

E-cadherin 启动子调控的慢病毒荧光报告载体的构建

何 倩, 杨耿兵, 姚 超, 钱 程

(浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018)

摘 要: E 钙黏素(E-cadherin)的缺失是上皮-间质转化(EMT)的重要标志,而 EMT 可促进肿瘤细胞的浸润及转移。为进一步研究 E-cadherin 与 EMT 的关系,研究构建了 E-cadherin 启动子驱动黄色荧光蛋白慢病毒表达载体,构建的载体经酶切鉴定正确;采用磷酸钙法包装出慢病毒,取病毒上清感染人肝癌 PLC/PRF/5 细胞株,通过荧光观察和 qRT-PCR 实验结果显示 E-cadherin 在靶细胞中稳定高表达。该载体的构建为深入研究 E-cadherin 相关的 EMT 现象提供了良好的工具。

关键词: E-cadherin; 慢病毒载体; 黄色荧光蛋白

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A

0 引 言

上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指上皮细胞失去极性,转变成具有迁移能力的间充质细胞表型的过程。这种转变在胚胎发育的过程中扮演着重要的角色。日益增多的实验证据表明,恶性肿瘤细胞在向周围组织侵袭和向远处器官转移的过程中也存在 EMT 现象。上皮源性的恶性肿瘤细胞通过 EMT 过程而失去彼此间的连接,丧失极性,细胞形态改变,迁移能力增强,从而获得侵袭和转移能力^[1-2]。EMT 现象在肝癌中的存在并促进肝癌的侵袭转移已被大量的文献报道,并且被认为是肝癌侵袭转移的主要机制之一。

肿瘤细胞中 E 钙黏素(E-cadherin)的缺失在 EMT 中不仅被认为是肿瘤细胞失去上皮特性的标志,同时也是促进肿瘤细胞转移的重要表现。E-cadherin 是上皮组织中的一类跨膜糖蛋白,该分子依赖 Ca^{2+} 对细胞进行黏连。当 E-cadherin 表达下调或其他因素损害 E-cadherin 的黏附功能时,肿瘤细胞就易于脱离原发灶进而发生侵袭转移。因此,E-cadherin 在肿瘤细胞 EMT 中的调节机制对

于研究 EMT 现象有着极其重要的意义,近年来已成为肿瘤细胞侵袭和转移研究的热点之一。慢病毒载体(lentiviral vector)作为一种高效的逆转录病毒载体,可以将外源基因有效地整合到宿主基因组上,从而达到持久性表达^[3]。本研究拟构建的 E-cadherin 启动子携带黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP)的慢病毒表达载体,将与 EMT 相关的标志物启动子和荧光蛋白报告基因协同起来,达到体内外示踪定位目的,并为进一步探讨 E-cadherin 在 EMT 发生和发展中的作用提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

KOD-Plus (TOYOBO 公司); T4 连接酶(Promega 公司); 基因组 DNA 提取试剂盒(QIAGEN 公司); 胶回收试剂盒、质粒大抽试剂盒(Omega 公司); 限制性内切酶(Fermentas 公司); DNA Marker、SYBR^(R) Premix Ex TaqTM (Takara 公司); 大肠杆菌 TOP10 (本实验室保存); 慢病毒骨架质粒(pRRLSIN, cPPT, PGK-GFP, WPRE,

以下简称 Lv-PGK-GFP) 及 3 个包装质粒(pMD2. G、pMDLg/pRRE、pRSV-Rev) 由本实验室保存, pTurboYFP-C (Evrogen JSC 公司); 病毒包装细胞 293FT、Hela 细胞、人肝癌 PLC/PRF/5 细胞(本实验室保存)。

1. 2 实验方法

1. 2. 1 PCR 扩增引物与 Linker 的设计

根据 Genbank 序列库中 E-cadherin 的基因序列, 采用 Primer 5. 0 软件设计了 4 条巢式 PCR 引物: E-1: 5'CGGCGGGGCTGGGATTCG3', E-2: 5'CCATGGCTGGCCGGGGAC3', E-3: 5'ATCGATGCTCCAGGCTAGA3', E-4: 5'ACCGGTGGAGCGGGCTGGA3'。

