

p150Sal2 在人卵巢癌细胞株中促进 MX1 基因的表达 *

施丽丹 蔺 剑 李大伟[△]

(上海交通大学药学院微生物与生化药学系 上海 200240)

摘要 目的:研究 p150Sal2 在人卵巢癌细胞株中对 MX1 基因表达的影响。方法:将 MX1 基因的启动子克隆至带有 Luciferase 报告基因的 pGL3-basic 载体中,将其与 p150Sal2 表达载体用 PEI 介导的转染方法共转染至卵巢癌细胞株 SKOV3,用双荧光素酶检测系统检测 MX1 启动子活性变化,将 p150Sal2 表达载体转染至卵巢癌细胞株 ES-2,用 western blot 检测细胞中 MX1 基因的表达变化。结果:双荧光素酶检测系统检测 MX1 启动子活性被 p150Sal2 上调,western blot 检测转染 p150Sal2 后细胞中 MX1 表达量增加。结论:p150Sal2 在人卵巢癌细胞株中促进 MX1 基因的表达。
关键词: 卵巢癌细胞株;同源异型转录因子 p150Sal2;MX1 基因
中图分类号: R737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2011)17-3216-03

Induction of MX1 Expression by p150Sal2 in Human Ovarian Cancer Cell Line*

SHI Li-dan, LIN Jian, LI Da-wei[△]

(Department of Microbiology and Biochemical Pharmacy, School of Pharmacy, Shanghaijiaotong University, Shanghai 200240, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of p150Sal2 on MX1 gene expression of human ovarian cancer cell line. **Methods:** Promoter of MX1 gene was cloned into pGL3-basic with luciferase reporter gene, and co-transfected with p150Sal2 expression plasmid into SKOV3 cell line. The promoter activity was detected by using dual-luciferase reporter gene detection method. The MX1 expression in ES-2 cells was assayed after transfection with p150Sal2 expression plasmid by western blot. **Results:** The activity of MX1 promoter was up-regulated by p150Sal2 in SKOV3 cell line, and the western blot result showed increased expression of MX1 gene of ES-2 cell line transfected with p150Sal2 expression plasmid. **Conclusions:** MX1 expression was induced by p150Sal2 in human ovarian cancer cell line.
Key words: Ovarian cancer cell line; homeotic transcription factor p150Sal2; MX1 gene
Chinese Library Classification (CLC): R735.3 **Document code:** A
Article ID: 1673-6273(2011)17-3216-03

前言

MX1 基因首先是在小鼠中发现的。1962 年 Lindenmann 等在研究近交系 A2G 小鼠对流感病毒具有天然免疫力这一现象时,发现这现象与一种 GTPase 结合蛋白,在哺乳动物鸟类、鱼类中高度保守,均受干扰素的诱导表达,主要对 RNA 病毒敏感,具有抗流感病毒功能,并命名为 MX1^[1]。通过对人 MX1 基因^[2]编码的 MX1 蛋白的抗原相关性,诱导条件,理化性质和氨基酸分析确定 MX1 蛋白具有与鼠 MX1 蛋白相似的功能,同属于发动蛋白家族和大 GTP 酶家族。MX1 基因第一个外显子和外显子 4A 之间有很长一段序列,并且转录出两个转录子,但编码的是同一个蛋白,因此,我们分别克隆这两个转录子的启动子进行研究(图 1)。
同源异型转录因子 p150Sal2 是与发育相关的 SALL 蛋白家族中的一员,能够与多瘤病毒大 T 抗原结合,并促进 p21 表达,抑制细胞生长^[3]。p150Sal2 基因第一个外显子有两种形式,因此 p150Sal2 蛋白有两种亚型(图 2)。

