论著

文章编号:1000-5404(2009)24-2440-04

Cyclin B1 的启动子在 HeLa 细胞 cyclin B1 蛋白调控中的作用

王 昱[1,2],卢仲义[2],许 峰[2],朱宇迪[3],朱宇熹[4,5] ([1]第三军医大学西南医院儿科,重庆 400038;重庆医科大学:[2]附属儿童医院 PICU,重庆 400014,[3]附属儿童医院药剂科,重庆 400014,[4]附属第一医院肿瘤科,重庆 400016;[5]Department of Radiation Oncology & Image-applied Therapy, Kyoto University Graduate School of Medicine,Japan)

摘 要:目的 通过检测细胞周期素 B1(cyclin B1)的启动子在 HeLa 细胞的不同细胞周期的活性变化,探讨其对 cyclin B1 蛋白的调控作用。**方法** 采用 PCR 法获得 HeLa 细胞 cyclin B1 的启动子,通过基因重组插入 pGL3 promoter vector 从而获得质粒 pGL3/cyclin B1 promoter。采用羟基脲(hydroxyurea, HU)对 HeLa 细胞进行细胞周期 G_1、S、G_2/M 期的同步化,通过流式细胞术法确认。用短暂转染的方法,将重组的质粒转染至 HeLa 细胞。通过双萤光素酶活性检测分析 cyclin B1 的启动子在 HeLa 细胞周期 G_1、S、G_2/M 期的活性的变化。**结果** 双荧光素酶活性检测 cyclin B1 的启动子活性在 G_1 期最高,S 期最低,G_2 期中等。**结论** 在 HeLa 细胞中 cyclin B1 的启动子活性和 cyclin B1 蛋白的表达并不同步。

关键词: 细胞周期素 B1; 启动子; HeLa 细胞;荧光素酶

中图法分类号: R329.28;R394-33;R394.3 **文献标识码:** A

Role of promoter of cyclin B1 in regulation of cyclin B1 protein in HeLa cells

WANG Yu[1,2], LU Zhong-yi[2], XU Feng[2], ZHU Yu-di[3], ZHU Yu-xi[4,5] ([1]Department of Pediatrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Department of PICU, [3]Department of Pharmacology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, [4]Department of Oncology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; [5]Department of Radiation Oncology & Image-applied Therapy, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto 606-8507, Japan)

Abstract: Objective To investigate the activity of cyclin B1 promoter in different cell cycle of HeLa cells and to explore its regulation role on cyclin B1 protein. **Methods** The cyclin B1 promoter of HeLa cells was obtained by PCR amplification, and then the PCR product was inserted into the plasmid of pGL3 promoter vector by recombination to construct the plasmid of pGL3/cyclin B1 promoter. HeLa cells were synchronized in G_1, S, G_2/M phase by hydroxyurea (HU), which was then identified by flow cytometry. The plasmid of pGL3/cyclin B1 promoter was transiently transfected into HeLa cells. The dual luciferase assay was performed in the HeLa cells at G_1, S, or G_2/M phase for the promoter activity. **Results** The activity of cyclin B1 promoter was highest in G_1 phase, decreased in S phase, and was medium in G_2/M phase. **Conclusion** The activity of cyclin B1 promoter is different from the expression of cyclin B1 protein in the cell cycles of HeLa cells.

Key words: cyclin B1; promoter; HeLa cell; luciferase

细胞周期素(cyclin)是调节细胞周期的重要蛋白质,和细胞周期依赖性激酶(cell cycle dependent kinase, CDK)相结合后具有磷酸化靶蛋白的作用,是细胞周期前进的动力之一。cyclin B 蛋白的浓度随着细胞周期的前进而发生相应的变化,在 G_1 期低,在 S 期升高,G_2/M 期达最高,有丝分裂结束时迅速降低。cyclin B 与 CDK1(又称细胞周期分裂基因 2,cell division gene 2, P^{34}cdc2)连接形成的复合物,因其可磷酸化靶蛋白调控细胞周期进入 M 期,故又称为成熟促进因子(maturation promoting factor,MRF)[1]。当 cyclin B 与 P^{34}cdc2 结合后,P^{34}cdc2 激酶的 15-酪氨酸和 14-苏氨酸脱磷酸而激活,细胞进入 M 期进行有丝分裂;当进入有丝分裂后期,cyclin B 的迅速降解,MPF 释放出无活性的亚单位 P^{34}cdc2 失去活性,细胞退出 M 期,如果 cyclin B 降解受阻,细胞将停滞于 M 期[1,2]。cyclin B 蛋白浓度的调节复杂,牵涉到转录水平和翻译后水

