

癌基因 *Bmi-1* 引起中心体扩增的可能机制

翁桂香, 徐理华, 冯 艳, 俞春萍, 宋立兵, 李 隽, 曾木圣, 张 玲
(中山大学肿瘤防治中心实验研究部//华南肿瘤学国家重点实验室, 广东 广州 510060)

摘 要:【目的】探讨 *Bmi-1* 引起中心体扩增的可能机制。【方法】体外建立 *Bmi-1* 稳定高表达和 *Bmi-1*-RNAi 稳定起作用的细胞株, 采用免疫荧光染色法计数中心体(Microtub)异常复制的比率及定位细胞周期素蛋白 D1 (cyclinD1) 和 P27 的表达, 同时进行 Western blot 检测 cyclinD1 和 p27 在核中的表达量。【结果】Microtub 染色计数发现与对照细胞相比, 中心体异常复制的比率在 6-10B/*Bmi-1* 细胞中升高, 而在 CNE2/*Bmi-1*-RNAi 细胞中下降; 免疫荧光染色和 Western blot 检测均发现 cyclinD1 蛋白在 6-10B/*Bmi-1* 细胞核内表达升高, 而在 CNE2/*Bmi-1*-RNAi 细胞核内表达降低, P27 蛋白则在两株细胞株中均呈现相反的变化。【结论】*Bmi-1* 可能通过调控 cyclinD1-P27 途径引起中心体扩增。

关键词: 癌基因; *Bmi-1*; 中心体扩增; cyclinD1-P27; 基因表达

中图分类号: R730.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2008)02-0131-04

Possible Mechanism of Centrosomal Amplification Induced by Oncogene *Bmi-1*

WENG Gui-xiang, XU Li-hua, FENG Yan, YU Chun-ping, SONG Li-bing, LI Jun,
ZENG Mu-sheng, ZHANG Ling

(Cancer Center of SUN Yat-sen University// State Key Laboratory of Oncology in Southern China, Guangzhou 510060, China)

Abstract:【Objective】To investigate the possible mechanism of centrosomal amplification induced by oncogene *Bmi-1* (B-cell-specific moloney murine leukemia virus integration site 1). 【Methods】Immunofluorescence staining were used to calculate the ratio of the abnormal centrosomal duplication and investigate the location of P27 and cyclin D1 protein; Western blot was performed to detect the expression of p27 and cyclin D1 in nucleus. 【Results】By Microtub counting, compared with the control cells, 6-10B/ pMSCV-*Bmi-1* showed a higher ratio of abnormal centrosomal duplication, while the ratio of centrosomal amplification was lower in CNE2/*Bmi-1*-RNAi cells. Moreover, higher expression of cyclin D1 was detected in nucleus of 6-10B/*Bmi-1* cells, while CNE2/*Bmi-1*-RNAi cells showed lower expression of cyclin D1 in nucleus; meanwhile, P27 was upregulated by *Bmi-1* overexpression and downregulated by *Bmi-1* RNAi, which was according with the results from immunofluorescence staining. 【Conclusions】*Bmi-1* may induce centrosomal amplification by regulating cyclin D1-P27 pathway.

Key words: oncogene; *Bmi-1*; centrosomal amplification; cyclin D1-P27; gene expression

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(2):131-134]

中心体在细胞的有丝分裂中对细胞两极纺锤体微管的形成起重要作用, 在哺乳动物细胞中, 中心体由一对中心粒及包绕在其周围的大量其它功能蛋白质组成, 每一次细胞分裂都伴随着一次中心体的复制和分裂。在细胞分裂过程中, 中心粒的正常复制对于染色体的正确分离起着关键作用,

其活动与细胞分裂、激活及复制密切相关。正常情况下, 中心体的复制周期与细胞的分裂周期紧密联系, 但是在体外培养的肿瘤细胞及不同分期的肿瘤组织中则出现中心体的扩增, 表现为细胞内产生两个以上的中心体^[1]。癌基因 *Bmi-1* 在多种肿瘤中高表达, 与肿瘤的发病有关^[2,3]。本实验室的前

收稿日期: 2007-10-29

基金项目: 国家自然科学基金(30570701; 30470666); 广东省自然科学基金(5001749; 04009427); CMB 基金(88-485)

