

## F10 基因对细胞中 PCNA 和 Cyclin D1 表达的影响

曹晓敏<sup>1,2</sup>, 庞战军<sup>3</sup>, 全松<sup>3</sup>, 邢福祺<sup>3\*</sup>

(1. 中山大学附属第二医院妇产科, 广东 广州 510120; 2. 中山市人民医院博士后工作站, 广东 中山 528403;  
3. 南方医科大学南方医院妇产科, 广东 广州 510515)

**摘要:**【目的】确定 F10 基因表达对细胞生长的影响,明确 F10 基因的功能。【方法】构建 F10 基因的真核表达载体,转染重组 pRc-CMV2-F10 质粒于肺癌细胞系 A549,筛选并获得稳定表达 F10 基因的细胞克隆 A549-F10。通过 MTT 实验和流式细胞检测 F10 对细胞生长的影响;通过免疫组化检测细胞中增殖核抗原(PCNA)和细胞周期素 D1(cyclin D1)的表达。【结果】转基因的 G418 抗性克隆能够检测到 F10 表达。MTT 和流式结果显示 F10 有促进细胞增殖的作用。阳性克隆的细胞株中 PCNA 和 cyclin D1 相对较高水平的表达。【结论】F10 基因通过上调 PCNA 和 cyclin D1 的表达,促进细胞的生长增殖。

**关键词:** F10 基因;增殖细胞核抗原;细胞周期素 D1

**中图分类号:**R737.33 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-3554(2009)01-0006-04

### Effect of F10 Gene on Expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen and Cyclin D1

CAO Xiao-min<sup>1,2</sup>, PANG Zhan-jun<sup>3</sup>, QUAN Song<sup>3</sup>, XING Fu-qi<sup>3\*</sup>

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China;  
2. Post-doctoral Workstation, Zhongshan People's Hospital, Zhongshan 528403, China;  
3. Department of Obstetrics and Gynecology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

**Abstract:** 【Objective】 To study the effect of F10 on the activities of cell growth and to identify the function of F10. 【Methods】 Eukaryotic expression vectors of F10 gene were constructed and pRc-CMV2-F10 plasmid was transfected and recombined into the lung cancer cell line A549 by Lipofectamine 2000. The cell clone A549-F10 which stably expressed F10 gene was obtained by detecting the mRNA expressing of F10 in G418-resistant clones. Effects of F10 gene on the activities of cell growth were detected by MTT and flow cytometry. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and cyclin D1 were detected by immunohistochemistry. 【Results】 Expression of F10 gene were detected by G418-resistant transgenic clones. The results of MTT and flow cytometry showed that F10 gene could promote cell proliferation. The expression of cyclin D1 and PCNA in A549/F10 transplants were relatively high. 【Conclusion】 F10 gene promotes the cell proliferation by up-regulating the expression of PCNA and cyclin D1.

**Key words:** F10 gene; proliferating cell nuclear antigen; cyclin D1

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(1): 6-9; 14]

F10 基因是新克隆的在葡萄胎中表达上调的基因<sup>[1]</sup>,差异显示 PCR 粗筛选显示 F10 基因可能参与细胞的增殖和凋亡过程。研究表明 F10 基因在葡萄胎组织、侵蚀性葡萄胎、绒癌中均阳性表达且依次增强。初步预测 F10 可能与葡萄胎的恶性变及肿瘤的侵袭行为有关<sup>[2]</sup>;原位杂交结果表明 F10 在卵巢腺癌、子宫内膜癌、乳腺癌、肝癌、胃癌

等腺癌中均阳性表达。提示 F10 与上述肿瘤的发生有关<sup>[3]</sup>。另外 F10 通过上调 AP1、下调 NF-KB 的表达参与转录因子活性调节过程。为明确 F10 基因的功能,通过建立稳定表达 F10 基因的肺癌细胞系 A549 的细胞克隆,通过 MTT、流式细胞术、PCNA、cyclin D1 的表达来检测其在细胞增殖和细胞周期进展中的作用,进一步明确 F10

收稿日期:2008-05-27

基金项目:国家自然科学基金(30470658;30672234)

