论著

文章编号:1000-5404(2008)02-0130-04

TCF4/pcDNA3.0表达载体的构建及其在毛乳头细胞中的表达

刘 毅,郝 飞,杨希川 (第三军医大学西南医院皮肤科,重庆市皮肤性病研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 构建TCF4/pcDNA3.0表达载体,为深入研究T细胞因子4(T cell factor4, TCF4)基因在毛乳头细胞生物学功能调控中的作用和机制奠定基础。方法 从凝集性生长毛乳头细胞中提取总RNA,RT-PCR获得带有酶切位点的TCF4基因,亚克隆入pCDNA3.0载体中,并通过双酶切和测序确定序列和阅读框正确。稳定转染到毛乳头细胞中进行表达,检测稳定转染前后TCF4表达的变化。结果 从人毛囊毛乳头细胞中获得TCF4基因克隆;成功构建了真核表达载体。经过稳定转染在毛乳头细胞中上调了TCF4基因mRNA和蛋白水平表达,促进了毛乳头细胞的增殖和外分泌功能。结论 TCF4/pcDNA3.0表达载体能在真核细胞中表达。TCF4基因可以促进毛乳头细胞增殖。

关键词:TCF4;pcDNA3.0;表达载体;表达
中图法分类号:R322.995;R394-33;R394.2 文献标识码:A

Construction and expression of TCF4/pcDNA3.0 expression vector

LIU Yi, HAO Fei, YANG Xi-chuan (Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To clone TCF4 (T cell factor 4) gene and construct its eukaryotic expression vector. Methods The total RNA was extracted from the aggregated human dermal papilla cells. The full length cDNA encoding TCF4 was obtained by RT- PCR, digested by restriction enzyme, then inserted in the eukaryotic expression vector pcDNA3.0. The sequence and reading frame were confirmed by two restriction enzymes and sequencing. The recombinant vector TCF4/pcDNA3.0 was stably transfected into dermal papilla cells, and the expression changes of TCF4 gene were detected. Results TCF4 gene was cloned from dermal papilla cells and its eukaryotic expression vector was constructed. After the identification and sequencing, the reconstructed plasmid was confirmed containing the correct and full nucleotide sequence of TCF4 gene. After stable transfection, the mRNA and protein level of TCF4 gene were up-regulated in dermal papilla cells and the proliferation of dermal papilla cells was promoted. Conclusion The expression vector TCF4/pcDNA3.0 was constructed successfully and could be expressed in the dermal papilla cells. TCF4 gene can promote the proliferation of the dermal papilla cells.

Key words: TCF4; pcDNA3.0 expression vector; expression

毛乳头细胞在毛囊的发育和周期性调控中有重要的作用。毛乳头细胞自身靶基因在毛囊生长周期中的作用是毛囊研究的重点和关键。在以往的工作中,我们使用抑制性消减杂交技术(SSH)结合SMART™ cDNA合成技术对人活体组织中休止期毛囊毛乳头细胞及生长期毛囊毛乳头细胞mRNA的表达差异进行了研究,并成功建立了毛乳头差异表达基因cDNA文库[1],在此研究中我们发现了Wnt信号通路关键信号分子T细胞因子4(T cell actor4,TCF4)基因作为生长期毛囊毛乳头细胞的上调表达基因。本实验拟构建表达TCF4基因的TCF4/pcDNA3.0表达载体,并导入人毛乳头细胞,稳定筛选后,检测转染前后TCF4基因、蛋白表达变化及对毛乳头细胞增殖和外分泌的影响,为深入研究TCF4基因在毛乳头细胞生物学功能调控中的作用和机制奠定基础。

基金项目:国家自然科学基金(30500442)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30500442)
作者简介:刘 毅,男,黑龙江省哈尔滨市人,博士研究生,副主任医师,主要从事毛囊生物学方面的研究。电话:(023)68754491,E-mail liuyi-fuzi@yahoo.com.cn
通信作者:郝 飞,电话:(023)68754491,E-mail:haofei@mail.tmmu.com.cn
杨希川,电话:(023)68754491,E-mail:doctoryxc@msn.com
收稿日期:2007-07-17;修回日期:2007-10-08

