论著

文章编号:1000-5404(2005)19-1928-03

pEGFPC1-uPAR 重组质粒的构建及对细胞增殖和侵袭性的影响

高强国,符 刚,曾益军,杨 恬 (第三军医大学基础医学部细胞生物学教研室,重庆 400038)

提 要: 目的 构建含人 uPAR 基因片断的真核表达绿色荧光蛋白质粒,并进行初步的细胞生物学研究。**方法** 设计引物,利用 PCR 从原核表达质粒中扩增人全长 uPAR 基因,并导入真核表达载体绿色荧光蛋白质粒 pGFPC1 中,测序确认后转染 Pam 212 细胞,使之在细胞中表达,检测其细胞生长特性和侵袭能力的变化。**结果** 测序证实构建的含 uPAR 的绿色荧光蛋白质粒,其 uPAR cDNA 阅读框完整,连接部位序列正确;转染 Pam 212 细胞后,能促进细胞的生长并能增强细胞的侵袭能力。**结论** 成功构建了含 pEGFPC1-uPAR 质粒,确认 uPAR 能促进 Pam 212 细胞的生长和侵袭,为进一步在体定位研究打下了基础。

关键词: uPAR; pEGFPC1; Pam 212 细胞

中图法分类号: R329.28; R394-33; R394.2 **文献标识码**: A

Construction and expression of recombinant plasmid pEGFPC1-uPAR in Pam 212 cells

GAO Qiang-guo, FU Gang, ZENG Yi-jun, YANG Tian (Department of Cell Biology, College of Medicane, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct the eukaryotic expression plasmid of pEGFPC1-uPAR gene and explore the effect on the proliferation and invasion ability of Pam 212 cells. Methods The human uPAR cDNA was cloned by PCR, and inserted into the eukaryotic expression plasmid pEGFPC1. After identification of sequencing, the reconstructive plasmid was transformed transiently into Pam 212 cells, then the cell growth and the invasion ability were evaluated. Results The reconstructive plasmid of pEGFPC1-uPAR was validated by sequencing. The reconstructive plasmid can promote the growth of Pam 212 cells and enhance the invasion ability. Conclusion The pEGFPC1-uPAR plasmid was constructed successfully and uPAR was confirmed to promote the growth and the invasion ability of Pam 212 cells, which lay the foundation for further studies of uPAR *in vivo*.

Key words: human uPAR; pEGFPC1; Pam 212 cells

uPAR(尿激酶受体)是一个高度糖基化的(55~60)×10^3 的蛋白质,由 3 个同源性的结构域组成,并通过 GPI 锚定的方式固定在质膜上。以往对尿激酶系统主要侧重于对 uPA(尿激酶)的研究,uPAR 仅仅看作为 uPA 的受体。但近来的研究表明,uPAR 不仅起着受体的作用,而且作为信号分子,在细胞的迁移、粘附、分化以及增殖中起着重要的作用。

绿色荧光蛋白能够在紫外光的激发下发出明亮的绿色荧光,蛋白本身的性质稳定,可在多种异源生物中表达,无细胞毒性。因此,绿色荧光蛋白被作为一种新型的报告基因,广泛用于研究某特定基因在活体条件下的表达情况,细胞内的定位及功能分析。

本研究将 uPAR cDNA 片断构建到绿色荧光蛋白质粒中,并转染 Pam 212 细胞,研究对细胞基本特性的影响,为进一步进行在体定位研究及探索 uPAR 的功能打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人原核表达质粒 pGEM-uPAR 由北京军科院贺福初院士惠赠。核酸内切酶购自纽英伦生物技术有限公司,DNA marker 为

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270671,30371383)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30270671,30371383)

作者简介:高强国(1971-),男,河北省平山县人,博士研究生,讲师,主要从事上皮生物学方面的研究。电话:(023)68752259

通讯作者:杨 恬,电话:(023)68752260,E-mail: tiany@163.net

收稿日期:2005-04-21;**修回日期**:2005-06-23

鼎国公司和天为时代产品。质粒抽提试剂盒为上海博亚公司产品，胶回收试剂盒为 Omega 公司产品，PCR 扩增试剂盒、T4 DNA 连接酶为大连 Takara 公司。脂质体转染试剂盒为美国 Invitrogen 公司产品，绿色荧光蛋白 pEGFPC1 为 BD 公司产品。卡那霉素为 Sigma 公司产品，G418 为 BM Scientific 公司产品。小鼠表皮细胞株 Pam212 为王韵博士惠赠，DH5α 本室保存。DMEM 培养基和小牛血清为 Hyclone 公司。胰蛋白酶为 Biosource 公司产品，MTT 为华美公司产品。

