

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.12.001

• 基础研究 •

Bub1 基因对人肝癌 MHCC97-H 细胞增殖、周期和凋亡的影响 *

蒲 猛 汪建林 黄启科 赵 戈 夏聪聪 何大立 杨 针 陶开山[△]

(第四军医大学西京医院肝胆胰脾外科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究 Bub1 基因在肝癌中的表达以及对肝癌细胞系 MHCC97-H 增殖、周期和凋亡的影响。**方法:**利用 RNA 干扰技术下调肝癌细胞系 MHCC97-H 中 Bub1 的表达;qRT-PCR 和 Western Blot 分别检测 Bub1 在 mRNA 和蛋白水平表达的变化;CCK-8 实验检测肿瘤细胞增殖能力的改变;流式细胞术检测细胞周期和凋亡的变化。**结果:**qRT-PCR 和 Western Blot 结果显示 si-Bub1 能够成功下调 Bub1 的表达;下调 Bub1 后肝癌 MHCC97-H 细胞的增殖能力下降($P<0.05$),细胞的凋亡比例升高($P<0.05$),细胞发生 S 期阻滞。**结论:**Bub1 基因在肝癌中高表达,下调 Bub1 的表达后能够降低肝癌细胞的增殖能力,促进细胞凋亡,诱导细胞发生 S 期阻滞。

关键词:肝癌;Bub1;增殖;细胞周期;细胞凋亡

中图分类号:R-33; R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)12-2201-04

Influence of Bub1 Gene on the Cell Proliferation, Cell Cycle and Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line MHCC97-H*

PU Meng, WANG Jian-lin, HUANG Qi-ke, ZHAO Ge, XIA Cong-cong, HE Da-li, YANG Zhen, TAO Kai-shan[△]

(Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To study the expression of Bub1 in hepatocellular carcinoma (HCC) and its effect on the cell proliferation, cell cycle and apoptosis in hepatocellular carcinoma cell line MHCC97-H. **Methods:** Bub1 was down-regulated by small interfering RNA (siRNA) in MHCC97-H. qRT-PCR and Western blot were used to determine the expression of mRNA and protein. CCK-8 assay was performed to evaluate the proliferation ability. Apoptosis and cell cycles were determined by flow cytometry. **Results:** qRT-PCR and Western blot showed that si-Bub1 group displayed a low expression of Bub1. Down-regulated of Bub1 by siRNA significantly inhibited the cell proliferation ($P<0.05$), Cell cycle had changed and increased the cell apoptosis rates ($P<0.05$). **Conclusion:** Bub1 was highly expressed in hepatocellular carcinoma and down-regulating the expression of Bub1 could reduce the proliferation of hepatocellular carcinoma cells and affect the cell cycle and apoptosis of HCC.

Key words: Hepatocellular carcinoma; Bub1; Proliferation; Cell cycle; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)12-2201-04

前言

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球常见的恶性肿瘤^[1]。发展迅速,易转移和高复发是肝癌死亡率居高不下的主要原因^[2]。因此,探索与肝癌发生发展相关的新靶点对肝癌的诊疗具有重要的意义。肿瘤细胞周期失调后,主要表现为不受调控的异常增殖和基因组的不稳定性^[3]。细胞周期是由多种激酶在不同时相发挥功能来调控的,包括周期素依赖的激酶(CDKs)、Polo 样激酶(PLK)、Bub 蛋白和 BubR1 等^[4]。研究显示 Bub1 是一种有丝分裂检查点蛋白质,其在乳腺癌、前列腺癌和胶质瘤等肿瘤中高表达^[5-8],并且与临床不良预后密切相关^[9,10],可能参与肿瘤的异常细胞周期和增殖过程中^[11,12]。目前,Bub1 在肝癌中表达情况以及在肝癌发生发展中所扮演的角色尚不

清楚。因此,本研究拟探讨 Bub1 在肝癌中的表达情况及干预 Bub1 后对肝癌细胞增殖、周期及凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞系 MHCC97-H 购自中国科学院上海细胞库,DMEM 培养液 (Hyclone 公司),胎牛血清 (Gibco 公司);Bub1-siRNA 及 negative control (上海吉玛公司);Lipofectamine 2000 转染试剂 (Invitrogen 公司);Bub1 引物 (上海生工公司);RNAiso 试剂 (大连 Takara 公司);反转录试剂盒及 SYBR Premix Ex Taq TM II(大连 Takara 公司);CCK-8 检测试剂盒(南京恩晶生物公司);细胞周期快速检测试剂盒(北京达科为公司);FITC-Annexin V 凋亡检测试剂盒(Biolegend);Millipore ECL 发

