

突变型 PUMA(S10A)对 HeLa 细胞的凋亡作用及其分子机制

熊为国¹ 孙洁¹ 黄伟² 郑泽琪^{1,3}

摘要 目的 观察突变型 PUMA 和野生型 PUMA 对 HeLa 细胞在促凋亡及抑制肿瘤细胞增殖方面的生物学功能差异,并探讨导致这些差异的分子机制。方法 实验随机分为:空载体质粒组、野生型 PUMA 组、突变型 PUMA 3 个实验组,应用脂质体转染方法分别将空载体质粒、野生型 PUMA 质粒、突变型 PUMA 质粒转染 HeLa 细胞中,转染 24、48 h 后用实时定量 PCR 和 Western blot 法检测各组 PUMA 表达情况;野生型实验组和突变型实验组分别加入蛋白质合成抑制剂放线菌酮后,Western blot 法检测 PUMA 蛋白的表达;MTT 及流式细胞术检测野生型 PUMA 与突变型 PUMA 对细胞增殖抑制和促凋亡作用。结果 在相同转染效率的情况下,通过 Western blot 法分析野生型 PUMA 组和突变型 PUMA 组的表达水平,结果表明突变型 PUMA 蛋白比野生型 PUMA 蛋白有一个更高的稳定状态。转染 24 h 后诱导表达野生型和突变型的 PUMA 细胞中均加入放线菌酮,结果表明,突变型 PUMA 蛋白降解延迟、半衰期延长;光密度值测定结果显示细胞转染两种质粒后,细胞存活率随着时间的延长逐渐下降,且转染突变型 PUMA 质粒在 24、48 h 的存活率均比野生型 PUMA 组低($P < 0.05, P < 0.01$);流式细胞术结果显示,随着 PUMA 转染时间的增加,野生型和突变型两组肿瘤细胞的凋亡率均逐渐升高,并且突变型组细胞比野生型组细胞的凋亡率增加更加明显($P < 0.05, P < 0.01$)。结论 PUMA 具有抑制 HeLa 细胞增殖、促进其凋亡的作用,而其 10 号位的丝氨酸被丙氨酸取代后增加了突变型 PUMA 的稳定性、延长了其半衰期,导致突变型比野生型 PUMA 对 HeLa 细胞的抑制作用及促凋亡功能得到加强。

关键词 p53 上调凋亡调制物;定点突变;蛋白稳定性;细胞凋亡;HeLa 细胞

中图分类号 R 737.33;R 329.2;R 394.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)11-1553-05

p53 上调凋亡调制物(p53 up-regulated modulator of apoptosis, PUMA)蛋白属于 BCL-2 家族、促凋亡蛋白亚家族中的重要成员之一,最早由余健

2014-08-11 接收

基金项目:2012 年江西省教育厅课题(编号:CJJ12101)

作者单位:南昌大学第一附属医院¹ 心血管内科、³ 高血压病研究所,南昌 330006

² 江西省儿童医院检验科,南昌 330006

作者简介:熊为国,男,主治医师,硕士研究生;

郑泽琪,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:zeqizheng@126.com

等^[1-3]在直结肠癌细胞中发现,因能被 p53 强大快速诱导,并且能通过线粒体途径直接激活凋亡的基因,所以被称之为 PUMA。由于 PUMA 是细胞凋亡的主要介导者,具有强大的促凋亡能力,其转录体 PUMA- α 编码一个全长为 193 个氨基酸的蛋白,近年研究^[4]显示一个重要的蛋白突变点位:即蛋白 10 号位丝氨酸磷酸化位点。该研究主要通过 MTT、流式细胞术等方法比较突变型 PUMA 和野生型 PUMA 对 HeLa 细胞在抑制其增殖及促凋亡方面的生物学功能差异,并深入研究导致这些差异的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与质粒 野生型和突变型 pIRES2-EGFP-(HA)₂-PUMA 质粒由南昌大学医学院生物化学与分子生物教研室构建及赠与^[5];HeLa 细胞由本教研室保存。

