

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.30.004

文章编号: 1005-8982 (2018) 30-0016-04

肺癌细胞中 CD59 rs79077373 遗传变异 对其转录活性的影响*

郭锦翠¹, 张艳艳¹, 杨振邦², 牛泽人¹, 张雪梅²

(1. 华北理工大学公共卫生学院, 河北 唐山 063000; 2. 华北理工大学生命科学院, 河北 唐山 063000)

摘要: **目的** 探讨肺癌细胞中 CD59 启动子区 rs79077373 遗传变异对其转录活性的影响。**方法** 利用 TRANSFAC 预测可能影响 CD59 转录活性的启动子区遗传变异, 然后构建含有不同等位基因的 CD59 启动子区报告基因载体, 分别命名为 pGL3-rs79077373C 和 pGL3-rs79077373T, 将重组质粒与内参质粒 pRL-SV40 共转染于肺癌细胞 A549、NCI-H23、NCI-H2030 后, 检测报告基因活性。**结果** 生物信息学分析发现当 CD59 rs79077373 增加转录因子 TBP 的结合。荧光素酶报告基因结果显示, 在肺癌细胞 A549、NCI-H2030、NCI-H23 细胞中 pGL3-rs79077373T 组的相对荧光素酶活性分别是 pGL3-rs79077373C 组的 2.00、1.82 和 1.42 倍 ($P < 0.05$)。**结论** CD59 启动子区 rs79077373 C>T 变异可增加 CD59 的启动子的活性。

关键词: CD59 遗传变异; 补体; 肺癌

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Functional analysis of CD59 rs79077373 in lung cancer cells*

Jin-cui Guo¹, Yan-yan Zhang¹, Zhen-bang Yang², Ze-ren Niu¹, Xue-mei Zhang²

(1. School of Public Health, 2. College of Life Science; North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of rs79077373 (C/T) mutation in promoter region of CD59 on CD59 transcription activity. **Methods** Bioinformatic analysis was performed to predict potential mutation in transcription factor binding site of the promoter region of CD59 that may affect transcription activity. Two different pGL3-CD59 promoter luciferase reporter constructs, CD59 rs79077373 T and pGL3-rs79077373C, were generated. Constructors were co-transfected with pRL-SV40 plasmid into A549, NCI-H2030 and NCI-H23 cells for manifestation of the transcription activity of CD59. **Results** Bioinformatic analysis unveiled that alteration of CD59 rs79077373 T allele to C allele may affect the transcription activity. The reporter gene expression suggested a 2.00-fold, 1.82-fold and 1.42-fold increase of transcription activity in A549, NCI-H2030 and NCI-H23 cells in CD59 rs79077373 T allele group compared with CD59 rs79077373C group (respectively, $P < 0.05$). **Conclusions** CD59 rs79077373 carrying the T allele enhances CD59 transcriptional activity.

Keywords: CD59; genetic variation; complement; lung cancer

肿瘤是全人类面临的一个巨大公共卫生问题, 肺癌在所有恶性肿瘤死因中居首位^[1]。肿瘤发生的主要

收稿日期: 2018-03-10

* 基金项目: 唐山市科技创新团队培养计划 (No: 14130225B); 河北省高等学校创新团队领军人才培育计划 (No: LJRC001); 河北省自然科学基金重点项目 (No: H2017209233)

[通信作者] 张雪梅, E-mail: jyxuemei@gmail.com

原因之一是肿瘤对补体监视的免疫逃避^[2]。膜结合性补体调节蛋白 (membrane-bound complement regulatory proteins, mCRPs) 在机体内能够与补体相互作用, 动态调节补体的激活与抑制, 在保护自身组织的同时还能有效杀灭外来有害成分^[3]。CD59 作为 mCRPs 中重要成分之一, 与炎症、创伤及某些肿瘤等疾病有密切的关系^[4-5]。研究表明, CD59 在乳腺癌^[5-6]、结肠癌^[7]、肺癌组织^[8]中显现出高表达。

