

· 系统性疾病 ·

IFITM5在不同癌细胞系中的差异表达*

1. 济南大学、山东省医学科学院医学与生命科学学院 (山东 济南 250022)
2. 山东省医药生物技术研究中心, 山东省医学科学院 (山东 济南 250062)
3. 山东省立医院 (山东 济南 250021)
4. 天津市武清区人民医院骨三科 (天津 301700)

韩峰^{1,2} 鲁艳芹² 王延宙³ 任秀智⁴ 石贤龙^{1,2} 韩金祥²

【摘要】目的 研究干扰素诱导的跨膜蛋白5(IFITM5)在人骨肉瘤15种细胞系中的表达。**方法** 应用RT-QPCR和Western blot检测IFITM5在SAOS2、3A0、SKOV3、HEPG2、HEP2、ACCM、HT29、MDA-MB-231、H7402、HELA、HEK-293、HL-60、K562、THP1、RD等癌细胞系中mRNA和蛋白表达差异。**结果** 在H7402、RD、HEP2细胞系中IFITM5 mRNA和蛋白的表达水平最低,其他细胞系次之,在SAOS2和3A0细胞系中两者均呈高表达。**结论** IFITM5在癌细胞系中存在并有表达差异,为后续研究IFITM5在肿瘤中的作用奠定基础。

【关键词】 IFITM5; mRNA; 蛋白; 癌细胞系

【中图分类号】 R73-3

【文献标志码】 A

【基金项目】 国家科技支撑计划, 课题编号: 2013BAI07B01

DOI: 10.3969/j.issn.1009-3257.2015.02.014

Different Expression of IFITM5 in Cancer Cell Lines*

HAN Feng^{1,2}, LU Yan-qin², WANG Yan-zhou³, et al., 1 School of Medicine and Life Sciences, University of Jinan-Shandong; Academy of Medical Sciences, Jinan 250022, China; 2 Shandong Medicinal Biotechnology Center, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, Shandong, China, et al.

【Abstract】Objective To investigate the expression level of IFN-inducible transmembrane protein 5(IFITM5) in 15 different cancer cell lines. **Methods** RT-QPCR and Western blot were performed to detect the expression level of IFITM5 in SAOS2, 3A0, SKOV3, HEPG2, HEP2, ACCM, HT29, MDA-MB-231, H7402, HELA, HEK-293, HL-60, K562, THP1 and RD cancer cell lines. **Results** There was remarkable difference in the expression of IFITM5 in this cancer cell lines. The lowest expression level of mRNA and protein were detected in H7402, RD and HEP2 cell lines. The highest IFITM5 expression was observed in SAOS2 cells, followed by 3A0. **Conclusions** Significant differential expression of IFITM5 in 15 cancer cells was observed, which laid the foundation for further research on the relationship of IFITM5 and tumor.

【Key words】 IFITM5; MRNA; Protein; Cancer Cell Lines

干扰素诱导跨膜蛋白基因家族(IFITM)于1984年筛选cDNA文库时首次发现^[1],其在进化上高度保守性。目前已在多个物种中被发现,其中研究较多的则是人源和鼠源家族。人类包括IFITM1、IFITM2、IFITM3、IFITM5和IFITM10等5个家族成员,这些家族成员均包含一个保守的CD225域和两个终端变异域。其编码的蛋白质在生殖细胞成熟、细胞-细胞粘附、白血病、肿瘤抑制、抗病毒活性、骨形成、胚胎发育发挥重要作用。IFITM参与了肿瘤抑制通路,对癌细胞具有抗增殖的作用。IFITM肽参与了肿瘤抗原树突的运输,其蛋白具有肿瘤抑制的性质,甚至可以在肿瘤形成之前起调制作用^[2-5]。尽管采用手术、化疗、

放疗等治疗手段使癌症的存活率有了很大的提高,但晚期患者即使经过系统治疗达到完全缓解,仍有60%~70%会出现复发^[6],而IFITM家族肿瘤抑制作用的发现可能会对降低癌症的复发率提供一种可能。

IFITM5是干扰素诱导跨膜蛋白基因家族成员之一,该基因位于人类第11号染色体11p15.5上,开放阅读框共399bp,含有两个外显子和一个内含子,其编码的蛋白质分子量为14.8kDa,由132个氨基酸组成。该蛋白结构包括胞外区N端和C端以及胞质区的loop,其C端为富含天冬氨酸区域,可参与Ca²⁺的结合^[7-8]。IFITM5是一种成骨细胞标记基因,为骨矿化因子^[9],在骨组织和成骨细胞高表达,在成纤维细胞谱系

