

# 肝癌抑制基因-1 转运功能区的研究

周 华<sup>1</sup>, 刘 鸿<sup>2</sup>, 赵新泰<sup>3</sup>, 周秀梅<sup>1</sup>

(1. 浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018; 2. 浙江大学医学院, 杭州 310058; 3. 上海市肿瘤研究所, 上海 200032)

**摘 要:** 肝癌抑制基因-1(hepatocellular carcinoma suppressor 1, HCCS1)是一种潜在的肝癌抑制基因,在细胞内发挥蛋白分拣运输的作用,其抑癌作用有可能与蛋白转运的功能有一定的关系。本研究旨在寻找 HCCS1 序列中与转运功能相关的序列区域。首先通过亚克隆技术,构建以 pEGFP-C2 为载体,对不同长度 HCCS1-cDNA 片段进行亚克隆,将构建的亚克隆转染到 HeLa 细胞,通过免疫荧光显微镜观察不同长度 HCCS1 蛋白在细胞内的分布,及其与 6-磷酸甘露糖受体(M6PR)的共定位。经过 PCR 及亚克隆后,目的片段成功插入载体质粒,构建了以 pEGFP-C2 为载体的含有 4 个不同长度 HCCS1 片段的亚克隆。分别是: pEGFP-C2-N1836, pEGFP-C2-N1572, pEGFP-C2-1707 和 pEGFP-C2-1506,其中 pEGFP-C2-N1836 和 pEGFP-C2-N1572 编码的 HCCS1 蛋白,长度不同均呈颗粒状、极性分布于核周的胞质内,且与 M6PR 有共定位;而 pEGFP-C2-1707 片段编码的 HCCS1 蛋白虽然也呈颗粒状分布于核周,但极性分布消失,且与 M6PR 共定位消失; pEGFP-C2-1506 与 pEGFP-C2-1707 结果相似。结果显示了 HCCS1-cDNA 的 5'端的 129 bp 序列为与 HCCS1 的极性及 M6PR 共定位相关的区域。

**关键词:** 肝癌抑制基因; 功能序列; 免疫荧光; 转运

**中图分类号:** Q789 **文献标识码:** A

## 0 引 言

肝癌抑制基因-1(HCCS1)是由上海市肿瘤研究所细胞与分子免疫学实验室发现的一种潜在的肝癌抑制基因,共有 18 个外显子,其 cDNA 全长约为 2.1 kb。研究显示, HCCS1 在肝癌组织中存在高频突变,而且表达水平明显低于癌旁组织,其在体内和体外均可抑制肝癌细胞的生长<sup>[1-2]</sup>。而最新的研究发现其在细胞内蛋白分拣运输中也发挥重要作用<sup>[3]</sup>。孔伟等<sup>[4]</sup>通过研究确定了 HCCS1-cDNA 1 572 bp 片段的 3'端 451 bp 的序列为与 HCCS1 转运功能相关的最小区域范围,但是有关与 HCCS1 转运相关的 5'端功能序列位点的确立,迄今未见报道。本实验构建了以 pEGFP-C2 为载体的一系列含有不同长度 HCCS1 片段的亚克隆,通过免疫荧光观察其与 M6PR 的共定位情况,初步确定了 HCCS1 与转运 M6PR 相关的 5'端功能序列,为进一步研究 HCCS1 基因的功能奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料及主要试剂

带有 HCCS1-cDNA 全长序列的重组质粒 pEGFP-C2-HCCS1 由上海肿瘤研究所赵新泰研究员惠赠,其表达框内含有 EGFP 和 HCCS1 的融合基因,长度为 2 100 bp。 *E. coli* 菌株 DH5 $\alpha$  为本组保存。人子宫颈癌 HeLa 细胞株,来源于中科院上海细胞库。

收稿日期: 2010-04-02

基金项目: 国家自然科学基金(30623033)

