

doi:103969/j.issn.0490-6756.2016.01.033

人翻译延伸因子 eEF1A1 促进肺癌细胞 H1299 对紫杉醇和阿霉素药物耐受的研究

丁沐然, 刘涛, 李灵

(四川大学生命科学学院, 成都 610064)

摘要: 在已知人翻译延伸因子 eEF1A 的多功能性和与细胞存活相关的基础上, 本文进一步研究 eEF1A 的变体蛋白 eEF1A1 对癌细胞耐药性的影响. eEF1A1 基因的蛋白质编码区经过克隆, 并瞬时转染了人肺癌细胞 H1299, 在确定 eEF1A1 蛋白的胞内表达后, 采用 MTT 法测定高表达 eEF1A1 的 H1299 细胞对抗癌药物紫杉醇和阿霉素的耐受. 相对于对照细胞, eEF1A1 的高表达可显著提高 H1299 细胞对阿霉素和紫杉醇的耐受性. 通过耐药性测试揭示出 eEF1A 可能参与肿瘤发生的潜在功能.

关键词: 人翻译延伸因子; 阿霉素; 紫杉醇; 耐药性

中图分类号: Q291 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2016)01-0198-05

Human elongation factor1A1(eEF1A1) promotes drug tolerance in lung cancer cell line

DING Mu-Ran, LIU Tao, LI Lin

(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: Based on the knowledge of multifunctional roles of Human translational elongation factor 1A (eEF1A) and its relation to cell viability, the possible effect of the isoform eEF1A1 was studied on the drug resistance in cancer cell lines. The eukaryotic expression vector containing eEF1A1 sequence was constructed and was transiently transfected into human lung cancer cell line H1299. After verifying the expression of FLAG-eEF1A1, MTT assay was utilized to measure the cell viability of transfected H1299 after treatment by two common anti-cancer drugs. H1299 transfected with eEF1A1 showed enhanced drug tolerance to both taxol and adriamycin. Lung cancer cell highly expressing eEF1A1 behave more tolerance to antineoplastic drugs.

Key words: Eukaryotic Elongation Factor 1A1; Taxol; Adriamycin; Tolerance

1 引言

真核翻译延伸因子 eEF1A 是翻译系统中较为保守的功能性蛋白^[1]. 在核糖体进行多肽合成时, eEF1A 结合氨酰 tRNA 并将其携带至延伸核糖体

的 A 位点, 在 GTP 水解作用下完成氨酰 tRNA 的转运作用^[2]. 除了 eEF1A 在翻译中的关键功能, 很多研究均揭示了 eEF1A 所具有的多功能现象, 这包括其与细胞骨架蛋白的结合^[3], 参与细胞周期和蛋白质质量控制的调控^[4]和细胞核质转运的过

收稿日期: 2014-09-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000579)

作者简介: 丁沐然(1988-), 男, 贵州六盘水人, 硕士, 研究方向为基因的分子生物学. E-mail: bibailing_sg@sina.com

通讯作者: 李灵. E-mail: 3569879@qq.com

程^[5], 以及与病毒关键组分间的相互作用^[6]等。

作为一种具有重要生物学意义的蛋白, eEF1A 的表达量高低也被发现能够影响细胞的存活率。在鼠成纤维细胞中过表达 eEF1A 增强了血清饥饿引发的细胞凋亡^[7], 而降低 eEF1A 的表达量则会导致氧化胁迫介导的凋亡率上升^[8]。目前 eEF1A 已经被发现具有两种高度类似的变体形式, eEF1A1 和 eEF1A2^[9]。其中 eEF1A1 的表达量的增加与内质网胁迫引发的细胞死亡相关^[10], 而变体 eEF1A2 则在氧化胁迫中对细胞起到一定程度的保护作用^[11]。因此, 作为一种多功能蛋白, eEF1A 能够参与影响不同种类细胞在不同胁迫状态下的存活率。而是否 eEF1A 的表达量变化能够影响癌细胞的药物耐受性, 目前是未知的。

