

# 核糖体蛋白 S3 表达减少对果蝇发育的影响\*

李红艳

(西藏民族学院 医学院 高原环境与疾病相关基因研究实验室, 陕西 咸阳 712082)

**摘要:**为探讨核糖体蛋白 S3 在果蝇(*Drosophila*)发育中的作用,采用 RNAi 法,分别在果蝇和果蝇 S2 细胞中干扰核糖体蛋白 S3 表达,观察对果蝇表型的影响。结果显示,减少核糖体蛋白 S3 表达引起果蝇幼虫发育延迟,眼睛、翅膀和刚毛生长缺陷等。进一步实验表明,在翅原基中有明显的凋亡信号;S2 细胞数目减少;细胞凋亡和细胞周期相关基因表达异常。上述结果暗示核糖体蛋白 S3 表达减少导致的果蝇发育改变可能通过细胞凋亡的方式来实现。

**关键词:**果蝇;RNAi;细胞凋亡;细胞周期;核糖体蛋白 S3

**中图分类号:**Q344.1

**文献标志码:**A

**文章编号:**1672-6693(2014)03-0021-05

核糖体蛋白不仅在核糖体组装和蛋白合成中有重要作用,在细胞周期、凋亡、DNA 损伤修复等过程中同样发挥着一定作用。一些核糖体蛋白的异常表达与人类疾病的发生紧密相关。S3 是核糖体小亚基的一个成员,有核酸内切酶的活性,是凋亡前体蛋白,并且是 NF- $\kappa$ B 复合物中的一个重要亚基<sup>[1]</sup>。研究发现,S3 蛋白通过 caspase 依赖的方式激活 JNK,引起基因毒性应激产生细胞凋亡<sup>[2]</sup>。在果蝇(*Drosophila*)中发现,S3 基因进行 p 元件插入可引起 minute 表型<sup>[3]</sup>。但是有关 S3 蛋白对果蝇发育的全面报道及分子机制还鲜有报道。本研究基于前人的工作,采用 RNAi 法,在果蝇和果蝇 S2 细胞中降低 S3 蛋白的表达,从而实现对 S3 蛋白在果蝇生长发育中的作用的探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 S3RNAi 转基因果蝇的获取和培养

以果蝇 S3cDNA 为模板进行 PCR 扩增(上游引物:5-CAAAC TAGT ACCATGGGAATGAATGCGAAC-3;下游引物:5-CCAGAATTCCGCAAACTTTCGCCTCGGACAGATC-3)。将 PCR 产物克隆到 *Sym pUAST-w* 载体上,获得 S3-*Sym pUAST-w* 质粒。将 S3-*Sym pUAST-w* 质粒通过显微注射的方法注射到果蝇 W<sup>1118</sup> 胚胎中。具体步骤如下:选择极细胞形成前(即产卵后 10~30 min)的胚胎。显微镜下观察胚胎的极性,将含有 S3-*Sym pUAST-w* 质粒和缓冲液的溶液在压力泵负压作用下,经显微注射针注射到果蝇胚胎尾部生殖细胞内。注射过的胚胎继续培养。经多步筛选获取 S3RNAi 转基因果蝇。用到的其它果蝇品系:*act5c-Gal4*、*Hsp70-Gal4*、*ey-Gal4*、*gmr-Gal4*、*sca-gal4* 和 *vg-Gal4*。除特别说明,果蝇均在 18 °C/25 °C 的玉米粉-蔗糖培养基上培养。

### 1.2 统计果蝇幼虫体长

*Hsp70-Gal4* 雌蝇与 S3RNAi 雄蝇杂交,使之在培养基上间隔 1 h 产卵。产卵后 24 h,37 °C 热激 30 min。热激后间隔 24 h 随机收集幼虫,每组 10 只,直到对照组发育至蛹期。用配有 CCD 摄像头(莱卡)的 MZ16 体视显微镜对幼虫拍照。通过 MetaMorph 软件分析并统计幼虫体长。

### 1.3 吖啶橙染色

在 PBS 缓冲液中解剖 S3RNAi/*vg-Gal4* 三期幼虫翅膀 disc,解剖好的 disc 立即放到 4 °C 果蝇培养基(Gibco)中,使之维持正常的生理环境。再将之转移到一个加有 50  $\mu$ L 培养基的载玻片上,用 100  $\mu$ L 的培养基清洗 1 次。以浓度为 1  $\mu$ g/mL 的吖啶橙(Sigma)室温染色 5 min。染色后即刻用荧光显微镜拍照观察。