作者简介: 周 华(1981-),女,山东青岛人,硕士研究生,主要从事癌症的基因-病毒治疗。

通讯作者: 周秀梅,电子邮箱: zhouxiumei824@163.com

常规限制性内切酶、T4 DNA 连接酶及碱性磷酸酶为 TaKaRa 公司产品;Taq 酶购自 Fermentas 公司;KOD-PLUS 购自 TOYOBO 公司。DNA 凝胶回收试剂盒购自捷瑞公司。DMEM、FBS 购自 GibcoBRL 公司;Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司;抗 M6PR 单克隆抗体购自 Abcam 公司;Cy3 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司;引物合成和基因测序由上海桑尼生物技术有限公司完成。

1.2 方法

以 pEGFP-C2 载体为基础,构建 HCCS1-cDNA 从 5'端和 3'端缺失的系列质粒,试图合成的 HCCS1 小片段见图 1,所用的 PCR 引物 A、B、C、D 也在图 1 中加以标注。

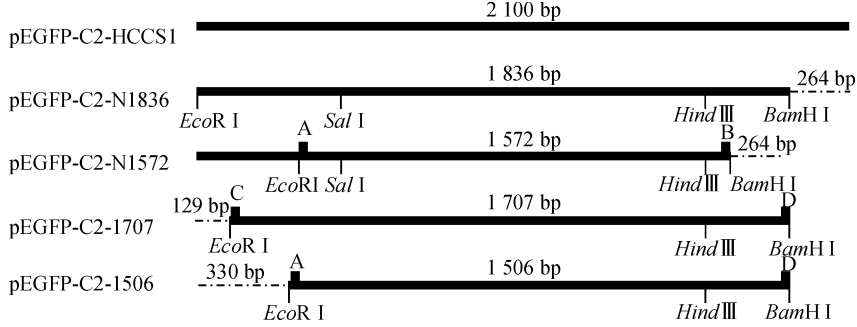


图 1 构建亚克隆表达区结构示意

用于构建质粒 pEGFP-C2-N1572, pEGFP-C2-HCCS1-1707 和 pEGFP-C2-1506 的引物分别命名为 A、B、C、D,划线处为 *EcoR* I 或 *BamH* I 酶切位点:

- A: 5'-CCCGAATTCATCAAAGATATCAAAGACAA-3' *EcoR* I;
- B: 5'-CCCGGATCCCTAACTGCTGGTTGTGGTTTT-3' *BamH* I;
- C: 5'-CCCGAATTCGCTGTTGAGTATATCAATAC-3' *EcoR* I;
- D: 5'-CCCGGATCCAAACTCAATGGTGATGGTGA-3' *BamH* I。

1.2.1 质粒 pEGFP-C2-N1836 的构建

以带有 HCCS1-cDNA 全长的重组质粒 pEGFP-C2-HCCS1 为模板,通过 *EcoR* I 和 *BamH* I 双酶切回收得到的片段,与通过 *EcoR* I 和 *BamH* I 双酶切载体 pEGFP-C2 回收得到的大片段相连接,转化 DH5a 感受态细菌,涂布 Kan 抗性的 LB 板,37℃培养过夜,接种于 5 mL 的含 Kan 的 LB 液体培养基中,挑取单克隆,37℃,220 r/min 培养过夜,收集菌体,提取质粒,经酶切和测序鉴定正确后命名为 pEGFP-C2-N1836。

1.2.2 质粒 pEGFP-C2-N1572 的构建

以 pEGFP-C2-N1836 作为模板,由 A 和 B 分别为上下游引物,用 KOD-plus PCR 扩增 331-1572 片段,含 *Sal* I 位点,用 *Sal* I 和 *BamH* I 双酶切回收后得到的片段,与同样用 *Sal* I 和 *BamH* I 双酶切的 pEGFP-C2-N1836 回收得到的大片段载体相连接,转化 DH5a 感受态细菌,涂布 Kan 抗性的 LB 板,37℃培养过夜,接种于 5 mL 的含 Kan 的 LB 液体培养基中,挑取单克隆,37℃,220 r/min 培养过夜,收集菌体,提取质粒,经酶切和测序鉴定正确后命名为 pEGFP-C2-N1572。

