

过表达白鳍鲨硒结合蛋白1对HL-7702细胞 镉胁迫的解毒作用

王 勇^{1*} 何曼文² 孙艳梅² 刘 琼¹

(¹深圳大学生命科学学院, 深圳市海洋生物资源与生态环境重点实验室, 深圳 518060;

²深圳大学生命科学学院, 深圳市微生物基因工程重点实验室, 深圳 518060)

摘要 硒结合蛋白1(Selenium-binding protein 1, SBP1)与肿瘤相关, 并可以与重金属镉直接结合。该研究构建了白鳍鲨SBP1重组质粒Myc-SBP1并转染人HL-7702细胞, 利用CCK-8和CFDA SE检测Cd胁迫下的细胞增殖情况, 利用流式细胞仪检测细胞内ROS的水平。结果显示, 过表达白鳍鲨SBP1可拮抗Cd对HL-7702细胞的毒害作用。在100 $\mu\text{mol/L}$ 的CdCl₂应激下, 表达SBP1组存活率为76.4%, 约为对照组存活率的2倍, 实验组的细胞增殖指数和分裂能力也略高于对照组。一级结构分析表明, 白鳍鲨SBP1具有两个CXXC区域, 为抗氧化位点, 具有2个HxD和3个HXXH保守区域, 它们为推测的Cd结合位点, 为在HL-7702细胞中表达白鳍鲨SBP1蛋白能拮抗Cd的结构基础。此外, ROS检测实验表明白鳍鲨SBP1蛋白能显著降低胞内ROS水平, 提示硒结合蛋白除通过直接与Cd结合降低毒性外, 降低重金属引起的氧化胁迫也可能发挥一定解毒作用。

关键词 硒结合蛋白; 白鳍鲨; HL-7702细胞; Cd胁迫

The Detoxification Effect of Overexpressed Shark SBP1 on HL-7702 Cells under Cadmium Stress

Wang Yong^{1*}, He Manwen², Sun Yanmei², Liu Qiong¹

(¹College of Life Science, Shenzhen Key Laboratory of Marine Bioresources and Ecology, Shenzhen University,

Shenzhen 518060, China; ²College of Life Science, Shenzhen Key Laboratory of Microbial Genetic Engineering,

Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract Selenium-binding protein 1 (SBP1) is involved in tumorigenesis and has the ability to bind the heavy metal cadmium. In this study, recombinant plasmid of white tip shark SBP1 was constructed and transfected into HL-7702 cells. CCK-8 and CFDA SE were used to detect cell proliferation under Cd stress; flow cytometry was used to analyze intracellular ROS levels. Under 100 $\mu\text{mol/L}$ of CdCl₂ stress, the cell viability of expression SBP1 group was 76.4%, which was approximately 2-fold of the control group; meanwhile, the cell proliferation index of experimental group was also higher than that of control group. Furthermore, we speculated that the reason for shark SBP1 expression efficiently helps to detoxify Cd for HL-7702 cells was based on the 2 CXXC, 2 HXD and 3 HXXH motifs of it, which is speculated antioxidation and metal binding sites respectively. In addition, a

收稿日期: 2013-07-21 接受日期: 2013-10-17

国家自然科学基金(批准号: 21271131、31070731)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0755-26535099; E-mail: wyong@szu.edu.cn

Received: July 21, 2013 Accepted: October 17, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.21271131, 31070731)

*Corresponding author. Tel: +86-755-26535099; E-mail: wyong@szu.edu.cn

网络出版时间: 2013-12-23 14:30

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.01.0223.html>

significantly low intracellular ROS levels was detected for HL-7702 cells after shark SBP1 was expressed, which suggested that reducing oxidative stress induced by heavy metal may also play a role for the detoxification of Cd.

