

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.28.003

稳定 eIF1 过表达的鼻咽癌细胞株的构建及其功能研究*

梁馨云¹, 赵毅^{1#}, 黎银潮², 李湛豪², 曾慧玲², 王燕^{1△}

(广东医科大学:1. 基础医学院;2. 第二临床医学院, 广东东莞 523808)

[摘要] **目的** 构建稳定真核翻译起始因子 1(eIF1)过表达的鼻咽癌细胞株,研究其对鼻咽癌细胞增殖和迁徙活性的影响。**方法** 采用 pEGFP-C1 真核表达系统,构建 eIF1 过表达载体,转染鼻咽癌 CNE1 细胞,进而获得稳定转染细胞株 CNE1-eIF1 及其对照细胞,以实时荧光定量 PCR(qPCR)和蛋白质印迹法(Western blot)验证该细胞中 eIF1 的过表达情况。采用细胞增殖与迁徙实验分别检测 CNE1-eIF1 细胞增殖和迁徙活性。**结果** 酶切电泳鉴定及测序检测显示 pEGFP-C1-eIF1 真核表达载体构建成功。稳定 eIF1 过表达的鼻咽癌 CNE1 细胞 CNE1-eIF1 的 eIF1 基因和蛋白的表达水平与空载质粒转染相比分别增加 2.85 倍和 2.58 倍($P<0.05$),而其增殖和迁徙活性组分别下调 55% 和 36%($P<0.05$)。**结论** 成功构建 eIF1 过表达鼻咽癌细胞株,eIF1 过表达可显著下调鼻咽癌细胞的增殖和迁徙活性,提示其具有潜在的抑癌作用。

[关键词] 鼻咽肿瘤;稳定细胞株;EIF1;基因转染;真核翻译因子
[中图法分类号] R73-35 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)28-3896-04

Study on construction and function of CNE1 cells stably over-expressing eIF1 gene*

Liang Xinyun¹, Zhao Yi^{1#}, Li Yinchao², Li Zhanhao², Zeng Huiling², Wang Yan^{1△}
(1. Basic Medical College;2. Second Clinical Medical College, Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong 523808, China)

[Abstract] **Objective** To establish nasopharyngeal carcinoma cell line (CNE1) with eIF1 gene stable over-expression and to study its effects on the proliferation and migration of nasopharyngeal carcinoma cells. **Methods** EIF1 over-expression vector was constructed by adopting the pEGFPC1 eukaryotic expression system for transfecting nasopharyngeal carcinoma CNE1 cells. Thus the stably transfected EIF1-eIF1 and its control cells were obtained. The over-expression situation of eIF1 in these cells was verified by real time fluorescence quantitative PCR(qPCR) and Western blot. The proliferation and migration activity of CNE1-eIF1 cells were tested by adopting the cell proliferation and migration tests. **Results** The enzyme digestion electrophoresis identification and sequencing showed that the pEGFPC1-eIF1 eukaryotic expression vector was successfully constructed. After mRNA and protein expression identification, compared with the reloading plasmid transfection group, the eIF1 gene mRNA and protein expression levels in nasopharyngeal carcinoma cell line CNE1 stably over-expressing eIF1 were up-regulated by 2.85 folds and 2.58 folds respectively ($P<0.05$), while its proliferation and migration activities were down-regulated by 55% and 36% respective ($P<0.05$). **Conclusion** The nasopharyngeal carcinoma cell line over-expressing eIF1 is successfully constructed, the eIF1 over-expression could significantly down-regulate the proliferation and migration activities of nasopharyngeal carcinoma cells, suggesting that eIF1 has potential anti-tumor effect.