1　材料与方法

1.1　材料

DMEM 培养基(每 1 升含 15% 新生小牛血清, 10 mmol/L Hepes, 1.5 g 碳酸氢钠, 0.3 g L-谷氨酰胺, 10×10^4 U 青霉素, 10×10^4 U 链霉素);分离酶中性蛋白酶;Ⅳ型胶原酶;胰蛋白酶;Tripure 购于 Roche 公司;RT-PCR 试剂盒、质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒购于 TaKaRa 公司;限制性内切酶 *Eco*RⅠ/*Eco*RⅤ购于 NEB 公司;PCR 引物由上海基康生物工程服务有限公司合成;质粒 pcDNA3.0 由本校细胞生物学教研室张艺博士惠赠;重组质粒由上海生工生物工程服务有限公司测序。Lipofectamine2000 转染试剂盒(美国 Invitrogen 公司)。

兔抗人 TCF4 抗体(NEB 公司),兔抗人 SCF 抗体(武汉博士德公司)。

1.2　TCF4/pcDNA3.0 表达载体的构建

1.2.1　TCF4 基因的获取　　人毛乳头细胞的分离与培养按我科建立的二步酶消化法进行[2]。取 1~3 代培养的处于凝集性生长状态的毛乳头细胞 1×10^6,加入 1 ml Tripure。按照 Tripure 说明书提取细胞总 RNA。

从 NCBI 获得 TCF4 基因的 CDS 区序列(NM_030756),引物根据载体 pcDNA3.0 和目的基因 TCF4CDS 区序列用序列分析软件 Primer Premier 5.0 设计。上游引物为:5′-GAGAATTCATGCCGCAGCT-3′;下游引物为:5′-CAGATATCTTTTTAAACGCTACA-3′。上下游引物中的下划线分别是 *Eco*RⅠ、*Eco*RⅤ限制性内切酶的酶切位点,此两点和载体 pcDNA3.0 的多克隆位点相同。RT-PCR 按照试剂盒说明进行操作。PCR 反应条件为:94 ℃,2 min;30 个循环(94 ℃,1 min;52 ℃,1 min;72 ℃,2 min),72 ℃,5 min。PCR 产物于 0.75% 琼脂糖凝胶中电泳。判断 PCR 产物的大小。

1.2.2　PCR 产物在载体 pcDNA3.0 上克隆　　PCR 产物、pcDNA3.0 分别以 *Eco*RⅠ、*Eco*RⅤ双酶切。双酶切产物于 0.7% 琼脂糖电泳,按 DNA 凝胶回收试剂盒说明回收双酶切后的 PCR 产物和 pcDNA3.0。

1.2.3　连接及连接产物的转化与扩增　　将双酶切后 TCF4 和 pcDNA3.0 混合,用 T_4 连接酶于 37 ℃进行 12 h 连接反应。将连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5α,Amp 平板筛选。取 pcDNA3.0 转化 DH5α 为阳性对照。挑取阳性单克隆菌落进行扩增,质粒抽提试剂盒抽提重组质粒 pcDNA3.0/TCF4。

1.2.4　重组质粒的鉴定　　①酶切电泳鉴定:将重组质粒用 *Eco*RⅠ/*Eco*RⅤ双酶切后电泳鉴定;②插入片段测序鉴定:重组质粒送上海生工生物工程技术服务有限公司进行自动测序。

1.3　重组质粒转染与稳定筛选

质粒转染与 G418 筛选采用 Lipofectamine™2000 脂质体转染法,并设立空质粒转染组作为阴性对照。毛乳头细胞以 2 ml/孔接种于 6 孔培养板中培养,最终细胞覆盖率为 90%~95%。转染前 1 d 换取无抗生素培养液。将质粒-脂质体复合物转染至细胞中(质粒:脂质体 = 7:10)。37 ℃, 5% CO_2,在无血清、无抗生素的培养液培养 6 h 后换含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基。24 h 后换 G418 选择培养液(200 μg/ml)继续培养。2 周后可见长出筛选克隆,挑选单个克隆于 96 孔板中,加入 G418 选择培养液(100 μg/ml)继续培养。96 孔板中培养物长满后,转接到大的培养皿中培养。

