

研究简报

REG γ 基因下调对HaCat细胞的生物学影响

黄婷妹 赵娟*

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200241)

摘要 为了研究蛋白酶体激活因子REG γ 对HaCat细胞增殖、凋亡、周期的影响, 该研究通过瞬时转染建立了siN、siR细胞系, 并利用流式细胞术、MTT、Western blot等实验技术检测细胞的处理效果。研究结果显示, 通过小干扰RNA使REG γ 低表达后, HaCat细胞内抑癌基因蛋白p53、细胞周期依赖性激酶抑制因子p21表达量增加, 进而抑制了细胞周期和增殖、促进了细胞凋亡。

关键词 REG γ ; HaCat; 细胞增殖; 细胞凋亡; 细胞周期

Cellular Biological Effects of REG γ Downregulation on HaCat Cells

Huang Tingmei, Zhao Juan*

(School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241, China)

Abstract To investigate the effects of REG γ downregulation on the cell proliferation, apoptosis and cell cycle of HaCat cells, we got the siN and siR HaCat cell lines by siRNA transfection. FACS, MTT and Western blot were used to detect the influence of regulating REG γ expression. The results indicated that the downregulation of REG γ could elevate the expression of p53, a tumor inhibitor, and p21, a cyclin-dependent kinases inhibitors. Hence, the cell cycle and proliferation of HaCat cells were inhibited, inducing apoptosis subsequently.

Keywords REG γ ; HaCat; cell proliferation; apoptosis; cell cycle

REG γ 又称PSME3、Ki抗原, 主要存在于细胞核中, 属于11S蛋白酶体家族成员之一, 是一种20S蛋白酶体激活因子。它介导泛素-ATP非依赖的蛋白降解途径, 对细胞内蛋白的稳定性起到重要作用。越来越多的实验结果显示, REG γ 在包括乳腺癌、甲状腺癌、结肠癌等多种肿瘤细胞组织中均高表达, 且与多种肿瘤相关因子和信号通路有关^[1-3]。其中, REG γ 与p53之间存在反馈调节作用, 与细胞周期蛋白p21之间存在负反馈调节作用。这些结果认为, REG γ 与

肿瘤的发生、发展密切相关^[4-5]。

HaCat细胞是人类永生表皮细胞, 广泛应用于生物科学研究。本实验拟通过小RNA干扰技术检测REG γ 对HaCat细胞增殖、凋亡和细胞周期的影响。

本实验采用的HaCat细胞来自于本实验室细胞库。

本实验采用的实验材料包括以下几种。细胞培养板购自NEST公司。NC膜购自PALL公司。细胞凋亡检测试剂盒购自天津三箭生物科技股份有限公司。DMEM培养基购自Thermo Fisher公司。FBS血清购自Gemini公司。p21抗体购自BD公司。p53抗体购自CST公司。MTT购自Sigma公司。荧光二抗anti-mouse Alexa488和anti-rabbit Alexa546购自Jackson公司。Lipo2000购自Invitrogen公司。其他生化试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

将HaCat细胞在含有10% FBS的DMEM培养

收稿日期: 2017-10-17 接受日期: 2017-11-16

美捷登青年基金(批准号: MJR20160019)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-54345015, E-mail: zhaajuansh@126.com

Received: October 17, 2017 Accepted: November 16, 2017

This work was supported by Medjaden Bioscience Limited (Grant No. MJR20160019)

*Corresponding author. Tel: +86-21-54345015, E-mail: zhaajuansh@126.com

网络出版时间: 2018-01-30 16:20:47

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180130.1620.006.html>

基中,于5% CO₂、37 °C条件下进行传代培养。以2×10⁴/mL的密度铺6孔板,待细胞长至对数生长期时,用Lipo2000:siRNA以2:1的比例做转染,设置一组阴性对照,用无血清培养基培养8 h后,换10% FBS培养基培养。持续培养72 h后收集细胞进一步实验。

将上述转染处理后的细胞制备成单细胞悬液后计数,分别以每孔2×10³个细胞分2组接种于96孔板中,每组设置3个复孔。每24 h分别取各组细胞检测,连续4 d。每孔加入200 μL 0.5 mg/mL的MTT,37 °C、5% CO₂的条件下培养4 h后,吸除各孔内液体并加入150 μL DMSO反应10 min后移入8联管中,在490 nm波长条件下用酶标仪检测吸光值(*D*)值,分析不同处理组细胞增殖现象。

本实验采用Annexin V/PI法检测细胞凋亡,并按照购买的凋亡试剂盒说明书检测不同处理组细胞凋亡效果。分别取对数生长期的2组细胞,胰酶消化后用冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤2次,离心弃上清,加1 mL 70%乙醇固定,4 °C过夜,离心,冷PBS洗涤2次,加PI染液,流式细胞仪(BD公司)检测各组细胞在细胞周期各时期的分布比例。

