论著

文章编号:1000-5404(2009)09-0768-04

Bmi-1调节干性相关分子转录的初步分析

阮 艳[1],蹇 锐[1],程小星[2],牛翰婕[2],周恒宇[3],郑宏庭[3],胡福泉[1] (第三军医大学:[1]基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室,重庆 400038,[3]新桥医院内分泌科,重庆 400037;[2]解放军总医院309临床部,北京 100091)

摘 要:目的 探讨Bmi-1对肿瘤及胚胎干细胞中干性相关分子转录表达的影响。**方法** 分别构建鼠源和人源Bmi-1过表达载体pCI-GFP-mbmi1和pCI-GFP-hbmi1;瞬时转染鼠ES细胞CCE和人神经胶质瘤细胞U87;半定量RT-PCR检测胚胎干细胞中Oct-4、Nanog、c-Myc、Klf4和Sox2及肿瘤细胞中CD133、Nestin等干性分子的表达;克隆形成实验检测CCE细胞自我更新克隆形成能力。**结果** 瞬时转染Bmi-1过表达载体后,CCE细胞中Nanog的表达上调,Oct-4、Sox2和Klf4的表达无明显变化;U87细胞中Nestin和Oct-4表达上调,CD133、Nanog变化不明显;两者c-Myc的转录表达均显著降低;过表达Bmi-1促进CCE细胞自我更新克隆形成。**结论** Bmi-1参与了对肿瘤及胚胎干细胞中干性相关分子的转录调节。

关键词: Bmi-1;干细胞;干性相关分子;转录调控

中图法分类号: R329.2; R394-33; R394.3 **文献标识码:** A

Transcriptional regulatory effects of Bmi-1 on stemness-associated genes in embryonic stem cells

RUAN Yan[1], JIAN Rui[1], CHENG Xiao-xing[2], NIU Han-jie[2], ZHOU Heng-yu[3], ZHENG Hong-ting[3], HU Fu-quan[1] ([1]Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]309 Clinical Division, General Hospital of PLA, Beijing 100091; [3]Department of Endocrinology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the transcriptional regulatory effects of Bmi-1, a member of polycomb group, on stemness-associated genes in cancer and embryonic stem cells (CSCs and ESCs). **Methods** Eukaryotic expression vectors pCI-GFP-mbmi and pCI-GFP-hbmi were constructed and then transiently transfected into mouse ESCs, CCE cells and human glioma cell line, U87 cells respectively. Semi-quantitative RT-PCR was used to detect mRNA expressions of stemness factors, such as Oct-4, Nanog, c-Myc, Klf4 and Sox2 in CCE cells, and expressions of Bmi-1, Oct-4, Nanog, c-Myc, CD133 and Nestin in U87 cells. Clone formation assay was used to elucidate the potential to form self-renewal clones of CCE cells. **Results** Overexpression of Bmi-1 in CCE cells up-regulated the expression of Nanog. The expressions of other stemness factors such as Oct-4, Sox2 and Klf4 had no significant change. U87 cells transiently transfected with Bmi-1 promoted the expression of Oct-4 and Nestin. The expression level of c-Myc was reduced in the 2 kinds of cells. Overexpression of Bmi-1 promoted the formation of self-renewal clones in CCE cells. **Conclusion** Bmi-1 is involved in the transcriptional regulation of stemness-associated genes in CSCs and ESCs.

Key words: Bmi-1; stem cells; stemness associated genes; transcriptional regulation

肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)是肿瘤组织中存在的一小部分对肿瘤的形成、生长及转移起决定性作用的细胞群体。这类细胞能维持自我更新及多向分化潜能,其生物学特性与胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)极为相似[1]。近年的研究表明,ESCs自我更新的核心分子如Nanog、Oct-4及c-Myc等,同样在CSCs中异常表达,提示两者可能存在共同的干性调控通路[2,3]。原癌基因Bmi-1(B-cell specific moloney leukemia virus insert site 1)属polycomb基因家族(polycomb group, PcG)成员,其表达产物可单独或与其他polycomb蛋白组成PcG复合体参与转录调

基金项目: 国家自然科学基金(30700418, 30700384)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30700418, 30700384)