### 1.4 果蝇 S2 细胞中进行 S3RNAi

通过 PCR 扩增果蝇 S3 基因编码序列,其中采用的上游引物(含有一个 T7 启动子)为:5-TAATACGACTCACTATAGGGAGAATGCGAACCTTCCGATTT-3,采用的下游引物为:5-TAATACGACTCACTATAGG-GAGAACTTGGCAGCTGACCAC-3)。PCR 产物经纯化试剂盒纯化(Roche Molecular Biochemicals)。以纯化的产物为模板,用 MEGAscript T7 体外转录试剂盒(Ambion)合成单链 RNAs(ssRNAs)。ssRNAs 在 95 °C 持续 5 min,65 °C 中退火 30 min,自然降温至室温,即生成双链 RNAs(dsRNAs)。dsRNAs 经乙醇沉淀后重悬在合适体积的无 RNase 水中。通过琼脂糖凝胶电泳对 dsRNAs 进行定量,保存在-80 °C 备用。

果蝇 S2 细胞培养在 Schneider 基本培养基(Gibco)中,并补加终浓度为 10 % 胎牛血清(Gibco)、160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  青霉素、250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素和 4 mmol/L L-谷氨酸(Sigma)。S2 细胞中干扰 S3mRNA 表达:细胞以  $1 \times 10^6$  个/mL 的密度培养在 35 cm 培养盘的无血清培养基里。S3 dsRNAs (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 加到 1 mL 无血清培养基中,室温培养 1 h。1 h 后,补加终浓度为 10 % 胎牛血清的正常培养基 2 mL 继续培养。分别在干扰后的第 4、8 d 收集 S3RNAi 细胞,相同条件下,GFPdsRNA 用作对照。

### 1.5 RT-PCR

根据 RNeasy Mini Kit(Qiagen)试剂盒提取第 8 d S3RNAi 组和 GFP RNAi 组细胞总 RNA。在进行 RT-PCR 之前,提取的 RNAs 用 DNase (TaKaRa)进行处理。纯化的 RNA 用作第一链 cDNA 合成。用 M-MLV 反转录酶(Invitrogen)和 oligo-dT 引物合成 cDNA。为了检测是否有基因组污染,实验中同时检测了每一组 RNA 样品在没有加反转录酶时对照基因的表达。在 25  $\mu\text{L}$  反应体系中,每个样品用 1  $\mu\text{L}$  cDNA 做模板。PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min;94 °C 持续 30 s,60 °C 持续 30 s,72 °C 持续 45 s,如此 30 个循环;最后 72 °C 延伸 8 min。用到的引物见表 1。

### 1.6 统计分析

所有实验至少重复 3 次,通过 Excel 软件进行分析。数值以“平均值 $\pm$ 标准差”表示。用  $t$  检验进行显著性分析, $p < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 S3 蛋白表达减少对果蝇幼虫发育的影响

用 *act5c-Gal4* 和 *Hsp70-Gal4* 驱动子分别驱动 S3 蛋白在果蝇体内广泛和诱导性删除。结果发现 S3RNAi/*act5c-Gal4* 死在胚胎期,对照组发育正常。对照组在幼虫期维持 5~7 d,正常发育到蛹期和成蝇。最初 48 h,S3RNAi/*Hsp70-Gal4* 与对照组相比,体长无大的差异;72 h 后较对照组幼虫体长显著短小(图 1a、b)。S3RNAi/*Hsp70-Gal4* 发育延缓,在幼虫期维持 10~12 d,体长偏小,生命缺少活力,最终死在蛹期之前(图 1c)。上述结果表明 S3 蛋白在果蝇早期发育过程中有重要作用。