Key words selenium-binding protein; whitetip shark; HL-7702 cells; Cd stress

硒结合蛋白1(selenium-binding protein 1, SBP1, 也称为SELENBP1、SBP56)是硒结合蛋白家族中的一种, 存在于线虫、细菌、扇贝和动植物中^[1-2]。SBP1首先在小鼠肝中发现, 其最先明确的功能是结合机体中游离的硒, 使机体避免硒中毒^[3]。人的硒结合蛋白1在1997年被首次克隆, 其编码472个氨基酸, 分子量为56 kDa, 故又命名为hSP56^[4]。

其次, SBP还与肿瘤相关, hSP56在肺、肝、结肠和前列腺正常组织中高表达, 而在对应的癌组织中hSP56表达量却明显下调; 临床研究表明, 在饮食中添加硒可降低肿瘤形成的概率。这一发现提示硒结合蛋白与饮食中硒的抗癌作用相关^[5]。此外, SBP1在肺腺癌组织中表达量明显比正常组织的要低; 而且SBP1表达的减少与预后不佳相关, 体内含低水平SBP1蛋白的肺腺癌病人的存活率较差; SBP1蛋白的缺乏并不是因为SBP1基因的缺失, 而用甲基化抑制剂5-氮胞嘧啶处理肺腺癌A549细胞也不能改变SBP1的表达。因此, SBP1可潜在地作为一种临床标记物^[6]。

SBP1还参与还原/氧化调节过程。在Cd应激下, 生物体内Se能与Cd拮抗, 形成Se-Cd化合物, 而组织中特别是肝和肾胞浆中Se和SBP1含量提高。此外, SBP1蛋白分子结构发生变化, 形成一个活泼的氧化还原反应中心, 这一氧化还原状态促使硒或Se-Cd与SBP1蛋白结合形成复合物, 同时有助于解除Cd的毒性^[7]。Christelle等^[8]的研究表明, 在拟南芥幼苗中加Cd处理, 其根部SBP1的表达量迅速上调; 在Cd应激下, SBP1的启动子活性增强; 过表达SBP1蛋白能增强对Cd的积聚, 在野生型中减少对Cd的敏感性, 其原因是SBP1直接与Cd结合。

白鳍鲨(white tip shark, *Triacodon obesus*)是软骨鱼, 在进化上高度保守, 其基因组序列未知, 目前只有象鲨的基因组被初步测序^[9]。白鳍鲨的SBP1基因序列及SBP1蛋白的性质目前在国内均未见报道。前期, 我们克隆了白鳍鲨SBP1 cDNA序列, 本文在HL-7702细胞中表达白鳍鲨SBP1蛋白, 研究其对Cd的拮抗作用和对细胞氧自由基(reactive oxygen

species, ROS)的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 白鳍鲨(真鲨目)购买于深圳市盐田区(活体)。RT-PCR Kit、5'-Full RACE Kit试剂盒和pMD18-T载体购自TaKaRa公司; PCR引物由上海赛百胜生物公司合成; Trizol试剂、pcDNA3.1-Myc真核表达载体、Lipofectamine 2000真核细胞转染试剂、PVDF膜和ECL化学发光底物购自Invitrogen公司; RIPA细胞裂解液、Cell Counting Kit-8(CCK-8)、CFDA SE细胞增殖与示踪检测试剂盒和活性氧(ROS)检测试剂盒购自碧云天公司; 用于Western blot测定的Myc标签抗体和羊抗鼠IgG-HRP分别购自SANTA CRUZ公司和上海生工生物工程有限公司。

1.1.2 细胞与细胞培养 人肝细胞株HL-7702购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库; HL-7702细胞培养于37 °C细胞培养箱(含5% CO₂), 培养基成分为RPMI-1640, 含10%胎牛血清及100 U/mL青霉素(Hyclone公司)和100 g/L链霉素(Sigma公司)。细胞生长至对数期将其铺板, 用于后期瞬时转染实验、细胞增殖及ROS检测。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒Myc-SBP1的构建 采用TRIZOL试剂提取白鳍鲨肝组织的总RNA, 按照pimeScript™ RT-PCR Kit说明获得白鳍鲨cDNA文库。设计引物从该cDNA文库中扩增SBP1的开放阅读框(ORF)片段, 并在片段两端引入BamH I和Xba I酶切位点。上游引物: 5'-CGC GGA TCC ATG GCG AAG TGT GGA GAA TGT GG-3', 下游引物5'-GCT CTA GAC TAC AGC CAA ATA TCG GAA CTG C-3'。扩增的片段和pcDNA3.1-cMYC载体都经双酶切后连接在一起, 筛选阳性克隆子并经测序确认后即完成构建重组质粒MYC-SBP1。