用1×loading收获转染后细胞,并100 °C Heater充分裂解样品后定量。用Western blot检测实验组与对照组细胞内各种蛋白的表达量。以10 μL上样量,用10%的SDS-PAGE胶做垂直电泳,电转至NC膜上,5%脱脂牛奶封闭1 h,用PBST洗膜5 min×3。分别用1:1 000稀释比孵育REG γ 抗体、1:500稀释比孵育p21抗体、1:1 000稀释比孵育p53抗体、1:5 000稀释比孵育actin抗体,4 °C过夜。收集一抗后用PBST洗膜5 min×3,用辣根过氧化物酶标记的二抗4 °C避光孵育1 h后,然后用PBST洗膜5 min×3收集二抗,用Odyssey扫膜仪扫描检测结果。

本研究主要从细胞增殖、细胞凋亡和细胞周期方面检测REG γ 对HaCat细胞的生物学影响。实验结果总结如下。

REG γ 对HaCat细胞增殖的影响

取对数生长期的细胞铺96孔板后进行MTT实验,以处理天数(*d*)为横坐标、吸光度(*D*)值为纵坐标。实验结果显示,从处理后48 h开始siR组细胞的增殖速度比siN组细胞的增殖速度明显减缓,且 $P < 0.05$,差异具有统计学意义(图1)。结果说明,REG γ 基因低

表达后细胞增殖减慢。

REG γ 对HaCat细胞凋亡的影响

根据凋亡试剂盒使用说明,利用瞬转成功的HaCat细胞进行流式细胞分析,结果显示,siR组(转染小干扰siREG γ 实验组)细胞凋亡水平增加(图2)。与siN组(阴性转染对照组)比较,siR组细胞早期凋亡率增加0.35%,晚期凋亡率增加1.51%,总凋亡率增加1.86%。结果说明,REG γ 基因低表达后,HaCat细胞的凋亡明显增加。

REG γ 对HaCat细胞周期的影响

利用流式细胞术进行细胞周期分析实验结果(图3)显示,siR组细胞G₁期生长比例为36.7%,siN组细胞G₁期生长比例为33.37%,较siN组增加3.33%。结果表明,经过siREG γ 处理的siR组细胞周期在G₁到S期受到抑制,从而说明,REG γ 基因低表达可以抑制HaCat细胞周期。

Western blot检测转染后细胞内各相关蛋白的表达量

取对数生长期的细胞进行siRNA转染实验,以干扰细胞内REG γ 基因的表达水平。在转染实验完成后,继续培养细胞72 h,然后收取样品进行Western blot检测。结果如图4显示,与siN细胞相比,siR细胞中REG γ 蛋白的表达水平明显降低,且随着REG γ 低表达,细胞周期依赖性激酶抑制因子p21和抑癌基因蛋白p53的表达均有不同程度的增加。这揭示,在HaCat细胞中,REG γ 可能通过调控p21和p53两种蛋白的表达进而调控细胞增殖、凋亡和细胞周期等生物学行为。

据研究结果显示,REG γ 属于11S蛋白酶体激活因子家族的成员,在细胞核中定位,并且参与细胞周期以及细胞凋亡的调控。REG γ 不仅参与多种肿瘤的发生、发展,而且参与几种重要蛋白(如细胞周期依赖的蛋白激酶抑制因子p21、SRC3、p19、HCV核心蛋白以及Smurf1)的降解^[1,4]。

细胞周期依赖性激酶抑制因子p21是一种非常重要的调控因子。研究表明,它既可以通过依赖于泛素的经典途径,又可以通过不依赖于泛素的途径,甚至还可以直接被20S蛋白酶体所降解^[4-11],细胞周期依赖性激酶抑制因子p21也是REG γ -20S蛋白酶体

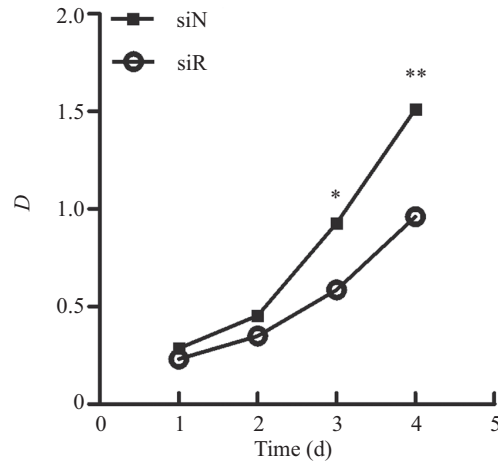


图1 *REGγ*低表达抑制HaCat细胞增殖
Fig.1 *REGγ* downregulation inhibits HaCat cell proliferation