基因单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 是人群中普遍存在的核苷酸改变, 而启动子区的多态性影响基因的转录水平, 进一步导致蛋白表达水平的改变, 导致肿瘤和疾病的发生和发展^[9]。本研究旨在探讨 CD59 启动子区遗传变异对基因转录的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

质粒 pGL3-Basic、pRL-SV40 以及双荧光素酶报告基因检测、凝胶回收、质粒提取试剂盒购自美国 Promega 公司, Lipofectamine™ 2000 试剂购自美国 Invitrogen 公司, 限制性内切酶 *Kpn* I、*Nhe* I 和连接酶 T4 DNA 分别购自美国 New England Biolabs 和日本 TaKaRa 公司。A549、NCI-H2030、NCI-H23 非小细胞肺癌细胞株购自美国菌种保藏中心。

1.2 实验方法

1.2.1 启动子区 SNP 筛选 对国际共享数据库 Ensembl 中基因 CD59 启动子区 SNP 信息进行数据挖掘, 将 CD59 基因转录起始位点上游扩展 1 500 bp, 筛选出可影响基因转录因子结合位点的 SNP 位点, 规定在中国人中的最小等位基因频率不 >0.05, 采用转录因子数据库 (www.gene-regulation.com) 中的软件 TRANSFAC 分析软件预测对转录因子结合有影响的 SNP 位点, 最终共筛选出 1 个 SNP 位点 (CD59 rs79077373)。

1.2.2 CD59 启动子区报告基因载体构建与鉴定 使用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计, CD59 启动子区 PCR 扩增所用引物序列: 正向 5'-GGGGTACCCCTC AAGCAACGCAAACTAC-3', 反向 5'-CTAGCTAGCTA GCCCCCGCATTCTTTCGCT-3'。该 PCR 产物长 2 282 bp (-2 234 bp, +47 bp) 引物两端分别加上酶切位点 *Kpn* I、*Nhe* I 及对应的保护碱基。

调整 PCR 仪器反应程序, 将反应体系离心 6 s,

立即放置到 PCR 仪, 进行片段的扩增, 一般在 94℃ 的温度条件下预变性 10 min, 然后进入循环扩增阶段: 第 1 阶段为 94℃ 变性 45 s, 第 2 阶段为 61.5℃ 退火 45 s, 第 3 阶段为 72℃ 延伸 2 min, 这 3 个阶段进行 35 个循环, 循环完成后进行 10min 的 72℃ 延伸。将扩增片段切胶回收, 使用 *Kpn* I、*Nhe* I 进行双酶切后与 pGL3-Basic 报告基因载体进行连接。随后将连接后的产物进一步转化成肠杆菌 DH5 α , 接着挑取其中的阳性单克隆, 最后进行测序的确认, 构建完成的质粒定点突变由苏州泓迅生物技术有限公司完成, 根据测序结果将重组质粒分别标记为 pGL3-rs79077373C 和 pGL3-rs79077373T。

1.2.3 细胞培养及重组质粒转染 转染前 1 天将状态良好的 A549、NCI-H23 和 NCI-H2030 以每孔 2×10^5 个细胞均匀接种到板中, 当密度到 70% 后, 根据使用说明转染重组质粒。质粒转染情况为: 800 ng 的重组质粒 (pGL3-rs79077373C 或 pGL3-rs79077373T) 和 10 ng 的内参质粒 pRL-SV40, 每组转染质粒的细胞至少设置 3 个实验的复孔, 每次以相同的条件相同的试剂至少重复 3 次实验。培养 24 h 后, 对细胞进行裂解, 然后收集细胞, 测定荧光素酶活性。

1.2.4 双荧光素酶活性检测 根据双荧光素酶报告基因检测试剂盒提供的说明书进行操作并设定发光检测仪, 型号为 Glo Max 20/20。600 μ l PBS 清洗, 加 100 μ l PLB 裂解液, 室温下轻摇板 15 min, 将裂解液移至 EP 管中, 瞬时离心后进行进一步检测。EP 管中加入 50 μ l LAR II 和 15 μ l 裂解产物, F 值即 Firefly 荧光素酶活性应被即刻检测, 随后 50 μ l 1 \times Stop & Glo 溶液被立即加入到 24 孔板中, R 值即 Renilla 荧光素酶活性, 计算荧光素酶活性即 F 值与 R 值之比。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 18.0 统计软件, 计量资料以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学分析

