文章编号:1000-5404(2005)06-0497-03

论著

Separase 上调对肿瘤细胞染色体分离作用的研究及条件表达载体的构建

由莉越,刘 昕 :(第三军医大学基础医学部分子遗传学教研室,重庆 400038)

提 要: 目的 研究 esp1 在肺腺癌细胞株 spc 细胞中对染色体分离的作用,为肿瘤的基因治疗探索新的方法。**方法** 将已有的含 esp1 基因的 EGFP-N1 质粒转染 spc 细胞,检测其转染效率及对染色体分裂相的影响。同时构建能依赖四环素调控的含有 esp1 基因的 pTRE-d2EGFP 质粒载体。**结果** 表达载体 EGFP-N1-esp1 转染成功,染色体异常分裂相减少。表达载体 pTRE-d2EGFP-esp1 构建成功。**结论** esp1 的上调表达对于肿瘤的异常染色体分裂相有一定的抑制作用,对于肿瘤治疗有潜在的应用价值。

关键词: spc 细胞;esp1;转染;四环素
中图法分类号: R394-33; R394.2; R73-354 **文献标识码**: A

Effects of up-regulation of separase/esp1 on tumor chromatid separation and construction of a conditional expression vector

YOU Li-yue, LIU Xin (Department of Molecular Genetics, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct an expression vector containing esp1 in order to investigate the effects on the chromatid separation. **Methods** A conditional plasmid vector containing esp1 was constructed, and was transfected into spc cells. The expression level of esp1 was detected by fluorescence microscopy, and the chromosomes were observed. **Results** EGFP-N1-esp1 was expressed in spc cells, and improper chromosome segregation was reduced. The plasmid of pTRE-d2EGFP-esp1 was constructed successfully. **Conclusion** Up-regulation of esp1 has inhibitory effects on the abnormal chromatid separation of tumors and may be potential in the treatment of cancer.

Key words: spc cell; esp1; transfection; tetracycline

倍体稳定性是细胞行使正常功能的基础,染色体结构或数目的异常必然造成严重后果。染色体非整倍性是肿瘤细胞的基本生物学特征,并在肿瘤的发生发展过程中发挥重要作用。因此,对姐妹染色单体分离机制的研究有助于我们揭开肿瘤细胞染色体非整倍性数目异常之谜。

由于 separase/esp1 的突变加速了额外的纺锤丝和极体的产生,因此被发现,该基因定位于Ⅶ号染色体,全长 6 662 bp,编码 1 795aa,约 180×10^3,为高度水溶性蛋白,其 C 端保守性强,含理论的酶活性区域,其 N 可以与人脑垂体肿瘤转化基因 1(human pituitary-tumour transforming gene 1, hPTTG1)高度亲和。研究表明,esp1 蛋白在分裂期的末期(anaphase)开始时与有丝分裂的纺锤丝以及极体共同作用,促进了姐妹染色单体粘附素(cohension)的丢失。因此,esp1 应该是一种姐妹染色体分离蛋白,起到一个类似 separase 的作用,它的活性在与 securin/Pds1 结合时被阻断[1]。此外 separase/esp1 除了在染色体分离时需要外,在纺锤体延伸时也同样重要[2,3]。

spc 细胞为人肺腺癌细胞,具有非整倍性的特征。转染是一种常规的分子生物学技术。基于 esp1 的重要性,本研究中,我们将以构建好的载体转染入 spc 细胞。同时,我们构建了受四环素调控的 esp1 表达载体,为下一步对该基因功能的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

pTRE-d2EGFP 质粒购自 Clontech 公司。EGFP-N1-esp1,PSK-esp1 质粒为本教研室保存,限制性内切酶 *Eco*RⅠ, *Sac*Ⅱ, *Xho*Ⅰ, *Sph*Ⅰ,T4 DNA Ligase,T4 DNA Polymerase 购自 New England 公司。λDNA*Hind*Ⅲ Marker、200 bp DNA ladder 和 DOTAP Liposomal Transfection Reagent 购自 Roche 公司。胶回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、质粒小提试剂盒均购自 Omega 公司,CIP 购自 Takara 公司。感受态细菌 DH5α 为本室保存。Esp1 部分序列的

作者简介:由莉越(1979-),女,黑龙江省牡丹江市人,硕士研究生,主要从事肿瘤遗传学方面的研究。电话:(023)68753879
通讯作者:刘 昕,电话:(023)68753934
收稿日期:2004-12-03;修回日期:2005-01-07

