文章编号:1000-5404(2006)01-0047-03

论著

人肝素酶基因正反义荧光真核表达载体的构建及肝癌细胞转染

陈 陵,李志宏,杨仕明,李晶晶,蔡永国,房殿春,罗元辉,王东旭 (第三军医大学西南医院全军消化内科中心,重庆 400038)

提 要: 目的 构建正义和反义人肝素酶绿色荧光蛋白真核共表达载体,并分别转染人低转移肝癌细胞株 MHCC97-L 及高转移细胞株 MHCC97-H 和 HCCLM6。**方法** 采用基因重组技术,用 *Eco*R Ⅰ从 pcDNA3-Hpa 质粒上切下约 1.7 kb 的人肝素酶全长 cDNA 片段,然后连入 pIRES2-EGFP 质粒的 *Eco*R Ⅰ酶切位点上,经 *Bam*H Ⅰ酶切鉴定出正义和反义表达载体,并进一步测序确认。用脂质体法将肝素酶正义真核表达载体转入人低转移肝癌细胞株 MHCC97-L,反义真核表达载体转入人高转移肝癌细胞株 MHCC97-H 和 HCCLM6,24 h 后荧光倒置显微镜下检测转染结果。**结果** 经 *Bam*H Ⅰ酶切后,正义质粒形成 5.3 kb 和 1.7 kb 两条 DNA 片段,而反义重组质粒为 6.5 kb 和 0.5 kb 两条 DNA 片段,与理论计算值完全一致;测序结果进一步确认了方向的正确性。转染成功的肝癌细胞在倒置荧光显微镜下呈绿色荧光。**结论** 成功构建了人肝素酶的正、反义真核表达载体,并成功转染人低、高转移肝癌细胞株,为进一步研究正、反义肝素酶基因转染对肝癌细胞的转移能力的影响奠定了基础。

关键词: 肝素酶;荧光真核表达载体;转染
中图法分类号: R394-33; R394.2; R735.7 **文献标识码**: A

Construction of sense and antisense human heparanase and green fluorescent protein eukaryotic co-expression vectors and expression in hepatic cancer cell lines

CHEN Ling, LI Zhi-hong, YANG Shi-ming, LI Jing-jing, CAI Yong-guo, FANG Dian-chun, LUO Yuan-hui, WANG Dong-xu (Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct sense and antisense human heparanase green fluorescent protein eukaryotic expression vectors and then transfect these vectors into hepatic cancer cell lines. **Methods** The human heparanase cDNA fragment contained in the pcDNA3 Hpa vector was cloned into the enhanced green fluorescent protein eukaryotic expression vector pIRES2-EGFP in cis-direction or trans-direction. The recombinant vectors were identified by digestion of *Bam*H Ⅰ and further by DNA sequencing. Then the recombinant were transfected to hepatic cancer cells with highly metastatic potential (MHCC97-H and HCCLM6) or with lowly metastatic potential (MHCC97-L) by liposome method. After 48 h, the transfected cells were observed under fluorescent inverted microscope. **Results** After digested by *Bam*H Ⅰ, two fragments of 5.3 kb and 1.7 kb were formed in sense fluorescent eukaryotic expression vector, while two other fragments of 6.5 kb and 0.5 kb were formed in antisense fluorescent vector, both of which were respectively named as pIRES2-EGFP-sHpa and pIRES2-EGFP-aHpa. The DNA sequencing also confirmed the linking direction of sense and antisense recombinant. Green fluorescence of the transfected cells could be observed under inverted fluorescence microscope at 48 h after transfection. **Conclusion** Human heparanase sense and antisense fluorescent eukaryotic expression vectors are successfully constructed and transfected to human hepatic cancer cell lines with different metastatic potential.

Key words: heparanase; fluorescent eukaryotic expression vector; transfection

肝素酶(heparanase, hpa)是1999年克隆成功的一种唯一能裂解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)内蛋白多糖主要成分硫酸乙酰肝素蛋白多糖(heparan sulfate proteoglycans, HSPG)的内源性糖苷内切酶,能破坏细胞外基质及基底膜,并直接和间接地促进肿瘤血管生成[1],与肿瘤的侵袭转移密切相关。我们过去的研究发现,肝素酶的高水平表达与胃癌预

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200123)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200123)
作者简介:陈 陵(1976-),男,湖南省醴陵市人,硕士研究生,主治医师,主要从事肿瘤免疫基因治疗方面的研究。电话:(023)68765191, E-mail: lingcong_008@126.com
通讯作者:杨仕明, E-mail: shimingyang@yahoo.com,电话:(023)68754124
收稿日期:2005-09-11;**修回日期**:2005-11-25

