文章编号:1000-5404(2008)22-2075-03

论著

纺锤体检查点蛋白 BubR1 在肝癌组织和肝癌细胞株 HepG2 中的表达

刘 斌,王 箭,翁亚光,蔡 燕,刘子杰,李素彦 (重庆医科大学医学检验系,临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆市重点实验室,重庆 400016)

摘 要:目的 观察纺锤体检查点蛋白 BubR1 在人类肝癌组织、正常肝组织以及肝癌细胞系(HepG2)、正常肝细胞系(LO2)有丝分裂期表达水平的差异,以探讨 BubR1 蛋白在肝癌发生中的作用。**方法** 用荧光定量 PCR 和 Western blot 检测 BubR1 基因在肝癌组织、正常肝组织,以及在 2 种细胞中用 Nocodazole 处理前后的 mRNA 和蛋白的表达水平。**结果** BubR1 基因在正常组织中的表达高于肝癌组织,在 Nocodazole 处理前 2 种细胞中表达无显著差异,在处理后 2 种细胞中表达均增高,但在 LO2 细胞中上调水平大于 HepG2 细胞。**结论** BubR1 基因低表达可能在肝癌的发生过程中起重要作用。

关键词: 纺锤体检查点;BubR1 基因;肝癌
中图法分类号: R394.3;R730.23;R735.7 **文献标识码**: A

Expression of spindle checkpoint protein BubR1 in HepG2 cell line and human hepatoma tissue

LIU Bin, WANG Jian, WENG Ya-guang, CAI Yan, LIU Zi-jie, LI Su-yan (The Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To study the differential expression of the spindle checkpoint protein BubR1 gene between human hepatoma tissue and human hepatic tissue, and between human hepatoma carcinoma cell line HepG2 and human hepatic normal cell line LO2 during mitotic period. **Methods** Nocodazole was employed to synchronize their cell phase at dividing phase. Real-time fluorescent-quantitation PCR and Western blotting were respectively employed to detect the expressions of BubR1 mRNA and protein. **Results** The expressions of BubR1 mRNA and protein in human hepatic tissue was higher than that in human hepatoma tissue. The expressions of BubR1 mRNA and protein showed no significant difference between HepG2 and LO2 cell lines before Nocodazole treatment. After being treated with Nocodazole, the expressions of BubR1 mRNA and protein in both cell lines were significantly increased and the increment in LO2 cells was higher than that in HepG2 cells. **Conclusion** Low expression of BubR1 gene is likely to play an important role in the genesis and development of human primary hepatocellular carcinoma.

Key words: spindle checkpoint; BubR1 gene; hepatoma

纺锤体检查点(spindle checkpoint)的功能主要是监测细胞染色体分离。检查点功能丧失的后果之一是遗传不稳定性,促使细胞更易恶变[1]。BubR1 基因是纺锤体检查点重要的基因之一。近来研究表明 BubR1 基因在细胞分裂期表达不足将引起纺锤体微管无法与染色体着丝粒正常连接[2]。本实验通过荧光定量 PCR 和 Western blot 检测 BubR1 基因在肝癌组织和肝癌细胞株 HepG2 中的表达,以探讨其在肝癌发生机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料及分组

质粒抽提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒均购自上海华舜公司。BubR1 和 GAPDH 的一抗、二抗购自 Santa-Cruz 公司。SYBR Green 染料荧光定量试剂购自 TaKaRa 公司。RIPA 裂解液购自上海申能博彩。肝癌组织和正常肝组织取自重庆医科大学附一院(肝癌组织以医院的病理结果为主,正常肝组织重新做病理切片确认)。人肝癌细胞株 HepG2、人正常肝细胞株 LO2 均为本室保存。HepG2 和 LO2 细胞分别分为 Nocodazole 处理组和未处理组,共 4 组。

基金项目:国家自然科学基金(30371485)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371485)
作者简介:刘 斌,男,湖南省衡南县人,硕士研究生,主要从事肿瘤细胞周期和染色体分离机制方面的研究,E-mail: llbb520@yahoo.com.cn
通信作者:翁亚光,E-mail:yaguangweng@126.com
收稿日期:2008-01-25;**修回日期**:2008-03-25

1.2 标准质粒的构建

1.2.1 RNA 的提取和逆转录 将肝癌组织、正常肝组织,处理前后的 HepG2 细胞和 LO2 细胞,按照试剂盒说明书操作用 Trizol 试剂(GIBICO 公司)提取总 RNA。然后按照 TaKaRa 公司逆转录试剂盒说明书逆转录成 cDNA 保存备用。

