文章编号:1000-5404(2006)09-0961-03

论著

PTTG1基因上调表达对A549细胞增殖和凋亡的影响

钱春荣,刘 昕,刘丽莎,卓勤强,程 英 (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 研究人垂体瘤转化基因1(human pituitary tumor transforming gene 1,PTTG1)上调表达对肺腺癌细胞株(A549)增殖和凋亡的影响。**方法** 构建含PTTG1基因的真核表达载体,脂质体法转染A549细胞并用G418筛选出高表达的阳性克隆株,实时荧光定量PCR(real-time fluorescent quantitation PCR)和免疫细胞化学(immunocytochemical assay,ICA)分别检测PTTG1 mRNA及蛋白表达的改变,^{3}H胸腺嘧啶核甙(^{3}H-TdR)掺入法检测细胞增殖活性,Annexin Ⅴ异硫氢酸荧光素(FITC)试剂盒检测凋亡情况。**结果** 成功构建含PTTG1基因的真核表达载体,获得上调表达PTTG1的A549细胞,转染含PTTG1基因重组质粒的A549细胞增殖活性较未转染组细胞及转染空白质粒组细胞均显著增强($P<0.05$);3组细胞间的凋亡率无显著差异。**结论** PTTG1基因能显著促进A549细胞的增殖,而对细胞凋亡没有影响。

关键词:垂体瘤转化基因1;真核表达载体;A549细胞;增殖;凋亡
中图法分类号:R394.2;R730.23;R734.2 **文献标识码**:A

Effect of pituitary tumor transforming gene 1 on proliferation and apoptosis of A549 cells

QIAN Chun-rong, LIU Xin, LIU Li-sha, ZHUO Qin-qiang, CHENG Ying (Department of Molecular Genetics, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of human pituitary tumor transforming gene 1 (PTTG1) transfection on cell proliferation and apoptosis of A549 cells. **Methods** The eukaryotic expression vector expressing PTTG1 gene was constructed, and transfected into A549 cells by lipofection. The positive clones were screened by using G418. PTTG1 mRNA and PTTG1 protein expression was confirmed by real-time fluorescent quantitation PCR and immunocytochemical assay, the cell proliferation was determined by ^{3}H-TdR incorporation, and the apoptosis was determined by Annexin Ⅴ-FITC kit. **Results** Recombinant expression vector for PTTG1 is successfully constructed and A549 cells highly expressing PTTG1 are obtained. The proliferation of A549 cells transfected with PTTG1 was higher than that of A549 cells and A549 transfected with empty vector ($P<0.05$), but the apoptosis was of no significant difference among the three groups. **Conclusion** PTTG1 gene enhances the proliferation and has no effect on the apoptosis in A549 cells.

Key words: pituitary tumor transforming gene 1; eukaryotic expression vector; A549 cells; proliferation; apoptosis

人垂体瘤转化基因是1997年在鼠垂体瘤细胞株CH4中通过mRNA差异显示PCR技术分离出来的第一个垂体瘤转化基因[1]。PTTG定位于染色体5q33,该基因全长超过10 kb,是编码1个含202个氨基酸残基、分子质量为22×10^3的蛋白质。人体的多种正常增生性组织,如胚胎肝、正常成人大脑、脾脏、睾丸等存在PTTG的低表达;在脑垂体腺癌、乳腺癌、卵巢癌、白血病、肺腺癌等肿瘤细胞中PTTG1较正常细胞表达量明显增高,并与肿瘤的侵袭性相关[2]。本研究拟观察上调A549细胞PTTG1基因的表达对细胞增殖和凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞 质粒pGEM-T Easy购自Pro-