1.2.3 质粒 pEGFP-C2-1707 的构建

先以 pEGFP-C2-N1836 作为模板,由 C 和 D 为上下游引物,用 KOD-plus PCR 扩增 1707 片段,*EcoR* I 和 *BamH* I 双酶切回收得到的片段,与同样用 *EcoR* I 和 *BamH* I 双酶切 pEGFP-C2-1836 回收得到的大片段载体相连接,转化 DH5a 感受态,涂布 Kan 抗性的 LB 板,37℃培养过夜,接种于 5 mL 的含 Kan 的 LB 液体培养基中,挑取单克隆,37℃,220 r/min 培养过夜,收集菌体,提取质粒,经酶切和测序鉴定正确后命名为 pEGFP-C2-1707。

1.2.4 质粒 pEGFP-C2-1506 的构建

以 pEGFP-C2-N1836 作为模板,由 A 和 D 为上下游引物,用 KOD-plus PCR 扩增 1506 片段,*EcoR* I 和 *BamH* I 双酶切回收得到的片段,与同样用 *EcoR* I 和 *BamH* I 双酶切的 pEGFP-C2-N1836 回收得到的大片段载体相连接,转化 DH5a 感受态,涂布 Kan 抗性的 LB 板,37℃培养过夜,接种于 5 mL 的含 Kan 的 LB 液体培养基中,挑取单克隆,37℃,220 r/min 培养过夜,收集菌体,提取质粒,经酶切和测序鉴定正确后命名为

pEGFP-C2-1506。

1. 2. 5 免疫荧光显微镜观察不同长度 HCCS1 蛋白的分布

转染前 24 h,将处于对数生长期的 HeLa 细胞以  $2\times 10^5$ /孔接种于置有盖玻片的 24 孔板中,每孔加入 1 mL 不含抗生素的 10% FBS DMEM 培养液,待细胞生长密度达 90% ~95% 时进行转染。操作严格按照 Lipofectamine2000 说明书进行。转染 24 h 后,用无血清培养液清洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 30 min,然后 PBS (pH 7. 2)轻轻洗涤 3 次,每次 5 min。最后取出盖玻片,用 DAPI 复染 1 min,然后通过免疫荧光显微镜(日本,Nikon)进行观察。

1. 2. 6 免疫荧光显微镜观察不同长度 HCCS1 蛋白与 M6PR 的共定位

同上转染 24 h 后,无血清培养液清洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS(pH 7. 2)轻轻洗涤 3 次,每次 5 min。然后,取出盖玻片,用 0. 25% Triton X-100 室温处理 20 min,再用含 1% 牛血清白蛋白室温封闭 30 min,抗 M6PR 单克隆抗体(1 : 50)4℃温育过夜,Cy3 标记的羊抗鼠 IgG(1 : 1 000),于 37℃反应 1 h,最后用 DAPI 复染 1 min。各步骤之间用 PBS(pH7. 2)轻轻洗涤 3 次,每次 5 min。免疫荧光显微镜观察同上。

2 结 果

2. 1 HCCS1 不同片段长度的亚克隆构建及其长度的电泳鉴定

用 pEGFP-C2 载体,笔者构建了 HCCS1-cDNA 从 5'端和 3'端缺失的系列质粒,其插入的 cDNA 片段长度如图 1 所示,根据图 2 所示,*Hind*Ⅲ有两个位点,一个位于载体中,靠近 HCCS1 片段的 N 端,即靠近 1836 的第一个 *Eco* RI 酶切位点(见图 2),一个在 HCCS1 不同片段的 C 端,位于 1 357 bp 处,故可用 *Hind* Ⅲ酶切鉴定质粒构建是否正确,对 pEGFP-C2-N1836 理论可得 1 132 bp 和 5 493 bp 条带;对 pEGFP-C2-1707 理论可得 1 003 bp 和 5 493 bp 条带;对 pEGFP-C2-1506 理论可得 802 bp 和 5 493 bp 条带;对 pEGFP-C2-N1572 理论可得 1 132 bp 和 5 153 bp 条带。结果如图 3 所示,条带大小与预期相符,说明质粒构建正确。

