论著

文章编号:1000-5404(2006)08-0828-03

esp1 基因上调表达对 A549 细胞凋亡影响的研究

刘丽莎,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 观察 A549 细胞转染 esp1 基因后细胞凋亡情况。**方法** 将含 esp1 基因的 IRE-EGFP 质粒用 FuGENE 6 脂质体转染到肺腺癌细胞 A549,经 G418 筛选获得转染阳性的细胞系,检测转染细胞染色体数目及利用 Annexin-V 和 TUNNEL 试剂盒检测细胞凋亡的变化。**结果** A549 细胞转入 esp1 基因后染色体异常分裂象减少,转染后细胞增殖减少,而去血清培养诱导的凋亡增加。**结论** esp1 的上调表达不仅对于肿瘤的异常染色体分裂象以及肿瘤细胞的异常增殖有一定的抑制作用,且对 A549 细胞的凋亡有促进作用。

关键词: A549 细胞;esp1;转染;凋亡

中图法分类号: R394-33;R394.2;R73-354 **文献标识码**: A

Effect of up-regulated esp1 gene expression on apoptosis of A549 cells

LIU Li-sha, 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 observe the effect of esp1 gene on the apoptosis of A549 cells. Methods A conditional plasmid vector containing esp1 was constructed, and transfected into A549 cells. The expression level of esp1 was detected by fluorescence microscopy, the chromosomes and the apoptosis, proliferation were detected. Results Transfection of IRE-EGFP-esp1 into A549 cells reduced improper chromosome segregation, cell proliferation and increased the apoptosis of A549 cells. Conclusion Up-regulation of esp1 not only has inhibitory effects on the abnormal proliferation and chromatid separation of tumor cells, but induces the apoptosis of A549 cells.

Key words: A549 cell; esp1; transfection; apoptosis

染色体非整倍体数目畸变是肿瘤细胞的基本特征之一,肿瘤细胞同时还存在明显的增殖和凋亡异常;肿瘤细胞染色体数目畸变是否与其凋亡异常有关呢?研究这一问题有助于加深人们对肿瘤细胞生物学改变的认识。esp1 基因编码一种姐妹染色单体分离酶 separase,分离酶在真核细胞有丝分裂的后期促使粘附素(cohensin)降解,从而引发姐妹染色单体分离[1]。Waizenegger 用 siRNA 抑制 separase 表达后细胞出现显著的染色体数目和形态畸变[2],说明分离酶确与肿瘤细胞染色体数目畸变有关。本研究进一步观察了上调 esp1 表达对肿瘤细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

感受态细菌 DH5α、A549 细胞由本教研室保存,IRE-EGFP-esp1 质粒由本室设计构建,限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ购自 New England 公司。λDNA*Hind* Ⅲ marker 和 FuGENE 6 Transfection Reagent 及 Annexin-V 凋亡试剂盒购自 Roche 公司。质粒小提试剂盒,PCR 纯化试剂盒均购自 Omega 公司。原位杂交所用地高辛标记试剂盒,抗地高辛抗体标记,显色剂 NBT/BCIP 购自 Promega 公司,^{3}H-TdR 购自上海原子能研究所。

1.2 方法

1.2.1 携带 IRE-EGFP-esp1 质粒细胞株的构建与筛选 利用 FuGENE 6 脂质体将 IRE-EGFP-esp1 质粒转染入 A549 细胞;用 G418(600 ng/ml)筛选两周后挑选单个细胞克隆进行增殖。

1.2.2 荧光显微镜检查 将孔板内的盖玻片取出,放入荧光显微镜(Olympus BX51)下观察。

1.2.3 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。将细胞爬片,长到 70% 密度时,固定,以 1/30 的比例将 esp1 探针加入到杂交液中,将抗地高辛抗体按照 1∶1 000 的比例稀释于抗体稀释液中,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。

1.2.4 染色体分裂象的分析 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

作者简介:刘丽莎(1980-),女,河南省驻马店市人,硕士研究生,技师,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:2005-12-14;修回日期:2006-02-05