### 2.2 S3 蛋白表达减少对果蝇眼睛、翅膀和刚毛发育的影响

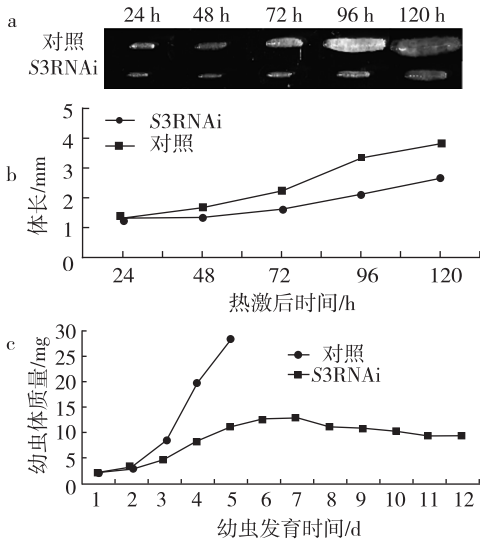
实验进一步用 *ey-gal4*、*gmr-gal4*、*vg-gal4* 和 *sca-gal4* 驱动子在果蝇眼睛、翅膀和刚毛中删除 S3 蛋白。果蝇复眼是由一定数目的单眼和特异性视网膜细胞精确排列组成的。S3RNAi/*ey-gal4*(图 2a、b)眼睛明显变小。*GMR-Gal4* 特异的驱动眼睛中的色素细胞和光感受器神经元<sup>[4]</sup>。S3RNAi/*gmr-Gal4* 眼中出现坏死样血斑(图 2c、d),表示在 S3RNAi 后有细胞死亡出现。S3RNAi/*vg-gal4* 翅膀变小,且有很多褶皱(图 2e、f)。另外 S3RNAi/*sca-gal4* 果蝇刚毛变短(图 2g、

表 1 RT-PCR 中用到的引物

Tab. 1 The primers for RT-PCR

基因名称	引物序列
S3	Forward, 5'-atgcgaaccttccgattt-3'
	Reverse, 5'-agcacctgctgggtcttgg-3'
<i>actin</i>	Forward, 5'-tgccatctacgagggttat-3'
	Reverse, 5'-agtacttgcgctctggcgg-3'
MCM5	Forward, 5'-tggaaggcttcgacgatgc-3'
	Reverse, 5'-caggacagcattggataga-3'
MCM3	Forward, 5'-gagggggagcagttcatca-3'
	Reverse, 5'-aaaccgtattcgttctccag-3'
<i>incenp</i>	Forward, 5'-atggaggacatcttggcgc-3'
	Reverse, 5'-ccgatcttacggttgatg-3'
<i>cyclin B</i>	Forward, 5'-cactggaagaacagcactgggc-3'
	Reverse, 5'-ggtggtgggcatcgtagatgtgt-3'
<i>p53</i>	Forward, 5'-catcggtgttattgcttca-3'
	Reverse, 5'-gctcaacgtaaggtgattt-3'
<i>hid</i>	Forward, 5'-tgctatagccctctacgag-3'
	Reverse, 5'-gatatgacggatgtggttc-3'
<i>cyclin E</i>	Forward, 5'-aacggagaagtggagcagcagcatag-3'
	Reverse, 5'-ctgagcttacggctccttg-3'
<i>cdc45</i>	Forward, 5'-atgtttgtccaggatctgcg-3'
	Reverse, 5'-gaccgaggaggcaaccgatgacag-3'

h)。这些表型说明 S3 蛋白表达减少后可能有细胞凋亡的发生,从而引起了异常表型的出现。



注:a. 热激后 S3RNAi/*Hsp70*-Gal4 幼虫和对照组幼虫体长;b. S3RNAi/*Hsp70*-Gal4 幼虫和对照组幼虫的体长比较,前 48 h,处理组和对照组幼虫体长差异不大;72 h 后 S3RNAi/*Hsp70*-Gal4 幼虫生长缓慢,体长显著短于对照组( $p < 0.05$ )。c. S3RNAi/*Hsp70*-Gal4 幼虫体重与对照组比较(5 d 之后对照组有幼虫开始进入蛹期;S3RNAi/*Hsp70*-Gal4 组在幼虫期维持 10~12 d,最终死在幼虫期)。

图 1 敲除 S3 蛋白引起幼虫生长阻滞

Fig. 1 Decreased expression of S3 protein caused the larvae growth arrest

### 2.3 吖啶橙染色和细胞计数

在 S3RNAi/*vg-gal4* 果蝇三期幼虫翅膀 disc 中,吖啶橙染色发现有明显的凋亡信号(图 3a)。而果蝇 S2 细胞在转染了 S3 dsRNAs 后,与对照组相比,细胞生长阻滞,数目明显减少(图 3b)。说明 S3 基因被删除后细胞增殖受到影响,并有细胞死亡的发生。这进一步证实了 S3 蛋白表达减少后引起的果蝇表型异常是由细胞凋亡引起。