2. 2 HCCS1 不同片段长度蛋白在 HeLa 细胞内的定位

4 种质粒转染 HeLa 细胞瞬时表达,24 h 后固定细胞,于免疫荧光显微镜下观察各种 HCCS1 不同长度片段编码的蛋白在 HeLa 细胞内的定位。pEGFP-C2-N1836, pEGFP-C2-N1572 和 pEGFP-C2-1707 蛋白呈颗粒状分布于核周的胞质内,其中 pEGFP-C2-N1836 和 pEGFP-C2-N1572 编码的不同长度 HCCS1 蛋白均呈颗粒状、极性分布于核周的胞质内;而 pEGFP-C2-1707 片段编码的 HCCS1 蛋白虽然也呈颗粒状分布于核周,但极性分布消失; pEGFP-C2-1506 蛋白极性分布也消失。如图 4 所示。

2. 3 HCCS1 不同片段长度编码的蛋白与 M6PR 的共定位

经免疫荧光实验观察了 HCCS1 cDNA 从片段 5'端和 3'端缺失的系列质粒编码的不同长度 HCCS1 蛋白与 M6PR 的共定位情况,以明确 HCCS1 具体的功能序列位点。pEGFP-C2-N1836, pEGFP-C2-N1572 和 pEGFP-C2-1707 蛋白呈颗粒状分布于核周的胞质内,其中 pEGFP-C2-N1836 和 pEGFP-C2-N1572 编码的不同长度 HCCS1 蛋白均呈颗粒状、极性分布于核周的胞质内,且与 M6PR 有共定位;而 pEGFP-C2-

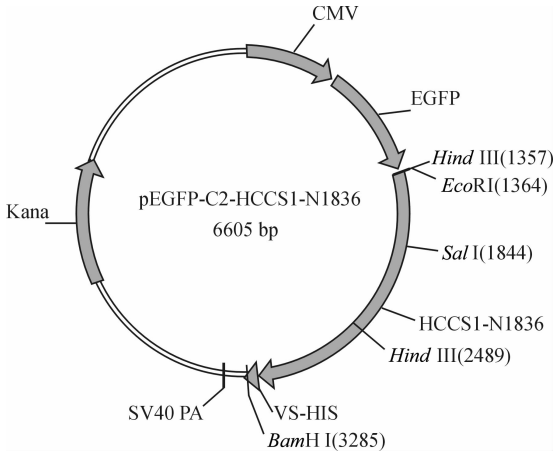
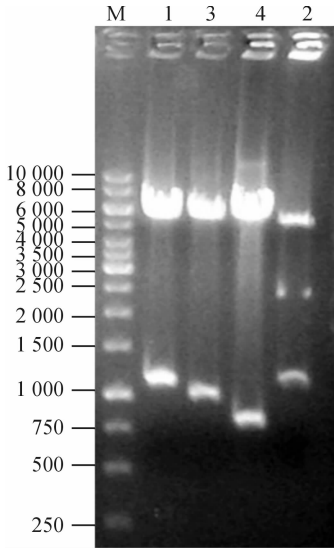


