

# TBP-like Protein(TLP)通过G<sub>2</sub>/M期阻滞抑制HeLa细胞的增殖

王宏伟 龚兴国\*

(浙江大学生命科学学院, 杭州 310058)

**摘要** TBP-like protein(TLP)是真核细胞中一种常见的转录因子, 在调节生长发育方面起着重要的作用。该实验构建重组质粒pEGFP-N1-TLP, 研究TLP对人宫颈癌细胞HeLa增殖的影响。利用流式细胞仪检测质粒的转染效率, 通过激光共聚焦显微镜观察外源TLP蛋白的亚细胞定位。经过MTT检测、RNAi-TLP诱导的基因沉默及Hoechst33258染色研究TLP对HeLa细胞的增殖抑制作用。流式细胞术、Western blot和RT-PCR实验结果表明, TLP将HeLa细胞周期阻滞于G<sub>2</sub>/M期, 并抑制周期相关基因*CDK1*和*CyclinB1*的转录和翻译。研究表明, 外源TLP在HeLa细胞的细胞核中表达, 通过降低细胞周期相关基因*CDK1*和*CDK1*的表达水平, 将HeLa细胞的细胞周期阻滞于G<sub>2</sub>/M期, 从而抑制细胞的增殖。

**关键词** TLP; HeLa细胞; 细胞周期; *CDK1*; *CyclinB1*

## The TBP-like Protein (TLP) Inhibits the Proliferation of HeLa Cells through G<sub>2</sub>/M Phase Arrest

Wang Hongwei, Gong Xingguo\*

(College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract** TBP-like protein (TLP), one kind of transcription factors in eukaryotic cells, plays an important role in regulating growth and development. In this experiment, we constructed the recombinant plasmids of pEGFP-N1-TLP to study the effect of *TLP* gene on the proliferation of HeLa cells. The transfection efficiency of plasmids was detected with flow cytometry and the subcellular localization of exogenous TLP protein was determined through laser scanning confocal microscope. *TLP* gene function of proliferation inhibition was determined by MTT assay, gene silence induced by RNAi-TLP and Hoechst33258 staining. Flow cytometry, Western blot and RT-PCR assay showed that TLP induced cell cycle arrest of HeLa cells in G<sub>2</sub>/M phase, by inhibiting the transcription and expression levels of *CDK1* and *CyclinB1* genes. In conclusion, this study showed that the exogenous TLP, expressing exclusively in nucleus of HeLa cells, inhibited the proliferation of HeLa cells through G<sub>2</sub>/M phase arrest.

**Key words** TLP; HeLa cells; cell cycle; *CDK1*; *CyclinB1*

收稿日期: 2013-11-30 接受日期: 2014-01-17

科学技术部农业科技成果转化基金项目(批准号: 2012C2202001)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0571-88206475, E-mail: gongxingguo@126.com

Received: November 30, 2013 Accepted: January 17, 2014

This work was supported by the Ministry of Science and Technology in Agricultural Science and Technology Achievement Transformation Fund Project (Grant No.2012C2202001)

\*Corresponding author. Tel: +86-571-88206475, E-mail: gongxingguo@126.com

网络出版时间: 2014-03-28 16:44

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.04.0398.html>

在真核细胞中, RNA聚合酶参与并促进基因的转录, 而基因转录的关键步骤是转录起始, 即各种转录因子与启动子结合, 形成转录复合物, 确保转录从正确的位点开始<sup>[1-2]</sup>, 此后, RNA聚合酶II才能正常发挥转录功能<sup>[3]</sup>。在真核细胞中, 存在3种RNA聚合酶, 它们分别与相对应的一系列转录因子互作参与基因的转录起始。其中, 转录因子TATA框结合蛋白(TATA-box binding protein, TBP)特异性地参与了RNA聚合酶II介导的基因转录<sup>[1]</sup>, 并且在转录过程中发挥核心功能<sup>[1,4-5]</sup>。TBP能识别基因启动子中的TATA框并与其结合从而引发转录起始复合物的形成<sup>[6]</sup>, 更为重要的是, 它能直接与TFIIA(transfection factor IIA)结合<sup>[7]</sup>, 这有利于TBP与DNA结合从而起始TBP依赖的RNA聚合酶的转录功能。

TBP由两部分组成: N端可变区和由大约180个氨基酸组成的C端保守区(C-terminal conserved domain, CCD)。TLP广泛存在于果蝇、鸡和人等多种物种中<sup>[8-10]</sup>, 因其CCD区与TBP存在76%的相似性, 所以科研人员对TLP的功能进行了深入地研究<sup>[10]</sup>。因此, 科学家推测TLP很可能是由原始的TBP基因经过一系列的基因复制和突变演化而来的<sup>[8]</sup>。

大量实验表明, TLP与TBP的功能存在很大的差异<sup>[11]</sup>。例如: TLP虽然能与TFIIA和TFIIB结合, 但是不与TATA框结合。另外, 在体外实验中, TBP不能代替TLP的转录功能。还有研究表明, TLP对小鼠、斑马鱼、线虫的精子形成至关重要, 因为在小鼠出生14 d即精子细胞仍处于初级精母细胞的状态时, TLP的表达水平很低, 只有开始产生精子之后, TLP的表达水平才会上升<sup>[12-14]</sup>。另外, TLP在调节基因的转录方面也起很重要的功能。例如, 在体内活性氧水平很高的情况下, TLP能下调TRF2基因的表达, 因为较高的氧化压力不利于睾丸中精子的形成<sup>[15]</sup>。此外, TLP还是小鼠wee1基因的转录抑制因子<sup>[16]</sup>。值得注意的是, TLP的这些功能并不需要与TATA框的结合为前提。在人体内, TLP也有重要的功能, 能调节多种基因的转录<sup>[17]</sup>。

尽管针对TLP的功能已有大量的研究, 但是, 其在抑制癌细胞增殖方面没有充分的研究。本实验研究表明, 过表达TLP能显著地抑制HeLa细胞的增殖, 并且将细胞周期阻滞于G<sub>2</sub>期。进一步的研究结果显示, TLP过表达的细胞中CDK1和CyclinB1的转录和翻译水平都降低, 从而揭示出TLP抑制癌细胞增