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81670593;81272648)

作者简介:蒲猛(1991-),博士研究生,主要从事肝癌相关研究,E-mail: pmpocy91@163.com

[△] 通讯作者:陶开山,博士生导师,教授,主任医师,主要从事肝脏损伤与再生、肝移植等方面研究,E-mail: taokaishan0686@163.com

(收稿日期:2016-10-10 接受日期:2016-11-05)

光液(Millipore 公司);流式细胞仪(Beckman FC-500);Real-time PCR 和化学显像仪均为 Bio-rad 公司产品;全自动酶标仪(EPOCH)。

1.2 实验方法

1.2.1 数据库中 Bub1 在肝癌中的表达情况 通过利用网上数据库(MERAV)^[13]检索 Bub1 基因在肝癌组织、正常组织和肝癌细胞系中的表达情况,然后下载标准化后的数据资料,利用 GraphPad Prism5 进行数据整理。

1.2.2 细胞培养及转染 人肝癌细胞系 MHCC97-H 细胞使用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞状态良好后,采用指数生长期的细胞进行转染,具体操作按 Lipofectamine 2000 说明书进行。细胞转染 24 h 后,收集细胞进行后续实验。

1.2.3 qRT-PCR 法检测 Bub1 基因的表达 采用 RNAiso 试剂按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA。参照反转录试剂盒操作说明将提取的 RNA 反转录成 cDNA,qPCR 法检测 Bub1 的表达,以 β -actin 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对定量分析。qPCR 的反应条件如下:95℃ 10 s,59℃ 30 s,72℃ 30 s,40 个循环。引物序列,Bub1 上游引物:5'-AGCCCA-GACAGTAACAGACTC-3';下游引物:5'-GTTGGCAACCT-TATGTGTTTCAC-3'; β -actin 上游引物:5'-CATGTACGTTGC-TATCCAGGC-3';下游引物:5'-CTCCTTAATGTCACGCAC-GAT-3'。

1.2.4 Western Blot 检测 Bub1 基因的表达 细胞转染后继续培养 48 h 后收集各组细胞,用加入蛋白酶抑制剂(PMSF 碧云天公司)的细胞裂解液(RIPA 碧云天公司)裂解细胞,振荡,离心后提取总蛋白,保存于 -80℃。BCA 法(北京索莱宝公司)测蛋白浓度。蛋白上样量为 30 μ g,经过 SDS-PAGE 凝胶电泳恒压分离后,恒流转至 PVDF 膜,5% BSA 摇床室温封闭 1 h 后,于 4℃冰箱孵育一抗过夜。Bub1 一抗(1:1000,Abcam)、 β -actin 一抗(1:3000,Abcam)。次日,TBST 洗 3 次,每次 10 min,HRP 标记山羊抗兔二抗(中衫金桥公司)室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次,每次 10 min。利用化学显像仪显影。

1.2.5 CCK-8 法检测干扰 Bub1 对 MHCC97-H 细胞增殖能力的影响 收集各组细胞用 0.25%的胰蛋白酶消化成单细胞悬液,调整浓度为 2.5×10^3 /mL,以每孔 100 μ L 体积接种于 96 孔板中,置于培养箱中常规培养。分别于接种后第 1、2、3、4 和 5 天进行 CCK-8 法检测。在避光条件下加入 100 μ L 新鲜培养基和 CCK-8 试剂 10 μ L,震荡混匀后 37℃培养箱中孵育 2 h,酶标仪 450 nm 波长检测光密度值(OD)。

1.2.6 流式细胞术检测干扰 Bub1 对 MHCC97-H 细胞周期和凋亡的影响 收集各组细胞后用 0.25%的胰蛋白酶消化后充分重悬成单细胞悬液,调整为合适细胞密度后,按细胞周期快速检测试剂盒的操作说明,取 1×10^6 个细胞细胞重悬于预冷的 PBS 中洗涤,500 $\times$ g 离心 5 min 后弃上清。然后加入 500 μ L 平衡至室温后的试剂重悬,流式细胞仪(Beckman FC-500)检测细胞周期。同样,按照细胞凋亡检测试剂盒的操作说明,取 5×10^6 个细胞重悬于预冷的 PBS 中洗涤 2 次,然后用 1 mL Binding buffer 重悬,4℃下 800 $\times$ g 离心 5 min 后弃上清,用 100 μ L Binding buffer 重悬后加入 5 μ L FITC-Annexin V 和 10 μ L PI