后不良临床病理学特征有密切关系[2,3]。Hpa 也由此逐渐成为引人注目的抗肿瘤治疗新靶点，其抑制剂的研制可望为抗肿瘤治疗开辟新的途径。我们通过构建人正、反义肝素酶真核荧光表达载体，并成功转染人肝癌细胞，为进一步研究肝素酶对肿瘤转移细胞的生物学影响创造了条件。

1 材料与方法

1.1 材料

DH5α 大肠杆菌菌株由第三军医大学西南医院全军消化内科中心保存；克隆化高(MHCC97-H 和 HCCLM6)、低(MHCC97-L)转移人肝癌细胞购自上海复旦大学肝癌研究所；DMED(高糖)培养基购自 Gibico 公司；G418 购自 Boehriger Mannheim 公司；pIRES2-EGFP 质粒为 Clontech 公司产品；含人全长肝素酶 cDNA 的 pcDNA3-Hpa 质粒由澳大利亚国立大学 Parish 及 Hulett 教授惠赠；限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ，*Bam*H Ⅰ和牛小肠碱性磷酸酶(CIP)购自美国 NewEngland Biolabs 公司；质粒提取试剂盒购自美国 Omega 公司；DOTAP 脂质体、琼脂糖 DNA 回收试剂盒购自 Roche 公司。

1.2 方法

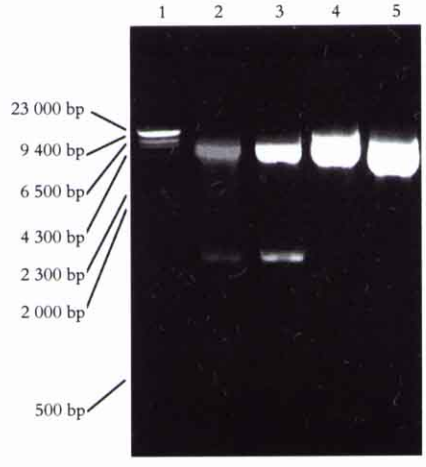
1.2.1 肝素酶正、反义真核荧光表达载体的构建及鉴定 pcDNA3-hpa 与 pIRES2-EGFP 质粒的转化采用氯化钙法，质粒提取采用 Omega 公司的质粒提取试剂盒，并用 *Eco*R Ⅰ酶切鉴定；肝素酶全长 1 724 bp，克隆在质粒 pcDNA3-Hpa 的 *Eco*R Ⅰ酶切位点，用 *Eco*R Ⅰ酶切该质粒，0.8 g/L 琼脂糖电泳，然后用琼脂糖 DNA 回收试剂盒回收含肝素酶 cDNA 的 DNA 片段，溶于去离子水中，-20 ℃冻存备用；用 *Eco*R Ⅰ酶切 pIRES2-EGFP 质粒使其线性化，试剂盒回收片段，牛小肠碱性磷酸酶去磷酸化，然后酚氯仿抽提，无水乙醇沉淀，TE 缓冲液溶解，-20 ℃保存备用；0.1 μg 去磷酸化的 pIRES2-EGFP/*Eco*R Ⅰ与 0.1 μg 肝素酶 cDNA 片段混合均匀，45 ℃反应 5 min，迅速转移到冰上，加 T_4 DNA 连接酶 1 μl 混匀，4 ℃过夜进行连接反应；将连接产物用氯化钙法转化大肠杆菌，将 200 μl 转化产物涂于含卡那霉素的 LB 培养板上，37 ℃过夜。次日挑取数个菌落置于含卡那霉素的 LB 液体培养基中，37 ℃振摇过夜，质粒提取试剂盒提取质粒，与空载体一起用 0.8 g/L 琼脂糖凝胶电泳筛选出重组质粒，然后按重组质粒图谱，用 *Bam*H Ⅰ限制性内切酶进行酶切鉴定。将 *Bam*H Ⅰ鉴定正确的正、反义重组子交上海生物工程公司进行基因测序以进一步鉴定连接的正确性。

1.2.2 肝素酶正、反义真核表达载体转染人肝癌细胞 人肝癌细胞株 HCCLM6、MHCC97-H 和 MHCC97-L 细胞在含 100 ml/L 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中，于 37 ℃，50 ml/L CO_2、饱合湿度下培养。人肝癌细胞株 HCCLM6、MHCC97-H 和 MHCC97-L 正、反义重组质粒及空载质粒(pIRES2-EGFP)的转染(脂质体法)及 G418 筛选见文献[4]。转染后 24 h 后荧光倒置显微镜下观察、照相。

