论著

文章编号:1000-5404(2008)02-0146-04

人乳腺癌细胞HYAL1基因真核表达载体的构建及其在MCF-7和ZR-75-30细胞中的表达

苏新良,任国胜,王小毅,谭金祥 (重庆医科大学附属第一医院内分泌外科,重庆 400016)

摘 要:**目的** 构建人乳腺癌HYAL1基因的真核表达载体并稳定转染HYAL1基因低表达的乳腺癌MCF-7和ZR-75-30细胞株,为进一步探讨HYAL1基因在乳腺癌的侵袭和转移中的作用奠定基础。**方法** 采用RT-PCR技术从高表达HYAL1的人乳腺癌细胞株MDA-MB-435S中扩增透明质酸酶HYLAL1基因,并将其插入真核表达载体pcDNA3.1/V5-His-TOPO中,构建的重组表达质粒经脂质体介导转染HYAL1基因低表达的乳腺癌MCF-7和ZR-75-30细胞。**结果** 用RT-PCR成功地扩增出1条1 332 bp的DNA片段,经限制性内切酶酶切分析和DNA测序证明已经成功构建了人乳腺癌HYAL1基因的真核表达载体。RT-PCR证明转染了重组质粒的乳腺癌MCF-7和ZR-75-30细胞可以高效稳定的表达HYAL1基因,且其穿透细胞外基质的能力增强。**结论** 成功构建了人乳腺癌HYAL1基因的真核表达载体,获得了稳定表达人HYAL1基因的MCF-7和ZR-75-30细胞克隆,且其侵袭能力增强。

关键词:透明质酸酶;HYAL1;真核表达;乳腺癌细胞;侵袭

中图法分类号:R394-33;R394.2;R737.9 **文献标识码**:A

Construction of eukaryotic expression vector of human HYAL1 gene and its expression in MCF-7 and ZR-75-30 cells

SU Xin-liang, REN Guo-sheng, WANG Xiao-yi, TAN Jin-xiang (Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To construct the eukaryotic expression vector of human HYAL1 gene and obtain MCF-7 and ZR-75-30 cell clones expressing HYAL1 gene stably. Methods The cDNA encoding HYAL1 gene of human breast cancer was amplified by RT-PCR from the total RNA isolated from human MDA-MB-435S cells and inserted into pcDNA3.1/V5-His-TOPO vector. The recombinant plasmid was transferred into MCF-7 and ZR-75-30 cells. Results A 1332-bp DNA fragment was successfully amplified from human MDA-MB-435S cell. Restriction enzyme digestion analysis and DNA sequencing showed that HYAL1 gene was inserted into recombinant vector. RT-PCR analysis revealed that HYAL1 gene could be expressed stably in the transfected MCF-7 and ZR-75-30 and it had strong invasive potential. Conclusion The eukaryotic expression vector of human HYAL1 gene was successfully constructed. MCF-7 and ZR-75-30 cell clones that can express HYAL1 gene were obtained and can promote the invasion.

Key words: hyaluronidase; HYAL1; eukaryotic expression; breast cancer cell; invasion

乳腺癌是妇女最常见的恶性肿瘤,近年其发病率呈明显上升趋势,而乳腺癌的侵袭和转移是乳腺癌患者死亡的主要原因。因此,寻找能反映乳腺肿瘤侵袭、转移潜能及预后的生物学标志一直是乳腺肿瘤研究的重点之一。我们前期工作中发现透明质酸酶(hyaluronidase,Hyase)高表达的人乳腺癌细胞,其生长、增殖、侵袭、转移能力较低表达的强,提示Hyase与肿瘤恶性潜能有关;同时发现人乳腺癌细胞MDA-MB-231、MDA-MB-435S等细胞株Hyase呈高表达,MCF-7、ZR-75-30等细胞株呈较低表达[1,2];应用RT-PCR测定了人乳腺癌细胞株MCF-7、ZR-75和MDA-MB-435S的HYAL1基因表达水平,发现HYAL1基因表达有显著差异,与酶学表达呈正相关[3]。因此我们推测肿瘤细胞HYAL1含量和活性的变化能够很好地反映肿瘤的恶性程度和转移能力。