作者简介: 阮 艳,女,重庆市人,硕士研究生,主要从事干细胞自我更新分子调控方面的研究。电话:13752921623

通信作者: 程小星,电话:(010)66775493,E-mail: xc36cn@yahoo.com.cn
蹇 锐,电话:(023)68752241,E-mail: jianruilq2@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-12-22;**修回日期:** 2009-02-13

控[4]。研究显示,Bmi-1 在维持肿瘤和成体干细胞(adult stem cells)自我更新方面发挥作用,其过度表达与多种肿瘤的发生关系密切[5-7],而在 ESCs 中该分子亦呈高表达状态。目前,对于 Bmi-1 分子是否参与调节干性相关分子的表达,以及是否在 ESCs 中也发挥功能均缺乏有力的证据。本研究利用免疫印迹和半定量 RT-PCR 检测瞬时转染 Bmi-1 过表达载体后 ESCs 和 CSCs 干性分子的表达变化,以期为下一步深入探讨干细胞自我更新调控机制提供新的研究靶点和线索。

1　材料与方法

1.1　菌株、质粒及主要试剂

E. coli DH5α 和载体 pCI-neo、pEGFP-N_2 等为本室保存,pMD18-T 购自日本 TaKaRa 公司。*Taq* 酶及 AMV 逆转录酶等均为博日公司产品,转染试剂 Lipofectamine^{2000}、Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司,AP 染色试剂盒和鼠抗 Bmi-1 抗体(#05-637)为 Upstate 公司产品,兔抗 Nanog(AB9220)和兔抗 Oct4(AB3209)购自 Chemicon 公司,鼠抗 c-myc(14 - 6785)为 eBioscience 公司产品,鼠抗 β-actin(A1978)为 Sigma 公司产品,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 和羊抗兔 IgG 购自北京中杉公司产品,ECL 化学发光试剂为 Pierce 公司产品。

1.2　Bmi-1 真核表达载体构建

自行设计扩增人源和鼠源 Bmi-1 基因编码序列的通用引物:正义链 5′-GAATTCACCATGCATCGAACAACCAG-3′;反义链 5′-GTCGAC-GCTAACCAGAW(A/T)GAAGTTG-3′,分别以 CCE 和 U87 细胞 cDNA 为模板行 PCR 反应,条件为:95 ℃ 3 min 后,按 94 ℃ 1 min,60 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min 循环 30 次。PCR 产物 T-A 克隆至 pMD18-T 载体,转化 *E. coli* DH5α,提取质粒并测序鉴定。*Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切获得目的片段,定向克隆至 pCI-GFP(本室保存)载体,构建鼠源和人源 Bmi-1 表达载体 pCI-GFP-mbmi1、pCI-GFP-hbmi1。

1.3　细胞培养及转染

鼠源 ES 细胞株 CCE[8,9] 接种于 0.2% 明胶包被的培养板中,用 DMEM(含 15% 胎牛血清,0.1 mmol/L β-巯基乙醇,0.1 mmol/L 非必需氨基酸和 10 ng/ml LIF)于 37 ℃,5% CO_2 孵箱中培养。当细胞生长至 80% 融合度时按 1∶8 比例传代。神经胶质瘤细胞株 U87 培养于含 15% 小牛血清的 DMEM 中。

转染方法参照产品说明书,取对数生长期的细胞,以 8×10^5 个细胞/孔接种 24 孔板,每孔加入 0.8 μg 质粒和 2 μl 脂质体 Lipofectamine2000,以 pCI-GFP 转染作为对照。

1.4　激光共聚焦显微镜观察

转染 48 h 后,用 4% 多聚甲醛固定细胞,行 DAPI 染色后,激光共聚焦显微镜观察细胞中 EGFP 和 EGFP-bmi1 蛋白的表达。

1.5　免疫印迹

转染 48 h 后,以 1×SDS 上样缓冲液[0.05 mol/L Tris-HCl(pH 6.8),2% SDS,10% 甘油,0.05% 溴酚蓝,2.5% β-巯基乙醇]裂解细胞,沸水浴 5 min 后 12 000 × *g* 离心 3 min,10 ~ 20 μg 蛋白行 SDS-PAGE 电泳(5% 积层胶,12% 分离胶)。采用半干转印仪(Bio-Rad 公司),以 15 V 恒压转印 30 min,将凝胶中的蛋白质转移至 NC 膜上。NC 膜以含 5% 脱脂奶粉的 TTBS[0.05 mol/L Tris-HCl(pH 7.6),0.9% NaCl,0.02% Tween-20]室温封闭 2 h,一抗 4 ℃反应 48 h,HRP 标记的二抗(1/2 000)室温反应 2 h。用 ECL 化学发光试剂显示条带。

