

PP2R1A 逆转录病毒的构建及对细胞周期的影响 *

付鹤玲 李靓云 李 蕾 李建民[△]

(南京医科大学基础医学院 江苏 南京 210029)

摘要 目的:构建重组 PP2R1A 基因的逆转录病毒感染 HEK293T 细胞,观察其定位,验证表达,研究过表达 PP2R1A 对细胞生长及周期的影响。方法:逆转录病毒载体 pMIG-Flag-PP2R1A-IRES-GFP 与 Pcl10A1 瞬时共转染 293T 细胞,收集病毒感染 HEK293T 细胞,在荧光显微镜下观察定位,标记荧光单克隆。挑取不同表达强度单克隆做 western 验证 PP2R1A 蛋白表达。运用流式细胞分析、体外创伤试验及生长曲线试验研究单克隆细胞的增殖及周期。结果:获得了过表达 PP2R1A 的单克隆细胞株,PP2R1A 在细胞内广泛表达,结合 western 及细胞试验证实 PP2R1A 高表达阻滞细胞周期并减慢细胞生长。结论:PP2R1A 是丝苏氨酸蛋白磷酸酶 PP2A 的结构 A 亚基的 α 亚型,在细胞内广泛表达。本文成功构建了表达 PP2R1A 的细胞株,研究发现 PP2R1A 高表达会影响细胞生长及细胞周期,减缓了细胞增殖。为进一步深入研究 PP2R1A 对 PP2A 全酶活性及功能、细胞转化的影响奠定了重要的实验基础。

关键词 PP2R1A;单克隆;亚细胞定位;细胞周期

中图分类号:Q75 Q78 Q253 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)10-1869-04

Construction of retrovirus and the influence on cell cycle of PP2R1A*

FU He-ling, LI Liang-yun, LI Lei, LI Jian-min[△]

(School of Basic Medical Science, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, P.R.China)

ABSTRACT Objective: To construct the recombinant PP2R1A (PP2A A α subunit)-containing retrovirus, and infect HEK293T cells using the retrovirus expression system. Then investigate the intracellular location and overexpression of PP2R1A, also the effect on cell multiplication and cell cycle. **Methods:** The retrovirus plasmid pMIG-Flag-PP2R1A-IRES-GFP was co-transfected into 293T cell with Pcl10A1, the virus were collected to infect HEK293T. The intracellular location and selection of monoclonal cell lines were determined using the fluorescence microscope and the overexpression of PP2R1A was detected by western blotting. Flow cytometry, in vitro wound healing and cell growth curve assay were performed to investigate the effect on cell multiplication and cell cycle. **Results:** The PP2R1A-overexpression monoclonal cell lines were selected, and PP2R1A was widely expressed in cell. The result of western and cell biology analysis showed that overexpression of PP2R1A inhibit the cell cycle and suppress the growth of cell. **Conclusions:** PP2R1A is the structural subunit A α of PP2A which is one of the serine-threonine phosphatases family and is widely expressed in cell. Here we successfully obtained PP2R1A-overexpression monoclonal cell lines. The results showed that the overexpression of PP2R1A had influence on cell growth and cell cycle, also suppress the cell multiplication. These lay an important experimental foundation for the further study of PP2R1A and PP2A holoenzymes.

Key words: PP2R1A; Monoclonal cell line; Intracellular location; Cell cycle

Chinese Library Classification(CLC): Q75 Q78 Q253 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)10-1869-04

前言

PP2A 是丝苏氨酸蛋白磷酸酶家族的一员,广泛存在于真核生物各组织器官中,参与调控许多不同的细胞进程,对细胞生长、增殖、代谢、细胞周期有重要调控作用^[1],此前研究也发现 PP2A 在细胞致癌转化中也有重要作用^[2,3]。

PP2A 是一种异源三聚体丝苏氨酸蛋白磷酸酶,PP2A 核心酶包括一个催化 C 亚基和一个架构 A 亚基。哺乳动物中,有两种不同的基因编码 PP2A A 亚单位。AC 二聚体又募集了第三种调节 B 亚基,此前的研究证实 B 亚基决定底物特异性和