连接 E-cadherin 与黄色荧光蛋白 YFP 的中间接头是一个 129bp 的 Linker, 序列如下: 5'ATCGATGGATCCACCGGTCGCGATCTAGAATAACTTGGTATAGCATACATTATACGAACGGTAGATATCATTAATGGTACCGCGGCCGCTACCGTTCGTATACGATACATTATACGAAGTTATGTGCAAC3'。

qRT-PCR 引物: E-u: 5'TGCCCAGAAAATGAAAAAGG3', E-d: 5'GTGTATGTGGCAATGCGTTTC3'

引物和 Linker 均由南京金斯瑞生物科技公司合成。

1. 2. 2 目的片段的扩增

E-cadherin 启动子的扩增: 按照试剂盒说明书, 抽提 Hela 细胞系的基因组 DNA。第一轮 PCR 反应: 10 × PCR Buffer 2 μL, 2mM dNTPs 2 μL, 25mM MgSO₄ 1 μL, 引物 E-1、E-2 各 0. 5 μL, KOD-Plus 0. 5 μL, 模板(Hela 细胞系的基因组 DNA) 50 ng, ddH₂O 补足至 20 μL。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 15 s, 55℃ 退火 30 s, 68℃ 延伸 30 s, 反应为 30 个循环。取 5 μL PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。第二轮 PCR 反应: 10 × PCR Buffer 2 μL, 2 mM dNTPs 2 μL, 25 mM MgSO₄ 1 μL, 引物 E-3、E-4 各 0. 5 μL, KOD-Plus 0. 5 μL, 模板(第一轮 PCR 反应产物) 0. 2 μL, ddH₂O 补足至 20 μL。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 15 s; 55℃ 退火 30 s; 68℃ 延伸 30 s, 反应为 30 个循环。取 5 μL PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。得到符合预期长度的片段后按照 DNA 凝胶回收试剂盒说明书纯化回收扩增产物。

1. 2. 3 重组慢病毒表达载体的构建

将 PCR 扩增出的 pE-cad 和合成的 Linker (已连有 2822bp 大小的 pMD19-T Simple Vector) 分别经 *Cla*I 和 *Age*I 双酶切, 酶切产物在 T4 DNA 连接酶作用下于 16℃ 连接过夜, 连接产物经 PCR 和 *Xba*I 酶切鉴定, 正确者命名为 T-pEcad。将 T-pEcad 经 *Xba*I 和 *Age*I 双酶切, 回收后与同样经 *Xba*I 和 *Age*I 双酶切的 pTurboYFP-C 连接, 经 *Sph*I 酶切鉴定, 正确者命名为 T-pEcad-YFP。进而将 T-pEcad-YFP 和慢病毒载体 Lv-PGK-GFP 分别经 *Cla*I 和 *Sal*I 双酶切, 回收目的条带后, 连接、转化, 经 *Eco*RI 和 *Pst*I 酶切鉴定, 正确者命名为 Lv-pEcad-YFP, 用 Omega 公司无内毒素质粒提取试剂盒抽提质粒, 用于转染。

1. 2. 5 慢病毒的包装

在转染之前, 将 293FT 细胞接种于 10 cm 细胞培养皿中, 培养基为含 10% 胎牛血清的 DMEM, 待细胞生长到 70%~80% 汇合, 将慢病毒包装质粒按 Lv- pEcad-YFP 15 μg、pRsv-REV 10 μg, pMDLg/pRRE 15 μg, pMD2. G 7. 5 μg 比例混合, 采用磷酸钙法共转染 293FT 细胞, 12 h 后更换为完全培养基继续培养, 48 h 和 72 h 收集病毒上清, 4℃, 3 000 r/min 离心 10 min 后用 0. 45 μm 滤膜 (Millipore, Corning, NY, USA) 过滤, 分装后冻存于 -80℃ 备用。采用荧光实时定量 PCR 检测病毒滴度。

1. 2. 6 慢病毒感染肝癌 PLC/PRF/5 细胞

转染前将 PLC/PRF/5 细胞接种至 24 孔板中, 1×10⁵ 细胞/孔, 待培养细胞达到 80%~85% 汇合, 去除孔内的培养基, 将含 200 μL 病毒上清的完全培养基加入细胞培养孔中, 病毒感染的同时加入工作液浓度为 5 μg/μL 的聚凝胺 (polybrene) 以增加感染效率, 次日去除含病毒的培养基, 更换为 1 mL 的完全培养基。72 h 后倒置荧光显微镜下观察、照相。