作者简介:曹晓敏,博士生,研究方向:生殖内分泌,E-mail:gyxcm2003@yahoo.com.cn,\* 通讯作者:邢福祺,博士生导师

的功能。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

A549 细胞株由广州医学院医学实验中心提供, TRIzol, ThermoScript RT-PCR System 及细胞培养试剂购于美国 Invitrogen 公司, 荧光定量 PCR kit 购自 Stratagene 公司, Electroporation buffer 购自 Eppendorf 公司, 质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司, 限制性内切酶购自 NEB 公司, G418 购自 Calbiochem 公司。96 孔板及流式细胞仪(Aria)为 BD 公司的产品, ELx 酶标仪为美国 BIO-TEK 公司的产品, 单克隆小鼠抗人细胞周期蛋白(cyclin D1)、单克隆大鼠抗人细胞核心抗原(PCNA)为 DAKO 公司的产品。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞转染及稳定克隆的建立和鉴定 前期实验证实 F10 基因在 A549 细胞中低表达, F10 基因转染 A549 细胞前后其基因表达水平有差异, 故对 F10 的转基因研究时肺癌细胞 A549 是一个很好的细胞模型, 可以真实的反应 F10 基因的功能。转染参考 Electroporation protocol, 当细胞在指数生长期 90% 的融合度时, 将重组质粒 pRc-CMV2/F10 转染到肺癌细胞株 A549 中, 同时转染 pRc-CMV2 作为阴性对照, G418(浓度 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 筛选 3 周后出现抗性克隆, 选一定数目单一克隆扩增培养, 提取总 RNA, 设计扩增 F10 的引物(同 1.2.3), 根据荧光定量 SYBR GREEN-PCR 试剂盒操作说明进行, 筛选出能够稳定、高效表达 F10 基因的单细胞克隆。

1.2.2 噻唑蓝(MTT)比色法分析 A549 细胞、稳定表达 F10 基因及稳定表达空载体的 A549 细胞系共 2 组细胞接种于 96 孔板, 每孔细胞数  $5 \times 10^3$  个。细胞共培养在 100  $\mu\text{L}$  含 150 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 体积分数 5%  $\text{CO}_2$  的条件下培养。24 h 后开始检测, 检测前每孔加 10  $\mu\text{L}$ , 5 mg/mL 的 MTT 试剂, 继续培养 4 h, 然后弃除培养基, 再加入 100  $\mu\text{L}$  DMSO 37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 10 min 后, 酶标仪测定 570 nm 波长的吸光度值, 设 3 个平等孔, 每 24 h 检测 1 次, 连续测定 6 d, 绘制各组细胞的生长曲线。

1.2.3 流式细胞仪分析细胞周期 pRc-CMV2/

F10 质粒及 pRc-CMV2 瞬时转染接种于 6 孔板中的 A549 细胞, 每孔细胞  $2.5 \times 10^6$  个, 设 3 个平等孔。细胞共培养在 2 mL 含 150 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 体积分数 5%  $\text{CO}_2$  的条件下培养。24 h、48 h、72 h 开始收集细胞悬液 1 200 r/min ( $r = 16 \text{ cm}$ ) 离心 5 min, 弃上清, PBS 洗涤细胞 3 次, 每次 1 000 r/min ( $r = 16 \text{ cm}$ ) 5 min, -20  $^{\circ}\text{C}$  700 mL/L 乙醇 2 mL 1 200 r/min ( $r = 16 \text{ cm}$ ) 离心 5 min, 弃上清。PBS 洗 2 次, 加入 50  $\mu\text{L}$  RNase(终浓度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PI 染色, 混均, 4  $^{\circ}\text{C}$  避光放置 30 min, 计数 10 000 个细胞, 用 Modifit LT 软件(美国 BD 公司)分析细胞 DNA 含量和凋亡率。

1.2.4 PCNA 和 cyclin D1 免疫组化检测 按试剂盒说明书进行, pRc-CMV2/F10 基因及 pRc-CMV2 瞬时转染接种于 6 孔板中的 A549 细胞, 每孔细胞  $2.5 \times 10^6$  个, 设 3 个平等孔。转染 24 h 后, 6 孔板中的细胞 PBS 洗 2 次, 加入 40 g/L 的多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗 2 次, 每次 3 min, 3 g/L Triton 固定 10 min 30 g/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  清洗 2 次, PBS 冲洗, 加一抗(即用型 PCNA 抗体直接滴加, cyclinD1 抗体按 1:30 稀释), 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。PBS 冲洗 3 次, 加入二抗孵育 2 h, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min, DAB 显色。

