

低氧通过 HIF-2 α 诱导 CCNE2 表达的初步研究

邹 阳,王 伟,温传俊

(南京师范大学生命科学学院,江苏省分子医学生物技术重点实验室,江苏 南京 210023)

[摘要] 低氧是肿瘤发生侵袭转移必经的过程之一,它促进了肿瘤致癌基因的表达,从而使肿瘤细胞发生远处转移.低氧环境对于调节肿瘤的 EMT 过程具有重要作用,刺激肿瘤的恶化和转移,也可促进血管激活因子的表达从而促进肿瘤血管的形成.CCNE2 作为调节细胞周期的关键基因,在肿瘤发生和转移过程中的作用已经得到广泛研究,在多种癌细胞中都发现 CCNE2 蛋白是高表达的.为此在 MCF-7 细胞中通过一系列的实验证明了 CCNE2 是一个新的低氧靶基因,并证明了低氧通过刺激 HIF-2 α 促进了 CCNE2 的表达.

[关键词] 低氧,MCF-7,HIF-2 α ,CCNE2

[中图分类号] Q291 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2014)02-0096-05

Study on Hypoxia Induced the Expression of CCNE2 by HIF-2 α

Zou Yang,Wang Wei,Wen Chuanjun

(School of Life Sciences,Nanjing Normal University,Jiangsu Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology,Nanjing 210023,China)

Abstract: Hypoxia is one of the process of tumorigenesis and tumor metastasis,it promotes the expression of tumors which promotes tumor cells distant metastasis. Hypoxia plays an important role in EMT process, which stimulates the degradation and metastasis of tumor, moreover, it promotes the expression of vascular activator to induce the formation of tumor blood vessels. As a key regulating in cell cycle genes, the role of CCNE2 in tumorigenesis and metastasis has been extensively studied, CCNE2 is found to express more than normal cells in various cancer cells. For these, a series of experiments are done to demonstrate CCNE2 is a new target to hypoxia and hypoxia induces the expression of CCNE2 by HIF-2 α .

Key words: hypoxia, MCF-7, HIF-2 α , CCNE2

CCNE2 作为调控细胞周期的关键因子,一直是肿瘤相关研究的热点.在正常细胞中,细胞增殖主要受细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖性激酶以及细胞周期蛋白依赖性激酶抑制物系统调控.绝大多数肿瘤细胞都存在若干改变的细胞周期调控基因^[1].在小鼠模型中已经被证明 CCNE2 调控系统的紊乱会导致肿瘤的发生^[2],Chetty^[3]等指出在胃癌中 CCNE2 是高表达的,在乳腺癌中也得出了类似的结果^[4].

低氧是肿瘤组织中普遍存在的现象,能够导致肿瘤的恶性转化^[5,6].肿瘤组织低氧程度,随着肿瘤发展不断加重,并被认为是估断子宫颈癌等肿瘤预后的一个独立指标^[7].低氧诱导因子是一种在低氧状态下才发挥活性的特异性转录因子并能激活许多下游的靶基因,可以促进肿瘤细胞的迁移^[8].它是迄今发现的组织细胞在低氧状态下诱生的最直接最重要的调控因子,包括 3 种亚型 HIF-1、HIF-2 和 HIF-3,分别由 α 和 β 2 个亚基组成异二聚体.

本实验利用双荧光素酶报告基因、siRNA、Q-PCR、Western blot 等手段证明 CCNE2 也是低氧的靶基因,在调节肿瘤转移和发生过程中发挥着重要的作用;还证明低氧促进 CCNE2 的表达由 HIF-2 α 介导,而不是 HIF-1 α .低氧促进 HIF-2 α 的表达,从而介导 CCNE2 的高表达.

收稿日期:2014-02-24.

基金项目:国家自然科学基金(2012104GZ30057).