殖的机制。由于TLP特异性地作用于HeLa细胞, 对LO2细胞没有明显的抑制作用, 从而表明TLP可能是癌症治疗的靶点, 为寻找抗癌药物新的靶点提供了科学依据, 具有重要的临床意义和潜在的科研价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

真核细胞表达载体pEGFP-N1购于Life technologies公司; HeLa细胞系、人胚胎肝细胞LO2、人肝癌细胞HepG2、白血病细胞HL60、人胚胎肾293细胞Hek293为本实验室保存; 引物由Life technologies公司合成; 无内毒素质粒中抽试剂盒购于Sigma公司; 转染试剂盒(Attractene Transfection Reagent)购于Qiagen公司; 反转录试剂盒购于ToYoBo公司; Hoechst33258购于碧云天生物技术研究所在; MTT试剂购于Sigma公司; 抗兔CDK1、CDK2、CDK4、CyclinB1、CyclinD1、CyclinE1购于北京博奥森生物技术公司; 抗鼠GAPDH购于杭州贤至生物科技有限公司。

### 1.2 重组质粒pEGFP-N1-TLP的构建及转染

1.2.1 重组质粒的构建 以Triol法提取的LO2细胞的RNA为模板, 反转录成cDNA, 克隆目的基因。设计引物为: 上游引物: 5'-CCG CTC GAG ATG GAT GCA GAC AGT GAT GTT G-3', 下游引物: 5'-TCC CCG CGG TAA AAT TTC TTT CCT GCT TT-3'(下划线表示引入的限制性内切酶识别位点: 上游引物Xho I、下游引物Sac II及其相应的保护碱基)。扩增出的目的基因理论大小为561 bp。用限制性内切酶Xho I、Sac II过夜酶切PCR产物和载体pEGFP-N1, 将目的基因和载体大片的胶回收后的产物用T<sub>4</sub> DNA连接酶连接, 得到重组质粒pEGFP-N1-TLP。将该质粒送往上海英潍捷基生物技术有限公司检测序列完全正确, 说明成功构建重组质粒pEGFP-N1-TLP。

1.2.2 质粒转染 消化并收集生长状态良好的HeLa细胞、LO2细胞、HepG2细胞、HL60细胞、Hek293细胞以5×10<sup>4</sup>/孔的细胞密度接种于96孔板中, 并按照试剂盒说明书中的方法转染: 将0.2 μg质粒DNA用无血清、无双抗的DMEM高糖培养基稀释至50 μL, 然后与0.75 μL转染试剂混合, 室温静置15 min, 最后将上述混合物加入到细胞悬液中; 24孔板转染时, 细胞密度为1×10<sup>5</sup>/孔, 每孔加入的质粒为0.4 μg, 用培养基稀释至60 μL, 最后与1.5 μL转染试

剂混合; 6孔板转染细胞时, 以 $5 \times 10^5$ /孔的细胞密度接种于6孔板中, 每孔加入的质粒为1.2  $\mu\text{g}$ , 用培养基稀释至100  $\mu\text{L}$ , 最后与4.5  $\mu\text{L}$ 转染试剂混合。

**1.2.3 流式细胞术检测转染效率** 将生长状态良好的HeLa细胞种于6孔板中, 以1.2.2的方法, 用重组质粒pEGFP-N1-TLP分别转染24, 36, 48, 60, 72 h后, 收集细胞, 用PBS洗两遍, 最后用PBS重悬, 空白对照组即为未经转染的HeLa细胞。通过流式细胞仪分析表达绿色荧光蛋白细胞的比例及细胞中的荧光强度。

### 1.3 激光共聚焦显微镜分析TLP在HeLa细胞中的亚细胞定位

以 $1.0 \times 10^5$ /孔的浓度将生长状态良好的HeLa细胞接种于24孔板中, 并事先将直径为1 cm的盖玻片置于孔中, 并按1.2.2中的方法转染。转染48 h后, 吸出培养基, 每孔加50  $\mu\text{L}$  Hoechst33258, 细胞培养条件下避光孵育20 min后, 吸出染色液, PBS洗两次。然后, 将细胞爬片置于载玻片上, 细胞面朝上, 轻轻盖上盖玻片, 使用激光共聚焦显微镜的油镜, 分别在488 nm和405 nm的激发波长下观察绿色荧光蛋白和Hoechst33258。根据两种荧光在细胞中的定位, 推断TLP在细胞中的表达位置。

### 1.4 TLP-siRNA的合成及转染

根据Genbank中TLP基因的序列, 按照siRNA序列设计原则, 设计TLP基因特异性的siRNA序列如下: 5'-UAG ACC UCA UGC CAG UUA CGA ACC UUU-3', 同时设计TLP基因的阴性对照siRNA: 5'-UGU CCU AGA ACC ACG CAG ACU AUU CUU-3', 即其核苷酸组成与TLP-siRNA完全相同, 仅排列顺序不同, 且与人类基因组的所有基因均无同源性。两组siRNA由上海吉玛制药技术有限公司合成。按照Qiagen公司转染试剂的说明书转染, 具体方法如下: 分别将对数生长期的HeLa细胞、LO2细胞以 $5 \times 10^4$ /孔的浓度种于96孔板中; 次日, 分别将TLP-siRNA和阴性对照siRNA各 $5 \times 10^{-9}$  mol溶于用无血清、无双抗的DMEM高糖培养基稀释至50  $\mu\text{L}$ , 混匀后加入0.25  $\mu\text{L}$ 转染试剂并混匀, 静置20 min, 最后将上述混合物加入到100  $\mu\text{L}$ 细胞悬液中。若使用6孔板, 则各组分的用量分别为: 细胞密度:  $6 \times 10^5$ /孔, 每孔中加入siRNA 100 pmol, 用培养基稀释至100  $\mu\text{L}$ , 转染试剂为5  $\mu\text{L}$ 。

