

hSesn1 基因真核表达载体构建及蛋白的表达和定位

沈 涛 巴 根 李 妍 杨 蕾 郭 然 陈之光 郭洲洋 付 勤

摘 要 **目的** 构建人源的 Sesn1 真核表达载体同时检测融合蛋白在 COS-7 细胞系内的表达和定位。**方法** 提取工具细胞系 HeLa 的 mRNA, 进而反转录成为 cDNA。聚合酶链反应方法扩增人源 Sesn1 基因的 cDNA 全长片段, 将其克隆于 pEGFP-C1 真核表达载体中。进一步将已构建好的重组表达载体进行双酶切以及测序鉴定, 继而转染到工具细胞系 COS-7 中, 进行 Western blot 方法检测。最后应用激光共聚焦扫描显微镜方法来观察 pEGFP-hSesn1 在 COS-7 细胞中的定位情况。**结果** hSesn1 基因 cDNA 全长片段克隆至 pEGFP-C1 真核表达载体中, 酶切鉴定片段大小为 1479bp, 测序证实成功。Western blot 方法检测出 GFP-hSesn1 融合蛋白的成功表达, 分子质量(Mr) 约为 80kDa。pEGFP-hSesn1 在 COS-7 细胞中主要定位在细胞质及核周。**结论** 成功构建了 pEGFP-hSesn1 真核表达载体, 进而检测到融合蛋白的表达, 并且在 COS-7 细胞中主要定位于核周及细胞质。

关键词 hSesn1 Western blot 绿色荧光蛋白 质粒构建

中图分类号 Q291

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.06.011

Construction of Eukaryotic Plasmid of Human hSesn1 Gene and Expression and Localization of Fusion Protein Shen Tao, Ba Gen, Li Yan, et al. Department of Orthopedic Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Liaoning 110004, China

Abstract Objective To construct the expression plasmid of human Sestrin 1 (hSesn1) gene and identify expression and localization of fusion protein. **Methods** Total mRNA was extracted from Hela cells, and cDNA was synthesized via reverse transcription. The hSesn1 coding sequence was successfully amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into pEGFP-C1 expression plasmid. After the hSesn1 gene was successfully identified by double enzymes digestion and sequencing, the plasmid was transiently transfected into COS-7 cells. The expression of the recombinant plasmid in COS-7 cells was detected by Western blot assay. The localization of pEGFP-hSesn1 in COS-7 cells was observed with laser confocal microscopy. **Results** hSesn1 cDNA was successfully constructed into the pEGFP-C1 expression vector. The fragment length identified by double restriction enzymes digestion was 1479bp. The expression of pEGFP-hSesn1 fusion protein was detected by Western blot assay. Its molecular weight is 80kDa. The pEGFP-hSesn1 fusion protein was mostly localized at cytoplasm and perinuclear of COS-7 cells. **Conclusion** The recombinant pEGFP-hSesn1 plasmid was successfully constructed, and the pEGFP-hSesn1 fusion protein was mostly localized at cytoplasm and perinuclear of COS-7 cells.

Key words hSesn1; Western blot; GFP; Plasmid construction

Sestrins (SESNs) 是一类高度保守的应激蛋白家族。当细胞暴露在各种不同的环境压力情况下(氧化应激和 DNA 损伤), SESNs 在保护细胞中发挥重要作用。研究发现 SESNs 主要通过参与调控 AMPK 和 mTOR 信号通路维持细胞稳态。最近的相关研究表明, SESNs 可能作为细胞信号通路的关键蛋白, 在肿

瘤等多种疾病的发生、发展过程中均起到重要作用^[1,2]。

在哺乳动物细胞中, SESNs 在结构上均具有高度同源的 AhpD 结构域(alkylhydroperoxidoreductase domain), 目前发现包括其家族主要包括 3 个成员: Sesn1、Sesn2 和 Sesn3^[2,3]。Sesn1 是这类家族中的一个重要成员, 其 cDNA 全长 1479 碱基, 编码 493 个氨基酸。研究发现 Sesn1 是 p53 的一个靶向基因, 在不同刺激条件下依赖 p53 参与细胞的存活^[4,5]。同时, 在 DNA 损伤和氧化应激条件下, Sesn1 表达显著增加^[6,7]。所以研究推测 Sesn1 可能整合细胞应激信号, 并在细胞代谢和肿瘤发生等多方面发挥多方面的生物学功能^[8]。本研究中笔者通过成功构建人源 Sesn1 的真核表达载体, 进一步证实了融合蛋白在