1.4　RT-PCR 检测 TCF4 在转录水平的表达

收集经稳定筛选的毛乳头细胞、空质粒转染组及未处理的毛乳头细胞 1×10^6,按照 Tripure 说明书提取总 RNA,逆转录反应按 1.2.1 进行。PCR 引物序列为 TCF4 基因 cDNA 的特异性序列,以 Primer Premier 5.0 设计引物,上游引物为 5′-CAGGATCCAAAATTGCTGCTGGTG-3′,下游引物为 5′-CCGGATCCTATTCTAAAGACTTGGTGACGAG-3′。PCR 反应条件如下:95 ℃ 2 min,30 个循环(94 ℃ 30 s,58 ℃ 40 s,72 ℃ 2 min)72 ℃ 5 s,0.75% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行分析。PCR 产物理论值为 1 800 bp。

1.5　Western blot 检测 TCF4 蛋白表达

收集转染稳定筛选的毛乳头细胞、空质粒转染组及未处理的毛乳头细胞 1×10^6个,加入细胞核裂解液后,4 ℃ 12 000 × *g* 离心 30 min,吸取上清,Bradford 法进行蛋白定量。经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳分离蛋白样本,半干式电转膜槽将 PAGE 移至 NC 膜上,蛋白封闭液 37 ℃封闭 NC 膜 1 h, PBST 洗涤,加一抗(1∶500)37 ℃过夜, PBST 振荡洗涤 2 次,加二抗(1∶5 000)37 ℃孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次, 10 min/次,DAB 室温显色,记录结果。

1.6　MTT 实验

收集对数生长期稳定筛选的毛乳头细胞、空质粒转染组及未处理的细胞,接种 96 孔板,细胞终密度为 1×10^4/孔,每个样本设 4 个平行孔,每孔总体系 200 μl,试剂空白以无血清 DMEM 培养液补足。37 ℃, CO_2 孵箱中培养 1~5 d,在每孔中加入四甲基偶氮唑蓝(MTT,浓度为 0.5 g/L),继续培养 4 h,弃上清,加入二甲基亚砜 200 μl,振荡 5 min,酶标仪(492 nm)读取吸光度值 $D(492)$ 值。以未转染的毛乳头细胞为对照。细胞增殖率 = [对照组平均 $D(492)$/实验组平均 $D(492)$] × 100%。

1.7　Western blot 检测 SCF、HGF 蛋白表达

转染稳定筛选的毛乳头细胞、空质粒转染组及未处理的毛乳头细胞在生长至 80% 融合时,用 0.1 mol/l PBS 洗涤 3 次,加入适量 Williams E 无血清培养基。培养 48~72 h 后收集无血清培养上清,上清液移入透析袋内,周围用聚乙二醇 2000 除去水分。浓缩液加入三氯乙酸 0.1 g/ml,冰上放置1 h,16 000 r/min 离心 30 min;乙醇:乙醚(1∶1,体积比)洗涤以除去多余的三氯乙酸。获得的蛋白沉淀加入细胞核裂解液后,4 ℃ 12 000 × *g* 离心 30 min,吸取上清,Bradford 法进行蛋白定量。经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳分离蛋白样本,半干式电转膜槽将 PAGE 移至 NC 膜上,蛋白封闭液 37 ℃封闭 NC 膜 1 h, PBST 洗涤,加一抗(1∶300)37 ℃过夜, PBST 振荡洗涤 2 次,加二抗(1∶5 000)37 ℃孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次,10 min/次,DAB 室温显色,记录结果。

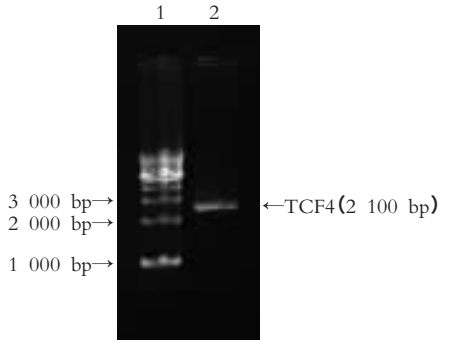
1.8　统计学分析

实验数据采用 SPSS 10.0 统计软件包进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 TCF4 基因的扩增