试剂,震荡混匀后于室温避光孵育 15 min。然后加入 500 μ L Binding buffer 重悬,流式细胞仪(Beckman FC-500)检测各组细胞凋亡的情况。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件分析。所有结果以均数 $\pm$ 标准差表示,对两组实验数据采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Bub1 在肝癌组织中的表达情况

通过检索 Bub1 基因的信息资料和样本的选取(肝脏正常组织、肝癌肿瘤组织和肝癌细胞系)后,下载原始数据后用 GraphPad Prism5 进行整理分析后发现,Bub1 在肝癌组织中的表达高于正常肝组织($P < 0.05$),并且在数据库中的肝癌细胞系中 Bub1 的表达量也明显升高,进一步证实 Bub1 在肝癌组织中的高表达。见图 1。

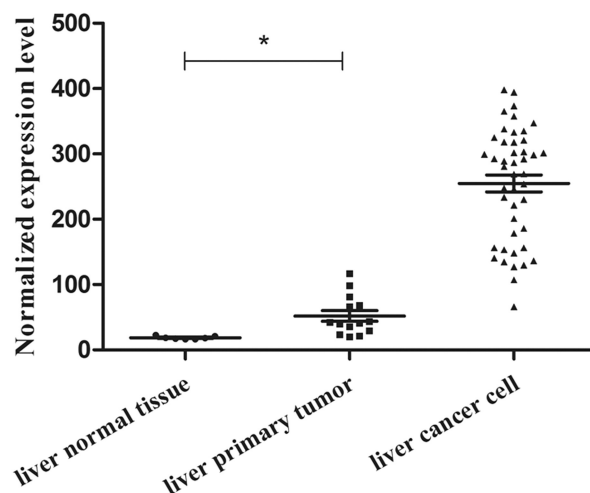


图 1 Bub1 基因在肝脏肿瘤组织、正常组织和细胞系中的表达情况
Fig.1 Expression level of Bub1 in the normal liver tissue, primary liver tumor and liver cancer cells

Note: compared with the normal liver tissue group, * $P < 0.05$.

2.2 特异性下调 Bub1 后 MHCC97-H 细胞中 Bub1 的表达

分别利用 Lipofectamine2000 转染 MHCC97-H 细胞,分为 si-NC 和 si-Bub1 组,然后通过 qRT-PCR 和 Western Blot 检测 Bub1 下调情况。如图 2 所示,转染后 si-Bub1 能够明显下调 Bub1 在 MHCC97-H 细胞中的 mRNA 和蛋白表达($P < 0.05$)。

2.3 特异性下调 Bub1 后对 MHCC97-H 细胞增殖能力的影响

CCK-8 法检测结果显示:第 1 天和第 2 天 si-NC 组与 si-Bub1 组之间没有显著性差异($P > 0.05$)。第 3 天,si-NC 组 OD 值(1.222 ± 0.039),si-Bub1 组 OD 值(0.994 ± 0.064)($P < 0.05$);第 4 天,si-NC 组 OD 值(1.697 ± 0.039),si-Bub1 组 OD 值(1.324 ± 0.071)($P < 0.05$);第 5 天,si-NC 组 OD 值(2.301 ± 0.113),si-Bub1 组 OD 值(1.753 ± 0.099)($P < 0.05$)均有显著差异。以上结果提示,下调 Bub1 后能够明显抑制肝癌细胞的增殖。见图 3。