1.1.2 主要试剂 质粒提取试剂盒、LipofectaminTM 2000、TRIzol 试剂均购自上海 Invitrogen 公司;1640 培养基及胎牛血清购自美国 Hyclone 公司;PUMA-C 末端抗体购自美国 CST 公司;PI、Hoechst 33342 染料购自美国 Sigma 公司;MTT、DMSO 购自美国 Ameresco 公司;感受态细胞 DH5 α 、逆转录试剂盒购自中国全式金公司。

1.2 方法

1.2.1 HeLa 细胞复苏及培养 从液氮中取出 HeLa 细胞,37℃水浴解冻后,迅速放入含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素的 1640 培养基中,放入 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,生长至 80% 以上密度时传代,转染前 1 d 更换无抗生素的 1640 培养基过夜。

1.2.2 野生型和突变型 pIRES2-EGFP-(HA)₂-PUMA 质粒测序 将两种质粒送上海英骏生物技术公司测序并进行 BLAST 比对。

1.2.3 实验分组及质粒转染 ① 空载体质粒组:空载体质粒 pIRES2-EGFP 转染 HeLa 细胞 24 h 或 48 h 实验组。② 24 h 野生型 PUMA 组:野生型 pIRES2-EGFP-(HA)₂-PUMA 转染 HeLa 细胞 24 h 实验组。③ 24 h 突变型 PUMA 组:突变型 pIRES2-EGFP-

(HA)₂-PUMA 转染 Hela 细胞 24 h 实验组。④ 48 h 野生型 PUMA 组:野生型 pIRES2-EGFP-(HA)₂-PUMA 转染 Hela 细胞 48 h 实验组。⑤ 48 h 突变型 PUMA 组:突变型 pIRES2-EGFP-(HA)₂-PUMA 转染 Hela 细胞 48 h 实验组。以上实验组按照 Invitrogen 公司提供的 LipofectamineTM 2000 转染 protocol 操作,以脂质体(μl):DNA(μg)=3:1 比例转染 Hela 细胞。

1.2.4 实时定量 PCR 检测各组细胞 PUMA 的转录

总 RNA 的抽提采用 Invitrogen 公司的 TRIzol Reagent 根据说明书操作,紫外分光光度仪检测总 RNA 浓度 A_{260}/A_{280} 为 1.79~2.00,并计算 RNA 含量,所提取 RNA 于 -80 ℃ 保存备用。制备 PUMA 和 β-actin 的荧光定量 PCR 标准曲线,采用 Light Cycler RealTime PCR 扩增仪进行反应,制作融解曲线,确定扩增产物的特异性。分别测定每个样品野生型 PUMA、突变型 PUMA、β-actin mRNA 的 CT 值,每个样品均作复管以减少操作误差。采用相对定量方式表示各样品目的基因的 ΔCT,再根据 ΔΔCT 计算 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 。 $\Delta CT = \text{目的基因 } CT - \text{内参基因 } CT$, $\Delta\Delta CT = \text{目的基因 } \Delta CT - \text{内参基因 } \Delta CT$ 。扩增条件为:95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 10 s,58 ℃ 退火 15 s,72 ℃ 延伸 10 s A0 个循环后,72 ℃ 延伸 10 min。GenBank 中查找目的基因序列,用 Primer Premier 5.0 软件设计引物序列,由英骏公司合成。PUMA 上游引物:5'-GCAGGGAGGAGGAACAGT-3',下游引物:5'-TGTGGCCCTGGG TAAGG-3';β-actin 上游引物:5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3',下游引物:5'-CTCCTTAATGTCACGCCACGAT-3'。

1.2.5 Western blot 法检测细胞中突变型、野生型 PUMA 蛋白的表达 转染后 Hela 细胞置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 24、48 h 提取蛋白裂解液,测定蛋白浓度,Western blot 法分别检测突变型与野生型 PUMA 在细胞中的表达。