本文采用在肺癌细胞系 H1299 中过表达人源性的变体蛋白 eEF1A1 的策略, 初步研究了 eEF1A1 的表达量是否能够影响 H1299 细胞对两种通用抗肿瘤药物, 紫杉醇和阿霉素的耐受性。首先通过构建真核表达载体, 经转染 H1299 后通过免疫印迹和细胞免疫荧光定位确证了外源表达的 eEF1A1 在多肽序列和胞内定位的正确性。瞬时转染后的 H1299 细胞经过药物处理后, 通过 MTT 细胞活性检测方法来监测并测算瞬时高表达 eEF1A1 的 H1299, 发现了显著的存活率上升的现象。本文的研究进一步将 eEF1A 蛋白对细胞保护作用扩展到了药物耐受的方面, 这为后续的机制分析提供了有效的基础。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 质粒、菌株和细胞 含有人源蛋白 eEF1A1 编码序列的质粒 pcDNA3.1(+) 购自 Ori-gene, pcDNA3.1(+) 真核表达质粒、*E. coli* DH5 α 、人类肺癌细胞 H1299 细胞株, 由四川大学功能基因组实验室保存。

2.1.2 主要试剂 DMEM-细胞高糖培养基购自 Invitrogen 公司, anti-FLAG 抗体, anti-rabbit IgG、anti-mouse IgG 等抗体和细胞活性检测试剂 methylthiazoltetrazolium (MTT) 购自 Sigma Aldrich 公司, anti-EEF1A1 抗体购自 abcam 公司, 胎牛血清购自 HyClone 公司, 质粒小量提取试剂盒、胶回收试剂盒、1kbDNA 分子量 Marker 购自成都福际生物公司, PrimeSTAR DNA polymerase 购自 TAKARA 公司, Pre-stained

protein Marker、Unstained protein Marker、T4 DNA ligase、*Xho* I、*Bam*H I 限制性内切酶购自 Thermo scientific 公司。

2.2 方法

2.2.1 构建真核表达载体 根据 eEF1A1 的 CDS 区碱基序列设计上下游引物。在上游引物 5' 端依次添加保护碱基、酶切位点 *Xho* I、FLAG 标签短肽编码序列。下游引物添加酶切位点 *Bam*H I、终止密码子和保护碱基。PCR 引物由金唯智公司合成。以 eEF1A1 的 CDS 区序列作为模板, 使用上述合成的引物扩增目的片段。PCR 产物经过琼脂糖电泳回收和双酶切后连接到 pcDNA3.1(+) 载体上, 并将连接产物转化至感受态细胞 *E. coli* DH5 α , 通过菌液 PCR 的方式初步鉴定生长于抗性平板上的菌落, 最后通过双酶切鉴定出阳性重组质粒 pcDNA3.1-FLAG-eEF1A1。质粒经过金唯智公司测序后确定插入片段的正确性。

2.2.2 细胞瞬时转染 将 H1299 细胞培养于含 10% 胎牛血清和青-链霉素的完全培养基中, 在 37 $^{\circ}$ C, 5%CO $_2$ 培养箱中培养。依据转染试剂 LipofectamineTM 2000 说明书, 将 pcDNA3.1-FLAG-eEF1A1 和 pcDNA3.1(+) 对照质粒转染 H1299 细胞, 6h 后更换培养基。维持培养 48h。FLAG-eEF1A1 的表达通过免疫印迹确证后, 用于下游的分子检测实验和细胞药理实验。

2.2.3 免疫学实验 收取转染后的细胞, 在含非离子型去污剂的缓冲液中裂解, 17000g 离心 10min 收获细胞裂解上清。裂解液总蛋白样品经过标准 SDS-PAGE 分离并电湿转至硝酸纤维素膜上。含目的蛋白的硝酸纤维素膜经过针对不同靶蛋白的抗体孵育及二级抗体孵育后, 采用化学发光法检测信号, 最终结果通过 X 光底片曝光获得。针对目的蛋白在细胞内的定位检测, 在 96 孔板中培养并转染 H1299 细胞, 48h 后细胞经过固定和穿透处理后, 与相应的抗体于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 后用二级荧光素标记抗体结合, 并在荧光显微镜下观察细胞内部的荧光分布信号。

2.2.4 MTT 细胞存活率检测 将转染后的 H1299 细胞按个数为 5000 铺板于 96 孔板, 每孔 100 μ L 体积。不同的药浓度设置 3 个复孔, 24h 后更换含有不同药浓度的培养基并维持培养 48h。药处理以后向每孔直接添加 15 μ L MTT 溶液, 并于正常细胞培养条件下放置 4h。后吸取培养基混合液, 加入 100% DMSO 150 μ L, 在室温下晃摇

5min 以溶解胞内的显色物. 将处理完毕后的 96 孔板进行酶标仪扫描, 记录 544nm 波长的吸光值以间接反映细胞活性, 并以此吸光值减去背景值, 并除以阳性对照的吸光值, 来计算经过药物处理后细胞的存活率.