2.4 特异性下调 Bub1 后对 MHCC97-H 细胞周期的影响

利用流式细胞仪检测各组细胞周期的改变,结果显示

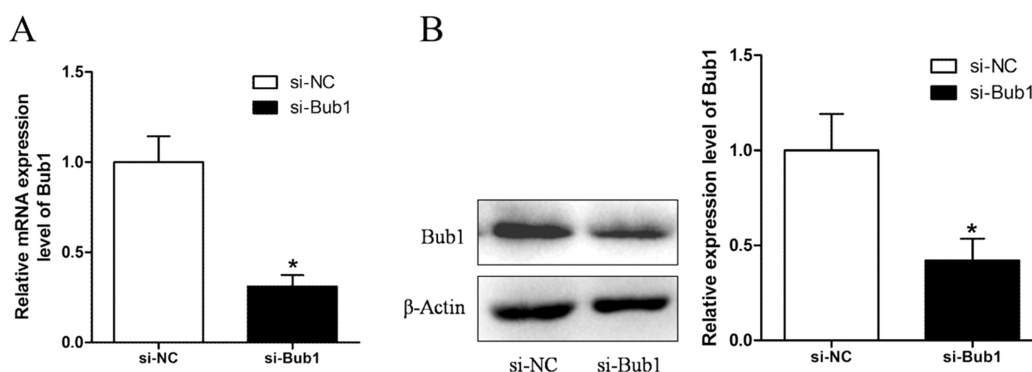


图2 MHCC97-H 转染 siRNA 后 Bub1 的 mRNA 和蛋白水平的改变

A: 转染 si-Bub1 后 Bub1 基因 mRNA 的表达降低; B: 转染 si-Bub1 后 Bub1 基因蛋白的表达降低

Fig.2 Expression of Bub1 mRNA and protein in MHCC97-H after being transfected by siRNA

A: Bub1 mRNA decreased after transfected si-Bub1 in MHCC97-H cells;

B: Bub1 protein decreased after transfected si-Bub1 in MHCC97-H cells

Note: compared with si-NC group, *P<0.05.

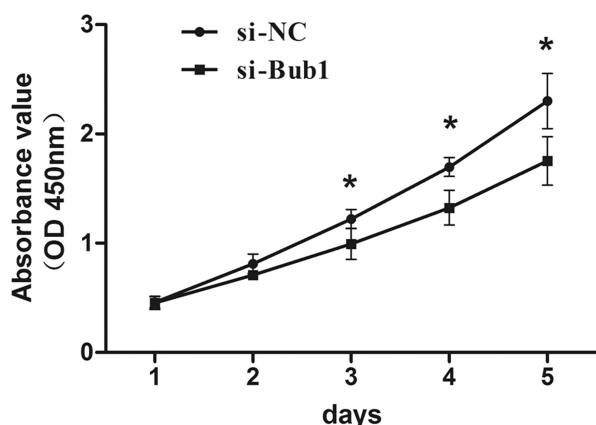


图3 转染 Bub1 siRNA 后对 MHCC97-H 细胞增殖的影响

Fig.3 Effect of transfection with Bub1 siRNA on the proliferation of MHCC97-H cells detected by CCK-8 assay

Note: At the same day compared with si-NC group, *P<0.05.

si-NC 细胞 S 期比例为 $(20.36 \pm 0.42)\%$, si-Bub1 组的比例为 $(26.33 \pm 0.61)\%$, 二者比较有显著性差异 ($P<0.05$)。以上结果提示下调 Bub1 后能够诱导肝癌细胞发生 S 期阻滞。见图 4。

2.5 特异性下调 Bub1 后对 MHCC97-H 细胞凋亡的影响

利用流式细胞仪检测各组细胞凋亡的改变, 结果显示: si-Bub1 组的肿瘤细胞凋亡比例 $(20.34 \pm 3.92)\%$, 与 si-NC 组凋亡率 $(5.61 \pm 2.53)\%$ 相比明显升高 ($P<0.05$), 表明下调 Bub1 的表达能够明显提高肝癌细胞的凋亡比例。

3 讨论

肝癌作为肝脏最常见的原发性肿瘤, 恶性程度极高^[14], 并且由于肝癌病人并发症多、病情复杂常常伴有肝功能异常使得其预后往往不佳^[15]。因此, 深入探究肝癌的异常生物学行为能够为肝癌的治疗提供更多的思路。

细胞周期有丝分裂纺锤体检查点丝 / 苏氨酸激酶(Bub1)基因编码一类丝 / 苏氨酸激酶, 在细胞有丝分裂的过程中发挥重要的调控作用^[16]。该蛋白通过磷酸化有丝分裂检查点复合物的部分部件并激活纺锤体的检查点, 从而调控有丝分裂后期促进复合物的形成和激活^[17,18]。该蛋白还可能参与到 DNA 的损伤修复过程中^[3]。已有的研究显示有丝分裂激酶和有丝分裂检查点蛋白在细胞分裂过程和维持染色质稳定性的过程中具有重要的作用^[19]。Jia L^[18]等研究发现 Bub1 对细胞周期的调控可能是通过磷酸化 Cdc20 分子来实现的。该基因的表达异常和多种肿