1.2.6 Western blot 法检测细胞中突变型、野生型 PUMA 蛋白的降解 将 1 g 放线菌酮溶解于 10 ml DMSO 将其配制成 100 mg/ml 母液,在转染突变型、野生型 PUMA 质粒 24 h 后的 Hela 细胞中均加入 100 mg/ml 母液使其终浓度为 10~20 μg/ml,继续培养,分别于 0、6、12、24、48 h 后使用 Western blot 法检测突变型、野生型 PUMA 蛋白的降解情况。

1.2.7 MTT 比色法检测各组细胞增殖的抑制情况

转染后 24、48 h,96 孔培养板各组的每孔分别加入 MTT 溶液 20 μl(终浓度 0.5 mg/ml),37 ℃ 继续

孵育 4 h,弃尽板中的培养液,加入 150 μl DMSO 振荡 10 min,用酶标仪检测 570 nm 波长处各孔的吸光度(OD)值。同时设置不加细胞的调零孔(培养基、MTT、DMSO)。以每组 6 个孔(OD 值 - 空白对照组 OD 值)的平均值作为各组的平均 OD 值。细胞生长抑制率(%)=(1-转染组 OD 值/细胞对照组 OD 值)×100%。

1.2.8 Annexin V-FITC/PI 双标记法检测各组细胞凋亡 收集转染后 24、48 h 细胞,进行 Annexin V 检测。将细胞悬浮于结合缓冲液中,调整浓度为 $2.5 \times 10^5/\text{ml}$,与 FITC 标记的 Annexin V 混合,室温孵育 10 min 后,1 000 r/min 离心 10 min,PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次,缓冲液重悬细胞,PI 染色,上机测试分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 11.5 统计软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间差异比较用单因素方差分析,各组组间比较用 LSD 法。

2 结果

2.1 野生型、突变型 pIRES2-EGFP-(HA)₂-PUMA 质粒测序结果 野生型 pIRES2-EGFP-(HA)₂-PUMA 质粒测序后在线比对,结果显示 PUMA 全基因序列碱基完全正确,而突变型 pIRES2-EGFP-(HA)₂-PUMA 质粒测序结果显示:第 28~30 位碱基由 TCC 突变为 CCC,其他碱基均无突变,见图 1。

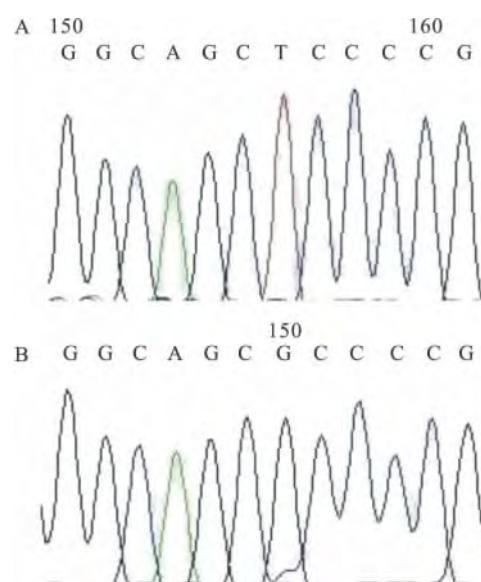


图 1 野生型和突变型 PUMA 质粒的测序结果比较

A:野生型;B:突变型

2.2 实时定量 PCR 检测突变型 PUMA 质粒与野

生型 PUMA 质粒的转染、转录效率 结果显示:突变型 PUMA 与野生型 PUMA 转染 24 h 后,实时定量 PCR 检测野生型 PUMA 24 h 过表达量相对于空载体质粒 $\Delta\Delta CT$ 为 -9.999,而突变型 PUMA 24 h 过表达量相对于空载体质粒 $\Delta\Delta CT$ 为 -9.869;野生型 PUMA 48 h 过表达量相对于空载体质粒 $\Delta\Delta CT$ 为 -13.880,而突变型 PUMA 48 h 过表达量相对于空载体质粒 $\Delta\Delta CT$ 为 -15.082。实验表明突变型 PUMA 质粒与野生型 PUMA 质粒转染、转录效率一致。见表 1。PCR 检测显示在相同转染率的情况下,突变型 PUMA 质粒与野生型 PUMA 质粒的转录效率相同,因此,PUMA 质粒并没因为该基因的第 28 号碱基发生突变其转录效率发生改变,提示突变型 PUMA 蛋白表达升高可能是因为突变型 PUMA 蛋白稳定性较野生型 PUMA 蛋白的稳定性高,见图 2。

