# hFAM92A1 在人宫颈癌细胞不同周期时相的表达*

方 娟[1]，王 珺[1]，龚 坚[1]，王 燕[1]，阮绪芝[2**]
(1. 湖北医药学院 基础医学研究所，湖北 十堰 442000；2. 湖北医药学院 科技处，湖北 十堰 442000)

[摘 要] **目的**：探讨 hFAM92A1 在人宫颈癌 HeLa 细胞不同周期时相的表达差异。**方法**：常规培养 Hela 细胞，应用血清饥饿法将 HeLa 细胞同步化于 G1 期，胸腺嘧啶核苷双阻断法同步化于 S、G2 期，秋水仙素阻断法同步化于 M 期，应用流式细胞术检测同步化效率，应用 RT-PCR 方法检测 hFAM92A1 在人宫颈癌 HeLa 细胞不同周期时相的表达水平。**结果**：流式细胞仪检测细胞同步化效率 G1 期为 77.5%、S 期为 85.5%、G2 期为 61.9%、M 期为 44%；FAM92A1 基因在各期均有表达，但存在差异，以 S 期表达最高。**结论**：FAM92A1 基因在 HeLa 细胞不同周期时相的表达有较大差异。

[关键词] 基因；子宫颈；癌；细胞周期
[中图分类号] R737.33 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2015)03-0304-03

## Expression of hFAM92A1 in Different Cell Cycle Time Phases of Human Cervical Carcinoma HeLa Cells

FANG Juan[1], WANG Jun[1], GONG Jian[1], WANG Yan[1], RUAN Xuzhi[2]
(*Institute of Basic Medicine, Hubei Medical College, Shiyan 442000, Hubei, China; 2. Division of Science and Technology, Hubei Medical College, Shiyan 442000, Hubei, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the expression differences of hFAM92A1 in different cell cycle time phases of HeLa cells of human cervical carcinoma. **Methods**: HeLa cells were conventionally cultured and synchronized in G1 phase using serum starvation, synchronized in G2 and S phase using double thymidine blocking, synchronized in M phase using colchicine blocking, and synchronizing efficiency was tested by flow cytometry. RT-PCR method was adopted to detect the expression of hFAM92A1 in different cell cycle phases of HeLa cells. **Results**: Flow cytometry instrument detected cell synchronization efficiency as follows: G1 phase 77.5%, S phase 85.5%, G2 phase 61.9%, M phase 44%. FAM92A1 genes were expressed in each period but with differences, the highest expression was in S phase. **Conclusions**: FAM92A1 gene of HeLa cell expression in different cycle phases exhibit notable differences.

[**Key words**] genes; cervix uteri; carcinoma; cell cycle

细胞周期是指连续分裂的细胞从一次有丝分裂结束到下一次有丝分裂的整个连续的过程。细胞周期的运行受多个因素的影响，有 2 个调控点，一个是 G1/S 期转折点，另一个是 G2/M 期转折点，细胞周期失控运行将导致癌的发生。因此，增殖相关基因在肿瘤细胞周期调控中的作用研究是认识肿瘤发生机制的重要内容。FAM92A1 基因是在前期研究中发现的一个位于细胞核的基因[1-2]，在人多种正常组织和癌组织中广泛表达[3]，可能参与细胞周期调控。细胞周期调节异常是癌症研究领域的一个热点[4-8]。已有文献报道宫颈癌有细胞周期失控现象存在[9]。本实验通过研究 hFAM92A1 在人宫颈癌 HeLa 细胞不同周期时相的表达差异，为研究 hFAM92A1 基因的生物学功能

*[基金项目]湖北医药学院硕士启动金项目(No:2012ZRQDJ09)
**通信作者 E-mail:ranxuzhi@163.com
网络出版时间:2015-03-19 网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20150319.0926.001.html

奠定基础。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料和仪器

人宫颈癌 HeLa 细胞株由本室保存，DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司，胸腺嘧啶核苷、秋水仙素购自 Sigma 公司，Trizol 购自 Invitrogin，RT-PCR 引物由上海生工合成，逆转录试剂盒购自 Promega，细胞周期检测试剂盒购自凯基生物科技发展有限公司。所需仪器有 $CO_2$ 培养箱、低温冷冻离心机（Eppendorf）、倒置显微镜（莱卡）、PCR 仪（Eppendorf）、荧光定量 PCR 仪（ABI），流式细胞仪（FAC Scalibur），紫外分光光度仪（UV-3802）。