PP2A 异源三聚体的功能^[4]。每种有活性的 PP2A 复合体都包含一个结构 A 亚基(A α 或 A β),在肿瘤中都发现过这两种亚型的突变体,尽管比率较低。A α 是哺乳动物体内最主要的亚型,研究发现 A α 是作为一种单倍不足的肿瘤抑制基因,调节部分 PI3K 信号通路,进而影响肿瘤发生。与之不同的 A β 功能的缺失会导致小 GTPase RalA 活性的失控,促进肿瘤的发展^[5]。这些发现提供了证据,证明不同的 PP2A 复合体的异常调控各异的磷酸化反应,影响细胞生长、增殖、周期调控等生理活动和肿瘤的发生,A 亚单位的异常是其中重要的一种。

本研究构建了 PP2R1A(PP2AA 亚单位 α 亚型)的逆转录

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30971092)

作者简介:付鹤玲(1986-)女,硕士,主要研究方向:发育与生殖,

[△]通讯作者:李建民 电话:025-86862068, Email: jianminli@njmu.edu.cn

(收稿日期:2011-03-08 接受日期:2011-03-31)

病毒,筛选得到了多个不同程度过表达 PP2R1A 的单克隆细胞株,并通过研究发现过表达 PP2R1A 会影响细胞增殖与细胞周期,高表达的 PP2R1A 减缓阻滞了细胞生长与周期。为进一步探讨 PP2R1A 在细胞增殖、细胞周期及其他细胞生理活动中的作用,对细胞转化肿瘤发生的影响提供了实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料和设备

质粒 pMIG-Flag-PP2R1A-IRES-GFP(哈佛大学 William C. Hahn 教授赠送)、pCL10A1(Addgene 美国)、*E.coli* XLblue(南京医科大学细胞生物学系保种)、脂质体 LipofectamineTM2000(Invitrogen, 美国)、胎牛血清、DMEM 培养基(Hyclone, 美国)、Flag 抗体(Sigma, 美国)、质粒中抽试剂盒 QIAGEN Plasmid Midi Kit 250(QIAGEN, 德国)、蛋白电泳仪、蛋白转膜仪(BIO-RAD 公司, 美国)、冷冻高速离心机(Effendorf, 美国)、Elx800 型紫外分光光度计(Bio-Tek 公司, 美国)、荧光显微镜(Olympus, 日本)。

1.2 质粒准备

pMIG-Flag-PP2R1A-IRES-GFP 转化 XLblue 感受态细菌,挑单克隆摇菌 25 ml,用 QIAGEN 中抽试剂盒抽提质粒,并测浓度及纯度。

1.3 293T 细胞、HEKTER 细胞的培养及准备

293T 细胞及 HEKTER 细胞均用含有 10%胎牛血清、1%1 M HEPES、1%抗生素的 DMEM 完全培养液培养,在含 5% CO₂ 的 37 度细胞培养箱中培养。

转染前一天,293T 细胞以 180 万/皿铺板至 60mm 细胞培养皿,加 4 ml 含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养液培养,至转染当天汇合度达到 90%以上。

感染前一天,HEKTER 细胞以 10 万/皿铺板至 60 mm 细胞培养皿,用含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养液培养,至感染当天汇合度达到 10%。

1.4 逆转录病毒的制备及感染

无菌 EP 管中加入无抗无血清 OptiMEM 培养液 500 μ l、20 μ l Lipofectamine2000,混匀室温孵育 5 min,另取 EP 管加入 OptiMEM 培养液 500 μ l pMIG-Flag-PP2R1A-IRES-GFP 4 μ g、pCL10A1 4 μ g 混匀。两管溶液混匀后室温孵育 20 min 轻柔加入 293T 细胞培养皿中。同时转染 pMIG-con、Pcl10A1 做为对照组。培养 8 小时后,换液 4 ml 含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养液。24 h 后荧光显微镜下观察转染效率,换 4 mlDMEM 完全培养液。

转染 48 h 及 72 h 后收分别收两次病毒悬液,加入 1 μ l/ml polybrene(10 mg/ml pH 7.2)和 10 μ l/ml 1 M HEPES(pH 7.5),混匀后用 0.22 μ m 滤膜过滤,感染 HEKTER 细胞。感染 8 小时后弃病毒悬液,换 4 ml 新 DMEM 完全培养液。48 h 后在荧光显微镜下观察感染效率。

1.5 PP2R1A 在 HEKTER 细胞中的定位

稳定表达 PP2R1A 的 HEKTER 细胞以 0.8 \times 10⁵/孔的密度接种于放有盖玻片的 6 孔板中,培养 24 h 后,用倒置荧光显微镜观察荧光融合蛋白在 HEK TER 细胞的表达定位。