毛乳头细胞 RT-PCR 产物经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳后，可见清楚的约 2 100 bp 条带，该条带相对分子质量与 TCF4 基因 cds 区理论值一致（图 1）。

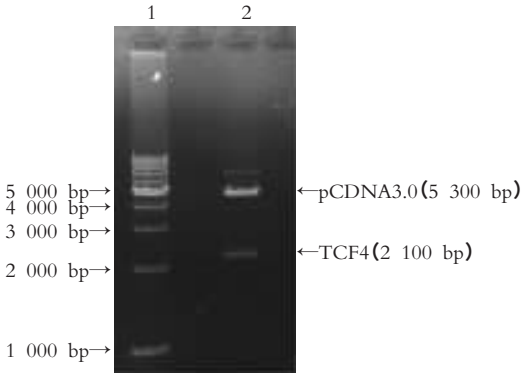


1：DNA 标准（1 kb）；2：TCF4 基因

图 1 凝集性生长毛乳头细胞 RNA RT-PCR 扩增结果

2.2 TCF4 基因 PCR 产物在载体 pcDNA3.0 上的定向克隆

TCF4 基因 PCR 产物、pcDNA3.0 连接反应，转化感受态细菌，Amp 平板上可见均匀分布数十个形态大小均一的阳性单克隆菌落。阳性对照平板也见到单克隆菌落。取阳性单克隆菌落扩增，抽提重组质粒，用 *Eco*RⅠ/*Eco*RⅤ进行双酶切。琼脂糖凝聚电泳显示：载体的相对分子质量与 pCDNA 分子量一致，插入片段条带与 TCF4 基因 PCR 产物相对分子质量一致（图 2）。重组质粒 pCDNA/TCF4 测序结果：插入片段与基因库中 TCF4 相应 cDNA 序列（NM030756）完全相同。

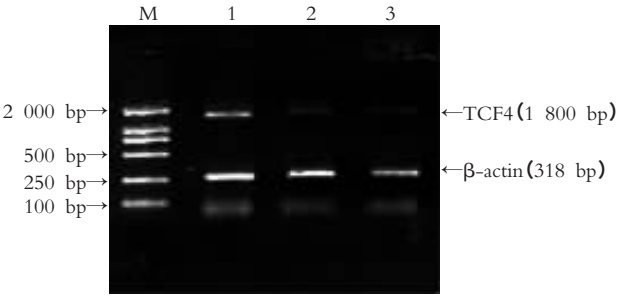


1：DNA 标准（1 kb）；2：重组质粒 pcDNA3.0/TCF4 用 *Eco*RⅠ/*Eco*RⅤ双酶切

图 2 TCF4/pcDNA3.0 酶切鉴定

2.3 TCF4/pcDNA3.0 转染毛乳头细胞前后 TCF4 mRNA 的表达变化

半定量 RT-PCR 检测结果来判断 TCF4 的 mRNA 表达高低。结果显示，未转染组 TCF4 mRNA 表达较弱；而 TCF4/pcDNA3.0 转染组中 TCF4 mRNA 表达明显增强（图 3）。

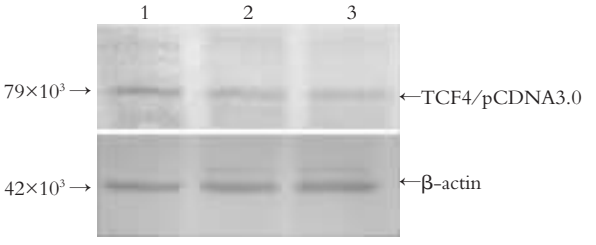


M：DNA 标准（DL 2000）；1：TCF4/pcDNA3.0 组；2：pcDNA3.0 组；3：未转染组

图 3 转染前后 TCF4 mRNA 表达变化

2.4 TCF4/pcDNA3.0 转染毛乳头细胞前后 TCF4 蛋白表达变化

与未处理毛乳头细胞组相比，TCF4/pcDNA3.0 稳定转染组中 TCF4 蛋白表达明显增强。将各组目的条带与内参 β-actin 的光密度比较后，与未处理毛乳头细胞组相比，其差异有显著性意义（$P<0.01$）（图 4）。