作者简介:王 昱,女,山东省荣成市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事儿科急救医学和分子生物方面的研究,发表论文 10 篇。电话:(023)68773098,E-mail:ewy009@yahoo.com.cn

通信作者:朱宇熹,E-mail:zhuyuxi17@hotmail.com

收稿日期:2009-02-25;修回日期:2009-10-09

平,其中对 cyclin B1 研究更为广泛,其功能紊乱导致的细胞有丝分裂异常是肿瘤发生的重要原因。因此,本实验对 cyclin B1 启动子的活性进行研究,试图明确其对 cyclin B1 的调节作用。

1　材料与方法

1.1　细胞培养与试剂

HeLa 细胞系(HeLa human cervical epithelial adenocarcinoma cell line)购自 American Type Culture Collection。培养于含 10% 的热灭活小牛血清、100 U/ml 青霉素及 100 U/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基(Promega)中,在 37 ℃,含 5% CO_2 的培养箱内培养传代。

1.2　PCR 引物设计与合成

检索 NCBI Nucleotide,查出 cyclin B1 的启动子序列,cyclin B1 基因的上游序列 949 碱基对,设计 PCR 引物 1 对,引物由 Sigma-aldrich 公司合成。5′端引物加有 *Xho* Ⅰ 酶切位点,3′端引物加有 *Hind*Ⅲ酶切位点。引物序列: cyclin B1 正义链:5′-ACTCGAGGATCTAGAGAGAATCTGAGCAAA-3′; 反义链:5′-ATAAGCTTCAGCCAAGGACCTACACCCAGC-3′,产物长度 969 bp。

1.3　PCR 扩增

按常规酚抽提方法提取 HeLa 细胞基因组 DNA。以此作模板,应用 KOD plus 酶(Toyobo)进行扩增。PCR 条件为 96 ℃ 1 min;96 ℃变性 15 s,60 ℃退火 15 s,68 ℃延伸 1 min,30 个循环;最后 68 ℃延伸 5 min。PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色并照相予以鉴定。

1.4　PCR 产物的克隆、构建质粒、质粒的鉴定

E. coli 大肠杆菌 DH5α 菌株,萤火虫荧光素酶报告基因表达载体质粒 pGL3 启动子购自 Promega。Ligation high DNA 连接系统、限制性内切酶等常规试剂购自 Toyobo。把 PCR 产物先克隆入 pBSⅡ-sk(+),构建 pBSⅡ-sk(+)/cyclin B1 启动子,然后酶切获得 cyclin B1 启动子片段,再克隆到质粒 pGL3 启动子中,实验操作完全按试剂盒提供的操作说明书进行。以 *Xho* Ⅰ和 *Hind*Ⅲ双酶切 PCR 产物和质粒 pBSⅡ-sk(+)和 pGL3 启动子,1% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色并照相鉴定插入片段和载体,电泳、切胶、提取,ligation high(Toyobo)连接,构建萤火虫荧光素酶报告基因表达载体,重组子命名为 pGL3/cyclin B1 启动子质粒。

构建的确认包括双酶切、电泳照相;基因测序(ABI PRISM 310 Genetic Analyzer)按照操作手册进行,与数据库的序列比较;短暂转染 HeLa 细胞(polyfec QIAGEN),测定荧光素酶的活性。

1.5　流式细胞仪判断羟基尿(HU)同步 HeLa 于不同的细胞周期

培养 HeLa 细胞至对数生长期,5×10^4/ml 接种在 6 孔培养盘。HU 终浓度 1 mmol/L,作用 24 h,然后换无 HU 培养基,根据 HeLa 细胞的周期分布每 30 分钟采集细胞作流式细胞检测细胞的周期分布,用 HU(-)的样本作对照。流式细胞检测方法:吸出培养基,1 × PBS + EDTA 洗 3 次,胰酶消化后,40 ℃ 3 000 r/min 离心 5 min 收集细胞,在漩涡振荡器上充分振荡使成单个细胞悬液,70% 预冷的乙醇固定,流式细胞仪(BD Bioscience)检测各时相中细胞的比例,每次分析 1×10^4 个细胞,应用 Cell Quest software (BD Bioscience)分析软件分析。实验重复 3 次。

