文章编号:1000-5404(2009)16-1569-04

论著

CENP-I 表达下调对 HEK293 细胞生长及染色体分离的影响

袁泰先[1],蔡 燕[1],彭乙华[2],翁亚光[1],施 琼[1],刘子杰[1],刘 斌[1],李素彦[1] ([1]重庆医科大学临床检验诊断学省部共建教育部实验室,重庆市市级重点实验室,重庆 400016;[2]川北医学院附属医院急诊科,四川 南充 637000)

摘 要:目的 构建 CENP-I 特异性 RNA 干扰真核表达载体,体外观察抑制 CENP-I 基因表达对 HEK293 细胞生长、细胞周期和染色体数目异常率的影响。**方法** 构建 CENP-I siRNA 真核表达载体,脂质体法将 pGenesil-1 空载体和 pGenesil-1/CENP-I-siRNA-1、pGenesil-1/CENP-I-siRNA-2、pGenesil-1/CENP-I-siRNA-3 真核表达载体分别导入人胚肾 HEK293 细胞。转染后 24、48、72 h 收集细胞用 Western blot 和 FQ-PCR 检测 HEK293 细胞内 CENP-I 蛋白及 mRNA 水平的表达情况,以确定干扰效果及最佳干扰时间。MTT 法检测各实验组细胞生长情况,流式细胞术检测各组细胞的细胞周期分布,Giemsa 染色法计数细胞分裂指数,常规法制备染色体标本。**结果** 成功构建 CENP-I siRNA 真核表达载体,筛选出具有干扰效果的质粒载体即 pGenesil-1/CENP-I-siRNA-3,转染人胚肾 HEK293 细胞 72 h 后可使 CENP-I 蛋白及 mRNA 表达显著下调。CENP-I 表达降低的 HEK293 细胞生长速度明显减慢($P<0.05$),G_2/M 期细胞增加,分裂期细胞比例增大。**结论** RNA 干扰有效地特异性抑制着丝粒特异性蛋白质 CENP-I 的表达。CENP-I 的抑制可使人胚肾 HEK293 细胞生长减慢,增殖能力减弱,使细胞分裂期延长。

关键词: CENP-I 基因; RNA 干扰;细胞分裂指数
中图法分类号: R322.61;R329.25;R394.3 **文献标识码:** A

Down-regulated centromere protein-I arrests cell growth at G_2/M phase in human embryo kidney cells

YUAN Tai-xian[1], CAI Yan[1], PENG Yi-hua[2], WENG Ya-guang[1], SHI Qiong[1], LIU Zi-jie[1], LIU Bin[1], LI Su-yan[1] ([1]Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, [2] Department of Emergency, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan Province, China)

Abstract: **Objective** To construct the RNA interference eukaryotic expression vector targeting human centromere protein-I (CENP-I) and to observe its effect on the growth of human embryo kidney 293 cells (HEK 293). **Methods** The expression vectors of pGenesil-1/CENP-I-siRNA-1. pGenesil-1/CENP-I-siRNA-2 and pGenesil-1/CENP-I-siRNA-3 were constructed by gene recombination and then were transfected into the HEK293 cells by liposome. The expressions of CENP-I at the protein and mRNA levels were detected by Western blotting and fluorescence quality PCR (FQ-PCR). The effective vector and the best transfection time were selected. The growth and the cell cycle of the transfected cells were assessed by MTT assay and flow cytometry. Giemsa was used to stain the transfected cells to calculate the mitotic index. **Results** Sequence-specific siRNAs targeting CENP-I significantly down-regulated the expression of CENP-I in HEK293 cells. The recombinant plasmid of pGenesil-1/CENP-I-siRNA-3 was the effective vector. After transfecting for 72 h the best inhibited efficiency was achieved. In CENP-I-siRNA transfected cells, the rate of cell growth was decreased markedly. Cells at G_2/M phase and the mitotic index were increased conspicuous compared with the cells transfected with the blank vector or untransfected. **Conclusion** Down-regulation of CENP-I in HEK293 cells by sequence specific siRNA delays the cell growth and postpones the cell division.