也有低水平的表达,其主要在成骨细胞中存在,在巨噬细胞和脾脏中也有少量存在^[10],而IFITM5在癌症方面的相关研究鲜有报道。

本实验从基因水平和蛋白水平初步分析了IFITM5在不同癌细胞系中的差异表达,为进一步探究IFITM5在癌细胞系中的作用机制奠定了基础。

1 材料

1640培养基、McCoy's 5A培养基、胎牛血清(FBS)购自GIBCO公司,乙醇、甲醇、异丙醇、氯仿购自国药集团,TRIzol Reagent 购自Invitrogen公司,反转录试剂盒购自宝生物公司,SYBR Green购自Roche公司,胰酶细胞消化液、青霉素-链霉素双抗、细胞裂解液、磷酸盐缓冲液、转膜液、PMSF、BCA试剂盒、过硫酸钠、十二烷基磺酸钠(SDS)、TEMED、Arc-Bis(29:1)、Tris-HCl(pH 8.8, pH 6.8), 5XSDS样品缓冲液、HRP标记山羊抗兔IgG、GAPDH多克隆抗体、一抗稀释液、蛋白显影定影试剂盒购自碧云天公司, PVDF膜购自Millipore公司,兔抗IFITM5多克隆抗体购自Sigma公司,彩色预染蛋白marker、ECL发色液购自Thermo公司。

2 实验方法

2.1 细胞培养 3A0、SKOV3、HEPG2、HEP2、ACCM、HT29、MDA-MB-231、H7402、HELA、HEK-293、HL-60、K562、THP1、RD细胞复苏后用含有10%FBS、100ug/ml青霉素、100ug/ml链霉素的1640培养基培养(SAOS2细胞用McCoy's 5A培养基培养),条件为37℃、5%CO₂,隔两天换液一次。

2.2 RT-QPCR测定转录因子mRNA表达水平
RNA提取与分析:收取SAOS2、3A0、SKOV3、HEPG2、HEP2、ACCM、HT29、MDA-MB-231、H7402、HELA、HEK-293、HL-60、K562、THP1、RD细胞,采用TRIzol法提取RNA,用DEPC水溶解沉淀获得细胞总RNA,紫外分光光度计检测A260/A280的比值,测定RNA纯度和浓度。

RT反应体系:采用Random Primers为RT反应引物;总反应体系为20ul,包括1ug的总RNA, 5×PrimeScript Buffer 4ul, RNase Inhibitor(40 U/ul)0.5ul, PrimeScript

Reverse Transcriptase(200 U/ul)1ul, RNase free dH₂O调总体积至20ul。30℃ 10min, 42℃ 60min, 70℃, 15min。

Real-time PCR反应:总反应体积为10ul,包括2ul cDNA, 2×SYBR I Master 5ul, HGAPDH-F/HGAPDH-R各1ul或IFITM5-F/IFITM5-R各1ul, RNase free dH₂O补足至10ul。循环参数:95℃预变性, 95℃ 10S, 60℃ 10s共45个循环,最后72℃延伸10S。

2.3 Western blot 检测IFITM5的表达 收集SAOS2、3A0、SKOV3、HEPG2、HEP2、ACCM、HT29、MDA-MB-231、H7402、HELA、HEK-293、HL-60、K562、THP1、RD细胞,用预冷的PBS洗涤三次,提取细胞总蛋白,加入含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液,超声破碎后12000rpm离心5min,吸取上清,测定样品蛋白浓度后加入5Xloading buffer 100℃煮沸5min使蛋白变性。不同浓度的蛋白样品取等量蛋白样品20ug进行SDS-PAGE电泳,300mA湿转1.5h,5%脱脂牛奶室