### 1.5 RT-PCR检测TLP基因的转录水平

将生长状态良好的HeLa细胞种于6孔板, 用1.4

中的方法, 以TLP-siRNA和对照siRNA处理细胞。处理24 h后, 收集细胞。同时, 其他6孔板中HeLa细胞以1.2.2中的方法用重组质粒pEGFP-TLP分别转染24, 48, 72 h。各组细胞分别用Trizol法提取总RNA, 并检测RNA的含量, 以等量的总RNA为模板, 反转录出各组细胞中的TLP基因。根据TLP基因序列设计引物为: 上游引物: 5'-ATG GAT GCA GAC AGT GAT GTT G-3', 下游引物: 5'-TAA AAT TTC TTT CCT GCT TT-3'。实验设5组: 空白对照组、TLP-siRNA作用48 h组、重组质粒分别转染24, 48, 72 h组。最后通过琼脂糖凝胶电泳检测, 以各组细胞中GAPDH的含量为参照, 分析各组总RNA中TLP的mRNA含量, 从而比较各组细胞中TLP的相对转录水平。

### 1.6 TLP抑制HeLa细胞的增殖

**1.6.1 MTT法检测TLP对不同细胞增殖的影响** 分别将生长状态良好的人肝癌细胞HepG2、白血病细胞HL60、人胚胎肾293细胞Hek293及HeLa细胞接种于96孔板中, 并按1.2.2中的方法转染。设置转染时间梯度为24, 36, 48, 60, 72 h。处理完毕后, 按如下方法检测: 将96孔板中的培养基吸出, 用PBS冲洗1次, 每孔加入100  $\mu\text{L}$ 、浓度为500 mg/mL的MTT试剂; 37  $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育4 h并吸出孔内试剂后, 加入150  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜(DMSO), 并震荡15 min; 用酶标仪检测570 nm波长激发光下的吸光值。

**1.6.2 MTT法检测不同表达水平的TLP对HeLa细胞增殖的影响** 分别将生长状态良好的HeLa细胞、LO2细胞接种于96孔板中, 两种细胞分别用重组质粒pEGFP-N1-TLP、TLP-siRNA和对照组siRNA转染处理, 设置时间梯度为24, 36, 48, 60 h。处理完毕后, 按照1.6.1中的方法检测。

**1.6.3 Hoechst33258染色** 将生长状态良好的HeLa细胞接种于24孔板中, 并事先将直径为1 cm的盖玻片置于孔中, 并按1.2.2中的方法用重组质粒pEGFP-N1-TLP转染。转染48 h后, 吸出培养基, 并用PBS清洗两遍, 每孔加50  $\mu\text{L}$  Hoechst33258, 细胞培养条件下避光孵育20 min后, 吸出染色液, PBS洗2次, 用激光共聚焦显微镜观察细胞核的形态。

### 1.7 流式细胞仪分析细胞周期

按照1.2.2中的方法, 将HeLa细胞接种于6孔板中, 并转染。实验设2组: 重组质粒pEGFP-N1-TLP转染HeLa细胞(EGFP-TLP-HeLa组)和空质粒转染HeLa细胞(EGFP-HeLa组)。各组设置时间梯度为24,

36, 48, 60, 72 h。将转染后的各组细胞消化并离心, 收集细胞沉淀; 小心加入2 mL预冷的70%的酒精, -20 °C固定12 h以上。检测之前用PBS清洗2次, 加入含RNA酶的碘化丙啶, 染色30 min后上机检测处于细胞周期各个时相的细胞数目占被检细胞数目的百分比。

### 1.8 RT-PCR分析周期相关基因的转录水平

按照1.2.2中的方法, 将HeLa细胞接种于6孔板中, 并转染。实验设2组: 实验组EGFP-TLP-HeLa组、空载体EGFP-HeLa组。各组转染的时间梯度为0, 24, 48, 72 h(0 h表示未经转染的细胞)。用Trizol法提取各组细胞的总RNA, 并检测RNA的含量。以等量的总RNA为模板, 反转录成cDNA, 根据下表所示的PCR条件(表1)及引物序列(表2), 检测下列基因(*CDK1*、*CyclinB1*、*CDK2*、*CDK4*、*CyclinD1*、*CyclinE1*、*GAPDH*)的相对变化。最后通过琼脂糖凝胶电泳检测, 以*GAPDH*的含量为参照, 分析各组总RNA中上述基因mRNA的相对含量, 从而比较上述基因的相对转录水平。

表1 各基因的PCR条件

Table 1 PCR conditions for each gene

基因 Gene	变性 Denaturation	复性 Renaturation	延伸 Extend	循环数 Cycles
<i>CDK1</i>	94 °C, 30 s	50 °C, 30 s	72 °C, 45 s	21
<i>CDK2</i>	94 °C, 30 s	51 °C, 30 s	72 °C, 45 s	25
<i>CDK4</i>	94 °C, 30 s	50 °C, 30 s	72 °C, 45 s	23
<i>CyclinB1</i>	94 °C, 30 s	50 °C, 30 s	72 °C, 45 s	23
<i>CyclinD1</i>	94 °C, 30 s	50.5 °C, 30 s	72 °C, 45 s	27
<i>CyclinE1</i>	94 °C, 30 s	48 °C, 30 s	72 °C, 45 s	24
<i>GAPDH</i>	94 °C, 30 s	55 °C, 30 s	72 °C, 45 s	23

表2 RT-PCR反应所用的引物

Table 2 Primers used in RT-PCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
<i>CDK1</i> -forward	GAG AAA ATT GGA GAA GGT ACC TAT G
<i>CDK1</i> -reverse	ACT CTG ATA GGT ATT CCA AAA GCT C
<i>CDK2</i> -forward	CAA AGC CAG AAA CAA GTT GAC GG
<i>CDK2</i> -reverse	GTC ACC ACC TCA TGG GTG TAA GTA C
<i>CDK4</i> -forward	GTT CGT GAG GTG GCT TTA CTG AG
<i>CDK4</i> -reverse	GAG TTT CCA CAG AAG AGA GGC TTT C
<i>CyclinB1</i> -forward	GGT TCA TGC AGA ATA ATT GTG TGC C
<i>CyclinB1</i> -reverse	TGA CTA CAT TCT TAG CCA GGT GC
<i>CyclinD1</i> -forward	CTC GGT GTC CTA CTT CAA ATG TGT G
<i>CyclinD1</i> -reverse	GAA ATG AAC TTC ACA TCT GTG GCA C
<i>CyclinE1</i> -forward	TTC TGG ATT GGT TAA TGG AGG TG
<i>CyclinE1</i> -reverse	CTA TGT CGC ACC ACT GAT ACC CT
<i>GAPDH</i> -forward	AAT CCC ATC ACC ATC TTC CA
<i>GAPDH</i> -reverse	CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG