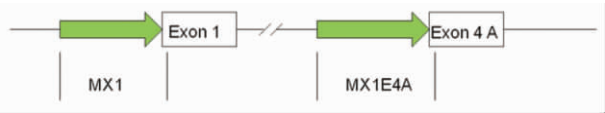


图 1 MX1 两个启动子示意图
Fig.1 Schematic diagram of the two MX1 promoters

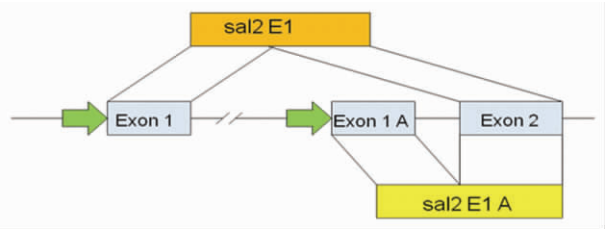


图 2 p150Sal2 两个亚型示意图
Fig.2 p150Sal2 diagram of the two isoforms

1 材料与方法

1.1 材料与细胞株

* 基金项目 国家自然科学基金资助项目(NO. 30771212)
作者简介 施丽丹 (1986-) 女, 硕士研究生
[△]通讯作者 李大伟 daweili@sjtu.edu.cn
(收稿日期: 2011-03-21 接受日期:2011-04-15)

卵巢癌细胞株 SKOV3 是本实验室保存细胞 p150Sal2 表达质粒由李大伟教授构建；兔抗 MX1 抗体购自 Abcam 公司；鼠抗 tublin 购自 Santa cruz 公司；羊抗鼠 / 羊抗兔二抗购自

Santa cruz 公司 ,PCR 引物由上海生工合成 ,DMEM 培养基购自 GIBCO 公司 ,新生牛血清购自 biowest 公司 ,双荧光素酶报告基因检测系统的检测试剂盒购自 Promega 公司。

表 1 启动子 MX1/MX1E4A 巢式 PCR 引物序列
Table 1 Primers of promoter MX1/MX1E4A for nest-PCR

Genes	Size(bp)	Sequence
MX1	2221	F1: GATCATGTGTGTAATGCCTAGCAC
		R1: GTGGAGCCTGACCTTGTGGCACTG
		F2: CTGGACTTCCAGCTTCTGGAATGAGC
		R2: GGCACAGCGTGGTTCGGTGCTTCTG
MX1E4A	2115	F1: CATGAGTGCCAGCTCTGCTCAC
		R1: GTCCCTGCGCAGTGCTGGAGTG
		F2: GCACTGTTCTCTGCTTCAGAAAGCATC
		R2: CTCCGCTCTCGTTTCGCCTCTTTTTCAC

Note F: Forward R: Rverse

1.2 方法

1.2.1 构建重组质粒载体 我们以 U2OS 细胞的基因组 DNA 为模板 ,利用巢式 PCR 的方法获得 MX1、MX1E4A 的启动子。设计引物如下：

将 PCR 获得的目的片段 ,将片段磷酸化后 ,用连接酶和内切酶同时作用的连接体系将其连入载体内。我们用的载体是 pGL3-basic ,上面有改造的 Pme 酶切位点。当目的片段插入载体后 ,Pme 酶切位点会被破坏。使用连接酶和内切酶同时作用的连接体系可以减少载体的自连，避免空载体的产生 ,提高连接效率。将连接体转化大肠杆菌 DH5α 酶切鉴定并进行测序鉴定 ,获得重组质粒 ,命名为 MX1-Luc 和 MX1E4A-Luc。

1.2.2 细胞培养

卵巢癌细胞株 SKOV3、ES-2 用含有 10%新生牛血清，100U/ml 链霉素和青霉素的 DMEM 培养培养，置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中 ,至对数生长期进行实验。

1.2.3 细胞转染

将一个约 90%满的大皿细胞全部铺于一个 24 孔板，待细胞贴壁 ,用 PEI (polyetheneimine, 聚乙烯基亚胺) 转染质粒表达载体到 SKOV3 细胞，实验组为 MX1-Luc/MX1E4A 与 p150Sal2E1 或者与 p150Sal2E1A 共转染，对照组为 MX1-Luc/MX1E4A 分别与空载体 pcDNA3 共转染。1μg 的 DNA 和 3μg PEI 分别稀释在 50μl 的无血清培养基中混匀，将两者混合孵育 10min 后以形成 DNA-PEI 复合物，并加入 400μl 无血清培养基 ,将该 500μl 转染液加入每孔(已移去培养基) ,置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中 ,于 6 h 后移去转染液 ,换入新的含有 0.1%新生牛血清的培养液，培养 48 h 使细胞生长状态同步化 ,移去原培养液 ,用含有 10%新生牛血清的培养液培养 20 h 裂解细胞 ,检测。