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81372337); 国家自然科学基金青年基金资助项目(31201053)

作者单位: 110004 沈阳, 中国医科大学附属盛京医院骨科(沈涛、巴根、杨蕾、郭然、陈之光、郭洲洋、付勤); 110001 沈阳, 中国医科大学基础医学院细胞生物学教研室、细胞生物学卫生部重点实验室(李妍)

通讯作者: 李妍, 副教授、硕士生导师, 电子信箱: cmuyanli@hotmail.com

COS-7 细胞内的表达与定位,为今后研究 Sesn1 生物学特性和潜在功能奠定基础。

材料与方法

1. 菌株、质粒和细胞:大肠杆菌 JM109 为本实验室保存;真核表达载体 pEGFP-C1 购自美国 Clontech 公司;HeLa 细胞系和 COS-7 细胞系均为本实验室保存。

2. 主要试剂:各种限制性核酸内切酶,Pyrobest™ DNA polymerase 和 DNA 凝胶回收试剂盒均购于(大连)TaKaRa 公司;DNA 和蛋白分子质量标准均购于美国 GenScript 公司;T4 DNA 连接酶购于美国 NEB 公司;TRIzol RNA 提取相关试剂采购自美国 Invitrogen 公司;南京金思瑞公司购置小鼠抗人 GFP 单克隆抗体;二抗 HRP 标记的山羊抗小鼠采购于中杉金桥生物技术有限公司;DNA 测序以及引物合成均由金思瑞公司完成;美国 GE Healthcare 公司购置 ECL 发光试剂盒。

3. 方法:(1)提取 RNA 及反转录成 cDNA:用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 HeLa 细胞至约 70% ~ 80% 融合,加入 1ml TRIzol 于直径 3.5cm 的标准培养板,用移液器反复吹打,直到细胞全部裂解。遵照 TRIzol 说明书(Invitrogen 公司)进行 RNA 提取。(2)聚合酶链反应方法扩增 hSesn1 基因全长:采用 HeLa 细胞 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,上游引物:5' - CACTGAATTCCATGCGCTTGCCCGC - 3', 下游引物:5' - CTGCGGTACCTCAGGT-CATATAGCGG - 3'。详细 PCR 反应体系为 50μl,含 1μg 模板,1.25 U Pyrobest™ DNA 聚合酶,5μl Pyrobest™ 缓冲液(10×),引物(0.4μmol/L)及 dNTP 混合物各 0.2μmol/L。扩增条件为:5min 预变性 94℃;60s 95℃,60s 58℃,延伸 72℃ 1min 30s,进行循环 35 个;10min 72℃ 延伸。PCR 产物于 1% ~ 1.5% DNA 琼脂糖凝胶电泳后,回收大小约 1479 碱基的 PCR 产物。(3)构建 pEGFP-hSesn1 表达载体:将 1μg pEGFP-C1 空载体及 hSesn1 的 PCR 产物分别用 Kpn I 和 EcoR I 双酶切,37℃ 反应过夜,凝胶回收纯化产物。将两个片段用 T4 DNA 连接酶 4℃ 连接 12 ~ 16h,并进一步转化到感受态细胞 JM109 中,37℃ 培养 12 ~ 16h 后。挑取 d 单克隆后扩增培养,然后提取质粒后,用酶切鉴定外源基因的插入,进行测序分析。(4)pEGFP-hSesn1 表达载体瞬时转染 COS-7 细胞:常规培养 COS-7 细胞于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,细胞铺于标准 6 孔板至约 70% ~

80% 融合,将 pEGFP-hSesn1 真核表达载体的瞬时转染到 COS-7 细胞中(参照 Lipofectamine™ 2000 的转染试剂说明)。(5)Western blot 法检测:24 ~ 36h 转染后,弃掉培养基,用 PBS 清洗细胞 2 遍,加入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 细胞裂解液后收集细胞。20min 12000 × g 4℃ 离心,将上清转移到一个新的 EP 管中。各取约 60μg 蛋白经 SDS-PAGE(80g/L)凝胶分离,70V 4℃ 3h 进一步湿转至 PVDF 膜上,3h 脱脂奶粉(50g/L)封闭。加入制备的小鼠抗人 GFP 的单克隆抗体(1:1000),4℃ 孵育 12 ~ 16h。加入二抗室温孵育 2h(辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠,1:5000),3 次 TBST 洗膜。ECL 显色,发光。(6)激光共聚焦显微镜观察 pEGFP-hSesn1 细胞内定位:在标准 6 孔板上放有盖片,将 COS-7 细胞培养 24 ~ 36h 后,转染 pEGFP-hSesn1 载体或对照载体。转染 36h 后,用 PBS 清洗细胞,15min 室温固定(40g/L 多聚甲醛),再次 3 次 PBS 清洗,5min 每次,20min 室温孵育,3 次 PBS 清洗,5min 每次,封片(50% 甘油)。激光共聚焦扫描显微镜进行扫描,激发光波长为 488nm,可以清楚的观察目的蛋白的表达及定位。