### 1.9 Western blot检测CDK1、CyclinB1的表达

按照1.2.2中的方法, 将HeLa细胞接种于6孔板中, 并转染。实验设2组: 实验组EGFP-TLP-HeLa组、空载体EGFP-HeLa组, 各组设置时间梯度为0, 24, 48, 72 h(0 h表示未经转染的细胞)。转染一定时间后, 用含蛋白酶抑制剂的裂解液充分裂解各组细胞, 并测定各组蛋白浓度; 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 并控制每孔上样量为10 μg; 然后将凝胶中的蛋白转印至硝酸纤维素薄膜; 封闭2 h后, 一抗4 °C振荡孵育过夜, 次日用辣根过氧化物酶偶联的二抗室温孵育1 h后, 在膜上滴加化学发光剂, 并在暗室中使胶片感光、显影。

### 1.10 统计学处理

各实验至少经过3次重复, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 并用SPSS 16.0软件进行显著性差异分析。P<0.05为差异显著, P<0.01为差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒成功转染至HeLa细胞

为了研究重组质粒pEGFP-N1-TLP转染HeLa细胞的转染效率, 我们通过流式细胞仪检测HeLa细胞中表达绿色荧光蛋白的细胞比例。实验结果如图1所示, 图中横坐标为荧光强度, 纵坐标代表细胞数, 百分数表示发出绿色荧光的细胞比例。空白对照组为未经处理的HeLa细胞。由图可知, 当转染时间不超过48 h时, 被转染的细胞比例均不超过30%, 表明经过较短的转染时间, HeLa细胞中表达GFP的比例较低。而当转染60 h、72 h后, 分别有56.7%、58.1%的细胞表达GFP。以上表明, 当转染时间超过48 h时, 细胞的转染效率显著提高。

### 2.2 TLP定位于细胞核

将重组质粒pEGFP-N1-TLP转染48 h后的HeLa细胞用Hoechst33258染色, 使用激光共聚焦显微镜检测两种荧光的亚细胞定位。HeLa细胞转染重组质粒后会发出绿色荧光, 由于TLP与GFP基因共同在细胞中表达, 所以通过绿色荧光发出的位置即可研究细胞中TLP的表达定位; 细胞经过Hoechst 33258染色, 在405 nm的激发光下可发出蓝色荧光, 显示细胞核的位置。当把两张荧光图片叠加时, 发现TLP与细胞核共定位, 表明TLP在细胞核中表达。

### 2.3 细胞中TLP的转录水平分析

通过RT-PCR实验检测HeLa细胞、LO2细胞

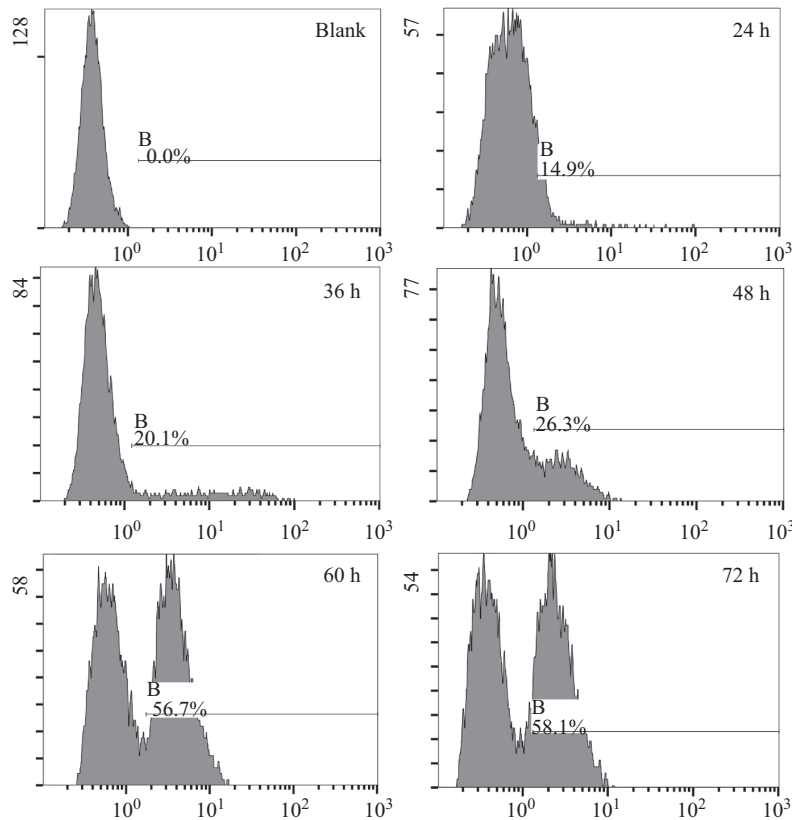


图1 不同转染时间的转染效率

Fig.1 Transfection efficiency at different times of transfection

中TLP的mRNA水平。实验结果如图3所示。经过RNAi-TLP处理48 h后,细胞中TLP的表达完全受到抑制;而经过重组质粒pEGFP-N1-TLP转染不同时间后,细胞中TLP的表达水平随着转染时间的延长而升高。各组均以相对应的GAPDH的转录水平做对照。由图可以看出,经过RNAi-TLP处理组的荧光强度大大减弱,而经过重组质粒转染组的荧光强度随转染时间的延长逐步增强。

#### 2.4 TLP抑制HeLa细胞增殖

**2.4.1 TLP对HeLa细胞存活力的影响** 为了比较过表达TLP对不同细胞存活力的影响,采用MTT法检测重组质粒pEGFP-N1-TLP和空载体pEGFP-N1转染后,细胞的增殖活力,4种细胞在转染24, 36, 48, 60, 72 h后,用酶标仪检测570 nm波长激发光下的吸光值,并以两种质粒转染的结果的比值作为该组细胞的相对增殖活力。所得结果如图4所示,由图可以看出,TLP对HeLa细胞的抑制效果最明显( $P<0.05$ ),而对其他3种细胞的增殖无显著的抑制作用。