### 1.2　HeLa 细胞培养及同步化

用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基，5% CO2 培养箱中培养，细胞密度 90% 时，接种到 6 孔板中，取对数生长期细胞用于实验。G1 期细胞同步化采用血清饥饿的方法，当细胞密度达 80% 时，换成无血清培养基培养 42 h 后收集 G1 期细胞。S 期细胞同步化采用胸腺嘧啶核苷双阻断法，细胞密度达 80% 时，加入含终浓度为 2 mmol/L 胸腺嘧啶核苷的培养基培养16 h，弃去培养基，PBS 洗 2 遍，换成含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基，5% $CO_2$ 培养箱中培养 9 h，再加入含终浓度为 2 mmol/L 胸腺嘧啶核苷的培养基培养 16 h，弃去培养基，PBS 洗 2 遍，换成 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基，5% $CO_2$ 培养箱中培养 6 h 收集 S 期细胞；G2 细胞同步化采用胸腺嘧啶核苷双阻断法，在第二次阻断释放后培养 9 h 收集 G2 期细胞。M 期细胞同步化采用秋水仙素阻断法，细胞融合率达 80% 时，换成秋水仙素终浓度为1 mg/L的培养基，5% $CO_2$ 培养箱中培养 7 h 后收集 M 期细胞。

### 1.3　细胞周期同步化效率检测

收集到的各期细胞加 75% 的冰乙醇 5 mL 4 ℃ 固定过夜，1 000 r/min 离心 5 min 弃上清，加 PBS 洗涤，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清，加 100 μL RNaseA 37 ℃水浴 30 min，加 400 μL 碘化丙定（PI）染色混匀，4 ℃ 避光30 min，用流式细胞仪检测同步化效率。

### 1.4　细胞总 RNA 的提取

收集到的各期细胞分别加 500 μL Trizol 液充分裂解细胞，收集到无 RNA 酶的 EP 管中，加入 100 μL 氯仿，室温静置3 min，4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min，吸取上清，加入等体积的异丙醇，剧烈震荡 15 s，室温静置 10 min，4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min，弃上清，加入预冷 75% 乙醇 800 μL，4 ℃ 7 500 r/min 离心 5 min，弃上清，干燥 5 min，加入无 RNA 酶水 20 μL，取 1 μL RNA，按照 1∶50 的比例稀释后用紫外分光光度仪检测 $A_{260}$ 和 $A_{280}$ 的值，对总的 RNA 浓度进行定量分析，余下的放 -80 ℃ 保存。

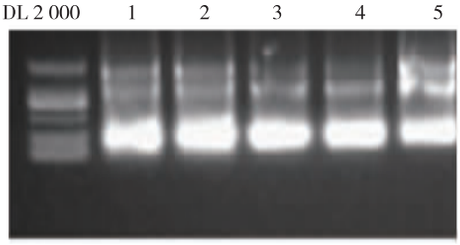
### 1.5　RT-PCR

收集同步化的各个周期时相的细胞，以不做任何处理 HeLa 细胞为对照，以 GAPDH 为内参，检测 HeLa 细胞中 FAM92A1 的表达。按照 Promega 逆转录试剂盒说明书操作，取 1 000 ngRNA 为模板，总体积为 20 μL，逆转录条件，70 ℃ 5 min，42 ℃ 1 h，95 ℃ 5 min，-20 ℃保存；RT-PCR，将上述逆转录产物稀释 10 倍后取2 μL为模板，反应总体积为 25 μL，反应条件为95 ℃ 2 min 预变性，95 ℃ 15 s，55 ℃ 22 s，72 ℃ 20 s，72 ℃ 5 min，36 循环，用琼脂糖凝胶方法分析。

## 2　结果

### 2.1　总 RNA 纯度

外分光光度仪检测吸光度结果，G1 期 $A_{260}$ 值为 0.245，$A_{260}/A_{280}$ 比值为 1.91；S 期 $A_{260}$ 值为 0.320，$A_{260}/A_{280}$ 比值为 2.01；G2 期 $A_{260}$ 值为 0.224，$A_{260}/A_{280}$ 比值为 1.95；M 期 $A_{260}$ 值为 0.106，$A_{260}/A_{280}$ 比值为 1.96。电泳结果清晰显示 5 S、18 S、28 S 三个条带，且 18 S 和 28 S 的灰度比为 1∶2，表明所提 RNA 纯度很高，能够满足下一步实验要求。见图 1。




注：DL2000 为标准分子量参照物大小为 2 000 bp、1 000 bp、750 bp、500 bp、250 bp，Hela 细胞 1 -5 分别为正常，G1、S、G2、M 各时相

图 1　Hela 细胞总 RNA 电泳图

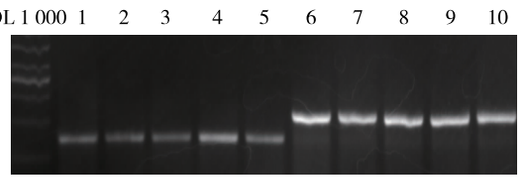
Fig. 1　Electrophoresis of total RNA of HeLa cells in each phase

**2.2** HeLa 细胞同步化效率检测

HeLa 细胞各期同步化后,经流式细胞仪检测,G1 期同步化效率为 77.5%,S 期同步化效率为 85.5%,G2 期同步化效率 61.9%,M 期同步化效率为 44%。