结 果

1. hSesn1 基因 cDNA 全长的扩增:以 HeLa 细胞的 cDNA 作为模板,聚合酶链反应扩增 hSesn1 基因,可见约 1479bp 大小的特异性片段(图 1)。

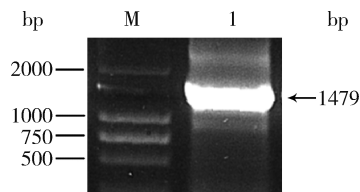


图 1 hSesn1 基因全长的 PCR 扩增

M. D2000 标记; 1.2μl PCR 产物

2. 重组真核表达质粒 pEGFP-hSesn1 的构建及鉴定经 EcoR I 和 Kpn I 双酶切 pEGFP-hSesn1 重组质粒后得到约 4700bp(载体)和 1479bp(片段)的两条带(图 2),送测序进一步分析鉴定。

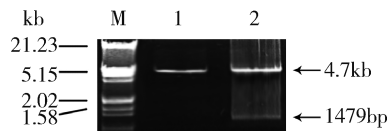


图 2 EcoR I 和 Kpn I 双酶切 pEGFP-hSesn1 真核载体的结果

M. λ DNA 标记; 1. Kpn I 和 EcoR I 双酶切 pEGFP-C1 空载体;

2. Kpn I 和 EcoR I 双酶切 pEGFP-hSesn1

3. pEGFP - hSesn1 融合蛋白于 COS - 7 细胞中的表达:将构建成功的 pEGFP - hSesn1 真核表达质粒进一步转染到工具细胞 COS - 7 细胞中, Western blot 法检测 GFP - hSesn1 融合蛋白的成功表达(图 3), 分子质量(Mr)为 80kDa。

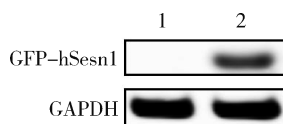


图 3 Western blot 法检测 pEGFP - hSesn1 融合蛋白的表达

1. COS - 7 细胞转染 pEGFP - C1 对照组;
2. COS - 7 细胞转染 pEGFP - hSesn1

4. pEGFP - hSesn1 融合蛋白于细胞中的定位:笔者利用共聚焦显微镜方法观察 pEGFP - hSesn1 融合蛋白于 COS - 7 细胞中的定位, 相对于转染空载体组(在细胞质和细胞核均有分布), 转染 pEGFP - hSesn1 转染组, 主要观察到绿色荧光分布在核周和细胞质, 表明其融合蛋白分布区域主要在核周以及细胞质(图 4)。

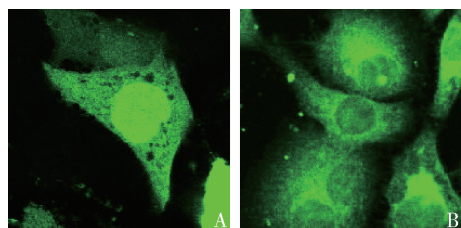


图 4 pEGFP - hSesn1 在 COS - 7 细胞中的定位

- A. COS - 7 细胞转染 pEGFP - C1;
- B. COS - 7 细胞转染 pEGFP - hSesn1

讨 论

研究证实, Sesns 能够抑制 TORC1 活化, 抑制 ROS 聚集, 减少基因组不稳定性以及刺激自噬性^[9,10]。有研究证据表明 Sesn1/2 过表达能够抑制高度活化 TORC1 导致的癌症细胞生长。最近发现 Sesn2 在自噬诱导和肿瘤抑制中有新的角色。Sesn2 的高度表达通过 JNK 信号通路的活化可以在癌症细胞中诱导自噬^[11,12]。研究发现在不同起源的肺癌中 Sesn1 和 Sesn2 下调, 并且 Sesn1/2 的下调将导致遗传不稳定性及加速肺癌移植物的生长^[13]。另有研究发现 Sesn2 能够直接与 AMPK 互作介导乳腺癌细胞对离子射线的敏感度^[14]。Sesn 家族成员 Sesn1, Sesn2 和 Sesn3 能够与 GATOR2 相互作用, 从而参与氨基酸代谢途径中的 mTORC1 的分支。这些研究表