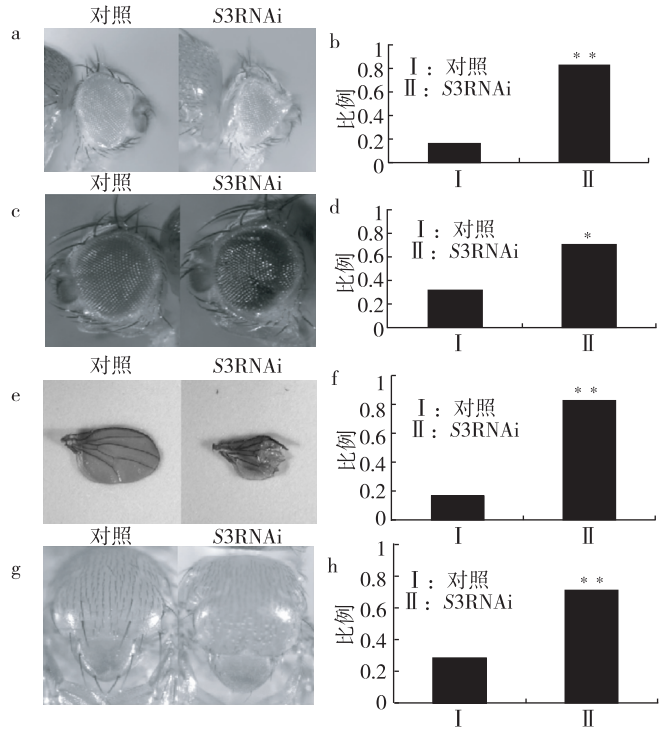
### 2.4 RT-PCR 检测 S3RNAi 后与细胞周期、细胞凋亡相关基因的变化

通过 RT-PCR 检测 S2 细胞中干扰 S3mRNA 后凋亡相关基因(*p53* 和 *hid*)和细胞周期相关基因(*MCM5*, *MCM3*, *cdc45*, *cyclin E*, *incenp* 和 *cyclin B*)的转录水平,结果如图 4a、b。在 S3RNAi 后 *p53* 和 *hid* 转录水平明显升高。而 *MCM5*, *MCM3*, *cdc45*, *cyclin E*, *incenp* 和 *cyclin B* 转录水平均降低。这种变化与它们各自在细胞凋亡中的作用一致,从而进一步证实了在 S3RNAi 后确实有凋亡的发生,并且与细胞周期异常相关。

## 3 讨论

本实验证实了 S3 蛋白对果蝇正常发育是不可缺少的。S3RNAi 后果蝇出现的缺陷表型暗示了,S3 蛋白表达减少可能抑制了细胞增殖,并造成细胞凋亡的出现。细胞的生长是由细胞增殖引起的细胞数目增加和细胞凋亡导致的细胞数目减少之间的动态平衡决定的<sup>[5]</sup>。细胞计数和免疫染色实验进一步验证了在 S3 干扰后确实有细胞凋亡的发生。RT-PCR 结果再一次证实了该结论。

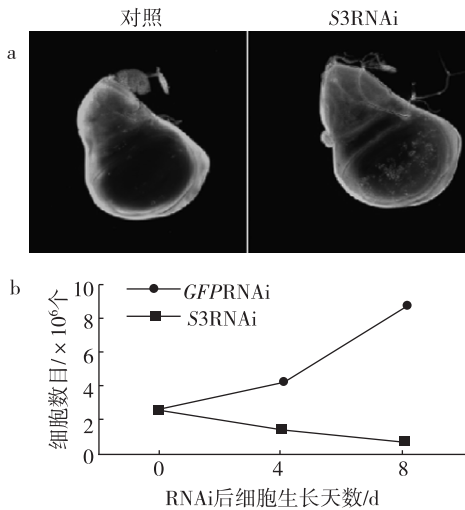
P53 蛋白通过释放细胞色素 C<sup>[6-7]</sup> 激活 caspase 启动细胞凋亡<sup>[8]</sup>。Hid 蛋白是果蝇中重要的凋亡诱导因子<sup>[9-10]</sup>,可直接或间接激活 *p53* 基因来诱导细胞凋亡<sup>[11]</sup>。并且 *hid* 基因还可以通过激活 caspase 诱导凋亡发生<sup>[12-13]</sup>。在 S3 基因干扰后 *hid* 和 *p53* 基因转录水平升高。*MCM3* 和 *MCM* 家族的其它成员在基因复制中有着重要作用<sup>[14]</sup>。在抑制细胞周期过程中 *p53* 基因负调控 *MCM5*<sup>[15]</sup>。而 *cdc45* 基因在调控细胞周期过程中与



