论著

文章编号:1000-5404(2007)22-2164-04

重组质粒 pBud-CD44v6 的构建及其在胃癌细胞内的表达

曾 波[1],姜 政[1],张 滨[3],李 彦[1],向廷秀[2],陶小红[1],王丕龙[1] (重庆医科大学:[1]附属第一医院消化内科,[2]附属第一医院实验研究中心,[3]公共卫生学院社会医学教研室,重庆 400016)

提 要:目的 构建含人的肿瘤侵袭和转移的特异性抗原 CD44v6 编码基因的真核表达的重组载体,进行核苷酸序列分析,并在肿瘤细胞中表达。**方法** ①以 pBud 作为真核表达载体,选择 CD44v6 编码基因进行 RT-PCR 扩增,构建重组表达质粒,进行酶切鉴定和测序分析。②在 Lipofectamine 2000 的介导下,将构建成功的 pBud-CD44v6 重组表达质粒转染到肿瘤细胞中,通过免疫组织化学方法检测 CD44v6 的表达。**结果** 经酶切鉴定和测序分析表明,插入的目的基因片段为 CD44v6 的编码基因,长为 129 bp,与 GenBank 中登录的 cDNA 相比较,同源性高达 100%,且方向正确;重组质粒 pBud-CD44v6 转染对数生长期胃癌细胞株 SGC-7901,进行免疫组织化学检测结果显示,与空质粒转染组对比,重组质粒组肿瘤细胞的细胞质中可见大量 CD44v6 基因编码的表达,其蛋白呈棕黄色,而对照组呈阴性。**结论** 成功构建了 pBud-CD44v6 真核表达的重组载体,并在肿瘤细胞中表达。

关键词: 胃肿瘤;CD44v6 基因;SGC-7901 细胞

中图法分类号: R394-33;R394.3;R735.2 **文献标识码:** A

Construction of recombinant plasmid of pBud-CD44v6 and its expression in gastric adenocarcinoma cells

ZENG Bo[1], JIANG Zhen[1], ZHANG Bin[3], LI Yan[1], XIANG Ting-xiu[2], TAO Xiao-hong[1], WANG Pi-long[1] ([1]Department of Gastroenterology, [2]Key Laboratory, the First Affiliated Hospital; [3]Department of Social Medcine, School of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To construct an eukaryotic gene expression vector for CD44v6 and its expression in tumor cells. **Methods** (1) CD44v6 gene was amplified by RT-PCR and cloned into plasmid pBud to form a recombinant plasmid pBud-CD44v6, which was then identified by restriction endoenzyme digestion and nucleotides sequencing. (2) The recombinant plasmid of pBud-CD44v6 was transfected into the gastric adenocarcinoma cell line SGC7901 by Lipofectamine 2000, and the expression of CD44v6 was detected by immunohistochemistry. **Results** (1) the restriction digestion and sequence analysis demonstrated that this 129 bp of CD44v6 was the same as that published in GenBank, and it was inserted into the vector accurately. (2) After the SGC7901 cells were transfected with CD44v6, obvious expression of CD44v6 protein was seen in the cytoplasm, while in the control group no brown protein was found. **Conclusion** A new plasmid of pBud-CD44v6 has been successfully established and expressed in tumor cells.

Key words: stomach neoplasm; CD44v6; SGC-7901 cells

随着分子医学和肿瘤病因研究的不断深入,肿瘤的免疫治疗已逐渐成为肿瘤治疗的活跃领域,现已从基础研究逐步过渡到临床应用,并已显示出良好的应用前景。在提高消化系统恶性肿瘤治疗效果、延长生存时间、降低放疗和化疗副作用方面,肿瘤免疫治疗将发挥重要作用[1,2]。CD44 是一种黏附因子,为分布极为广泛的一组细胞表面跨膜糖蛋白,参与细胞与细胞、细胞与基质之间的特异性黏连,是肿瘤共同表达的肿瘤转移标志物之一[3],对肿瘤的诊断和治疗具有重要的意义,特别是 CD44v6 是恶性肿瘤共同表达的特异性抗原,与肿瘤的发生、浸润和转移关系密切,能被作为肿瘤发生发展和预后的指标[4-7]。本实验采用分子生物学技术,构建针对 CD44v6 的 pBud 载体,并且将