表 1 各实验组 CT 值

样本	CT ₁	CT ₂	CT ₃	CT	ΔCT	$\Delta\Delta CT$
				平均值	平均值	0
空载体质粒	30.83	31.32	31.49	31.21	17.234	0
24 h 野生型 PUMA 质粒	20.97	21.37	22.19	21.51	7.235	-9.999
24 h 突变型 PUMA 质粒	21.41	21.34	21.88	21.54	7.366	-9.869
48 h 野生型 PUMA 质粒	20.82	20.51	20.77	20.70	3.355	-13.880
48 h 突变型 PUMA 质粒	20.86	20.95	20.92	20.91	2.151	-15.082

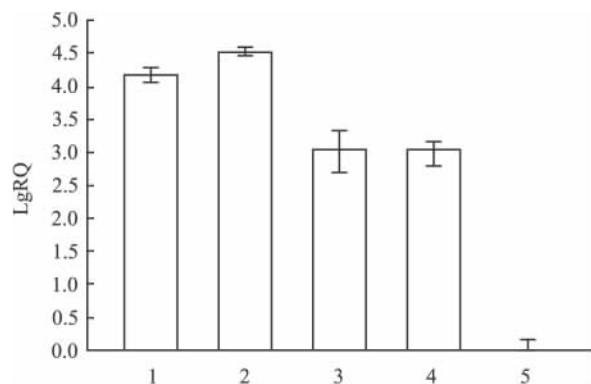


图 2 突变型与野生型 PUMA 质粒的实时定量 PCR 结果

1: 48 h 野生型 PUMA 质粒组;2: 48 h 突变型 PUMA 质粒组;3: 24 h 野生型 PUMA 质粒组;4: 24 h 突变型 PUMA 质粒组;5: 空载体质粒组

2.3 Western blot 法检测突变型与野生型 PUMA 蛋白表达情况 突变型 PUMA 质粒转染 HeLa 细胞 24 h 后表达较野生型 PUMA 质粒组表达量升高 ($P < 0.05$) 48 h 后更明显 ($P < 0.05$)。之前,PCR 检测发现在相同转染率的情况下,突变型 PUMA 质粒与野生型 PUMA 质粒的转录效率相同,因此,PUMA 质粒并没因为该基因的第 28 号碱基发生突变其转