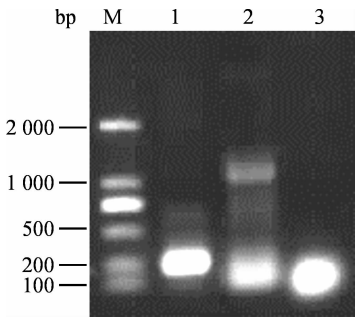
1. 2. 7 感染细胞株外源性 YFP 表达水平与内源性 E-cadherin 表达水平的相关性检测

将上一步已感染病毒的 PLC/PRF/5 细胞经流式细胞仪分选出 YFP 表达阴性和阳性的细胞, 分别提取 RNA 并逆转录得到 cDNA, 利用荧光实时定量 PCR 检测 E-cadherin 的表达差异。

2 结果与分析

2. 1 E-cadherin 启动子的扩增及鉴定

PCR 成功扩增出 E-cadherin 启动子, 电泳结果第 1 泳道可见大小约为 245 bp 的特异性条带(图 1)。

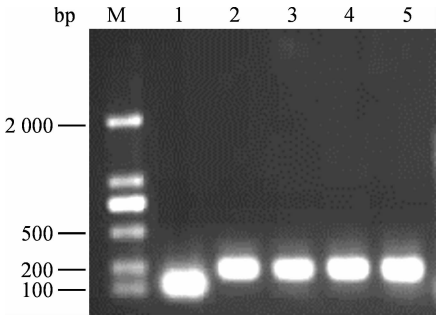


M 为 Marker DL2000;1,2 为 E-cadherin 启动子 PCR 产物;
3 为阴性对照

图 1 E-cadherin 扩增电泳图

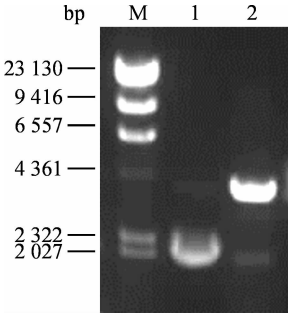
2.2 载体的酶切电泳鉴定结果

载体 T-pEcad 以 E-cadherin 启动子特异性引物进行 PCR 鉴定,成功扩增得到 245 bp 左右的目的条带,表明已经连接成功(图 2)。载体 T-pEcad-YFP 经 *Sph*I 酶切鉴定,得到 3 807 bp,表明 YFP 连接成功(图 3)。最终载体 Lv-pEcad-YFP 分别经 *Eco*RI 和 *Pst*I 酶切鉴定,均能得到 7 155 bp 大小片段,表明成功引入 pEad-YFP 表达盒(图 4)。



M 为 Marker DL2000;1 为 PCR 扩增的阴性对照;
2~5 为 T-pEcad 质粒的 PCR 扩增鉴定

图 2 T-pEcad 载体经 PCR 鉴定电泳图

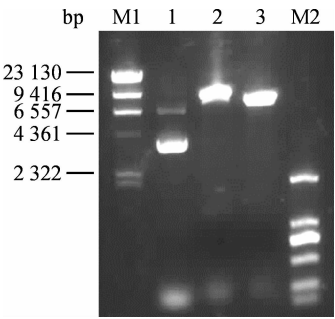


M 为 Marker λ -HindIII;1 为 T-pEcad-YFP 质粒对照;
2 为 T-pEcad-YFP 质粒的 *Sph*I 酶切结果

图 3 T-pEcad-YFP 载体经 *Sph*I 酶切鉴定电泳图

2.3 慢病毒的获得

Lv-pEcad-YFP 和 包装质粒 pMD2. G、pMDLg/pRRE、pRSV-Rev 共转染 293FT 细胞,72 h 后,倒置荧光显微镜下可见黄色荧光,证明转染成功(图 5)。



M1 为 Marker λ -HindIII;1 为 Lv-pEcad-YFP 质粒对照;
2 为 Lv-pEcad-YFP 质粒的 *Eco*RI 酶切结果;3 为 Lv-pEcad-YFP 质粒的 *Pst*I 酶切结果;M2 为 Marker DL2000
图 4 Lv-pEcad-YFP 载体分别经 *Eco*RI 和 *Pst*I 酶切电泳图