明 Sesn 家族可能通过调节 mTOR 信号通路, 氧化应激反应, 及肿瘤代谢等在肿瘤发生、发展中起到重要的作用。

为了进一步研究 Sesn1 的生物学特性和功能, 笔者成功构建了人源 Sesn1 带有 GFP 标签的真核表达载体。其中 GFP 即绿色荧光蛋白, 它不需要底物和辅助因子, 在紫外光的激发下, 可以发出绿色荧光。而我们用的 EGFP 绿色荧光蛋白载体是一种更加优化的 GFP 突变体, 通过利用双氨基酸改建增加了绿色荧光蛋白的强度, 其荧光强度要增加 40 ~ 120 倍。从而更适合在细胞中检测蛋白的表达和定位。笔者利用成功构建的带有 GFP 标签的 Sesn1 真核表达载体瞬时转染到工具细胞 COS - 7 中, Western blot 法成功检测到了融合蛋白 GFP - Sesn1 的表达, 并进一步采用激光共聚焦显微镜观察到其主要定位在细胞质和核周。此外, 真核表达载体 pEGFP - hSesn1 的成功构建, 为笔者今后建立能够稳定表达 hSesn1 的细胞模型, 研究其相互作用蛋白及调控蛋白, 同时检测 Sesn1 下游靶基因的表达和活性提供了材料; 更重要的是, 有助于我们在体内 Sesn1 对细胞增殖凋亡以及转移侵袭等机制的研究, 并进一步阐明 hSesn1 在肿瘤转录调控和细胞信号转导中发挥的作用。

综上所述, 笔者本研究将为阐明 Sesn1 的生物学结构和生物学功能提供了崭新的思路, 并为进一步深入探索肿瘤新的靶向治疗奠定了基础。

参考文献

- 1 Lee JH, Cho US, Karin M. Sestrin regulation of TORC1: Is Sestrin a leucine sensor[J]. *Sci Signal*, 2016, 9(431): 265 - 275
- 2 Parmigiani A, Budanov AV. Sensing the environment through sestrins: implications for cellular metabolism[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2016, 327: 1 - 42
- 3 Lee JH, Budanov AV, Karin M. Sestrins orchestrate cellular metabolism to attenuate aging[J]. *Cell Metab*, 2013, 18(6): 792 - 801
- 4 Budanov AV, Shoshani T, Faerman A, *et al.* Identification of a novel stress - responsive gene H195 involved in regulation of cell viability [J]. *Oncogene*, 2002, 21(39): 6017 - 6131
- 5 Peeters H, Debeer P, Bairoch A, *et al.* PA26 is a candidate gene for heterotaxia in humans: identification of a novel PA26 - related gene family in human and mouse [J]. *Hum Genet*, 2003, 112(5 - 6): 573 - 580
- 6 Velasco - Miguel S, Buckbinder L, Jean P, *et al.* PA26, a novel target of the p53 tumor suppressor and member of the GADD family of DNA damage and growth arrest inducible genes [J]. *Oncogene*, 1999, 18(1): 127 - 137
- 7 Cam M, Bid HK, Xiao L, *et al.* p53/Tap63 and AKT regulate mammalian target of rapamycin complex1 (mTORC1) signaling through two

- independent parallel pathways in the presence of DNA damage[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(7):4083–4094
- 8 Budanov AV, Karin M. P53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling[J]. *Cell*, 2008, 134(3):451–460
 - 9 Budanov AV, Sablina AA, Feinstein E, *et al.* Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD[J]. *Science*, 2004, 304(5670):596–600
 - 10 Zhang XY, Wu XQ, Deng R, *et al.* Upregulation of sestrin 2 expression via JNK pathway activation contributes to autophagy induction in cancer cells[J]. *Cell Signal*, 2013, 25(1):150–158
 - 11 Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K, *et al.* Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(24):13784–13789
 - 12 Wachi S, Yoneda K, Wu R. Interactome – transcriptome analysis reveals the high centrality of genes differentially expressed in lung cancer tissues[J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(23):4205–4208
 - 13 Su LJ, Chang CW, Wu YC, *et al.* Selection of DDX5 as a novel internal control for Q-RT-PCR from microarray data using a block bootstrap re-sampling scheme[J]. *BMC Genomics*, 2007, 8:140
 - 14 Sanli T, Linher-Melville K, Tsakiridis T, *et al.* Sestrin2 modulates AMPK subunit expression and its response to ionizing radiation in breast cancer cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2):e32035