基金项目:重庆市科委项目(2005BB5031)
Supported by the Sci & Tech Research Project Foundation of Scientific Committee of Chongqing (2005BB5031)

作者简介:曾 波(1973-),男,四川省绵阳市人,硕士研究生,主治医师,主要从事消化系统肿瘤方面的研究。电话:13072367017, E-mail: zb730305118216@sina.com

通讯作者:张 滨,电话:13883266741,E-mail: jiangz1753@163.com

收稿日期:2007-06-25;修回日期:2007-09-12

携带 CD44v6 基因的重组载体转染至肿瘤细胞,以检测肿瘤细胞 CD44v6 的表达情况,旨在为肿瘤的免疫治疗奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　细胞、菌株与质粒　　人胃癌细胞(SGC-7901)从上海中国科学院细胞库获得,Top10 和 *E. coli* DH5α 菌株和质粒 pBud 为本校病毒性肝炎研究所赠送。

1.1.2　主要试剂及来源　　总 RNA 提取试剂盒(Trizol)、DEPC 和 T_4 DNA 连接酶购自北京天为时代公司;M-MLV 反转录酶、*Taq* DNA 聚合酶、*Kpn* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ限制性内切酶、DNA 标准(DL 2000)等购自 TaKaRa 大连公司;DAB 显色试剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Goldview™ DNA 染料购自北京赛百盛基因技术有限公司;Lipofectamine 2000 和 Zeocin 购自 Invitrogen 公司;CD44v6 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　总 RNA 提取及其逆转录　　从 -80 ℃冰箱中取出人胃癌组织 100 mg,放入研磨器中,加入液氮迅速研磨成粉状;加入 Trizol 1 ml,迅速抽打、混匀;加入氯仿 100 μl,剧烈振摇 15 s,室温孵育 15 min,4 ℃,13 200 r/min 离心 15 min,使溶液分成 3 相;小心吸取上层含 RNA 的水相,移入新的 EP 管中;加入 250 μl 异丙醇,颠倒数次以混匀,室温孵育 10 min,以形成 RNA 沉淀,4 ℃,13 200 r/min 离心 10 min,弃上清;每管中加入 500 μl 75% 乙醇洗涤 RNA,4 ℃,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清;空气干燥 10 min。加入 50 μl 无 RNA 酶的水,55 ~ 60 ℃孵育 15 min,检测备用。提取总的 RNA 2 μl(约 1 μg)于逆转录反应体系中,反应体系为 Oligo(dT)15 1 μl;无 RNA 酶的水 8.5 μl;RNA 酶抑制剂 0.5 μl;dNTPs 1 μl;5 × RT buffer 4 μl;M-MLV 反转录酶 1 μl,混匀后短暂离心,42 ℃,20 min;99 ℃,5 min;4 ℃,5 min,所得 cDNA 用于 PCR 扩增。

1.2.2　CD44v6 编码基因的 RT-PCR 扩增　　根据 Hofmann 报道的人 CD44v6 的序列,按照引物设计原则设计 PCR 引物,P1:5′-GAGGTACCATGATCCAGGCAACTCCTA-3′,P2:5′-GCGCTCGAGCAGCTGTCCCTGTTGT-3′。在上游引物中引入 *Kpn* Ⅰ酶切位点,在下游引物中引入 *Xho* Ⅰ酶切位点,由上海生工生物工程公司合成。在 50 μl 反应体系中,分别加入 200 μmol/L dNTPs 5.0 μl;0.5 μmol/L P1、P2 各 2.5 μl;4 ng/μl cDNA 5.0 μl;2.5 U *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μl;2.5 mmol/L $MgCl_2$ 2.5 μl。按照以下条件进行 PCR 扩增:①94 ℃预变性 5 min;②94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,共 30 个循环;③72 ℃延伸 10 min。所获 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,并回收 PCR 片段。