1.6　半定量 RT-PCR

转染后 48 h,吸去培养液,加入 500 μl Trizol 裂解细胞,参照产品说明书提取细胞总 RNA,反转录得到 cDNA,以 cDNA 为模板行 PCR 扩增,以 GAPDH 作为内参照。PCR 反应条件为:95 ℃ 3 min 后,按 94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min 循环,循环次数依不同分子而定(表 1)。

表 1　半定量 RT-PCR 引物

引物名称	引物序列	产物大小(bp)	循环次数
GAPDH	正义链:5′-TTAGCCCCCCTGGCCAAGG-3′ 反义链:5′-CTTACTCCTTGGAGGCCATG-3′	541	24
CCE 细胞			
bmi-1	正义链:5′-ACCAGCAAGTATTGTCCTATT-3′ 反义链:5′-CGATCTCGTCAGTCCATCCCTCT-3′	585	28
oct-4	正义链:5′-GGAAGCCGACAACAATGAGA-3′ 反义链:5′-AGAGCAGTGACGGGAACAGA-3′	429	26
nanog	正义链:5′-CAGCCCTGATTCTTCTACCA-3′ 反义链:5′-CAGATGCGTTCACCAGATAG-3′	386	26
c-myc	正义链:5′-CCCTACCCGCTCAACGACAG-3′ 反义链:5′-TTGCCTCTTCTCCACAGACACC-3′	224	26
klf4	正义链:5′-ACGATCGCAAGTTTGTGCTGAAGGC-3′ 反义链:5′-ACGATCGGCAGGAAAGGAGGGTAGTT-3′	601	28
sox2	正义链:5′-CCTCTTCCTCCCACTCCAGG-3′ 反义链:5′-TCTAGTCGGCATCACGGTTT-3′	364	28
U87 细胞			
CD133	正义链:5′- GCACTCTATACCAAAGCGTC-3′ 反义链:5′-CTCCCATACTTCTTAGTTTCCTC-3′	154	35
nestin	正义链:5′-GAGCAGCACTCTTAACTTACGATC-3′ 反义链:5′-CATTACTTTATTCAGGCAGGGACT-3′	467	30
oct-4	正义链:5′-CAAGCAGCGACTATGCACAACG-3′ 反义链:5′-ACTTCACCTTCCCTCCAACCAG-3′	392	35
nanog	正义链:5′-CTCTTCCTCTATACTAACATGAGT-3′ 反义链:5′-GGTGGAAGAGAACACAGTTCT-3′	332	35
c-myc	正义链:5′-ACCGAGGAGAATGTCAAGAGGC-3′ 反义链:5′-GAGTTCCGTAGCTGTTCAAGTTTGT-3′	262	28
bmi-1	正义链:5′-TCGGAAAGTAAACAAAGACAAAGAG-3′ 反义链:5′-TAGGCAAACAAGAAGAGGTGGA-3′	388	28

1.7　克隆形成实验

取转染 48 h 后的 CCE 细胞,计数后以 100 个细胞/孔接种于 96 孔板,培养 5 d 后,行 AP 染色(alkaline phosphatase staining),在显微镜下观察自我更新克隆形成情况,计算克隆形成率:(自我更新克隆数/总克隆数)×100%。

1.8　统计学分析

利用 Bio-Rad 凝胶成像扫描分析系统,分别计算目的条带的峰度值(Volume, INT × mm^2),以 GAPDH 为标准进行校正,以其均数代表该样本的表达强度,反应目的基因 mRNA 的表达水平。采用 SPSS 11.0 统计软件进行 *t* 检验。

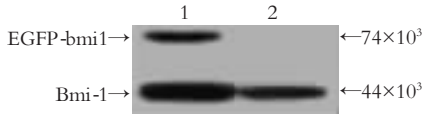
2 结果

2.1 pCI-GFP-mbmi1 和 pCI-GFP-hbmi1 表达载体的构建及鉴定

测序鉴定以及 BLAST 检索的结果显示:在 pCI-GFP-mbmi1 和 pCI-GFP-hbmi1 载体中均插入了 Bmi-1 的编码序列,分别与 GenBank 中鼠源(NM_007552)及人源(NM_005180)的 Bmi-1 序列相吻合。