通讯联系人:温传俊,副教授,研究方向:肿瘤分子细胞生物学. E-mail: wenchuanjun@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

pGL3-Basic 载体,质粒 pRL-TK 为本实验室保存;高糖 DMEM 培养基和胎牛血清购自 Gibco 生物公司;Trizol 和脂质体 2000 购自 Invitrogen 公司;HIF-1 α siRNA, HIF-2 α siRNA 合成于 Sigma 公司;HIF-1 α , HIF-2 α , CCNE2 抗体购自 CST 公司;反转录试剂盒和 SYBR Green 购自 Takara 公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自 Promega 公司.

1.1.2 细胞

乳腺癌细胞系 MCF-7 为本实验室保存.在 5% CO₂, 37 °C 细胞培养箱中培养,培养基为含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素的高糖 DMEM.

1.2 方法

1.2.1 低氧培养细胞和细胞转染

接种细胞 24 h 后将细胞置于低氧培养箱中培养,氧气浓度为 1%,低氧培养时间为 0 h、4 h、24 h、48 h.细胞转染质粒和 siRNA 的浓度和方法都严格按照脂质体 2 000 的操作说明书进行.

1.2.2 CCNE2 启动子质粒构建

利用 TFSEARCH、JASPAR 等软件分析 CCNE2 基因启动子潜在的与低氧有关的转录因子结合位点,结果表明转录起始位点上游的 1 214 bp 至下游的 627 bp 有多种 HIF 家族的结合位点,包括 HIF-1 α 、HIF-2 α 、HIF-2 β .为此,构建不同长度的报告基因从而来确定促进 CCNE2 启动子活性的转录因子. CCNE2-p4 (596) 构建时缺失了转录起始位点,不具备转录活性,作为阴性对照.

利用 primer 5.0 设计引物,在上游引物 5'端添加 *Kpn* I 酶切位点,在下游引物 5'端添加 *Hind* III 结合位点,引物序列如下:

上游引物

CCNE2-pF1 (1842): 5'-CGGGGTACCGACGATGTGCAGTTTTGGGGTGC-3',

CCNE2-pF2 (1599): 5'-CGGGGTACCATCTTTCTTCCACCCGGCCAG-3',

CCNE2-pF3 (1116): 5'-CGGGGTACCCAGCTCTTCAGCCAACGCTTTGCTC-3',

CCNE2-pF4 (569): 5'-CGGGGTACCCGAGCGGTAGCTGGTCTGGCGGTGA-3';

下游引物

CCNE2-pR: 5'-CCCAAGCTTGGGGTTGTGGAGGCGAAATGCT-3'.

PCR 产物经过纯化后用 *Kpn* I, *Hind* III 双酶切 2 h, 割胶回收后,用 T4 DNA 连接酶将片段与 pGL3-Basic 载体连接,16 °C 过夜,然后转化、挑取克隆、提质粒,最后送去测序.

1.2.3 荧光素酶活性检测

弃去培养液, PBS 洗细胞 2~3 次,完全吸净 PBS,使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒进行细胞裂解及荧光素酶活性检测实验.每孔中加入 100 μ L 1 \times PLB,室温静置 30 min.吸取上清于专用 96 孔板中,选择检测区域,每孔加入 20 μ L 细胞裂解液以及 100 μ L 1 \times Luciferase Assay Buffer 进行检测,得出萤火虫荧光素酶活性,再加入 100 μ L Stop&Glo Buffer,检测得到海肾荧光素酶活性.各孔细胞的转染效率用海肾荧光素酶活性校正,所得数值为萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值.

1.2.4 RNA 提取以及 Q-PCR 分析

弃去培养基,1 \times PBS 洗 3 次,每孔加入 500 μ L Trizol,室温静置 15 min,使贴壁细胞充分裂解.转移 Trizol 裂解液至 1.5 mL 进口 EP 管中,然后加入 0.1 mL 氯仿, Vortex 15 s 充分混匀后室温静置 5 min. 4 °C, 12 000 r/min 离心 10 min, EP 管内溶液分层.转移上层水相至另一 EP 管,加入等体积异丙醇,轻轻上下颠倒混匀,室温静置 10 min, 4 °C, 12 000 r/min 离心 10 min, EP 管底可见少量白色胶状沉淀物,即 RNA 沉淀.弃去上清液,向 EP 管中加 1 mL 75% 乙醇(用 0.1% DEPC 处理过的水配制),轻轻颠倒数次清洗 RNA 沉淀,随后 4 °C 7 500 r/min 离心 5 min,再次沉淀 RNA.弃去上清液,并将 EP 管置于超净工作台中吹干管内残余的乙醇(不宜太干,以防影响 RNA 溶解),最后加入 30 μ L DEPC 水溶解 RNA.经测定合格的