1.2.2 细胞转染与Western blot检测 转染前一天, 铺2×10⁶细胞接种于10 cm大培养皿中, 用不含抗生

素的培养基来培养,使细胞密度在转染时达到90%以上。转染前1 h换上新鲜的无血清无抗生素培养基,将重组质粒Myc-SBP1转染至HL-7702细胞中。瞬时转染后24 h收集细胞,制备蛋白质,进行12% SDS-PAGE凝胶电泳,转膜、封闭,抗Myc一抗(1:1 000)及抗GAPDH单抗(1:5 000) 4 °C孵育过夜, TBST洗膜3遍, HRP标记的鼠二抗(1:10 000)孵育2 h, 洗膜、ECL底物作用、曝光、显影、定影及结果分析。

1.2.3 细胞存活率检测 先将 2×10^5 细胞接种于24孔板,次日将重组质粒和空载体pcDNA3.1-Myc经瞬时细胞转染后,迅速轻柔地消化细胞并收集,经细胞计数后,在96孔板中每孔铺上5 000个细胞,同时设置对照孔(不加药培养基和CCK-8溶液,有细胞)和空白孔(培养基和CCK-8溶液,无细胞),每组设定6个复孔。转染24 h后,在实验组和对照组中分别加不同浓度的CdCl₂溶液继续培养,24 h后向培养板中每孔加入10 μL CCK-8溶液。将培养板在细胞培养箱内继续孵育1 h,测量各组的D₄₅₀值。设定转染了空载体且未加Cd的对照组细胞存活率为100%,其他各组细胞存活率(CV)=(实验组D₄₅₀值/对照组D₄₅₀值)×100%。

1.2.4 细胞增殖检测 取对数生长期细胞铺板于10 cm大培养皿中,待细胞密度达到90%以上后分别转染质粒Myc-SBP1和pcDNA3.1-Myc,即为实验组和对照组细胞。转染8 h后,将两组细胞消化并收集,利用羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFDA SE)标记细胞,然后再将细胞铺于6孔板,待转染24 h后,更换新鲜培养基或添加CdCl₂溶液的培养基继续培养。再过24 h后,分别收集细胞,用流式细胞仪检测和ModFit软件分析细胞的增殖情况。

1.2.5 细胞ROS水平检测 对数生长期细胞分别转染质粒Myc-SBP1和pcDNA3.1-Myc,24~48 h之间收集细胞,按照活性氧检测试剂盒说明书标记细胞,然后用流式细胞仪检测,研究细胞内ROS的水平。

1.2.6 统计学分析 上述所有细胞实验均3次重复,数据均经SPSS 13.0软件统计。多组比较采用方差分析,而两组比较采用t检验, P<0.05为有显著性差异, P>0.05为无显著性差异。

2 结果

2.1 SBP1蛋白表达情况

将构建好的重组质粒Myc-SBP1转染至HL-

7702细胞,用Western blot检测SBP1蛋白水平的表达。结果显示,用抗Myc一抗检测到在50~60 kDa之间有一条带(图1),这与预测的SBP1蛋白分子质量为52.6 kDa相符。

2.2 SBP1对HL-7702细胞生存的影响

在镉应激情况下,用CCK-8检测不同细胞组的细胞存活率,发现在HL-7702细胞中表达SBP1组与对照组(转染空载体组)均有低促高抑现象,但是表达SBP1组的细胞存活率均高于对照组(图2),其

