文章编号:1000-5404(2008)07-0625-03

论著

esp1 在 A549 和 Hela 细胞中的表达及对染色体倍性的影响

付连仲[1],刘 昕[1],张成德[2] ([1]第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038;[2]解放军信息工程大学卫生处,郑州 450000)

摘 要:**目的** 观察 esp1(estradiol-stimulated protein)在 A549 和 Hela 两种肿瘤细胞株中的表达与染色体倍性的关系。**方法** 提取肿瘤细胞 A549、Hela 及分别转染 pIRE-S2-EGFP-ESP1 的相应肿瘤细胞总 RNA,逆转录,real-time quantitative PCR 检测,比较 esp1 在肿瘤细胞中的表达变化;VIDEOTEST-KARYO 3.1 分析相应的染色体数目变化;流式细胞仪检测其染色体倍性的改变。**结果** 转染 pIRE-S2-EGFP-ESP1 后 esp1 表达上调($P<0.01$),染色体数目减少($P<0.01$),染色体倍性降低($P<0.01$)。**结论** esp1 上调表达可以抑制肿瘤细胞异常分裂相,降低染色体倍性,但是 esp1 在 A549 和 Hela 两种肿瘤细胞株中的表达没有观察到明显差异。

关键词:esp1;染色体倍性;非整倍性;上调表达
中图法分类号:Q343.244;Q55;R730.23 **文献标识码**:A

esp1 expression and its effect on ploidy in A549 and Hela cells

FU Lian-zhong[1], LIU Xin[1], ZHANG Cheng-de[2] (Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; Division of Health, Information Engineering University of the People's Liberation Army, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: **Objective** To observe the relation of estradiol-stimulated protein (esp1) expression with chromosome ploidy in A549 and Hela cells. **Methods** Total RNA was extracted from A549 and Hela cells respectively for cDNA. pIRE-S2-EGFP-ESP1 plasmid was transfected into the 2 corresponding tumor cells. Real-time quantitative PCR was used to detect esp1 gene expression. The chromosome changes were analyzed by VIDEOTEST-KARYO 3.1 and chromosome ploidy was analyzed with flow cytometry. **Results** After the tumor cells were transfected with pIRE-S2-EGFP-ESP1 plasmid, the expression of esp1 gene was up-regulated ($P<0.01$), chromosome number decreased ($P<0.01$), and chromosome ploidy reduced ($P<0.01$). **Conclusion** The over-expression of esp1 gene inhibits the abnormal proliferation of tumor cells and decreases chromosome ploidy.

Key words: estradiol-stimulated protein; ploidy; aneuploidy; over-expression

染色体非整倍性是肿瘤细胞的特征性改变之一,但是其发生的确切机制至今仍不清楚。在人正常细胞有丝分裂后期,由 esp1 编码的分离酶在染色体的分离中起着决定性的作用[1,2]。Waizenegger 等[3]的研究显示,人类正常细胞通过 RNAi 抑制 esp1 表达后,形成了含有大叶状核的多倍体细胞,在这些细胞有丝分裂过程中,许多细胞都含有不分离的姐妹染色单体。对于肿瘤细胞,本室前期工作已观察到在 A549 肺癌细胞株中上调表达 esp1 后肿瘤细胞生物学形状的改变[4,6],本研究进一步观察在不同肿瘤细胞中 esp1 上调表达和染色体倍性的关系。

作者简介:付连仲,男,河南省夏邑县人,硕士研究生,主治医师,主要从事肿瘤细胞染色体分离表达调控方面的研究。电话:(023)68753879,E-mail:lzhdoctor@sina.com
通信作者 刘 昕,电话:(023)68753934
收稿日期:2007-10-12;修回日期:2007-11-12

1 材料与方法

1.1 材料

人源 A549(本室保存),人源 Hela(第三军医大学全军免疫学研究所邹丽云博士惠赠),Hela-pIRE-S2-EGFP-ESP1,A549-pIRE-S2-EGFP-ESP1(刘丽莎[4]构建),1640 培养基(Gibico 公司),DMEM 培养基(HyClone 美国),小牛血清(兰州民海生物),Tipure(Roch 公司),逆转录试剂盒(Promega 公司),PCR 试剂(宝生物公司),引物(Invitrogen 公司),淋巴细胞分离液(中国医学科学院灏洋生物工程研究所),FuGENE 6 Transfection (Reagent Roche 公司),SYBR Green Ⅰ染液(深圳达克维公司),姬姆萨染液,PI(中杉金桥公司)。