体，镜下观察转染前后染色体数目的变化，记录数据。

1.2.5　细胞凋亡检测

1.2.5.1　Annexin-V 检测法　用胰酶收集无血清培养 7 d 后的细胞，按照 Annexin-V 凋亡检测试剂盒操作说明进行检测。每管细胞悬液（1×10^6 个/ml）中加入 5 μl Annexin-V 试剂及 10 μl 碘化炳啶（PI）进行复染，同时设只加 Annexin-V 或 PI 的对照管，加样后在 3～5 h 内送流式细胞仪检测。

1.2.5.2　TUNNEL 检测法　按 TUNNEL 凋亡检测试剂盒操作说明进行检测。细胞爬片无血清培养 7 d 后用新鲜配制的固定液（4% 多聚甲醛溶于 PBS）固定细胞样本 1 h，用 1 mol/L PBS 漂洗玻片，用封闭液（3% H_2O_2 于甲醇）孵育 10 min，再用 PBS 漂洗玻片，在冰上与通透液（0.1 Triton ×100 稀释于 0.1% 碳酸氢钠）孵育 2 min。用 PBS 再漂洗 2 次，烘干放置干燥，每张玻片加入 50 μl TUNNEL 反应混合液（酶反应液/标记液 = 1/9），阴性对照只加标记液，阳性对照则添加 Dnase 1 孵育 10 min。湿盒 37 ℃孵育 60 min，PBS 漂洗 3 次，荧光显微镜下，激发波长 450～500 nm，在 515～565 nm 处观察到绿色荧光。

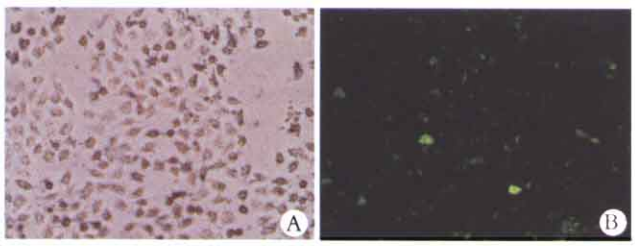
1.3　统计学分析

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 软件，进行 t 检验。

2　结果

2.1　A549 转染 espl 基因的表达检测

2.1.1　细胞转染后绿色荧光检测转染 IRE-EGFP-espl 基因后可检测到绿色荧光蛋白见图 1。



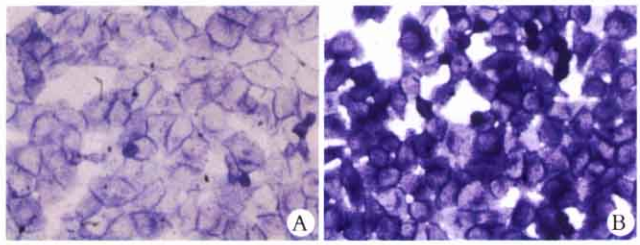
A：光镜下未转染 A549 细胞；B：荧光显微镜下转染 IRE-EGFP-espl 的 A549 细胞显示出绿色荧光

图 1　显示成功转染 IRE-EGFP-espl 质粒进 A549　（×400）

2.1.2　细胞转染后原位杂交　转染前后 espl 染色均呈阳性反应。阳性染色存在于细胞质中，主要集中于核膜外，呈颗粒状或絮状物。图 2 左图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 0.334 ±0.105。右图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 0.362 ±0.09，espl 表达量明显增高（$P<0.05$）。

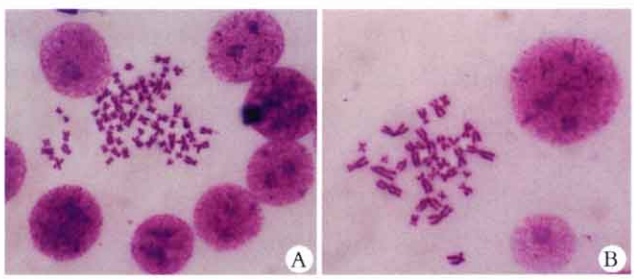
2.2　细胞转染后染色体数目分析

油镜下分别对 A549 细胞和转染后的细胞分别计数 100 个分裂象，发现未转染的 A549 细胞的染色体分布于 48～78，众数范围在 63～69 条，占总数的 69%，众数为 68 条，出现频率为 18%，染色体数目 61～70 占总数的 71%。同时发现对于转染后的细胞染色体分布于 38～67 条，众数范围在 62～66 条，占总数的 58%，众数为 58 条，出现频率为 13%，染色体数目 51～60 占总数的 61%。转染后的细胞染色体分裂象仍然异常，但是染色体的众数平均水平明显减少（$P<0.05$），见图 3。