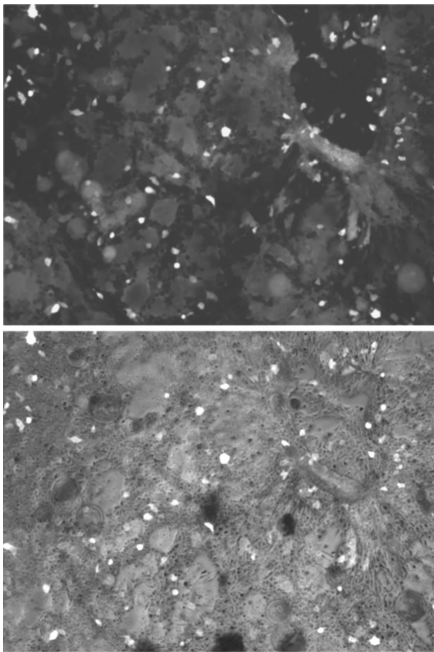


图 5 慢病毒 Lv-pEcad-YFP 和包装质粒共转染 293FT 细胞后荧光检测结果

2.4 慢病毒对人肝癌 PLC/PRF/5 细胞的感染

将收获的慢病毒上清感染人肝癌 PLC/PRF/5 细胞 72 h 后,倒置荧光显微镜下可观察到大量黄色荧光(图 6),证明感染成功。

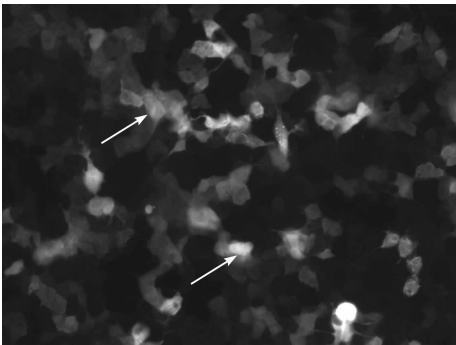


图 6 慢病毒 Lv-pEcad-YFP 感染人肝癌 PLC/PRF/5 细胞 72 h 后荧光检测结果

2.5 慢病毒感染 PLC/PRF/5 细胞后的 E-cadherin 表达

将已感染慢病毒的 PLC/PRF/5 细胞经流式细胞仪分选出 YFP 表达阴性和阳性的细胞,荧光实时定量 PCR 检测到 YFP 阳性细胞的 E-cadherin 表达量远高于 YFP 阴性细胞(图 7),表明外源性 YFP 表达水平可有效指示内源性 E-cadherin 表达水平,反映该报告系统工作良好。

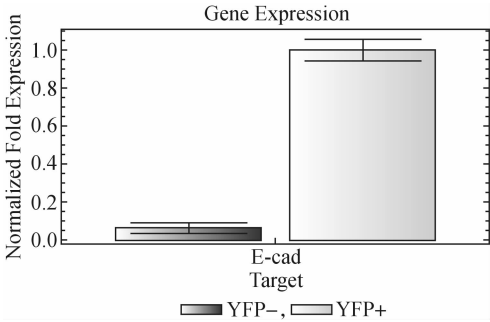


图 7 YFP 阴性与阳性的 PLC/PRF/5 细胞中 E-cadherin 的表达差异

3 结 论

上述结果表明,慢病毒载体质粒 Lv-pEcad-YFP 构建成功,且利用磷酸钙法成功生产出目的病毒,并获得了稳定感染有病毒的人肝癌细胞株 PLC/PRF/5 细胞株,实时定量 PCR 结果初步显示该系统工作良好与预期一致。

4 讨 论

上皮间质转化(EMT),是一种哺乳动物胚胎发育过程中必需的生理现象。近来已有研究证实 EMT 在早期肿瘤向侵袭性的恶性肿瘤转化过程中扮演了重要的角色。大量证据表明,EMT 表型的获得往往密切参与肿瘤的发生,肿瘤细胞通过 EMT 获得侵袭性,以实现对其周围组织的浸润和远处器官的转移^[4-6]。

E-cadherin 作为一类主要介导细胞间同质粘附的钙依赖性跨膜糖蛋白,对维持细胞形态、细胞运动及粘附功能具有重要作用。已有研究证实,其表达的降低与肿瘤的分化、侵袭和转移有显著的相关性^[7]。而 E-cadherin 的减少或缺失正是 EMT 最重要的标志性变化,近年来已成为研究肿瘤细胞侵袭和转移的热点。