图 2 pEGFP-C2-N1836 质粒结构示意图

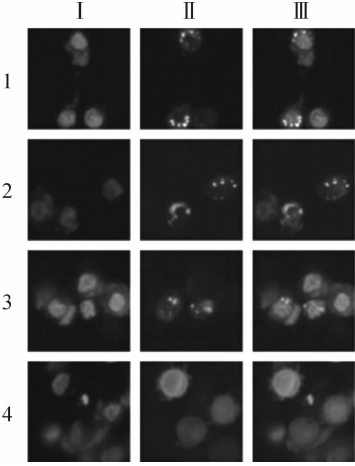


M:marker; 1:pEGFP-C2-N1836(1 132 bp+5 493 bp); 2:pEGFP-C2-N1572(1 132 bp+5 153 bp); 3:pEGFP-C2-1707 (1 003 bp+5 493 bp); 4:pEGFP-C2-1506(802 bp+5 493 bp)

图 3 酶切鉴定

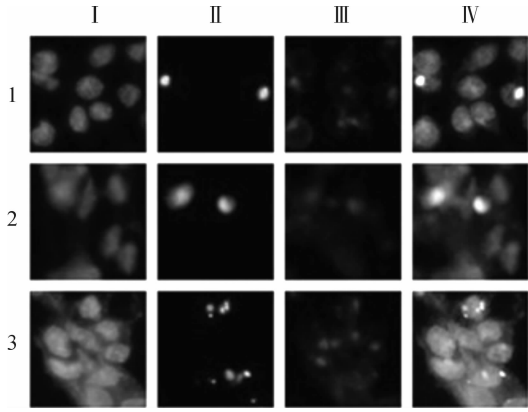
1707 片段编码的 HCCS1 蛋白虽然也呈颗粒状分布于核周,但极性分布消失,且与 M6PR 共定位消失,如图 5 所示。

因此,HCCS1 5'端 129 bp 非常重要,它的缺失将使蛋白的极性分布消失,同时与 M6PR 的共定位也消失。



I :DAPI blue; II :EGFP-HCCS1 green; III :Overlay;  
1: pEGFP-C2-N1836; 2: pEGFP-C2-N1572; 3: pEGFP-C2-1707;  
4: pEGFP-C2-1506

图 4 不同片段长度 HCCS1 蛋白在 HeLa 细胞内的定位(×400)



I :DAPI blue; II :EGFP-HCCS1 green; III :Anti-M6PR red;  
IV :Overlay

1: pEGFP-C2-N1836; 2: pEGFP-C2-N1572; 3: pEGFP-C2-1707

图 5 不同片段长度 HCCS1 蛋白与 M6PR 的共定位  
(×400)

3 讨 论

肝细胞癌(HCC)是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,尤其在亚洲和非洲地区最为严重,而且与其他癌症相比预后更差。在以往的研究<sup>[5-6]</sup>中发现在肝癌组织中,染色体 17p13. 3 区域存在着高频杂合性缺失(LOH)。赵新泰等<sup>[2]</sup>通过对肝癌细胞染色体该区域杂合性缺失的精确分析,确定了染色体 17p13. 3 区在肝癌细胞中的最小热点缺失范围并从中发现了 13 个与 HCC 发生发展相关的新基因。通过对这些基因进行分析后发现,HCCS1 是其中一个可能的抑癌基因。通过序列比对发现 HCCS1 是酵母 Vps53 的同源基因,在酵母中,它的表达产物和另外两个 Vps 系列蛋白 Vps52 和 Vps54 以 1 : 1 : 1 的形式形成复合体 GARP 称为高尔基体相关逆向转运复合体。近年来,随着国内外研究的广泛深入,国外的一些报道<sup>[7-11]</sup>从不同角度研究了酵母中 GARP 的形成和功能,发现它的主要定位存在于转运小泡,能特异地介导转运小泡和高尔基体的融合,将早期及晚期内涵体中的蛋白逆向运输到高尔基体中。通过免疫荧光共聚焦的研究发现<sup>[3]</sup>,在这些被转运的蛋白中主要包括了溶酶体水解酶,而这些溶酶体水解酶是通过依赖 M6PR (Mannose-6-Phosphate Receptor) 的途径转运至溶酶体,即新合成的溶酶体酶在高尔基复合体加上溶酶体酶标记 M6P (Mannose-6-Phosphate) 成为成熟溶酶体后,和高尔基体 trans 面中的 M6PR 结合。而 M6PR 从内涵体向高尔基体的逆向转运过程促进了其循环利用,从而减少了损耗,进一步增强了部分溶酶体水解酶的运输以及形成溶酶体,在酵母的研究中发现,GARP 的突变将导致酵母溶酶体水解酶的定位错误<sup>[5]</sup>和溶酶体水解酶的分泌,进而影响溶酶体的功能。在研究无脊椎动物的基础上发现,在哺乳动物细胞中 HCCS1 有可能影响 M6PR 在细胞内的含量以及分布,从而影响 M6PR 转运部分溶酶体水解酶的作用以及形成溶酶体,最终将影响与溶酶体相关的蛋白降解途径。在另外一些研究中还发现<sup>[12]</sup>,在哺乳动物中经溶酶体蛋白降解途径过程中,降解的蛋白中包括了一些活化了的受体型酪氨酸激酶,通过阻断降解过程将有可能引起活化的受体在细胞内的堆积,进而导致细胞的过度增长,因此,得出结论:HCCS1 有可能能通过其转运功能影响细胞内涵体/溶酶体系统,从而进一步影响酪氨酸激酶受体信号途径,最终发挥其抑癌作用。