1.2.5 统计学方法 荧光定量 PCR 用 Ct 比较法来测算转录水平差异。  $X_n = X_0 \times (1 + E_x)^n$ ,  $E_x = ER$ ,  $\text{Fold} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ,  $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_1 - \text{Ct}_2) - (\text{Ct}_3 - \text{Ct}_4)$ , 其中:  $\text{Ct}_1$ : 处理样品待测基因的临界循环数,  $\text{Ct}_2$ : 处理样品持家基因的临界循环数。多组间均数比较采用单因素方差分析 Q 检验, 线性资料采用析因分析的统计方法。

## 2 结果

### 2.1 质粒 pRC-CMV2-F10 和 pRC-CMV2 鉴定结果

酶切和测序结果表明重组载体 pRC-CMV2-F10 为正向连接(图 1)。

### 2.2 抗性克隆的鉴定

G418 持续筛选, 未转染的细胞 1 周内全部死亡, pRc-CMV2/F10 和 pRc-CMV2 转染 A549 细胞系, 2 周时转染细胞大部分死亡。持续加压 3 周可见散在 G418 抗性克隆出现。荧光定量 PCR 鉴定抗性克隆, 结果根据荧光定量公式进行计算: 同

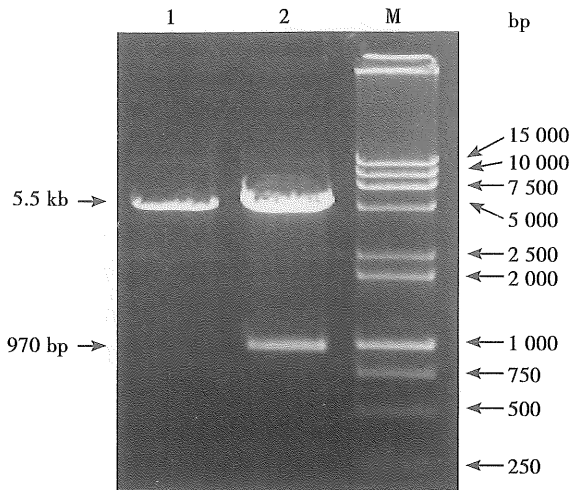


图 1 质粒 pRc/CMV2-F10 和 pRc/CMV2 鉴定  
Fig.1 Identification of the plasmid pRc/CMV2-F10 and pRc/CMV2

1: pRc/CMV2 plasmid digested with HindIII and XbaI; 2: pRc/CMV2-F10 plasmid digested with HindIII and XbaI; M: Marker

一个克隆  $\Delta Ct = ct - ctactin$ , 不同细胞克隆之间  $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct$  研究组 - 对照组, 研究组 mRNA 相对含量 =  $2^{-\Delta \Delta Ct}$  X 对 pRc-CMV2 转染 A549 细胞系组 mRNA 的含量。筛选出二株高表达的细胞克隆 (表 1)。

2.3 F10 对 A549 细胞生长的影响

根据酶标仪连续 6 d 测定的 570 nm 波长吸光值绘制出肺癌细胞 A549 的生长曲线 (图 2), 结果显示, 第 2 天开始, F10 基因表现为对 A549 细胞生长促进作用, 并随培养时间延长及培养细胞数量的增加, 促进作用愈明显, 第 4 天促进率

表 1 阳性克隆荧光定量 PCR 的结果

Table 1 Results of F10 gene expression detected by positive fluorescent quantitation PCR

Groups	Sample	$-\Delta \Delta Ct$
Control	3	0
Positive cell clone 1	3	$39.6 \pm 16.7^{1)}$
Positive cell clone 2	3	$19.5 \pm 3.7^{1)}$