Key words: centromere protein-I; RNA interference; cell mitotic index

基金项目: 国家自然科学基金(30371485);教育部博士培养基金(20060631012);重庆市重点项目[渝科发计字(2004)47号]
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371485), the Researcher Fund of Doctoral Program by Ministry of Education (20060631012), and the Key Project of Natural Science Foundation of Chongqing [(2004)47]

作者简介: 袁泰先,男,重庆市人,实验师,主要从事分子生物学技术方面的研究。电话:(023)68485992,E-mail:ytx118@yahoo.com.cn
通信作者: 翁亚光,电话:(023)68485045,E-mail: yaguangweng@126.com

收稿日期: 2009-02-27;**修回日期:** 2009-04-15

细胞的正常增殖是生物生长发育过程中的关键环节,在细胞增殖周期中有多种调控机制对细胞周期进行调控,其中染色体着丝粒可通过调节染色体的分离对细胞分裂期进行有效的控制。有研究表明,染色体着丝粒蛋白质(centromere proteins, CENPS)在着丝粒组装和功能的正确行使中发挥着重要作用,CENPS 表达异常可能会导致染色体不等分离和细胞分裂异常[1]。CENP-I 是着丝粒蛋白组装过程中较上游的一个蛋白质,在着丝粒装配和功能发挥过程中可能具有重要作用[2]。我们曾发现染色体数目异常的胚胎细胞中 CENP-I 的表达降低[3]。本研究采用 RNAi 技术构建 CENP-I 缺陷表达的人胚肾 HEK293 细胞模型,探讨下调 CENP-I 的表达对人胚肾细胞异常增殖、染色体的不等分离的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

HeLa 细胞,293 细胞, RNA 提取、RT-PCR、PMD18-T vector、定量 PCR、T_4DNA 快速连接等试剂盒、限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ、*Hind* Ⅲ均购自 TaKaRa;抗 CENP-I 为自备兔抗人多抗;羊抗人 β-actin 一抗购自 SantaCruz;二抗(为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 和兔抗羊 IgG,北京中杉);胎牛血清(杭州四季青);RPMI1640 培养基、DMEM 培养基(GIBCO);脂质体 Lipofectamin2000(Invitrogen);G418 购自 Promega;pGenesil-1 干扰载体、*E. coli* DH5α 由本室保存。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HeLa 细胞培养按文献[1]方法,并提取 RNA 制备定量 PCR 标准品;293 细胞(本室保存)培养(10% 胎牛血清,DMEM 培养基)。

1.2.2 标准品及引物设计 参照文献[4]制备 CENP-I 和 GAPDHFQ-PCR 标准品。Primer Premier 5.0 软件设计 CENP-I 和内参 GAPDH 引物、探针序列如下。

CENP-I 引物(产物为 92 bp):上游 5′-TGCAAATGGCAGTGGGATATT-3′;下游 5′-GTGTTTTTCCAAGGTTTTATCTTTATTCTG-3′;探针 MGB-FAM 5′-FAAGGTCCCATTAAAGCP-3′。

GAPDH 引物(产物为 66 bp):上游 5′-CCAGCAATGACCCCTTCATTG-3′;下游 5′-CATGGGTGGAATCATATTGGAAC-3′;探针 FAM 5′-CCTCAACTACATGGTTTAC-3′。

1.2.3 RNAi 载体的构建 根据 Genbank 序列设计干扰序列 CENP-I-siRNA-1、CENP-I-siRNA-2,文献[1]报道的干扰序列为 CENP-I-siRNA-3,序列两端分别带有 *Bam*H Ⅰ、*Hind* Ⅲ两个酶切位点。

CENP-I-siRNA-1 序列:5′-GATCCCGTAGAGACATTGGTCTCACTTCAAGAGAGTGAGACCAATGTCTCTACTTTTTTA-3′,5′-AGCTTAAAAAAGTAGAGACATTGGTCTCACTCTCTTGAAGTGAGACCAATGTCTCTACGG-3′。

CENP-I-siRNA-2 序列:5′-GATCCCGCGCTTGGAGAGCAACAATTTCAAGAGAATTGTTGCTCTCCAAGCGCTTTTTTA-3′, 5′-AGCTTAAAAAAGCGCTTGGAGAGCAACAATTCTCTTGAAATTGTTGCTCTCCAAGCGCGG-3′。