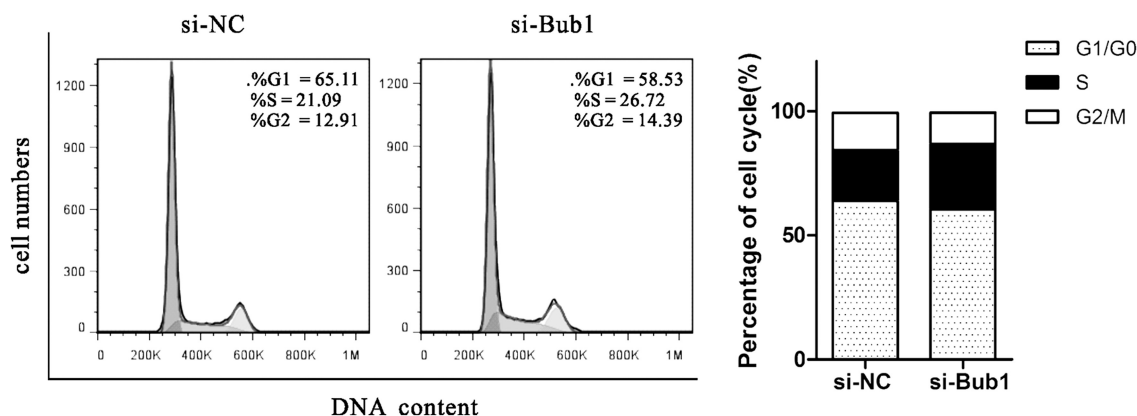


图4 MHCC97-H 细胞转染 Bub1 siRNA 后细胞周期的变化

Fig.4 The cell cycle of MHCC97-H after being transfected by Bub1 siRNA

Note: Compared with si-NC group, *P<0.05.

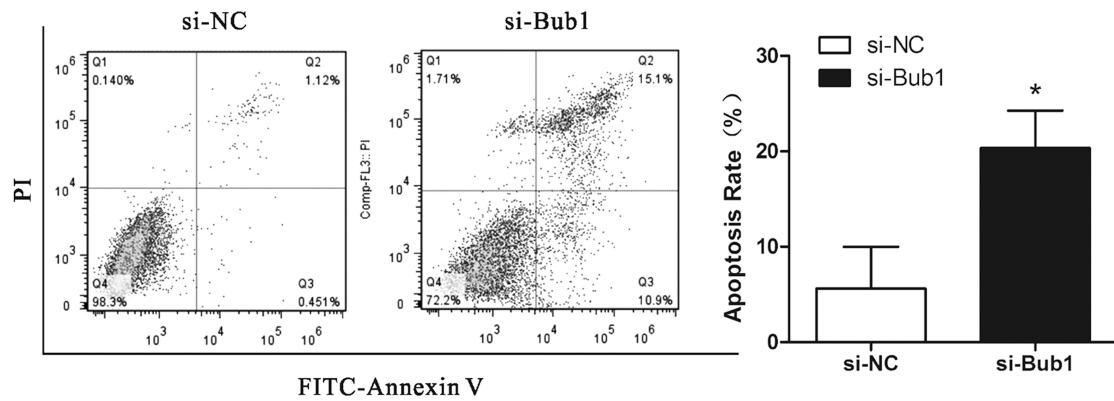


图5 MHCC97-H 细胞转染 Bub1 siRNA 后细胞凋亡的情况

Fig.5 Effect of transfection with Bub1 siRNA on the apoptosis of MHCC97-H cells

Note: Compared with si-NC group, *P<0.05.