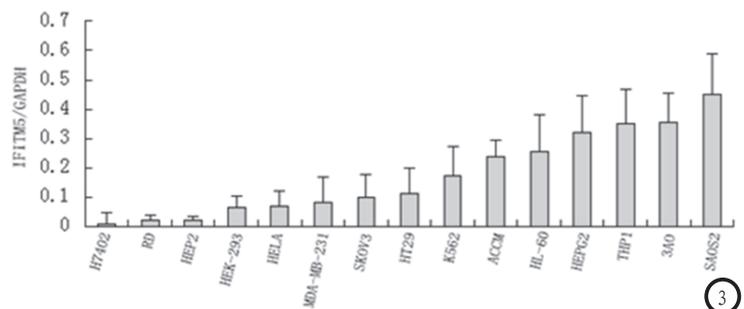
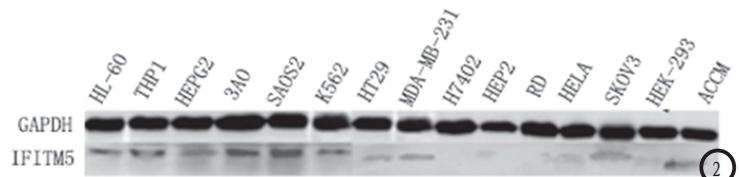
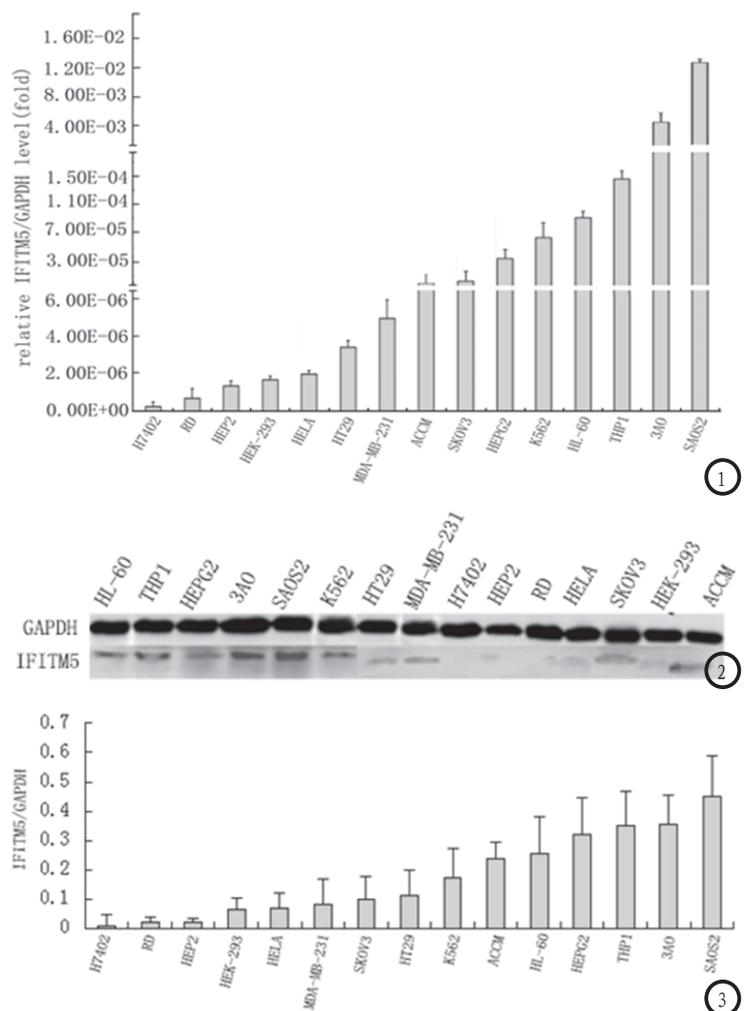


图1 不同癌细胞系IFITM5/GAPDH的基因相对差异表达。图2 不同癌细胞系IFITM5和GAPDH的蛋白表达。图3 不同癌细胞系IFITM5/GAPDH的灰度相对比值。

温封闭2h, TBST洗三遍, 一抗4℃过夜, TBST洗三遍, 二抗室温孵育1h, TBST洗三遍后化学发光显色, 利用富士LAS4000mini化学发光成像仪自动曝光成像显影。

3 实验结果

3.1 不同癌细胞系中IFITM5 mRNA表达差异 RT-QPCR结果显示: 不同癌细胞系中IFITM5的基因相对表达具有显著性差异, SAOS2、3A0癌细胞系中IFITM5的基因相对表达明显高于SKOV3、HEPG2等癌细胞系, 其中H7402、HEP2、RD癌细胞系IFITM5的基因相对表达量最低(图1)。

3.2 不同癌细胞系中IFITM5蛋白表达差异 Western blot结果显示: 不同癌细胞系的蛋白提取液在相对分子质量14.8KD处可检测到一条蛋白质条带, 其IFITM5蛋白表达水平不一, 其中在人成骨肉瘤(SAOS2)细胞系中表达量最高, 其次是人卵巢癌(3A0)细胞系, 人肝癌(H7402)细胞系表达量最低(图2)。图3中目的蛋白IFITM5与内参GAPDH灰度值的比值分析从0到0.45相差较大, 具有显著性差异。

