

· 论 著 ·

## 骨桥蛋白在肝癌细胞中转录后调控的研究

秦宝山<sup>1</sup>, 张金平<sup>2△</sup>

(1. 郑州人民医院消化内科, 郑州 450003; 2. 郑州大学第一附属医院消化内科, 郑州 450052)

**摘要:**目的 分离鉴定在肝癌细胞 HepG2 和 Hep3B 中与骨桥蛋白(OPN)5'非翻译区(5'-UTR)结合后在转录后水平调节 OPN mRNA 的稳定性的 mRNA 结合蛋白。方法 利用亲和纯化的方法分离和纯化 OPN 5' UTR 结合蛋白, 质谱分析消化后的片段以鉴定蛋白; Hep3B 细胞瞬时转染真核细胞翻译延长因子 1A(EF1A) siRNA 抑制 EF1A, HepG2 细胞瞬时转染(pcDNA 3.1+EF1A)质粒过表达 EF1A, Western blot 检测 OPN 蛋白的表达, real-time PCR 检测 OPN mRNA 半衰期的变化。结果 质谱分析法确认此结合蛋白为 EF1A。在 HepG2 细胞中过表达 EF1A 能通过加速 OPN mRNA 的降解而降低 OPN 表达; 在 Hep3B 细胞中利用 siRNA 技术下调 EF1A 的表达能增强 OPN mRNA 的稳定性, 进而增强 OPN 的表达。结论 EF1A 作为一个去稳定因素作用于 OPN 5'UTR, 至少部分决定了 Hep3B 和 HepG2 细胞中 OPN 的表达。

**关键词:**癌, 肝细胞; 5'非翻译区; 肽链延伸, 翻译; RNA 稳定性; 骨桥蛋白

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.35.005

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)35-3548-03

## A study on posttranscriptional regulation of osteopontin in hepatoma cell

Qin Baoshan<sup>1</sup>, Zhang Jinping<sup>2△</sup>

(1. Department of Gastroenterology, People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450003, China;

2. Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

**Abstract: Objective** To isolate and identify mRNA-binding protein regulating stability of osteopontin(OPN) mRNA at posttranscriptional regulation level after combination with 5' untranslated region(5'-UTR) of OPN in HepG2 and Hep3B hepatoma cells. **Methods** Affinity purification method was applied to isolated and purified OPN 5'-UTR-binding proteins, the digested fragment was subjected to mass spectrometry analysis for protein identifying. Eukaryotic translation elongation factor 1A(EF1A) siRNA was transiently transfected into Hep3B cells to inhibit EF1A, (pcDNA 3.1+EF1A) plasmid was transiently transfected into HepG2 cells to over express EF1A, and then the expression of OPN protein and changes of OPN mRNA half-life in cells was detected by Western blot and real-time PCR, respectively. **Results** Mass spectrometry analysis confirmed the binding protein as a eukaryotic translation EF1A. Over-expressing EF1A in HepG2 cells decreased OPN protein expression via accelerating degradation of OPN mRNA, and down-regulating EF1A expression using siRNA technique in Hep3B cells enhanced stability of OPN mRNA, and thereby promoted the expression of OPN protein. **Conclusion** EF1A interacts with OPN 5'UTR as a destabilizing factor and at least partially determines the expression of OPN in Hep3B and HepG2 cells.

**Key words:** carcinoma, hepatocellular; 5' untranslated regions; peptide chain elongation, translational; RNA stability; osteopontin