作者简介:钱春荣(1979-),女,湖北省武汉市人,硕士研究生,主要从事肿瘤细胞遗传方面的研究。电话:13883923789,E-mail:qchr2003@163.com
通讯作者:刘 昕,E-mail:liuxin@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2006-01-01;修回日期:2006-03-02

mega 公司,大肠杆菌 DH5α、pdsRED-C1 载体和人肺腺癌细胞株 A549 由本室保存。

1.1.2 主要试剂 RNA 提取试剂 Tripure、DOTAP Liposomal Transfection Reagent 购自 Roche 公司,反转录试剂 AMV 购自 Promega 公司,限制性内切酶购自 New England 公司,AnnexinV-FITC 试剂盒购自深圳晶美生物公司,引物和探针均由上海基康生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 真核表达载体 pdsRED-C1/PTTG1 的构建 按 Tripure 试剂说明书提取 k562 细胞总 RNA,AMV 酶反转录为 cDNA。PTTG1 引物自行设计,序列为 P1:5′-GTTAAGACCTGCAATAATCC-3′,P2:5′-CACAAACTCTGAAGCACTAA-3′,扩增产物长度为 657 bp。PCR 扩增条件为:94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,52 ℃ 40 s,72 ℃ 30 s,30 个循环,72 ℃延伸 8 min。PCR 扩增产物经纯化后与 pGEM-T Easy 载体连接,再经转化、筛选、测序获得人 PTTG1 cDNA。PTTG1 cDNA 经 *Sac* Ⅰ和 *Sac* Ⅱ双酶切后正向克隆到同样经双酶切后的 pdsRED-C1 载体中,进一步酶切鉴定,将构建的重组体命名为 pdsRED-C1/PTTG1。

1.2.2 重组质粒的转染 pdsRED-C1/PTTG1 和 pdsRED-C1 的真核转染参照 DOTAP 转染试剂说明书进行。用 G418 筛选阳性细胞,以未转染组作对照,3 ~ 4 d 换液 1 次,持续筛选两周,挑取阳性单克隆扩大培养,建立稳定转染 PTTG1 基因的 A549 细胞。

1.2.3 细胞培养及分组 A549 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。将细胞分为 3 个实验组,分别为 A549 细胞组、转染 pdsRED-C1 细胞组、转染 pdsRED-C1/PTTG1 细胞组。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测 PTTG1 mRNA 的表达 检测 PTTG1 的引物和 Taqman 探针序列为 P1:5′-CTAAGGATGGGCTGAAGCTGG-3′, P2:5′-TGAAACTTGAGATCTCCCATCTAAGG-3′; Taqman 探针为:5′-FAMTGGACCTTCAATCAAATAMRA-3′;内参照 GAPDH 的引物和 Taqman 探针序列为 P1:5′-CCATCAATGACCCCTTCATTG-3′, P2:5′-CATGGGTGGAATCATATTGGAAC-3′, Taqman 探针:5′ FAM-CCTCAACTACATGGTTTACTAMRA-3′[3]。

提取细胞总 RNA,反转录合成 cDNA,将空白对照和样品管共同置于实时荧光定量 PCR 仪(美国 MJ Research™公司)中进行反应。结果计算:根据公式(目的基因含量 = 目的基因拷贝数/对照 GAPDH 拷贝数)计算出 3 组细胞的 PTTG1 mRNA 的含量。

1.2.5 免疫组化检测 PTTG1 蛋白表达 实验步骤参照北京中山生物公司 SP-9000 免疫组化试剂盒提供的操作步骤进行,DAB 显色试剂盒显色。一抗为武汉博士德生物工程公司的兔抗人 PTTG 多克隆抗体。结果判定:细胞质和(或)细胞核有棕黄色颗粒而背景不显色者为阳性,应用美国 Tiger 920 细胞图像分析仪进行定量处理。取固定检测光源强度,每张切片随机选取 3 个高倍视野(×400),每个视野总测量面积为 2.9658×10^4 μm^2,分别测得这 3 个视野的积分光密度值(IOD)后取其平均值。

1.2.6 细胞增殖实验 采用 ^{3}H-TdR 掺入法[4]。将处于对数生长期的 3 组细胞分别以每孔5 000个细胞的密度接种于 96 孔板中,每组细胞复种 10 孔,每孔加入 ^{3}H-TdR 2 μBq(放射性浓度为 1 mCi/ml),继续培养 48 h 后,用 Beckman LS-6500 型 β 液闪记数仪测定标本核素并记数率,用每分钟核素的 cpm 数代表样品 ^{3}H-TdR 掺入值。

