期:2016-04-21 修回日期:2016-06-28)