1.2.3　pBud-CD44v6 基因重组质粒的构建　　将纯化的 CD44v6 编码基因和 pBud 质粒分别以 *Kpn* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ进行双酶切,并用 PCR 纯化试剂盒进行纯化。将酶切纯化的 CD44v6 编码基因和 pBud 质粒按 4∶1(物质的量)的比例,在 T_4 DNA 连接酶作用下 4 ℃过夜,同时按照文献[7]制备感受态 DH5α 菌株;将 10 μl 的上述连接产物加入含有 100 μl *E. coli* DH5α 感受态菌株的离心管中,冰浴 30 min;置 42 ℃水浴箱热休克 90 s,迅速取出冰浴 2 min;加入 LB 培养液 1 ml,37 ℃恒温摇床培养 200 r/min × 1 h;涂布于含有 Zeocin 100 μl 的 LB 平板,用玻璃棒平涂均匀后,37 ℃恒温培养箱静置至水分渗入琼脂中;倒置平板,继续培养 12 ~ 16 h;挑选单克隆菌落 6 ~ 10 个,放入 3 ml 含有 Zeocin 的 LB 液体培养基,37 ℃振摇培养 10 ~ 12 h,提取重组质粒进行酶切鉴定以及序列分析。

1.2.4　重组质粒 pBud/CD44v6 基因在肿瘤细胞中的表达　　首先配备溶液 A:4 μg 质粒 + 500 μl RPMI1640 培养液(无血清,无抗生素),轻轻混匀;同时配备溶液 B:8 μl Lipofectamine 2000 脂质体 + 500 μl RPMI1640 培养液,轻轻混匀,室温放置 5 min。将溶液 A 和溶液 B 混匀,室温放置 20 min;而后加入到用 PBS 液洗涤 3 次处于指数分裂期的人胃癌细胞 6 孔培养板中,置 CO_2 孵箱中培养;12 h 后,更换为完全培养液;48 h 后收获细胞。吸去 RPMI1640 培养液,PBS 冲洗,3 min × 3 次,95% 乙醇固定15 min,再用 PBS 冲洗,3 min × 3 次,3% H_2O_2 去离子水孵育 5 ~ 10 min,以消除内源性过氧化物酶活性,滴加试剂 A,室温孵育 10 ~ 15 min,倾去,勿洗,滴加适当比例的 CD44v6 抗体,37 ℃孵育 3 h,PBS 冲洗,3 min × 3 次,滴加试剂 B,37 ℃孵育 1 h,PBS 冲洗,3 min × 3 次,滴加试剂 C,37 ℃孵育 10 ~ 15 min,PBS 冲洗,3 min × 3 次,DAB 显色 10 s,自来水充分冲洗,光镜下观察,照相。

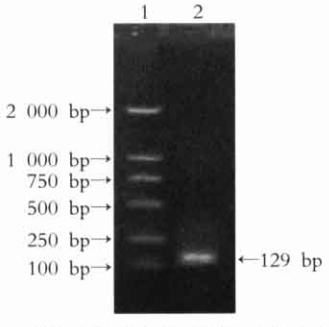
2　结果

2.1　总 RNA 提取产物

从人胃组织提取的总 RNA 产物采用紫外分光光度仪测定分析 RNA 纯度,RNA 的 $D(260)/D(280)$ 值在 1.80 以上;经 1% 琼脂糖凝胶电泳可见 28S、18S、5S 3 条较清晰的条带。

2.2　RT-PCR 产物

将所获的 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,结果表明:PCR 扩增产物位于 100 ~ 250 bp。其条带大小与预期结果一致,为 129 bp,见图 1。



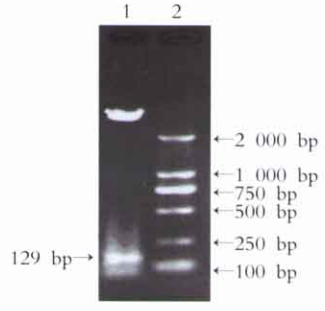
1:DNA 标准(DL 2000);2:CD44v6 基因 PCR 产物

图 1　CD44v6 基因 PCR 产物电泳图

2.3　重组质粒双酶切鉴定

将重组质粒 pBud-CD44v6 经 *Kpn* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切后,同

