

Ran 对黑腹果蝇 Kc 细胞耐受 DDT 的影响

柏 骞, 陈 露, 常春洁, 刘雅慧, 程罗根

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

[摘要] 通过 DDT 刺激黑腹果蝇 Kc 细胞, 着重讨论基因 *Ran* 的表达量变化情况. 应用实时荧光定量 PCR, 检测不同浓度 DDT 诱导刺激条件下, Kc 细胞内基因 *Ran* 表达量变化. 利用流式细胞仪, 检测不同浓度 DDT 诱导下细胞的凋亡率. 结果表明, 20 mg/L DDT 处理的细胞, *Ran* 表达水平最高. 同时, 在该浓度下, 细胞凋亡率明显减弱, 其变化趋势与 *Ran* 表达变化趋势基本一致. DDT 可以显著提高 Kc 细胞 *Ran* 基因表达, 降低细胞凋亡率. 为了进一步验证 *Ran* 的功能, 进行了 *Ran* 的过表达和干扰, 并检测细胞凋亡情况. 结果显示 *Ran* 的干扰能够明显提高细胞凋亡率. 实验表明, *Ran* 对细胞具有一定保护作用, *Ran* 有可能是一个与杀虫剂耐受性相关的基因之一, 并为进一步分析害虫应激反应及分子毒理提供研究依据.

[关键词] *Ran*, DDT, 应激, 耐受性, 细胞凋亡

[中图分类号] Q965.9 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2018)02-0083-06

Analysis of *Ran* and DDT Resistance in *Drosophila Melanogaster* Kc Cells

Bo Qian, Chen Lu, Chang Chunjie, Liu Yahui, Cheng Luogen

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: In this paper, the Kc cells of *Drosophila melanogaster* were stimulated by Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), we focus on the changes in the expression of *Ran*. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the changes in gene expression of *Ran* in Kc cells under different concentrations of DDT induced stimulation. Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate of cells with different concentrations of DDT. The results showed that the expression of *Ran* in the cells treated by 20 mg/L DDT was the highest. At the same time, the apoptosis rate decreased obviously at this concentration, the trend of cell apoptosis was basically consistent with the change of *Ran* expression. DDT can significantly increase the expression of *Ran* gene in Kc cells and reduce the rate of apoptosis. In order to further verify the function of *Ran*, we carried out the overexpression and interference of *Ran*. The cell apoptosis was detected. The results showed that the interference of *Ran* could significantly increase the rate of apoptosis. The experiment showed that *Ran* had a certain protective effect on the cells. *Ran* may be one of the genes associated with insecticide tolerance, which provides a basis for further analysis of the stress response and molecular toxicology of insect pests.

Key words: *Ran*, DDT, stress, resistance, apoptosis

DDT 因其持久、难降解的特点, 成为当今国际社会关注的持久性有机污染物之一^[1-2]. 近年来, 陆续有学者报道我国各地土壤、水体、沉积物、蔬果及人体中均不同程度检出了有机氯杀虫剂的药物残留. 调查显示, 我国部分地区土壤中残留的 DDT 总量一般在 0 mg/L, 2 mg/L~7 mg/L, 六六六总量在 0.01 mg/L~2 mg/L^[3]. *Ran* (GTP-binding nuclear protein *Ran*), 是一种小 G 蛋白和分子开关, 早期研究发现, *Ran* 参与细胞的核质运输、微管形成、有丝分裂纺锤体以及核膜形成等过程^[4-6]. 小 G 蛋白广泛参与生长发育、抗病和激素敏感性调控等过程, Nachury 报道其在应激反应中也扮演重要作用^[7]. 最近一项研究表明, 过表达 *DiRan3A* 基因具有较高的逆境胁迫能力, 如盐胁迫、渗透胁迫、干旱胁迫和热胁迫等; 异位表达龙眼 *Ran* 引起大量植株内源抗性基因的差异表达, 这些提示 *Ran* 可能在提高生物体抗性方面发挥重要作用^[8]. 课题

收稿日期: 2018-02-01.

基金项目: 国家自然科学基金 (31071974, 31460482).