作者简介: 翁桂香 (1981-), 女, 山东临沂人, 硕士研究生, E-mail: xxwtop1981@hotmail.com; 张 玲, 副教授, 通讯作者, E-mail: zhang166@mail.sysu.edu.cn

期研究结果表明 *Bmi-1* 在鼻咽癌中亦呈现高表达,且可引起中心体扩增^[4],并且证实在外源性高表达 *Bmi-1* 的细胞中,其 P53、P21 蛋白表达水平无明显改变,但是我们的芯片结果显示 cyclinD1 表达水平大大提高,因此,我们推测 *Bmi-1* 引起中心体扩增可能是通过 Cylin D1-P27 通路实现的。本文在本实验室前期研究的基础上,初步探讨了 *Bmi-1* 引起中心体扩增的可能机制。

1 材料与方 法

1.1 试 剂

主要有 Cyclin D1 抗体 (Santa Cruz, sc-753), P27 抗体 (Santa Cruz, sc-1641), BMI-1 抗体 (upstate, 05-637), α -tubulin 抗体 (Sigma, T6074), anti-fade (Invitrogen), puromycin, 凯基核蛋白抽提试剂盒 (南京凯基生物科技发展中心), BCA 蛋白定量试剂盒。

1.2 细胞系和培养

人鼻咽癌上皮细胞株 6-10B、CNE2 采用 RPMI1640 (Gibco) 加 100 mL/L 的胎牛血清 (Hyclone) 培养。

1.3 细胞株的建立

将 *Bmi-1* 全长克隆至 pMSCV, *Bmi-1*-RNAi 序列克隆至 PRS, 分别与包装质粒共转染 293-FT 细胞, 得到逆转录病毒后分别用 pMSCV 和 pMSCV-*Bmi-1* 感染 6-10B, 用 PRS 和 PRS-*Bmi-1*-RNAi 感染 CNE2, puromycin 筛选 3 d, 免疫印迹验证 BMI-1 的表达。

1.4 免疫印迹

1 \times 细胞裂解液提取细胞总蛋白, 根据凯基试剂盒提供的步骤提取细胞核蛋白, BCA 试剂盒进行蛋白定量, SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转印到 PVDF 膜上, 50 g/L 脱脂奶封闭 30 min, 一抗室温孵育 1 h, 1 \times TBST 漂洗 15 min \times 3 次, 带有 HRP (辣根过氧化物酶) 标记的二抗室温孵育 40 min, 1 \times TBST 漂洗 15 min \times 3 次, 在暗房内加入发光液, 通过氧化还原原理使之在胶片上感光, 机器冲洗胶片。

1.5 免疫荧光染色

以 α -tubulin 做为中心体的标记。按 2 \times 10⁴ 个/孔的密度将细胞种在铺有 cover slip 的 24 孔板中, 48 h 后用预冷的甲醇置于 -20 $^{\circ}$ C 固定 10 min, 1

\times PBST 快速洗 1 次, 100 g/L 的 BSA 室温封闭 10 min, 一抗 (Sigma, 1:1 000) 室温孵育 1 h, 1 \times PBST 洗 10 min \times 3 次, 避光加带有 FITC 标记的驴抗鼠二抗, 室温孵育 40 min, 1 \times PBST 洗 10 min \times 3 次, DAPI 染核 5 min, 快速漂洗 1 次, 风干后 Anti-fade 封片, 荧光显微镜下观察。

2 结 果

2.1 稳定细胞株的建立

收集稳定传至第 7 代的细胞 6-10B/pMSCV 和 6-10B/pMSCV-*Bmi-1*, CNE2/PRS 和 CNE2/PRS-*Bmi-1*-RNAi 的总蛋白, 免疫印记检测 BMI-1 的表达, 结果显示相对于对照细胞, BMI-1 在 6-10B/pMSCV-*Bmi-1* 细胞中的表达显著性增高, 而在 CNE2/PRS-*Bmi-1*-RNAi 细胞中仅能检测到 BMI-1 的微弱表达, 提示 BMI-1 稳定高表达和 *Bmi-1*-RNAi 稳定起作用的鼻咽细胞株成功建立 (图 1)。