录效率发生改变,这表明突变型 PUMA 蛋白表达升高可能是因为突变型 PUMA 蛋白稳定性较野生型 PUMA 蛋白的稳定性高,见图 3。

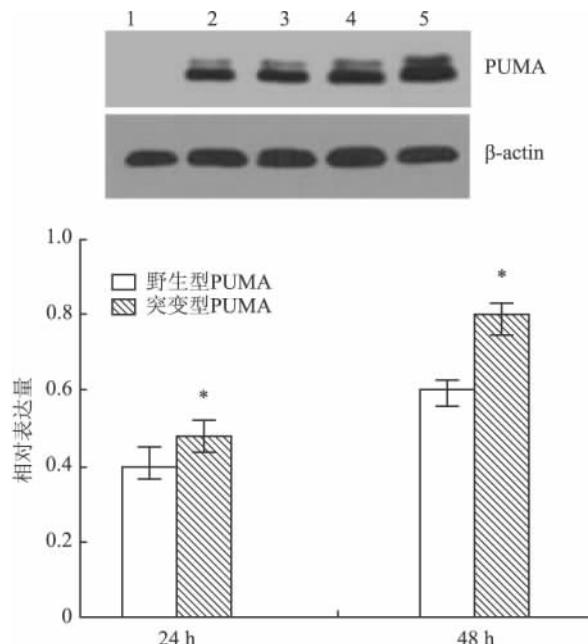


图 3 Western blot 法检测突变型与野生型 PUMA 蛋白表达情况

1: 空载体质粒组;2: 24 h 野生型 PUMA 质粒组;3: 24 h 突变型 PUMA 质粒组;4: 48 h 野生型 PUMA 质粒组;5: 48 h 突变型 PUMA 质粒组;与野生型比较: * $P < 0.05$

2.4 Western blot 检测突变型与野生型 PUMA 蛋白降解情况 突变型 PUMA 蛋白较野生型 PUMA 蛋白降解速度延迟,见图 4,表明突变型 PUMA 蛋白比野生型 PUMA 蛋白稳定性更强。由于改变了 PUMA 蛋白的磷酸化位点,导致 PUMA 蛋白的磷酸化程度下降进而导致 PUMA 蛋白的降解速率减慢,而这种降解的减慢很有可能是由于蛋白泛素化程度降低所致。

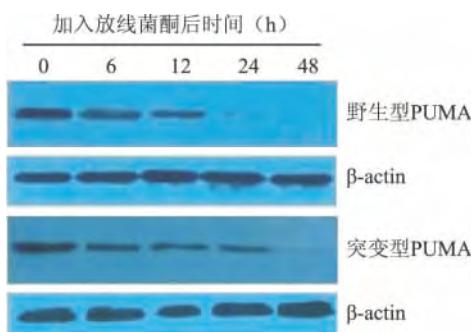


图 4 突变型与野生型 PUMA 蛋白降解情况

2.5 MTT 检测 HeLa 细胞存活率 结果显示:细胞

转染两种质粒后,细胞存活率随着时间的延长逐渐下降,且转染突变型 PUMA 质粒在 24、48 h 的存活率均比野生型 PUMA 质粒组低,见表 2、图 5,表明突变型 PUMA 蛋白由于其稳定性较野生型 PUMA 更强导致其抑制细胞增殖作用明显增加。

表 2 突变型 PUMA 与野生型 PUMA 对 HeLa 细胞 OD 值的影响($n=5 \bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h
空载体质粒	0.763 ± 0.026	0.951 ± 0.033
野生型 PUMA	$0.481 \pm 0.072^*$	$0.493 \pm 0.069^*$
突变型 PUMA	$0.395 \pm 0.065^{*\#}$	$0.341 \pm 0.062^{*\#}$

与空载体质粒组比较:^{*} $P < 0.05$;与野生型 PUMA 组比较:[#] $P < 0.05$

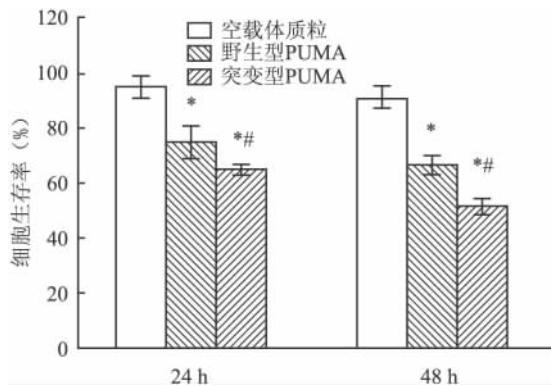


图 5 突变型与野生型 PUMA 抑制 HeLa 细胞增殖柱状图

2.6 流式细胞术检测 PUMA 过表达诱导 HeLa 细胞凋亡 转染野生型 24 h 组凋亡率为 ($16.8 \pm 2.1\%$) 和突变型 24 h 组凋亡率为 ($21.5 \pm 2.7\%$), 高于转染空载体质粒组的 ($9.7 \pm 1.9\%$), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而转染野生型 48 h 组凋亡率为 ($26.7 \pm 2.0\%$) 和突变型 48 h 组凋亡率为 ($32.5 \pm 1.9\%$), 高于转染空载体质粒组的 ($12.5 \pm 0.8\%$), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示突变型 PUMA 的促凋亡能力较野生型强, 见图 6。