1.6　双荧光素酶活性检测

接种 1×10^4 个细胞于 24 孔板中,24 h 后当细胞长至 50% ~ 70% 融合度时,利用 polyfec(QIAGN)将质粒 pGL3/cyclin B1 启动子和 pRL 转染入细胞,其中 pRL 为内对照,以平衡转染效率。用 berthold reporter gene assays 仪器检测,按操作说明书进行,设空白对照。转染 20 h 后,加入 HU,24 h 后换培养基,移除 HU,然后在特定细胞周期收获细胞。制备1 × 细胞裂解液(passive lysis buffer)。在检测仪专用检测管中加入 10 μl 细胞裂解液,20 μl 荧光素酶催化底物(LAR Ⅱ Promega),混匀,测定 pGL3(萤火虫荧光素酶)活性,然后加入 pRL 的底物 Stop&Glo 10 μl,测定 pRL(海洋腔肠荧光素酶)活性,两者相除得最终结果。实验重复 3 次, 每管测定重复 3 次。

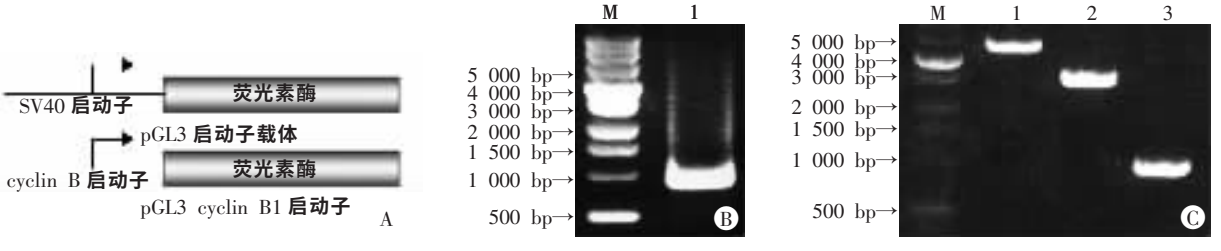
1.7　统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件进行结果处理,实验组与对照组之间及组内的比较用 *t* 检验。

2　结果

2.1　构建质粒 pGL3/cyclin B1 启动子

图 1A 示构建 pGL3/cyclin B1 启动子的方法主要是用 cyclin B1 启动子取代 SV40 启动子。图 1B 示 PCR 扩增 pGL3/cyclin B1 启动子,图 1C 示酶切 PCR 产物、质粒 pBSⅡ-sk(+)和 pGL3/cyclin B1 启动子。

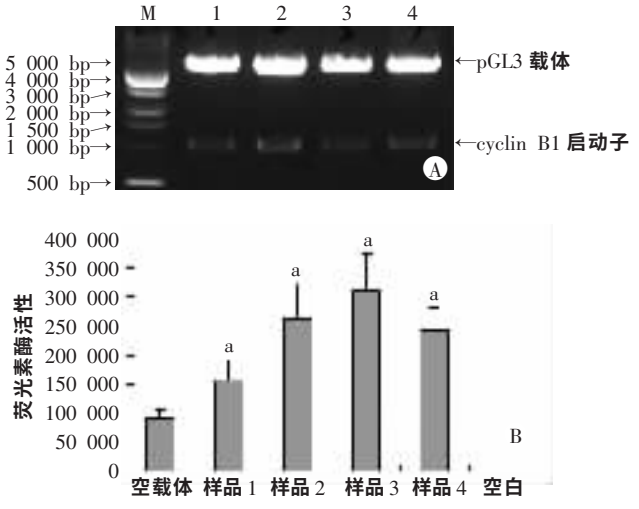


A: 质粒构建模拟图; B: cyclin B1 启动子 PCR 扩增产物凝胶电泳结果　M:标准; 1:cyclin B1 启动子; C: pGL3 启动子、pBSⅡ-sk(+)质粒和 cyclin B1 启动子片段凝胶电泳结果　M:标准; 1:pGL3 启动子载体;2: pBSⅡ-sk(+)质粒;3: cyclin B1 启动子