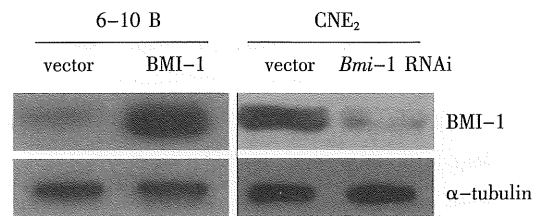


图 1 稳定细胞株中 *Bmi-1* 的表达

Fig.1 The expression of *Bmi-1* in 6-10B and CNE2

The expression of BMI-1 in 6-10B pMSCV, pMSCV-*Bmi-1* and CNE2 PRS, PRS-*Bmi-1* RNAi; α -tubulin is used as loading control

2.2 *Bmi-1* 引起中心体扩增

荧光显微镜下观察, 随机挑选 10 组不同的视野计数, 计数每 300 个处于有丝分裂期的细胞出现异常中心体的细胞总数目。结果显示, 6-10B/pMSCV 细胞中仅有 11 个细胞出现两个以上中心体, 占 3.67%, 而 6-10B/pMSCV-*Bmi-1* 细胞中出现两个以上中心体的细胞增至 36, 比例为 12%。相反, CNE2/PRS 细胞中有 44 个细胞出现两个以上中心体, 占 15%, 而在经 *Bmi-1*-RNAi 沉默的 CNE2 细胞中出现两个以上中心体的细胞数则降至 18 个, 仅占 6%, 两者相差较大。用 SPSS 13.0 软件进行两组独立样本 *t* 检验统计, 第 1 组 6-10B pMSCV 和 6-10B pMSCV-*Bmi-1* 之间 $t=-3.883$, $P=0.001$, 同样, 第 2 组 CNE2 PRS 和 CNE2 PRS-*Bmi-1*-RNAi 之间 $t=3.9$, $P=0.001$, 提示两组中心体异常

复制的个数差异有统计学意义。如图2示,结果说明 *Bmi-1* 可引起中心体的扩增,且对于中心体的扩增是必需的。

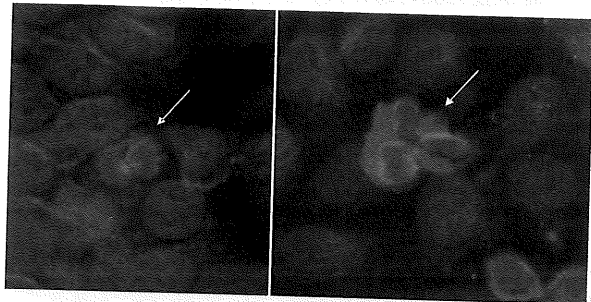


图2 *Bmi-1* 引起的中心体异常复制

Fig.2 The abnormal centrosomal duplication induced by *Bmi-1*

Arrow points to the normal centrosom in the left figure while the abnormal in the right

2.3 *Bmi-1* 可能通过调控 Cyclin D1-P27 途径介导中心体扩增

抽提细胞核蛋白,Western blot 检测 CyclinD1 和 P27 在细胞核中的表达,结果显示与对照细胞相比,cyclinD1 蛋白在 6-10B/ pMSCV-*Bmi-1* 细胞核中表达升高,而在 CNE2/*Bmi-1*- RNAi 细胞核中表达则降低,P27 则呈现相反的变化趋势,在总蛋白中二者呈现相同的改变,但是在浆蛋白中均无显著改变(图3)。免疫荧光染色法对 CyclinD1 进行定位及定量检测发现在 6-10B/ pMSCV-*Bmi-1* 细胞中 CyclinD1 在细胞核内的表达增高,P27 蛋白则与 cyclinD1 呈现相反的变化(图4)。所得结果与 Western 检测结果一致,提示 *Bmi-1* 引起中心体扩增可能由调控 CyclinD1-P27 途径所介导。

3 讨论

癌基因 *Bmi-1* 是多梳基因(polycomb of genes, PcG) 家族的成员之一,PcG 家族产物是由一系列保守、稳定抑制靶基因的蛋白质组成的反式作用因子,PcG 家族产物的调控位点是多梳应答元件形成的复合物以介导相邻基因沉默。*BMI-1* 是一种广泛表达的核蛋白,与各种实体瘤的发生有关^[6-10]。此外,还发现 *BMI-1* 与细胞周期的调控密切相关,*BMI-1* 蛋白呈微粒状分布于染色体上,在细胞分裂间期呈紧密排列,而在整个有丝分裂期则变得非常松散。在整个细胞周期中,*BMI-1* 的磷酸化状