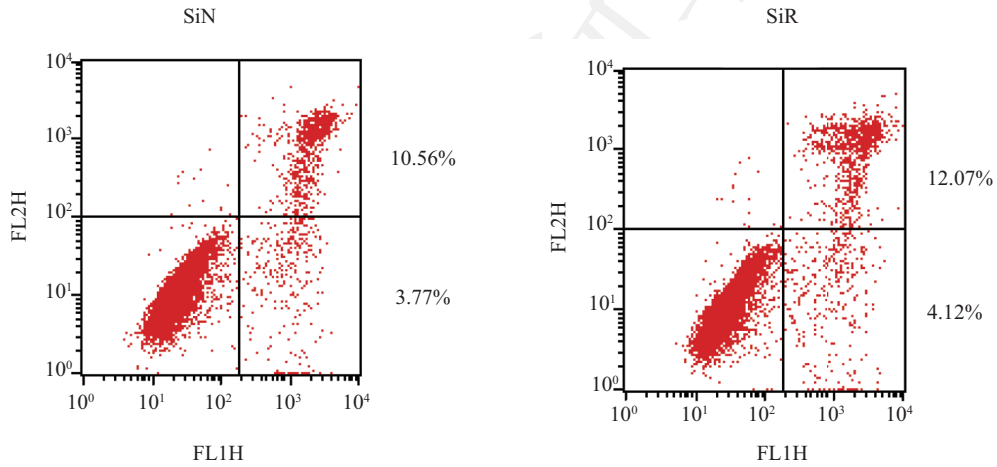


图2 *REGγ*低表达促进HaCat细胞凋亡
Fig.2 *REGγ* downregulation promote HaCat apoptosis *in vitro*

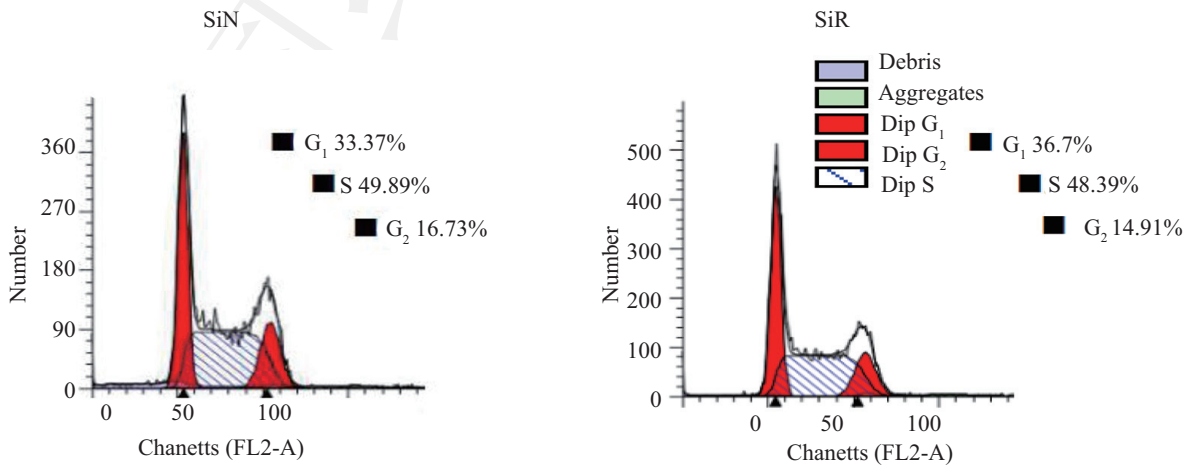


图3 *REGγ*低表达抑制HaCat细胞周期
Fig.3 *REGγ* downregulation inhibits HaCat cell cycle

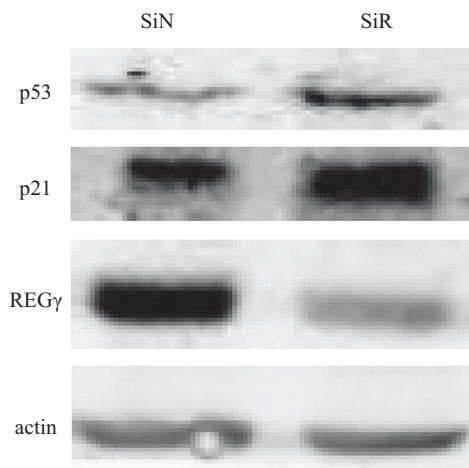


图4 Western blot检测转染后细胞内REG γ 及各相关蛋白表达结果

Fig.4 The expression of REG γ and corresponding protein in transfected HaCat cells detected by Western blot