RNA 可立即进行反转录实验或放置于 -80°C 冰箱中保存. 经反转录得到的 cDNA 进行 Q-PCR 分析. 反转录和 Q-PCR 的步骤都严格按照 Takara 公司说明书进行.

1.2.5 蛋白提取以及 Western blot 分析

弃去培养基, $1\times\text{PBS}$ 洗 3 次, 每孔加入 $200\ \mu\text{L}$ RIPA 裂解液 ($50\ \text{mmol/L}$ Tris-HCl $\text{pH}=7.5$, $150\ \text{mmol/L}$ NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, $10\times\text{cocktail}$, $100\times\text{PMSF}$) 置于冰上裂解 $30\ \text{min}$, $12\ 000\ \text{r/min}$ 离心 $10\ \text{min}$, 取上清加入 $5\times\text{Sample Buffer}$ 混匀, 95°C 煮样 $10\ \text{min}$, 10% SDS PAGE 电泳, 转移蛋白至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭 $90\ \text{min}$, 4°C 孵育一抗过夜, 37°C 孵育辣根过氧化物酶标记的二抗 $2\ \text{h}$, 最后以 ECL 显色法进行显色.

1.2.6 统计学分析

实验重复 3 次, 数据采用 Origin 8.0 软件统计和做图, 组间差异采用 t -检验和 q -检验进行比较.

2 结果

2.1 低氧促进 CCNE2 启动子的活性

生物信息学分析 CCNE2 启动子上游的 $1\ 214\ \text{bp}$ 至下游的 $627\ \text{bp}$ 有多个与低氧有关的转入因子结合位点, 图 1A 表示了 4 个不同长短的报告基因的大小以及缺失片段的位置. 将构建好的启动子和 PGL3-Basic 转染入 MCF-7 细胞, 转染 $48\ \text{h}$ 后检测荧光素酶活性, 图 1B 显示 PGL3-CCNE2($1\ 842$) 启动子的活性较 PGL3-Basic 上调了将近 27 倍; PGL3-CCNE2($1\ 116$) 启动子的活性较 PGL3-Basic 上调了将近 50 倍; 由