[Key words] nasopharyngeal neoplasms; stable cell lines; EIF1; gene transfection; eukaryotic translation factor

真核翻译起始因子 1(eukaryotic initiation factor1, eIF1)是该家族中最早被命名的成员,其蛋白相对分子质量约 12×10^3 , 基因位于 17q21.2 区^[1-2]。eIF1 因被发现能够以其不同的蛋白质表面区域结合 40S 核糖体亚基、eIF2、eIF3 及 eIF5 等,参与组装 43S 翻译前起始复合物,高保真扫描并选择翻译起始密码子而备受关注^[3-4]。随着对 eIF4E、eIF5A 等家族成员的功能进一步研究,特别是在细胞发育、肿瘤发生与转移等进程中的作用不断引发研究热潮^[5-6],针对该家族其他成员的研究探索逐渐成为研究热点^[7-8]。本研究通过体外基因克隆技术,构建了过表达 eIF1 的鼻咽癌细胞株及阴性转染对照细胞^[9],进而就过表达 eIF1 对鼻咽癌细胞增殖和迁徙活性的影响进行

了研究,以期探讨真核翻译调控机制对肿瘤发生、发展的影响提供重要的实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 真核表达载体 pEGFP-C1 及鼻咽癌 CNE1 细胞为广东医科大学科研实验中心保存提供,大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 购自生工生物工程(上海)有限公司。

1.1.2 试剂与引物 高纯度质粒小提中量试剂盒(DP107)、DNA Marker 购自天根生化科技(北京)有限公司;2 $\times$ Power Taq Plus PCR MasterMix(PR4001)购自北京百泰克生物技术有限公司;限制性核酸内切酶 HindIII/BamHI、RNAiso Plus

* 基金项目:广东省自然科学基金资助项目(2015A030310046);广东省中医药局科研基金资助项目(20151261);广东医科大学国家级大学生创新创业训练计划基金资助项目(201510571003)。 作者简介:梁馨云(1981—),实验师,本科,主要从事肿瘤学与病原生物学研究。 # 共同第一作者:赵毅(1978—),副教授,博士,主要从事肿瘤免疫学研究。 △ 通信作者, E-mail:657057106@qq.com。

(9108) 及 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (RR047A) 购自宝生物工程(大连)有限公司; Lipofectamine® 3000 Transfection Reagent (L3000008) 购自 Thermo Fisher Scientific 公司; FastStart Universal SYBR Green Master (ROX, 04913850001) 购自罗氏(中国)公司; Anti-eIF1 单克隆抗体(ab118979)、Anti-β Actin 单克隆抗体(ab8226) 购自 Abcam 公司; RIPA Lysis Buffer System(sc-364162)、BCA Protein Assay Kit(sc-202389)、Western Blotting Luminol Reagent(sc-2048) 及 HRP 标记羊抗鼠二抗(sc-2005) 购自 Santa Cruz 公司。CCK8 检测试剂盒(CA1210) 购自北京索莱宝科技有限公司; Transwell 小室(3422) 购自 Corning 公司。eIF1 的 Real-time PCR 引物, 上游: 5'-TGT AAC CAT TTG GGG TCC GCT T-3', 下游: 5'-TTT GTA ATC TTA GGG CTC TGG GCTT-3'。内参 GAPDH 的 Real-time PCR 引物, 上游: 5'-TGA CTT CAA CAG CGA CAC CCA-3', 下游: 5'-CAC CCT GTT GCT GTA GCC AAA-3'。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建与鉴定 以 Genbank 中 eIF1 的 mRNA 序列 (NM_005801.3) 为模板, pEGFP-C1 载体为基础, 构建 eIF1 过表达载体, 插入序列两端携带限制性核酸内切酶 Hind III / BamH I 的靶序列。以测序、PCR 鉴定及酶切电泳验证插入序列及过表达载体构建情况。

1.2.2 细胞培养 将鼻咽癌 CNE1 细胞于含 10% FBS 的 DMEM 培养液中, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中饱和湿度、常规培养。分别设置常规培养组 (Blank 组)、过表达质粒转染组 (CNE1-eIF1 组)、空载质粒转染组 (CNE1-NC 组) 及阴性转染对照组 (Control 组), 每组 3 复孔。