3 讨论

本研究在突变型 PUMA 质粒与野生型 PUMA 质粒的转录效率基本一致情况下, 通过 MTT 实验显示: HeLa 细胞转染两种质粒后, 细胞存活率随着时间的延长逐渐下降, 且转染突变型 PUMA 质粒在 24、48 h 的存活率均比野生型 PUMA 质粒组低, 这表明了突变型 PUMA 蛋白由于其稳定性较野生型 PUMA 更强导致其抑制细胞增殖作用明显增加。流式细胞术结果显示, 随着 PUMA 转染时间的增加,

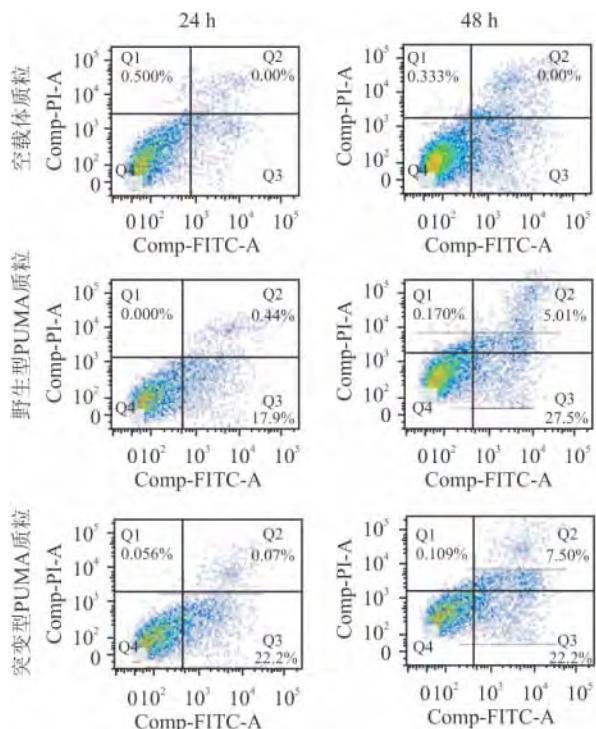


图 6 流式细胞术检测各组 HeLa 细胞凋亡结果

野生型和突变型两组肿瘤细胞的凋亡率均逐渐升高, 并且突变型组细胞比野生型组细胞的凋亡率增加更加明显, 表明突变型 PUMA 对 HeLa 细胞促凋亡作用强于野生型 PUMA。通过 Western blot 实验显示: 突变型 PUMA 蛋白比野生型 PUMA 蛋白有一个更高的稳定状态, 而突变型 PUMA 蛋白比野生型 PUMA 蛋白半衰期更长。

较早之前, PUMA 研究多集中在转录水平的调控, 主要通过一些如 p53 和非 p53 转录因子(如 p73、E2F1 和 FOXO3a)上调其表达水平^[6]。这些因素包括: 基因毒性应激、癌基因应激、血清饥饿/细胞因子/生长因子撤离应激、内质网应激、缺血/再灌注等。而近年发现该蛋白存在翻译后调节即蛋白磷酸化调节。Fricker et al^[4] 研究发现 PUMA 磷酸化位点位于 10、96、106 位的丝氨酸, 其中 10 号位点的丝氨酸是主要的磷酸化位点。当 PUMA 的 10 号位点的丝氨酸被磷酸化后可以促进其降解, 其促凋亡作用减弱。

随着对突变型 PUMA 研究的不断深入, 进一步研究 PUMA 在蛋白酶降解过程中的机制, 如 PUMA 翻译后调节是否存在磷酸化修饰及泛素化修饰双调控? 进一步阐明 PUMA 翻译后磷酸化修饰调控机制, 试图寻找调节 PUMA 蛋白磷酸化相应的细胞信号转导, 便可以使用相应的磷酸激酶抑制剂增强肿瘤细胞凋亡,