2.2 EGFP-bmi1 融合蛋白的表达及亚细胞定位

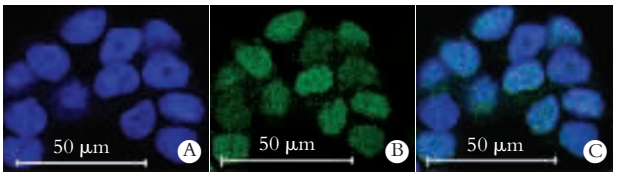
以 Bmi-1 单抗行免疫印迹的结果显示:pCI-GFP-mbmi1 和 pCI-GFP-hbmi1 转染 CCE 和 U87 细胞后,均在约 74×10^3 处出现特异性蛋白反应条带,与预测的 EGFP-bmi1 融合蛋白相对分子质量相符;而对照质粒 pCI-GFP 转染后只出现 44×10^3 的内源性 Bmi-1 蛋白反应条带(图 1)。



1:pCI-GFP-hbmi1; 2:pCI-GFP

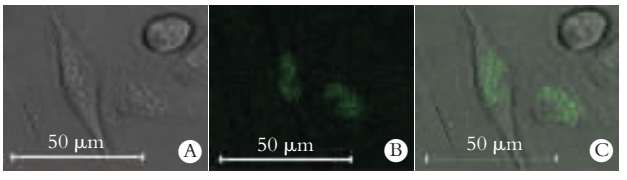
图 1 CCE 细胞中 Bmi-1 蛋白印迹结果

激光共聚焦显微镜观察的结果显示:对照质粒 pCI-GFP 转染后,绿色荧光均匀地表达于整个细胞浆与细胞核中;而 pCI-GFP-mbmi1 和 pCI-GFP-hbmi1 转染后绿色荧光则定位于细胞核内,并呈颗粒状分布(图 2、3)。



A:DPAI 核染色;B:荧光蛋白表达;C:荧光蛋白定位于核内

图 2 瞬时转染 CCE 细胞 48 h 后激光共聚焦显微镜下观察荧光蛋白定位

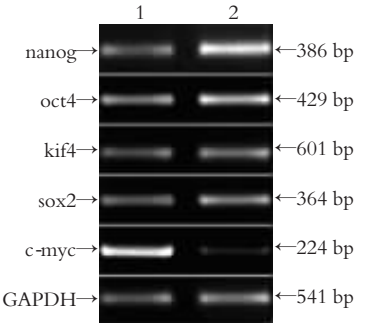


A: U87 细胞形态;B: 荧光蛋白表达;C: 荧光蛋白定位于核内

图 3 瞬时转染 U87 细胞 48 h 后激光共聚焦显微镜下观察荧光蛋白定位

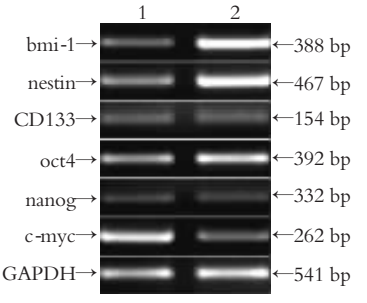
2.3 过表达 Bmi-1 对肿瘤及 ES 细胞干性分子表达水平的影响

半定量 RT-PCR 检测的结果显示:与转染 pCI-GFP 对照质粒相比,pCI-GFP-mbmi1 瞬时转染 ES 细胞株 CCE 后,其干性分子 nanog 的转录出现上调,oct-4、klf4 和 sox2 的表达无明显变化(图 4)。pCI-GFP-hbmi1 瞬时转染神经胶质瘤细胞 U87 后,nestin 及 oct-4 的表达均上调,CD133、nanog 无明显变化(图 5)。而在 2 种细胞中过表达 bmi-1 均导致 c-myc 的 mRNA 表达水平显著降低(图 4、5)。对 Nanog、Oct-4 及 c-Myc 行蛋白印迹结果显示其蛋白水平与转录水平表达变化一致(图 6、7)。