图 1　构建质粒 pGL3/cyclin B1 启动子

2.2 质粒 pGL3/cyclin B1 启动子功能鉴定

图2A示构建质粒后,转化 *E. coli*,培养盘上涂菌,37 ℃培养过夜,培养盘上挑选4个克隆,用 mini prep 试剂盒扩增、提取质粒,用 *Xho* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 酶切,电泳。照相显示载体和 cyclin B1 启动子被分开,大小和构建前一致。利用提取的质粒产物测序,鉴定是否有基因突变,结果第4样本的突变为758:C-T。其余样本均有2个突变。图2B示质粒扩增,nucleobund 试剂盒提取后,单质粒短暂转染 HeLa 细胞,测定荧光素酶的活性。设质粒 pGL3 启动子转染细胞为空载体(empty vector)对照,并设空白对照。结果显示与对照相比,各个样品的荧光素酶活性均显著升高($P<0.05$)。



A:连接产物转化 *E. coli*,选扩质粒酶切后凝胶电泳结果 M:标准;1~4:分别为4个样本;B:质粒短暂转染 Hela 细胞后荧光素酶活性

a: $P<0.05$,与空载体比较

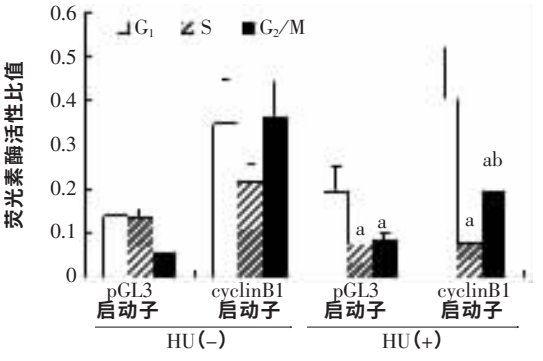
图2 质粒 pGL3/cyclin B1 启动子的鉴定

2.3 流式细胞仪验证 HU 将 HeLa 细胞同步化于 G_1、S、G_2/M 期

通过流式细胞仪在3个时间点检测证实,HU 将 HeLa 细胞同步于特定的 G_1、S 和 G_2/M 周期(图3)。

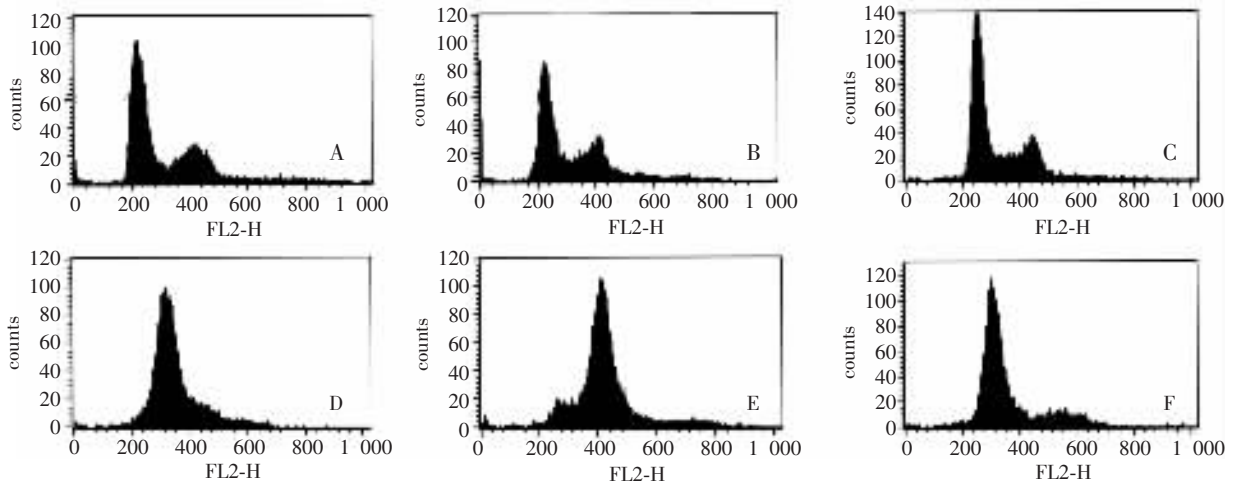
2.4 双荧光素酶活性检测结果

图4示 HeLa 细胞在同时短暂转染 pGL3/cyclin B1 启动子和 pRL 后,细胞裂解液处理,用 berthold reporter gene assays 仪器检测后,将所得值相除,得到的比值为双荧光素酶活性。用 pGL3 启动子空载体和 HU(-)为对照。结果显示在 pGL3/cyclin B1 启动子转染的 HeLa 细胞被 HU 同步化以后,双荧光素酶活性在 G_1 期最高,S 期最低,不同细胞周期活性比较差异有显著性($P<0.05$)。HU(-)组指转染后没有用 HU 同步细胞的对照,pGL3/cyclin B1 启动子的活性在 G_1 期和 G_2/M 期相似,而在 S 期偏低。pGL3 启动子空载体转染后 S 期和 G_1 期活性相似。总的说来,pGL3/cyclin B1 启动子在 HeLa 细胞的不同细胞周期显示了不同的活性。