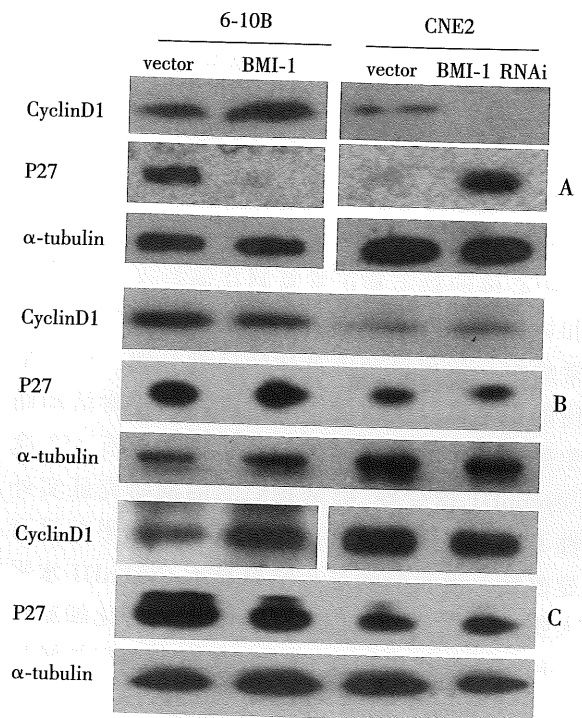


图3 CyclinD1 和 P27 蛋白在总蛋白、浆蛋白以及核蛋白中的表达变化

Fig.3 The expression of cyclinD1 and P27 in total, plasm, nuclei protein

A:indicates their expression in total protein; B:indicates their expression in plasm protein; C:indicates their expression in nuclei protein. α -tubulin is used as loading control

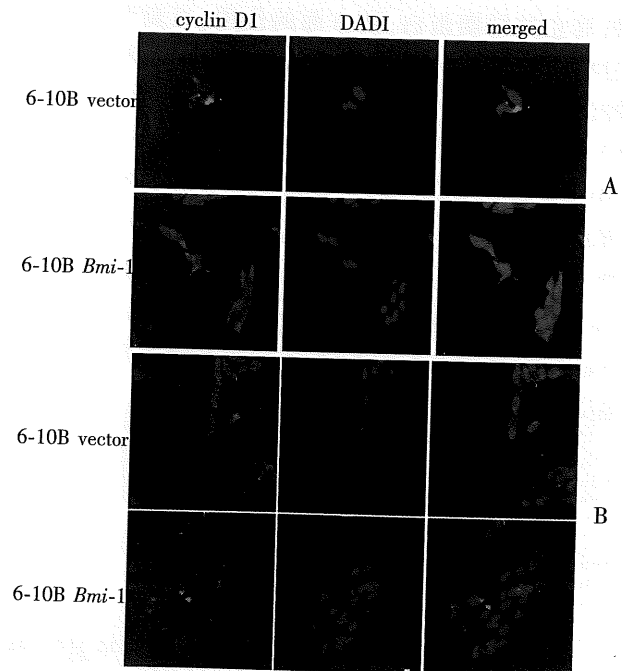


图4 6-10B 细胞中免疫荧光染色

Fig.4 Immunofluorescence staining in 6-10B cell line

A: indicates cyclinD1 in nuclear is upregulated in 6-10B *Bmi-1* compared to 6-10B vector; B: indicates P27 is downregulated in 6-10B *Bmi-1* compared to 6-10B vector

态与其和染色体结合的状态呈一种相反的关系:在 G1/S 期,非磷酸化的 BMI-1 特异地结合在染色体的核蛋白片段中,而在 G2/M 期,磷酸化的 BMI-1 却没有与染色体结合^[1]。同时 BMI-1 可引起中心体扩增的现象已经证实,但有关其作用机制的探讨尚鲜见报道。