应用转录因子数据库 (www.gene-regulation.com) 中的软件 TRANSFAC 分析预测 CD59 rs79077373 C/T 遗传变异对潜在的转录因子结合位点影响 (见图 1)。无转录因子结合的情况是当该位点为 C 等位基因时; 当该位点出现 T 等位基因, 此时存在转录因子 TBP 与

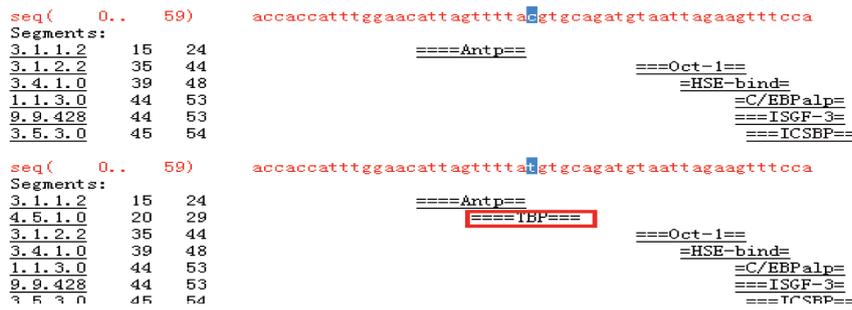


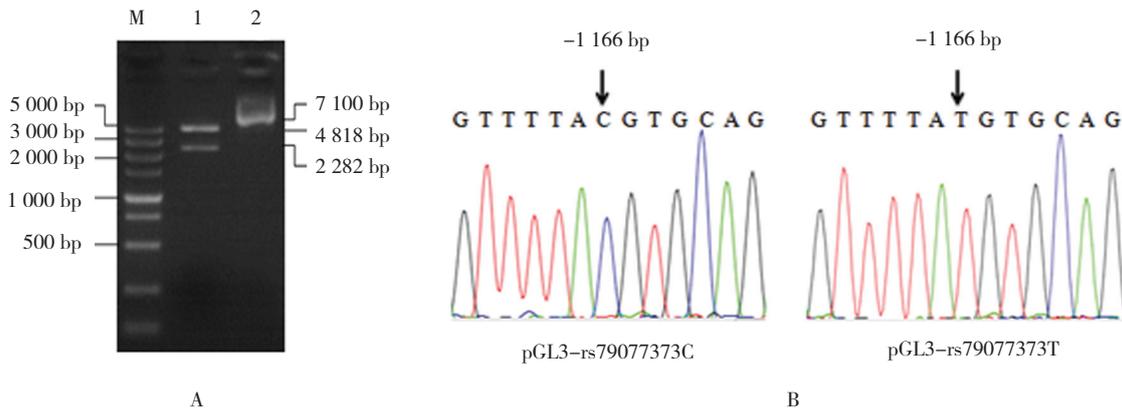
图 1 生物信息学预测 rs79077373 C/T 对转录因子结合位点的影响

之结合。因此采用双荧光素酶报告基因实验验证预测结果，探讨生物学意义。

2.2 CD59 基因启动子区重组质粒结果验证

CD59 重组质粒经测序验证后 rs79077373 位点为 C 等位基因，将其命名为 pGL3-rs79077373C，利用构建好的重组质粒将 rs79077373 位点进行定点突变，突

变后的重组质粒命名为 pGL3-rs79077373T。重组质粒利用双酶切后经琼脂糖凝胶电泳进行验证，酶切片段与插入片段长度相符（见图 2A）。重组质粒测序结果利用 Blast 与 NCBI 数据库中 CD59 基因启动子区序列进行比对，一致性为 100%（见图 2B）。