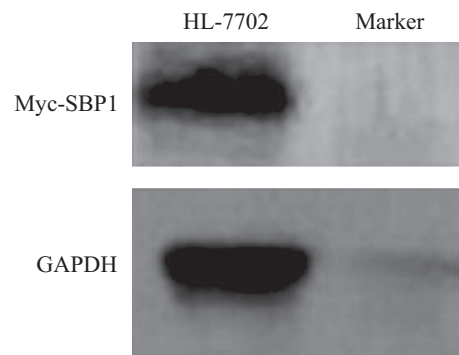
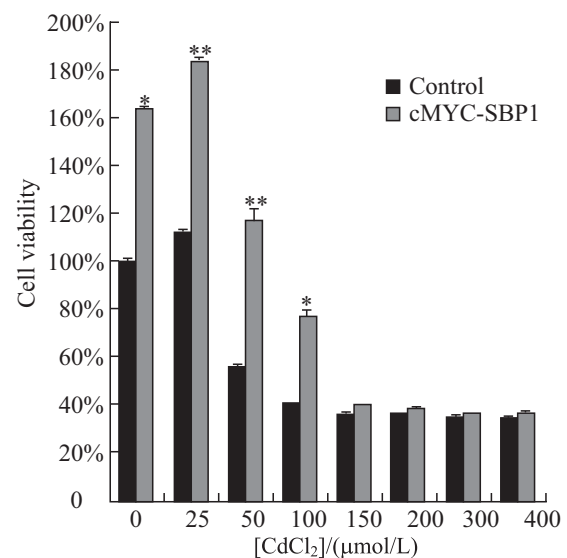


图1 HL-7702细胞中SBP1蛋白的免疫印迹分析

Fig.1 Expression of SBP1 in HL-7702 cells by Western blot



CCK-8检测细胞的存活率,过表达组细胞存活率高于对照组,以未用Cd处理的对照组细胞存活率为参比(100%), *P<0.05, **P<0.01,与对照组比较。

CCK-8 assay showed that cell viability of SBP1 expression was higher than that of control cells, even in 100 μmol/L CdCl₂. The cell viability of Cd-untreated control group was set as 100% and the other groups compared to this criterion. *P<0.05, **P<0.01 vs control group.

图2 Cd应激条件下过表达SBP1对细胞存活率的影响

Fig.2 Influence of SBP1 overexpression to cell viability under Cd stress

中在50 $\mu\text{mol/L}$ Cd胁迫下差别最为明显, 即使是在100 $\mu\text{mol/L}$ 的CdCl₂应激下, 表达SBP1组存活率约76.4%, 而对照组存活率已低于半致死率, 为39.9%, 具有统计学意义($P<0.05$)。当镉浓度高于150 $\mu\text{mol/L}$ 时, 实验组和对照组生长情况已无显著差别, 因为此时细胞已大部分死亡。

选取100 $\mu\text{mol/L}$ 的CdCl₂浓度, 采用CFDA SE标记细胞, 观察并分析细胞的增殖情况, 进而证实以上实验结果。在培养基中未添加CdCl₂时, 表达SBP1组和对照组的细胞主要分裂至第四代(55.87% vs 49.52%) (表1), 表达SBP1组的增殖指数高于对照组(5.15 vs 5.01)($P<0.05$); 在培养基中添加CdCl₂(100 $\mu\text{mol/L}$)

后, 细胞分裂能力减弱, 主要集中在第三代(94.55% vs 85.29%), 实验组细胞的增殖指数同样略高于对照组(3.75 vs 3.54)($P<0.05$)。

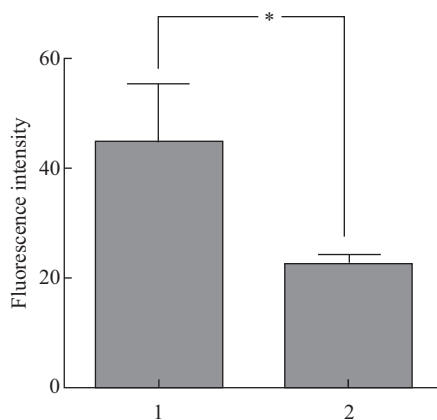
2.3 SBP1对细胞ROS的影响

除了与Cd直接结合外, 我们还探讨了过表达白鳍鲨SBP1对细胞内氧化水平的影响。在HL-7702细胞中分别转染质粒Myc-SBP1和空质粒, 24 h后用DCFH-DA荧光探针检测胞内活性氧。结果如图3所示: 转染了空质粒pcDNA3.1-Myc的细胞的荧光强度为45.09, 而表达了白鳍鲨SBP1蛋白的细胞的荧光强度为22.71, 说明表达白鳍鲨SBP1蛋白显著降低了胞内ROS水平。