1.2.3 细胞转染 参照说明书, 采用 Lipofectamine® 3000 Transfection Reagent 以试剂盒参考比例转染质粒 DNA 入鼻咽癌 CNE1 细胞中, 转染后 12 h 换液。转染后 24~48 h 观察细胞荧光表达情况, 计算转染效率, 经预实验验证, 以转染后 48 h 荧光表达为鉴定细胞转染效率的依据。

1.2.4 稳定过表达细胞株筛选及鉴定 转染后 48 h, 以含有 G418(800 μg/mL) 的 DMEM 培养基稀释细胞, 而后挑取单克隆加压筛选 2 个月, 3~4 d 更换含有 G418(终浓度 400 μg/mL) 的 DMEM 培养液 1 次筛选培养, 待细胞数稳定增长后, 挑取单克隆细胞簇进行 RNA 及蛋白水平鉴定, 其中 RNA 检测采用实时荧光定量 PCR(qPCR), 严格按试剂盒说明书操作, 采用宝生物工程(大连)有限公司 RNAiso plus 试剂盒提取细胞总 RNA, 以 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒合成 cDNA, 并用 FastStart Universal SYBR Green Master(ROX) 进行检测。蛋白检测采用蛋白质印迹法(Western blot), 参照说明书, 以 RIPA Lysis Buffer System 试剂盒提取细胞总蛋白, 以 BCA Protein Assay Kit 对总蛋白定量, 而后以 50 μg 总蛋白及蛋白 Marker 上样, 采用 12% SDS/PAGE 电泳, PVDF 膜转印, 特异性一抗 4℃ 抚育过夜, 以 Western Blotting Luminol Reagent 检测。留取与对照组相比, eIF1 过表达水平最高的 1 株细胞株, 即为 CNE1-eIF1 过表达细胞, 同时结合荧光表

达鉴定法构建空载体转染对照细胞株 CNE1-NC 细胞。

1.2.5 细胞增殖实验 选用 CCK8 细胞增殖检测试剂盒, 取对数生长期各组细胞以每孔 3 000 个分别接种于 96 孔细胞培养板中, 细胞接种后 12 h, 设置重复孔, 其后严格按照试剂盒说

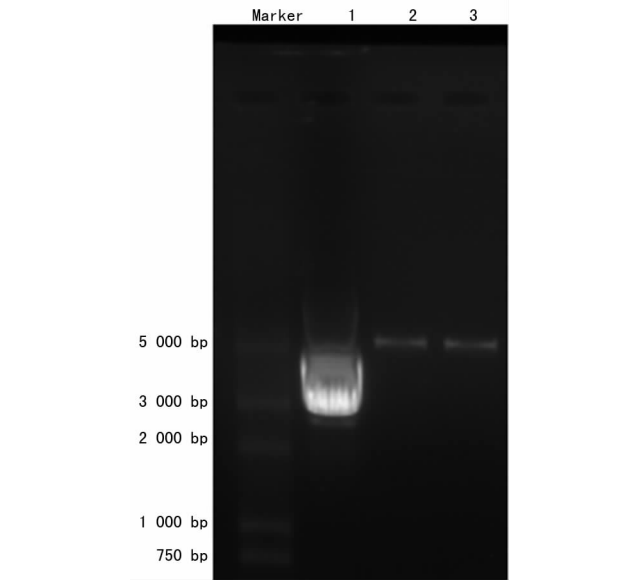
明书操作, BioTek 公司 Synergy 2 多功能酶标仪 450 nm 波长测每孔吸光度(A)值。与对照组相比, 计算细胞增殖比率。