A: CD59 基因启动子区重组质粒双酶切琼脂糖凝胶验证。M: 1 kb DNA Ladder; 1: 重组质粒 pGL3-rs79077373C 酶切验证（内切酶 *Kpn* I 和 *Nhe* I）；2: 重组质粒 pGL3-rs79077373T。B: CD59 基因启动子区重组质粒测序验证

图 2 CD59 基因启动子区载体构建结果验证

2.3 荧光素酶报告基因活性检测

将重组质粒 pGL3-rs79077373C、pGL3-rs79077373T、空质粒 pGL3-Basic 分别与内参质粒 pRL-SV40 共转染于 NCI-H2030、NCI-H23、A549 3 株非小细胞肺癌后，荧光素酶活性的表达情况检测见图 3。重组质粒荧光素酶相对活性经对照组校正，每组质粒转染细胞至少设置 3 个复孔，数据由 3 次独立重复实验得出，用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示每组数值。A549 细胞中，pGL3-rs79077373T 组的荧光素酶相对活性值为 (17.95 ± 0.50) ，pGL3-rs79077373C 组的荧光素酶相对活性值为 (8.99 ± 0.56) ，经 *t* 检验，差异有统计学意义 ($t = -20.639, P = 0.000$)，pGL3-rs79077373T 组的荧光素酶相对活性值为 pGL3-

rs79077373C 组的 2.00 倍。NCI-H23 细胞中，pGL3-rs79077373T 组的荧光素酶相对活性值为 (18.89 ± 1.13) ，pGL3-rs79077373C 组的荧光素酶相对活性值

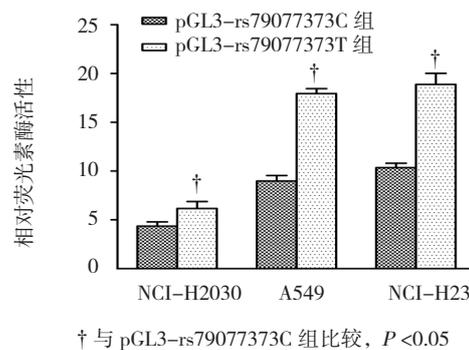


图 3 CD59 基因 rs79077373 报告基因荧光素酶相对活性

为 (10.36 ± 0.44), 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($t = -12.150, P = 0.000$), pGL3-rs79077373T 组的荧光素酶相对活性值为 pGL3-rs79077373C 组的 1.82 倍。NCI-H2030 细胞中, pGL3-rs79077373T 组的荧光素酶相对活性值为 (6.17 ± 0.71), pGL3-rs79077373C 组的荧光素酶相对活性值为 (4.36 ± 0.43), 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($t = -3.752, P = 0.020$), pGL3-rs79077373T 组的荧光素酶相对活性值为 pGL3-rs79077373C 组的 1.42 倍。

3 讨论

CD59 又称保护素, 位于人类 11 号染色体长臂, 其糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 锚定到细胞膜表面。CD59 蛋白的功能突出表现在以下几个方面: ① CD59 通过与 C8 和 (或) C9 结合、干扰 C9 插入细胞膜内或 C9 的多聚化, 进而阻断补体攻膜复合物 (MAC) 的装配, 保护宿主细胞免于受补体的溶破^[10]。② CD59 可以作为第二信号刺激物, 一方面可以诱导 T 淋巴细胞的激活, 另外参与免疫反应的调节过程^[11]。③ CD59 作为 CD2 的配体能够与 CD2 相结合形成 CD59-CD2 复合物, 随后激活 T 细胞并且诱导 T 细胞及其他组织细胞的黏附, 并进一步调节组织细胞的生长^[12]。