A：原位杂交检测转染前 A549 细胞中 espl 表达；B：原位杂交检测转染后 A549 细胞中 espl 表达

图 2　原位杂交显示转染前后 A549 细胞 espl 表达的差异　（×400）

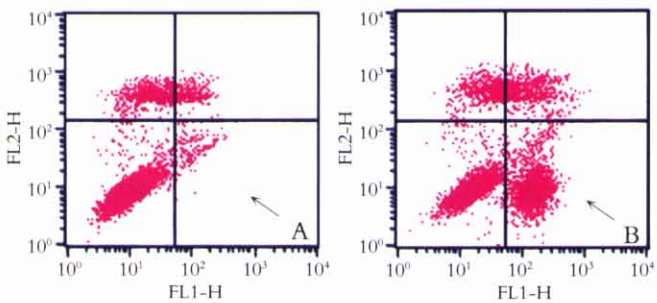


A：转染前 A549 细胞染色体数；B：转染后 A549 细胞明显减少染色体

图 3　秋水仙素法显示转染前后 A549 细胞染色体数目的差异（Giemsa ×1 000）

2.3　A549 转染 espl 基因的凋亡检测

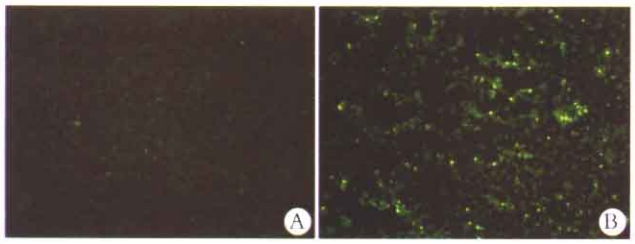
2.3.1　Annexin-V 凋亡检测结果　如图 4 可以看出未转染前，经过无血清培养 7 d 后，凋亡率只有 1.61%；转染 IRE-EGFP-espl，凋亡率达到 39.42%。



A：转染前 A549 细胞凋亡率；B：转染后 A549 细胞明显增高的凋亡率（箭头所示象限）

图 4　ANNEXIN-V 凋亡检测显示转染前后 A549 细胞凋亡率的差异

2.3.2　细胞 TUNNEL 凋亡检测结果　如图 5 所示，经过无血清培养 7 d 后，未转染细胞通过 Image-pro plus 4.5 软件分析其在 515～565 nm 处绿色荧光强度平均值为34.757 790 74，转染细胞绿色荧光强度平均值为58.906 119 95。转染细胞凋亡明显增高（$P<0.05$）。



A：转染前 A549 细胞凋亡荧光强度；B：转染后 A549 细胞明显增高的荧光强度

图5 TUNNEL 凋亡检测显示转染前后 A549 细胞凋亡荧光强度的差异 （荧光显微镜×1 000）

3 讨论

esp1 基因定位于Ⅶ号染色体，全长 6 662 bp，编码 1 795 个氨基酸，为高度水溶性蛋白，其 C 端保守性强，含有保守的半胱氨酸残基，N 端可以与人垂体瘤转移基因 1（hPTTG1）高度亲和[4]。esp1 基因编码的 separase 是一种姐妹染色单体分离蛋白，其作用主要是在细胞有丝分裂后期促使姐妹单体 cohesin 的降解，从而引发染色单体的分离[5,6]。本实验中，我们在上调表达 esp1 基因的肿瘤细胞中除了观察到染色体数目畸变程度有所减轻外，还观察到其对凋亡诱导因素的敏感性也增加了：转染 esp1 基因的肿瘤细胞在无血清培养 7 d 的凋亡诱导因素作用下凋亡明显高于没有进行转染的肿瘤细胞（Annexin-V 检测的凋亡率 39.42% > 1.61%；TUNNEL 检测的荧光强度 58.906 119 95 > 34.757 790 74 $P<0.05$）。由此，esp1 基因对肿瘤细胞的凋亡是有促进作用的。