1.2.7 细胞凋亡实验 采用磷脂酰丝氨酸结合蛋白/碘化丙啶双参数法(AnnexinV FITC/PI 法)检测细胞凋亡。将 3 组细胞无血清饥饿培养 48 h 以诱导细胞凋亡,上机前的细胞处理按照 AnnexinV-FITC 试剂盒说明书进行。BD 公司的 Calibur 流式细胞仪测定检测。

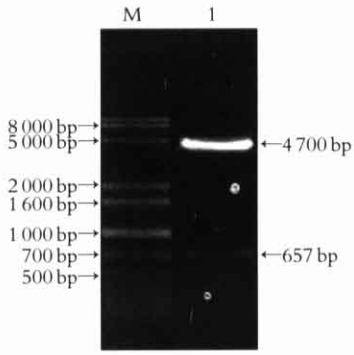
1.3 统计学处理

应用 SPSS 10.0 软件对数据进行均数间的多重比较。

2 结果

2.1 pdsRED-C1/PTTG1 重组质粒的鉴定

经测序证实,用 RT-PCR 克隆 PTTG1cDNA 序列与 GenBank 中的序列一致;pdsRED-C1/PTTG1 的酶切电泳图谱表明成功构建 pdsRED-C1/PTTG1 真核表达载体(图 1)。



M:标准;1:pdsRED-C1/PTTG1 被限制性内切酶 *Sac* Ⅰ和 *Sac* Ⅱ双切

图 1 pdsRED-C1/PTTG1 重组质粒经酶切的凝胶电泳图

2.2 转染前后 PTTG1 mRNA 的表达

实时荧光定量 PCR 检测结果显示 pdsRED-C1/PTTG1 转染组细胞 PTTG1 mRNA 含量较转染空白质粒组细胞和未转染组细胞均显著升高($P < 0.05$),见表 1。

2.3 转染前后 PTTG1 蛋白的表达

免疫细胞化学检测结果显示 pdsRED-C1/PTTG1 转染组细胞 PTTG1 蛋白表达较转染空白质粒组细胞和未转染组细胞比较均显著升高($P < 0.05$),见表 1。证实成功建立上调 PTTG1 表达的 A549 细胞。

2.4 细胞增殖实验结果

^{3}H-TdR 掺入法测定结果显示:转染 pdsRED-C1/PTTG1 质粒组细胞的 cpm 值分别较转染空白质粒组和未转组细胞均显著增强($P < 0.05$),转染空白质粒组与未转染组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1　转染 PTTG1 重组表达质粒对 A549 细胞的 PTTG1 mRNA、蛋白增殖、凋亡的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	PTTG1 mRNA	PTTG1 蛋白(IOD)	细胞增值(cpm)	细胞凋亡(%)
A549 细胞组	2.42 ±0.54	1 024.51 ±115.56	11 102.30 ±2 083	10.90 ±1.26
A549 pdsRED-C1	1.83 ±0.69	997.56 ±102.85	8 114.80 ±720	7.71 ±1.21
转染 pdsRED-C1/PTTG1 细胞组	42.50 ±6.53[ab]	5 963.57 ±136.17[ab]	30 377.30 ±3 858[ab]	10.76 ±2.03

a：$P<0.05$，与 A549 细胞组比较；b：$P<0.05$，与 A549 pdsRED-C1 比较

2.5　细胞凋亡实验结果

AnnexinV FITC/PI 法测定结果显示：3 组细胞间的细胞凋亡率无显著差异（$P>0.05$）。

3　讨论

目前认为 PTTG1 促进肿瘤发展的作用机制主要有三个方面[5,6]：①作为保全素（Securin）可抑制分裂期细胞姊妹染色体的分离，使子代细胞非整倍体化，增加突变几率，促进肿瘤表型恶化；②PTTG 蛋白中含有的 PXXP 基序可与多种细胞内接头蛋白的 SH3 域结合，通过募集多种胞内信号分子，将生长刺激信号传至核内，激活多种肿瘤相关基因的表达，使细胞发生转化；③研究显示 PTTG 可上调 bFGF，后者可诱导肿瘤组织新生血管形成，促进肿瘤生长、侵袭与转移。