引物由上海基康公司合成。

1.2 方法

1.2.1 pTRE-d2EGFP-esp1 表达载体的构建 质粒 PSK-esp1 用 *Eco*R Ⅰ, *Sac* Ⅱ 双酶切,电泳后切下目的片段,按照胶回收试剂盒说明进行回收,pTRE-d2EGFP 质粒用 *Eco*R Ⅰ 单酶切,产物 65 ℃灭活 20 min,再利用 CIP 将载体去磷酸化,用 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化,去除样品内所含的各种杂质。将处理后的两个样本均利用 T4 DNA Polymerase 进行平端化,然后利用 T4 DNA Ligase、16 ℃、24 h 连接(图 1),转化 DH5α 感受态细菌,挑取单个克隆,利用快速细胞破碎法(cracking gel)的方法进行初筛,挑取阳性克隆提取质粒,由于连接后部分酶切位点已经破坏,因此,采用 *Xho* Ⅰ, *Sph* Ⅰ 双酶切鉴定,同时采用了 esp1 部分序列的特异引物做 PCR 检测重组质粒中是否含有目的基因。

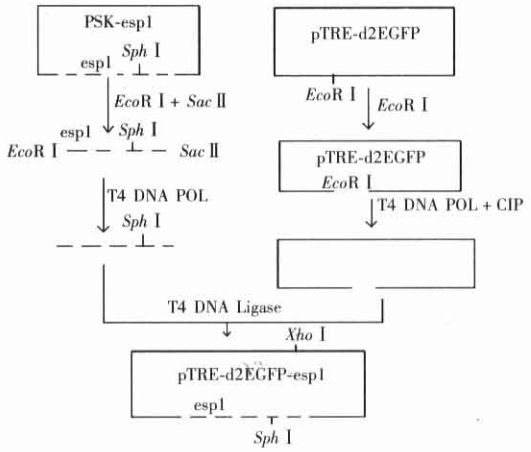


图 1 pTRE-d2EGFP-esp1 构建过程

Fig 1 Construction of pTRE-d2EGFP-esp1

1.2.2 细胞培养及脂质体转染 spc 细胞在含 10% 小牛血清的 1640 培养液、37 ℃、5% CO_2 饱和湿度下培养。转染前,将对数生长期的细胞利用胰蛋白酶消化法消化下来,以 1×10^5 的密度接种到 6 孔培养板内,每孔内放入盖玻片,当细胞长到 70% ~ 80% 融合时,按照 DOTAP 转染试剂说明书的方法将 1 μg EGFP-N1-esp1 重组质粒、6 μl DOTAP 和 1 ml 1640 培养液进行混合转染。另取一孔做阴性对照,仅加 15 μl DOTAP 和 2.5 ml 1640 培养液。5 h 后全部用 2.5 ml 新鲜的 1640 培养液取代。

1.2.3 荧光显微镜检测 将孔板内的盖玻片取出,放在荧光显微镜(Olympus BX51)下观察。

1.2.4 原位杂交检测 利用 PCR 的方法扩出 esp1 的部分序列,做地高辛标记探针。将未转染和已转染的细胞分别爬片,当细胞长到 70% 的密度时,将玻片用 40 g/L 多聚甲醛固定 12 h, 0.1 mol/L PBS 液冲洗 5 min × 2 次,浸入新鲜配置的 0.1 mol/L Tris-HCL(pH 8.0,含 2.5 g/L 乙酸酐) 10 min,然后 2 × SSC 冲洗 10 min,以 1/30 的比例将 esp1 探针加入到杂交液中,按照每切片 10 μl 的浓度将杂交液滴到玻片上,加盖,于 45 ℃保温 24 h,然后用 4 × SSC 漂洗 15 min,2 × SSC(含有 Rnase A 20 ng/L)37 ℃漂洗 30 min,1 × SSC、0.5 × SSC 在 37 ℃各漂洗 10 min,0.05 mol/L PBS 漂洗 10 min × 2 次,将抗地高辛抗体按照 1∶1 000的比例稀释于抗体稀释液中,滴到玻片上,37 ℃保温 2.0 ~ 3.0 h, 0.05 mol/L PBS 漂洗 10 min × 3 次,TSM1 漂洗 10 min × 2 次,TSM2 漂洗 10 min × 2 次,利用 NBT/BCIP(1/50 的比例用 TSM2 配制)室温 3 ~ 5 h,裱片,用不同浓度乙醇脱水,最后用二甲苯脱水,封片剂封固,显微镜下观察,利用 Image-pro plus 4.5 软件进行分析,观察其平均吸光度值[*D*(260)]的变化。