时进行1%琼脂糖凝胶电泳分析，结果表明：重组质粒经过双酶切能够得到129 bp的小片段，与预期结果一致，说明重组质粒构建成功，见图2。



1：pBud-CD44v6 双酶切产物；2：DNA 标准（DL 2000）

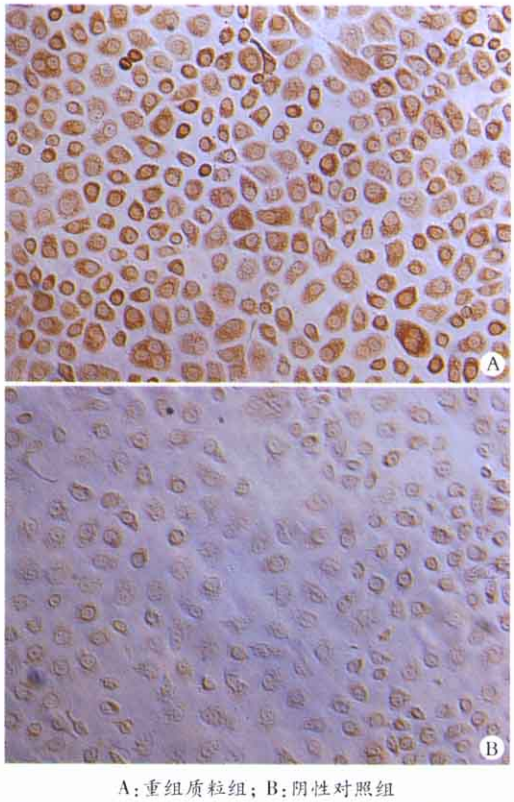
图2 重组质粒 pBud-CD44v6 双酶切鉴定

2.4 测序分析

重组质粒采用通用引物反向测序，并经电脑 DNA 分析辅助软件对所测定的 DNA 序列进行同源性分析。结果表明：基因的插入方向及顺序完全正确，所测序列与预期结果一致，目的基因序列与 Hofmann 所报道的序列比较，同源性为100%。

2.5 重组质粒在肿瘤细胞中的表达

采用 Lipofectamine 2000 脂质体将重组质粒瞬时转染指数分裂期的胃癌细胞株 SGC-7901 进行免疫组织化学检测，并与空质粒转染组作对比，可见重组质粒组肿瘤细胞细胞质中 CD44v6 基因编码蛋白呈棕黄色（图3A），而对照组呈阴性（图3B）。



A：重组质粒组；B：阴性对照组

图3 pBud-CD44v6 瞬时转染 SGC-7901 细胞的免疫组化观察 （S-P×400）

3 讨论

CD44 是一种细胞表面跨膜糖蛋白分子，它分布非常广泛，在淋巴细胞、成纤维细胞、单核细胞、上皮细胞和平滑肌细胞均能检测到它的表达。CD44 分子具有多种亚型，主要分为两种：仅含固定表达组成型外显子的 CD44 转录子编码的蛋白质称为标准型 CD44（CD44s），相对分子质量为（80～90）×10^3，主要在间质和造血源性细胞中表达，为透明质酸盐的主要表面受体；另一种为还含有 v 区变异性剪接外显子，相对分子质量为 150×10^3 左右，它编码的蛋白质称为变异性 CD44（CD44v），于上皮源性细胞和肿瘤中表达。CD44v6 基因全长 129 bp，编码产物为小分子糖蛋白，CD44v6 分子主要分布于细胞质。众多研究表明，CD44v6 与消化道肿瘤，特别是胃癌的发生、浸润、转移和预后关系密切，是恶性消化道肿瘤共同表达的特异性抗原，因此，CD44v6 在胃癌的发生、发展及其转归中具有重要的临床意义。pBud 质粒是双表达真核载体，带有双启动子、双克隆位点和 Zeocin（一种抗生素）筛选标记。本实验中，我们选择 CD44v6 作为研究的靶抗原，采用基因重组技术将作为肿瘤的共同抗原-肿瘤侵袭和转移特异性抗原 CD44v6 的编码基因克隆到 pBud 质粒，构建了含 CD44v6 目的基因的真核表达载体。