3 结果

3.1 eEF1A 克隆及重组质粒的鉴定

eEF1A1 的蛋白编码区长度为 1400bp, 我们用 2.2.1 中的引物序列进行特异性 PCR 扩增后, 通过电泳检测获得了符合预期结果长度的片段产物(图 1A). 经过筛选得到的重组质粒 pcDNA3.1-FLAG-eEF1A1 经过 *Xho* I、*Bam* H I 双酶切鉴定, 在电泳检测中能够分别得到预期的 PCR 目的片段长度及插入的 FLAG-eEF1A1 片段约 1400bp 大小的 DNA 条带(图 1B). 这表明我们获得了具有插入片段的真核表达载体. 将此载体样品送出分析碱基序列, 结果经过 NCBI 数据库比对后, 插入片段与 eEF1A1 的序列完全一致.

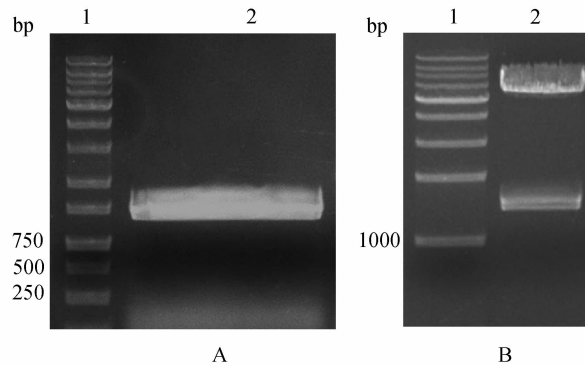


图 1 重组真核表达质粒 pcDNA3.1-FLAG-eEF1A1 的酶切鉴定

Fig. 1 verification of recombinant vector by double digestion

A. lane1: 1kb DNA Ladder; lane2: PCR product of eEF1A1; B. lane1: 1kb DNA Ladder; lane 2: Plasmid digested by *Xho* I and *Bam* H I.

3.2 eEF1A1 在 H1299 细胞株中瞬时表达与分析

分别使用 anti-actin、anti-FLAG 和 anti-eEF1A1 抗体, 对转染后的 H1299 细胞裂解液进行免疫印迹检测. 结果表明, 在总蛋白上样量一致的情况下, 转染有目的基因 FLAG-eEF1A1 的 H1299 在 50kDa 处具有明显的 FLAG 标签短肽信号, 并且其 eEF1A1 的蛋白表达量相对于对照转染组较高(图 2A). 为了进一步观测外源蛋白 FLAG-eEF1A1 是否也具有正常的细胞内定位. 瞬时转染 pcDNA3.1-FLAG-eEF1A1 的 H1299 经过

免疫荧光染色, 在细胞核以外的区域具有明显的荧光信号(图 2B). 这表明在瞬时转染的 H1299 细胞中, FLAG-eEF1A1 具有分子水平和细胞内定位水平的正确表达.