1.2　方法

1.2.1　引物的设计与合成　　利用引物设计软件 Primer Premier 5.00 进行。在引物 uPAR 的 5′和 3′端分别加上 *Eco*R Ⅰ和 *Bgl* Ⅱ酶切位点及保护碱基。引物由上海博亚合成。

uPAR 引物：上游引物 P1：5′-GAAGATCTATGGGTCACCCGC-3′ Tm 60.8 ℃ GC 57.1%；下游引物 P2：5′-CGGAATTCTTAGGTCCAGAGGAGAG-3′ Tm 64.1 ℃ GC 52.0%；产物长度：1 024 bp

1.2.2　原核表达质粒的抽提、鉴定　　将惠赠的质粒 pGEM-uPAR 转化 DH5α 菌进行扩增。挑单一菌落，接种至含羧氨苄青霉素的液体培养基中培养，小量提取质粒进行酶切鉴定。

1.2.3　pEGFPC1-uPAR 的构建与鉴定　　以含人 uPAR 全长的质粒 pGFPC1-uPAR 作为 PCR 模板，用引物 P1、P2 扩增 uPAR cDNA，100 μl 体系，反应条件：95 ℃ 5 min→(95 ℃ 45 s，62 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min，进行 30 个循环)→72 ℃ 保温 8 min。扩增产物进行电泳鉴定和切胶回收。

用 *Eco*R Ⅰ、*Bgl* Ⅱ分别双酶切胶回收的的 PCR 产物和 pEGFPC1，胶回收 uPAR 片段和线形化空载体 pEGFPC1，通过 T4 DNA 连接酶相连接(按说明书进行，插入片段与空载体的摩尔比为 10∶1，16 ℃ 5 h)，并转化 DH5α 宿主菌。经卡那霉素筛选出阳性克隆后，用 *Eco*R Ⅰ、*Bgl* Ⅱ双酶切鉴定。将阳性重组子送上海博亚测序。构建如图 1。

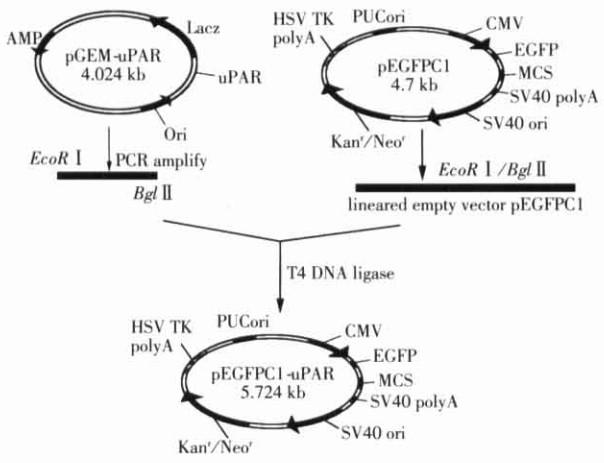


图 1　质粒 pEGFPC1-uPAR 的构建

Fig 1　Construction procedure of the recombinant plasmid pEGFPC1-uPAR

1.2.4　将鉴定的质粒转染 Pam 212 细胞株　　转染步骤按实验手册进行，将空质粒 pEGFPC1 和构建的 pEGFPC1-uPAR 转染进 Pam 212 细胞，G418 800 μg/ml 进行筛选，在荧光显微镜下挑取单克隆入 96 孔板，以 G418 400 μg/ml 进行培养。

1.2.5　对转染的细胞进行生长状况观察(MTT 法)　　将培养的细胞以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板，每孔 200 μl，每组重复 3 次，分别于第 3、4、5 天利用 MTT 法进行细胞计数[1]，做出生长曲线。