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一个由格根包尔氏细胞、上皮细胞、内皮细胞、巨噬细胞、平滑肌细胞等多种细胞类型分泌到细胞外基质中的一个高度磷酸化和糖基化的蛋白<sup>[1]</sup>。研究认为, OPN 在细胞迁移、细胞存活、抑制细胞钙化、调节细胞免疫、肿瘤细胞转移等方面具有重要的功能<sup>[2]</sup>。在包括动脉粥样硬化、化生、肿瘤转移<sup>[3]</sup>和肾脏疾病<sup>[4]</sup>等多种病理状态下, OPN 的表达都上调。非翻译区(untranslated region, UTR)中的元件调控特定基因的表达<sup>[5-6]</sup>, 对正常机体的发展<sup>[7]</sup>以及疾病的进程<sup>[8-9]</sup>发挥重要的作用。UTRs 可以通过改变转录稳定性、转录位置和翻译效率来影响 mRNA, 进而影响蛋白量的表达。在 5'-UTR 内, 稳定的二级结构, 反式作用因子的结合位点, 或者编码区上游的短的开放阅读框(ORFs)都可以影响帽依赖的翻译过程<sup>[10]</sup>。有研究显示, HepG2 和 Hep3B 细胞中 OPN5'-UTR 与一个 50×10<sup>3</sup> 大小的 mRNA 结合蛋白相互作用, 可以在转录后水平调节 OPN mRNA 的稳定性<sup>[11]</sup>。在本研究中, 试图分离鉴定此蛋白并深入研究其对 OPN 表达的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 准备细胞提取物, 细胞裂解液(10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1.0 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.5% NP-40)重悬细胞, 4 000 r/min 离心 3 min 去除沉淀物。上清液保存在-80℃备用。

## 1.2 方法

**1.2.1 鉴定和纯化 OPN mRNA 结合蛋白** 按亲和纯化方法提取 Hep3B 细胞胞浆蛋白。生物素标记的 OPN 5'-UTR 核苷酸探针由 IDT 公司合成。1.0 mL of 1×PBS 冲洗 300 μL 抗生蛋白链菌素包被的磁珠 3 次, 在 500 μL 结合缓冲液中重悬后保存在 4℃。为了减少磁珠与非特异性蛋白的结合, 细胞质提取物与 2×结合缓冲液 1:1 稀释, 与磁珠 4℃孵育 1 h。1 000×g 离心 5 min 除去磁珠后, 上清液与生物素标记的 RNA 探针 4℃孵育 2 h。清洗过的磁珠加入反应体系中孵育 60 min 后, 磁体装置吸附磁珠。1.0 mL 结合缓冲液冲洗磁珠 2 次后, 洗涤缓冲液冲洗 1 次。洗脱液洗脱结合的蛋白。Ultrafree-0.5 离心纯化装置浓缩蛋白。浓缩后的蛋白, 10%十二

△ 通讯作者, Tel:(0371)66295922; E-mail: zhangjp@zzu.edu.cn.

烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离后, 银染试剂盒银染, 或转膜至 PVDF 膜上进行 Western blotting 分析。出现在 Hep3B 样本中而没有在 HepG2 样本中出现的条带胶内消化后, 送到蛋白分析中心进行质谱分析。

**1.2.2 siRNA 和质粒** 针对人 EF1A 的特异性 siRNA 由 Dharmacon Research 公司合成。正义序列为: 5'-AUG CGG UGG CAU CGA CAA AUU; 对照 siRNA 购自 Santa Cruz。EF1A 全长 cDNA 片断由 PCR 利用引物扩增而来: 正向引物, ATG GGA AAG GAA AAG ACT CAT ATC; 反向引物, TTA GCC TTC TGA GCT TTC TGG GCA。PCR 扩增片断克隆入 pcDNA3.1/V5-His<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> TA 质粒中, 所有载体的构建均由测序证实。

**1.2.3 瞬时转染试验** 转染前 24 h 接种细胞, Hep3B 细胞生长至 70%~80% 进行转染试验。利用 Lipofectamine2000 在 OptiMem-I 培养基中将 siRNA 转染入细胞中。转染后 6 h, 更换 OptiMem-I 培养基为正常培养基, 转染 48 h 后收获细胞。