1.2.6 细胞迁徙实验 采用 Corning 公司 Transwell 小室, 取对数生长期细胞, 按每毫升 5×10⁵ 个细胞浓度加入 200 μL 无血清细胞悬液到小室中, 下室中加入含 10% FBS 和 1% 纤维粘连蛋白的完全培养基 500 μL, 设置 3 复孔, 继续培养 48 h 后, 取出 Transwell 小室用 PBS 轻轻洗 2 遍, 用棉签去除上室膜表面的细胞。甲醇固定 30 min, 0.1% 结晶紫室温下染色 30 min, PBS 洗 3 遍使结晶紫完全冲干净, 在高倍镜视野下计数穿膜细胞数, 取交叉十字共 10 个视野, 计算平均值。与对照组相比, 计算细胞迁移比率。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.00 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析, 组间比较采用 *q* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒酶切电泳及测序结果 如图 1 所示, 可见环状质粒 DNA 被切断后呈现线性条带改变。证明质粒构建插入内切酶 Hind III 及 BamH I 的酶切位点正确可靠。双向测序, pEGFP-C1-eIF1 载体 MCS(Multiple cloning site)区插入序列与拟构建的 eIF1 表达序列一致, 见图 2。



1: pEGFP-C1-eIF1 载体; 2: pEGFP-C1-eIF1 载体经 Hind III 酶切后形成的线性 DNA; 3: pEGFP-C1-eIF1 载体经 BamH I 酶切后形成的线性 DNA

图 1 pEGFP-C1-eIF1 质粒酶切电泳图

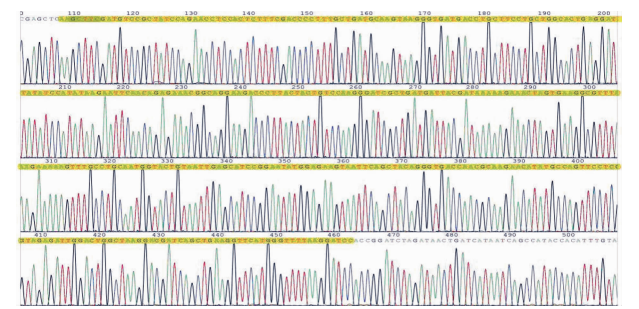


图 2 pEGFP-C1-eIF1 插入序列测序峰

2.2 细胞转染情况 与 Blank 组、Control 组相比, CNE1-eIF1 组、CNE1-NC 组细胞均出现大量明显的绿色荧光, 计数 200 个

细胞,两组细胞均显示转染效率为 90% 以上,说明转染成功,外源 GFP 绿色荧光蛋白表达正常。见图 3。

2.3 eIF1 过表达鉴定 Blank 组和 CNE1-NC 组细胞 eIF1 基因、蛋白的表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$);与 CNE1-NC 组相比,CNE1-eIF1 组细胞的 eIF1 mRNA、蛋白的表达水平分别上调 2.85 倍、2.58 倍($P<0.05$)。见图 4、5。

2.4 eIF1 过表达对鼻咽癌细胞增殖和迁徙活性的影响 Blank 组和 CNE1-NC 组细胞增殖、迁移活性比较差异无统计学意义($P>0.05$);与 CNE1-NC 组相比,CNE1-eIF1 组细胞的增殖、迁移活性分别下调 55%、36%($P<0.05$)。见图 6。

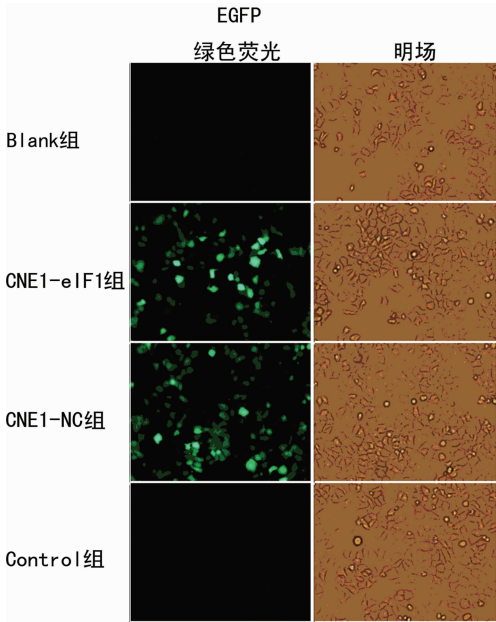
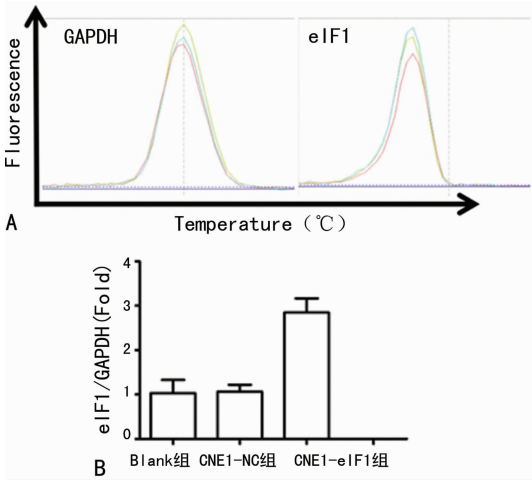
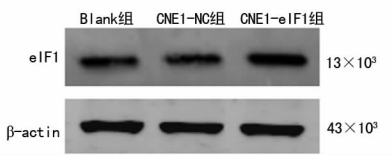