1.2.6　细胞的体外侵袭实验　　将明胶铺于 8 μm 孔径的 Transwell 微孔滤膜上，下室加入 200 μl 趋化剂(无血清培养 24 h 的 NIH3T3 细胞条件培养基)，将 1×10^5/ml 的空质粒细胞和转染的细胞接种于 Transwell 上室，37 ℃ 5% CO_2 孵箱培养 24 h。取出滤膜，擦去滤膜上的基质胶，甲醛固定，HE 染色，200 倍光镜下计数膜背面侵袭的细胞数，计算中间和四周的 5 个视野，计算平均值，每组 3 次重复。

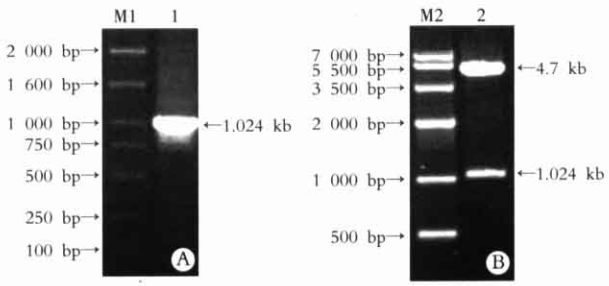
1.3　统计学方法

实验数据 $\bar{x}\pm s$ 表示，运用 Excel 统计软件进行 t 检验和方差分析。

2　结果

2.1　uPAR 全长的扩增及 pEGFPC1-uPAR 重组子的鉴定

PCR 扩增人全长的 uPAR cDNA 序列，扩增产物的电泳结果显示扩增产物具明显的特异性，在 1.024 kb 具明显的条带，见图 2A。连入载体 pEGFPC1，结合软件 SimVector1.2 电子酶切分析，对筛选出的阳性重组子进行酶切鉴定，见图 2B。*Eco*R Ⅰ + *Bgl* Ⅱ双酶切获得 4.7 kb 和 1.024 kb 两个片段，与电子酶切结果一致。将双向测序结果与公布的序列比较。发现两者的序列完全一致，未发现错配和移位等。



A：PCR amplification of uPAR cDNA；M1：DGL2000 markers；1：uPAR cDNA；B：pEGFPC1-uPAR by restrictive enzyme digestion；M2：DNA markers Ⅳ；2：pGFPC1-uPAR digested by *Eco*RI + *Bgl* Ⅱ

图 2　uPAR 的 PCR 扩增及其重组质粒的酶切鉴定

Fig 2　PCR amplification of uPAR and restrictive enzyme digestion analysis of the recombinated plasmid pEGFPC1-uPAR

2.2　转染重组质粒 Pam 212 细胞的培养鉴定

通过荧光显微镜观察，发现转染后的 Pam 212 细胞有绿色荧光蛋白的表达。用含 G418 800 μg/ml 的 DMEM 培养基筛选培养 2 周后，未转染的细胞大部分死亡。在荧光显微镜下胰蛋白酶消化单独的转染细胞，转移至 96 孔板，用含 G418 400 μg/ml 的 DMEM 培养基培养，4 周后，再转移至 6 孔板培养，见图 3。

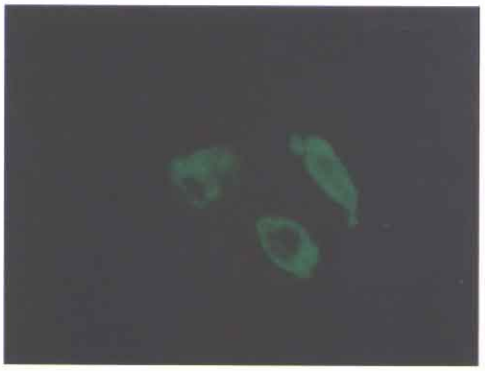
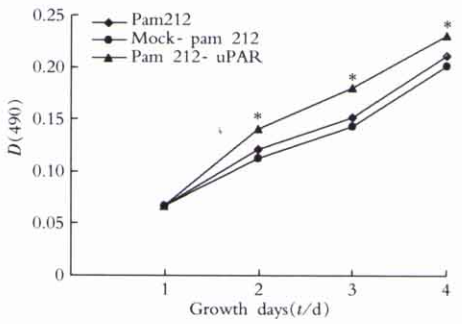


图3 转染 pEGFPC1-uPAR 质粒的 Pam 212 细胞 （荧光显微镜 ×200）

Fig 3 Pam 212 cells transformed with pEGFPC1-uPAR plasmid (Fluorescent microscope ×200)