基金项目:国家自然科学基金(30070292)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070292)

作者简介:苏新良,男,四川省仁寿县人,博士研究生,副主任医师,主要从事肿瘤侵袭、转移方面的研究。电话:(023)89011191

收稿日期:2007-04-10;修回日期:2007-06-06

本研究拟构建人 HYAL1 基因的真核表达质粒 pcDNA3.1-HYAL1，用脂质体转染到 HYAL1 低表达的乳腺癌 MCF-7、ZR-75-30 细胞株，建立稳定表达 HYAL1 的细胞克隆。为进一步研究 Hyase 的水平和活性、细胞侵袭力的变化、诱导人脐静脉内皮细胞 ECV-304 生成管腔潜能的变化等奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

人乳腺癌细胞株 MDA-MB-435S、MCF-7 和 ZR-75-30 细胞购自中科院上海细胞所，由本校实验室保存。真核表达载体 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 试剂盒、脂质体转染试剂、Trizol 以及引物均购自 Invitrogen 公司。RPMI1640 培养基和小牛血清购自 HyClone 公司。逆转录酶、高保真酶 PrimerStar、r*Taq* 酶、限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ、DNA 凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒均购自大连宝生物公司。NIH3T3 细胞和人脐静脉内皮细胞 ECV-304 为本实验室保存；ECM gel 购自 Sigma 公司；Transwell 小室购自 Millipore 公司

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　　人乳腺癌细胞株 MDA-MB-435S、MCF-7 和 ZR-75-30 细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液在 37 ℃，5% CO_2 的培养箱内培养和传代。

1.2.2　引物设计和合成　　根据 NCBI 公布的人 HYAL1 基因（accession number：U03056）序列设计合成上下游引物 P1 和 P2。此引物对可以扩增 HYAL1 基因 cDNA（594～1 925 bp 的片段，产物大小为 1 332 bp，包含了 HYAL1 基因完整的编码区（617～1 925 bp）。P1 序列为 5′-TTGTCCTCGACCAGTCCCGT-3′，P2 序列为 5′-ATCACCACATGCTCTTCCGC-3′。设计合成内参（GAPDH）的引物 P3 和 P4，该引物扩增的产物大小为450 bp 左右，P3 的序列为 5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′，P4 的序列为 5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′。

1.2.3　RT-PCR 扩增人 HYAL1 基因 cDNA　　收集人乳腺癌细胞株 MDA-MB-435S 细胞，用 Trizol 提取细胞总 RNA，再按试剂盒说明进行逆转录。以逆转录产物为模板进行 PCR，反应条件为：98 ℃预变性 2 min；98 ℃ 10 s，60 ℃ 15 s，72 ℃ 1.5 min，30 个循环；最后 72 ℃延伸 5 min。扩增产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶进行电泳鉴定并回收目的片段。回收的片段再进行加 A 尾巴反应，反应体系为：r*Taq* 酶（5 U/μl）0.5 μl，10×PCR 缓冲液 5 μl，25 mmol/L $MgCl_2$ 3 μl，1.0 mmol dATP 4 μl，胶回收产物 20 μl，补水至 50 μl。反应条件为 72 ℃ 15 min。加 A 尾巴的 PCR 产物再次进行凝胶电泳胶回收。

1.2.4　HYAL1 基因真核表达载体的构建及鉴定　　按照 Invitrogen pcDNA3.1/V5-His-TOPO 真核表达载体试剂盒的操作说明进行 HYAL1 基因的 T-A 克隆。连接产物转化感受态大肠杆菌 TOP10，将转化的大肠杆菌菌液涂布于含 100 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 平板中，37 ℃培养 16 h。通过菌落 PCR 初步筛选阳性克隆，阳性克隆经扩大培养后小量提取质粒，进行 *Kpn* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切鉴定。鉴定正确的重组质粒送交 Invitrogen 公司测序。将 HYAL1 基因插入方向和序列都正确的重组质粒命名为 pcDNA3.1-HYAL1。