**2.3** FAM92A1 表达

RT-PCR 结果显示 FAM92A1 的表达随细胞周期时相的变化而存在差异,以 S 期表达量最高(如图 2)。




1 ~5 为对照、M 期、G2 期、S 期及 G1 期 HeLa 细胞中 FAM92A1 的表达, 6 ~10 为对照、M 期、G2 期、S 期及 G1 期 HeLa 细胞中 GAPDH 内参的表达

图 2 HeLa 细胞不同周期时相 FAM92A1 基因的表达

Fig. 2 FAM92A1 gene expression of HeLa cells in different phases

## 3 讨论

FAM92A1 基因是近期发现的一个新基因,与细胞增殖关系密切,在正常生长旺盛的组织和肿瘤组织中高度表达,参与细胞周期调控[10],但是其生物学功能目前尚不明确。

细胞正常的分裂、增殖、分化与衰老维持着机体的稳定,细胞周期的异常会导致这一过程的紊乱。许多生长因子、细胞因子、激素及癌基因产物对 DNA 代谢的调节都是通过影响细胞周期实现的,许多基因的表达又受到细胞周期的制约。调控细胞周期的核心因子就是细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK,cyclin dependent kinase),它与不同的细胞周期蛋白形成多种复合物,作用于细胞周期的不同时相,决定着细胞周期的进程。而近几年来陆续发现的多种细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白(CKI,cyclin dependent kinase inhibitor),更加深了对肿瘤发生机制的了解。

基因突变或基因表达异常是肿瘤发生的关键。为了深入研究 FAM92A1 基因的生物学功能,本研究从细胞周期入手,首先通过细胞同步化方法,将细胞同步化于 G1,S,G2,M 期,运用流式细胞仪检测同步化效率,接着运用 RT-PCR 证实 FAM92A1 在 HeLa 细胞各个时相均有表达,以 S 期表达量最高,G1,G2,M 期表达较低,这种各时相表达的差异性可能与 FAM92A1 在细胞周期中所起的调控作用关系密切。又知 S 期细胞的主要活动是进行 DNA 复制,DNA 复制完成与否直接影响细胞增殖周期的运行,hFAM92A1 基因过表达时发生 S 期阻滞,提示其与 DNA 复制有关。那么 FAM92A1 基因在其它肿瘤细胞各时相的表达及其具体的生物学功能又是怎么样的?有待于进一步的研究。

## 4 参考文献

[1] Ruan XZ, Yang HS, Yao SH, et al. Isolation and characterization of a novel Xenopus gene (xVAP019) encoding a DUF1208 domain containing protein[J]. Mol Reprod Dev, 2007(12):1505 - 1513.

[2] Liang S, Gong F, Zhao X, et al. Prokaryotic expression, purification of a new tumor-relative protein FAM92A1-289 and its characterization in renal cell carcinoma[J]. Cancer Lett, 2009(1):81 - 87.

[3] 陈洁,李瑞明,方娟,等. siRNA-FAM92A1_289 对 HeLa 细胞增殖的影响[J]. 湖北医药学院学报, 2011(2):105 - 108.

[4] Kaida A, Miura M. Visualizing the effect of tumor microenvironments on radiation-induced cell kinetics in multicellular spheroids consisting of HeLa cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013 (4):453 - 458.

[5] Ramaiah MJ, Pushpavalli SN, Lavanya A, et al. Novel anthranilamide-pyrazolo (1, 5-a) pyrimidine conjugates modulate the expression of p53-MYCN associated micro RNAs in neuroblastoma cells and cause cell cycle arrest and apoptosis[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2013(20):5699 - 5706.

[6] Yang F, Yi F, Han X, et al. MALAT-1 interacts with hnRNP C in cell cycle regulation[J]. FEBS Lett, 2013 (19):3175 - 3181.

[7] Aviner R, Geiger T, Elroy-Stein O,et al. Novel proteomic approach (PUNCH-P) reveals cell cycle-specific fluctuations in mRNA translation[J]. Genes Dev, 2013 (16):1834 - 1844.

[8] Choudhari AS, Suryavanshi SA, Kaul-Ghanekar R, et al. The aqueous extract of Ficus religiosa induces cell cycle arrest in human cervical cancer cell lines SiHa (HPV-16 Positive) and apoptosis in HeLa (HPV - 18 positive)[J]. PLoS One, 2013 (7):70127.

[9] 周玉宇,余海浪,马文丽. Let7a 在人宫颈癌 HeLa 细胞不同周期时相表达[J]. 南方医科大学学报, 2009(3):442 - 445.

[10] Annunziata C, Buonaguro L, Buonaguro FM, et al. Tornesello ML. Characterization of the human papillomavirus (HPV) integration sites into genital cancers[J]. Pathol Oncol Res, 2012(4):803 - 808.

(2014-12-06 收稿,2015-02-21 修回)

中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 赵 毅