CENP-I-siRNA-3 序列:5′-GATCCCGCAACTCGAAGAACATCTCTTCAAGAGAGAGATGTTCTTCGAGTTGCTTTTTTA-3′,5′-AGCTTAAAAAAGCAACTCGAAGAACATCTCTCTCTTGAAGAGATGTTCTTCGAGTTGCGG-3′。

将 2 对单链 RNA(single strand RNA,ssRNA)于 95 ℃水浴中5 min,自然冷却退火。siRNA 模板与载体(*Bam*H Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切)16 ℃连接过夜。产物转 *E. coli* DH5α 感受态细胞,扩增阳性菌落提取质粒酶切鉴定,阳性质粒测序。

1.2.4 细胞转染 HEK293 细胞 37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养过夜,细胞生长融合达 90% ~95% 后分别加入 2 μl 脂质体和对应质粒 1.0 μg,同时以空载体转染作为对照。24、48、72 h 分别收集细胞提取总 RNA 和蛋白质进行 FQ-PCR 及 Western blot,确定最佳干扰效果及时间。未转染为对照组 1;转染空载体为对照组 2;转染 CENP-I-siRNA-1、CENP-I-siRNA-2、CENP-I-siRNA-3 分别为实验组 1、2、3 组。

1.2.5 FQ-PCR 扩增 各取 RNA 约 1 μg 逆转录为 cDNA 备用,GAPDH 为内参。PCR:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 15 s,51 ℃退火 30 s,40 个循环。每次实验制备标准曲线,每例 3 个平行管。平均拷贝数与相应内参平均拷贝数的比值进行统计学分析。

1.2.6 Western blot 检测 各标本以 50 μg 总蛋白质上样。SDS-PAGE:积层胶(60 V,30 min)、10% 的分离胶(120 V,2 h)分离蛋白质;半干转法(20 V,40 min)转膜(内参:20 V,15 min);5% 封闭用蛋白质干粉的 PBST 于 4 ℃过夜封闭,兔抗人抗 CENP-I 抗体 1∶400 稀释,37 ℃孵育 1 h,羊抗兔二抗 1∶5 000 稀释,37 ℃ 孵育 1 h;PBST 洗膜 10 min,ECL 法显色。Quantity one 软件分析。

1.2.7 细胞增殖实验 有效质粒转染 HEK293 细胞(每孔 1×10^3 个细胞)接种 96 孔板,设对照组 1(未转染组)、对照组 2(转染空质粒组)、实验组(干扰组即转染 CENP-I-siRAN-3)。第 1 ~7 天,分别进行 MTT 试验,波长 490 nm 处检测光密度值[*D*(490)],绘制细胞生长曲线。重复 3 次。

1.2.8 细胞周期的检测 干扰后 72 h 收集各组细胞,流式细胞仪测定细胞周期。

1.2.9 细胞分裂指数测定 收集各组细胞, PBS(磷酸盐缓冲液)清洗,用甲醇∶冰醋酸(3∶1)固定, Giemsa 染色。镜下观察,每一张片子计数 3 个视野至少 100 个细胞,计算分裂期细胞所占的比例,取平均数进行分析。