表1 表达SBP1实验组和对照组细胞在镉胁迫下的增殖指数($n=3$)

Table 1 Cell proliferation index of SBP1 expression group and control group ($n=3$)

组别 Group	空载体组 Empty vector transfected (0 $\mu\text{mol/L}$ CdCl ₂)(%)	SBP1转染组 SBP 1 transfected group (0 $\mu\text{mol/L}$ CdCl ₂)(%)	空载体组 Empty vector transfected (100 $\mu\text{mol/L}$ CdCl ₂)(%)	SBP1转染组 SBP 1 transfected group (100 $\mu\text{mol/L}$ CdCl ₂)(%)
Parent	0.95	0.51	0.45	1.05
Generation 2	2.23	4.43	12.69	3.94
Generation 3	46.64	38.81	85.29	94.55
Generation 4	49.52	55.87	0.58	0
Generation 5	0.58	0.35	0.87	0.32
Generation 6	0.08	0.02	0.12	0.14
Proliferation index	5.01	5.15	3.54	3.75



HL-7702细胞分别用不同质粒转染, 24 h利用DCFH-DA荧光染料检测细胞内自由基。1: 转染空pcDNA3.1-Myc载体; 2: 转染Myc-SBP1载体。* $P<0.05$ 。

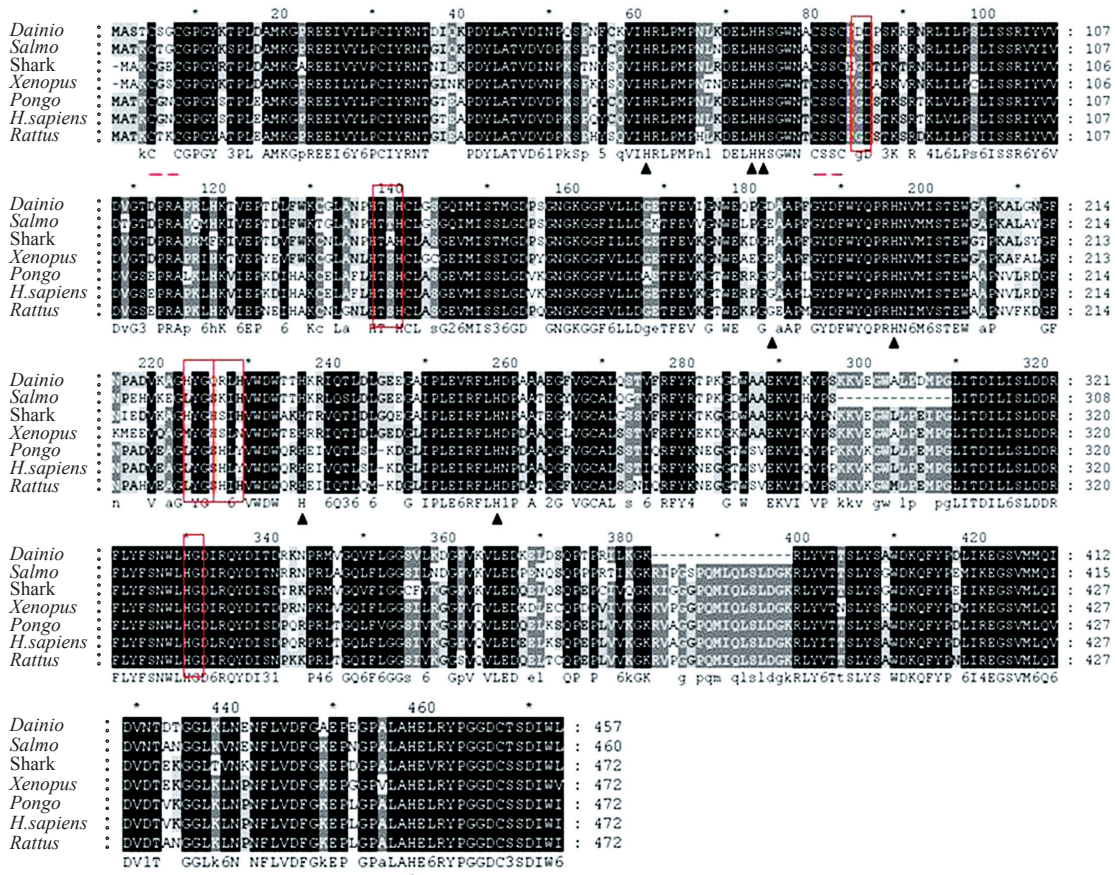
HL-7702 cells were transfected with different plasmids. 24 h later, ROS production was measured by the DCFH-DA fluorescent dye. 1: empty pcDNA3.1-Myc vector; 2: Myc-SBP1 vector. * $P<0.05$.