1.2.5　真核表达载体 pcDNA3.1-HYAL1 转染人乳腺癌 MCF-7 和 ZR-75-30 细胞　　将乳腺癌 MCF-7 和 ZR-75-30 细胞接种于 6 孔培养板中，当细胞长满 80% 培养板时用脂质体将重组载体 pcDNA3.1-HYAL1 和空载体转染 MCF-7 和 ZR-75-30 细胞。转染 48 h 后，换用含有 G418 的 RPMI1640 培养液进行筛选，然后再扩大培养，得到稳定传代的细胞克隆。

1.2.6　RT-PCR 鉴定 HYAL1 基因在 MCF-7 和 ZR-75-30 细胞中的稳定表达　　收集稳定转染 HYAL1 基因的乳腺癌 MCF-7 和 ZR-75-30 细胞，用 Trizol 提取细胞总 RNA，进行逆转录。用引物 P1 和 P2 进行半定量 PCR 鉴定，同时用引物 P3 和 P4 扩增 GAPDH 基因作为内参。

1.2.7　侵袭实验　　NIH3T3 细胞用含 10% 小牛血清的 1640 培养基，37 ℃，5% CO_2 培养，离心收集培养基上清作为趋化因子。将细胞外基质凝胶均匀地铺在 Transwell 小室的膜上，40 μl/孔，37 ℃ 成胶 30 min。稳定转染了 HYAL1 基因以及空质粒的乳腺癌细胞株 MCF-7 和 ZR-75-30 用含 10% 小牛血清的 1640 培养基，37 ℃，5% CO_2 培养。分别设为实验组、阴性对照组，取对数生长期的细胞按 2.0×10^5/孔接种到成胶的 Transwell 小室中，将小室放置于 24 孔板中，同时在 24 孔板中加入含趋化因子的培养基。24 h 后，取出小室，拭去膜上的细胞外基质凝胶，用 PBS 清洗。经瑞氏染色后在 100 倍光镜下计数 5 个视野的细胞数。

1.3　统计学方法

两样平均数比较，采用 t 检验。

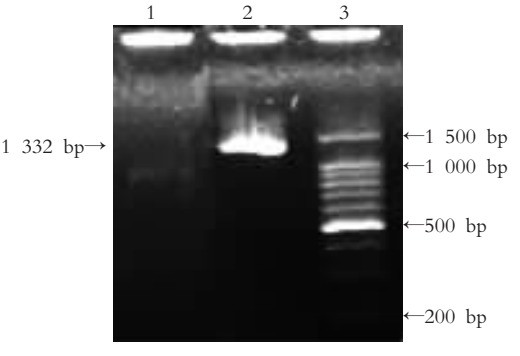
2　结果

2.1　MDA-MB-435S 细胞总 RNA 提取

收集乳腺癌 MDA-MB-435S 细胞，用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA，用 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳示总 RNA 提取完整。

2.2　HYAL1 基因的扩增

用细胞总 RNA 进行 RT-PCR，扩增 HYAL1 基因，扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳显示，在 1 332 bp 处有明显的扩增条带，与预期大小一致，阴性对照没有条带（图 1）。

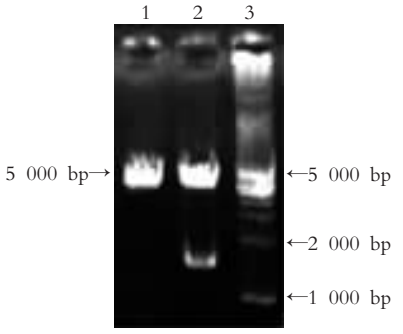


1：阴性对照；2：HYAL1 基因；3：DNA 标准

图 1　HYAL1 基因的扩增

2.3 真核表达载体 pcDNA3.1-HYAL1 的酶切鉴定

重组质粒经限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切后，经琼脂糖凝胶电泳显示在 5 400 bp 和 1 300 bp 处有 2 个片段，分别和 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 质粒以及 HYAL1 基因的大小一致，证明我们已经成功构建了真核表达载体 pcDNA3.1-HYAL1。见图 2。