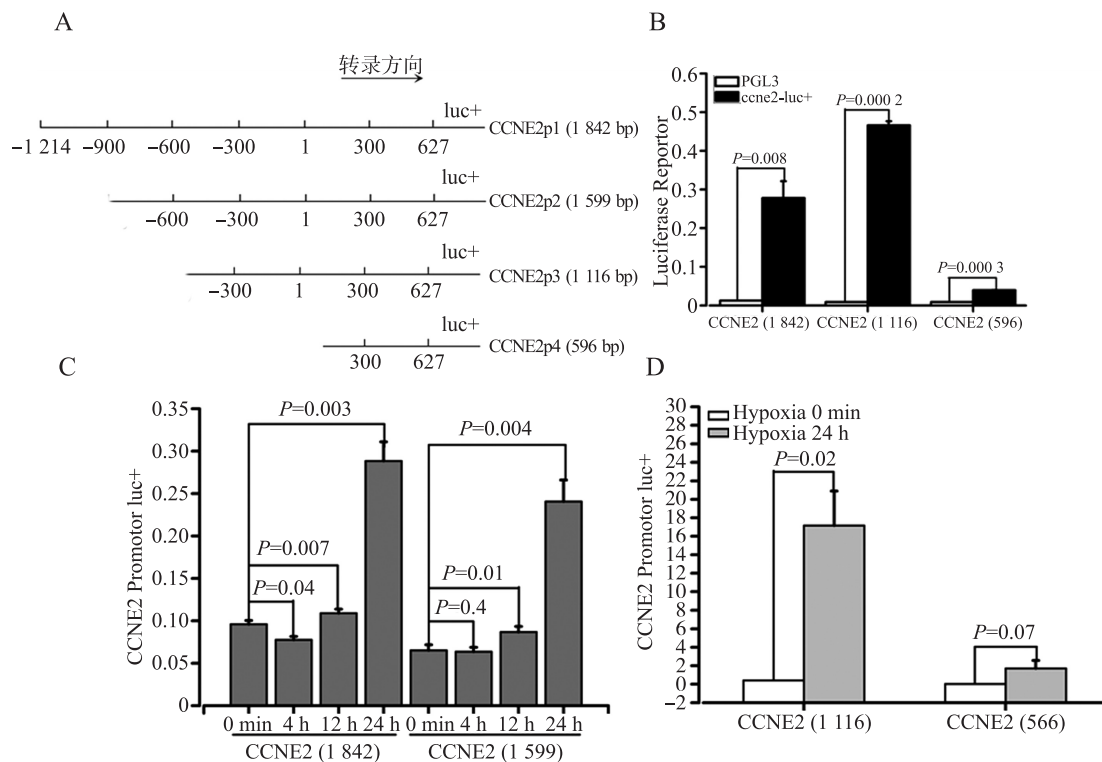


图1 1%浓度的氧气处理 MCF-7 细胞 24 h 可以促进 CCNE2 启动子活性

Fig. 1 1% oxygen concentration promotes the activity of CCNE2 promoter in MCF-7 cells

A: 4 个 CCNE2 启动子的片段大小 ($1\ 842\ \text{bp}$, $1\ 599\ \text{bp}$, $1\ 116\ \text{bp}$, $596\ \text{bp}$) 和缺失片段的位置; B: 验证 CCNE2 启动子活性. 结果证明除了丧失启动子活性的 CCNE2 (596) 外, 其他 2 个报告基因启动子活性都是正常的; C: 低氧促进 CCNE2 ($1\ 842\ \text{bp}$, $1\ 599\ \text{bp}$) 启动子活性. 设置不同的低氧时间, 结果发现低氧 $24\ \text{h}$, 启动子活性最佳; D: 低氧促进 CCNE2 ($1\ 116\ \text{bp}$) 的活性却不能启动缺失启动子活性的 CCNE2 (596).

A: The sizes and missing fragments of four different plasmids ($1\ 842\ \text{bp}$, $1\ 599\ \text{bp}$, $1\ 116\ \text{bp}$, $596\ \text{bp}$). B: Verify the activity of CCNE2 promoter. The result shows that except CCNE2 (596), the activity of other two reporters is normal. C: Hypoxia promotes the activity of CCNE2 ($1\ 842\ \text{bp}$, $1\ 599\ \text{bp}$), the result shows that the activity of promoter is the strongest when treated with hypoxia $24\ \text{h}$. D: Hypoxia $24\ \text{h}$ promotes the activity of CCNE2 ($1\ 116\ \text{bp}$) but not the CCNE2 ($596\ \text{bp}$) because of losing the activity of promoter.

于缺失转入起始位点 PGL3-CCNE2(596)启动子的活性较 PGL3-Basic 而言只上调了将近 4 倍,所以数据是可信的. 将 CCNE2(1 842)和 CCNE2(1 599)2 个启动子和 PRL-TK 共转入 MCF-7,细胞转染 24 h 后低氧处理 0 h、4 h、12 h、24 h. 图 1C 显示,与低氧处理 0 h 相比,处理 4 h 组启动子活性无明显变化,但是低氧处理 12 h 后,启动子活性明显上升,而 24 h 后达到最高峰. 图 1C 的结果说明 2 个大小不同的启动子对于低氧都具有敏感性,并未达到我们想要的效果. 于是再次用相同的方法转染 CCNE2(1 116)和 CCNE2(569),低氧 24h. 图 1D 显示,CCNE2(1 116)仍具有低氧敏感性,CCNE2(569)不具备启动子活性,所以不具备低氧敏感性,说明实验数据的可信度.