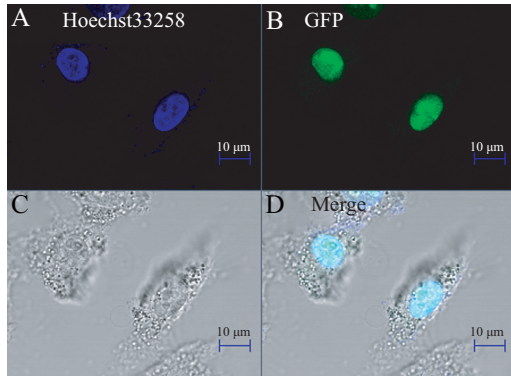
**2.4.2 RNAi-TLP可解除TLP对HeLa细胞增殖的抑制作用** 为了进一步确认重组质粒对HeLa细胞增殖的抑制作用是由于外源TLP蛋白引起的,分别检

测经过重组质粒pEGFP-N1-TLP转染及经过RNAi-TLP处理的HeLa细胞和LO2细胞的增殖活力。实验结果显示,当细胞过表达TLP时,细胞的增殖活力有所下降,HeLa细胞受到的增殖抑制效果显著( $P<0.05$ )。然而,当HeLa细胞经过RNAi-TLP处理后,细胞的增殖抑制效果解除,且细胞的相对增殖活力增加。该结果表明,通过RNA干扰实验抑制TLP基因的表达,可逆转TLP对细胞的抑制作用,从而证明TLP对细胞增殖的抑制作用。

**2.4.3 TLP过表达对HeLa细胞核形态的影响** 分别将空载体EGFP-HeLa组和实验组EGFP-TLP-HeLa组的细胞用Hoechst33258染色,在激光共聚焦显微镜下观察细胞核的形态。检测结果如图6所示,图6A为空载体EGFP-HeLa组细胞,其细胞核形态正常,呈椭圆形,染色均一,核边缘光滑;图6B为实验组EGFP-TLP-HeLa组细胞,由图可以看出经过重组质粒转染48 h后,细胞核形态发生异常,表现在细胞核染色加深,细胞核皱缩。以上说明,HeLa细胞的增殖受到抑制。

#### 2.5 TLP将HeLa细胞周期进程阻滞于G<sub>2</sub>期

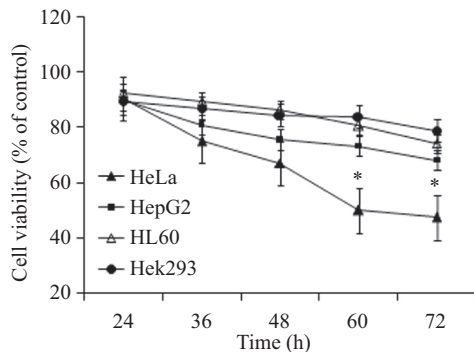
用流式细胞仪分析转染后的细胞中处于细胞



A: 细胞核(激发光405 nm); B: GFP-TLP(激发光488 nm); C: 无激发光条件下的细胞形态; D: GFP-TLP与Hoechst33258共定位。  
A: nucleus (the excitation wavelength is 405 nm); B: GFP-TLP (the excitation wavelength is 488 nm); C: the morphology of the whole cells without being excited; D: GFP-TLP co-localized with the staining of Hoechst33258.

图2 Hoechst33258染色显示TLP于细胞核中表达(63×)

Fig.2 Hoechst33258 staining showed that TLP was expressed in nucleus (63×)



$P < 0.05$ , 与24 h组比较。

$P < 0.05$  vs 24 h group.

图4 TLP对不同细胞相对增殖活力的影响

Fig.4 Effect of TLP on the relative viability of different cells

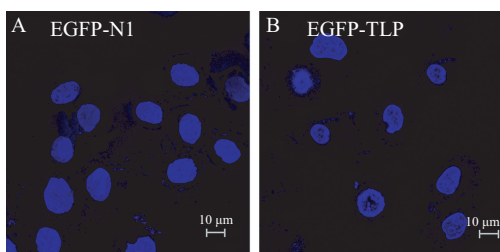
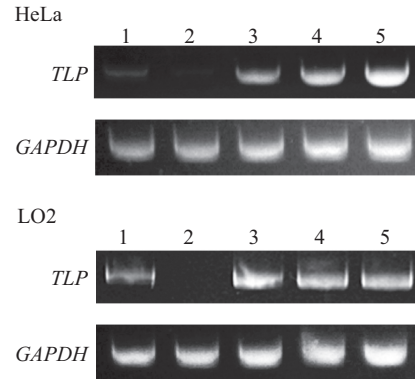


图6 Hoechst33258染色检测细胞核形态(63×)

Fig.6 Morphology of nucleus detected through Hoechst33258 staining (63×)

周期各时相的细胞数目, 检测结果如图7所示。当重组质粒pEGFP-N1-TLP转染HeLa细胞48 h后, 其G<sub>2</sub>期的细胞数目明显高于空质粒pEGFP-N1转染的HeLa细胞。而且, 这一差别随着转染时间的延长更

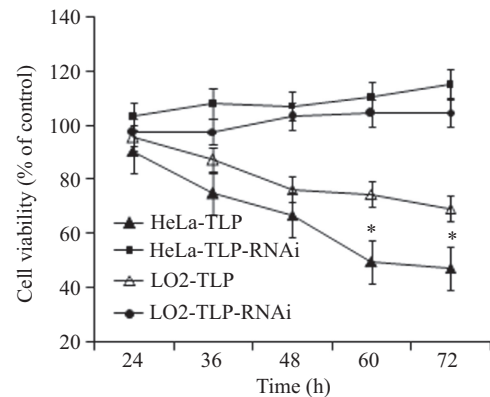


1: 空白; 2: RNAi-TLP处理48 h; 3、4、5: 重组质粒pEGFP-N1-TLP转染24, 48, 72 h。

1: blank; 2: transfected with RNAi-TLP for 48 h; 3, 4, 5: transfected with pEGFP-N1-TLP for 24, 48, 72 h.