中心体的稳定和正常复制在保持遗传的稳定性和协调联系细胞其他活性中起到关键的作用,异常的中心体可导致染色体的异常分裂,最终是遗传的稳定性发生改变,干扰细胞的正常活动而发生肿瘤。中心体复制的调控机制主要有 p53 途径、cyclinD1 途径等,但是我们的前期研究证实外源性 BMI-1 高表达的细胞株,其 P53 水平并没有明显改变,而我们的芯片结果显示 CyclinD1 水平大大提高。因此,我们选择鼻咽癌高分化细胞株 6-10B 及低分化细胞株 CNE2,在前者我们外源性的高表达 BMI-1,后者,我们采取 *Bmi-1* RNAi 的措施,来检测一下 *Bmi-1* 对中心体复制的调节作用,并探讨其可能机制。P27 是一种细胞周期抑制因子,可普遍抑制细胞周期蛋白的表达,但是细胞在得到一些生长因子刺激的时候,CDK4-cyclinD1 在与 P27 蛋白结合形成具有活性的三聚体,同时 P27 在此三聚体中是没有活性的,所以就不能抑制其它的周期蛋白,两方面的作用,可刺激细胞越过检查点,中心体复制增加。细胞失去了检查点的控制,就会出现异常复制等。在我们的研究中,我们发现 *Bmi-1* 可以上调 cyclinD1 在核内的表达,同时下调 P27 在核内的表达,二者在总蛋白中呈现相同的改变,但是在胞浆内都没有明显改变,支持 *Bmi-1* 引起的中心体异常复制是通过调节 CyclinD1-P27 途径实现的,关于 *Bmi-1* 上调 cyclinD1 的详细机制以及是否跟其他通路之间存在相互作用,尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 康洁. 细胞中心体的复制与调控 [J]. 长春师范学院学报, 2004, 23(4): 57-59.
- [2] 金顺钱. 中心体异常和肿瘤 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30(4): 527-532.
- [3] 蔡杨. 中心体异常、染色体不稳定和癌发生的相关性 [J]. 临床口腔医学杂志, 2003, 19(9): 571-573.
- [4] 宋立兵, 张玲, 汪慧民, 等. 癌基因 *Bmi-1* 对中心体复制的调节作用 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005, 26(4): 377-379.
- [5] Song LB, Zeng MS, Liao WT, et al. *Bmi-1* is a novel molecular marker of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(12): 6225-6332.
- [6] 黄开红, 刘建化, 李学先, 等. *Bmi-1* 基因过度表达与胃癌分化、转移及预后的关系 [J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(7): 973-975.
- [7] Guo WJ, Zeng MS, Yadav A, et al. Mel-18 acts as a tumor suppressor by repressing *Bmi-1* expression and down-regulating Akt activity in breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(11): 5083-5089.
- [8] Cui H, Hu B, Li T, et al. *Bmi-1* is essential for the tumorigenicity of neuroblastoma cells [J]. *Am J Pathol*, 2007, 170(4): 1370-1378.
- [9] Dutton A, Woodman CB, Chukwuma MB, et al. *Bmi-1* is induced by the Epstein-Barr virus oncogene LMP1 and regulates the expression of viral target genes in Hodgkin lymphoma cells [J]. *Blood*, 2007, 109(6): 2597-2603.
- [10] Sawa M, Yamamoto K, Yokozawa T, et al. BMI-1 is highly expressed in M0-subtype acute myeloid leukemia [J]. *Int J Hematol*, 2005, 82(1): 42-47.
- [11] Voncken JW, Schweizer D, Aagaard L, et al. Chromatin-association of the polycomb group protein BMI1 is cell cycle-regulated and correlates with its phosphorylation status [J]. *J Cell Sci*, 1999, 112 (Pt 24): 4627-4639.

(编辑 张恩健)

中山大学学报(医学科学版)影响排名

据科学出版社最新出版的《中国学术期刊综合引证报告》,《中山大学学报(医学科学版)》2007年影响因子上升为0.721,在同类刊物中排名第2。另外,本刊于2007年全文被美国《化学文摘》(CA)收录。在此,感谢各位专家、作者和读者的大力支持!希望今后能继续大力支持本刊,多宣传、推荐优秀稿件。