**1.2.4 Western blotting 试验** PBS 冲洗细胞, 裂解液裂解, SDS 胶电泳分离蛋白后, 转膜至 PVDF 膜。转膜后, 用不同的抗体孵育, ECL 发光试剂盒检测信号强度。

**1.2.5 定量 (RT)-PCR 分析 RNA 的半衰期** HepG2 细胞转染构建的质粒, Hep3B 细胞转染 siRNA 24 h 后, 细胞消化, 接种至培养板中, 20 μg/mL 放线菌素 D 处理不同的时间点, 收集细胞。RT-PCR 方法分析 mRNA 的半衰期。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS11.0 软件进行统计分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 计量资料的比较采用 Student's *t*-test 检验。以  $\alpha=0.05$  为检验水准。

**2 结果**

**2.1 蛋白纯化和质谱分析** 利用亲和纯化的方法分离和纯化 OPN 5' UTR 结合蛋白。SA-PMPs 捕获生物素标记的 RNA 片段, 结合到 RNA 上的蛋白同时被分离下来。在 Hep3B 细胞中, 利用此技术能分离出作用于 OPN 5' UTR RNA 的反式作用蛋白, 而在 HepG2 细胞中却检测不到蛋白结合。经过去盐处理, 沉淀下来的蛋白经 SDS-PAGE 分离后, RNA 亲和和分析试验确认结合到 OPN 5' UTR 的  $50 \times 10^3$  的蛋白, 银染显色 (图 1)。相对分子质量  $50 \times 10^3$  的蛋白条带被切割下来后, 胶内胰蛋白酶消化。MS/MS 分析消化后的片段。经过把 MS/MS 光谱结果与已知蛋白数据库的对比, 确认翻译延长因子 1A (EF1A) 为此结合蛋白。

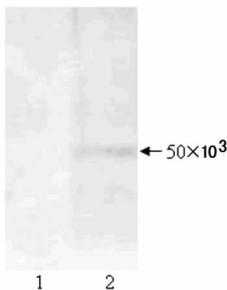
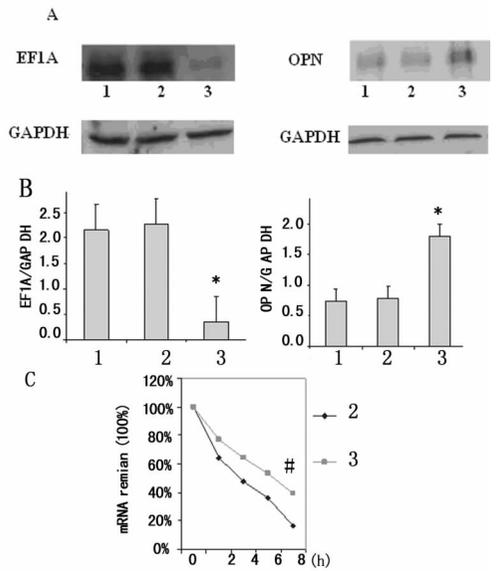


图 1 银染后的 SDS-PAGE

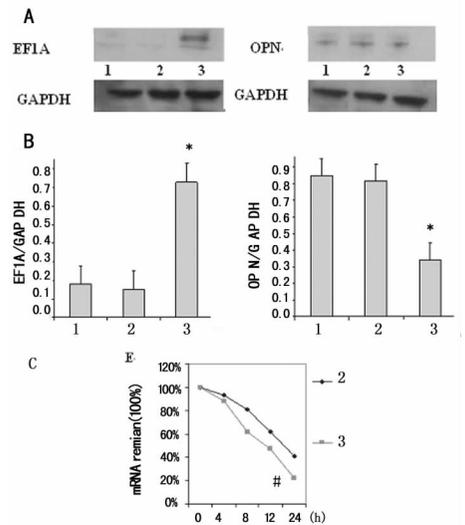
**2.2 敲除 EF1A 可以通过增强 OPN mRNA 的稳定性而提高其在 Hep3B 细胞中的表达** Western blot 检测 siRNA 敲除 EF1A 后 Hep3B 细胞中 OPN 蛋白的表达情况。EF1A siRNA 转染能显著降低 EF1A 蛋白的表达 (图 2A)。EF1A siRNA 处