图3 细胞中TLP的转录水平

Fig.3 Transcription levels of TLP in cells



$P < 0.05$ , 与24 h组比较。

$P < 0.05$  vs 24 h group.

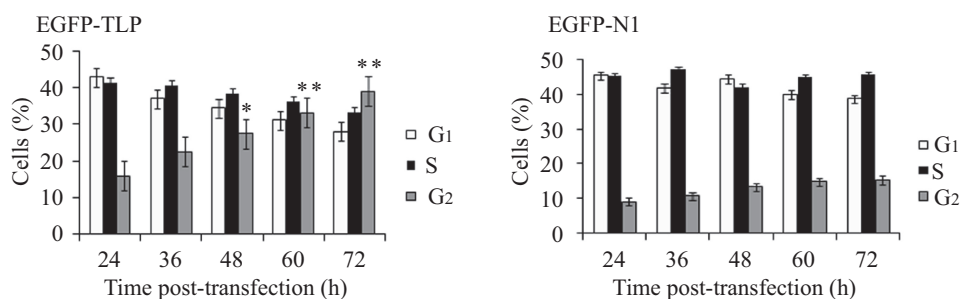
图5 TLP对HeLa细胞相对增殖的影响

Fig.5 Effect of TLP on the relative viability of HeLa cells

为显著: 当转染时间达到72 h时, 重组质粒转染的HeLa细胞中G<sub>2</sub>期细胞的比例已达(38.96±0.053)%, 而空质粒转染的HeLa细胞中G<sub>2</sub>期细胞的比例仅为(15.378±0.068)%, 存在极为显著的差异( $P < 0.01$ )。该结果表明, TLP能使细胞周期阻滞于G<sub>2</sub>期, 并且随着转染时间的延长, 该阻滞效果更为明显。从而说明, TLP通过将细胞周期阻滞于G<sub>2</sub>期的方式来抑制HeLa细胞的增殖。

## 2.6 TLP抑制HeLa细胞基因CDK1和CyclinB1的转录

为了研究TLP对周期相关基因转录水平的影响, 实验以GAPDH为参照, 通过RT-PCR检测转染后细胞中CDK1、CyclinB1、CDK2、CDK4、CyclinD1、CyclinE1的转录水平。检测结果如图8所示: 在转染



\* $P < 0.05$ , 与24 h组比较; \*\* $P < 0.01$ , 与24 h组比较。

\* $P < 0.05$  vs 24 h group; \*\* $P < 0.01$  vs 24 h group.

图7 转染后HeLa细胞的周期分析

Fig.7 Cell cycle analysis of transfected HeLa cells

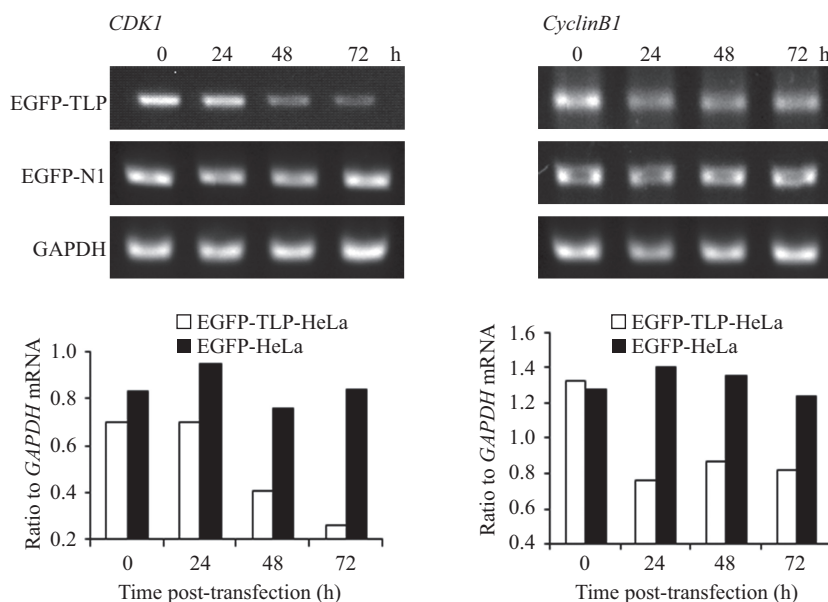


图8 TLP转染后HeLa细胞中CDK1、CyclinB1的转录水平

Fig.8 Transcription levels of CDK1 and CyclinB1 in HeLa cells transfected by TLP

48 h之后, 重组质粒pEGFP-N1-TLP转染的HeLa细胞组, 其CDK1条带的灰度值相对于0 h降低了42.9%, 而且在转染72 h时, 降低了63.3%; CyclinB1条带的灰度值在转染24 h后相对于0 h降低46.2%, 且在转染48 h、72 h后一直维持低水平; 其他基因的转录水平则没有明显地变化(图中未显示); 然而, 空载体pEGFP-N1转染的HeLa细胞, 不管是G<sub>1</sub>期相关的基因还是G<sub>2</sub>期相关的基因, 其转录水平都没有明显的变化。由此可以推断出, TLP转染使HeLa细胞G<sub>2</sub>期相关蛋白基因CDK1和CyclinB1的转录水平明显降低(图8)。

## 2.7 TLP抑制HeLa细胞中蛋白CDK1和CyclinB1的表达

通过Western blot进一步检测了HeLa细胞中CDK1和CyclinB1蛋白的表达水平。通过调整上

样量, 使各点样孔的总蛋白水平保持一致, 并以GAPDH的表达水平作参照。分别对转染0, 24, 48, 72 h的细胞进行检测, 结果显示, 重组质粒pEGFP-N1-TLP转染的HeLa细胞组CDK1的表达水平在48 h后明显降低, CyclinB1的表达水平在转染24 h后即有所降低, 且随着转染时间的延长, 蛋白的表达水平更低。然而, 空载体pEGFP-N1转染的HeLa细胞CDK1和CyclinB1的蛋白表达水平都无明显变化(图9)。

## 3 讨论

TLP在人体的各种器官中广泛表达<sup>[10]</sup>, 在本实验中, 我们成功地从LO2细胞中分离出TLP基因的mRNA, 构建了重组质粒pEGFP-N1-TLP, 并转染至HeLa细胞中。GFP基因在488 nm的激发光下能发出绿色荧光, 所以, 本文使外源基因TLP与GFP融合