肿瘤的免疫治疗是利用肿瘤细胞或肿瘤抗原诱导机体产生特异性细胞免疫或体液免疫，从而达到治疗肿瘤的目的。首先是抗原提呈细胞（antigen presenting cell，APC）捕获具有肿瘤治疗作用的抗原，经其加工处理后将 Ag 信息传递给 T、B 淋巴细胞，从而引发一系列特异性免疫应答。在众多肿瘤疫苗中，目前研究最热门的是 DC 疫苗，DC 是肿瘤抗原与机体免疫系统之间的桥梁，是机体内最有效的、功能最强大的专职 APC，具有活化幼稚 T 细胞的能力，能合成大量的 MHC-Ⅱ以及摄取和转运 Ag 的特殊膜受体，是体内 Ag 的主要摄取者和 T 细胞激活的主要承担者[8,9]。如果将作为共同抗原-肿瘤侵袭和转移特异性抗原 CD44v6 作为肿瘤抗原，通过基因重组技术将其导入 DC 细胞中和进行 DC 细胞与肿瘤细胞融合，用于肿瘤的免疫治疗，这样既可以避免自身抗原诱发自身免疫性疾病，同时又可诱导强烈的特异性抗肿瘤反应。

有资料表明，肿瘤自身抗原肽致敏的 DC 疫苗可以诱导 $CD8^+$ CTL 和 $CD4^+$ 应答及 Th1 和 Th2 细胞因子产生，全面调动机体的抗肿瘤免疫力，从而达到治疗中、晚期肿瘤的目的[10-12]。鉴于此，外源基因在真核

细胞中的高效表达是 DC 发挥作用的基础，选择高效表达的外源基因是发展 DC 瘤苗的重要措施，是我们实验非常关键的一步。因此，我们进一步研究 pBud-CD44v6 真核表达质粒的效果，我们以人胃癌 SGC7901 细胞株作为靶细胞，对其进行了质粒的转染，转染 48 h 后，进行细胞免疫组织化学检测，可见 SGC7901 细胞质中呈棕黄色显色，证实 CD44v6 基因的高效表达，将极大的便利于我们以后的研究。

总之，我们利用 pBud 质粒上的多克隆位点，将 CD44v6 基因插入该载体，经 PCR、酶切和测序鉴定证实了构建的真核表达载体获得成功和重组质粒经瞬时转染肿瘤细胞，免疫组化法证实了 CD44v6 基因呈表达基因，为我们下一步稳定转染到 DC 细胞和融合细胞，进行抗肿瘤的研究做好充分的准备。

参考文献：

[1] Kalady M F, Onaitis M W, Emani S, *et al*. Sequential delivery of maturation stimuli increases human dendritic cell IL-12 production and enhances tumor antigen-specific immunogenicity[J]. J Surg Res, 2004, 116(1): 24 - 31.

[2] Terando A, Roessler B, Mule J J. Chemokine gene modification of human dendritic cell-based tumor vaccines using a recombinant adenoviral vector[J]. Cancer Gene Ther, 2004, 11(3): 165 - 173.

[3] 吴秋平，向明章，钟前进，等. CD44v3、CD44v6 在非小细胞肺癌中的表达及其与淋巴结转移的关系[J]. 第三军医大学学报，2001, 23(5): 541 - 543.

[4] Kalinski P, Giermasz A, Nakamura Y, *et al*. Helper role of NK cells during the induction of anticancer responses by dendritic cells[J]. Mol Immunol, 2005, 42(4): 535 - 539.

[5] Qiu J, Li G W, Sui Y F, *et al*. Heat-shocked tumor cell lysate-pulsed dendritic cells induce effective anti-tumor immune response *in vivo*[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(3): 473 - 478.