随着对 HCCS1 研究的深入,在 Liewen 等<sup>[3]</sup>的报道中,HCCS1 编码的蛋白通过定位在胞质内发挥其蛋白运转的功能,而 M6PR 是其转运的主要蛋白之一,但有关 HCCS1 具体的与转运功能相关的序列位点并未明确指出。因此,对于基因序列区的细化和区域化就成为研究的热点问题之一。最近,Nicole 等<sup>[11]</sup>研究了酵母中 GARP 的亚单位 Vps54 的 C 端与 N 端不同结构域的功能,研究结果显示,Vps54 的 C 端与 N 端在

GARP 中发挥着不同的作用。本研究主要开展了 GARP 的亚单位 HCCS1(hVps53)转运功能相关序列区的研究。以 pEGFP-C2 为载体,根据 HCCS1-cDNA 上固有的酶切位点构建了从 5'端和 3'端缺失的含不同长度 HCCS1 片段的系列质粒,为 HCCS1 转运功能的进一步研究奠定了一定的基础。

根据前期的研究数据<sup>[4]</sup>,通过实验观察到了 HCCS1 的上调可以诱发 HCC 细胞凋亡,从而发挥 HCCS1 的抑癌作用,已有实验结果提示了溶酶体途径可能是主要参与途径之一,即 HCCS1 的蛋白表达上调有可能影响 M6PR 等蛋白的转运,从而最终导致溶酶体破坏,释放溶酶体酶,如 Cathepsins 等,继而促发下游的凋亡信号。

## 4 结 论

经过对 HCCS1 分子结构的分析,初步认为 HCCS1 与 M6PR 蛋白相互作用的位点是它的 5'端 129 bp 序列区,其可能是与蛋白转移的极性有关。这对进一步研究 HCCS1 的蛋白转运功能及其相关的抑癌作用的联系具有积极意义。

