

· 论 著 ·

cyclin B1 的启动子在乏氧条件下活性的变化

王 昱¹, 卢仲毅², 朱宇熹^{3△}(1. 第三军医大学西南医院儿科, 重庆 400038; 2. 重庆医科大学附属儿童医院 PICU 400014;
3. 重庆医科大学附属第一医院肿瘤科 400016)

摘要:目的 探讨细胞周期素 B1(cyclin B1)的启动子在乏氧条件下活性的变化。方法 采用 PCR 法获得对 HeLa 细胞 cyclin B1 的启动子,通过基因重组插入 pGL3 promoter vector 从而获得表达。荧光素酶的活性检测,了解通过双荧光素酶活性检测分析 cyclin B1 的启动子在乏氧条件下活性的变化。结果 双荧光素酶活性检测 cyclin B1 的启动子活性在乏氧条件下,表达明显下降。结论 在乏氧条件下,HeLa 细胞的 cyclin B1 的启动子活性下降,可能是乏氧条件下肿瘤细胞的自我保护机制。

关键词:乏氧;细胞周期素 B1;启动子;Hela 细胞;荧光素酶**中图分类号:**R730.23;R73-37**文献标识码:**A**文章编号:**1671-8348(2010)08-0930-03

Regulation of promoter of cyclin B1 in cyclin B1 protein

WANG Yu¹, LU Zhong-yi², ZHU Yu-xi^{3△}

(1. Pediatric Department, Southwest Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

2. Department of PICU, Children's Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China;

3. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the activity of cyclin B1 promoter in hypoxic condition. **Methods** Constructed the plasmid of pGL3/cyclin B1 promoter. Transiently transfected the plasmid of pGL3/cyclin B1 promoter into HeLa cells, and checked the activity of it. Then checked the activity of pGL3/cyclin B1 promoter in HeLa cell by dual luciferase assay in hypoxia. **Results** The activity of cyclin B1 promoter was much lower in hypoxia than that in normoxia. **Conclusion** The activity of cyclin B1 promoter decreases in hypoxia, which may relate to the self protection of cell.

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

恶性肿瘤内存在乏氧细胞已经是共识。乏氧的条件下,肿瘤细胞的许多基因的表达发生变化,使肿瘤对放疗的抗拒性增强,侵袭性增大而容易发生远处转移。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)相结合形成一套蛋白,能够磷酸化靶蛋白,作为细胞周期前进的动力。Cyclin B 与 CDK1 又称细胞周期分裂基因 2 (cell division gene 2 P³⁴cdc2)相连接形成一个复合物,磷酸化靶蛋白,调控细胞周期进入 M 期,故该复合物又称为成熟促进因子(maturation promoting factor, MPF)。当细胞进入有丝分裂后期,Cyclin B 的迅速降解,MPF 释放出无活性的亚单位 P³⁴cdc2 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 的功能紊乱可以导致细胞有丝分裂的异常。本研究通过构建 cyclin B1 的启动子的报告基因分析乏氧可能造成的 cyclin B1 的启动子的活性的影响。

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 The American Type Culture Collection(ATCC)。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% 的 CO₂ 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,选择 cyclin B1 基因的上游序列 949 个碱基对,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-Xho-sense: ACT CGA GGA TCT AGA GAG AAT CTG AGC AAA; Cyclin B1-Hind-anti: ATA AGC TTC AGC CAA GGA CCT ACA CCC AGC。

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、构建质粒及质粒的鉴定 萤火虫荧光素酶报告基因表达载体质粒 pGL3 promoter 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 promoter,转化大肠杆菌 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,然后酶切获得 cyclin B1 promoter 片段,再克隆到质粒 pGL3 promoter 中,共获得 4 个质粒,实验操作完全按试剂盒提供的操作说明书进行。以 Xho I、Hind III 双酶切 PCR 产物、质粒 pBSII-sk(+)和 pGL3 promoter,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 promoter 质粒。然后通过双酶切,电泳照相的方法判断质粒的结构是否正确;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。结果正确后,然后转化 E. coli 大肠杆菌 DH5α 菌株,扩增,提取纯化质粒(QIGEN)。

△ 通讯作者。

表 1 乏氧处理后细胞的双萤光素酶活性检测结果

环境条件	时间(h)	萤光素种类	pGL3/cyclin B1p	平均值	标准差
常氧	12	空载体	Firefly	11751	9277
			Renilla	196264	202408
		F/R		0.060	0.046
				0.049	0.049
		cyclin B1p	Firefly	23527	26015
			Renilla	193482	172866
		F/R		0.122	0.150
				0.114	0.114
		阴性对照	Firefly	77	66
			Renilla	86	67
乏氧	12	空载体	Firefly	11564	8978
			Renilla	188361	180773
		F/R		0.061	0.050
				0.062	0.062
		cyclin B1p	Firefly	33625	27427
			Renilla	434892	325827
		F/R		0.077	0.084
				0.083	0.083
		阴性对照	Firefly	109	62
			Renilla	112	76
		F/R		0.973	0.816
				0.968	0.968