通讯联系人: 程罗根, 博士, 教授, 研究方向: 遗传学. E-mail: chenglugeng@njnu.edu.cn

组早期发现,基因 *Ran* 是溴氰菊酯应激耐受的候选基因^[9],而关于 *Ran* 基因对有机氯类杀虫剂的应激作用机理尚未见报道,本研究在基因水平上初步研究 Kc 细胞对有机氯类杀虫剂的应激作用机理中,采用实时荧光定量 PCR 技术,检测不同浓度 DDT 诱导刺激条件下,黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) Kc 细胞内 *Ran* 表达量的变化;通过流式细胞仪检测这些 DDT 诱导下细胞凋亡情况。

1 实验材料

1.1 果蝇细胞

实验使用的 Kc 细胞由东南大学生命科学研究院的韩俊海教授课题组惠赠,置于 28 ℃ 无 CO₂ 的细胞培养箱中培养。

1.2 主要试剂

DDT 标准溶液 (1 000 mg/L) (上海农药研究所),无血清昆虫细胞培养基 (美国 Thermo 公司),TRIZOL 试剂 (美国 Invitrogen 公司),PrimeScript[®] RT reagentKit (日本 TaKaRa 公司),ChamQ TM SYBR[®] q-PCR Master Mix (Vazyme, CHINA),AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒 (美国 BD Pharmingen 公司),MEGAscript RNAi Kit (美国 Invitrogen 公司),其他试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器和耗材

超净工作台 (新加坡 Esco 公司),恒温细胞培养箱 (新西兰 Contherm 公司),高压蒸汽灭菌锅 (日本 Hirayama 公司),离心机 (Eppendorf 公司),流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson 公司),-80 ℃ 超低温冰箱 (美国 Thermo Electron 公司),MilliporeElix 纯水仪 (美国 Millipore 公司),倒置显微镜 XDS1C (日本 Nikon 公司),实验相关耗材均购自生工生物科技有限公司。

2 实验方法

2.1 *Ran* 对 DDT 的响应

2.1.1 细胞传代培养

选用无血清昆虫细胞培养基培养 Kc 细胞,每隔 3 d 更换新鲜培养基,置于 28 ℃ 无 CO₂ 细胞培养箱中继续培养。细胞传代的过程要动作轻柔,从而减小机械损伤,整个过程在超净台中进行。各项实验前将细胞以 1×10^7 /孔接种到六孔板培养 24 h,确保细胞处于对数增长期,以备后续操作。

2.1.2 不同剂量 DDT 刺激处理

以丙酮作为溶剂,将 DDT 标准溶液稀释成如下浓度梯度:5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、40 mg/L、80 mg/L。逐滴添加 25 μ L 不同浓度梯度的 DDT 至六孔板,对照组只加 2 mL 培养基,此时药物浓度记做 0 mg/L。每一个药物浓度设置 3 个重复组。加药后将细胞重新放入到无 CO₂ 细胞培养箱中,相同条件下再培养 48 h。整个过程均在超净工作台完成。

2.1.3 总 RNA 提取与反转录

该过程所用到的 PCR 管、离心管、枪头等均为无 RNase 的专门耗材,依照传统 TRIZOL 法提取细胞 RNA,该操作在超净台中完成。随后在 NanoDrop 2000 核酸定量仪测定所提取的 RNA 浓度,经 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定所提取 RNA 的纯度。合格的 RNA 置于冰上,按照反转录试剂盒 (PrimerscriptTM RT Reagents Kit Perfect Real Time) 说明书合成 cDNA。反应条件为:37 ℃,15 min;85 ℃,5 s。

2.1.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

以 cDNA 为模板,用 Primer Primer 5 软件设计 *Ran* 基因和 *GAPDH* 基因的引物,按照 ChamQ TM SYBR[®] q-PCR Master Mix 试剂盒中的说明书逐步进行操作,该操作在暗环境下进行。该实验独立样本 3 次重复,所得数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析^[10-11]。

2.2 基因 *Ran* 表达水平对 Kc 细胞抗性的影响

2.2.1 *Ran* 基因的过表达

首先根据已有的果蝇基因序列,设计扩增 *Ran* 基因 ORF 引物,以 Kc 细胞的 cDNA 为模板进行 PCR 并胶回收。其次将 *Ran* 的 PCR 纯化产物和 pIB/V5-his 表达载体进行连接,构建表达载体。然后挑选阳性克隆,测序比对完全正确菌液样品扩繁后质粒抽提。最后接种于六孔板中,待细胞融合率达 80%~90%

时,按照 X-tremeGENE HP DNA 转染试剂说明书进行转染. 整个过程均需在超净工作台中完成.