4 讨论

干扰素诱导跨膜蛋白是干扰素介导的先天免疫系统的重要组成部分, 它们在肿瘤抑制中起着一定的作用, 这可能与它们控制细胞周期的能力有关。细胞从正常状态到癌变过程中IFITM会经常出现异常表达^[2]。同一个人正常组织、癌周组织和癌组织之间基因的表达存在差异显著性。不同的癌组织样本IFITM的表达高低不一, IFITM水平的上调或下调可能依赖于癌组织类型, 也可能一起作用于癌细胞的突变^[11-12]。IFITM在不同的肿瘤中可能具有不同的作用, 肿瘤发生涉及细胞周期控制的失活和DNA损伤修复能力的减弱。DNA损伤修复能力的缺失导致的DNA倒置、染色体重组等可能有IFITM基因的参与^[13]。IFITM基因表达水平缺失后肿瘤的症状就会明显, 所以该基因被认为具有肿瘤抑制作用。然而, 多数癌细胞解除了对IFITM基因转录的控制, 表明在癌症发展阶段至少有一种干扰素诱导跨膜蛋白基因在抗增殖通路中是保持沉默的^[2], 而IFITM5也是干扰素诱导跨膜蛋白基因家族成员之一, 其在人类免疫及癌症形成方面的相关研究较少, 尚有待于进一步探索。

本实验通过实时荧光定量PCR和Western blot对

15种癌细胞系进行基因和蛋白相对差异分析, 发现IFITM5在骨肿瘤以及人卵巢癌细胞系中高表达。在肝癌H7402与横纹肌肉瘤RD等细胞中表达量低。本研究结果显示IFITM5在多种癌细胞系中存在并有表达差异, 它是否可以作为骨肿瘤以及其它肿瘤的生物标记物及其与肿瘤的关系等尚有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Chen YX, Welte K, Gebhard DH, et al. Induction of T cell aggregation by antibody to a 16kd human leukocyte surface antigen [J]. *Immunol*, 1984, 133: 2496-2501.
- [2] Siegrist F, Ebeling M, Certa U. The small interferon-induced transmembrane genes and proteins [J]. *Interferon Cytokine Res*, 2011, 31: 1-197.
- [3] Li D, Peng Z, Tang H, et al. KLF4-mediated negative regulation of IFITM3 expression plays a critical role in colon cancer Pathogenesis [J]. *Clinical Cancer Research*, 2011, 17(11): 3558-3568.
- [4] Tanaka S S, Nagamatsu G, Tokitake Y, et al. Regulation of expression of mouse interferon-induced transmembrane protein like gene-3, Ifitm3 (mil-1, fragilis), in germ cells [J]. *Developmental dynamics*, 2004, 230(4): 651-659.
- [5] Ai H, Zhang Z, Shen Y, et al. Molecular structure, phylogenetic analysis, tissue distribution, and function characterization of interferon- γ -inducible lysosomal thiol reductase (GILT) gene in sheep (*Ovis aries*) [J]. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2011, 140(3): 329-334.
- [6] 沈媛媛, 武璁, 陶可, 等. 凋亡抑制基因survivin与卵巢癌的研究新进展[J]. *罕见疾病杂志*, 2012, 19(3): 47-64.
- [7] Moffatt P, Gaumont M H, Salois P, et al. Bril: a novel bone-specific modulator of mineralization [J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2008, 23(9): 1497-1508.
- [8] Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors [J]. *Journal of cellular biochemistry*, 2006, 99(5): 1233-1239.
- [9] N. Hanagata, T. Takemura, A. Monkawa, et al. Phenotype and gene expression pattern of osteoblast-like cells cultured on polystyrene and hydroxyapatite with pre-adsorbed type-I collagen [J]. *Biomed. Mater. Res. Part A*, 2007, 83: 362-371.
- [10] Nobutaka Hanagata, Xianglan Li, Hiromi Morita, et al. Characterization of the osteoblast-specific Transmembrane protein IFITM5 and analysis of IFITM5-deficient mice [J]. *Bone Miner*, 2011, 29: 279-290.
- [11] 韦伟, 叶静, 刘巧列, 等. 乳腺正常, 癌周和癌组织中ER mRNA表达一致性及其临床意义的探讨[J]. *罕见疾病杂志*, 2008, 15(6): 1-3.
- [12] Young JC, Dias VL, Loveland KL. Defining the window of germline genesis in vitro from murine embryonic stem cells [J]. *Biol Reprod*, 2010, 82(2): 390-401.
- [13] Zhao H, Boije H, Granberg F, et al. Activation of the interferon-induced STAT pathway during an adenovirus type 12 Infection [J]. *Virology*, 2009, 392(2): 186-195.

【收稿日期】2015-03-26