瘤的发生发展有关,并且有研究表明该基因也涉及乳腺癌等肿瘤干细胞的生物学行为中^[20,21]。

本研究结果显示 Bub1 在肝脏原发性肿瘤中的表达情况明显升高,并且在肝癌细胞系中的表达丰度也很高,通过小干扰 RNA 下调 Bub1 后发现肝癌细胞的增殖能力下降,出现明显的 S 期阻滞,凋亡细胞的比例升高。以上结果表明下调 Bub1 后可能抑制肝癌的发生发展。

综上所述,Bub1 在肝癌中高表达,并且与肿瘤的异常增殖过程密切相关,可能通过调控细胞周期以及凋亡相关的通路维持肿瘤细胞的增殖能力,而通过对 Bub1 基因在肝癌中的研究能够加深对肝癌的认识并为寻找有效治疗提供新的思路。

参考文献(References)

- [1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108
- [2] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132
- [3] Choi E, Zhang X, Xing C, et al. Mitotic Checkpoint Regulators Control Insulin Signaling and Metabolic Homeostasis [J]. Cell, 2016, 166(3): 567-581
- [4] Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle kinases in cancer[J]. Curr Opin Genet Dev, 2007, 17(1): 60-65
- [5] Nakagawa T, Kollmeyer T M, Morlan B W, et al. A tissue biomarker panel predicting systemic progression after PSA recurrence post-definitive prostate cancer therapy [J]. PLoS One, 2008, 3(5): e2318
- [6] Shigeishi H, Yoneda S, Taki M, et al. Correlation of human Bub1 expression with tumor-proliferating activity in salivary gland tumors [J]. Oncol Rep, 2006, 15(4): 933-938
- [7] Sotiriou C, Neo S Y, McShane L M, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(18): 10393-10398
- [8] Takagi K, Miki Y, Shibahara Y, et al. BUB1 immunolocalization in breast carcinoma: its nuclear localization as a potent prognostic factor of the patients[J]. Horm Cancer, 2013, 4(2): 92-102
- [9] Bie L, Zhao G, Cheng P, et al. The accuracy of survival time prediction for patients with glioma is improved by measuring mitotic spindle checkpoint gene expression[J]. PLoS One, 2011, 6(10): e25631
- [10] Finetti P, Cervera N, Charafe-Jauffret E, et al. Sixteen-kinase gene expression identifies luminal breast cancers with poor prognosis[J]. Cancer Res, 2008, 68(3): 767-776
- [11] Chen C, Sun C, Tang D, et al. Identification of key genes in glioblastoma-associated stromal cells using bioinformatics analysis [J]. Oncol Lett, 2016, 11(6): 3999-4007
- [12] Ricke R M, van Deursen J M. Aurora B hyperactivation by Bub1 overexpression promotes chromosome missegregation[J]. Cell Cycle, 2011, 10(21): 3645-3651
- [13] Shaul Y D, Yuan B, Thiru P, et al. MERAV: a tool for comparing gene expression across human tissues and cell types[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 44(Database issue): D560-D566
- [14] Vilarinho S, Taddei T. Therapeutic strategies for hepatocellular carcinoma: new advances and challenges [J]. Curr Treat Options Gastroenterol, 2015, 13(2): 219-234
- [15] Gish R G, Finn R S, Marrero J A. Extending survival with the use of targeted therapy in the treatment of hepatocellular carcinoma [J]. Gastroenterol Hepatol (N Y), 2013, 9(4 Suppl 2): 1-24
- [16] Akhouni F, Parvaneh N, Modjtaba E B. In silico analysis of deleterious single nucleotide polymorphisms in human BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase B gene [J]. Meta Gene, 2016, 9: 142-150
- [17] Ricke R M, Jeganathan K B, van Deursen J M. Bub1 overexpression induces aneuploidy and tumor formation through Aurora B kinase hyperactivation[J]. J Cell Biol, 2011, 193(6): 1049-1064
- [18] Jia L, Li B, Yu H. The Bub1-Plk1 kinase complex promotes spindle checkpoint signalling through Cdc20 phosphorylation [J]. Nat Commun, 2016, 7: 10818
- [19] Park Y Y, Nam H J, Do M, et al. The p90 ribosomal S6 kinase 2 specifically affects mitotic progression by regulating the basal level, distribution and stability of mitotic spindles [J]. Exp Mol Med, 2016, 48: e250
- [20] Chang J T, Reiner S L. Asymmetric division and stem cell renewal without a permanent niche: lessons from lymphocytes[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2008, 73: 73-79
- [21] Lathia J D, Hitomi M, Gallagher J, et al. Distribution of CD133 reveals glioma stem cells self-renew through symmetric and asymmetric cell divisions[J]. Cell Death Dis, 2011, 2: e200