CD59 在肿瘤细胞中的高表达可能有助于肿瘤逃避免疫监视和补体介导的细胞溶解。CD59 在结直肠癌中表达上调, 与结直肠癌的临床分化和病理分期明显相关, 并且 CD59 沉默的结肠癌细胞会增强对化疗药物的敏感性^[7, 13]。在乳腺癌研究中, CD59 表达明显增加并且 CD59 的缺失可导致肿瘤细胞的凋亡, 抑制肿瘤细胞的 CD59 基因表达后, Fas 和 Caspase-3 的表达上调 Bcl-2 的表达降低, 从而诱发肿瘤细胞的凋亡和生长抑制^[14]。在 CD59 与肺癌关系的研究中^[8, 15], 通过体内和体外实验都发现 CD59 在肿瘤细胞中的表达要高于正常肺组织细胞, 补体系统对肿瘤细胞介导的裂解作用被抑制, CD59 的高表达可能是肿瘤细胞逃避补体攻击和抵制单克隆抗体治疗肺癌的重要原因, 提示 CD59 是肿瘤发生及恶性进展的主要因素之一。

本研究证实, CD59 启动子区 SNP rs79077373 T 等位基因可增加 CD59 的启动子区转录活性, 说明 CD59 启动子区遗传变异可以在转录水平上调其表达, 为深入研究 CD59 基因在肿瘤中高表达的分子机制奠定

了基础。

参 考 文 献:

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] AFSHAR-KHARGHAN V. The role of the complement system in cancer[J]. J Clin Invest, 2017, 127(3): 780-789.
- [3] 王超, 李婧, 吴晓莎, 等. 膜结合性补体调节蛋白及其在肿瘤免疫治疗中的控制策略 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(3): 332-335.
- [4] NUUTILA J, JALAVA-KARVINEN P, HOHENTHAL U, et al. Use of complement regulators, CD35, CD46, CD55, and CD59, on leukocytes as markers for diagnosis of viral and bacterial infections[J]. Hum Immunol, 2013, 74(5): 522-530.
- [5] DAS N, BISWAS B, KHERA R. Membrane-bound complement regulatory proteins as biomarkers and potential therapeutic targets for SLE[J]. Adv Exp Med Biol, 2013(735): 55-81.
- [6] OUYANG Q, ZHANG L, JIANG Y, et al. The membrane complement regulatory protein CD59 promotes tumor growth and predicts poor prognosis in breast cancer[J]. Int J Oncol, 2016, 48(5): 2015-2024.
- [7] SHANG Y, CHAI N, GU Y, et al. Systematic immunohistochemical analysis of the expression of CD46, CD55, and CD59 in colon cancer[J]. Arch Pathol Lab Med, 2014, 138(7): 910-919.
- [8] LI B, LIN H, FAN J, et al. CD59 is overexpressed in human lung cancer and regulates apoptosis of human lung cancer cells[J]. Int J Oncol, 2013, 43(3): 850-858.
- [9] De GOBBI M, VIPRAKASIT V, HUGHES J R, et al. A regulatory SNP causes a human genetic disease by creating a new transcriptional promoter[J]. Science, 2006, 312(5777): 1215-1217.
- [10] KIMBERLEY F C, SIVASANKAR B, PAUL MORGAN B. Alternative roles for CD59[J]. Mol Immunol, 2007, 44(1/2/3): 73-81.
- [11] 聊菲, 高美华, 张蓓. CD59 锚定蛋白对 CD55 介导的 T 细胞信号转导的增强效应 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(2): 128-130.
- [12] 高美华, 钟丹丹, 张蓓. CD59-CD2 对 T 细胞信号转导的作用 [J]. 免疫学杂志, 2011, 27(9): 773-776.
- [13] YIN H, LI C, WANG S, et al. Silencing of CD59 enhanced the sensitivity of HT29 cells to 5-Fluorouracil and Oxaliplatin[J]. J Infect Chemother, 2015, 21(1): 8-15.
- [14] LI B, CHU X, GAO M, et al. The effects of CD59 gene as a target gene on breast cancer cells[J]. Cell Immunol, 2011, 272(1): 61-70.
- [15] AJONA D, HSU Y F, CORRALES L, et al. Down-regulation of human complement factor H sensitizes non-small cell lung cancer cells to complement attack and reduces in vivo tumor growth[J]. J Immunol, 2007, 178(9): 5991-5998.

(王荣兵 编辑)