的底物之一^[4,7]。另外, p21是一个细胞凋亡调节因子, 它在细胞周期的进程中以及细胞凋亡中扮演重要角色^[12], 同时, p21缺失后与癌症的发生、发展有着直接联系。

p53是一种肿瘤抑制因子, 被广泛研究, 它能够加速细胞凋亡, 并且抑制肿瘤的发生^[13]。有研究发现, REG γ 能够作为辅助因子特异性结合到p53和MDM2上以增强p53与MDM2之间的作用, 最终促进依赖泛素化的蛋白酶体降解途径降解p53^[14]。

近年来, 有关REG γ 在肿瘤中的研究也倍受人们的关注。据报道, REG γ 已经被发现在直肠癌血清^[5]、甲状腺癌^[15]和乳腺癌^[16]中表达水平升高, 并被认为是—种潜在的癌症标签^[16]。

本实验通过干扰REG γ 在HaCat细胞内的表达水平检测REG γ 对细胞生物学行为的影响。本文证实了REG γ 基因沉默后, HaCat细胞内p53、p21水平明显升高从而在细胞增殖、细胞凋亡和细胞周期方面产生影响。因此可以推测, 在HaCat细胞中, REG γ 通过调控p53、p21的表达进而影响细胞的生物学行为。然而, REG γ 是通过调控p53的表达后进而影响了p21的表达, 还是REG γ 同时调控p53和p21两个蛋白的表达, 这点还需要进一步的验证。

参考文献 (References)

- 1 Li X, Lonard DM, Jung SY, Malovannaya A, Feng Q, Qin J, *et al.* The SRC-3/AIB1 coactivator is degraded in a ubiquitin- and ATP-independent manner by the REGgamma proteasome. *Cell* 2006; 24(2): 381-92.
- 2 Mao I, Liu J, Li X, Luo H. REGgamma, a proteasome activator and beyond. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65(24): 3971-80.
- 3 Liu J, Yu G, Zhao Y, Zhao D, Wang Y, Wang L, *et al.* REGgamma modulates p53 activity by regulating its cellular localization. *J Cell Sci* 2010; 123(Pt 23): 4076-84.
- 4 Li X, Amazit L, Long W, Lonard DM, Monaco JJ, O'Malley BW. Ubiquitin- and ATP independent proteolytic turnover of p21 by the REGgamma proteasome pathway. *Mol Cell* 2007; 26(6): 831-42.
- 5 Okamura T, Taniguchi S, Ohkura T, Yoshida A, Shimizu H, Sakai M, *et al.* Abnormally high expression of proteasome activator-gamma in thyroid neoplasm. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(3): 1374-83.
- 6 Jariel-Encontre I, Bossis G, Piechaczyk M. Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1786(2): 153-77.
- 7 Chen X, Barton LF, Chi Y, Clurman BE, Roberts JM. Ubiquitin-independent degradation of cell-cycle inhibitors by the REGgamma proteasome. *Mol Cell* 2007; 26(6): 843-52.
- 8 Touitou R, Richardson J, Bose S, Nakanishi M, Rivett J, Allday MJ. A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 alpha-subunit of the 20S proteasome. *EMBO J* 2001; 20(10): 2367-75.
- 9 Kriwacki RW, Hengst L, Tennant L, Reed SI, Wright PE. Structural studies of p21Waf1/Cip1/Sdi1 in the free and Cdk2-bound state: conformational disorder mediates binding diversity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(21): 11504-9.
- 10 Liu CW, Corboy MJ, DeMartino GN, Thomas PJ. Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science* 2003; 299(5605): 408-11.
- 11 Liu CW, Li X, Thompson D, Wooding K, Chang TL, Tang Z, *et al.* ATP binding and ATP hydrolysis play distinct roles in the function of 26S proteasome. *Mol Cell* 2006; 24(1): 39-50.
- 12 Roninson IB. Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett* 2002; 179(1): 1-14.
- 13 Sharpless NE, DePinho RA. p53: good cop/bad cop. *Cell* 2002; 110(1): 9-12.
- 14 Zhang Z, Zhang R. Proteasome activator PA28 gamma regulates p53 by enhancing its MDM2-mediated degradation. *EMBO J* 2008; 27(6): 852-64.
- 15 Wang X, Tu S, Tan J, Tian T, Ran L, Rodier JF, Ren G. REG gamma: a potential marker in breast cancer and effect on cell cycle and proliferation of breast cancer cell. *Med Oncol* 2011; 28(1): 31-41.
- 16 Yan SY, Tsai MJ. SRC-3/AIB1: transcriptional coactivator in oncogenesis. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27(4): 387-94.