1.6 挑单克隆

感染 48 h 后的 HEKTER 细胞,以 100 个/皿的密度铺板至 100 mm 细胞培养皿中,加入 8 mlDMEM 完全培养液,充分吹打均匀后培养。一周后在荧光显微镜下观察,标记全部细胞都有绿色荧光的单克隆。弃培养液并用 PBS 漂洗后,加入胰酶短时间消化,用移液器吸少量胰酶集中吹打消化标记的单克隆,消化下的细胞转移至 30 mm 细胞培养皿中,加入 2 mlDMEM 完全培养液培养,细胞汇合度达 80%后分别传代并冻存。

1.7 Western-Blot 检测单克隆细胞 PP2R1A 过表达水平

各单克隆细胞株分别接种于 60 mm 培养皿中,培养至 90%以上汇合度后消化收细胞,加入蛋白裂解液提取细胞总蛋白。取 100 μ g 蛋白样品依分子克隆标准方法进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,用 Flag 抗体进行 Western-Blot 分析。

1.8 细胞周期实验

HEKTER 细胞(pMIG、pMIG-PP2R1A)消化计数后,以 100,000 个细胞/孔铺六孔板,加入 4 mlDMEM 完全培养液培养。6 h 细胞完全贴壁后,换含 0.5%胎牛血清的培养液培养,12-18 h 后换回含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养液。培养 72 h 后,细胞汇合度达到 90%,消化收细胞做流式,分析细胞周期。

1.9 细胞生长速率测定——体外创伤愈合实验

HEKTER 细胞(pMIG、pMIG-PP2R1A)消化计数后,以 100,000 个细胞/孔铺六孔板,加入 4 mlDMEM 完全培养液培养。6 h 细胞完全贴壁后,换含 0.5%胎牛血清的培养液培养,12-18 h 后换回含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养液。细胞汇合度达到 90%时,划线,用无血清培养液冲洗划线处。以 12 h 间隔拍照,对比观察细胞迁移速率。

1.10 生长曲线实验

HEKTER 细胞(pMIG、pMIG-PP2R1A)消化计数后,以 15,000 个细胞/孔铺 24 孔板,加入 1 mlDMEM 完全培养液培养 5 d。每天取一组(3 个平行孔)细胞,消化后计数。取日平均数绘制细胞生长曲线,同时计算对数生长期的细胞倍增时间。

2 结果

2.1 PP2R1A 在细胞内定位

前期研究中,瞬时转染 PP2R1A 发现它在细胞内弥散分布,胞浆和胞核中均有分布。为进一步研究并确认 PP2R1A 蛋白在细胞中的确切定位,我们构建包装了逆转录病毒 pMIG-Flag-IRES-GFP-PP2R1A,感染 HEKTER 细胞,同时感染 pMIG-GFP 做对照。在荧光显微镜下观察(图 1),并进行单克隆或多克隆的筛选。绿色荧光蛋白显示,PP2R1A 在 HEKTER 细胞中弥散性表达,核表达强度较高。同时,我们依据荧光显微镜下细胞荧光的强度,挑取了 10 株荧光强弱不同的 pMIG-PP2R1A 单克隆细胞株。10 株单克隆细胞株中 PP2R1A 过表达效率不同,但定位相同,都在细胞内广泛表达。

2.2 Western-Blot 验证 PP2R1A 表达

为了验证 PP2R1A 的表达及各单克隆细胞株的表达强度,我们挑选了 HEKTER pMIG-con、pMIG-Flag-PP2R1A-IRES-GFP 的多克隆和单克隆细胞株,根据荧光强弱不同,挑取了 HEKTER pMIG-Flag-PP2R1A-IRES-GFP 2# 和 6# 单克隆。对挑取的细胞株进行免疫印记分析,结果显示我们已经成功筛选得到了稳定表达 pMIG-con 和 pMIG-Flag-PP2R1A-IRES-GFP 的 HEK-

TER 细胞株(图 2)。同时结果也显示, PP2R1A 2# 单克隆细胞株中 PP2R1A 的表达较强, 6# 克隆表达较弱, 这与荧光强度观察结果相符(图 2)。在后续试验中, 我们主要应用这两个细胞株进行试验, 比较 PP2R1A 过表达效率对细胞生长和细胞周期的影响。