2.2.2 *Ran* 基因的干扰

设计 dsRNA 合成所需引物并且合成 *Ran* 的编码区序列,PCR 所得产物经琼脂糖凝胶电泳、纯化、基因序列克隆以后测序并且比对序列. 上述合成 PCR 的产物通过定量后可以作为体外进行 dsRNA 转录的模板,按照 MEGAscript RNAi Kit 说明书来合成 dsRNA. 最后接种于六孔板中,待细胞融合率达 80%~90% 时,按照 EndoFectinTM-Max 说明书转染. 整个过程均在超净工作台中完成.

2.3 Western Blot

将细胞样本转移到 2 mL 离心管中,采用一步法昆虫活性蛋白提取试剂盒提取总蛋白. SDS-PAGE 分离后转移到 PVDF 膜上进行 WB 分析,具体步骤按照参考文献[12]操作.

2.4 细胞凋亡率检测

采用 Annexin-V/PI 双染法检测细胞凋亡. 按照每 5×10^5 细胞接种到每一个 6 孔板,24 h 后添加不同浓度的 DDT 刺激细胞 48 h. 收集上述所有细胞,PBS 冲洗 2 次,按照 AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒说明书逐步进行操作,1 h 以内置于流式细胞仪检测细胞凋亡.

2.5 统计分析

采用 SPSS 20 软件进行数据分析. 以上每个实验至少进行 3 次,采用单因素方差分析(ANOVA)来分析结果的统计意义. 各组间表达水平的差异用 Turkey 检验,* 代表 $P < 0.05$.

3 结果与讨论

3.1 qPCR 检测在 DDT 应激下 *Ran* 的表达量

采用 qPCR 来定量暴露于不同剂量 DDT(0 mg/L 至 80 mg/L) 应激下的 *Ran* 表达水平,结果如图 1 所示. 在各剂量处理下,其表达量都有明显的增加且随着用药剂量的不断升高,*Ran* 的表达水平也不断上升. 通过比较分析看出,用 20 mg/L 处理时 *Ran* 的表达量出现最大值,为对照组的 3.11 倍. 结果表明,不同浓度的 DDT 对 *Ran* 表达水平显著上调. 据此初步推测,*Ran* 可能在有机氯类杀虫剂耐药性形成过程中发挥作用.

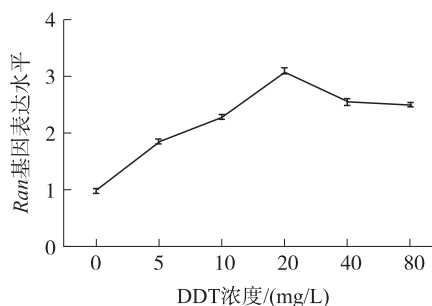


图 1 实时荧光定量检测 *Ran* 表达水平

Fig.1 The expressions of *Ran* in kc cells treated with DDT

3.2 细胞凋亡率的测定

采用流式细胞术测定不同浓度 DDT 处理下 Kc 细胞的凋亡率,结果如图 2 所示,随着用药剂量的不断升高,细胞凋亡呈下降趋势,过高的浓度反而加快细胞凋亡;在 20 mg/L 处理组,细胞凋亡率较其他浓度为低,说明细胞活力在此浓度下最强,因此在该浓度下,细胞抵御杀虫剂应激作用最强,说明 *Ran* 的表达水平能影响细胞对 DDT 的耐受能力.