1：对照组；2：pcDNA3.1-HYAL1；3：DNA 标准

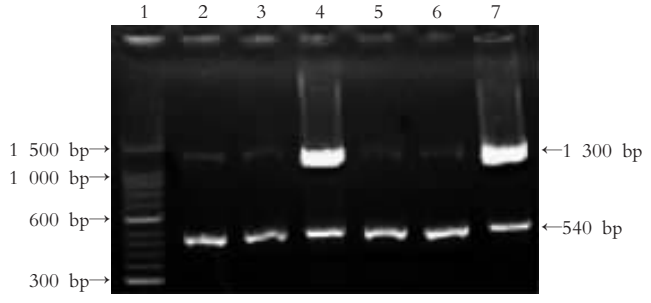
图 2 重组质粒 pcDNA3.1-HYAL1 的酶切鉴定

2.4 真核表达载体 pcDNA3.1-HYAL1 的测序鉴定

重组质粒测序结果表明 HYAL1 基因已经正确的插入了 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 载体，插入方向正确，序列与 GenBank（U03056）中 HYAL1 基因的序列完全一致。

2.5 HYAL1 基因在乳腺癌 MCF-7 和 ZR-75-30 细胞中的表达

稳定转染重组 pcDNA3.1-HYAL1 质粒的 MCF-7 和 ZR-75-30 细胞经 RT-PCR 鉴定可以高表达 HYAL1 基因，而未转染的以及转染了空载体的 MCF-7 和 ZR-75-30 细胞则几乎不见 HYAL1 基因的表达。见图 3。



1：DNA 标准；2：未转染 MCF-7 细胞；3：转染了空载体的 MCF-7 细胞；4：转染 pcDNA3.1-HYAL1 质粒的 MCF-7；5：未转染的 ZR-75-30；6：转染了空载体的 ZR-75-30；7：转染 pcDNA3.1-HYAL1 质粒的 ZR-75-30

图 3 HYAL1 基因在 MCF-7 and ZR-75-30 细胞中的稳定表达

2.6 HYAL1 基因过表达对乳腺癌细胞侵袭力的影响

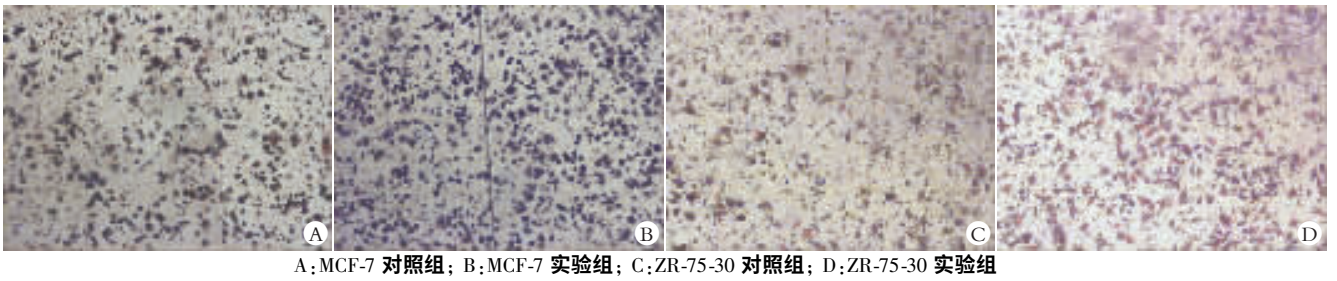
乳腺癌细胞受趋化因子的影响，穿过 ECM gel 迁移到 Transwell 小室的膜上，贴壁生长（图 4）。细胞计数结果显示过表达 HYAL1 基因的 MCF-7 细胞（实验组）的侵袭细胞数（293 ± 22）明显高于对照组（181 ± 12）（$P < 0.05$）；同样，过表达 HYAL1 基因的 ZR-75-30 细胞（实验组）的侵袭细胞数（272 ± 15）明显高于对照组（163 ± 11）（$P < 0.05$），说明 HYAL1 基因在乳腺癌细胞中的表达能增强其侵袭能力。

