

Cyclin Y 和 Cyclin X 在肺癌细胞株 A549 中的细胞定位和功能

周世杰, 江 姝, 赵晓婷, 岳文涛

(首都医科大学附属北京胸科医院, 北京胸科医院分子生物学实验室, 北京 101149)

摘 要: [目的] 构建 CCNY 和 CCNX 基因的真核表达载体并观察其在人肺癌细胞株 A549 中的表达及定位, 为进一步探讨 Cyclin Y、Cyclin X 在肺癌中的细胞定位和功能奠定了基础。[方法] 以人肺腺癌细胞株 H1299 cDNA 为模板扩增 CCNY 和 CCNX 基因, 并构建 CCNY 和 CCNX 过表达真核表达载体。应用荧光显微照相及 Western Blot 方法鉴定该细胞株中 Cyclin Y、Cyclin X 的定位及表达。[结果] 成功构建 pEGFP-N1/CCNY 和 pEGFP-N1/CCNX 真核表达载体。荧光显微照相显示绿色荧光, Western Blot 检测证实转染重组质粒细胞表达 Cyclin Y、Cyclin X 蛋白, Cyclin Y 和 Cyclin X 分别定位于胞膜与胞核。A549-pEGFPN1 细胞活性为 1.31 ± 0.03 , 而转染后的 A549-CCNY pEGFPN1 细胞活性为 1.36 ± 0.02 , A549-CCNX pEGFPN1 细胞活性为 1.45 ± 0.05 ($P < 0.01$)。[结论] Cyclin Y 和 Cyclin X 在 A549 细胞株中定位具有明显的差异, 而且胞浆定位的 Cyclin X 比细胞膜定位的 Cyclin Y 更能够促进 A549 细胞增殖。

关键词: Cyclin Y; Cyclin X; 肺癌; 细胞定位; 细胞增殖

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2013)07-0570-05

doi:10.11735/j.issn1004-0242.2013.07.A012

The Function Study and Cell Localization of Cyclin Y and Cyclin X in Lung Cancer Cell Line A549

ZHOU Shi-jie, JIANG Shu, ZHAO Xiao-ting, et al.

(Beijing Chest Hospital Affiliated Capital Medical University, Molecular Biology Laboratory, Beijing Chest Hospital, Capital Medical University, Beijing 101149, China)

Abstract: [Purpose] To construct pEGFP-N1/CCNY vector and pEGFP-N1/CCNX eukaryotic expression vector, and to explore the location and function of CyclinY/CyclinX in lung cancer A549 cell. [Methods] CCNY and CCNX genes were amplified from human lung adenocarcinoma cell line H1299 by PCR. The recombinant plasmids pEGFP-N1/CCNY and pEGFP-N1/CCNX were constructed and transfected into A549 cells. The cellular localization and expression of CyclinY and Cyclin X were detected by fluorescence microscopy and Western Blot. [Results] The recombinant plasmid pEGFP-N1/CCNY and pEGFP-N1/CCNX were constructed successfully. Green fluorescence on the surface of transfected cells was found by fluorescence microscope. Western Blot confirmed Cyclin Y, Cyclin X expression. Cyclin Y and Cyclin X located at cellular membrane and nucleus in recombinant plasmid cell respectively. After transfection, A549-CCNY pEGFPN1 cell viability was 1.36 ± 0.02 , A549-CCNX pEGFPN1 cell viability was 1.45 ± 0.05 , which was higher than that in A549-pEGFPN1 (1.31 ± 0.03) ($P < 0.01$). [Conclusion] In A549 cell, Cyclin Y and Cyclin X are differently distributed, Cyclin X plays more important role in promoting proliferation than Cyclin Y.

Key words: Cyclin Y; Cyclin X; lung cancer; cellular localization; cell proliferation

肿瘤是细胞增殖异常所引起的疾病, 其发生、发展与细胞周期调控的失调密切相关。细胞周期素(Cyclin)是细胞周期调控的关键分子, 广泛存在于真核生物细胞中, 与周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑

制因子(cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI)一起参与细胞周期的调控。细胞周期蛋白 CyclinY 是近年来新发现的一种细胞周期蛋白, 现有研究显示 CyclinY(CCNY)在调节细胞周期及肿瘤细胞增殖调控中发挥重要作用^[1]。CyclinY 的 N 末端的 54 个氨基酸残基中存在豆蔻酰化位点, 将其定位于细胞膜, 但研究表明有一种胞核定位的 CyclinY 的异构