为肿瘤治疗找到一个新的治疗靶点。最后,也将对PUMA其他的磷酸化位点进行深入研究。

参考文献

- [1] Yu J ,Zhang L ,H Wang P M ,et al. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells [J]. *Mol Cell* ,2001 ,7(3) : 673 - 82.
- [2] Nakano K , Vousden K H. PUMA , a novel proapoptotic gene , is induced by p53 [J]. *Mol Cell* ,2001 ,7(3) : 683 - 94.
- [3] Han J , Flemington C , Houghton A B , et al. Expression of Bbc3 , a pro-apoptotic BH3-only gene , is regulated by diverse cell death and survival signals [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* ,2001 ,98 (20) :11318 - 23.
- [4] Fricker M ,Prey O J ,Tolkovsky A M ,et al. Phosphorylation of puma modulates its apoptotic function by regulating protein stability [J]. *Cell Death Dis* 2010 ,1: e59.
- [5] 黄伟,万福生.突变型PUMA质粒的构建及表达[J].安徽医科大学学报 2013,48(4):341-5.
- [6] Yu J ,Zhang L. PUMA ,a potent killer with or without p53 [J]. *Oncogene* 2008 ,27 suppl1:S71 - 83.

Mutant type PUMA can accelerate the apoptosis of Hela cells *in vitro* and its molecular mechanism

Xiong Weiguo¹ , Sun Jie¹ , Huang Wei² , et al

(¹ Dept of Cardiology ,The First Affiliated Hospital of Nanchang University ,Nanchang 330006;

²Clinical Laboratory ,Children's Hospital in Jiangxi Province ,Nanchang 330006)

Abstract Objective To investigate the differences of wild type PUMA protein mutant PUMA protein in apoptosis and proliferation inhibition function and to explore the molecular mechanism of these differences ,which may pave the way for further study on tumor suppressor function of PUMA and its post-translational regulation on mechanism.

Methods Hela cells were divided into 3 groups: wild type PUMA transfection group ,mutant PUMA transfection group ,and the empty vector control group. After transfection 24 h and 48 h the expression of PUMA was detected by Western blot and qPCR. The cellular proliferation inhibition was examined by MTT. The cellular apoptosis rates were examined by FCM. Wild type group and mutant group after joining protein synthesis inhibitors cycloheximide ,degradation of PUMA protein were detected by Western blot ,respectively. **Results** We analyzed the expression levels of wild type PUMA and mutant PUMA by Western blot. This revealed that mutant PUMA was expressed at a higher steady state level than wild type PUMA in the same under the condition of transfection efficiency. Cells expressing wild type PUMA and mutant PUMA were treated with cycloheximide and we then tested wild type PUMA and mutant PUMA protein degradation. This assay revealed that degradation of mutant PUMA protein delayed degradation and prolonged the half life. After mutant PUMA and WT plasmids cell transfection ,the OD value results displayed certain degree proliferation inhibitory effect in a time-dependent manner Hela cells ,and transfected with mutant PUMA was significantly lower than that after being transfected with WT at the 24 h and 48 h time point. There was significant difference ($P < 0.05$, $P < 0.01$). FCM results showed that with the increase of transfection time ,wild type and mutant of two groups of tumor cell apoptosis rate increased ,and the mutant type group cell apoptosis rate increased more obviously ,the difference was statistically significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion**

PUMA can inhibit Hela cells proliferation and promote its apoptosis. 10 of serine was replaced by alanine can increase the stability of mutant PUMA ,prolong its half-life ,which results in inhibition and pro-apoptotic function strengthened in the mutant than wild type PUMA on Hela cells.

Key words p53 up-regulated modulator of apoptosis; site-directed mutagenesis; protein stability; apoptosis; Hela cells