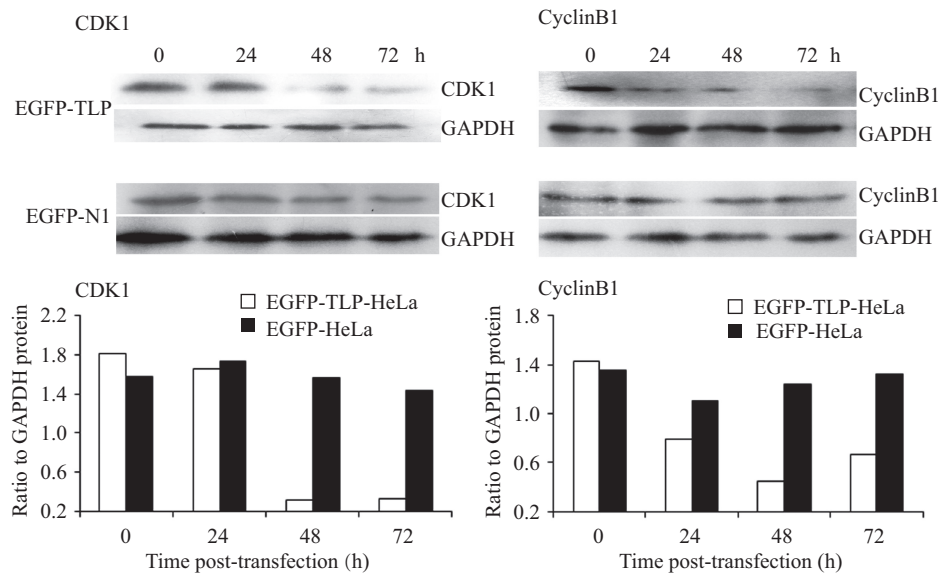


图9 TLP转染后HeLa细胞中CDK1、CyclinB1的表达水平

Fig.9 Expression levels of CDK1 and CyclinB1 protein in HeLa cells transfected by TLP

表达,通过对细胞中荧光强度等参数的分析来完成对外源基因的初步研究。

本研究通过流式细胞仪检测不同转染时间的转染效率,其中,当转染时间为72 h时,转染效率达58.1%。转染后的细胞经过Hoechst33258染色,使用激光共聚焦显微镜观察发现,外源TLP蛋白在细胞核中表达。通过MTT实验、RNAi诱导的TLP基因沉默以及细胞核染色等研究表明,TLP能抑制HeLa细胞增殖,而对其他细胞例如LO2细胞、HepG2细胞、HL60细胞和Hek293细胞的抑制效果不明显。为了进一步研究TLP在HeLa细胞中的作用,我们通过流式细胞术研究转染后细胞周期各时相分布,结果表明,TLP使HeLa细胞周期阻滞于G<sub>2</sub>/M期。随后我们利用RT-PCR和Western blot检测周期相关基因的转录和表达水平。研究结果表明,TLP能抑制HeLa细胞中CDK1和CyclinB1的转录和翻译,从而揭示出TLP诱导G<sub>2</sub>/M期周期阻滞的原因。

由此可知,TLP作为一种转录因子,同时有抗肿瘤的功能。有研究表明,TLP在精子形成<sup>[12]</sup>和胚胎发育<sup>[14]</sup>方面起着重要作用。同时,大量的研究表明,多种诱导胚胎的发育和细胞分化的因子皆有调节细胞周期进程的作用<sup>[18-21]</sup>。另外,已经研究出多种细胞转录因子在控制细胞周期进程方面起着重要的作用<sup>[22-25]</sup>。

实验结果显示,TLP能抑制HeLa细胞增殖。所以,从某种意义上讲,TLP是肿瘤细胞的增殖抑制因子,或许可以作为抗肿瘤治疗的靶点。之前也有研

究结果显示,TLP是小鼠weel基因的抑制因子。我们推测TLP这种抑制肿瘤细胞增殖的功能与其转录抑制功能相关。

我们由此得出结论,TLP能特异性地抑制肿瘤细胞增殖。在本实验中,TLP在细胞周期进程中起着重要的作用,因为在TLP过表达的HeLa细胞中,其G<sub>2</sub>期明显延长。这与之前的研究相吻合,即TLP能抑制鸡DT40细胞的增殖,并且将细胞周期阻滞于G<sub>2</sub>期<sup>[17]</sup>。

CyclinB1能调节细胞分裂周期基因2(cell division cycle gene 2, CDC2)激酶的活性,控制细胞周期G<sub>2</sub>/M期的顺利通过,在有丝分裂调节方面起着重要作用。所以,抑制CyclinB1的转录是控制肿瘤发展的有效方式。例如:大多数乳腺癌细胞系过表达CyclinB1,而且其在肿瘤细胞的积累能促进肿瘤细胞的增殖,从而很难通过控制启动子活性的方式来控制该蛋白的表达<sup>[26]</sup>。细胞周期调控是翻译水平调控的重要方式,在细胞分裂间期,各基因的翻译效率很高,等到分裂期时,由于翻译的起始受到抑制,所以效率降低。该过程是通过磷酸化相关调节蛋白而使其失活来实现的。CDK1就通过使一系列蛋白底物磷酸化的方式调节细胞周期G<sub>2</sub>期到M期的进程<sup>[27]</sup>。TLP能够抑制CyclinB1和CDK1的转录和翻译,这无疑是一种有效抑制肿瘤增殖的机制。

磷酸甘油醛脱氢酶(reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH)是由四个37 kDa亚基组成的四聚体,是糖酵解反应中的关键性酶。其



基因作为一种管家基因, 在各种组织中广泛表达, 且表达量相对恒定, 可以作为转录及表达水平研究的内参<sup>[28]</sup>。在本实验中, 将周期相关基因的转录、翻译水平与GAPDH作对比, 通过控制GAPDH的量在不同组中保持一致, 从而确保各组的上样量相同, 即可检测出周期相关基因的转录和表达水平。实验结果显示: 过表达TLP的HeLa细胞中, G<sub>2</sub>期相关基因CDK1和CyclinB1的转录水平和翻译水平都明显下降。