收稿日期: 2013-02-19; 修回日期: 2013-04-28

通讯作者: 岳文涛, E-mail: yuewt2000@yahoo.com

体——CyclinX(CCNX)^[2],除了缺失N端54个氨基酸残基,与CyclinY序列完全相同,其功能尚不清楚。我们前期研究^[3,4]发现细胞周期CyclinY其编码基因(CCNX)在非小细胞肺癌肿瘤组织和肺癌细胞系中高表达并且其表达水平与肿瘤的组织分型相关;体内外实验中亦证实抑制CCNY表达可导致肺癌细胞周期阻滞于G₁/S期,从而抑制肺癌细胞的体内外生长,但不同肺癌细胞系中CCNY和CCNX表达水平并不相关。为进一步明确CCNY和CCNX基因表达对肺癌细胞增殖的影响,本研究将构建pEGFP-N1/CCNY和pEGFP-N1/CCNX真核表达载体,并转染A549细胞观察其在人肺细胞株A549中的表达和定位,检测CyclinY与CyclinX的表达对A549细胞增殖的影响,为进一步研究CCNY和CCNX的关系及肿瘤相关功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺腺癌细胞株H1299的cDNA、大肠杆菌DH5 α 及人肺腺癌细胞株A549均为本实验室保存。pGEM-T Vector System,MTS试剂盒购自Promega公司;pEGFP-N1真核表达载体购自Clontech公司;质粒小提试剂盒、凝胶回收试剂盒及DNA分子量标准购自天根公司;限制性内切酶BamH I、Nhe I及T4 DNA连接酶购自NEB公司;脂质体LipofectamineTM 2000和高保真DNA聚合酶购自Invitrogen公司。鼠源的GFP单克隆抗体购自Sigma公司;HRP标记的抗鼠二抗购自优宁维公司;RPMI-1640及胎牛血清均购自GBICO公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

根据GenBank数据库中的基因序列,应用软件Primer Designer5.0分别设计用于克隆CCNY和CCNX基因cDNA的引物。CCNY基因的上游引物GAGTCGGGCTAGCTAGCTAGATGGGGAAC,CCNX基因的上游引物GAGCACCTAGCTAGCTAGAA-CATGGAATTC,两者共同的下游引物CATCATCTCTAAACTACGGGATCCCGCC,在上下游引物中分别引入Nhe I、BamH I酶切位点,上述引物由上海生物工程技术有限公司合成。

1.2.2 PCR扩增目的基因cDNA

CCNY和CCNX以H1299的cDNA为模板,采用PCR方法分别扩增目的基因cDNA CCNY和CCNX,1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

1.2.3 CCNY和CCNX cDNA的T-A克隆

用pGEM-T载体连接试剂盒将回收纯化的PCR产物与pGEM-T载体连接。转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,将菌液均匀涂布在LB/AMP⁺平板培养基上,筛选阳性菌落。随机挑取阳性的单菌落培养,PCR扩增鉴定目的片段并同时取菌液送上海生工测序。经测序比对确定目的基因序列正确后将阳性克隆的菌液扩大培养,根据试剂盒说明书提取重组质粒备用。

1.2.4 真核表达载体pEGFP-N1/CCNY和pEGFP-N1/CCNX构建和鉴定

用BamH I、Nhe I分别双酶切重组质粒pGEM-T/CCNY、pGEM-T/CCNX及pEGFP-N1空载体,1%琼脂糖凝胶电泳后切胶回收目的基因片段。在T4 DNA连接酶的作用下,将pEGFP-N1分别和CCNY、CCNX目的片段在16℃反应过夜。将连接产物转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,挑选阳性克隆,提取重组质粒pEGFP-N1/CCNY和pEGFP-N1/CCNX。阳性克隆经BamH I/Nhe I双酶切鉴定后测序。测序正确后扩大培养,抽提重组质粒DNA。

1.2.5 细胞培养

用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基在37℃、5%CO₂饱和湿度下对人肺癌细胞株A549进行常规培养。实验采用对数生长期细胞。