1.2 方法

1.2.1 Real-time quantitative PCR 检测 esp1 基因的表达

1.2.1.1 RNA 的提取 细胞分别培养于含 10% 小牛血清 DMEM1640(100 U/ml 青霉素,100 U/ml 链霉素)中,生长呈对数期状态时弃去培养液,按要求提取总 RNA,用 0.1% DEPC

水调节浓度至200 ng/μl，－20 ℃保存备用。

1.2.1.2 逆转录cDNA 用AMV逆转录试剂盒按说明将总RNA逆转录为cDNA。

1.2.1.3 Real-time quantitative PCR 反应引物：esp1上游引物：5′-ACCAAGCAATAGCCACCTTG-3′，下游引物：5-GGCCCCATACTCTTTGATGA-3′；GAPDH上游引物：5′-CCTCAACTACATGGTTAC-3′，下游引物：5′-CATGGGTGGAATCATATTGGAAC-3′。20 μl反应体系。反应条件为：50 ℃预变性2 min，95 ℃变性10 min，95 ℃变性30 s，60 ℃退火1 min，72 ℃延伸，读板，扩增40个循环，绘制融解曲线。

1.2.2 染色体的制备、分析

1.2.2.1 染色体的制备 细胞生长至覆盖瓶底面积70%时加入秋水仙碱，使终浓度为40 ng/ml，继续培养1.5 h。弃培养基，用PBS洗1次，0.25%胰蛋白酶消化细胞，172.5×*g*离心6 min，弃上清。加入预热至37℃的0.075 mol/L低渗液KCl，至10 ml，混匀，37 ℃低渗处理20 min，172.5×*g*离心6 min，去上清。加固定液甲醇-冰醋酸(3:1)至10 ml，混匀，固定30 min，然后172.5×*g*离心6 min，弃上清。重复2～3次，每次固定30 min。固定完毕，加入0.2 ml固定液，制成悬液，滴一滴在冰冷的玻片上，酒精灯外焰烤干，72 ℃烤箱2～3 h。姬姆萨染色10 min，清水冲洗，晾干。

1.2.2.2 染色体的分析 光镜下观察染色体的形态、分布，VIDEOTEST-KARYO 3.1采集染色体，计数100个细胞，分析其核型，计数染色体数目。

1.2.3 流式细胞技术分析细胞染色体的倍性 细胞生长至覆盖瓶底面积70%时，弃培养基，用PBS洗1次，0.25%胰蛋白酶消化细胞，225×*g*离心2 min，弃上清。加入1 ml PBS，混匀，225×*g*离心2 min，重复2次。用75%乙醇在4 ℃固定过夜，送检。将健康人外周血淋巴细胞做为参考标准，确定样品细胞DNA增殖指数(DNA index，DI)，DI＝样品细胞$G_{0/1}$峰均道值÷淋巴细胞$G_{0/1}$峰均道值。

1.3 统计学处理

结果以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 13.0统计软件行t检验。

2 结果

2.1 esp1在肿瘤细胞中表达结果

结果可见转染pIRE-S2-EGFP-ESP1后的肿瘤细胞esp1的表达均明显大于转染前($P<0.01$)，而没有转染的A549、Hela肿瘤细胞之间esp1的表达差别不大(表1)。

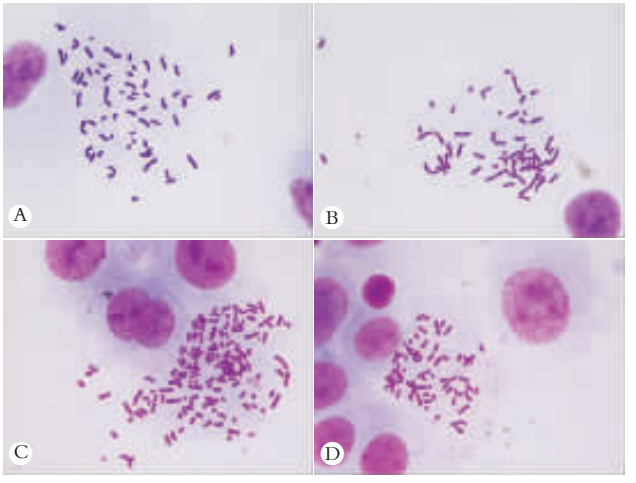
表1 实时荧光定量PCR检测各组esp1基因表达结果对比表($\bar{x}\pm s$)