1：TCF4/pcDNA3.0 组；2：pcDNA3.0 组；3：未转染组

图 4 转染前后 TCF4 蛋白表达变化

2.5 细胞增殖实验（MTT）

TCF4/pcDNA3.0 稳定转染组中，细胞增殖实验各吸光度值明显高于未处理毛乳头细胞组吸光度值。与未处理组毛乳头细胞增殖率相比，TCF4/pcDNA3.0 稳定转染组细胞增殖率具有显著性差异（$P<0.01$）（图 5）。

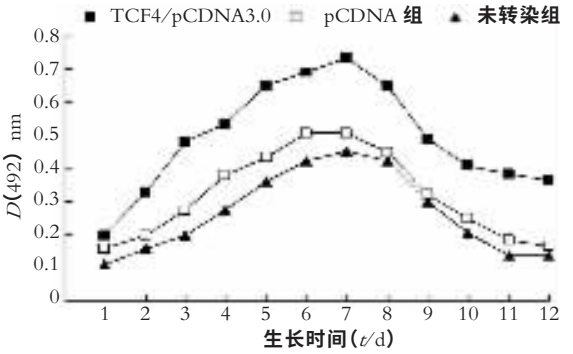
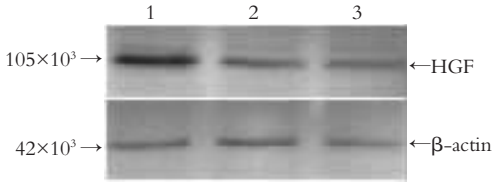


图 5 TCF4 对毛乳头细胞生长曲线的影响

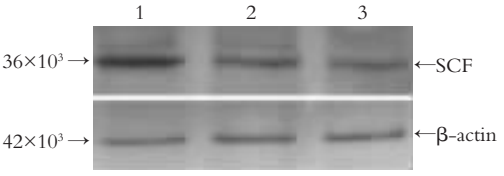
2.6 细胞免疫化学检测 HGF、SCF 的表达

与未处理毛乳头细胞组相比，TCF4/pcDNA3.0 稳定转染组 DPC 上清中 HGF、SCF 蛋白表达明显增强。将各组目的条带与内参 β-actin 的光密度比较后，与未处理毛乳头细胞组相比，其差异有显著性意义（$P<0.01$）（图 6，7）。



1：TCF4/pcDNA3.0 组；2：pcDNA3.0 组；3：未转染组

图 6　转染前后 HGF 蛋白表达变化



1：TCF4/pcDNA3.0 组；2：pcDNA3.0 组；3：未转染组

图 7　转染前后 SCF 蛋白表达变化

3　讨论

位于毛发根部毛母质细胞包裹的毛乳头细胞通过自分泌和旁分泌多种细胞因子对毛发周期性生长循环起到重要调节作用[3]。为了深入研究毛囊周期基因调控机制以及毛乳头自身基因的作用，我们使用抑制性消减杂交技术（SSH）结合 SMART™ cDNA 合成技术对人活体组织中休止期毛囊毛乳头细胞及生长期毛囊毛乳头细胞 mRNA 的表达差异进行了研究，并且建立了生长期和休止期毛乳头细胞的差异表达文库。通过反向 Northern 杂交对所筛选到的差异表达基因进行了验证[4]，我们发现 Wnt 信号途径的关键因子 TCF4 在毛囊毛乳头细胞中差异表达。

Wnt 信号途径是细胞生长、发育和分化的关键途径。有证据表明 Wnt 信号与细胞增值关系密切，在非增值细胞如正常结肠上皮细胞中 Wnt 信号几乎不表达。其中 β-catenin /TCF4 是 Wnt 信号激动过程的重要组成部分[5]。