1.2.6 基因转染及融合蛋白的荧光观察

将处于对数生长期的A549细胞重悬于完全培养基中,以5 $\times$ 10⁴细胞/孔接种于24孔板中,培养24h,待细胞生长密度达到70%~80%融合。用LipofectamineTM 2000分别将pEGFP-N1/CCNY、pEGFP-N1/CCNX质粒及空载质粒pEGFP-N1转染至A549细胞中,设转染空载体为对照组。具体方法参照说明书。转染24h后在40倍荧光显微镜下观察CyclinY、CyclinX在细胞中的表达及定位。

1.2.7 Western Blot检测细胞中融合蛋白的表达

脂质体转染48h后,分别收集转染了pEGFP-N1/CCNY、pEGFP-N1/CCNX质粒及空载质粒的A549细胞,细胞裂解液提取总蛋白,行蛋白定量分

析。表达产物经 10%SDS-PAGE 电泳分离后,电转移至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉室温封闭2h,加入 1:2 000 稀释的鼠源的 GFP 抗体,4℃孵育过夜,再加入 1:3 000 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体,室温孵育 2h,ECL 显色,曝光。

1.2.8 MTS 法绘制细胞生长曲线

将转染 pEGFP-N1/CCNY、pEGFP-N1/CCNX 质粒及空载质粒 48h 的 A549 细胞接种 96 孔板,每孔 6 000 个细胞,每种细胞设 5 个重复,分别在细胞接种 24h,48h,72h 加入 MTS 试剂,37℃继续培养 3h,在酶标仪上测定各孔在 490nm 处的吸光度,绘制细胞的生长曲线。

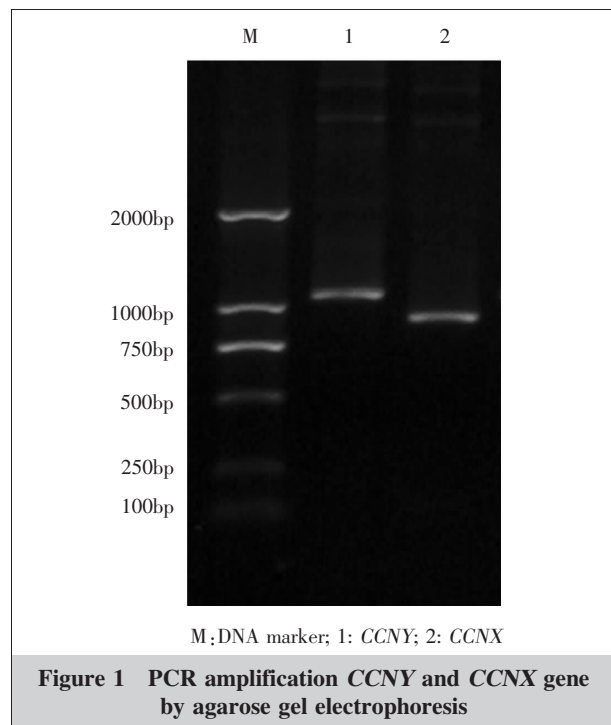
1.3 统计学处理

实验中所获得的数据用 SigmaPlot 作图绘制细胞生长曲线,用 Student T-test 进行组间差异比较, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

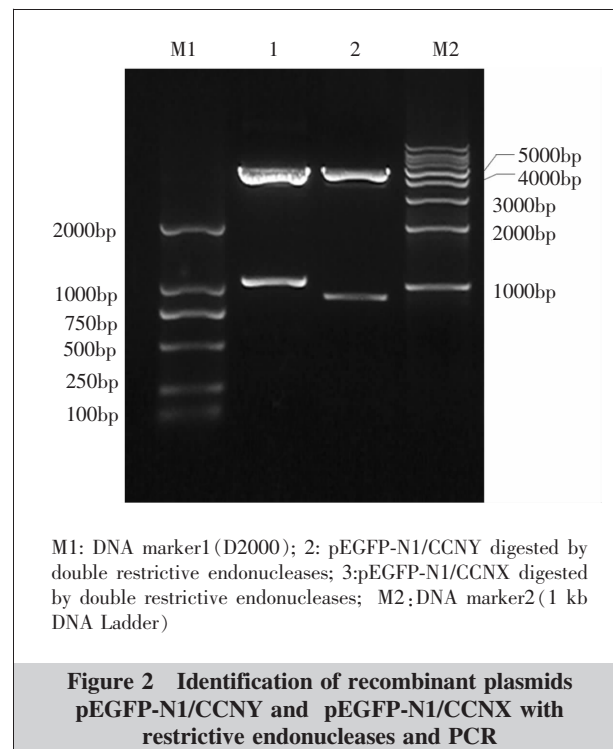
2.1 PCR 扩增获得目的基因 cDNA CCNY 和 CCNX

全长 CCNY 和 CCNX 基因 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,有目的条带出现(CCNY 基因 cDNA 1061 bp,CCNX 基因 cDNA 960 bp),说明 CCNY 和 CCNX 基因成功克隆(Figure 1)。