注:S3RNAi/*ey-Gal4* 果蝇眼睛变小(a)及所占比例(b);S3RNAi/*gmr-Gal4* 眼睛中出现坏死样血斑(c)及所占比例(d);S3RNAi/*vg-Gal4* 翅膀缩小、褶皱(e)及所占比例(f);S3RNAi/*sca-Gal4* 刚毛变短(g)及所占比例(h)。

图 2 S3RNAi 对果蝇眼睛、翅膀和刚毛的影响

Fig. 2 Eye, wing and bristle defects in S3-depleted flies

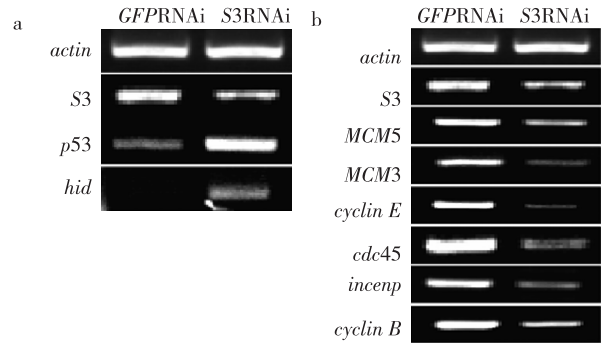


注:a. S3RNAi/*vg-Gal4* 翅膀 disc 中出现明显的凋亡信号;

b. S3RNAi 后 S2 细胞数减少,随着时间的延长,减少越明显。

图 3 S3RNAi 对果蝇翅膀 disc 及 S2 细胞数目的影响

Fig. 3 The effects of S3-depleted in flies on wing discs and in S2 cell on cell number



注:a. S3 基因敲除导致细胞凋亡诱导因子 *p53* 和 *hid* 的转录水平上升;b. 细胞周期调节因子 *MCM5*、*MCM3*、*cdc45*、*cyclin E*、*cyclin B* 和 *incenp* 的转录水平下降,而持家基因 *actin* 在 S3 基因敲除和 GF-PRNAi 细胞中都正常表达。

图 4 S3 基因缺失后引起细胞凋亡和细胞周期相关基因表达的改变

Fig. 4 Abnormal expression of the genes related to apoptosis and cell cycle in S3-depleted S2 cells

MCM5/*cdc46* 相互作用<sup>[16]</sup>。Cyclin B 表达水平降低可以引起 G2 阻滞,该过程受到 *p53* 基因依赖的转录抑制<sup>[17]</sup>。Incenp 与 Aurora B 和 survivin 相互作用,形成染色体分离所必须的复合物:Aurora B/*incenp*/*survivin*<sup>[18-20]</sup>。研究发现,*survivin* 表达水平升高可减少 *p53* 基因表达,是因为通过 caspases, Survivin 调控了 Mdm2 的分裂,从而增加了 *p53* 基因的降解。过表达 *cyclin E* 通过激活 caspase 诱导造血细胞凋亡<sup>[21]</sup>。在 S3RNAi 后 *MCM5*、*MCM3*、*cdc45*、*cyclin B* 和 *incenp* mRNA 表达减少,而 *cyclin E* mRNA 增加。

总之,S3RNAi 后检测到的细胞凋亡基因和细胞周期基因的变化均与它们在凋亡中的作用是一致的。S3RNAi 后通过细胞凋亡和细胞周期阻滞影响了果蝇发育,造成异常表型的出现。