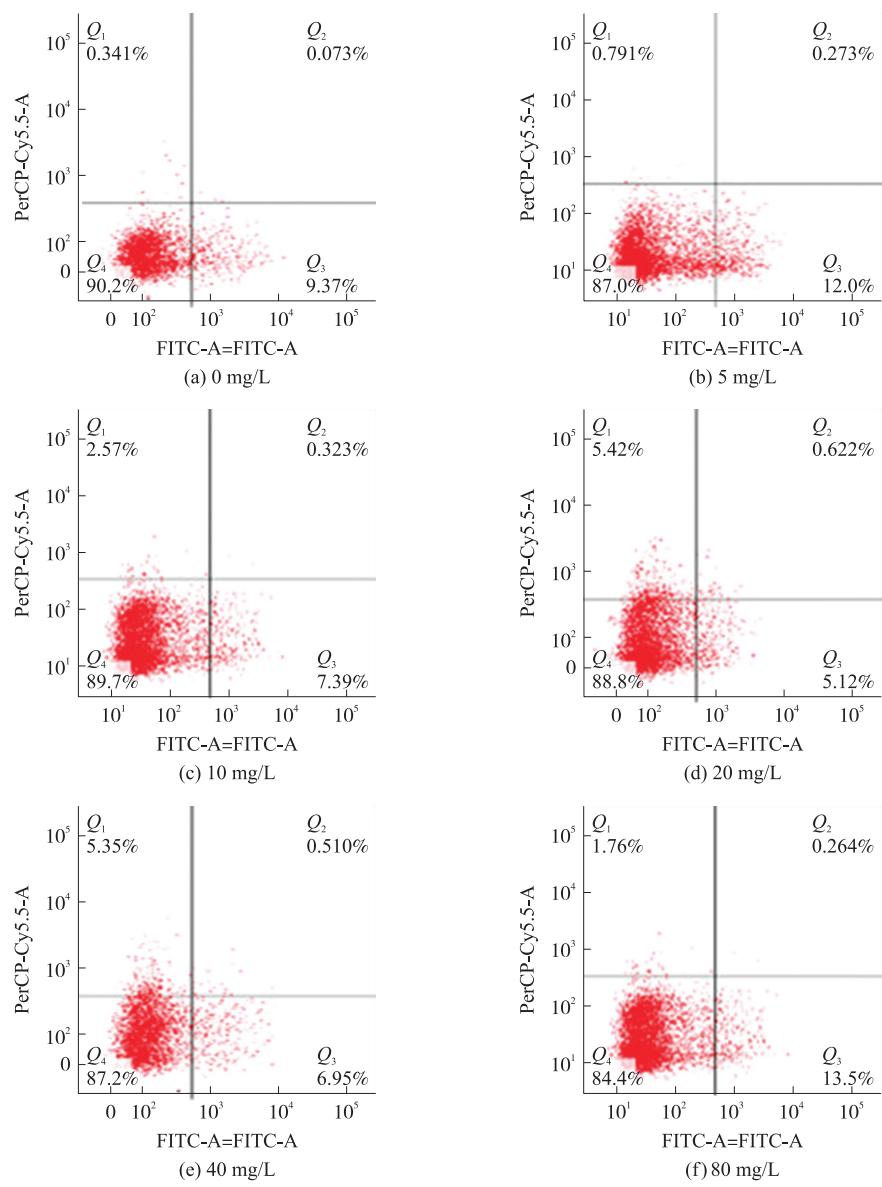
3.3 *Ran* 表达水平与 Kc 细胞耐受性分析

为了进一步证实 *Ran* 在 DDT 耐受中的作用,我们对 Kc 细胞进行过表达或干扰,用 Western Blot 检测过表达或干扰效率. 由图 3A 可知,*Ran* 过表达或干扰细胞中,*Ran* 的表达水平发生了显著变化. 流式细胞检测不同处理细胞的凋亡率,结果表明,干扰组能显著降低细胞对 DDT 的耐受性,而 *Ran* 过表达则能显著提高细胞的耐受性(图 3B、3C). 结合图 1 和图 2,推测在 DDT 胁迫下,细胞凋亡率的下降源自 *Ran* 表达水平的提升. 随着 *Ran* 表达水平的升高,Kc 细胞耐受不良环境的能力加强,该结果进一步表明,*Ran* 参与 DDT 耐药性的形成.