1.5 短暂转染 将 Hela 细胞接种到 24 孔板中,密度为每孔 1×10^4 个细胞。孵育 24 h 后,每孔加入 400 ng 质粒与转染试剂 polyfec 试剂盒的混合液,进行短暂转染。孵育 24 h 后,按说明用 berthold reporter gene assays 仪器检测萤光素酶活性。制备 $1 \times$ 细胞裂解液(passive lysis buffer)。裂解细胞后,在检测仪专用检测管中加入 $10 \mu\text{L}$ 细胞裂解液, $20 \mu\text{L}$ 萤光素酶催化底物(Promega),混匀,测定萤光素酶活性,实验重复 3 次,每管测定重复 3 次。

1.6 双萤光素酶活性检测 接种 1×10^4 个细胞于 24 孔板中,24 h 后利用 polyfec 短暂转染质粒 pGL3/cyclin B1 promoter 和 pRL,按操作说明书进行,设空白对照。双萤光素酶试剂盒进行活性检测(promega),pRL 为内对照,以平衡转染效率。

1.7 乏氧培养箱处理 接种 1×10^4 个细胞于 24 孔板中,24 h 后,短暂转染质粒 pGL3/cyclin B1 promoter 和 pRL。孵育 24 h 后,把细胞置于 $1\% \text{O}_2$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 、 $94\% \text{N}_2$ 混合气体的乏氧培养箱内培养。乏氧培养 12 h 时取出。设常规标准培养对照组($5\% \text{CO}_2$ 、 $95\% \text{O}_2$)。12 h 后在乏氧培养箱内直接吸出培养基,加入 $1 \times$ 细胞裂解液 $100 \mu\text{L}$,然后取出,检测萤光素酶活性。

1.8 统计学方法 采用 SPSS11.0 统计学软件进行结果处理,实验组与对照组的对比用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

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

2.2 质粒 pGL3/cyclin B1 promoter 功能鉴定 图 2 示构建 4

个 pGL3/cyclin B1 promoter 质粒后,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,结果示第 4 样本的突变为 758:C-T。其余的均有 2 个突变。质粒扩增,提取后,单质粒短暂转染 Hela 细胞,测定萤光素酶的活性。设质粒 pGL3 promoter 转染细胞为空载体(empty vector)对照,并设空白对照。结果见图 3,和对照组相比,各个样品的萤光素酶活性差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

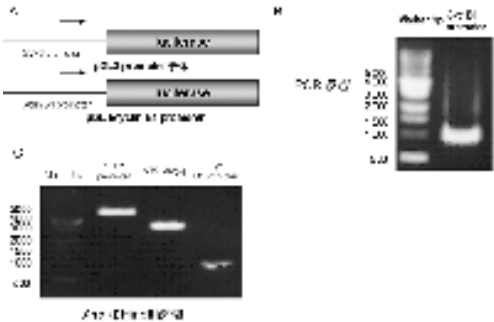


图 1 构建质粒 pGL3/cyclin B1p

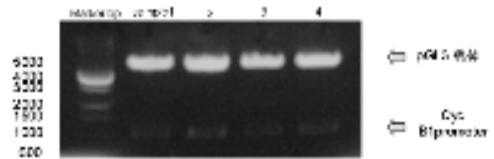


图 2 质粒 pGL3/cyclin B1p 的鉴定

2.3 乏氧处理后细胞的双萤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 promoter 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(表 1)。用 pGL3 promoter 空载体(empty vector)和未转染细胞为对照。由图 4 可以看到乏氧处理后 cyclin B1 启动子的活性明显降低($P<0.05$)。而空载体转染的细胞和未转染细胞在乏氧和常规培养下的活性没有差别。