1.2.2 PCR 反应及产物鉴定 引物序列由 TaKaRa 公司设计并合成,BubR1 基因上游引物:5′-GCTGTCTGCGATACTGT-GAAC-3′;下游引物:5′-CAATCCCTCCAAAATCAAGTG-3′。

内参 GAPDH 上游引物:5′-GCAGAGGGGGCAGAGATGA-3′,下游引物:5′-ACTCCTCTGGCTTCTCTGGTT-3′。PCR 反应条件为:94 ℃ 5 min,1 个循环;94 ℃ 15 s,63 ℃ 15 s,72 ℃ 15 s 35 个循环 ;72 ℃ 10 min,1 个循环;4 ℃保存。

1.2.3 T-A 克隆 将 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,按照华舜胶回收试剂盒说明书纯化 PCR 产物,按照 TaKaRa 操作说明书将其连接到 pMD18-T 质粒上,送本校感染病分子研究所测序。

1.3 荧光定量 PCR

用 SYBR Green 染料荧光定量法(TaKaRa 公司的试剂)检测 BubR1 基因的 mRNA 的水平,BubR1 基因与内参引物见前。用已稀释的标准质粒作为阳性标准品。扩增条件为:95 ℃ 10 s,1 个循环 ;95 ℃ 5 s,63 ℃ 31 s,40 个循环;荧光定量的溶解曲线分析显示产物为单一的特异峰,说明扩增产物单一,特异性好(图 1)。

1.4 细胞周期分析

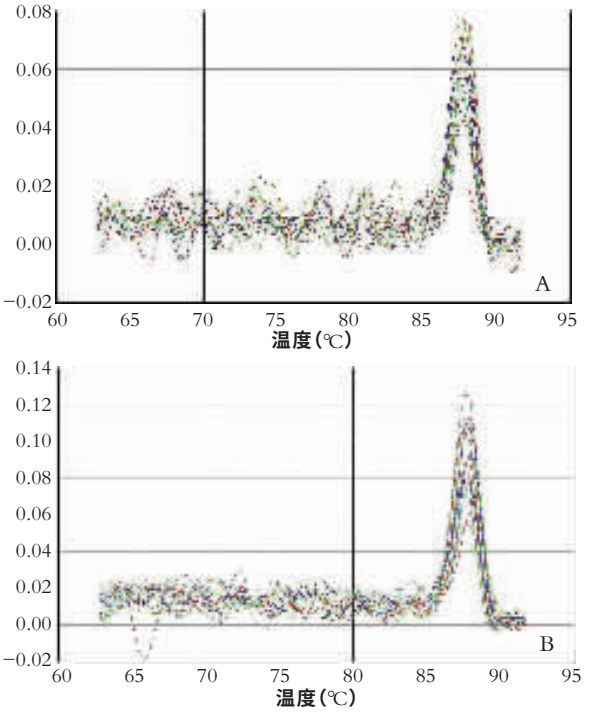
用 100 ng/ml Nocodazole 同时处理 HepG2 和 LO2 细胞 12 h,收集细胞 PBS 离心清洗 3 遍后,加入 PBS 配制的 75% 冰乙醇,4 ℃过夜,由本校儿科医学研究所流式细胞仪完成细胞周期分析。

1.5 Western blot 免疫印迹

将肝癌组织、正常肝组织以及处理前后 HepG2 细胞和 LO2 细胞,按照试剂盒说明书操作提取蛋白。采用 BCA 法进行蛋白质定量测定(参照试剂说明)。提出的蛋白经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,电转移至 PVDF 膜。用相应抗体行免疫印迹分析。

1.6 染色体计数及统计学分析

100 ng/ml Nocodazo 同时处理 6 ~ 12 h 后,收集细胞。按常规方法处理后,用 Giemsa 染色。分别计数分析 100 个以上分裂相,并计算 2 种细胞染色体数目异常的比例。所有结果用 SPSS 10.0 软件行 t 检验。