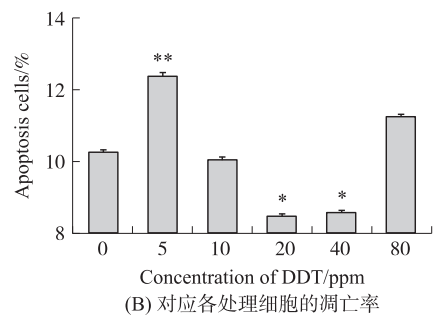
4 结果与讨论

自 20 世纪以来,杀虫剂大量使用,给农业生产带来了严重的威胁,杀虫剂的抗性研究将有助于扩大对其他相关害虫抗性机制的认识,最终有助于农业和森林害虫的防治. 前期研究表明,*Ran* 在生命活动中扮演重要角色,包括核质转运^[13-14]、纺锤体形成^[15]、核膜组件^[16]、细胞周期调控^[17]. *Ran* 在哺乳动物中作为一种致癌基因^[18],与正常组织相比,在肿瘤组织中的表达增加. Chatterjee M 等人近期发现 *Ran* 还与氧化

应激调控相关^[19]. 我们的研究小组已经证明了 *Ran* 与溴氰菊酯的耐受性之间的联系,在溴氰菊酯应激反应中,*Ran* 可能是抑制细胞凋亡的候选基因.



(A) 不同浓度DDT处理细胞的流式细胞检测结果



(B) 对应各处理细胞的凋亡率

Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞仪检测报告,散点图被分为 4 个象限,图中象限 Q₃ 为凋亡早期细胞;右上象限 Q₂ 为坏死和晚期凋亡细胞群;左下象限 Q₄ 为活细胞