2.2 低氧促进 CCNE2 mRNA 和蛋白的表达

研究表明低氧能够诱导低氧诱导因子 HIF-1 α , HIF-2 α 的表达(图 2A,2B). 低氧处理 MCF-7 细胞 0 h、12 h、24 h、48 h 后,提取 RNA 和蛋白,做定量分析检测. 以低氧处理 0 h 为对照(设为 1),图 2C 显示低氧 12 h 和 24 h,CCNE2 mRNA 的表达量持续上升,直至处理 48 h 后 CCNE2 mRNA 的表达才开始下调,但是和对照组相比还是上调的. 低氧处理之后 CCNE2 的蛋白表达和 mRNA 表达的趋势是一致的(图 2D).

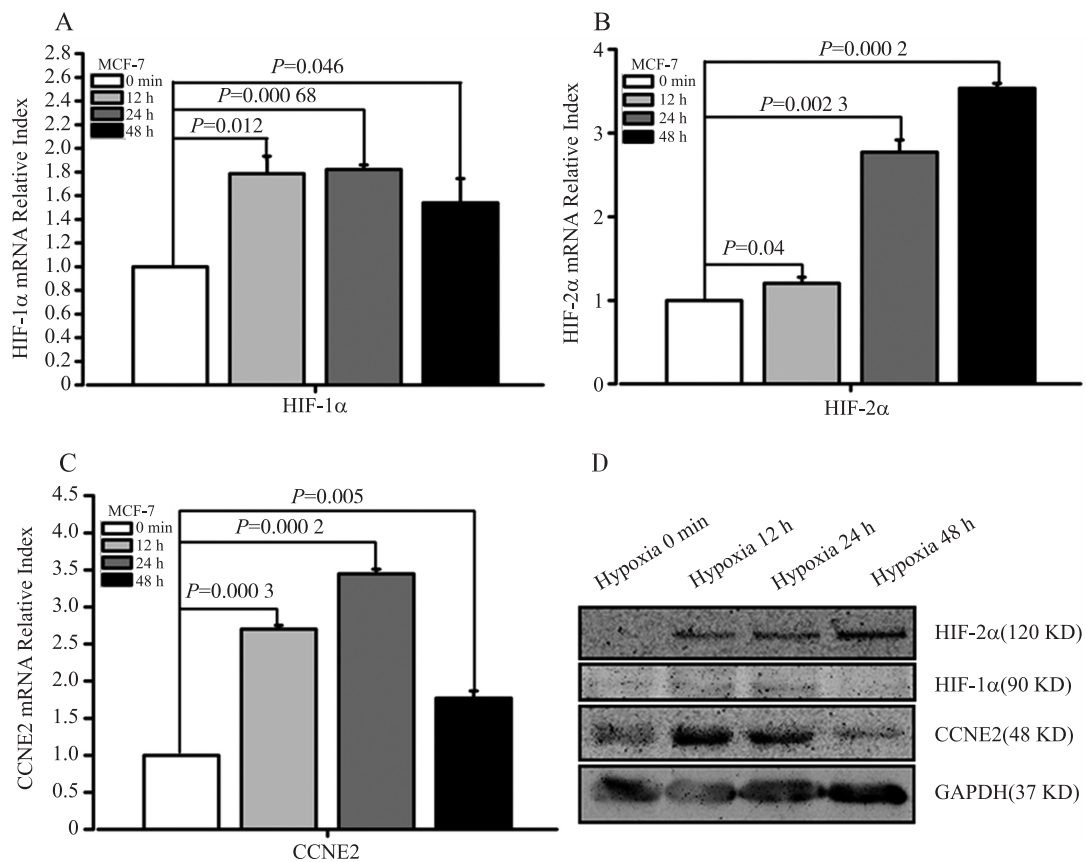


图 2 1%浓度的氧气处理 MCF-7 细胞 24 h 后 CCNE2 mRNA 和蛋白表达上升

Fig. 2 1% concentration of oxygen promotes the expression of CCNE2 mRNA and protein

A:低氧诱导 HIF-1 α mRNA 表达. B:低氧诱导 HIF-2 α mRNA 表达. C:低氧诱导 CCNE2 mRNA 的表达. D:低氧诱导 HIF-1 α , HIF-2 α , CCNE2 蛋白的表达.