1.2.10 染色体核型鉴定 按常规法制备染色体,分析 50 ~100 个分裂象,计算染色体数目异常细胞所占的比例。

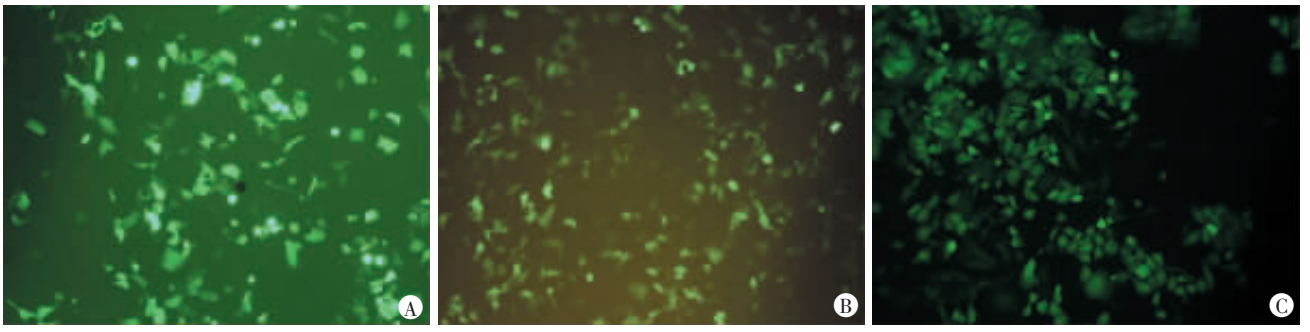
1.3 统计学处理

采用 SPSS 12.0 统计软件进行 *t* 检验。采用 SARS 软件进行成组秩和检验。

2 结果

2.1 成功构建 CENP-I-siRNA 真核表达载体

*Bam*H Ⅰ、*Hind* Ⅲ酶切重组质粒获得约为 60 bp 的片段,并测序鉴定。



A: 24 h; B: 48 h; C: 72 h

图 1　不同转染时间细胞转染效率　(间接免疫荧光 ×100)

2.2　细胞转染结果

将质粒与脂质体以 1 μg∶2 μl 的比例成功的将重组干扰质粒转入到 HEK293 细胞中,24 h 时转染效率达 30%,48 h 时达 60%,72 h 时可达 70% 以上(图 1),确定转染 72 h 为最佳转染时间。

2.3　FQ-PCR 检测转染细胞中 CENP-I mRNA 表达水平结果

标准曲线的 r^2 为 0.991 274。将各实验组与对照组 1 的比值进行两独立样本 t 检验。结果显示:实验组 3 与对照组 1 比较有显著性差异($P<0.05$,表 1),且转染 72 h 时抑制效果最明显($P<0.05$,表 2)。

表 1　转染后 HEK293 细胞 72 h 后 CENP-I 基因表达

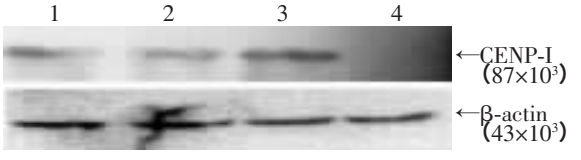
组别	CENP-I 拷贝数均值	GAPDH 拷贝数均值	CENP-I 拷贝数均值/GAPDH 拷贝数均值	P
对照组 1	97 949.91	1.26×10^7	0.007 77	
对照组 2	109 468.00	1.35×10^7	0.008 11	>0.05
实验组 1	89 263.70	1.27×10^7	0.007 03	>0.05
实验组 2	78 978.18	1.30×10^7	0.006 08	>0.05
实验组 3	2 354.07	2.01×10^7	0.000 12	<0.05

表 2　penesil-1/CENP-I-siRNA-3 质粒转染 HEK293 细胞 CENP-I 基因表达

组别	CENP-I 拷贝数均值	GAPDH 拷贝数均值	CENP-I 拷贝数均值/GAPDH 拷贝数均值	P
对照组 1	97 949.91	1.26×10^7	0.007 77	
转染 24 h	6 863.84	1.84×10^7	0.000 37	<0.05
转染 48 h	5 455.13	2.00×10^7	0.000 27	<0.05
转染 72 h	2 354.07	2.01×10^7	0.000 12	<0.05
转染 96 h	3 829.88	1.05×10^7	0.000 25	<0.05