2 结果

2.1 正、反义载体构建及鉴定

如图 1 所示，pcDNA3-Hpa 质粒经 *Eco*R Ⅰ酶切后，形成 5.4 kb 和 1.7 kb 两条电泳条带，试剂盒回收 1.7 kb 的电泳条带；pIRES2-EGFP 真核荧光载体经 *Eco*R Ⅰ酶切后，形成 5.3 kb 一条带，片段经试剂盒回收、CIP 去磷酸化后，与肝素酶片段相连接，连接产物转化大肠杆菌后，得到大量阳性菌落，随机挑取数个菌落小提质粒，琼脂糖凝胶电泳筛选出重组体，然后用 *Bam*H Ⅰ酶切鉴定，正义重组质粒为 5.3 kb 和 1.7 kb 两条带，而反义重组质粒为 6.5 kb 和 0.5 kb 两条带，与理论计算完全符合，证明含有人肝素酶的正、反义真核荧光表达载体构建成功，分别命名为 pIRES2-EGFP-sHpa 和 pIRES2-EGFP-aHpa。测序结果进一步确认了方向的正确性。

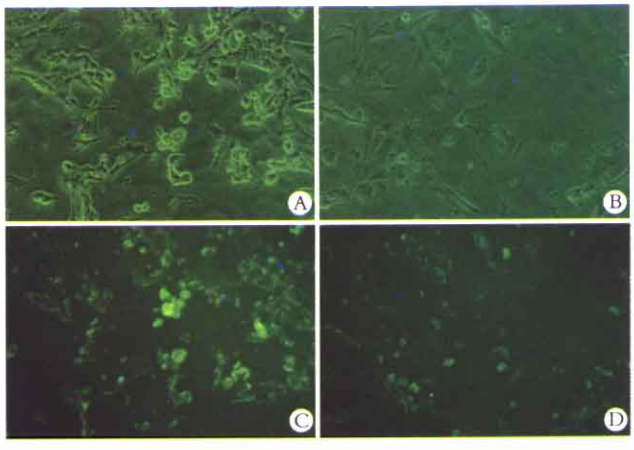


1：DNA 标准(λDNA/*Hind* Ⅲ)；2：pDNA3-Hpa/*Eco*R Ⅰ；3：pIRES2- EGFP-sHpa/*Bam*H Ⅰ；4：pIRES2-EGFP-aHpa/*Bam*H Ⅰ；5：pIRES2-EGFP/*Eco*R Ⅰ

图 1 正、反义肝素酶荧光蛋白真核共表达载体的鉴定

2.2 细胞转染

转染 24 h 后，在荧光倒置显微镜下即可见发绿色荧光的细胞，转染效率达 20% ~30%。如图 2 所示。



A：pIRES2-EGFP-shpa 转染 MHCC97-L 细胞 (IM × 200)；
B：pIRES2-EGFP--shpa 转染 MHCC97-L 细胞 (FIM × 200)；
C：pIRES2-EGFP-ahpa 转染 HCCLM6 细胞 (IM × 200)；
D：pIRES2-EGFP-ahpa 转染 HCCLM6 细胞 (FIM × 200)