细胞凋亡是由基因控制的细胞主动参与并遵守一定程序的自我消亡过程，在此过程中涉及到众多的蛋白和分子，本实验显示上调表达 esp1 基因的肿瘤细胞凋亡增加有可能为如下机制：①caspases 家族在细胞凋亡中起着极其重要的作用，目前在哺乳动物中发现至少有 12 种 Caspases 家族成员，它们具有酶催化活性，参与打靶、激活及调控着级联反应，在执行和控制细胞凋亡的过程中发挥着重要作用[7]，由于 separase 蛋白与 caspases 同属于半胱氨酸蛋白酶（cysteine proteases）[8]，二者在 C 端均含有保守的半胱氨酸残基，该残基正是 caspases 的催化活性基团。因此，上调表达的 separase 有可能与 caspases 一样能够参与细胞凋亡过程。例如，Annexin-V 凋亡检测法检测出凋亡率的明显增高可能与 separase 参与对细胞表面蛋白的切割形成丝氨酸外翻有关。②Pati 和 Chen 分别在 2002 年提出对 cohesin Rad_{21} 亚基的裂解会引起细胞凋亡，其蛋白裂解 C-端产物（65×10^3）向胞质的易位是引发凋亡途径的早期事件（凋亡后 3～4 h）并能正反馈引起凋亡信号的逐级扩大[9,10]；2005 年 Atienza[11] 进一步报道：对 Rad_{21} 进行 RNA 干扰，减少 Rad_{21} mRNA 的表达后发现肿瘤细胞增殖受到抑制，凋亡增加。而在本研究中，我们确实发现上调 esp1 基因的肿瘤细胞凋亡增加，增殖受到抑制（增殖指数由52 388.1 ± 1 943 下降为39 868.3 ± 1 310）。因此，separase 裂解 Rad_{21} 可能引发细胞凋亡。

esp1 基因对姐妹染色单体的分离作用很明确，本实验又观测到该基因表达产物对肿瘤细胞凋亡有促进作用，那么细胞凋亡与姐妹染色单体之间是否也会存有一定联系呢？对此机制还不能做出合理的解释，我们将在今后的实验中进一步研究。

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(3): 1067－1076.

[2] 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.

[3] 由莉越，刘 昕. 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[J]. 第三军医大学学报，2005，27(6)：497－499.

[4] CHESTUKHIN A, PFEFFER C, MILLIGAN S, *et al*. Processing, localization, and requirement of human separase for normal anaphase progression[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(8): 4574－4579.

[5] NASMYTH K, PETER J M, UHLMANN F. Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids[J]. Scince, 2000, 288(5470): 1379－1385.

[6] UHLMANN F. Secured cutting: Controlling separase at the metaphase to anaphase transition[J]. EMBO Rep, 2001, 21(6): 487－492.

[7] HENGARTNER M O. The biochemistry of apoptosis[J]. Nature, 2000, 407(6805): 770－776.

[8] UHLMANN F, WERNIC D, POUPART M A, *et al*. Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast[J]. Cell, 2000, 103(3): 375－386.

[9] CHEN F, KAMRADT M, MULCAHY M, *et al*. Caspase proteolysis of the cohesion component RAD21 promotes apoptosis[J]. J Biol Chem, 2002, 277(19): 16775－16781.

[10] PATI D, ZHANG N, PLON S E. Linking sister chromatid cohesion and apoptosis: role of RAD2[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(23): 8267－8277.

[11] ATIENZA J M, ROTH R B, ROSETTE C, *et al*. Suppression of RAD21 gene expression decreases cell growth and enhances cytotoxicity of etoposide and bleomycin in human breast cancer cells[J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4(3): 361－368.

（编辑 汪勤俭）