a: $P<0.05$,与 G_1 期比较; b: $P<0.05$,与 S 期比较

图4 HeLa 细胞双荧光素酶活性检测



A、B、C:HU(-)对照组;D、E、F:HU(+)组;A、D:释放细胞3.5 h,细胞处于S期;B、E:释放细胞8.5 h,细胞处于 G_2/M 期;C、F:释放细胞18 h,细胞处于 G_1 期

图3 流式细胞仪检测不同处理条件下 Hu 对 HeLa 细胞周期同步化的影响

3　讨论

细胞周期素维持着细胞周期循环,在细胞周期的调控中起着重要的作用[3,4]。细胞周期调控机制主要是依赖细胞周期素、周期蛋白依赖性激酶、周期蛋白依赖性激酶抑制物。细胞周期调控异常是癌变机制的重要原因之一,绝大多数恶性肿瘤细胞都存在细胞周期检验点的异常。当细胞处于 G_1 期的时候,cyclin B1 浓度低,G_2 期升高,进入 M 期的时候最高,但随着细胞的分裂,cyclin B1 的浓度迅速降低。cyclin B1 蛋白有 D-box,在 M 期里,通过泛素化途径降解蛋白[2]。cyclin B1 参与的细胞周期和基因转录的合理调控是保持细胞进行正常增殖和分化的必要条件。如果 cyclin B1 的降解受到影响,其浓度不能按时降低,细胞将停滞在 M 期,而不分裂,则可能引起癌变。G_2/M 期是与细胞恶变有关的重要细胞周期时相,研究发现,肿瘤普遍存在 G_2/M 期调控因子 cyclin B1 表达的异常[5,6]。放射可以破坏 G_2/M 期细胞染色体,形成微核,G_2/M 期细胞对放射最敏感[7],现在的放射治疗常常利用一些药物可以将肿瘤细胞同步于 G_2/M 期,联合放射治疗以提高疗效,达到增加放射敏感性的作用[8]。cyclin B1 是促进细胞进入 G_2/M 期的细胞周期素,研究其调控机制对研究肿瘤的发展和放射敏感性的影响很有意义。

为了研究某一时相细胞的代谢、增殖、基因表达或凋亡,常需采取一些方法使细胞处于细胞周期的同一时相,即细胞同步化技术。细胞同步化的方法有很多,物理的或是化学的,比如振荡收集法、胸腺嘧啶核苷(TdR)双阻断法等。常常要分别采用几种方法联合应用,来同步细胞到特定的细胞周期[9]。我们采用 HU 这种 DNA 合成抑制剂可逆地抑制 S 期细胞 DNA 合成而不影响其他细胞周期运转,最终可将细胞群体阻断在 G_1/S 期交界处,然后将含 HU 的培养基置换出来,释放细胞后继续培养,按照 HeLa 细胞的细胞周期分布在不同的时间段作流式细胞术检测,来判断细胞所处的周期。经过反复实验建立了 HeLa 细胞同步化的方法。这个方法比较简单,便于操作。对于下一步的研究建立了很好的基础。