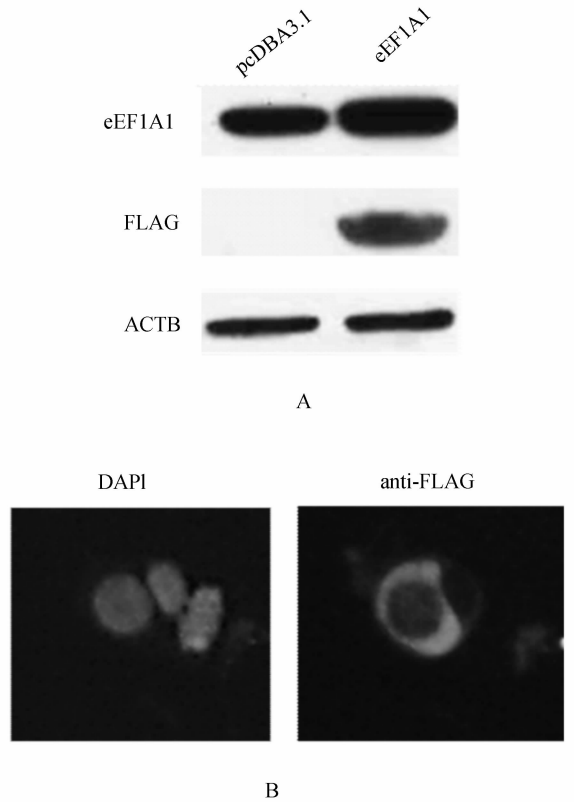


图 2 免疫学检测 FLAG-eEF1A1 的表达
Fig. 2 Verification of FLAG-tagged eEF1A1 expression in H1299 cells by Western blot and Immunofluorescence

A: Immunoblotting results from control and transfected H1299 cell lysates. B: Blue color indicates the nucleus of transfected H1299 cells. Green color represents the localization of FLAG-eEF1A1 in the same individual cell.

3.3 eEF1A1 的过表达增强了 H1299 对阿霉素和紫杉醇的药物耐受力

转染有 pcDNA3.1-FLAG-eEF1A1 和对照质粒 pcDNA3.1(+) 的 H1299 细胞在 96 孔板中进行药物处理实验. 所获得的数据经处理后得到不同药物浓度下的细胞存活率, 并对各个复孔进行统计学分析并绘制柱状图. 结果表明, 在相同浓度的紫杉醇, 一种抑制癌细胞分裂增殖的药物^[13], 过表达 FLAG-eEF1A1 的 H1299 细胞在 10~1000nM 浓度下的存活率相比于对照具有显著的提升(图 3A). 相应的, 在使用阿霉素, 一种常用的肿瘤治疗药物^[12] 进行处理的结果中, eEF1A1 的过表达也能促进 H1299 在较高浓度阿霉素处理下的存活率(图 3B).

4 讨 论

eEF1A 是一种广泛存在于人体各组织中的高含量蛋白, 目前所发现的两种变体 eEF1A1 和 eEF1A2

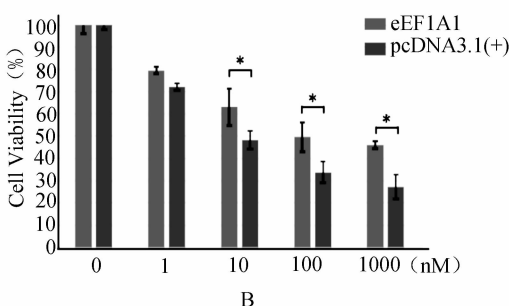
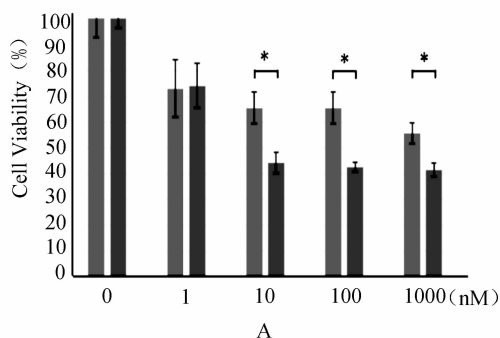


图 3 MTT 法检测紫杉醇和阿霉素处理后 H1299 细胞的存活率

Fig. 3 MTT analysis of H1299 cell viability after treatment with taxol and Adriamycin (1-1000 nM)

A. Taxol treatment. B. Adriamycin treatment. The cell viability is calculated by dividing the control OD values. Asterisk indicates the data significance from three independent experiments, with the student's *t*-test value $P < 0.05$.

均表明能够参与并直接影响细胞的存活率^[10,11]. 在肿瘤细胞中 eEF1A 的表达量呈现上升, 并且在淋巴瘤细胞中的 eEF1A1 能够结合寡核酸聚合体, 形成细胞毒性相关复合物^[12]. 这些研究均表明 eEF1A 的过表达以及肿瘤细胞活性之间所存在的关系.