A: Hypoxia induces the expression of HIF-1 α mRNA. B: Hypoxia induces the expression of HIF-2 α mRNA. C: Hypoxia promotes the expression of CCNE2 mRNA. D: Hypoxia promotes the expression of HIF-1 α , HIF-2 α , CCNE2 protein.

2.3 干扰 HIF-2 α 后,低氧不能诱导 CCNE2 的表达

利用小片段的 siRNA 干扰低氧诱导因子,然后提取 RNA 和蛋白,做定量检测分析. 接种 MCF-7 细胞于六孔板 24 h 后分别转染 NC, HIF-1 α siRNA, HIF-2 α siRNA, 以及 HIF-1 α siRNA、HIF-2 α siRNA 共转,然后分别低氧 0 h、24 h. Q-PCR 和 Western blot 都表明,干扰 HIF-2 α 之后,低氧不能有效地促进 CCNE2 的表达,而干扰 HIF-1 α 对于低氧促进 CCNE2 的表达没有影响(图 3A,3B).

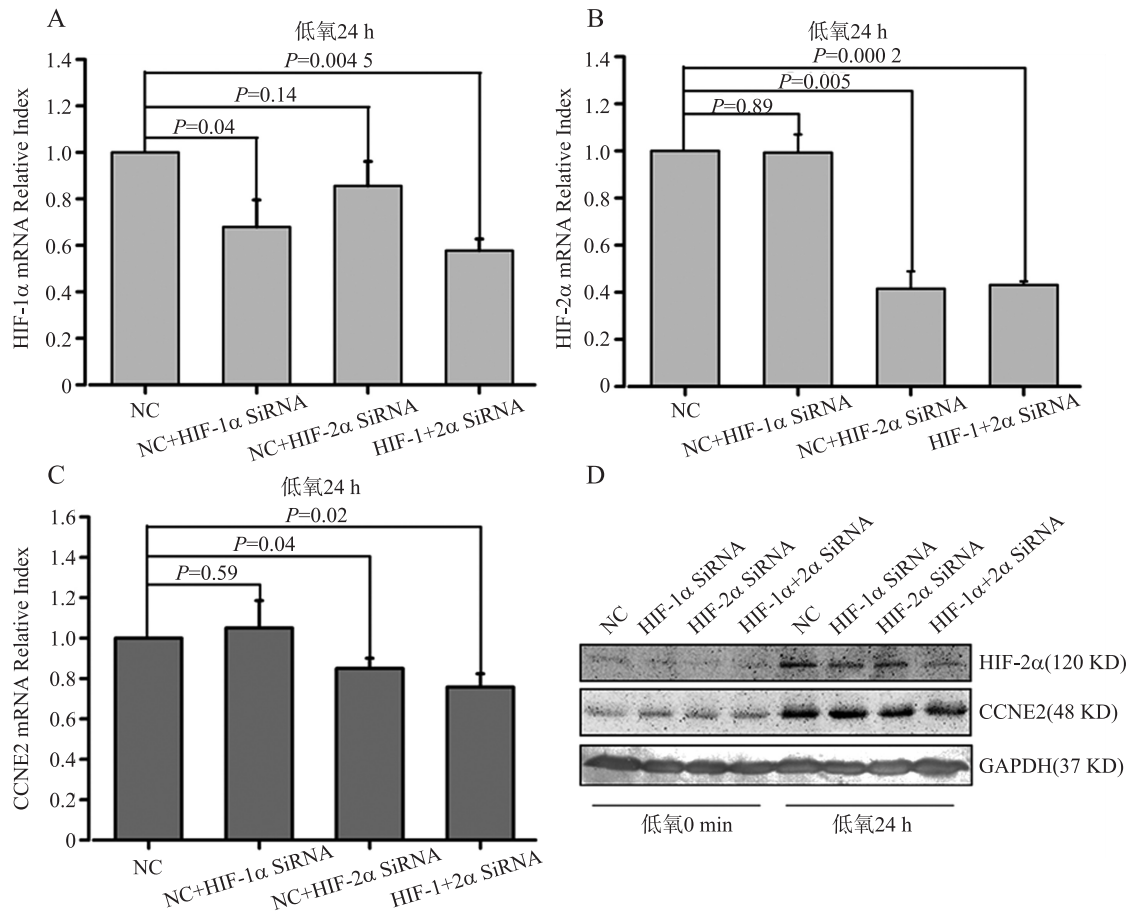


图 3 干扰 HIF-2α 后, 1% 的氧气浓度低氧 24 h 后不能有效地诱导 CCNE2 的表达

Fig. 3 1% concentration of oxygen can not induce the expression of CCNE2 effectively after interference of HIF-2α

A: Q-PCR 检测 HIF-1α 的干扰效率, 结果表明干扰率达到将近 40%。B: Q-PCR 检测 HIF-2α 的干扰效率, 结果表明干扰率达到将近 70%。C: Q-PCR 分析 HIF-1α 和 HIF-2α 干扰之后 CCNE2 mRNA 的表达。干扰 HIF-2α 后低氧 24 h CCNE2 的 mRNA 的表达下降了, 而干扰 HIF-1α 却没有影响。D: Western blotting 分析 HIF-1α 和 HIF-2α 干扰之后 CCNE2 mRNA 的表达。干扰 HIF-2α 后低氧 24 h CCNE2 的蛋白水平下降了, 而干扰 HIF-1α 却没有影响。