图 2 正、反义肝素酶绿色荧光蛋白真核共表达载体转染人肝癌细胞株

3　讨论

hpa 基因位于染色体 4q22，基因全长 50 kb，内含 14 个外显子和 13 个内含子[5]。正常情况下，Hpa 分布于胸腺、脾脏、淋巴结、骨髓、血小板、中性粒细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞等免疫组织及胎盘中，此外，胎肝中也有分布。以外周白细胞表达水平最高，其次为胎盘。除胎盘外的非免疫组织中未见或极少表达[6]。其生理功能有：①帮助胚泡附着于子宫内膜，促进胎盘的发育和功能形成过程。②在组织损伤或炎症时，Hpa 可降解基底膜 HSPG，帮助免疫细胞渗出到无血管区，加快创面愈合，帮助组织修复[7]。现有大量资料表明，Hpa 对肿瘤扩散及转移有着关键的促进作用。研究人员在多种肿瘤[8]中发现，恶性程度越高、转移潜能越大、生长速度越快的肿瘤细胞内 hpa 的表达水平越高，而良性肿瘤则低水平表达，正常组织则不表达。低转移潜能的肿瘤细胞可通过导入 hpa cDNA 获得高转移潜能[9]；高转移潜能的肿瘤应用 hpa 抑制剂后，肿瘤细胞转移的数量和部位均明显减少[10]。进一步证明了 hpa 具有促进肿瘤细胞转移的作用。其机制可能是降解 ECM 和 BM 中的 HSPG，破坏限制肿瘤转移的屏障；加强肿瘤细胞的运动能力；释放促进细胞生长及血管生成的活性因子，加快血管生成[8]。因此，肝素酶有可能成为抗肿瘤转移治疗的良好靶位。pIRES2-EGFP 含有巨细胞病毒即刻早期增强子/启动子，可使基因在哺乳动物细胞内持续、高效表达. pIRES2-EGFP 中的 EGFP 基因，能编码绿色荧光蛋白（GFP），由于 GFP 能在活细胞中直观地反映外源基因的表达，又无需外源物质参与，对细胞无毒性，且能维持一定时间的稳定，因此可把 EGFP 作为标记基因用于筛选. 故此我们采用该质粒作为载体，将人全长肝素酶 cDNA 导入到真核荧光载体 pIRES2-EGFP 中，成功构建了 pIRES2-EGFP 肝素酶正、反义表达载体，经酶切鉴定后分别成功地用脂质体转染法转染入人肝癌细胞低转移株 MHCC97-L 和高转移株 HCCLM6、MHCC97-H，为进一步研究肝素酶基因对肝癌转移的影响及其对高低转移肝癌细胞株生物学行为的影响奠定了基础。

参考文献：

[1] ECCLES S A. Heparanase: breaking down barriers in tumors[J]. Nat Med, 1999, 5(7): 735 - 736.

[2] 蔡永国，房殿春，杨仕明，等. 胃癌组织中肝素酶 mRNA 的表达意义[J]. 第四军医大学学报，2004，25(10)：909 - 911.

[3] 冷建军，韩本立，董家鸿. 肝脏缺血再灌注损伤机制和缺血预处理保护作用[J]. 消化外科，2005，4(2)：142 - 148.

[4] 杨仕明，房殿春，杨金亮，等. 人端粒酶蛋白催化亚单位反义基因转染对胃癌细胞恶性表型的逆转作用[J]. 第三军医大学学报，2001，23(8)：934 - 937.

[5] DONG J, KUKUKA A K, TOYOSHIMA M, *et al*. Genomic organization and chromosome localization of the newly identified human heparanase gene[J]. Gene, 2000, 253(2): 171 - 178.

[6] MCKENZIE E, TYSON K, STAMPS A, *et al*. Cloning and expression profiling of Hpa2, a novel mammalian heparanase family member[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 276(3): 1170 - 1177.

[7] BAME K J. Heparanases: endoglycosidases that degrade heparan sulfate proteoglycans[J]. Glycobiology, 2001, 11(6): 91R - 98R.

[8] 陈　陵，杨仕明，房殿春，等. 肝素酶：抗肿瘤转移的新靶点[J]. 世界华人消化杂志，2004，12(2)：439 - 442.

[9] PIKAS D S, LI J P, VLODAVSKY I, *et al*. Substrate specificity of heparanases from human hepatoma and platelets[J]. J Biol Chem, 1998, 273(30): 18770 - 18777.

[10] BENTOLILA A, VLODAVSKY I, ISHAI MICHAELI R, *et al*. Poly (N-acryl amino acids): a new class of biologically active polyanions [J]. J Med Chem, 2000, 43(13): 2591 - 2600.

（编辑　薛国文）

关于数字的用法

在各种出版物上数字的用法总的原则是：凡是可以使用阿拉伯数字，而且又很得体的地方均应使用阿拉伯数字。以下两种情况必须使用阿拉伯数字：

1　公历世纪、年代、年、月、日和时刻　　例如：公元前 5 世纪，20 世纪 90 年代，1995 年 6 月 8 日 14 时 30 分。

表示年份要写全称，1995 年不能写成 95 年或'95 年；1953 - 1958 年不能写成 1953 - 58 年。年月日可以写成 1995-06-08。时刻用":"分隔的形式。如：13 时 45 分 8 秒可以写成 13:45:08。

2　计数和计量（整数、小数、分数、百分数、均数）包括序数、编号　　4 位和 4 位以上的数字采用三位分节法，不用"千分撇"，节与节之间留半个阿拉伯数字的空隙（如 2,431 改为 2 431）。年份、部分代号、仪器型号等非计量数字不用分节，也不加千分撇。尾数"0"多，5 位以上的数字，可以用"万""亿"表示，但不得以十、百、千、百万、十亿等汉字表示，例如 3 579 000 可写成 357.9 万但不能写成 3 百 57 万千或 357 万 9 千。

本刊编辑部