图 3 细胞转染 24 h 荧光表达



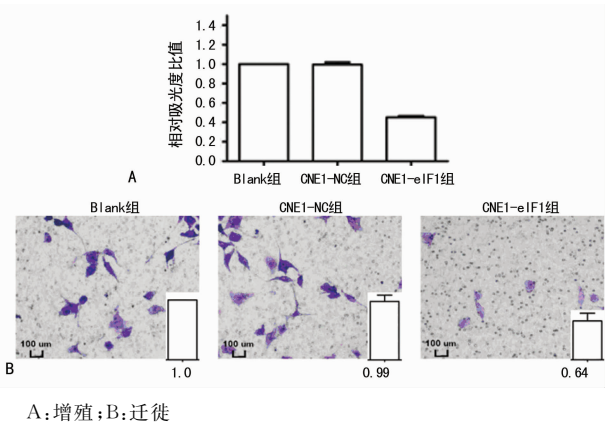
A:内参基因 GAPDH 及目的基因 eIF1 的溶解曲线图;B:3 组细胞 eIF1 mRNA 相对表达量

图 4 eIF1 稳定转染细胞株 eIF1 mRNA 表达水平



β-actin:内参基因 GAPDH;eIF1:目的基因

图 5 eIF1 稳定转染细胞株 eIF1 蛋白表达水平



A:增殖;B:迁徙
图 6 过表达 eIF1 对鼻咽癌 CNE1 细胞的增殖和迁徙活性的影响

3 讨 论

作为真核翻译起始因子家族成员中第 1 个与拟表达基因 mRNA 起始区域结合的成分,eIF1 对于选择并扫描相关基因 mRNA 自 5' 帽子结构区至起始密码子 AUG 序列前,进而控制翻译起始的保真性与延续性等过程至关重要^[3]。Lind 等^[1] 研究发现,eIF1 与 eIF1A 一起通过控制翻译起始阶段,针对 mRNA 起始密码第 1 位和第 3 位碱基配对的识别与自由能的调控,升高错配自由能需求,进而保真调节核糖体 tRNA 识别结合 mRNA 起始密码子的扫描过程。另外,在密码子与反密码子没有正确配对时,eIF1 可以抑制 GTP 的水解,控制 AUG 上下游碱基序列的配对,调控翻译起始过程。当密码子的识别完成后,eIF1 的抑制作用被减弱,经由精确的起始密码子及其上下游碱基的配对 eIF1 的抑制作用得以减弱^[10],从而启动翻译起始复合物的合成。有研究发现,蛋白翻译起始时 40 S 核糖体亚基上面的 mRNA 结合通道为关闭状态,当 eIF1 和 eIF1A 先后结合到亚基上面时,特别是 eIF1 结合到 40 S 核糖体亚基 P 位点后,其 mRNA 结合通道才得以打开,拟表达基因的 mRNA 结合到核糖体亚基上,核糖体 tRNA 开始沿 mRNA 的 5' 端进行扫描,识别 AUG 起始密码子及其上下游碱基序列,碱基配对无误后,eIF1 从核糖体亚基上释放出来,翻译起始复合物开始形成,mRNA 结合通道关闭,蛋白翻译起始^[11-12]。在此过程中,特别是在核糖体完成与拟表达基因 mRNA 起始密码子识别后,eIF1 的存在对翻译前起始复合物的形成,GTP 水解和能量释放,乃至蛋白翻译过程的抑制作用,不容忽视^[13]。