2.3 PP2R1A 过表达对细胞周期的影响

pMIG-PP2R1A 单克隆细胞株经血清饥饿达到细胞同步化后, 收细胞用流式细胞仪测定了不同组 HEKTER 细胞株的细胞周期。结果发现高表达 PP2R1A 的细胞株(HEKTER pMIG-PP2R1A-2)G1 和 G2 期的细胞数量增多, S 期的细胞数目减少(表 1)。表明 PP2R1A 表达量的增高, 影响到了 HEKTER 细胞周期的进程, 抑制了 HEKTER 细胞的分裂增殖。

2.4 PP2R1A 过表达细胞株体外迁移能力减慢

为量化 PP2R1A 蛋白对细胞生长和细胞周期的影响, 我们用获得的稳定细胞株, 对细胞活性进行测定。在血清饥饿 12 h 后, HEKTER(pMIG-PP2R1A) 细胞及对对照组细胞(pMIG-con) 同步化生长时进行划线, 并在划线后以 12 h 间隔进行观察并拍照。发现恢复 10% 血清正常培养液后, 与对照组相比, PP2R1A 过表达使细胞迁移速度减慢(图 3)。高表达 PP2R1A 的 2# 单克隆迁移速度最慢, 而表达强度较弱的 6# 克隆, 其细胞迁移速度相对较快。说明 PP2R1A 的过表达对细胞的增殖有一定的抑制作用, 同时这种抑制与 PP2R1A 的剂量有关。表达量低时, PP2R1A 对细胞增殖的抑制效果不明显。由于人工造成损伤的力度有不同, 划痕的初始距离也有区别, 为量化实验结果, 我们还测量了 24 h 的划痕愈合情况, 并计算了细胞迁移速率。结果表明高过表达 PP2R1A 的细胞迁移速率为对照组的 71%。

2.5 PP2R1A 过表达细胞株细胞增殖速率减慢

为进一步验证 PP2R1A 蛋白以及表达量差异对 HEKTER 细胞的细胞增殖速率的影响, 我们采用 24 孔板细胞计数法连续测定 5 天, 记录 HEKTER(pMIG-PP2R1A) 单细胞株及其对照组细胞 HEKTER(pMIG-con) 的生长情况, 以细胞数为纵坐标, 生长时间为横坐标作图, 绘制生长曲线。生长曲线显示, PP2R1A 表达量不同的细胞对细胞增殖速率的影响不同, 高表达 PP2R1A 的单克隆其细胞增殖速率下降, 而表达较弱的单克隆其细胞增殖速率相对对照组没有明显变化(图 4)。推测是因为 PP2R1A 参与多种不同信号通路, 它的强弱对下游通路有不同的调控作用, 譬如先前研究中有人提出 PP2R1A 主要通过单倍剂量不足调节 PI3K 信号通路进而影响肿瘤发育进程。

3 讨论

PP2A 是真核生物一种主要的丝/苏氨酸蛋白磷酸酶, 通过可逆性的磷酸化使已磷酸化激活的转录因子和蛋白激酶磷酸化, 在细胞代谢、DNA 复制、基因转录、细胞周期调控、细胞分化、凋亡、癌基因转化等细胞活动中起着重要作用^[6,7]。A 亚单位是 PP2A 的结构亚基, 在哺乳动物中具有 α 和 β 两种亚型, 由两个不同的基因编码, 具有 86% 的同源性, 在哺乳动物中多以 A α 形式存在^[8]。作为连接催化亚基和不同种调控亚基的结构亚基, 研究单独的 A 亚基对研究 PP2A 的功能有着重要意义。人体细胞内 PP2A A α 一个等位基因的突变就可能引起

细胞的肿瘤化转变, 在人类神经胶质瘤和乳腺癌细胞 MCF-7 中都曾发现 PP2A A α 表达量的下降^[9,10]。PP2A A α 在 PP2A 核心酶的稳定以及与 B 亚基的结合中都发挥重要作用, PP2A A α 的过表达可以稳定 B55 α , B56 ϵ 和 C α 亚基^[11], 因此研究 PP2A A α 的功能有格外重要的意义。

HEK TER 293 细胞是哈佛大学 Hahn 等改造的一种表达 SV40 大 T 抗原、人端粒末端转移酶催化亚基 hTERT 和活化 Ras 基因的人类胚胎肾细胞^[12], 改造后的 HEK TER 293 是一种永生化的, 但未肿瘤化的细胞, 当添加会引起 PP2A 全酶功能下降的小 T 抗原时, 引起细胞增殖速度提高^[13,14], 以 HEK TER 细胞作为细胞模型可以很好的研究 PP2R1A 蛋白在细胞增殖和周期等方面的功能。