[6] 周昌菊，马　薇，周建大，等. 自体宫颈癌-树突细胞疫苗激活的 CTL 杀伤效应[J]. 癌症，2006, 25(2): 143 - 147.

[7] Loveland B E, Zhao A, White S, *et al*. Mannan-MUC1-pulsed dendritic cell immunotherapy: a phase I trial in patients with adenocarcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(3 Pt 1): 869 - 877.

[8] Bergant M, Meden L, Repnik U, *et al*. Preparation of native and amplified tumour RNA for dendritic cell transfection and generation of *in vitro* anti-tumour CTL responses[J]. Immunobiology, 2006, 211(3): 179 - 189.

[9] Ojima T, Iwahashi M, Nakamura M, *et al*. The boosting effect of co-transduction with cytokine genes on cancer vaccine therapy using genetically modified dendritic cells expressing tumor-associated antigen[J]. Int J Oncol, 2006, 28(4): 947 - 953.

[10] Haegel-Kronenberger H, de-la-Salle H, Bohbot A, *et al*. Adhesive and/or signaling functions of CD44 isoforms in human dendritic cells [J]. J Immunol, 1998, 161(8): 3902 - 3911.

[11] Wang D R, Chen G Y, Liu X L, *et al*. CD44v6 in peripheral blood and bone marrow of patients with gastric cancer as micro-metastasis [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(1): 36 - 42.

[12] Zhang L, Zhang H, Liu W, *et al*. Specific antihepatocellular carcinoma T cells generated by dendritic cells pulsed with hepatocellular carcinoma cell line HepG2 total RNA[J]. Cell Immunol, 2005, 238 (1): 61 - 66.

（编辑　王　红）

（上接 2163 页）

2　讨论

目前外周动脉闭塞原因主要为两方面[1]：外来因素包括吸烟、寒冷与潮湿的生活环境、慢性损伤和感染等；内在因素如自身免疫功能紊乱、性激素和前列腺素失调以及遗传因素等。此病应与下列疾病相鉴别：①动脉粥样硬化：吸烟、高血压、糖尿病等是动脉粥样硬化的易患因素。结合患者情况无吸烟嗜好，偶尔饮酒，无动脉粥样硬化易患因素，动脉粥样硬化性闭塞可予以排除。②动脉栓塞性疾病：患者无深部静脉炎、心房颤动，且属慢性起病过程。③血管炎：血管炎主要侵犯大小不等动脉、静脉及微血管，入院后查血沉、C 反应蛋白、自身抗体等检查均正常，DSA 检查除右侧动脉闭塞以外，其他血管未见明显异常。患者病因考虑为自幼患脊髓灰质炎，长期靠右上肢拄拐站立、行走所致。拄拐支撑点位于右腋部，肱动脉长期受压，导致血管壁或血管内皮损伤、脱落。内皮细胞和成纤维细胞增生，内皮下胶原纤维暴露，血小板黏附聚集而使动脉狭窄逐渐造成动脉闭塞。该类病例仅见数例报道[2]。

内科治疗主要以扩张血管及抑制血小板聚集为目的，前列腺素 E_1、α 受体阻滞剂、β 受体兴奋剂可配合高压氧治疗。外科治疗目前常采用动脉重建术或血管内介入治疗[1]。

因外周动脉闭塞可造成截肢，故应注意加强预防：首先应严格戒烟、防止受冷、受潮和外伤，不使用热疗，以免因组织需氧量增加而加强缺血症状；其次应减少饮酒、高脂血症、肥胖等高危因素的发生，多加强肢体活动，避免因血流速度减慢，而引起动脉血栓形成；另外对下肢残疾者应尽量减少拄拐，多采用轮椅或手扶拐杖行走。

关键词：长期拄拐；肱动脉闭塞

中图法分类号：R543.5　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 张柏根. 周围血管和淋巴管疾病[M]//吴在德，吴肇汉. 外科学. 第 6 版. 北京：人民卫生出版社，2003：625 - 630.

[2] 冯如剪. 长期拄拐致右上肢血管损伤性血栓形成 1 例[J]. 疑难病杂志，2004, 3(6): 367.

（编辑　王小寒）