图 2 流式细胞仪检测细胞凋亡率变化

Fig. 2 Pesticides sensitivity analysis of the apoptosis in DDT

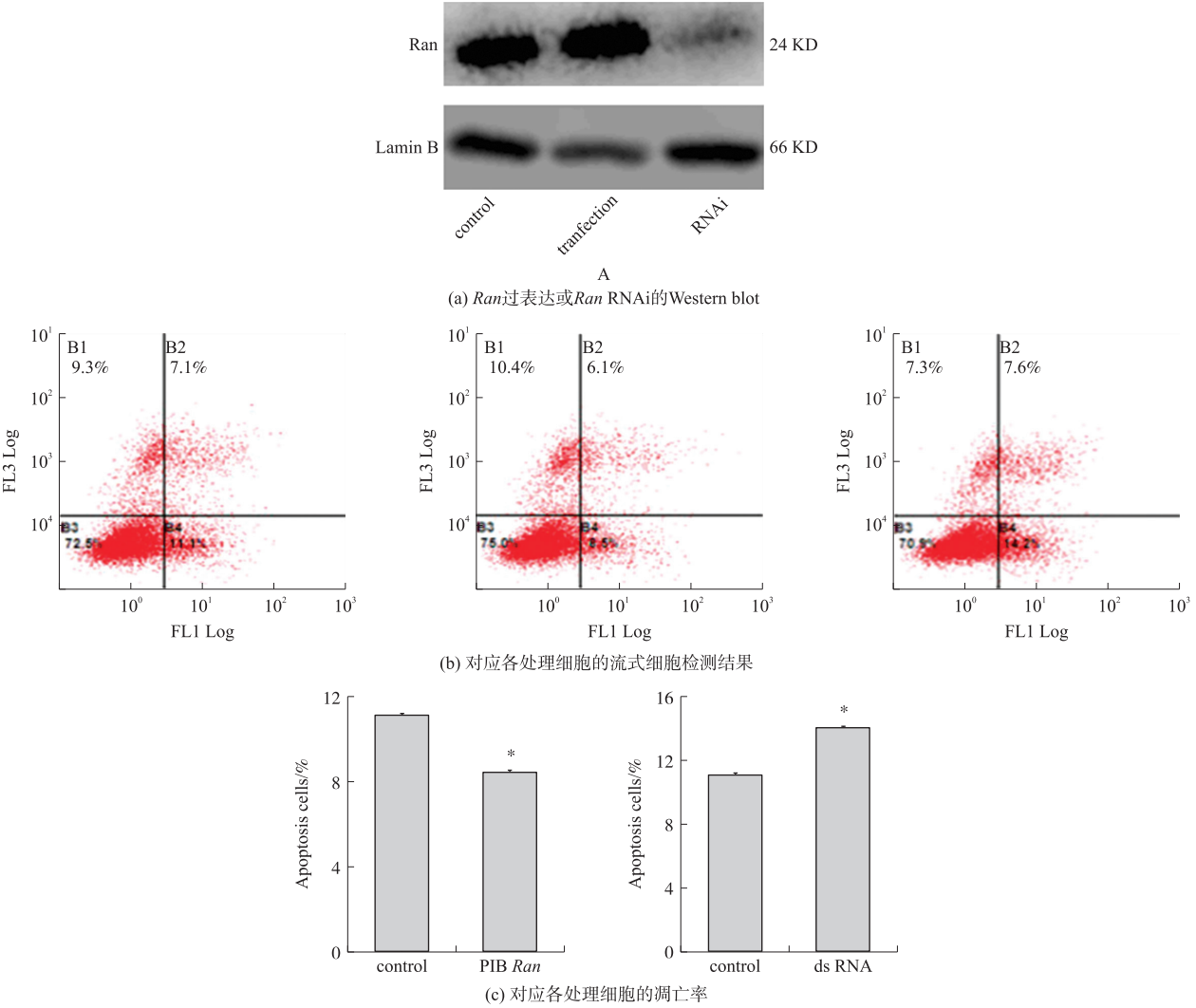


图3 *Ran*RNAi 或 *Ran* 过表达对细胞耐受水平的影响

Fig. 3 The effect of overexpression of *Ran* or *Ran*RNAi on cell tolerance

本研究通过采用 qRT-PCR 分析,发现基因 *Ran* 表达水平与 DDT 之间存在响应关系,这与溴氰菊酯的研究结果相似,进一步表明 *Ran* 是受杀虫剂诱导的基因. 这为深入研究有机氯类杀虫剂的作用机理和抗性新靶标的筛选奠定了研究基础. 至于 *Ran* 是否是杀虫剂耐受性调节网络中的关键因子以及如何触发下游抗性反应,需要进一步的研究证实. 本研究结果证实 *Ran* 对 Kc 细胞有一定的保护作用,参与昆虫对有机氯类杀虫剂的应激响应,但是其对于细胞的解毒作用机理仍有待更深入研究.

[参考文献]

[1] WANG T Y,LU Y L. Contamination of persistent organic pollutants(POPs)and relevant-management in China[J]. Environ-ment international,2005(31):813-821.

[2] 王守敏,冯建军. 有机氯农药污染、危害及防治[J]. 河北化工,1981(3):29-32.

[3] 史晓乐,王 亚. 浅谈环境中有机氯农药的残留现状[J]. 中国科技论文,2007,2(6):453-456.

[4] JIANG S Y,RAMACHANDRAN S. Comparative and evolutionary analysis of genes encoding small GTPases and their activa-ting proteins in eukaryotic genomes[J]. Physiological genomics,2006,24(3):235-251.

[5] JIANG Q,LU Z,ZHANG C. Role of Ran GTPase in cell cycle regulation[J]. Chinese science bulletin,2004,49(6):535-541.

[6] KHUPERKAR D,HELEN M,MAGRE I,et al. Inter-cellular transport of Ran GTPase[J]. Plos one,2015,10(4):e0125506.