Compared with the two groups 1)  $P < 0.05$

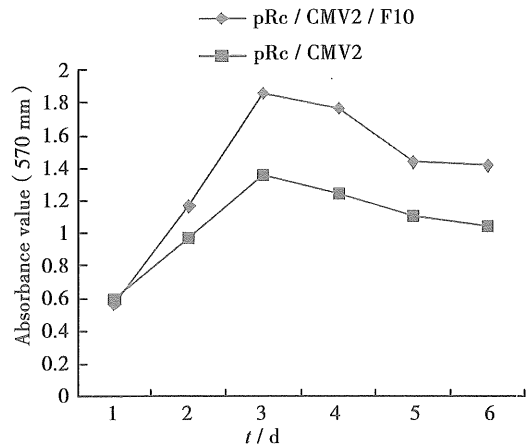


图 2 F10 促进细胞生长曲线

Fig.2 Curve of cell growth promoted by F10 gene

达到 43.5%。

2.4 流式细胞仪分析细胞周期的结果

pRc/CMV2/F10 基因转染细胞 48 小时较对照组细胞中 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例升高 2.2 倍, S 期升高 1.2 倍。二组相比差异有显著性意义 ( $P = 0.000$ ; 图 3、表 2)。

表 2 二组细胞的各组细胞周期时相

Table 2 Phases of cell life cycle of the two groups

( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Time (h)	A549/F10			A549/pRc/CMV2		
	G <sub>0</sub> -G <sub>1</sub> (%)	S(%)	G <sub>2</sub> -M(%)	G <sub>0</sub> -G <sub>1</sub> (%)	S(%)	G <sub>2</sub> -M(%)
24	$73 \pm 3$	$10 \pm 5$	$18 \pm 4$	$78 \pm 4$	$6 \pm 5$	$16 \pm 5$
48	$48 \pm 5$	$12 \pm 4^{1)}$	$40 \pm 5^{1)}$	$73 \pm 3$	$10 \pm 5$	$18 \pm 5$
72	$53 \pm 4$	$18 \pm 5$	$31 \pm 4$	$76 \pm 5$	$7 \pm 5$	$17 \pm 4$

Compared with the two groups 1)  $P < 0.05$

2.5 F10 基因对 PCNA 和 cyclin D1 表达的影响

免疫组化显示, PCNA 在 A549/F10 中强阳性表达, 在 A549/空载体中呈中度阳性表达。各组中

cyclin D1 表达水平的变化和 PCNA 的改变一致。表明 F10 基因的表达使 A549 细胞中 PCNA 和 cyclin D1 表达上调 (图 4-7)。

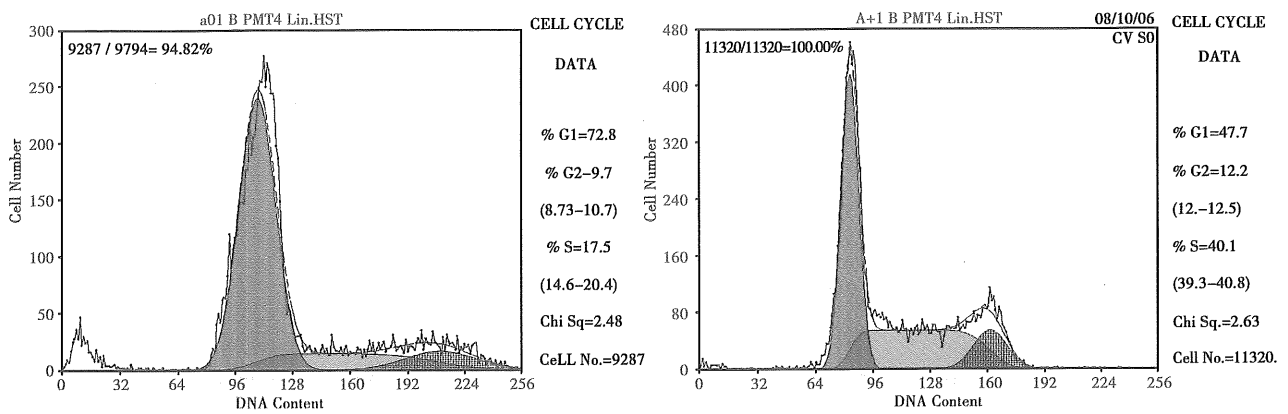


图3 pRc/CMV2/F10, pRc/CMV2 转染转染 A549 细胞后 48 h  
Fig.3 48 h after pRc/CMV2/F10 and pRc/CMV2 transfected A549 cell