目前,随着真核翻译起始家族成员在多种人类疾病,尤其是肿瘤相关疾病中的研究日渐深入,如 eIF4E、eIF5A 等在乳腺癌、大肠癌和鼻咽癌等多种肿瘤中的促癌作用已成为相关研究热点^[14-15],作为启动真核蛋白翻译起始的关键分子,eIF1 在肿瘤发生、发展进程中的作用亟待进一步的研究。为研究 eIF1 在鼻咽癌发生、发展中作用,本研究成功构建了 eIF1 真核表达载体,转染至鼻咽癌 CNE1 细胞中,筛选并成功构建了过表达 eIF1 的鼻咽癌 CNE1-eIF1 细胞及其对照阴性 CNE1-NC 细胞,从而为进一步探讨蛋白翻译起始调控在癌基因表达和肿瘤形成、复发、转移中的影响提供了研究工具。在此基础上,笔者就 eIF1 对鼻咽癌细胞增殖和迁徙活性的影响进行了初步的探索,结合文献研究,笔者发现过表达的 eIF1 可明显下调鼻咽癌细胞的增殖和迁徙活性,提示 eIF1 在鼻咽癌 CNE1 细胞的蛋白翻译起始过程中具有重要的调控作用,其对 CNE1 细胞翻译起始复合物的形成和真核细胞蛋白翻译的启动可能具有重

要的开关抑制作用,并可由此影响到细胞的一系列生物学行为,对肿瘤细胞可能具有潜在的抑癌作用。

目前国内外虽已有多家研究机构致力于此方面的相关研究,但均无明确的突破,本研究的发现为真核细胞蛋白翻译的机制研究和肿瘤癌基因异常表达的调控研究提示了研究方向,为进一步的探讨 eIF1 影响鼻咽癌病变转移机制奠定了一定的基础。

参考文献

- [1] Lind C, Aqvist J. Principles of start codon recognition in eukaryotic translation initiation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016,44(17):8425-8432.
- [2] Sheikh MS, Fernandez-Salas E, Yu M, et al. Cloning and characterization of a human genotoxic and endoplasmic reticulum stress-inducible cDNA that encodes translation initiation factor 1 (eIF1(A121/SUI1)) [J]. *J Biol Chem*, 1999,274(23):16487-16493.
- [3] Hussain T, Ll  cer JL, Fern  ndez IS, et al. Structural changes enable start codon recognition by the eukaryotic translation initiation complex [J]. *Cell*, 2014,159(3):597-607.
- [4] Lind C, Esguerra M,   qvist J. A close-up view of codon selection in eukaryotic initiation [J]. *RNA Biol*, 2017,14(7):815-819.
- [5] Nakanishi S, Cleveland JL. Targeting the polyamine-hypusine circuit for the prevention and treatment of cancer [J]. *Amino Acids*, 2016,48(10):2353-2362.
- [6] Fischer PM. Cap in hand; targeting eIF4E [J]. *Cell cycle*, 2009,8(16):2535-2541.
- [7] 刘岱松,杨思思,谭江琳,等.真核起始因子 6 抑制小鼠肾间质纤维化的组织学研究[J]. *重庆医学*, 2014,43(16):2022-2025.