3 讨论

Hyase 与透明质酸（hyaluronic acid，HA）均是细胞外基质（extracellular matrix，ECM）的重要成分。天然的 HA 无血管生成作用，只有被 Hyase 降解的 HA 片段才具有血管生成作用。Hyase 可以降解 HA 刺激血管生成、降低细胞间黏附、促进细胞外基质去聚合，从而促进肿瘤细胞的迁移[4]。新血管的生成常伴随组织中 Hyase 活性的增强和 HA 浓度的降低[5]。Hyase 是降解透明质酸的一家族酶。目前发现人类共有 6 种 Hyase 基因型，分别位于人染色体 3p21.3（HYAL1、HYAL2、HYAL3）和 7q31.3（HYAL4、PH-20、HYALP1）上，其中以 HYALl、HYAL2 和 PH-20 最为重要[3]。正常人体组织中 Hyase 呈差异性分布：HYAL1 广泛存在于人体基质，HYAL2 主要分布于溶酶体，而 PH20 仅限于睾丸组织[6]。其中 HYAL1 有 5 种 mRNA 剪接变异体，只有 HYAL1wt 翻译的蛋白质才具有 Hyase 活性[7]。Hyase 一方面通过降解 HA 刺激血管生成，另一方面能降低细胞间黏附、促进细胞外基质去聚合，从而促进肿瘤细胞的迁移。新血管的生成常伴随组织中 Hyase 活性的增强和 HA 浓度的降低。

关于透明质酸与肿瘤的报道很多，但涉及透明质酸酶与肿瘤的侵袭、转移之间的关系的报道却少，现有的研究也主要局限于从临床角度分析 Hyase 与肿瘤分级及预后的关系[8,9]。对 Hyase 和 HA 如何调节肿瘤细胞侵袭、转移的机制仍不清楚，而关于 Hyase 与人乳腺癌的相关研究则更少。

我们前期研究发现，不同的乳腺癌细胞株 HYAL1 基因表达有显著差异，与酶学表达呈正相关[3]。为了进一步研究乳腺癌 Hyase 基因表型与乳腺癌恶性行为



A：MCF-7 对照组；B：MCF-7 实验组；C：ZR-75-30 对照组；D：ZR-75-30 实验组

图 4 乳腺癌细胞 MCF-7 和 ZR-75-30 的侵袭力变化 （瑞氏染色 ×100）

的关系，我们构建了 pcDNA3.1-HYAL1 质粒，利用脂质体将重组质粒转染到 Hyase 低表达的 MCF-7、ZR-75-30 细胞株，并筛选到稳定表达的细胞克隆。实验表明过表达 HYAL1 基因（转染重组载体）的 MCF-7 和 ZR-75-30 细胞的侵袭力生成潜力明显增强。为进一步的细胞侵袭力试验、诱导人脐静脉内皮细胞（ECV-304）生成管腔潜能的变化试验和体内试验，以及为阐明 Hyase 的表达和 Hyase 基因的表型特点在乳腺癌进程中的作用，探索其对乳腺癌恶性行为的影响等提供了实验基础。

参考文献：

[1] 任国胜，王小毅，姚榛祥. 人乳腺癌细胞株透明质酸酶的表达及其意义[J]. 中华实验外科杂志，2002，19(4)：336－337.
[2] 王小毅，任国胜，石　远，等. 肝素对透明质酸酶不同表达水平的人乳腺癌细胞侵袭力的影响[J]. 第三军医大学学报，2002，24(10)：1219－1221.
[3] 石　远，任国胜，王　良，等. 人乳腺癌细胞株透明质酸酶基因的表达及其意义[J]. 重庆医学，2005，34(2)：257－258.
[4] West D C, Hampson I N, Arnold F, *et al*. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid[J]. Science, 1985, 228(4705): 1324－1326.
[5] Lees V C, Fan T P, West D C. Angiogenesis in a delayed revascularization model is accelerated by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan[J]. Lab Invest, 1995, 73(2): 259－266.
[6] Csoka A B, Frost G I, Stern R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes[J]. Matrix Biol, 2001, 20(8): 499－508.
[7] Lokeshwar V B, Schroeder G L, Carey R I, *et al*. Regulation of hyaluronidase activity by alternative mRNA splicing[J]. J Biol Chem, 2002, 277(37): 33654－33663.
[8] Hautmann S H, Lokeshwar V B, Schroeder G L, *et al*. Elevated tissue expression of hyaluronic acid and hyaluronidase validates the HA-HAase urine test for bladder cancer[J]. J Urol, 2001, 165(6 Pt 1): 2068－2074.
[9] Delpech B, Laquerriere A, Maingonnat C, *et al*. Hyaluronidase is more elevated in human brain metastases than in primary brain tumours[J]. Anticancer Res, 2002, 22(4): 2423－2427.