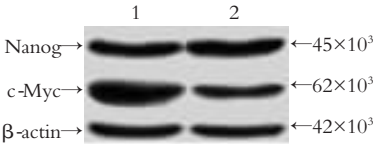
1:pCI-GFP;2:pCI-GFP-mbmi1

图 4 转染 CCE 细胞 48 h 后干性分子 mRNA 水平表达



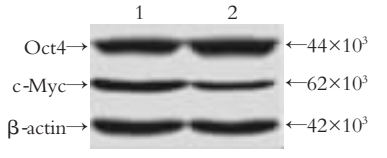
1:pCI-GFP;2:pCI-GFP-hbmi1

图 5 转染 U87 细胞 48 h 后干性分子 mRNA 水平表达



1:pCI-GFP;2:pCI-GFP-mbmi1

图 6 转染 CCE 细胞 48 h 后干性分子蛋白水平表达



1:pCI-GFP;2:pCI-GFP-hbmi1

图 7 转染 U87 细胞 48 h 后干性分子蛋白水平表达情况

2.4 CCE 细胞克隆形成实验结果

AP 染色结果显示:转染 pCI-GFP-mbmi1 的 CCE 细胞克隆形成率为 70%,而转染 pCI-GFP 的对照细胞仅为 50%,过表达 Bmi-1 提高了 ES 细胞自我更新克隆形成率($P<0.05, n=4$)。

3 讨论

Bmi-1 是转录抑制因子 PcG 家族成员之一,直接参与调控细胞的生长、增殖及衰老,其适量表达是个体发育所必需的,但高表达则与多种肿瘤的形成有关[6,7,10]。研究表明,Bmi-1 蛋白主要通过作用于 *INK4α* 基因座,抑制 *p16* 及 $p19^{ARF}$ 的表达,而在维持 CSCs 及造血、神经等成体干细胞的自我更新中发挥作用[11],但亦发现存在不依赖 *INK4α* 的信号通路[6],目前对其调控机制的了解还非常有限。近来越来越多的证据显示,Bmi-1 与 Nanog、Oct-4 等 ESCs 特异的干性

相关分子在分离的 CSCs 中共同表达[12,13];而本室的研究显示,在 ESCs 中 Bmi-1 分子同样呈高表达状态,因此我们推测 Bmi-1 有可能通过调节干性相关分子的表达从而参与调控干细胞的自我更新。

本实验选择构建了 N 端融合表达 EGFP 的鼠源和人源 Bmi-1 过表达载体,并分别转染了鼠 ES 细胞系 CCE 和人胶质瘤细胞系 U87。激光共聚焦显微镜观察的结果显示:融合蛋白 EGFP-bmi1 呈颗粒状在细胞核内集中表达,与已有研究相符[14]。

c-Myc 是调节细胞增殖、凋亡和自我更新的关键分子。现有研究表明,在鼠源 ESCs 中保持 c-Myc 活性可促进自我更新;而在人源 ESCs 中过表达 c-Myc 却引起细胞凋亡和分化[15,16]。Bmi-1 同 c-Myc 关系密切,其最早发现就被认为是与 c-Myc 协同作用促进小鼠 T、B 细胞淋巴瘤的形成[10]。Guney 等[17]的研究证实,c-Myc 可直接作用于 Bmi-1 启动子区域的 E-Box 位点,使其表达上调,进而通过抑制下游 $p16$ 及 $p19^{ARF}$ 抑癌基因的表达,促进细胞增殖,但对 Bmi-1 是否在转录水平调控 c-Myc 的表达尚少见报道。本实验结果显示,在肿瘤和胚胎干细胞中过表达 Bmi-1 后,c-myc 分子的 mRNA 表达水平均显著下调,提示 Bmi-1 和 c-Myc 之间可能存在负反馈调控机制。