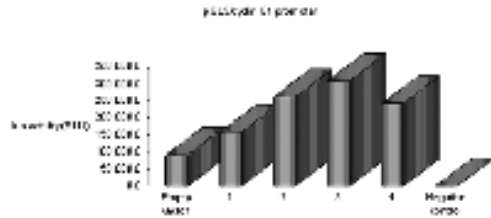


图 3 基因重组后挑选的 4 个 pGL3/cyclin B1p 质粒短暂转染 HeLa 细胞荧光素酶活性

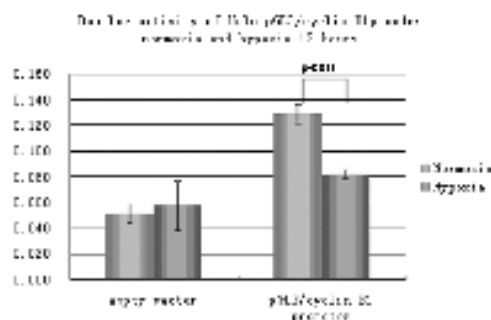


图 4 乏氧处理后细胞的双荧光素酶活性检测结果

3 讨 论

肿瘤乏氧的原因一般认为是氧供的绝对和相对不足。肿瘤体积的高速膨胀,在肿瘤中的一部分肿瘤组织由于离最近的血管距离越来越远,故导致血液供应的不足,最终导致了这一部分肿瘤组织的缺氧。因此,在临床上大部分恶性肿瘤在它的生长、发展过程中都有内部的乏氧区域存在。乏氧可产生增生抑制反应,即肿瘤组织氧浓度减少后导致增生期细胞和(或)随着离血管距离的增加而呈现的增生期细胞减少现象。临床上已证实肿瘤乏氧不仅导致放疗耐受和化疗耐受,而且在乏氧的选择下肿瘤更具有侵袭性,容易发生远处转移。研究发现乏氧能特异地抑制肿瘤细胞早 S 期 DNA 复制的启动。当处于 S 期的细胞再氧合时,引起 DNA 过度复制,其结果一方面引起放射抗拒基因的扩增而使肿瘤对放射治疗的抗拒性增加,另一方面引起肿瘤细胞染色体的畸变和重组,导致肿瘤的异质性增加,恶性增高。

细胞周期调控机制主要是细胞周期素,周期蛋白依赖性激酶、周期蛋白依赖性激酶抑制物。正常细胞周期中,在细胞周期素等调节因子的作用下,细胞忠实而有顺序地启动和完成细胞周期的过程。细胞周期调控异常是癌变机制的重要原因之一。细胞周期素可大致分成两大类:G1 期细胞周期素(G1 cyclins)及分裂期周期素(mitotic cyclins)。G1 周期素有周期素 D 及 E 2 种,分裂期细胞周期素有周期素 A、B^[3]。cyclin B 包括 B1、B2 和 B3,目前研究较多的是 B1 和 B2,其功能和调控相似。

当细胞处于 G1 期的时候,cyclin B1 浓度低,G2 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。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。G2/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 G2/M 期调控因子 cyclin B1 表达的异常^[4-5]。放射可以破坏 G2/M 期细胞染色体,形成微核,因此,G2/M 期肿瘤细胞对放射治疗最敏感^[6],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 G2/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^[7]。cyclin B1 是促进细胞进入 G2/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。

乏氧与细胞周期的关系很复杂,涉及许多细胞的生理和病理过程。研究发现乏氧可以将细胞阻断在 G1/S 期。其机制是乏氧诱导了乏氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)的表达,而 HIF-1 α 能够上调通过调节 p21 和 p27 的表达,阻断 cyclin A-cdk2 和 cyclin E-cdk2 复合物的功能,减少了 RB 的磷酸化,使细胞周期不能由 G1 期进入 S 期^[8]。但是关于 G2/M 期的研究中,目前还没有关于乏氧对 cyclin B1 启动子的活性影响的文献。因此,本研究设计并采用的由 cyclin B1 启动子的控制的荧光素酶载体。通过双荧光素酶活性检测,发现 cyclin B1 的启动子活性在乏氧的条件下明显低于常规培养,而空载体的双荧光素酶活性检测差异无统计学意义。这可能是细胞对乏氧自我保护的一种反应,乏氧造成了肿瘤细胞的周期运转明显下降,可能使肿瘤细胞内的变异积聚,从而增加肿瘤的侵袭性。cyclin B1 在细胞周期中的重要作用,对因为乏氧导致肿瘤进展和对治疗的耐受,具有重要意义。

参考文献:

- [1] Borgne A, Versteeg I, Mahé M, et al. Analysis of cyclin B1 and CDK activity during apoptosis induced by camptothecin treatment[J]. *Oncogene*, 2006, 25(5): 7361.
- [2] Li JP, Yang JL. Cyclin B1 proteolysis via p38 MAPK signaling participates in G2 checkpoint elicited by arsenite [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 212(2): 481.
- [3] Wolgemuth DJ. Function of cyclins in regulating the mitotic and meiotic cell cycles in male germ cells[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(22): 3509.
- [4] 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.
- [5] Zhao M, Kim YT, Yoon BS, et al. Expression profiling of cyclin B1 and D1 in cervical carcinoma[J]. *Exp Oncol*, 2006, 28(1): 44.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Nobuhito G, Heather ER, Bahram K, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α is essential for cell cycle arrest during hypoxia[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(1): 359.