综上所述, 我们通过形态学观察、MTT实验发现TLP能显著地抑制HeLa细胞的增殖, 并且通过流式细胞仪检测发现TLP能将HeLa细胞的周期进程阻滞于G<sub>2</sub>期, 随后通过RT-PCR、Western blot实验揭示出周期阻滞的机制是抑制CDK1和CyclinB1的转录和翻译, 从而说明TLP可能是癌症治疗的靶点, 为寻找抗癌药物新的靶点提供了科学依据, 具有重要的临床意义和潜在的科研价值。

### 参考文献 (References)

- Hernandez N. TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev* 1993; 7(7B): 1291-308.
- Lira-DeVito LM, Burke TW, Kadonaga JT. Structure of the genes encoding transcription factor IIB and TATA box-binding protein from *Drosophila melanogaster*. *Gene* 1995; 153(2): 203-7.
- Ham J, Steger G, Yaniv M. How do eukaryotic activator proteins stimulate the rate of transcription by RNA polymerase II? *FEBS Lett* 1992; 307(1): 81-6.
- Struhl K. Duality of TBP, the universal transcription factor. *Science* 1994; 263(5150): 1103-4.
- Sharp PA. TATA-binding protein is a classless factor. *Cell* 1992; 68(5): 819-21.
- Orphanides G, Lagrange T, Reinberg D. The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev* 1996; 10(21): 2657-83.
- Nakadai T, Shimada M, Shima D, Handa H, Tamura TA. Specific interaction with transcription factor IIA and localization of the mammalian TATA-binding protein-like protein (TLP/TRF2/TLF). *J Biol Chem* 2004; 279(9): 7447-55.
- Shimada M, Ohbayashi T, Ishida M, Nakadai T, Makino Y, Aoki T, *et al.* Analysis of the chicken TBP-like protein (tlp) gene: evidence for a striking conservation of vertebrate TLPs and for a close relationship between vertebrate tlp and tlp genes. *Nucleic Acids Res* 1999; 27(15): 3146-52.
- Ohbayashi T, Makino Y, Tamura TA. Identification of a mouse TBP-like protein (TLP) distantly related to the drosophila TBP-related factor. *Nucleic Acids Res* 1999; 27(3): 750-5.
- Ohbayashi T, Kishimoto T, Makino Y, Shimada M, Nakadai T, Aoki T, *et al.* Isolation of cDNA, chromosome mapping, and expression of the human TBP-like protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 255(1): 137-42.
- Davidson I. The genetics of TBP and TBP-related factors. *Trends Biochem Sci* 2003; 28(7): 391-8.
- Zhang D, Penttila TL, Morris PL, Roeder RG. Cell- and stage-specific high-level expression of TBP-related factor 2 (TRF2) during mouse spermatogenesis. *Mech Dev* 2001; 106(1/2): 203-5.
- Dantonel JC, Quintin S, Lakatos L, Labouesse M, Tora L. TBP-like factor is required for embryonic RNA polymerase II transcription in *C. elegans*. *Mol Cell* 2000; 6(3): 715-22.
- Bartfai R, Balduf C, Hilton T, Rathmann Y, Hadzhiev Y, Tora L, *et al.* TBP2, a vertebrate-specific member of the TBP family, is required in embryonic development of zebrafish. *Curr Biol* 2004; 14(7): 593-8.
- Wei SM, Yan ZZ, Zhou J. Involvement of reactive oxygen species and TATA box-binding protein-related factor 2 in testicular torsion/detorsion-induced injury. *Urology* 2013; 81(2): 466.e9-14.
- Tanaka Y, Nanba YA, Park KA, Mabuchi T, Suenaga Y, Shiraiishi S, *et al.* Transcriptional repression of the mouse wee1 gene by TBP-related factor 2. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 352(1): 21-8.
- Suzuki H, Ito R, Ikeda K, Tamura TA. TATA-binding protein (TBP)-like protein is required for p53-dependent transcriptional activation of upstream promoter of p21<sup>Waf1/Cip1</sup> gene. *J Biol Chem* 2012; 287(24): 19792-803.
- Knittweis J. An ataxia telangiectasia model: Inefficient cell differentiation and possible reversal by serine protease inhibitors, tumor necrosis factor inhibitors, dexamethasone, and glutathione enhancers. *Med Hypotheses* 1998; 51(1): 53-7.
- Almog N, Rotter V. Involvement of p53 in cell differentiation and development. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1333(1): F1-27.
- Matsumoto T, Turesson I, Book M, Gerwins P, Claesson-Welsh L. p38 MAP kinase negatively regulates endothelial cell survival, proliferation, and differentiation in FGF-2-stimulated angiogenesis. *J Cell Biol* 2002; 156(1): 149-60.
- Massague J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 2000; 103(2): 295-309.
- Ozer J, Lezina LE, Ewing J, Audi S, Lieberman PM. Association of transcription factor IIA with TATA binding protein is required for transcriptional activation of a subset of promoters and cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1998; 18(5): 2559-70.
- Metzger D, Scheer E, Soldatov A, Tora L. Mammalian TAF(II)30 is required for cell cycle progression and specific cellular differentiation programmes. *EMBO J* 1999; 18(17): 4823-34.
- Wassarman DA, Aoyagi N, Pile LA, Schlag EM. TAF250 is required for multiple developmental events in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(3): 1154-9.
- Seroz T, Hwang JR, Moncollin V, Egly JM. TFIIF: A link between transcription, DNA repair and cell cycle regulation. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5(2): 217-21.
- Keyomarsi K, Pardee AB. Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(3): 1112-6.
- Marintchev A, Edmonds KA, Marintcheva B, Hendrickson E, Oberer M, Suzuki C, *et al.* Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation. *Cell* 2009; 136(3): 447-60.
- Hjerpe E, Egyhazi Brage S, Carlson J, Frostvik Stolt M, Schedvins K, Johansson H, *et al.* Metabolic markers GAPDH, PKM2, ATP5B and BEC-index in advanced serous ovarian cancer. *BMC Clin Pathol* 2013; 13(1): 30.