[7] NACHURY M V,WEIS K. The direction of transport through the nuclear pore can be inverted[J]. Proceedings of the national

- academy of sciences of the United States of America, 1999, 96(17): 9 622–9 627.
- [8] TIAN Q, LIN Y, YANG M, et al. *DLRan3A* is involved in hormone, light, and abiotic stress responses in embryogenic callus of *Dimocarpus longan* Lour[J]. *Gene*, 2015, 569(2): 267–275.
- [9] LIU W, XU Q, CHI Q P, et al. Up-regulated expression of *Ran* reveals its potential role to deltamethrin stress in Kc cells[J]. *Gene*, 2016, 585(1): 1–7.
- [10] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [11] LALITHA S. Primer premier 5[J]. *Biotech software and internet report*, 2000, 1(6): 270–272.
- [12] CHI Q P, LI F L, LIU W, et al. Analysis of *UB* and *L40* resistance related to deltamethrin in *Drosophila* kc cells[J]. *Gene*, 2016, 575: 399–406.
- [13] MARY D. The Ran GTPase: theme and variations[J]. *Current biology*, 2002, 12(14): 502–508.
- [14] CLARKE P R, ZHANG C. Ran GTPase: a master regulator of nuclear structure and function during the eukaryotic cell division cycle? [J]. *Trends Cell Biol*, 2001, 11(9): 366.
- [15] CICIARELLO M, MANGIACASALE R, LAVIA P. Spatial control of mitosis by the GTPase Ran[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64(15): 1891–1914.
- [16] HELEN S S, PAUL R C. Cell biology: *Ran*, mitosis and the cancer connection[J]. *Current biology*, 2006, 16(12): 466–468.
- [17] PAUL R C, CHUAN M Z. Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase[J]. *Nat Rev Mol Cell*, 2008, 9(6): 464.
- [18] ABE H, KAMAI T, SHIRATAKI H, et al. High expression of Ran GTPase is associated with local invasion and metastasis of human clear cell renal cell carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2008, 122(10): 2391–2397.
- [19] CHATTERJEE M, PASCHAL B M. Disruption of the Ran system by cysteine oxidation of RCC1[J]. *Mol Biol Cell*, 2014, 35(3): 566–581.

[责任编辑:黄 敏]

(上接第82页)

- [2] YIN L, WEI G Y, CHEN J. Glutathione: a review on biotechnological production[J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2004, 66(3): 233–242.
- [3] 宋希文, 周治, 姚忠, 等. 固定化 γ -谷氨酰转肽酶催化合成 γ -L-谷氨酰-L-半胱氨酸[J]. *化学反应工程与工艺*, 2009, 25(5): 420–425.
- [4] NISHIUCHI H, SUEHIRO M, NISHIMURA Y. Method for producing gamma-glutamylcysteine: 日本, JP2004113155[P]. 2004–11–31.
- [5] NISHIUCHI H, SUGIMOTO R. Gamma-glutamylcysteine producing yeast: 中国台湾, TW264466B[P]. 2006–10–21.
- [6] 焦庆才, 钱绍松, 王先斌, 等. γ -L-谷氨酰-L-半胱氨酸的合成方法: 中国, CN1810769A[P]. 2006–01.
- [7] BRIDGE W J, ZARKA M H. Process for the production of γ -Glutamylcysteine: 澳大利亚, AU2006228996B[P]. 2006.
- [8] 吴明刚, 姚忠, 李松, 等. 化学酶法合成 γ -L-谷氨酰-L-半胱氨酸[J]. *现代化工*, 2008, 28(2): 338–341.
- [9] CLUDIO J, SUZUKI H, TOCHIKURA T. Excretion and rapid purification of γ -glutamyl transpeptidase from *Escherichia coli* K-12[J]. *Journal of fermentation and bioengineering*, 1991, 72(2): 125–127.
- [10] KEILLOR J W, CASTONGUAY R, LHERBET C. γ -Glutamyl transpeptidase substrate specificity and catalytic mechanism[J]. *Methods Enzymol*, 2005, 401(8): 449–467.
- [11] OKADA T, SUZUKI H, WADA K, et al. Crystal structures of gamma-glutamyl transpeptidase from *Escherichia coli*, a key enzyme in glutathione metabolism, and its reaction intermediate[J]. *Proceedings of the national academy of sciences*, 2006, 103(17): 6471–6476.

[责任编辑:黄 敏]