理能提高 OPN 蛋白的表达水平, 分析 3 次独立试验中 EF1A/GAPDH, OPN/GAPDH 相对灰度值 (图 2B)。Hep3B 细胞未处理或转染 EF1A siRNA 24 h 后, 加入 actinomycin D (time 0), 8 h 周期内分析 OPN mRNA 的降解速率 (结果为 3 次独立试验的代表)。EF1A siRNA 处理显著提高 OPN mRNA 的稳定性 [ $(6.80 \pm 0.15)$ h 与  $(3.17 \pm 0.18)$ h,  $P < 0.01$ ], 见图 2C。



1: 未处理细胞; 2: 转染对照 siRNA 细胞; 3: 转染 EF1A siRNA 细胞。\*  $P < 0.01$ , 与未处理组及转染对照 siRNA 细胞比较。#  $P < 0.01$ , 与转染对照 siRNA 细胞比较。

图 2 Hep3B 细胞瞬时转染 EF1A siRNA



1: 未处理细胞; 2: 转染 pCDNA 3.1-C 质粒细胞; 3: 转染 pCDNA 3.1+ EF1A 质粒细胞。\*  $P < 0.01$ , 与未处理细胞及转染 pCDNA 3.1-C 质粒细胞比较; #  $P < 0.01$ , 与转染 pCDNA 3.1-C 质粒细胞比较。

图 3 HepG2 细胞瞬时转染 pCDNA 3.1+ EF1A 质粒

**2.3 HepG2 细胞中 EF1A 过表达通过降低 OPN mRNA 稳定性减少 OPN 的表达** HepG2 细胞瞬时转染包含人 EF1A 蛋白编码区的 pCDNA 3.1+EF1A 表达质粒, 同时用不包含 EF1A 的 pCDNA 3.1-C 作为对照质粒。转染 pCDNA 3.1+EF1A 后, EF1A 表达水平明显上调 (图 3A), 同时 OPN 表达水

平下调,图像分析 3 次独立试验中 EF1A/GAPDH, OPN/GAPDH 相对灰度值(图 3B)。RT-PCR 结果显示, HepG2 细胞中过表达 EF1A 后, OPN mRNA 半衰期从  $(21.00 \pm 0.08)$ h 减少为  $(11.00 \pm 0.20)$ h ( $P < 0.01$ ), HepG2 细胞未处理或转染 pCDNA 3.1+ EF1A 24 h 后, 加入 actinomycin D (time 0), 24 h 周期内分析 OPN mRNA 的降解速率(结果为 3 独立次试验的代表), 见图 3C。

### 3 讨 论

本研究前期的实验中, 认为 OPN 5' UTR 上的一个顺式作用元件参与调控 HepG2 和 Hep3B 细胞中 OPN mRNA 的稳定性。本实验中, 把这一作用区域定位在 OPN 5' UTR 上一段 12 个核苷酸序列的区域。蛋白纯化结果显示, EF1A 是此 OPN 5' UTR RNA 结合蛋白复合物的主要成分。尽管最初被认为只参与蛋白翻译延长过程中催化 GTP-依赖的氨基酰-tRNA 结合到核糖体的步骤, 有研究认为, EF1A 可以特异性的结合到 West Nile RNA 病毒 3' UTR 的茎环二级结构上<sup>[12]</sup>, 参与  $\beta$ -actin mRNA 的定位过程<sup>[13]</sup>。由于 EF1A 在真核细胞中的高丰度(哺乳动物细胞总蛋白的 1%), 远大于翻译过程中其他元件的含量, 其必定有除参与翻译机制外的其他功能。另外, EF1A 与 actin 和细胞骨架结构联系密切, 预示其可能把特定 mRNA, 例如  $\beta$ -actin mRNA 锚定到细胞外周区域, 或者把 MT-1 mRNA 锚定在细胞核周边, 以阻止其弥散到细胞质中<sup>[14]</sup>。关于 EF1A 是否结合到其他 RNA 结构的 UTR 区域的研究正在进行中。