图3 HL-7702细胞中活性氧自由基比较

Fig.3 ROS detection in HL-7702 cells

2.4 白鳍鲨SBP1与其它物种的序列比对

本研究成功构建Myc-SBP1质粒并转染至HL-7702细胞中, 白鳍鲨SBP1对重金属的拮抗作用可从其一级结构进行初步分析。该蛋白由472个氨基酸组成, 与人、猩猩和大鼠等哺乳动物的硒结合蛋白相同(图4), 而值得注意的是, 硬骨鱼类斑马鱼和鲑鱼的SBP1分别由457和460个氨基酸组成, 提示在一级结构上白鳍鲨SBP1与哺乳动物更为相似, 这也与已经报道的象鲨基因组保守序列与人基因组保守序列的相似度高于一硬骨鱼与人的序列相似性相符^[9]。目前, 已知的SBP1蛋白序列(如人、拟南芥和百脉根等)均含有CXXC、HXD和HXXH保守区域, 可能在参与氧化还原调控和拮抗重金属方面发挥着重要作用^[10]。对白鳍鲨SBP1序列分析, 发现其在氨基酸一级结构上与拟南芥有60%的相似性, 组氨酸残基所占比例为3.2%, 含有2个CXXC、2个HXD和3个HXXH保守区域。



黑色框区为保守区,红色下划线代表CXXC结构域,红框为推测的金属结合位点HXD和HXXH,其他组氨酸用黑色三角形(▲)标出。

Black shaded boxes represented the conserved amino acids of SBP1. The putative CXXC sequence motifs were underlined and the putative metal-binding sites HXD and HXXH were boxed. Additional H residues were marked with arrowheads (▲).

图4 白鳍鲨硒结合蛋白与其他物种的序列比对

Fig.4 Multiple alignments of SBP1 protein in shark and other species

3 讨论

在HL-7702细胞中表达白鳍鲨SBP1蛋白并用不同CdCl₂浓度来处理细胞,实验中发现,表达SBP1组细胞的存活率和增殖指标(增殖指数,主要分裂代数)高于对照组,在0~100 μmol/L时转染SBP1基因的细胞存活率明显高于对照组,说明SBP1蛋白的表达有助于细胞生长和减小了Cd对细胞的危害。机体对重金属Cd的抗性过程复杂,包括诱发多种抗氧化酶如过氧化氢酶3的表达^[11],利用植物螯合肽和金属硫蛋白络合Cd^[12]和通过microRNA对重金属应答进行调控等^[13]。Christelle等^[8]还发现,拟南芥SBP1蛋白可与Cd直接结合,其潜在的金属结合位点为2个HXD和1个HXXH结构,可能是对Cd解毒的关键位点。白鳍鲨SBP1蛋白具有5个金属结合位点(2个HXD和3个HXXH),多于拟南芥、哺乳动物和斑马鱼等,这种结构特性可能是其对Cd具有高拮抗能力的结构基础。