A:BubR1 基因的荧光定量 PCR 溶解曲线图;B:GAPDH 基因的荧光定量 PCR 溶解曲线图

图 1 荧光定量 PCR 溶解曲线图

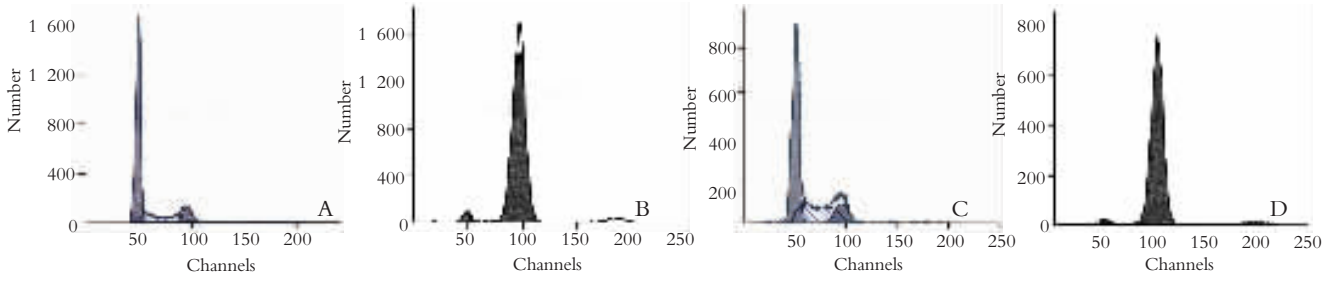
2 结果

2.1 细胞周期分析

用 Nocodazole 处理使 HepG2 细胞和 LO2 细胞在分裂期同步,促使 BubR1 蛋白表达。流式细胞仪检测显示,处理前 LO2 细胞 G_2/M 期的比例(0.096 7 ±0.024 1)与 HepG2 细胞(0.125 0 ± 0.028 7)比较,差异不显著(P >0.05,图 2A、C)。处理后 2 种细胞的 G_2/M 期细胞都大幅增加(LO2 细胞:0.954 3 ±0.275,HepG2 细胞:0.978 3 ±0.218),见图 2B、D。处理后 2 组细胞中期细胞比例比较,差异不显著(P >0.05)。

2.2 BubR1 基因 mRNA 水平分析

荧光定量 PCR 检测 BubR1 基因在各组的 mRNA 水平,以 BubR1 基因 mRNA 拷贝数/GAPDH 基因 mRNA 拷贝数的均值作为该样品中 BubR1 基因表达水平。结果显示:处理前 HepG2 细胞为(0.009 78 ±0.002 93)、LO2 细胞为(0.007 96 ±0.002 7),无统计学意义,(P >0.05);处理后 LO2 细胞 BubR1 基因 mRNA



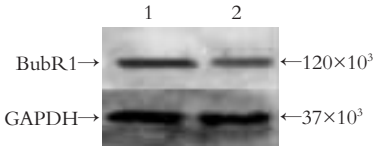
A:处理前 LO2 细胞;B:处理后 LO2 细胞;C:处理前 HepG2 细胞;D:处理后 HepG2 细胞

图 2 HepG2 和 LO2 细胞用 Nocodazole 处理前后的流式细胞仪检测结果

水平(0.168 35 ± 0.031 5)明显高于 HepG2 细胞(0.118 72 ± 0.030 3)($P<0.05$)。在正常肝组织中表达水平(0.023 78 ± 0.009 73)高于肝癌组织(0.014 58 ± 0.008 73)($P<0.05$)。

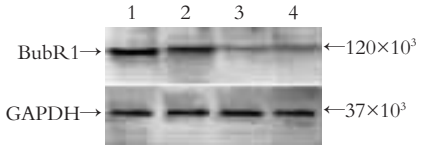
2.3　Western blot 结果

我们通过灰度扫描,发现 BubR1 蛋白表达量(与内参蛋白 GAPDH 的灰度值比值)在正常肝组织中为(0.356 ± 0.012),在肝癌组织中为(0.161 ± 0.009),差异有统计学意义($P<0.05$,图 3)。BubR1 蛋白在 Nocodazole 处理前 LO2 细胞(0.096 ± 0.027)和 HepG2 细胞(0.110 ± 0.029)中表达无明显差异(图 4 中 3、4 泳道),表达量差异无统计学意义($P>0.05$)。用 Nocodazole 处理后,BubR1 蛋白在 LO2 细胞(0.968 ± 0.031)、HepG2 细胞(0.618 ± 0.030)中表达明显增高,而且在 LO2 细胞中表达增高的幅度大于 HepG2 细胞(图 4 中 1、2 泳道),表达量差异有统计学意义($P<0.05$)。



1:正常肝组织; 2:肝癌组织

图 3　正常肝组织和肝癌组织的 Western blot 结果

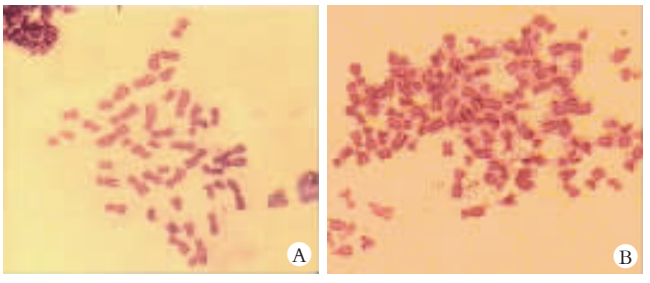


1:处理后 LO2 细胞 BubR1 蛋白;2:处理后 HepG2 细胞 BubR1 蛋白;
3:处理前 LO2 细胞 BubR1 蛋白;4:处理前 HepG2 细胞 BubR1 蛋白