A: Detecting interference efficiency of HIF-1α by Q-PCR, the result shows the efficiency is about 40%. B: Detecting interference efficiency of HIF-2α by Q-PCR, the result shows the efficiency is about 70%. C: Analysis of the CCNE2 mRNA expression by Q-PCR after the interference of HIF-1α and HIF-2α. The expression of CCNE2 mRNA decreased with hypoxia 24 h but not HIF-1α. D: Analyse of the CCNE2 protein expression by Western blotting after the interference of HIF-1α and HIF-2α. The expression of CCNE2 expression decreased after hypoxia 24 h but not HIF-1α.

3 讨论

低氧能够通过调节一些周期蛋白的转录表达从而调控一些细胞周期分子机制的变化^[9,10], CCNE2 作为一个细胞周期蛋白对调控细胞周期发挥着不可或缺的作用。低氧能够促进肿瘤转移以及肿瘤血管的形成, 而大多数肿瘤细胞都会涉及调控细胞周期机制的变化^[11], CCNE2 作为 cyclin E 成员可以和 CDK 组成复合物从而调控细胞 G1/S 期的转换^[12]。这些文献和资料似乎证明了低氧和 CCNE2 有关, 但是现在并未有任何一篇文献报道 CCNE2 和低氧的关系。

为此, 我们的研究着重于低氧诱导 CCNE2 的表达。通过报告基因验证了 1% 的氧气浓度, 低氧 24 h 能够诱导 CCNE2 启动子的活性, 但是并未通过片段缺失的方法找到与 CCNE2 结合并且与低氧有关的转录因子。我们又从核酸和蛋白水平着手, 同样, 1% 的氧气, 低氧 24 h 后能够促进 CCNE2 mRNA 和蛋白的表达。随后在 RNA 水平上发现, 干扰 HIF-2α 之后, 低氧不能诱导 CCNE2 mRNA, 而干扰 HIF-1α 却没有影响, 蛋白水平也有类似的结果。从这些结果中我们不难发现, 低氧能够通过诱导 HIF-2α 的表达从而介导 CCNE2 的表达。