mRNA 稳定性被认为对真核细胞基因的表达的调控影响重大。不同的 mRNA 具有不同的半衰期, 它们的半衰期在很大程度上决定了其表达的丰度。在不同细胞类型中影响 mRNA 表达的多种机制中, mRNA 降解的调控是一个潜在的决定基因表达水平的重要过程<sup>[15]</sup>。关于在 HepG2 和 Hep3B 细胞中 OPN mRNA 稳定性的特异性调控机制, 目前还没有研究报道。本研究结果显示, OPN mRNA 5' UTR 中包含有一段决定 HepG2 和 Hep3B 细胞中 OPN mRNA 半衰期的 12 个核苷酸序列的顺式作用元件。EF1A 通过特异性的调节机制, 在转录后水平调控 OPN 的表达。在 HepG2 细胞中过表达 EF1A 可以通过降低 OPN mRNA 的稳定性而降低 OPN 的表达; 在 Hep3B 细胞中利用 siRNA 技术下调 EF1A 的表达能增强 OPN mRNA 的稳定性, 进而增强 OPN 的表达。

综上所述, 本研究中证实了 EF1A 作为一个去稳定因素作用于 OPN 5' UTR, 至少部分决定了 Hep3B 和 HepG2 细胞中 OPN 的表达的不同。

### 参考文献:

[1] Denhardt DT, Giachelli CM, Rittling SR. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001, 41(0): 723-749.  
[2] Liaw L, Birk DE, Ballas CB, et al. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1)[J]. *J*

*Clin Invest*, 1998, 101(7): 1468-1478.

- [3] Furger KA, Menon RK, Tuckl AB, et al. The functional and clinical roles of osteopontin in cancer and metastasis [J]. *Curr Mol Med*, 2001, 1(5): 621-632.  
[4] Xie Y, Sakatsume M, Nishi S, et al. Expression, roles, receptors, and regulation of osteopontin in the kidney [J]. *Kidney Int*, 2001, 60(5): 1645-1657.  
[5] De Moor CH, Richter JD. Translational control in vertebrate development [J]. *Int Rev Cytol*, 2001 (203): 567-608.  
[6] Vlasova IA, Bohjanen PR. Posttranscriptional regulation of gene networks by GU-rich elements and CELF proteins [J]. *RNA Biol*, 2008, 5(4): 201-207.  
[7] Kuersten S, Goodwin EB. The power of the 3' UTR: translational control and development [J]. *Nat Rev Genet*, 2003, 4(8): 626-637.  
[8] Ruggiero D, Pandolfi PP. Does the ribosome translate cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(3): 179-192.  
[9] Stonele M, Willis AE. Aberrant regulation of translation initiation in tumorigenesis [J]. *Curr Mol Med*, 2003, 3(7): 597-603.  
[10] Meijer HA, Thomas AA. Control of eukaryotic protein synthesis by upstream open reading frames in the 5'-untranslated region of an [J]. *Biochem J*, 2002, 367(Pt 1): 1-11.  
[11] Emani S, Zhang J, Guo L, et al. RNA stability regulates differential expression of the metastasis protein, osteopontin, in hepatocellular cancer [J]. *Surgery*, 2008, 143(6): 803-812.  
[12] Blackwell JL, Brinton MA. Translation elongation factor-1 alpha interacts with the 3' stem-loop region of West Nile virus genomic RNA [J]. *J Virol*, 1997, 71(9): 6433-6444.  
[13] Liu G, Grant WM, Persky D, et al. Interactions of elongation factor 1alpha with F-actin and beta-actin mRNA: implications for anchoring mRNA in cell protrusions [J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(2): 579-592.  
[14] Mickleburgh I, Burtle B, Nury D, et al. Isolation and identification of a protein binding to the localization element of Metallothionein-1 mRNA [J]. *Biochem Soc Trans*, 2004, 32(5): 705-706.  
[15] Bevilacqua A, Ceriani MC, Capaccioli S, et al. Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs [J]. *J Cell Physiol*, 2003, 195(3): 356-372.

(收稿日期: 2011-03-09 修回日期: 2011-07-27)

《重庆医学》——中文核心期刊, 欢迎投稿, 欢迎订阅!