组别	A549(esp1/GAPDH)	Hela(esp1/GAPDH)
未转染组	0.182±0.031[a]	0.293±0.030[a]
空载体组	0.189±0.045	0.325±0.033
转染组	6.257±0.081	5.162±0.073

a：$P<0.01$，与转染组比较

2.2 肿瘤细胞esp1上调表达前后染色体结果

利用VIDEOTEST软件对制备的染色体进行分析，结果可见Hela细胞染色体均数(83.6条)大于A549细胞(65.1条)，相应的转染pIRE-S2-EGFP-ESP1质粒后肿瘤细胞染色体均数大于转染前，Hela细胞均数从83.6条降低到71.2条，A549细胞均数从65.1条降到56.8条。转染后染色体分裂相仍然异常，但染色体的均数水平明显降低($P<0.01$)(图1，表2)。



A 未转染A549细胞；B 转染后A549细胞；C 未转染Hela细胞；D 转染后Hela细胞

图1 转染前、后染色体分裂相 (姬姆萨染色×1 000)

表2 A549和Hela细胞染色体计数(个，$n=100$，$\bar{x}\pm s$)

组别	A549	Hela
未转染组	65.1±5[a]	83.6±6[a]
空转染组	64.5±8	85.1±7
转染组	56.8±6	71.2±6

a：$P<0.01$，与转染组比较

2.3 流式细胞仪检测肿瘤细胞esp1上调表达前后染色体倍性结果

从流式结果看出，转染前后A549、Hela细胞均为非整倍体细胞，转染后DI值明显降低($P<0.01$)(表3)。

表3 流式细胞仪检测肿瘤细胞染色体倍性DI结果($\bar{x}\pm s$)

组别	A549	Hela
未转染组	1.67±0.05[a]	2.20±0.07[a]
空转染组	1.62±0.07	2.13±0.09
转染组	1.43±0.10	1.89±0.08

a：$P<0.01$，与转染组比较

3 讨论

正常细胞染色体的分离机制一直被广泛研究，而esp1表达的分离酶在染色体分离中发挥着重要作用[7,8]。目前对分离酶在正常细胞中作用发挥和活性调节已经有了一定的认识，其功能主要是裂解粘合素的亚单位Scc1/Mcd1，促成黏合素复合体的解离和姐妹染色单体的分离及稳定纺锤体。对其调节方式目前所知主要有结合保全素、底物磷酸化、自身磷酸化和自身裂解[9]。对于分离酶在肿瘤细胞染色体紊乱的分

离机制中发挥作用研究甚少，但这可能会为肿瘤的基因治疗提供新的靶点。

本实验观察到：esp1 上调表达后可以使不同肿瘤细胞异常分裂相受到抑制，染色体倍性降低，其可能的机制如下：①在有丝分裂过程中，染色体不分离可阻止细胞质分裂完成，导致双核细胞形成，从而防止非整倍体细胞的发生，提出“细胞周期中存在防止非整倍体细胞发生的保护机制”的新概念，并进一步证实“双核细胞的命运控制在非整倍体细胞发生中起重要作用”[10]。分离酶在肿瘤细胞中的低表达，可能会是造成其染色体不分离的原因之一，而我们通过上调表达肿瘤细胞 esp1，则可能是导致染色体倍性降低的诱导因素之一；②分离酶蛋白与 caspases 同属于半胱氨酸蛋白酶，而 caspases 家族在细胞凋亡中起着极其重要的作用，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[11]。因此，分离酶有可能与 caspases 一样能够参与细胞凋亡过程。肿瘤细胞 esp1 表达上调后可能会导致肿瘤细胞的凋亡增加，也可能是肿瘤细胞染色体倍性降低的原因之一。