cyclin B1 启动子是受细胞周期依赖性元件(cell cycle-dependent element CDE)和细胞周期基因同源区(cell cycle genes homology region CHR)调节;启动子有 3 个 CCAAT-BOX,染色质的免疫共沉淀(Chromatin Immunoprecipitation ChIP)分析已证实一个具有组蛋白结构亚单位的保守三聚体转录因子(NF2Y)与 cyclin B1 启动子的 CCAAT-BOX 结合可以激活 CDE 和 CHR 调节的启动子[10]。关于 cyclin B1 的启动子在 cyclin B1 蛋白的调控中的作用曾有研究。该研究发现 cyclin B1 的启动子在 G_1 期最低,在 S 期升高,在 G_2/M 期最高,在 cyclin B1 蛋白的调控中起重要作用[11]。该研究用的是 pCAT 载体检测系统。但是,我们的研究发现,启动子在 S 期的活性低于 G_2/M 期,而在 G_1 期最高。在 HeLa 细胞中 cyclin B1 的启动子活性和 cyclin B1 蛋白的表达并不同步。从现有的文献看,cyclin B1 蛋白的调控应该是转录水平和翻译后水平共同控制。启动子的活性只是调控 cyclin B1 蛋白机制的一部分,关于启动子的作用还需要进一步研究。

荧光素酶的检测是间接的反应启动子的活性,有可能荧光素酶自身的活性或半衰期会影响启动子活性的,因此,接下来的研究我们准备修饰启动子和构建荧光蛋白的探针,探讨启动子的活性变化和与其他因子的相互作用。

参考文献:

[1] Borgne A, Versteege I, Mahe M, *et al*. Analysis of cyclin B1 and CDK activity during apoptosis induced by camptothecin treatment[J]. Oncogene, 2006, 25(56): 7361 - 7372.

[2] Li J P, Yang J L. Cyclin B1 proteolysis via p38 MAPK signaling participates in G2 checkpoint elicited by arsenite[J]. J Cell Physiol, 2007, 212(2): 481 - 488.

[3] Wolgemuth D J. Function of cyclins in regulating the mitotic and meiotic cell cycles in male germ cells[J]. Cell Cycle, 2008, 7(22): 3509 - 3513.

[4] 陈　济, 潘巍巍, 成海恩, 等. 细胞周期素 E 的干挠 RNA 对 HeLa 细胞增殖的抑制作用[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(22): 2135 - 2138.

[5] Zhao M, Kim Y T, Yoon B S, *et al*. Expression profiling of cyclin B1 and D1 in cervical carcinoma[J]. Exp Oncol, 2006, 28(1): 44 - 48.

[6] Song Y, Zhao C, Dong L, *et al*. Overexpression of cyclin B1 in human esophageal squamous cell carcinoma cells induces tumor cell invasive growth and metastasis[J]. Carcinogenesis, 2008, 29(2): 307 - 315.

[7] 朱宇熹, 陈绪元. 微核率在放射治疗中的研究进展[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2003, 12(4): 287 - 288.

[8] 朱宇熹, 陈绪元, 陈晓品. 同步放化疗治疗Ⅲ期非小细胞肺癌的研究进展[J]. 重庆医学,2002, 31(10): 1000 - 1003.

[9] Takita M, Furuya T, Sugita T, *et al*. An analysis of changes in the expression of cyclins A and B1 by the cell array system during the cell cycle: comparison between cell synchronization methods[J]. Cytometry A, 2003, 55(1): 24 - 29.

[10] Wasner M, Haugwitz U, Reinhard W, *et al*. Three CCAAT-boxes and a single cell cycle genes homology region (CHR) are the major regulating sites for transcription from the human cyclin B2 promoter [J]. Gene, 2003, 312: 225 - 237.

[11] Hwang A, Maity A, McKenna W G, *et al*. Cell cycle-dependent regulation of the cyclin B1 promoter[J]. J Biol Chem, 1995, 270(47): 28419 - 28424.

(编辑　邓强庭)