在本研究中, 我们用 PP2R1A 的逆转录病毒感染 HEKTER 细胞获得稳定过表达单克隆细胞株, 验证了 PP2R1A 的细胞内的广泛分布性和主要地位, 并发现了随剂量变化的 PP2R1A 对细胞增殖和细胞周期的影响, 过表达量较低的单克隆细胞株对细胞生理活动调控影响较小, 表达量高时则显著影响细胞增殖、周期等生理活动, 表现出一定的剂量依赖效应。这一研究, 为深入了解 PP2A A α 在 PP2A 全酶中的地位, 对细胞生理活动的影响, 以及在相关疾病中的作用提供了重要工具。

4 结论

本研究成功包装了 PP2R1A 的逆转录病毒并感染 HEKTER 细胞, 最终得到了多个不同强度过表达 PP2R1A 的单克隆细胞株。研究发现 PP2R1A 在细胞内广泛表达, 参与调控细胞生长、增殖、细胞周期等生理活动。过表达 PP2R1A 的单克隆细胞株, 随 PP2R1A 表达量的升高, 细胞的生长增殖速度减慢, 细胞周期受到抑制。

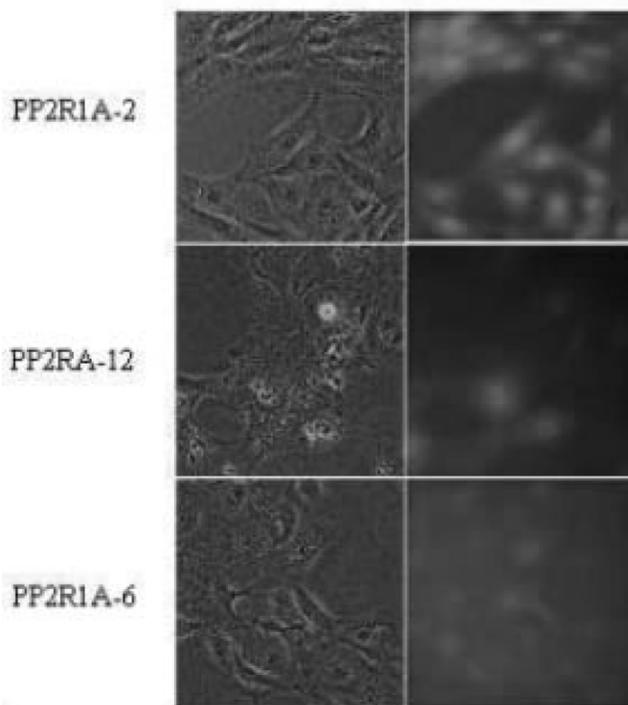


图 1 稳定过表达 PP2R1A 的 3 个单克隆的荧光定位照片(200x)

Fig.1 Sublocation of PP2R1A in three HEKTER monoclonal cell lines using fluorescence microscope (200x)

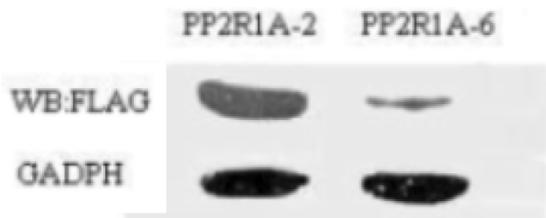


图2 稳定过表达 PP2R1A 的 2 个单克隆的 western blotting

Fig.2 Western blotting of two PP2R1A-overexpression-monoclonal cell lines

表 1 流式细胞术检测过表达 PP2R1A 对 HEKTER 细胞周期的影响

Table 1 The effect of PP2R1A overexpression on cell cycle measured by FCM

Group	apoptosis (%)	G1 phase (%)	G2 phase (%)	S phase (%)
pMIG	3.77± 0.29	59.38± 1.87	16.02± 2.60	22.21± 0.73
pMIG-PP2R1A	3.22± 0.45	68.32± 1.03	25.38± 0.54	17.00± 0.86