高浓度ROS的产生和消除的不平衡容易引起细胞的氧化应激反应,从而造成细胞凋亡、坏死等有害作用^[14]。在氧化应激胁迫下,许多参与细胞防御的蛋白表达水平增加,而SBP1蛋白就是其中一类,受H₂O₂应激而表达增加^[15]。检测HL-7702细胞内的ROS水平,发现表达白鳍鲨SBP1蛋白后胞内ROS水平降低了近一倍,说明表达白鳍鲨SBP1确实改变了细胞内的氧化还原状态,这也与前人提出的SBP1的蛋白通过氧化还原调节拮抗Cd的结论一致。在体内参与氧化还原调控的许多蛋白(如硫氧还蛋白和硫氧还蛋白还原酶)均具有CXXC区域^[16],与硒结合蛋白的抗氧化活性相关。与其他物种的该蛋白相同,白鳍鲨SBP1也具有2个保守的CXXC区域,其中CSSC结构域与其他物种相同,而蛋白质N端附近的CXXC结构变化较大,白鳍鲨SBP1结构与功能之间的关系还有待进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 Song L, Zou H, Chang Y, Xu W, Wu L. The cDNA cloning and mRNA expression of a potential selenium-binding protein gene in the scallop *Chlamys farreri*. *Dev Comp Immunol* 2006; 30(3): 265-73.
- 2 Agalou A, Roussis A, Spaink HP. The *Arabidopsis* selenium binding protein confers tolerance to toxic levels of selenium. *Funct Plant Biol* 2005; 32: 881-90.
- 3 Bansal MP, Mukhopadhyay T, Scott J, Cook RG, Mukhopadhyay R, Medina D. DNA sequencing of a mouse liver protein that binds selenium: Implications for selenium's mechanism of action in cancer prevention. *Carcinogenesis* 1990; 11(11): 2071-3.
- 4 Chang PW, Tsui SK, Liew C, Lee CC, Waye MM, Fung KP. Isolation, characterization, and chromosomal mapping of a novel cDNA clone encoding human selenium binding protein. *J Cell Biochem* 1997; 64(2): 217-24.
- 5 Yang MH, Sytkowski AJ. Differential expression and androgen regulation of the human selenium-binding protein gene HSP56 in prostate cancer cells. *Cancer Res* 1998; 58(14): 3150-3.
- 6 Chen GA, Wang H, Miller CT, Thomas DG, Gharib TG, Misk DE, *et al*. Reduced selenium-binding protein 1 expression is associated with poor outcome in lung adenocarcinomas. *J Pathol* 2001; 202(3): 321-9.
- 7 Jamba L, Nehru B, Bansal MP. Redox modulation of selenium-binding proteins by cadmium exposure in mice. *Mol Cell Biochem* 1997; 177(1/2): 169-75.
- 8 Dutilleul C, Jourdain A, Bourguignon J, Hugouvieux V. The *Arabidopsis* putative selenium-binding protein family: Expression study and characterization of SBP1 as a potential new player in cadmium detoxification processes. *Plant Physiol* 2008; 147(1): 239-51.
- 9 Byrappa V, Ewen F K, Loh Y H, Halpern A L, Lee AP, Johnson J. Survey sequencing and comparative analysis of the *Elephant Shark* genome. *PLoS Biol* 2007; 5(4): e101
- 10 Fletmetakis E, Agalou A, Kavroulakis N, Dimou M, Martsikovskaya A, Slater A. Lotus japonicus gene Ljsbp is highly conserved among plants and animals and encodes a homologue to the mammalian selenium-binding proteins. *Mol Plant Microbe Interact* 2002; 15(4): 313-22.
- 11 Sarry JE, Kuhn L, Ducruix C, Lafaye A, Junot C, Hugouvieux V, *et al*. The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics* 2006; 6(7): 2180-98.
- 12 Cobbett C, Goldsbrough P. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* 2002; 53: 159-82.
- 13 丁艳菲, 朱 城, 王珊珊, 刘海丽. 植物microRNA对重金属胁迫响应的调控. *生物化学与生物物理进展*(Ding Yanfei, Zhu Cheng, Wang Shanshan, Liu Haili. Regulation of heavy metal stress response by plant microRNAs. *Progress in Biochemistry and Biophysics*) 2011; 38(12): 1106-10.
- 14 Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408(6809): 239-47.
- 15 Desikan R, Mackerness SAH, Hancock JT, Neill SJ. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol* 2001; 127(1): 159-72.
- 16 Meyer Y, Verdoucq L, Vignol F. Plant thioredoxins and gluredoxins: Identity and its putative roles. *Trends Plant Sci* 1999; 4(10): 388-94.