（编辑　龙　亮）

文章编号：1000-5404(2008)02-0149-01

个案与短篇

新生儿脐血单个核细胞 ICOS 与转录因子表达的观察

闫　莉，刘恩梅，黄　英　（重庆医科大学附属儿童医院呼吸内科，重庆 400014）

新生鼠及人脐血的研究均表明，新生儿 T 细胞有向 Th2 细胞发育的潜能。可诱导共刺激因子（inducible co-stimulate factor，ICOS）是近年来发现表达在活化 T 淋巴细胞表面的一种新型膜分子，转录因子 T-bet、GATA-3 和 Foxp3 分别是 Th1、Th2 和 $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞的特异性转录因子，它们均可影响 T 细胞分化的上游调节。我们比较了新生儿脐血与成人外周血新鲜分离的单个核细胞及 PHA 刺激活化后的单个核细胞 $CD3^+ICOS^+$ 阳性率，转录因子 T-bet、GATA-3、Foxp3 mRNA 的表达水平及相应的细胞因子的表达水平，以了解新生儿 Th1/Th2 的功能状态。

1　材料与方法

1.1　标本

收集足月、顺产、体质量 2.5～4 kg、37 周≤孕周＜42 周、1 min Apgar 评分≥8 分、产前产时无异常的新生儿脐血，对照组为健康成人，无特应性疾病家族史及个人史，无其他疾病史，采血前 4 周无明显感染史及免疫调节剂用药史。

基金项目：重庆市科委科技计划（2003-43-97）
Supported by the Sci&Tech Project of Chongqing Scientific Committee (2003-43-97)
作者简介：闫　莉，女，重庆市人，硕士，医师，主要从事小儿呼吸系统疾病方面的研究，现在成都儿童专科医院。电话：（028）85138837，E-mail：pipi8812@126.com
通信作者：刘恩梅，电话：（023）63624074，E-mail：emliu186@126.com
收稿日期：2007-06-06；修回日期：2007-09-10

1.2　实验方法

分离培养脐血单个核细胞（umbilical cord blood mononuclearcells，CBMC）和人外周静脉血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cell，PBMC），进行细胞培养后通过流式细胞仪检测 ICOS 表达，通过 RT-PCR 定量检测 T-bet，GATA-3，FoxP3 及内参照 β-actin 表达水平，并用 ELISA 法测定培养上清 IL-4、IL-10 IFN-γ 水平。

1.3　统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SAS 6.0 统计软件进行分析，两组间比较用 t 检验，多组间比较用双因素方差分析法。

2　结果

培养前 CBMC 的 $CD3^+ICOS^+$ 阳性率显著高于 PBMC（$P<0.01$），无 PHA 刺激组与培养前无显著性差异（$P>0.05$）。PHA 刺激 48 h 后，CBMC 的 $CD3^+ICOS^+$ 阳性率与 PBMC 的 $CD3^+ICOS^+$ 阳性率均较培养前明显升高（$P<0.01$）。PHA 刺激后 CBMC 的 $CD3^+ICOS^+$ 阳性率仍然显著高于 PBMC（$P<0.01$）。培养前、PHA 刺激 48 h 后 CBMC T-bet、GATA-3、Foxp3 mRNA 的表达强度均低于 PBMC，其中新生儿脐血 T-bet 表达显著低于 PBMC（$P<0.05$），3 种转录因子无 PHA 刺激组与培养前均无显著性差异（$P>0.05$），PHA 刺激后 CBMC Foxp3 mRNA 表达较培养前明显增高（$P<0.05$），同时显著高于 PBMC Foxp3 mRNA 表达（$P<0.01$）。PHA 刺激培养 48 h 后，

（下转 156 页）