图 4　Nocodazole 处理前后 LO2 细胞和 HepG2 细胞 Western blot 结果

2.4　染色体分析

同级分析了 2 种细胞各 100 个以上中期细胞分裂像,图 5 为 2 种细胞其中一个分裂像,统计结果显示 HepG2 细胞中染色体数目异常细胞的比例(33%)高于 LO2 细胞(12%)。



A:LO2 细胞染色体数目正常; B:HepG2 细胞染色体数目异常

图 5　部分染色体数目核型　(Giemsa × 1 000)

3　讨论

Marchio 等[3]应用比较基因组杂交技术对 50 例原发性肝细胞癌(primary human hepatocellular carcinoma, HCC)基因组图谱进行了分析,发现在 HCC 的发生、发展过程中存在多种染色体的异常。吴孟超等[1]发现有多个基因变异参与了肝细胞的癌变过程。以上表明 HCC 的发生是一种多染色体、多基因异常的结果,但引起多条染色体异常的机制尚有待进一步研究。

Fang 等[4]报道 BubR1 缺陷可导致纺锤体微管未与着丝粒正常连接时,细胞逃避纺锤体检查点的监控机制而进入后期,引起染色体数目异常细胞的发生。纺锤体检查点功能的异常与染色体不稳定(CIN)密切相关[5],而 CIN 在肿瘤的早期阶段存在已经得到证实。一些研究提示纺锤体检查点的基因表达水平的变化可能起到重要作用[6],如 Mad2 表达降低见于鼻咽癌、肝细胞癌、人乳腺癌及其一些乳腺癌细胞系和卵巢癌等,并与有丝分裂检查点关卡功能缺陷相关[7,8]。Bubl 的 mRNA 降低也见于结肠癌[9]。但 BubR1 与肝癌的关系鲜见报道。

本实验结果提示 BubR1 在正常肝组织中表达高于肝癌组织,肝癌组织中 BubR1 蛋白表达的降低引起的纺锤体检查点监控功能下降,很可能是导致肝癌细胞有丝分裂失控并导致染色体数目紊乱的重要原因之一。为此,我们进一步对培养的 LO2 细胞和 HepG2 细胞 BubR1 表达进行研究,当 2 种细胞(Nocodazole 处理后)被同时高度同步在中期时,尽管 BubR1 在 2 种细胞中都出现应激性高表达,但 BubR1 表达在 LO2 细胞中的表达明显高于 HepG2 细胞,从而表明 LO2 细胞在分裂期的应激引起上调 BubR1 的能力强于 HepG2 细胞。我们推测 HepG2 细胞 BubR1 上调表达水平的不足可能是引起纺锤体检查点的功能异常的重要原因之一,其最终导致细胞分裂失控和染色体数目异常及肿瘤细胞的发生。

参考文献:

[1] 丛文铭, 吴孟超. 肝癌基因组不稳定性的研究现状与展望[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(1): 5 - 8.

[2] 时洪凯, 陆振虞. 有丝分裂检验点基因 BubR1 的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(7): 1110 - 1115.

[3] Marchio A, Meddeb M, Pineau P, *et al*. Recurrent chromosomal abnormalities in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization[J]. Genes Chromosomes Cancer, 1997, 18(1): 59 - 65.

[4] Fang Y, Liu T, Wang X, *et al*. BubR1 is involved in regulation of DNA damage responses[J]. Oncogene, 2006, 25(25): 3598 - 3605.

[5] Tanudji M, Shoemaker J, LItalien L, *et al*. Gene silencing of CENP-E by small interfering RNA in HeLa cells leads to missegregation of chromosomes after a mitotic delay[J]. Mol Biol Cell, 2004, 15(8): 3771 - 3781.

[6] 易宗春, 党　磊, 周宗灿. 有丝分裂关卡信号途径及其在致癌过程中作用[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(6): 753 - 755.

[7] Jeong S J, Shin H J, Kim S J, *et al*. Transcriptional abnormality of the hsMAD2 mitotic checkpoint gene is a potential link to hepatocellular carcinogenesis [J]. Cancer Res, 2004, 64(23): 8666 - 8673.

[8] Wang X, Jin D Y, Wong Y C, *et al*. Correlation of defective mitotic checkpoint with aberrantly reduced expression of MAD2 protein in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Carcinogenesis, 2000, 21(12): 2293 - 2297.

[9] Shichiri M, Yoshinaga K, Hisatomi H, *et al*. Genetic and epigenetic inactivation of mitotic checkpoint genes hBUB1 and hBUBR1 and their relationship to survival[J]. Cancer Res, 2002, 62(1): 13 - 17.

(编辑　吴培红)