1.2.5 染色体分裂相的分析 分别收集对照组和转染组的细胞,利用传统的秋水仙素方法,Giemsa 染色处理后收集染色体,镜下观察转染前后染色体数目的变化,记录数据。

1.3 统计学分析

采用 χ^2 检验和 *t* 检验。

2 结果

2.1 质粒鉴定

PSK-esp1 在 *Eco*R Ⅰ, *Sac* Ⅱ 双酶切后,分别得到 6 662 bp、3 000 bp 两个片段,pTRE-d2EGFP 质粒用 *Eco*R Ⅰ 单酶切后,得到 4 000 bp 的片段。二者经一系列处理后利用 T4 DNA Ligase 连接。连接后利用 cracking gel 方法进行初筛,初筛后的结果用 *Eco*RI 单酶切片段符合预计大小,用 PCR 鉴定结果符合预先设计的结果,即 250 bp,用 *Xho* Ⅰ, *Sph* Ⅰ 双酶切后两片段应该为 6 717 bp/3 510 bp,均已证明质粒构建成功。

2.2 转染后荧光检测

有荧光显示。

2.3 原位杂交结果分析

转染前后 esp1 染色均呈阳性反应。阳性染色存在于胞浆中,主要集中于核膜外,呈颗粒状或絮状物。图 2 为未转染原位杂交照片,通过软件分析其吸光度[*D*(260)]平均值为 0.237 ± 0.016。图 3 为转染后原位杂交照片,通过软件分析其吸光度[*D*(260)]平均值为 0.37 ± 0.026,esp1 表达量明显增高。

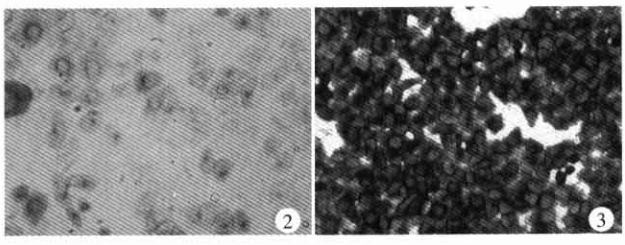


图 2 转染前原位杂交 (× 200)

Fig 2 Results by *in situ* hybridization before transfection (× 200)

图 3 转染后原位杂交 (× 200)

Fig 3 Results by *in situ* hybridization after transfection (× 200)

2.4 细胞分裂相分析

油镜下分别对 spc-A-1 细胞和转染后的细胞分别计数 100 个分裂相,发现未转染的 spc-A-1 细胞的染色体分布于 54 ~ 77,众数范围在(66.16 ± 4.2 964)条,占总数的 73%,众数为 68 条,出现频率为 17%,染色体数目 61 ~ 70 占总数的 83%。同时发现对于转染后的细胞染色体分布于 36 ~ 64 条,众数范围在(53.4 200 ± 5.5 216)条,占总数的 60%,众数为 57 条,出现频率