1.2.4 双荧光素酶检测系统

移去 24 孔板孔中培养液 ,用 1 × PBS 洗涤细胞两次。尽量将 PBS 除去。用 1 × passive lysis buffer 裂解细胞 ,100 μl /

孔。来回晃动培养板 ,使裂解液覆盖到孔的整个表面。将加了裂解液的培养板置于摇床上 ,室温裂解 15 min。取 20 μl 细胞裂解液到白底的 96 孔检测板。配 1 × Luciferase Assay Reagent II，即萤火虫荧光素酶的底物 (luciferin)；配 1 × Stop & Glo Reagent，即荧光淬灭试剂和海肾荧光素酶底物(coelenterazine) ,将他们置于多功能酶标仪 ,由仪器自动加样至 96 孔检测板中。萤火虫荧光素酶催化 luciferin 所发荧光的检测波长为 560 nm，海肾荧光素酶催化 coelenterazine 所发荧光的检测波长为 465 nm。

1.2.5 Western blot

p150Sal2 以及空载体 pcDNA3 转染 ES-2 细胞，并以绿荧光蛋白 EGFP 作为内参 ,用于表征转染效率 ,EGFP 的比例为十分之一。转染 4-6 h 后换成低血清培养基(0.1 % 新生牛血清)培养 48 h ,使得实验组和对照组的细胞生长状态同步化 ,再换成高血清培养基(10 % 新生牛血清)培养 20 h。用荧光显微镜拍照 ,在确保一定的转染效率的情况下 ,裂解细胞提取蛋白。

用 10 % SDS-PAGE 琼脂糖凝胶分离蛋白，恒压 80 V ,电泳 2 h ,使蛋白分开。将蛋白电转移至醋酸纤维素膜上。p16 转膜条件 :400 mA ,45min p150 转膜条件 :300 mA ,25min。将蛋白转至 NC 膜后 ,用 5 % 牛奶室温封闭 1 h。一抗室温杂交 2 h，1 × TNE'T 洗 3 × 10 min。一抗稀释倍数 p16 抗体 1:500 p150 抗体 1:1000 tublin 1:2000。二抗室温杂交 1 h ,1 × TNE'T 洗 3 × 10 min。曝光显影扫描结果。

2 结果

2.1 p150Sal2 对 MX1 启动子活性的调节

实验组和对照组的细胞收集裂解进行双荧光素酶活性检测 ,结果显示 p150Sal2 的两个亚型 E1、E1A 对 MX1 启动子的活性都有增强作用 ,p150Sal2 E1A 对 MX1E4A 启动子的活性也有增强作用 ,但是 p150Sal2 E1 对 MX1E4A 启动子的活性没有明显作用(图 3)。提示 p150Sal2 会促进 MX1 基因的启动子

活性,但是不同的 sal2 亚型对 MX1 基因的不同启动子的活性调节作用会不一样。

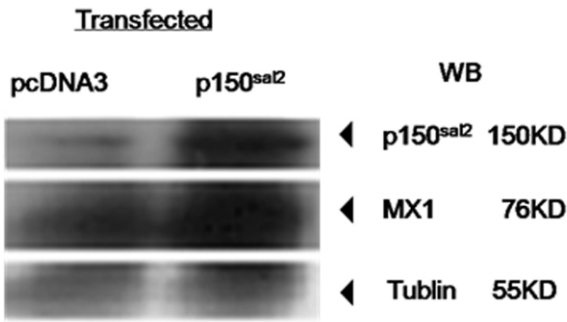


图 3 p150Sal2 对 MX1 启动子活性的调节
Fig.3 The regulation of p150Sal2 to MX1 promoters activities

2.2 p150Sal2 在 ES-2 细胞内促进 MX1 表达

转染 p150Sal2 和 pcDNA3 的两组 ES-2 细胞收集细胞提取蛋白进行 western blot 检测,结果显示转染 p150Sal2 细胞内的 MX1 蛋白量明显增多,而对照组的 MX1 量比较少,提示 p150Sal2 在卵巢癌细胞株 ES-2 中会促进 MX1 的表达(图 4)。