TCF4 属核内转录因子，在 Wnt 信号传导中可调控下游基因表达[6]。TCF4 有着分子“开关”的双重作用[7]，由于上游信号刺激的不同而分别表现为转录激活或转录抑制的作用。当缺乏 Wnt 信号时，TCF4 与转录抑制因子如 Groucho 蛋白、cAMP 效应元件（CREB）结合蛋白（CBP）及 C 末端结合蛋白（CtBP）结合，抑制靶基因的转录表达；然而当 Wnt 信号激活后，TCF4 的氨基端与 Wnt 通路上游信号分子 β 连环蛋白（β-catenin）Arm 重复序列作用形成复合体，将其由细胞质转入细胞核内，而羧基端的 HMG 可与启动子区域的靶基因调控序列相互作用，发挥其转录激活功能。在正常组织发育和分化过程中，TCF 基因家族起至关重要的作用，既能促进细胞增殖分化，又可抑制细胞过度生长，防止肿瘤发生[8]。在哺乳类上皮细胞中，尤其是肠上皮的分化过程中，TCF4 表达与上皮的发育阶段密切相关。因此对 Wnt 信号通路关键信号分子 TCF4 基因在毛乳头细胞生物学功能调控中作用的研究具有重要意义。

TCF4 在毛囊毛乳头细胞中差异表达的生物学意义尚不明了。前期的研究工作提示 TCF4 基因在毛乳头细胞生物学功能调控中起重要作用。因此，在本研究中通过 RT-PCR 从毛乳头细胞中扩增获得了 TCF4 基因。插入空质粒 pcDNA3.0 后，通过双酶切以及自动测序鉴定可以证实 TCF4/pcDNA3.0 表达载体构建成功。表达载体稳定转染入毛乳头细胞，通过 RT-PCR 和 Western blot 检测证明增强了 TCF4 表达。MTT 实验证明转染促进了毛乳头细胞的增殖。Western blot 检测转染后毛乳头细胞的上清，发现 SCF HGF 蛋白的分泌增加。证明促进了毛乳头细胞的外分泌功能。

基于以上结果我们推测：毛囊毛乳头细胞中 TCF4 基因的差异表达可能导致下游某些重要功能基因的表达变化，引起毛乳头细胞生物学功能改变，最终促进了毛囊由休止期进入生长期。这些研究成果为深入了解 TCF4 基因以及 Wnt 信号在毛囊周期性调控中的作用和机制奠定了基础。

参考文献：

[1] Yang X C, Hao F, Song Z Q, *et al*. Identification of differentially expressed genes in anagen dermal papilla by suppression subtractive hybridization[J]. Chin Med J (Engl), 2004, 117(4): 371 – 375.

[2] 钟白玉，杨卫兵，杨希川，等. 二步酶消化法分离人头皮毛乳头细胞[J]. 中华皮肤科杂志，2003，36(7)：406.

[3] 郭晓静，郝　飞，姜晓勇，等. 人毛乳头细胞在不同传代时期某些细胞因子表达的变化[J]. 第三军医大学学报，2006，28(21)：2144 – 2145.

[4] 杨希川，郝　飞，杨卫兵，等. 抑制性消减杂交筛选生长期毛乳头细胞差异表达基因[J]，中华皮肤科杂志，2004，37(11)：645 – 647.

[5] Lu Z F, Cai S Q, Wu J J, *et al*. Biological characterization of cultured dermal papilla cells and hair follicle regeneration *in vitro* and *in vivo* [J], Chin Med J (Engl), 2006, 119(4): 275 – 281.

[6] Chang H R, Cheng T L, Liu T Z, *et al*. Genetic and cellular characterizations of human TCF4 with microsatellite instability in colon cancer and leukemia cell lines[J], Cancer Lett, 2006, 233(1): 165 – 171.

[7] Krieghoff E, Behrens J, Mayr B. Nucleo-cytoplasmic distribution of beta-catenin is regulated by retention[J]. J Cell Sci, 2006, 119(Pt 7): 1453 – 1463.

[8] Li C Y, Wang Y, Cui Z S, *et al*. Expression of T cell factor-4 in non-small-cell lung cancer[J], Chin Med J (Engl), 2005, 118(2): 136 – 140.

（编辑　王　红）