本研究采用肺癌细胞系 H1299 作为实验对象, 通过转染获得 eEF1A1 短期表达量上升的 H1299 细胞, 并通过 MTT 细胞活性检测方法来评估高表达 eEF1A1 的细胞在耐药性方面的变化. 我们使用两种通用的抗癌药物紫杉醇和阿霉素对细胞进行浓度梯度处理, 在较高药物浓度下, 高表达 eEF1A1 的细胞均具有细胞存活率提升的现象. 且通过设置复孔和统计学显著性分析确证了数

据的可信度. 由于两种药物分别作用于微管蛋白和 DNA 拓扑异构酶, 来达到最终抑制细胞分裂的表型效果^[13,14]. 而我们的数据表明, 在 H1299 细胞系中的 eEF1A1 过表达均增强了其对紫杉醇和阿霉素的耐受性, 结合 eEF1A1 所具有的多功能性^[15], 我们推测 eEF1A1 是通过不同的途径和通路增强了 H1299 细胞对两种抗癌药物的耐受性.

本研究通过细胞水平的实验, 初步揭示了 eEF1A 的变体蛋白 eEF1A1 对癌细胞耐药性的增强作用, 这为接下来 eEF1A1 在癌症促发和癌症药理治疗的研究提供了参考和依据.

参考文献:

- [1] Andersen G R, Valente L, Pedersen L, *et al.* Crystal structures of nucleotide exchange intermediates in the eEF1A-eEF1Ba complex[J]. *Nature Structure & Molecular Biology*, 2001, 9: 531.
- [2] Murray J W, Edmonds B T, Liu G, *et al.* Bundling of actin filaments by elongation factor 1 α inhibits polymerization at filament ends[J]. *Journal of Cell Biology*, 1996, 135: 1309.
- [3] Hotokezaka Y, Többen U, Hotokezaka H, *et al.* Interaction of the eukaryotic elongation factor 1A with newly synthesized polypeptides [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277: 18545.
- [4] Mishra A K, Gangwani L, Davis R J *et al.* Structural insights into the interaction of the evolutionarily conserved ZPR1 domain tandem with eukaryotic EF1A, receptors, and SMN complexes [J]. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 2007, 104: 13930.
- [5] Zhou B, Liu J, Wang Q, *et al.* The nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus inhibits cell cytokinesis and proliferation by interacting with translation elongation factor 1 [J]. *Journal of Virology*, 2008, 82: 6962.
- [6] Chen E, Proestou G, Bourbeau D, *et al.* Rapid Up-Regulation of Peptide Elongation Factor EF-1a Protein Levels Is an Immediate Early Event during Oxidative Stress-Induced Apoptosis [J]. *Experimental Cell Research*, 2000, 259: 140.
- [7] Duttaroy A, Bourbeau D, Wang X-L, *et al.* Apoptosis rate can be accelerated or decelerated by over-expression or reduction of the level of elongation factor-1a [J]. *Experimental Cell Research*, 1998, 238: 168.
- [8] Chen E, Proestou G, Bourbeau D, *et al.* rapid up-

- regulation of peptide elongation factor EF-1a protein levels is an immediate early event during oxidative stress-induced apoptosis[J]. *Experimental Cell Research*, 2000, 259: 140.
- [9] Kahns S, Lund A, Kristensen P. The elongation factor 1 A-2 isoform from rabbit; cloning of the cDNA and characterization of the protein[J]. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26: 1884.
- [10] Borradaile N M, Buhman K K, Listenberger L L, *et al.* A critical role for eukaryotic elongation factor 1A-1 in lipotoxic cell death[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2006, 17: 770.
- [11] Chang R, Wang E. Mouse translation elongation factor eEF1A-2 interacts with prdx-I to protect cells against apoptotic death induced by oxidative stress [J]. *Journal of Cell Biochemistry*, 2007, 100: 267.
- [12] Dapas B, Tell G, Scaloni A, *et al.* Identification of different isoforms of eEF1A in the nuclear fraction of human T-lymphoblastic cancer cell line specifically binding to aptameric cytotoxic GT oligomers[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2003, 270: 3251.
- [13] Bharadwaj R, Yu H T. The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer [J] *Oncogene*, 2004, 23: 2016.
- [14] Momparler R L, Karon M, Siegel S E, *et al.* Effect of Adriamycin on DNA, RNA, and Protein Synthesis in Cell-free Systems and Intact Cells[J]. *Cancer Research*, 1976, 36: 2891.
- [15] Mateyak M K, Kinzy T G. eEF1A: Thinking outside the ribosome [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285: 21209.