为 15%，染色体数目 51 ~ 60 占总数的 66%。转染后的细胞染色体分裂相仍然异常，但是染色体的众数平均水平明显减少（$P<0.05$）。见图 4,5。

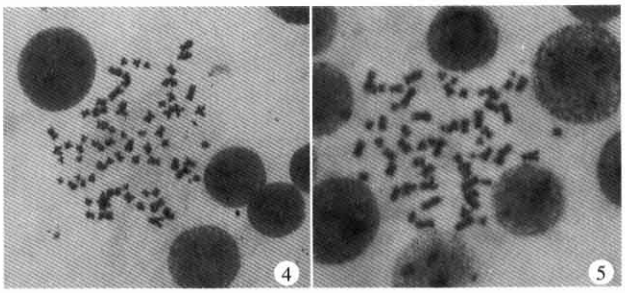


图 4　未转染染色体分裂相　（Giemsa 染色 × 1 000）

Fig 4　Chromosomes before transfection　（Giemsa stain × 1 000）

图 5　转染后染色体分裂相　（Giemsa 染色 × 1 000）

Fig 5　Chromosomes after transfection　（Giemsa stain × 1 000）

3　讨论

近 50 年来，全世界肺癌发病率明显增高，在中国的大城市中，肺癌的发病率已居男性各种肿瘤的首位，腺癌是肺癌中一个常见的病理学类型，针对于肺腺癌所具有的易转移和对化疗药物不敏感的特性，本研究中，在基因的水平上分析了 esp1 对肺腺癌细胞株的一些生物学效应。染色体分离机制一直以来被广泛研究。多个遗传和生化实验表明在不同的组织中 esp1 可以使姐妹染色体分离，它可能通过降解粘附素（cohensin）发挥作用[4]。本实验进一步确立了 esp1 在其中的重要作用，也为肿瘤的基因治疗提供了一条新的思路。通过本研究，显示在染色体分离时，esp1 确实起到了一定的作用，虽然 spc 细胞株仍然具有染色体数目非整倍性的特征，但是其染色体的数目出现显著性减少。因此，可以确定上调 esp1 有助于肺腺癌细胞株 spc-A-1 的染色湾异常分裂相减少。

脂质体是一种人工制备的携有双层包膜的磷脂质小囊，可作为各类治疗药剂的人工膜和赋形剂，目前广泛用于细胞的转染。无论对悬浮还是贴壁细胞，脂质体的转染效率都是比较高的，据记载比其他方法高 10 倍以上[5]。脂质体法转染还具有重复性好、不含其他离子和操作方便以及可以通过多种途径给药的优点。用脂质体把 EGFP-N1-esp1 转入细胞后发现有特异性荧光表达，并促进了下游基因的表达。

本实验在质粒载体的构建中遇到了一定的困难，由于 pTRE-d2EGFP 载体只用 4 000 bp，而克隆上的目的基因 esp1 却有 6 200 bp，在二者的连接上采取了载体：目的片段 = 1∶10 的比例，同时，由于是平端连接，存在插入方向问题，因此也作了大量的筛选工作，最终多个检测指标确定载体构建成功。该载体构建中涉及到了 TRE（tetracycline response element）元件，即所谓的四环素（tetracycline）诱导的条件启动系统，该系统主要是包括两个调解元件，TetR（Tet repressor protein）和 TetO（Tet operator DNA sequence），将这两个元件整合到宿主细胞基因组，以建立一个双稳定的细胞系[6,7]。近年来正在被广泛应用，也被应用于 RNAi 技术[8,9]。本实验中，我们将 pTRE-d2EGFP 质粒上克隆了目的基因 esp1，就是希望在以后的工作中，可以建立一个稳定的受强力霉素调控的 spc 细胞株，为研究该基因提供一个方便的平台。同时也为其它基因在 spc 细胞中的研究提供了模型。此项构建稳定细胞株的工作也正在进行中。

基于本研究的结论，esp1 基因对于肺腺癌细胞起到了明显的改善作用，因此，针对 esp1 基因的进一步研究是必要的，为肺腺癌的治疗提供一个基因基础。

参考文献：

[1] Ciosk R, Zachariae W, Michaelis C, *et al*. An ESp1/PDs1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast[J]. Cell, 1998, 93(6): 1067 - 1076.

[2] Jensen S, Segal M, Clarke D J, *et al*. A novel role of the budding yeast separin Esp1 in anaphase spindle elongation: evidence that proper spindle association of Esp1 is regulated by Pds1[J]. J Cell Biol, 2001, 152(1): 27 - 40.

[3] Uhlmann F, Wernic M, Poupart E, *et al*. Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast[J]. Cell, 2000, 103(3): 375 - 386.

[4] Waizenegger I, Gimenez Abian J F, Wernic D, *et al*. Regulation of Human Separase by Securin Binding and Autocleavage[J]. Curr Biol, 2002, 12(16): 1368 - 1378.

[5] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 北京：科学出版社, 1999. 82 - 83.

[6] Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89(12): 5547 - 5551.

[7] Gossen M, Freundlieb S, Bender G, *et al*. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells[J]. Science, 1995, 268(5218): 1766 - 1769.

[8] Gupta S, Schoer R A, Egan J E, *et al*. Inducible, reversible, and stable RNA interference in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(7): 1927 - 1932.

[9] Wiznerowicz M, Trono D. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference[J]. J Virol, 2003, 77(16): 8957 - 8961.

（编辑　张大春）