CD133 和 Nestin 是神经干细胞及神经瘤中 CSCs 识别和分离的标志分子,在已分离的 $CD133^+$ 神经瘤干细胞中,发现 Bmi-1 与 Nestin、Oct-4、Nanog 等分子共同表达[13],但对于它们之间是否存在调控关系却少见报道。Oct-4 和 Nanog 是 ESCs 的干性标志分子,目前在成体干细胞及 U87、MCF-7、HeLa 等多种肿瘤细胞系中均发现其表达[2];肺癌和口腔鳞状上皮细胞癌的研究还表明,Oct-4 有利于肿瘤细胞的干性维持[3]。本研究在神经胶质瘤细胞 U87 中过表达 Bmi-1 后发现,干性分子 nestin 和 Oct-4 的转录明显上调,在人乳腺癌细胞系 MCF-7 中的研究也发现相似的结果,提示 Bmi-1 可能参与了它们的转录调节,但其具体的调控机制有待探讨。在 ES 细胞中,过表达 Bmi-1 引起 Nanog 表达上调。Nanog 是 ESCs 的关键干性调控分子,与 Oct-4、Sox2 等分子共同构成 ESCs 干性调控网络的核心,过表达 Nanog 的 ESCs 即使在无 LIF 的培养条件下也可维持多能性和自我更新状态。进一步的克隆形成实验结果显示,过表达 Bmi-1 提高了 ES 细胞的自我更新克隆形成率,说明 Bmi-1 可能通过上调 Nanog 的表达促进 ES 细胞自我更新。

ESCs 和 CSCs 的自我更新必定依赖于多个分子和通路的协同作用来加以维持,对其相关调控机制的研究不仅对了解胚胎发育的分子机制具有重要意义,也能为肿瘤治疗及 ESCs 的临床应用提供理论基础。本研究通过研究原癌基因 Bmi-1 对肿瘤及胚胎干细胞干性相关分子转录的影响,为深入探讨 ESCs 和 CSCs 的干性调控机制提供了线索。

参考文献:

[1] Reya T, Morrison S J, Clarke M F, *et al*. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. Nature, 2001, 414(6859): 105 - 111.

[2] Tai M H, Chang C C, Kiupel M, *et al*. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis [J]. Carcinogenesis, 2005, 26(2): 495 - 502.

[3] Chiou S H, Yu C C, Huang C Y, *et al*. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(13): 4085 - 4095.

[4] Boyer L A, Plath K, Zeitlinger J, *et al*. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells[J]. Nature, 2006, 441(7091): 349 - 353.

[5] Lessard J, Sauvageau G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells [J]. Nature, 2003, 423 (6937): 255 - 260.

[6] Kang M K, Kim R H, Kim S J, *et al*. Elevated Bmi-1 expression is associated with dysplastic cell transformation during oral cancinogenesis and is required for cancer cell replication and survival [J]. Br J Cancer, 2007, 96(1): 126 - 133.

[7] Singh S K, Hawkins C, Clarke I D, *et al*. Identification of human brain tumour initiating cells[J]. Nature, 2004, 432(7015): 396 - 401.

[8] Keller G, Kennedy M, Papayannopoulou T, *et al*. Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture[J]. Mol Cell Biol, 1993, 13(1): 473 - 486.

[9] Robertson E, Bradley A, Kuehn M, *et al*. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector [J]. Nature, 1986, 323(6087): 445 - 448.

[10] Haupt Y, Alexander W S, Barri G, *et al*. Novel zinc finger gene implicated as myc collaborator by retrovirally accelerated lymphomagenesis in E mu-myc transgenic mice[J]. Cell, 1991, 65(5): 753 - 763.

[11] Jacobs J J, Kieboom K, Marino S, *et al*. The oncogene and Polycomb-group gene Bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus[J]. Nature, 1999, 397(6715): 164 - 168.

[12] Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(3): 781 - 786.

[13] Liu G, Yuan X, Zeng Z, *et al*. Analysis of gene expression and chemoresistance of $CD133^+$ cancer stem cells in glioblastoma[J]. Mol Cancer, 2006, 5: 67.

[14] Cohen K J, Hanna J S, Prescott J E, *et al*. Transformation by the Bmi-1 oncoprotein correlates with its subnuclear localization but not its transcriptional suppression activity[J]. Mol Cell Biol, 1996, 16 (10): 5527 - 5535.

[15] Cartwright P, McLean C, Sheppard A, *et al*. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism [J]. Development, 2005, 132(5): 885 - 896.

[16] Sumi T, Tsuneyoshi N, Nakatsuji N, *et al*. Apoptosis and differentiation of human embryonic stem cells induced by sustained activation of c-Myc[J]. Oncogen, 2007, 26(38): 5564 - 5576.

[17] Guney I, Wu S, Sedivy J M. Reduced c-Myc signaling triggers telomere-independent senescence by regulating Bmi-1 and p16(INK4α)[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(10): 3645 - 3650.

(编辑　王　红)