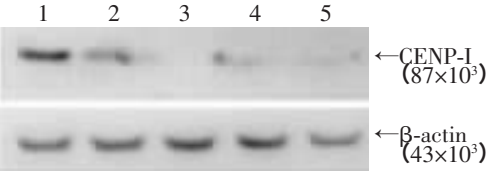
2.4　Western blot 鉴定转染细胞中 CENP-I 的蛋白表达水平

如图 2、3 所示,CENP-I-siRNA-3 转染细胞 72 h 时抑制效果最为显著,与 FQ-PCR 结果一致。



1:未转染;2:转染 CENP-I-siRNA-1;3:转染 CENP-I-siRNA-2; 4:转染 CENP-I-siRNA-3

图 2　Western blot 检测转染细胞 CENP-I 蛋白表达



1:未转染; 2:转染后 24 h; 3:转染后 72 h; 4:转染后 48 h; 5:转染后 96 h

图 3　Western blot 检测 CENP-I-siRNA-3 转染后不同转染时间的 CENP-I 蛋白表达

2.5　HEK293 细胞的增殖结果

MTT 法检测对照组 1、对照组 2、实验组 3 细胞的生长情况,连续检测 7 d,根据 3 次独立实验的结果绘制生长曲线,统计学分析结果显示实验组细胞生长变慢,增殖能力减弱($P<0.01$,图 4)。

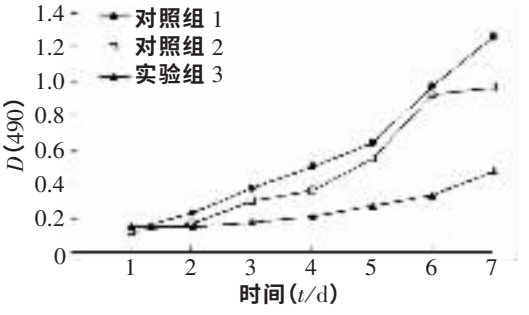


图 4　RNA 干扰后 HEK293 细胞生长曲线

2.6　CENP-I 表达降低对细胞周期的影响

流式细胞仪分析细胞 DNA 含量结果显示:实验组 3 G_2/M 期细胞较两对照组均有显著增加(表 3),说明有效干扰质粒抑制内源性目的基因表达后,较多细胞停留在细胞周期的 M 期。且 CENP-I 表达降低使细胞凋亡增加。

表 3　流式细胞仪检测细胞周期和细胞分裂指数结果(%)

组别	G_1	S	G_2/M	凋亡细胞	细胞分裂指数			
					24 h	48 h	72 h	96 h
对照组 1	64.58	27.76	7.66	2.55	8.00	7.95	7.69	8.10
对照组 2	59.19	31.95	8.86	1.90	8.11	8.05	7.96	8.03
实验组 3	44.96	37.15	17.89	9.88	7.76	20.63	23.53	22.41

2.7 细胞分裂指数

随转染时间增加,实验组3中分裂期细胞所占比例也增加(表3)。该结果与流式细胞仪检测结果一致,说明CENP-I表达的降低可能导致细胞的分裂期延长或停滞。

2.8 HEK293细胞转染质粒后染色体数目变化

对照组1与实验组3染色体异常率平均值分别为4.500%和31.012%,经SARS软件的成组秩和检验分析,2组间有显著性差异($P<0.01$),即CENP-I蛋白的表达下降可导致HEK293细胞染色体数目异常。

3 讨论

目前,对CENP-I的研究多在低等生物或肿瘤细胞中进行,利用人正常核型的细胞进一步探索其功能研究鲜有报道。人胚肾细胞(HEK293)是一种核型正常的细胞株,具有高转染率的优点,故本研究选取它作为研究对象。本实验中我们成功构建了CENP-I小干扰RNA载体,转染HEK293细胞抑制了CENP-I的表达,发现低表达CENP-I的HEK293细胞生长速度减慢,细胞增殖受到抑制,分裂期细胞增多。Nishihashi等[2]研究发现在鸡的DT40细胞敲除CENP-I基因后,细胞将长时间停滞于分裂的前中期,并出现染色体错排。说明CENP-I在染色体分离、细胞增殖中具有重要作用,同时还发现细胞染色体异常的比例增高。本课题组前期研究也发现自然流产染色体数目异常胚胎的CENP-I表达比染色体数目正常胚胎显著降低[3]。Hemmerich等[5]在HEp-2细胞中发现,CENP-I在细胞周期中能较稳定的存在于着丝粒内层,它对保证CENP-A、CENP-H等多种着丝粒蛋白与着丝粒的附着具有重要作用,从而使纺锤体微管与着丝粒的稳定连接。CENP-I表达降低可能会影响染色体着丝粒与纺锤体微管的正常连接,从而引起部分细胞阻滞在分裂中期。而部分细胞虽勉强能进入后期,却因染色体数目异常胚胎细胞的形成,大多数情况下可导致胚胎早期发育异常而流产。