## 参考文献:

- [1] Liu X Y, Gan Y, Zhao X, et al. Adenovirus-mediated HCCS1 overexpression elicits a potent antitumor efficacy on human colorectal cancer and hepatoma cells both in vitro and in vivo[J]. *Cancer Gene Therapy*, 2008, 15: 808-816.
- [2] 赵新泰, 李锦军, 何英华, 等. 肝癌中具有高突变率位于染色体 17p13.3 区的新抑癌基因[J]. *癌症研究*, 2001, 61(20): 7383-7387.
- [3] Liewen H, Ivo Meinhold-Heerlein, Vasco Oliveira, et al. Characterization of the human GARP(GO l $\alpha$ -associated retrograde protein) complex[J]. *Exp Cell Res*, 2005, 306(1): 24-34.
- [4] Kong W, Gan Yu. Establishment of 451 bp fragment that functionally related to transportation in hepatocellular carcinoma suppressor gene-1 HCCS1[J]. *China Oncology*, 2008, 18(1): 15-19.
- [5] Piao Z, Park C, Park J H, et al. Allelotype analysis of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer*, 1998, 75(8): 29-33.
- [6] Charroux B, Shevehenko A, Mann M, et al. Gemin4, A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli[J]. *Cell Biol*, 2000, 148(6): 1177-1186.
- [7] Conibear E, Stevens T H. Vps52p, Vps53p, and Vps54p form a novel multisubunit complex required for protein sorting at the yeast late Golgi[J]. *Mol Biol Cell*, 2000, 11(1): 305-323.
- [8] Conibear E, Stevens T H. Studying yeast vacuoles[J]. *Methods Enzymol*, 2002, 351: 408-432.
- [9] Andag U, Neumann T, Sehm H D. The coatamer-interacting protein Dsl P is required for Golgi-to-endoplasmic reticulum retrieval in yeast[J]. *Biol Chem*, 2001, 276(42): 39150-39160.
- [10] Conibear E, Cleek J N, Stevens T H. Vps51P mediates the association of the GARP(Vps52/53/54) complex with the late Golgi t-SNARE TlsIP[J]. *Mol Biol Cell*, 2003, 14(4): 1610-1623.
- [11] Nicole R, Qwenwillw N R, Chao T Y, et al. Domains within the GARP subunit Vps54 confer separate functions in complex assembly and early endosome recognition[J]. *Mol Biol Cell*, 2006, 17(4): 1859-1870.
- [12] Wiley S H, Burke P M. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking[J]. *Traffic*, 2001, 2(1): 12-18.

(下转第 282 页)

# The Research of Electronic Power Construct Project Cost Management in EMIS

DAI Li<sup>1</sup>, WANG Cun-yu<sup>2</sup>

- (1. School of Economics and Management, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;  
2. Zhejiang Topcheer Information Technology Co, Ltd, Hangzhou 310000, China)

**Abstract:** This paper analyses the difficult point of building enterprise’s project cost management of electricity, proposes the realization technique of electronic power construction project management, and also emphasizes the importance of the project cost in using P3 software, combining electric construction project information management system (EMIS).

**Key words:** cost management; EMIS; P3 software

(责任编辑: 马春晓)

(上接第 245 页)

# A Study on Functional Region for Transportation in HCCS1

ZHOU Hua<sup>1</sup>, LIU Hong<sup>2</sup>, ZHAO Xin-tai<sup>3</sup>, ZHOU Xiu-mei<sup>1</sup>

- (1. School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;  
2. School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;  
3. Shanghai Cancer Institute, Shanghai 200032, China)

**Abstract:** Hepatocellular carcinoma suppressor gene-1(*HCCS1*) as a potential hepatocellular carcinoma suppressor gene plays an important role in sorting of some cytoplasmic proteins. Its carcinoma suppressor function may be related to its protein import to some extent. So it is crucial to identify functional sequences in *HCCS1* that are responsible for the transportation. The expression vectors containing different lengths of *HCCS1* gene are constructed and transfected into HeLa cells mediated by liposomes. The localizations and co-localizations of different *HCCS1* fragments are determined by fluorescence microscopy, respectively. Research indicates the polarity and co-localizations with M6PR both disappear when *HCCS1* gene is cleaved 129 bp from the 5’ end by fluorescence microscopy. The results show that a 129 bp fragment in *HCCS1* at the 5’ end must be the region to its polarity and localization.

**Key words:** hepatocellular carcinoma suppressor gene; functional sequence; immunofluorescence; transportation

(责任编辑: 许惠儿)