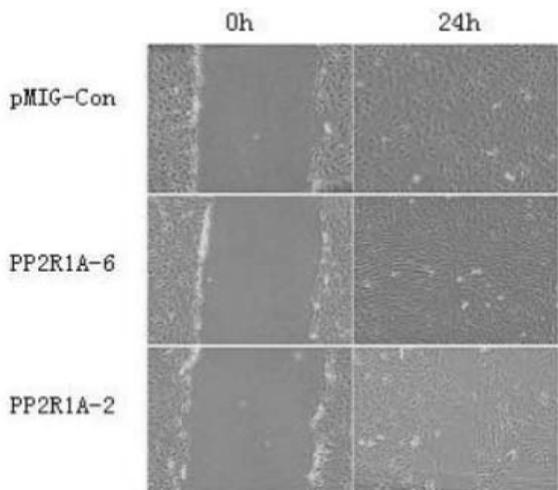


图3 pMIG 对照及过表达 PP2R1A 的两个单克隆细胞的体外创伤愈合实验(100x)

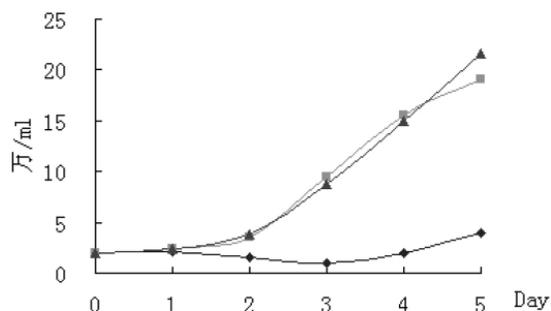
Fig.3 In vitro wound-healing experiment of pMIG-con and two PP2R1A-overexpression- monoclonal cell lines(100x)

参考文献(References)

[1] Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling [J]. Biochem J,2001,353:417-439

[2] Pieter J.A. Eichhorn, Menno P. Creyghton. René Bernards. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer [J]. Biochimica et Biophysica Acta,2009,1795(1):1-15

[3] Chen W, Possemato R, Campbell KT, et al. Identification of specific PP2A complexes involved in human cell transformation [J]. Cancer



—◆— PP2R1A-2 —■— PP2R1A-6 —▲— pMIG-con

图4 pMIG-con 及两个过表达 PP2R1A 单克隆细胞株的细胞生长曲线 ** 表示差异极其显著 P<0.01

Fig.4 The cell growth curve of pMIG-con and two PP2R1A-overexpression-monoclonal cell lines

Cell, 2004,5:127-136

[4] Xu Y, Xing Y, Chen Y, et al. Structure of the Protein Phosphatase 2A Holoenzyme Cell [J]. Cell,2006,127(6):1239-1251

[5] Sablina AA, Hahn WC.The role of PP2A A subunits in tumor suppression [J].Cell Adh Migr,2007,1(3):140-141

[6] Xing Y, Li Z, Chen Y, et al. Structural mechanism of demethylation and inactivation of protein phosphatase 2A [J]. Cell, 2008, 133 (1): 154-163

[7] Cho,U.S., W.Xu. Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme[J]. Nature, 2007, 445(7123): 53-57

[8] Zhou J, Pham HT, Ruediger R, et al. Characterization of the Aalpha and Abeta subunit isoforms of protein phosphatase 2A: differences in expression, subunit interaction, and evolution [J]. Biochem.J, 2003, 369:387-398

[9] Colella S, Ohgaki H, Ruediger R, et al. Reduced expression of the Aa subunit of protein phosphatase 2A in human gliomas in the absence of mutations in the Aa and Aβ subunit genes [J]. Int J Cancer, 2001,93: 798-804

[10] Suzuki K, Takahashi K. Reduced expression of the regulatory A subunit of serine/threonine protein phosphatase 2A in human breast cancer MCF-7 cells [J]. Int J Oncol, 2003,23:1263-1268

[11] Chen W, Arroyo JD, Timmons JC, et al.Cancer-associated PP2A Aalpha subunits induce functional haploinsufficiency and tumorigenicity [J].Cancer Res, 2005, 65(18): 8183-8192

[12] Arroyo J D, Hahn W C. Involvement of PP2A in viral and cellular transformation[J]. Oncogene,2005,24(52): 7746-7755

[13] Hahn W.C, Dessain S.K, Brooks M.W, et al. Enumeration of the Simian Virus 40 Early Region Elements Necessary for Human Cell Transformation [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(7): 2111-2123

[14] Hahn W.C, Sablina A.A. SV40 small T antigen and PP2A phosphatase in cell transformation [J]. Cancer Metastasis Rev, 2008, 27: 137-146