为了研究 PTTG1 的表达对 A549 细胞增殖和凋亡的影响，我们首先克隆了 PTTG1 基因，构建了含 PTTG1 基因的真核表达载体，并将其通过脂质体介导的方法导入 A549 细胞，通过筛选和鉴定，pdsRED-C1/PTTG1 转染组细胞的 PTTG1 mRNA 和蛋白表达均较未转染组和转染空白质粒组升高，证明我们获得了 PTTG1 基因上调表达的 A549 细胞株。然后我们设定了 A549 细胞组、转染 pdsRED-C1 细胞组、转染 pdsRED-C1/PTTG1 细胞组共 3 个实验组，检测了 3 组细胞的增殖和凋亡情况，结果显示：对比转染空白质粒组细胞和 A549 细胞，PTTG1 上调表达的 A549 细胞组增殖活性明显增强；而 3 组细胞间的凋亡率无明显变化。实验结果提示，PTTG1 在肿瘤细胞中有明显的促细胞增殖作用，而对细胞的凋亡则无明显影响。

有研究报道：表达 PTTG 的 3T3 细胞能促进 bFGF 转录和分泌[7]，bFGF 具有促进有丝分裂、血管生成，调控激素分泌等功能，在人体其他肿瘤中也有 bFGF 表达增高的报道，推测 PTTG 可能通过 FGF 家族发挥促增殖作用[8,9]。Yu 等[10]研究发现表达野生型 P53 的乳腺癌 MCF-7 细胞中，PTTG 过度表达能引起细胞凋亡。而我们发现当 PTTG 上调表达时，细胞凋亡率无显著改变，提示 PTTG 没有诱导凋亡的作用。我们认为：当 PTTG1 上调表达时，促进肿瘤细胞的增殖而对细胞凋亡无明显影响，使肿瘤细胞获得快速生长与侵袭的能力。

参考文献：

[1] PEI L, MELMED S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG)[J]. J Mol Endocrinol, 1997, 11(4): 433-441.

[2] SAEZ C, JAPON M A, RAMOS-MORALES F, *et al*. hpttg is over-expressed in pituitary adenomas and other primary epithelial neoplasias [J]. Oncogene, 1999, 18(39): 5473-5476.

[3] 罗勇军，刘　昕，钱春荣. PTTG、ESP1 在 A549 SPC-A-1 细胞株 S G_2/M 期的表达[J]. 第三军医大学学报，2005，27(8)：710-712.

[4] 余祖滨，白　莉，闵家新，等；SOCS 3 基因转染对肺腺癌细胞株 A549 原癌基因 c-fos、c-jun mRNA 表达及细胞增殖的影响[J]. 第三军医大学学报，2004，26(17)：1549-1552.

[5] HUNTER J A, SKELLY R H, AYLWIN S J, *et al*. The relationship between pituitary tumour transforming gene (PTTG) expression and in vitro hormone and vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from human pituitary adenomas[J]. Eur J Endocrinol, 2003, 148(2): 203-211.

[6] YU R, MELMED S. Pituitary tumor transforming gene: an update[J]. Front Horm Res, 2004, 32: 175-185.

[7] KATHRIN CHAMAON, ELMAR KIRCHES, DIMITRIOS KANAKIS, *et al*. Regulation of the pituitary tumor transforming gene by insulin-like-growth factor-I and insulin differs between malignant and non-neoplastic astrocytes[J]. J Biochemi Biophy Res, 2005, 27(1): 86-92.

[8] ISHIKAWA H, HEANEY A P, YU R, *et al*. Human pituitary tumor-transforming gene induces angiogenesis[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(2): 867-874.

[9] HAMID T, KAKAR S S. PTTG and cancer[J]. Histol Histopathol, 2003, 18(1): 245-251.

[10] YU R, HEANEY A P, LU W, *et al*. Pituitary tumor transforming gene causes aneuploidy and p53-dependent and p53-independent apoptosis[J]. J Biol Chem, 2000, 275(47): 36502-36505.

（编辑　栾　嘉）