本次课题研究中选用的慢病毒载体,是近年来公认的最有潜力的一类病毒载体。其最大的特点是对分裂和非分裂的细胞均能有效感染,是一种高效

的基因传递工具,具有容纳外源性目的基因片段大、安全性好、重组机会低、可将所携带的目的基因有效整合到宿主染色体中并稳定长期表达等优点^[8]。同时以报告基因——黄色荧光蛋白作为标志基因。该蛋白作为一种从水母中获得的,介于绿色荧光蛋白和红色荧光蛋白之间的一种荧光蛋白,具有在哺乳动物细胞中表达较快,无细胞毒性,便于活体测定等优点,此外,YFP 标记的细胞还可方便地通过流式细胞仪检测与分离、活体成像等优势,因此该蛋白已成为构建体内、体外荧光指示模型的优选对象。

据此,本研究成功构建携带有 E-cadherin 启动子驱动黄色荧光蛋白(YFP)表达盒的慢病毒报告系统,并初步证实了该系统工作良好,从而为体内外示踪、定位肿瘤细胞上皮-间质转化现象提供了有用的工具。

参考文献:

[1] Their J P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression[J]. Nature Reviews Cancer, 2002, 2(6): 442-454.

[2] Thiery J P, Acloque H, Huang R Y J, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. Cell, 2009, 139(5): 871-890.

[3] Miyoshi H, Takahashi M, Gage F H, et al. Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(19): 10319-10323.

[4] Brabletz T, Jung A, Reu S, et al. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(18): 10356-10361.

[5] Brabletz T, Jung A, Spaderna S, et al. Migrating cancer stem cells: an integrated concept of malignant tumour progression[J]. Nature Reviews Cancer, 2005, 5(9): 744-749.

[6] Lee J M, Dedhar S, Kalluri R, et al. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease[J]. Journal of Cell Biology, 2006, 172(7): 973-981.

[7] Yap A S, M S Crampton, J Hardin. Making and breaking contacts: the cellular biology of cadherin regulation[J]. Current Opinion in Cell Biology, 2007, 19(5): 508-514.

[8] Naldini L, Blomer U, Gallay P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector[J]. Science, 1996, 272(5259): 263-267.

Preliminary Study of Hela Cell Treated with *Pinellia ternata* lectin

FENG Rui-juan, LIU Xue-feng, WANG Bo, CHEN Wen-duo, DONG Miao, XU Tao

(Institute of Bioengineering, School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: One kind of *Pinellia ternata* lectin is isolated from the total protein of *Pinellia ternata* via mannose-Sepharose 4B affinity chromatography. The cultured Hela cell added with different concentrations of lectin is detected via the MTT method and observed with an inverted phase contrast microscope. The results showed that low concentrations (0.004 mg/mL, 0.02 mg/mL, 0.1 mg/mL) of *Pinellia ternata* lectin can promote the proliferation of Hela cells, but high concentrations (0.5 mg/mL, 1 mg/mL) of *Pinellia ternata* lectin can inhibit the proliferation of Hela cells.

Key words: *Pinellia ternata* lectin; affinity column; isolation and purification; Hela cell; MTT method

(责任编辑: 许惠儿)

(上接第 846 页)

Construction of Lentiviral-based System with Fluorescent Reporter Gene Regulated by E-cadherin Promoter

HE Qian, YANG Geng-bing, YAO Chao, QIAN Cheng

(School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: The loss of E-cadherin is a significant marker of epithelial-mesenchymal transition (EMT), which promotes the progression of tumor invasion and metastasis. To further examine the relationship between E-cadherin and EMT, the lentiviral vector with yellow fluorescent protein reporter gene driven by E-cadherin promoter is successfully constructed. The supernatant of virus-producing cells transfected by calcium phosphate is then used to transfect PLC/PRF/5 cells. The fluorescent microscopy and qRT-PCR results show that the E-cadherin gene is expressed highly and stably in the target cells. This work is expected to provide a high-quality transfection vector for further research on the relevant functions of the E-cadherin gene and EMT.

Key words: E-cadherin; lentiviral vector; yellow fluorescent protein

(责任编辑: 许惠儿)