致谢:感谢清华大学孙方霖教授给予的实验指导和经费支持以及课题组所有成员的帮助。

## 参考文献:

- [1] Wan F, Anderson D E, Barnitz R A, et al. Ribosomal protein S3: a KH domain subunit in NF-kappaB complexes that mediates selective gene regulation[J]. *Cell*, 2007, 131 (5):927-939.
- [2] Jang C Y, Kim H D, Kim J. Ribosomal protein S3 interacts with TRADD to induce apoptosis through caspase dependent JNK activation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 421(3):474-478.
- [3] Saeboe-Larssen S, Lyamouri M, Merriam J, et al. Ribosomal protein insufficiency and the minute syndrome in *Drosophila*: a dose-response relationship [J]. *Genetics*, 1998, 148 (3): 1215-1224.
- [4] Junger M A, Rintelen F, Stocker H, et al. The *Drosophila* forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling [J]. *J Biol*, 2003, 2(3):20.
- [5] Kastan M B, Canman C E, Leonard C J. P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 1995, 14(1):3-15.
- [6] Schuler M, Bossy-Wetzl E, Goldstein J C, et al. P53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (10): 7337-7342.
- [7] Chooi W Y, James S M, Burns D K. Decrease in ribosomal proteins 1, 2/3, L4, and L7 in *Drosophila melanogaster* in the absence of X rDNA[J]. *Mol Gen Genet*, 1982, 187 (3):364-369.
- [8] Fisher E M, Beer-Romero P, Brown L G, et al. Homologous ribosomal protein genes on the human X and Y chromosomes; escape from X inactivation and possible implications for Turner syndrome[J]. *Cell*, 1990, 63(6):1205-1218.
- [9] Grether M E, Abrams J M, Agapite J, et al. The head involution defective gene of *Drosophila melanogaster* functions in programmed cell death[J]. *Genes Dev*, 1995, 9 (14): 1694-1708.
- [10] White K, Grether M E, Abrams J M, et al. Genetic control

- of programmed cell death in *Drosophila* [J]. *Science*, 1994, 264(5159): 677-683.
- [11] Brodsky M H, Weinert B T, Tsang G, et al. *Drosophila melanogaster* MNK/Chk2 and p53 regulate multiple DNA repair and apoptotic pathways following DNA damage[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(3): 1219-1231.
- [12] White K, Tahaoglu E, Steller H. Cell killing by the *Drosophila* gene reaper [J]. *Science*, 1996, 271 (5250): 805-807.
- [13] Zhou L, Schnitzler A, Agapite J, et al. Cooperative functions of the reaper and head involution defective genes in the programmed cell death of *Drosophila* central nervous system midline cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(10): 5131-5136.
- [14] Kearsley S E, Maiorano D, Holmes E C, et al. The role of MCM proteins in the cell cycle control of genome duplication[J]. *Bioessays*, 1996, 18(3): 183-190.
- [15] Agarwal M K, Ruhul Amin A R, Agarwal M L. DNA replication licensing factor minichromosome maintenance deficient 5 rescues p53-mediated growth arrest[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(1): 116-121.
- [16] Hardy C F. Identification of Cdc45p, an essential factor required for DNA replication[J]. *Gene*, 1997, 187(2): 239-246.
- [17] Krause K, Wasner M, Reinhard W, et al. The tumour suppressor protein p53 can repress transcription of cyclin B [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(22): 4410-4418.
- [18] Sugihara Y, Honda H, Iida T, et al. Proteomic analysis of rodent ribosomes revealed heterogeneity including ribosomal proteins L10-like, L22-like 1, and L39-like[J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(3): 1351-1366.
- [19] Cheeseman I M, Anderson S, Jwa M, et al. Phospho-regulation of kinetochore-microtubule attachments by the Aurora kinase Ipl1p[J]. *Cell*, 2002, 111(2): 163-172.
- [20] Bolton M A, Lan W, Powers S E, et al. Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation[J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(9): 3064-3077.
- [21] Mazumder S, Gong B, Almasan A. Cyclin E induction by genotoxic stress leads to apoptosis of hematopoietic cells [J]. *Oncogene*, 2000, 19(24): 2828-2835.

## Animal Sciences

### The Effect of Decreasing the Expression of Ribosomal Protein S3 on *Drosophila* Development

LI Hong-yan

(Gene Research Laboratory of Plateau Environment and Disease, School of Medicine, Tibet University for Nationalities, Xianyang Shaanxi 712082, China)

**Abstract:** In order to clarify the role of ribosomal protein S3 in *Drosophila* development, we investigated developmental changes after S3RNAi. The results showed that the down-regulation expression of ribosomal protein S3 in *Drosophila* causes profound delay in larval development, strong defects on eye, wing and bristle. Further, apparent apoptosis in the wing disc was observed by S3RNAi; the cell number was reduced and the expression of these genes related to cell cycle and apoptosis were abnormal. These data indicated that the effect of S3RNAi on *Drosophila* development may be achieved by apoptosis.

**Key words:** *Drosophila*; RNAi; apoptosis; cell cycle; ribosomal protein S3

(责任编辑 方 兴)