(下转第 105 页)

- [8] 徐恩,陆雪芬,伍健伟,等.广东中山古镇健康中老年人体质指数的流行病学研究[J].中国慢性病预防与控制,1997,5(3):125-127.
- [9] 陈捷,杨遇春,林志国,等.哈尔滨,德阳两地人群血压差异与肥胖关系的研究[J].中国慢性病预防与控制,1995,3(4):145-146.
- [10] 中国肥胖问题工作组数据汇总分析协作组.我国成人体重指数和腰围对相关疾病危险因素异常的预测价值:适宜体重指数和腰围切点的研究[J].中华流行病学杂志,2002,23(1):5-10.
- [11] Cooper R S, Rotimi C N, Wilks R, et al. Prevalence of NIDDM among populations of the African diaspora[J]. Diabetes Care, 1997, 20(3):342-345.
- [12] Bailey K V, Ferro L A. Use of body mass index of adults in assessing individual and community nutritional status[J]. Bull World Health Organ, 1995, 73(5):673-680.
- [13] Meanulty J, Scragg R. Body mass index and cardio vascular risk factors in pacific island polynesians and europeans in New Zealand[J]. Ethn Health, 1996, 1(3):187-195.
- [14] Unwin N, Harland J, White M, et al. Body mass index, waist circumference, waisthip ratio, and glucose intolerance in Chinese and europid adults in Newcastle, UK[J]. J Epidemiol Community Health, 1997, 5(2):160-166.
- [15] 刘铁群,钟春妍,赵蔚.大连地区健康人群体重指数分布状况的调查分析[J].医学与哲学:临床决策论坛版,2006,27(5):37-38.
- [16] 金莉子,马英东,黄日荷,等.珠海市斗门区居民体重指数、腹围与血压关系的研究[J].中国卫生监督杂志,2009,16(5):474-477.
- [17] 王自勉.人体组成学[M].北京:高等教育出版社,2008:135-157.

[责任编辑:黄 敏]

(上接第 100 页)

[参考文献]

- [1] Clurman B E, Roberts J M. Cell cycle and cancer[J]. Journal of the National Cancer Institute, 1995, 87(20):1 499-1 501.
- [2] Hwang H C, Clurman B E. Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles[J]. Oncogene, 2005, 24(17):2 776-2 786.
- [3] Loeb K R, Kostner H, Firpo E, et al. A mouse model for cyclin E-dependent genetic instability and tumorigenesis[J]. Cancer Cell, 2005, 8(1):35-47.
- [4] Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis[J]. Journal of the National Cancer Institute, 2006, 98(4):262-272.
- [5] Wykoff C C, Beasley N J P, Watson P H, et al. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases[J]. Cancer Research, 2000, 60(24):7 075-7 083.
- [6] Meiron M, Anunu R, Scheinman E J, et al. New isoforms of VEGF are translated from alternative initiation CUG codons located in its 5' UTR[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 282(4):1 053-1 060.
- [7] 陈彬,李晓,穆超,等.大鼠正畸牙移动中 HIF-1 α 的表达[J].口腔生物医学,2011,2(2):78-81.
- [8] Höckel M, Schlenger K, Höckel S, et al. Hypoxic cervical cancers with low apoptotic index are highly aggressive[J]. Cancer Research, 1999, 59(18):4 525-4 528.
- [9] Rademakers S E, Span P N, Kaanders J H A M, et al. Molecular aspects of tumour hypoxia[J]. Molecular Oncology, 2008, 2(1):41-53.
- [10] Fanale D, Bazan V, Corsini L R, et al. HIF-1 is involved in the negative regulation of AURKA expression in breast cancer cell lines under hypoxic conditions[J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2013, 140(3):505-517.
- [11] Tan P, Cady B, Wanner M, et al. The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a, b) invasive breast carcinomas[J]. Cancer Research, 1997, 57(7):1 259-1 263.
- [12] Bartek J, Lukas J. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage[J]. FEBS Letters, 2001, 490(3):117-122.

[责任编辑:黄 敏]