2.2 真核表达载体 pEGFP-N1/CCNY 和 pEGFP-N1/CCNX 构建和鉴定

将构建的重组质粒 pEGFP-N1/CCNY 和 pEGFP-N1/CCNX 质粒经 BamH I /Nhe I 双酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,结果显示插入片段大小分别为全长 CCNY(1061 bp)和 CCNX(960 bp)(Figure 2)。测序结果证实插入片段 CCNY 和 CCNX cDNA 序列正确,真核表达载体 pEGFP-N1/CCNY 和 pEGFP-N1/CCNX 成功构建。



2.3 CyclinY 和 CyclinX 在 A549 细胞株中的细胞定位

转染真核表达质粒 pEGFP-N1/CCNY、pEGFP-N1/CCNX 及 pEGFP-N1 空载质粒至 A549 细胞株 24h 后荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达,发现 Cyclin Y 在 A549 细胞内定位于细胞膜,绿色荧光呈环状分布(Figure 3B);Cyclin X 分布于细胞浆及细胞核中,且在细胞核中为主(Figure 3C);对照组 GFP 主要分布于细胞核内(Figure 3A)。

2.4 Western Blot 检测结果

Western Blot 检测证实蛋白 Cyclin Y 和 Cyclin X 在人肺癌细胞株 A549 中成功表达(Figure 4)。GFP 为对照组蛋白条带位于 27kD、CCNX-GFP 融合蛋白位于 57kD 处,CCNY-GFP 融合蛋白位于 63kD 处。

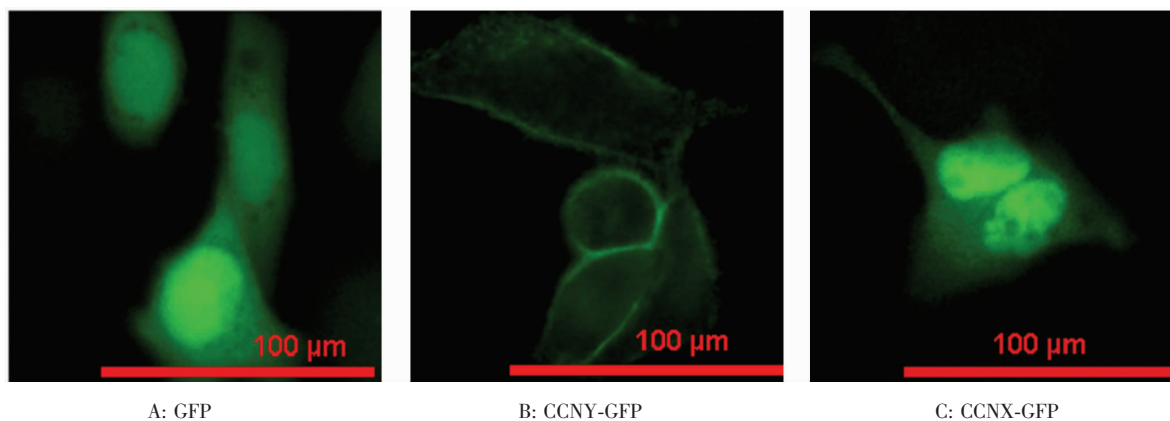


Figure 3 Localization of recombinant proteins of cyclin Y-GFP and cyclin X-GFP in A549 cell line