- [8] Lu C, Makala L, Wu D, et al. Targeting translation; eIF4E as an emerging anticancer drug target [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2016,18:e2.
- [9] 聂伟,王小毅,邱干,等. ABCG2 过表达对乳腺癌细胞上皮间质化能力的影响 [J]. *重庆医学*, 2016,45(26):3622-3623,3626.
- [10] Ivanov IP, Loughran G, Sachs MS, et al. Initiation context modulates autoregulation of eukaryotic translation initiation factor 1 (eIF1) [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010,107(42):18056-18060.
- [11] Martin-Marcos P, Nanda JS, Luna RE, et al. Enhanced eIF1 binding to the 40S ribosome impedes conformational rearrangements of the preinitiation complex and elevates initiation accuracy [J]. *RNA*, 2014,20(2):150-167.
- [12] Maduzia LL, Moreau A, Pouillet N, et al. The role of eIF1 in translation initiation codon selection in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics*, 2010,186(4):1187-1196.
- [13] Ll  cer JL, Hussain T, Marler L, et al. Conformational differences between open and closed states of the eukaryotic translation initiation complex [J]. *Mol Cell*, 2015,59(3):399-412.
- [14] Ramon S, De Mattos-Arruda L, Sonenberg N, et al. The intra-tumor heterogeneity of cell signaling factors in breast cancer: p4E-BP1 and pEIF4E are diffusely expressed and are real potential targets [J]. *Clin Transl Oncol*, 2014,16(11):937-941.
- [15] Mathews MB, Hershey JW. The translation factor eIF5A and human cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015,1849(7):836-844.

(收稿日期:2017-04-18 修回日期:2017-06-06)

(上接第 3895 页)

- a better prognosis and an increased number of both CD8⁺ T cells and natural killer cells in gastric adenocarcinoma [J]. *Ann Surg Oncol*, 2008,15(6):1775-1782.
- [5] Jones SA, Horiuchi S, Topley N, et al. The soluble interleukin 6 receptor; mechanisms of production and implications in disease [J]. *FASEB J*, 2001,15(1):43-58.
- [6] Tang L, Hu HD, Hu P, et al. Gene therapy with CX3CL1/ Fractalkine induces antitumor immunity to regress effectively mouse hepatocellular carcinoma [J]. *Gene Ther*, 2007,14(16):1226-1234.
- [7] Ohta M, Tanaka F, Yamaguchi H, et al. The high expression of Fractalkine results in a better prognosis for colorectal cancer patients [J]. *Int J Oncol*, 2005,26(1):41-47.
- [8] Zhang X, Wei H, Chen Q, et al. Activation of human natural killer cells by recombinant membrane-expressed fractalkine on the surface of tumor cells [J]. *Oncol Rep*, 2007,17(6):1371-1375.
- [9] Belluco C, Nitti D, Frantz M, et al. Interleukin-6 blood level is associated with circulating carcinoembryonic antigen and prognosis in patients with colorectal cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 2000,7(2):133-138.
- [10] Galizia G, Orditura M, Romano C, et al. Prognostic sig-

- nificance of circulating IL-10 and IL-6 serum levels in colon cancer patients undergoing surgery [J]. *Clin Immunol*, 2002,102(2):169-178.
- [11] Corvinus FM, Orth C, Moriggl R, et al. Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth [J]. *Neoplasia*, 2005,7(6):545-555.
- [12] 刘丽丽,战雪梅,孙崇伟,等.转录信号传导子与激活子 3 在宫颈癌组织中的表达及临床意义 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2007,14(6):447-449.
- [13] Lesina M, Kurkowski MU, Ludes K, et al. Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer [J]. *Cancer Cell*, 2011,19(4):456-469.
- [14] Hamada S, Masamune A, Yoshida N, et al. IL-6/STAT3 plays a regulatory role in the interaction between pancreatic stellate cells and cancer cells [J]. *Dig Dis Sci*, 2016,61(6):1561-1571.
- [15] 黄陈,裴正军,刘辰,等.阻断 STAT3 信号转导通路对人胰腺癌细胞生长的影响 [J]. *肿瘤*, 2006,26(5):414-417.

(收稿日期:2017-05-18 修回日期:2017-07-06)