近年来的研究表明,CENP-I表达的下调,除了可直接影响到CENP-C、CENP-F、MAD1、MAD2等在着丝粒的定位[1],还可通过其下游的着丝粒蛋白质Hecl、Nuf2来间接调控其他的蛋白质在着丝粒的附着[6],如Nuf2可与CENP-E的C-末端连接来干扰其在着丝粒的定位[7],而且CENP-I自身与着丝粒结合时还受到Sgt1、hMis12、CENP-H的影响[8-10]。故有研究者推测CENP-I是着丝粒的组装过程中的一个重要成分[11,12]。CENP-I表达降低,不仅影响CENP-I本身在着丝粒上的附着,还将直接或间接影响着丝粒的正确装配,导致纺锤体微管不能与着丝点正确附着,引起染色体分离发生异常,细胞分裂停滞在分裂中期,细胞增殖受阻。

总之,CENP-I参与着丝粒对细胞染色体分离和细胞增殖的调控。在临床可识别的流产中由染色体异常引起的高达30%~50%;肿瘤作为威胁人类生命的杀手,其发生和发展也与染色体异常有关,许多恶性肿瘤常表现为染色体数目异常。故CENP-I可作为预防染色体数目异常胚胎发生或具有染色体数目紊乱的肿瘤细胞的临床治疗靶点。

参考文献:

[1] Liu S T, Hittle J C, Jablonski S A, *et al*. Human CENP-I specifies localization of CENP-F, MAD1 and MAD2 to kinetochores and is essential for mitosis[J]. Nat Cell Biol, 2003, 5(4): 341-345.

[2] Nishihashi A, Haraguchi T, Hiraoka Y, *et al*. CENP-I is essential for centromere function in vertebrate cells[J]. Dev Cell, 2002, 2(4): 463-476.

[3] 蔡 燕, 王 箭, 袁泰先, 等. 染色体数目异常滋养层细胞中CENP-I基因的异常表达[J]. 生殖与避孕, 2008, 28(3): 156-161.

[4] Gerard C J, Olsson K, Ramanathan R, *et al*. Improved quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using real-time polymerase chain reaction and plasmid-DNA complementarity determining region III standards[J]. Cancer Res, 1998, 58(1): 3957-3964.

[5] Hemmerich P, Weidtkamp-Peters S, Hoischen C, *et al*. Dynamics of inner kinetochore assembly and maintenance in living cells[J]. J Cell Biol, 2008, 180(6): 1101-1114.

[6] Hori T, Haraguchi T, Hiraoka Y, *et al*. Dynamic behavior of Nuf2-Hec1 complex that localizes to the centrosome and centromere and is essential for mitotic progression in vertebrate cells[J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt 16): 3347-3362.

[7] Liu D, Ding X, Du J, *et al*. Human NUF2 interacts with centromere-associated protein E and is essential for a stable spindle microtubule-kinetochore attachment[J]. J Biol Chem, 2007, 282(290): 21415-21424.

[8] Steensgaard P, Garre M, Muradore I, *et al*. Sgt1 is required for human kinetochore assembly[J]. EMBO Rep, 2004, 5(6): 626-631.

[9] Amor D J, Kalitsis P, Sumer H, *et al*. Building the centromere: from foundation proteins to 3D organization[J]. Trends Cell Biol, 2004, 14(7): 359-368.

[10] Mikami Y, Hori T, Kimura H, *et al*. The functional region of CENP-H interacts with the Nuf2 complex that localizes to centromere during mitosis[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(5): 1958-1970.

[11] Chan G K, Liu S T, Yen T J. Kinetochore structure and function[J]. Trends Cell Biol, 2005, 15(11): 589-598.

[12] Liu S T, Rattner J B, Jablonski S A, *et al*. Mapping the assembly pathways that specify formation of the trilaminar kinetochore plates in human cells[J]. J Cell Biol, 2006, 175(1): 41-53.

(编辑 王 红)