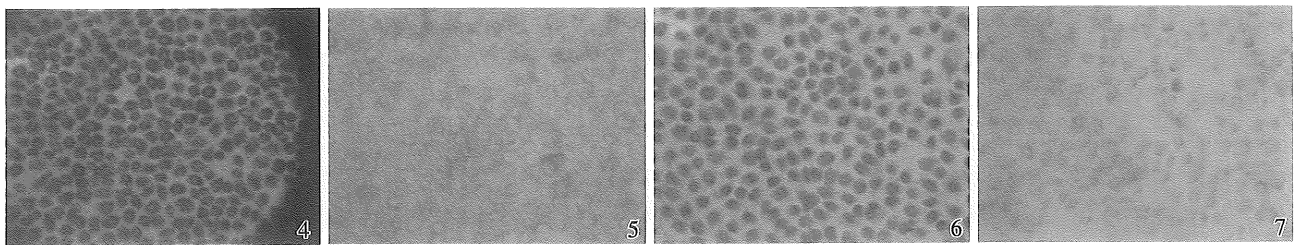


图4 A549/F10 组中 PCNA 的表达  
图5 A549/空载体组中 PCNA 的表达  
图6 A549/F10 组中 cyclinD1 的表达  
图7 A549/空载体组中 cyclinD1 的表达

Fig.4 Expression of PCNA of A549/F10 (×200)  
Fig.5 Expression of PCNA of pRc-CMV2 (×200)  
Fig.6 Expression of PCNA of A549/F10 (×200)  
Fig.7 Expression of PCNA of pRc-CMV2 (×200)

### 3 讨论

F10 基因为新克隆的葡萄胎中表达上调的基因, 前期实验结果提示 F10 基因与滋养细胞的侵袭性相关, 还可能参与某些腺癌的发生并观察了 F10 基因编码蛋白在细胞内的定位情况<sup>[4-5]</sup>。采用差异显示技术高通量的筛选转染 F10 基因后宿主细胞基因表达的变化, 得出 F10 基因可能参与促进细胞增殖、抑制细胞凋亡的过程<sup>[6-7]</sup>。从而推出新基因 F10 可能是一个新的癌基因。

恶性肿瘤的发生与细胞异常增殖密切相关, PCNA 是一种调节蛋白, 在细胞周期 G<sub>1</sub> 期开始升高, S 期合成达最高峰, G<sub>2</sub> 期和 M 期则又下降, 并认为它在 DNA 合成和细胞增殖调控中起重要作用。PCNA mRNA 一般仅积聚在增殖细胞中, 而在静止细胞中则缺乏, 因此, PCNA 可很好地反映细胞动力学的变化, 代表细胞增殖的潜能<sup>[8-10]</sup>。本研究中 A549/F10 细胞较 A549/空载体中 PCNA 的

表达高, 表明 F10 基因促进了 A549 细胞的增殖。

细胞的增殖失控是肿瘤组织最显著的特点, 癌基因、抑癌基因对细胞增殖周期各环节直接或间接的调控作用发生异常时, 可导致肿瘤的发生<sup>[11]</sup>。CDK 是细胞周期调节的中心, 其成员的激活和磷酸化, 可促进细胞由 G<sub>1</sub> 期向 S 期及 G<sub>2</sub> 期向 M 期的转变, CDK4 需与细胞周期素 D1 蛋白结合才能被激活, 任何引起细胞周期素 D1 蛋白过度表达, 都会导致细胞分裂增殖失控<sup>[12]</sup>。本研究发现, 表达 F10 基因的 A549 细胞中 cyclin D1 表达水平较对照组增高。表明 F10 促进了 cyclin D1 的表达, 缩短 G<sub>1</sub> 期时间及加速 G<sub>1</sub> 的进展。因而加快了细胞周期的进展。

#### 参考文献:

- [1] 李贵堂, 庞战军, 周瑾, 等. 葡萄胎发病相关新基因的克隆 [J]. 广东医学, 2006, 27(1): 22-23.
- [2] 周瑾, 陈士岭, 邢福祺, 等. 葡萄胎发病新基因 F10