在本实验中我们观察到染色体倍性不同的肿瘤细胞之间 esp1 表达差异不明显。这可能是由于导致肿瘤细胞染色体数目紊乱的机制较多，分离酶功能的改变仅是其中之一。今后还需要选择更多的肿瘤细胞观察。为了提高染色体数目检测的科学性和准确性，在染色体制备中通过反复摸索条件，尽可能使染色体充分散开同时又不让其过于分散。计数时每种细胞计数 100 个视野，采用不同实验人员手工和 VIDEOTEST-KARYO 3.1 仪器同时计数，取均数，尽可能消除各种误差。

esp1 上调表达可以促使恶性肿瘤细胞的染色体数目和倍性变化，但是关于过表达的 esp1 在肿瘤细胞生长、分裂机制中发挥的作用，促凋亡在肿瘤细胞逆转或部分逆转中发挥的作用，我们还知之甚少。需要进一步研究，期待其能为肿瘤治疗等问题寻找新的可能靶点和思路。

（致谢：衷心感谢医学遗传学教研室许雪青博士对本实验的无私帮助。）

参考文献：

[1] Uhlmann F. The mechanism of sister chromatid cohesion[J]. Exp Cell Res, 2004, 296(1): 80 – 85.

[2] Oueralt E, Uhlmann F. More than a separase[J]. Nat Cell Biol, 2005, 7(10): 930 – 932.

[3] 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.

[4] 刘丽莎，刘　昕. esp1 基因上调表达对 A549 细胞凋亡影响的研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(8)：828 – 830.

[5] 刘丽莎，刘　昕，程　英. Tet-on 系统诱导 esp1 基因表达对 A_(549)细胞染色体的影响[J]. 重庆医学，2006，35(20)：1862 – 1864.

[6] 刘丽莎，刘　昕，刘永康. A549 细胞转染 esp1 基因后生物学行为的变化[J]. 郑州大学学报：医学版，2006，41(5)：884 – 886.

[7] Kumada K, Yao R, Kawaguchi T, *et al*. The selective continued linkage of centromeres from mitosis to interphase in the absence of mammalian separase[J]. J Cell Biol, 2006, 172(6): 835 – 846.

[8] Nagao K, Yanagida M. Securin can have a separase cleavage site by substitution mutations in the domain required for stabilization and inhibition of separase[J]. Genes Cells, 2006, 11(3): 247 – 260.

[9] Sullivan M, Hornig N C, Porstmann T, *et al*. Studies on substrate recognition by the budding yeast separase[J]. J Biol Chem, 2004, 279(2): 1191 – 1196.

[10] Shi Q, King R W. Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines[J]. Nature, 2005, 437(7061): 1038 – 1042.

[11] Potempa J, Sroka A, Imamura T, *et al*. Gingipains, the major cysteine proteinases and virulence factors of Porphyromonas gingivalis: structure, function and assembly of multidomain protein complexes[J]. Curr Protein Pept Sci, 2003, 4(6): 397 – 407.

（编辑　栾　嘉）

《军医大学学报》(英文版)欢迎投稿

Journal of Medical Colleges of PLA 是由 3 所军医大学和南方医科大学共同主办的、国内外公开发行的综合性医学学术类英文期刊，是中国英文版科技论文统计源期刊，并被纳入中文科技期刊数据库、中国期刊网、万方数据库、重庆维普数据库。从 2007 年开始，本刊电子版由全球著名的科技出版集团爱思唯尔(Elsevier)负责海外发行，全文已进入 ScienceDirect 全文数据库，期刊网址 http://www.elsevier.com/locate/jmcpla。国内统一刊号：CN31 – 1002/R，国际标准刊号：ISSN 1000 – 1948。双月刊。设有论著、技术与方法、个案报道、交流等栏目。若无彩图，无需缴纳版面费，亦不收取审稿费，无稿酬。投稿要求：中(或大摘要)、英文稿各 1 份，照片提供 3 份。电子投稿 E-mail：gangela@mail.tmmu.com.cn。照片需以附件形式单独提供 JPG 或 TIF 格式。电子投稿请注明英文版。

联系地址：重庆市沙坪坝区高滩岩第三军医大学学报编辑部(400038)　　电话：(023)68752782