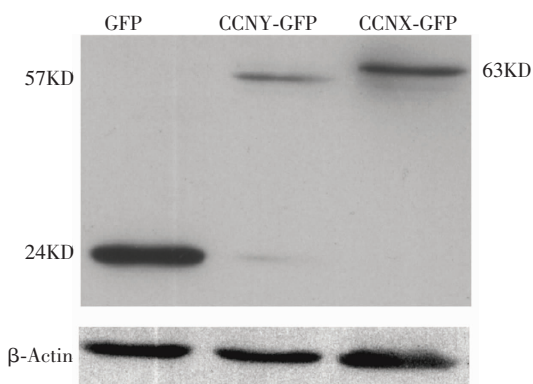


Figure 4 Recombinant proteins of cyclin Y and cyclin X by Western Blot

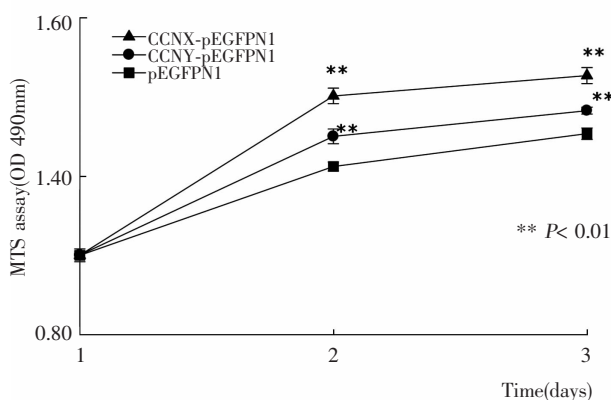


Figure 5 A549 cells proliferation curves of different groups

2.5 Cyclin X 促进 A549 细胞的增殖

绘制 A549CCNY pEGFPN1、A549CCNX pEGFPN1 和 A549-pEGFPN1 三组细胞的生长曲线 (Figure 5)。与 A549-pEGFPN1 细胞相比, A549-CCNY pEGFPN1、A549-CCNX pEGFPN1 细胞增殖能力均明显增强 ($P < 0.01$), 第 3d 时, A549-pEGFPN1 细胞活性为 1.31 ± 0.03 , 而 A549-CCNY pEGFPN1 细胞活性为 1.36 ± 0.02 , A549-CCNX pEGFPN1 细胞活性为 1.45 ± 0.05 。与 Cyclin Y 相比, Cyclin X 更能促进 A549 细胞的增殖 ($P < 0.01$)。

3 讨论

研究表明, 周期素蛋白家族与肿瘤发生发展关

系密切, 可能作为肿瘤诊断标志物和治疗靶点。Cyclin Y 和 Cyclin X 是近年来新发现的可能与肺癌发生发展密切相关的细胞周期蛋白。细胞周期蛋白 Cyclin Y 其编码基因 (CCNY) 定位于 10 号染色体, 全长 3 968bp, 有 10 个外显子, 编码 341 个氨基酸的 Cyclin Y 蛋白, 分子量约为 39kD。其中 143~243 位氨基酸高度保守, 是 CDK 结合结构域, 亦称为周期素盒 (Cyclin box)。Cyclin X 为 Cyclin Y 的 N 端缺失 54 个氨基酸残基, 其余序列完全相同, 其功能尚不清楚。有研究报道高表达 Cyclin X 能激活转录因子 c-Myc 的活性进而可能影响细胞周期的调控。本研究将目的基因 CCNY 和 CCNX cDNA 克隆至表达载体 pEGFP-N1 中, 成功构建了 pEGFP-N1/CCNY 和 pEGFP-N1/CCNX 真核表达载体。脂质体转染 A549

细胞,荧光显微镜下观察到绿色荧光蛋白的表达,另外 Western Blot 也验证蛋白 CyclinY 和 Cyclin X 在肺癌细胞 A549 中稳定表达。转染 CCNY 和 CCNX 后可以促进肿瘤细胞增殖。我们前期研究发现抑制 CCNY 基因的表达可显著性抑制 H1299、95D 肺癌细胞增殖的速度;CCNY 基因沉默后肺癌细胞周期阻滞于 G₁/S 期,从而显著性抑制肺癌细胞的体内外生长^[3,4]。Ying-Tao 等^[5]通过质谱分析方法筛选出 CyclinY 蛋白在转移性的人直肠癌细胞系中显著性高表达,并且在细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡等方面发挥重要的作用。Xu 等^[6]研究发现 CCNY 与脑胶质瘤细胞增殖密切相关,抑制 CCNY 表达可同样显著性抑制脑胶质瘤细胞的生长。Li 等^[2]发现 CyclinY 的同源异构体 Cyclin X 可激活转录因子 c-Myc 进而可能调节肿瘤细胞的细胞周期。这些研究表明 CCNY 和 CCNX 与肿瘤发生发展关系密切,很有可能作为肿瘤诊断标志物和治疗的新靶点。