(收稿日期:2016-11-24)

(修回日期:2016-12-30)

苦豆碱对膀胱癌 EJ 细胞增殖与凋亡的影响

秦 聪 张 杰 张礼军

摘 要 **目的** 观察苦豆碱对膀胱癌 EJ 细胞增殖与凋亡的影响并探讨其作用机制。**方法** 实验分组如下, A 组:膀胱癌 EJ 细胞不作处理; B 组:加入苦豆碱浓度 25 $\mu\text{mol/L}$; C 组:加入苦豆碱浓度 50 $\mu\text{mol/L}$; D 组:加入苦豆碱浓度 100 $\mu\text{mol/L}$ 。通过 CCK8 检测各组细胞的存活率, 通过流式细胞术检测各组细胞凋亡率, 通过 Western blot 法检测各组细胞 Bcl-2、Bax、p-Erk1/2 蛋白的表达水平。**结果** CCK8 结果显示, B、C、D 组较 A 组细胞存活率降低 ($P < 0.05$); 流式细胞术结果显示: B、C、D 组较 A 组细胞凋亡率增加 ($P < 0.05$); Western blot 结果显示: B、C、D 组较 A 组 Bcl-2、p-Erk1/2 表达水平降低 ($P < 0.05$), Bax 表达水平增高 ($P < 0.05$)。**结论** 苦豆碱可降低膀胱癌 EJ 的存活率, 诱导其凋亡, 其作用机制可能是通过抑制 Erk1/2 的磷酸化而实现的。

关键词 苦豆碱 膀胱癌 增殖 凋亡

中图分类号 R6 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.06.012

Effects of Aloperine on Proliferation and Apoptosis of Bladder Cancer EJ Cells. Qin Cong, Zhang Jie, Zhang Lijun. Central Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract Objective To investigate the effect of aloperine on the proliferation and apoptosis of bladder cancer EJ cells and to explore its mechanism. **Methods** The experimental group was as follows: bladder cancer EJ cells were not treated (group A); 25 $\mu\text{mol/L}$ aloperine was added (group B); 50 $\mu\text{mol/L}$ aloperine was added (group C). 100 $\mu\text{mol/L}$ aloperine was added (group D). The survival rate of the cells was detected by CCK8. The apoptosis rate was detected by flow cytometry. The expression levels of Bcl-2, Bax, p-Erk1/2 protein were detected by Western blot. **Results** CCK8 results showed that: B, C, D group compared with A group, the cell survival rate were decreased ($P < 0.05$). The results of flow cytometry showed that the apoptosis rate of B, C and D group was higher than that of A group ($P < 0.05$). Western blot results showed that: B, C, D group compared with A group the expression of Bcl-2 and p-Erk1/2 levels were reduced ($P < 0.05$), the expression of Bax level was increased ($P < 0.05$). **Conclusion** The survival rate of EJ in bladder cancer can be reduced by aloperine and induce its apoptosis, and inhibiting the phosphorylation of Erk1/2 may be the mechanism.

Key words Aloperine; Bladder cancer; Proliferation; Apoptosis

苦豆碱存在于豆科植物苦豆子中, 且苦豆子叶片

中含苦豆碱较高^[1]。研究表明苦豆碱可以抗 HIV-I 入侵, 可以预防肾缺血再灌注损伤、抗氧化应激, 对多发性骨髓瘤细胞、抗结肠癌细胞具有杀伤作用, 并能缓解疼痛^[2~7]。苦豆碱分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2$, 分子质量为 232.36 kDa, 本实验主要研究苦豆碱对人膀胱移行上皮细胞癌 EJ 细胞的作用。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81470923)

作者单位: 430060 武汉大学人民医院泌尿外科

通讯作者: 张杰, 教授、博士生导师, 电子信箱: zhangjielw@666@

163.com