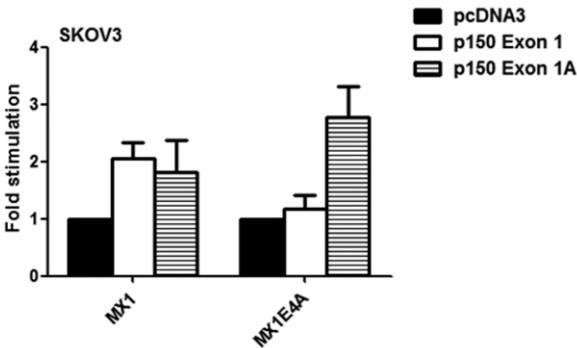


图 4 MX1 在 ES-2 细胞中表达情况(Western blot)
Fig.4 MX1 expression in the ES-2 cell line (Western blot)

3 讨论

同源异型转录因子 p150Sal2 是与发育相关的 SALL 蛋白家族中的一员,其在卵巢癌细胞系(SKOV3)中表达比正常卵巢上皮细胞系(HOSE)中低,能够与多瘤病毒大 T 抗原结合,并促进 p21 表达,抑制细胞生长^[3]。多瘤病毒的大 T 抗原像其

他 DNA 肿瘤病毒的癌基因蛋白一样,具有灭活抑癌基因的功能。p150Sal2 作为一个抑癌基因^[4],可能是通过与大 T 抗原结合使之不能灭活抑癌基因,使得抑癌基因得以正常表达而具有抑癌作用。

MX1 蛋白是发动蛋白这类 GTP 酶蛋白超家族的成员,同时还是抗病毒性先天性免疫的重要组成部分^[5-7]。体内外试验研究表明,MX 基因受 I 型干扰素^[8]、双链 RNA 的诱导^[9]或病毒感染的情况下被激活,表达 MX 蛋白发挥 GTP 酶活性,水解病毒核衣壳,抑制病毒复制,以抵抗病毒对细胞的感染^[10]。

目前对于 p150Sal2 和 MX1 的研究都不是很透彻,我们这次的研究发现在卵巢癌细胞系中 p150Sal2 会促进 MX1 的表达,并且 p150Sal2 的两种亚型对 MX1 的两个转录本的启动子调控不一样。p150Sal2 上调 MX1 对细胞生长的影响还有待进一步研究。但这个事实为我们阐明 p150Sal2 的抑癌作用机制及 MX1 与肿瘤之间的关系提供了线索。

参考文献(References)

[1] van der Blik, A.M., Functional diversity in the dynamin family. Trends Cell Biol, 1999, 9(3): 96-102

[2] Haller, O., P. Staeheli, and G. Kochs, Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense, Biochimie, 2007, 89(6-7): 812-8

[3] Li, D., et al., p150 (Sal2) is a p53-independent regulator of p21 (WAF1/CIP). Mol Cell Biol, 2004, 24(9): 3885-93

[4] Liu, H., et al., A transcriptional program mediating entry into cellular quiescence. PLoS Genet, 2007, 3(6): e91

[5] Haller, O. and G. Kochs, Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. Traffic, 2002, 3(10):710-7

[6] Assiri, A.M. and T.L. Ott, Cloning and characterizing of the ovine MX1 gene promoter/enhancer region. Dev Comp Immunol, 2007, 31 (8): 847-57

[7] Baise, E., et al., Conditional expression of type I interferon-induced bovine Mx1 GTPase in a stable transgenic vero cell line interferes with replication of vesicular stomatitis virus. J Interferon Cytokine Res, 2004, 24(9): 513-21

[8] Samuel, C.E., Antiviral actions of interferons. Clin Microbiol Rev, 2001, 14(4): 778-809

[9] Mundt, E., Human MxA protein confers resistance to double-stranded RNA viruses of two virus families. J Gen Virol, 2007, 88 (Pt 4): 1319-23

[10] Lee, S.H. and S.M. Vidal, Functional diversity of Mx proteins: variations on a theme of host resistance to infection. Genome Res, 2002, 12(4):527-30