本研究还发现 Cyclin Y 和 Cyclin X 在人肺腺癌细胞株 A549 中细胞定位明显不同。Cyclin Y 在 A549 细胞中定位于细胞膜;Cyclin X 分布于细胞浆和细胞核中,且在细胞核中为主;而对照组 GFP 主要分布于细胞核内。说明 Cyclin Y 在半转化型细胞以及肺癌细胞中定位是一致的,主要定位于细胞膜。Li 等^[2]将目的基因 CCNX 克隆至真核表达载体 pCMV-Myc 中,发现 CCNX 的 N 末端缺少豆蔻酰化位点,在人肺癌细胞株 H1299 中主要定位于细胞核。本研究亦发现 Cyclin X 在人肺腺癌细胞株 A549 中细胞定位于细胞核,进一步确证 CCNX 由于缺失 N 端的豆蔻酰化位点,在细胞中定位于细胞核。Jiang 等^[7]利用 Northern-blot 检测了多种人体组织和细胞系,发现其中至少存在两种 CyclinY 转录本,分别为 4kb 和 2kb。4kb 转录本在所有检测的组织和细胞系中低水平表达,2kb 转录本则在睾丸等细胞分裂旺盛的细胞中高表达,在骨骼肌、脑等组织中低表达,而在正常肺组织中无表达,但是在癌组织中 CyclinY 两种转录本的表达以及两者之间的关系尚未明确。另外,他们成功将 CCNY 基因及其 N 端突变体克隆至真核表达载体 pEGFP-N3、pEGFP-C2、pcDNA3-2HA

和 pMycN3 中,发现野生型 CyclinY 在半转化型细胞 HEK293T 细胞中定位于细胞膜,N 端豆蔻酰化位点突变的突变体在 HEK293T 细胞中定位于细胞浆和细胞核中。但是,CCNY 与 CCNX 之间的关系以及两者在肺癌发生发展过程中的相互作用尚不明确。与已有研究类似,在本研究中 A549 细胞转染 Cyclin Y、Cyclin X 后增殖能力明显增强,而且胞浆定位的 Cyclin X 比胞膜定位的 Cyclin Y 更能促进细胞增殖。说明 Cyclin X 高表达与肺癌细胞恶性增殖关系更加密切。

综上所述,本研究在成功构建 pEGFP-N1/CCNY 和 pEGFP-N1/CCNX 真核表达载体的基础上,转染细胞后发现胞浆定位的 Cyclin X 比细胞膜定位的 Cyclin Y 更能促进细胞的增殖。本研究结果提示 CCNY 及其异构体 CCNX 在肺癌发生和增殖中的作用不同,我们推测与其不同的亚细胞定位有关,但其具体机制还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Liu D, Guest S, Finley RL Jr. Why cyclin Y? A highly conserved cyclin with essential functions[J]. *Fly* (Austin), 2010, 6(4):278-282.
- [2] Li X, Wang X, Liu G, et al. Identification and characterization of cyclinX which activates transcriptional activities of c-Myc[J]. *Mol Biol Rep*, 2009, 36(1):97-103.
- [3] Yue W, Zhao X, Zhang L, et al. Overexpression of cyclin Y in non-small cell lung cancer is associated with cancer cell proliferation[J]. *Sci China Life Sci*, 2010, 53(4): 511-516.
- [4] Yue W, Zhao X, Zhang L, et al. Cell cycle protein cyclin y is associated with human non-small-cell lung cancer proliferation and tumorigenesis[J]. *Clin Lung Cancer*, 2011, 12(1):43-50.
- [5] Ying-Tao Z, Yi-Ping G, Lu-Sheng S, et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins between metastatic and non-metastatic human colorectal carcinoma cell lines [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2005, 17(7):725-732.
- [6] Xu Y, Wang Z, Wang J, et al. Lentivirus-mediated knock-down of cyclin Y (CCNY) inhibits glioma cell proliferation [J]. *Oncol Res*, 2010, 18(8):359-364.
- [7] Jiang M, Gao Y, Yang T, et al. Cyclin Y, a novel membrane-associated cyclin, interacts with PFTK1[J]. *FEBS Lett*, 2009, 583(13):2171-2178.