2.3 质粒转染对细胞生长能力的影响

空质粒转染细胞与未转染细胞相比，生长速度没有明显变化。但转染 uPAR 的细胞比空质粒转染细胞和未转染细胞的增值率明显上升，见图4。



*：$P<0.05$，*vs* mock-pam 212

图4 pEGFPC1-uPAR 质粒转染对 Pam 212 细胞生长的影响

Fig 4 Effect of pEGFPC1-uPAR on Pam 212 cell growth

2.4 质粒转染对细胞侵袭能力的影响

为确定 Pam 212 细胞的侵袭性表型是否会因 uPAR 而改变，我们比较了 pGFPC1-uPAR 转染细胞和空质粒的侵袭能力。转 uPAR 基因的 Pam 212 细胞穿透的细胞数为（85 ± 4），高于母细胞（63 ± 3）及转染空质粒的细胞（60 ± 2）（$P<0.01$），表明 uPAR 能促进 Pam 212 细胞的侵袭能力。

3 讨论

利用质粒转染细胞或进行转基因动物的研究，已有很多报道，技术也比较成熟。绿色荧光蛋白作为一种新型的报告基因，被认为是研究基因表达调控、细胞分化及细胞探测的最好方法。以 EGFP 为报告基因的表达载体具有以下的特点：①检测方便，对细胞或组织切片，可直接在荧光显微镜下观察。②定位准确，通过荧光显微镜观察，可直接确定研究成分在组织中的定位。③荧光稳定。EGFP 对光致漂白作用有强烈的耐受性，能耐受长时间光照。④EGFP 对宿主细胞无任何毒害。⑤具有共用性和通用性。即不受受体范围的限制，可以在细胞、胚胎或转基因动物模型中表达[2]。

在肿瘤细胞的迁移，创伤愈合以及再上皮化，甚至在基因治疗方面，uPAR 越来越引起重视。作为 uPA 的受体，通过与 uPA 的结合，催化无活性的纤溶酶原为活性的纤溶酶，从而引起一系列的反应，如分解胞外基质中的一些蛋白质，激活一些无活性的基质金属蛋白酶，激活或释放一些生长因子等[3]。以往体内和体外的实验表明，细胞分泌的 uPA 通过与 uPAR 结合，其催化纤溶酶原转变成纤溶酶的能力提高至少 20 倍[4]。另一方面，uPAR 作为细胞内的信号分子，参与了细胞的迁移、粘附，分化以及增殖等[5]。在肿瘤治疗方面，通过调控 uPAR，抑制 uPA 与 uPAR 的结合，从而达到抑制细胞的迁移[6]。

本研究显示，转染 uPAR 的小鼠表皮鳞状细胞癌 Pam 212 细胞株，比未转染细胞和空质粒转染细胞的增殖率明显上升，从一个方面也说明了 uPAR 参与了细胞的增殖和迁移。同时，转染的细胞比未转染的细胞和空质粒转染的细胞侵袭率增强，其可能的原因，是通过增加 uPA 与 uPAR 的相互作用，增强了其侵袭能力。侵袭能力是肿瘤细胞的主要特征。本实验结果表明，通过外源性 uPAR 的加入，能促进肿瘤细胞的侵袭能力。

参考文献：

[1] 司徒镇强，吴军正. 细胞培养[M]. 西安：世界图书出版社，1996. 186－187.

[2] 彭树英，安志兴，张 涌. bcl-2/EGFP 融合基因真核表达质粒的构建[J]. 西北农林科技大学学报（自然科学版），2004，32(12)：65－68.

[3] Duffy M J. The urokinase-type plasminogen activator system: role in malignancy[J]. Curr Phar Des, 2004,10(1): 39－49.

[4] Wang Y. The role and regulation of urokinase-type plasminogen activator receptor gene expression in cancer invasion and metastasis[J]. Med Res Rev, 2001, 21(2): 146－170.

[5] Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signaling orchestrator[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(12): 932－943.

[6] Choong P F, Nadesapillai A P. Urokinase plasminogen activator system: a multifunctional role in tumor progression and metastasis[J]. Clin Orthop, 2003, 415(S): S46－S58.

（编辑 周 芳）