论著

文章编号:1000-5404(2008)12-1132-04

转染 maspin cDNA 在胃癌细胞中的表达及其对 uPA 和 uPAR 表达的影响

周文文,易永芬,郑爱华 (重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

摘 要:目的 研究转染 maspin cDNA 在胃癌细胞中的表达及其对 uPA 和 uPAR 表达的影响,探讨 maspin 基因抑制胃癌浸润转移的机制。**方法** 构建 maspin/PCR2.1 表达载体,转染胃癌细胞株 MKN28 和 SGC7901,用 RT-PCR 和 Western blot 检测 maspin 基因,uPA 和 uPAR 表达的变化。**结果** 经酶切证实,得到正向插入的真核表达质粒 maspin/PCR2.1。成功转染到 MKN28 和 SGC7901 细胞中并表达,uPA 和 uPAR 的 mRNA 和蛋白表达均降低。**结论** 成功构建了 maspin/PCR2.1 表达载体,maspin 基因可在靶细胞表达,并能抑制 uPA 和 uPAR 的表达。

关键词: maspin;PCR2.1 表达载体;尿激酶型纤溶酶原激活物;胃癌
中图法分类号: R394-33;R730.23;R735.2 **文献标识码:** A

Transfection of maspin/PCR2.1 vector inhibits uPA and uPAR expressions in gastric cancer cells *in vitro*

ZHOU Wen-wen, YI Yong-fen, ZHENG Ai-hua (Department of Pathology, School of Preclinical Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of maspin gene on metastasis and invasion of gastric cancer and its mechanism. **Methods** Maspin gene was ligated to the expression vector PCR2.1 with T_4 DNA ligase after the PCR2.1 was digested by *Hind* Ⅲ/*Xba* Ⅰ. The recombinant vector maspin/PCR2.1 was transfected into human gastric cancer cell lines MKN28 and SGC7901, then the mRNA and protein expression changes of maspin gene, uPA and uPAR were detected respectively by PT-PCR and Western blotting. **Results** After identified by digestion and sequencing, the reconstructed plasmid was confirmed to contain the correct and full nucleotide sequence of maspin gene. The expressions of maspin gene were up-regulated in MKN28 and SGC7901 cell lines, while the expressions of uPA and uPAR were down-regulated. **Conclusion** The expression vector maspin/PCR2.1 is constructed successfully and can be expressed in eukaryotic cells. Expressions of uPA and uPAR can be inhibited by maspin gene.

Key words: maspin; PCR2.1 expression vector; urokinase-type plasminogen activitor (uPA); uPAR; gastric cancer

maspin 是一种抑癌基因,编码的蛋白是丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族中的一员,其在肿瘤细胞的运动、侵袭以及新生肿瘤血管形成等转移的各个环节均发挥着重要作用。前期研究结果显示胃癌组织中 maspin mRNA 及蛋白表达均下调,且与胃癌的侵袭和淋巴结转移有关[1]。本研究采用构建真核表达质粒 maspin/PCR2.1,并将该质粒转染到胃癌细胞株 MKN28 和 SGC7901 中,并检测转染前后 maspin 基因、uPA 和 uPAR 的表达变化,为深入研究 maspin 基因的抑癌作用及机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

空载质粒 PCR2.1 由重庆医科大学临床学院肝胆外科阎雄博士惠赠;人胃癌高分化细胞株 MKN28 和中分化细胞株 SGC7901 购自重庆医科大学病毒性肝炎研究所;培养基 RPMI1640 培养基、小牛血清(美国 HyClone 公司);总 RNA 提取试

基金项目: 重庆市教委资助项目(040310)
Supported by the Program of Chongqing Municipal Education Committee (040310)
作者简介: 周文文,女,重庆市人,硕士研究生,主要从事消化系统肿瘤病理方面的研究。电话:13594079022, E-mail: wenwencq1018@yahoo.com.cn
通信作者: 易永芬,电话:(023)68012697, E-mail:yiyongfenl953@yahoo.com.cn
收稿日期: 2008-01-30;**修回日期:** 2008-03-14

剂 Trizol、Lipofectamine2000 转染试剂盒（美国 Invitrogen 公司）;质粒抽提试剂盒(北京天根生化科技公司);M-MLV 逆转录酶(美国 Promega 公司);限制性内切酶、surpercoiled DNA Ladder Marker、T_4 DNA 酶连接试剂盒、胶回收试剂盒、*Ex Taq* DNA 聚合酶(日本 TaKaRa 公司);maspin 一抗(美国 Santa Cruz 公司)、uPA 及 uPAR 一抗(武汉博士得生物工程有限公司)空载质粒 PCR2.1 由重庆医科大学临床学院肝胆外科阎雄博士惠赠;人胃癌高分化细胞株 MKN28 和中分化细胞株 SGC7901 购自重庆医科大学病毒性肝炎研究所;培养基 RPMI1640 培养基、小牛血清(美国 HyClone 公司);总 RNA 提取试剂 Trizol、Lipofectamine2000 转染试剂盒（美国 Invitrogen 公司）;质粒抽提试剂盒(北京天根生化科技公司);M-MLV 逆转录酶(美国 Promega 公司);限制性内切酶、surpercoiled DNA Ladder Marker、T_4 DNA 酶连接试剂盒、胶回收试剂盒、*Ex Taq* DNA 聚合酶(日本 TaKaRa 公司);maspin 一抗(美国 Santa Cruz 公司)、uPA 及 uPAR 一抗(武汉博士得生物工程有限公司)。

1.2　细胞培养

胃癌细胞株 MKN28 和 SGC7901 细胞均接种在含 10% 新生牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 RPMI1640 培养液中,37 ℃、5% CO_2 环境中培养,长满后传代。

1.3　maspin/PCR2.1 表达载体的构建

maspin 上游: 5′-TAGAAGTCACTTCTGTGTAGAGTAAAGAG-3′;下游:5′-CTAGTCTAGATTAAGGAGAACAGAATTTGC-3′。β-actin 上游: 5′-ATAAACCTGGCAATTGTCTCC-3′; 下游: 5′-CCTGAGTTGAAAATGGATTC-3′(410 bp)。收集培养的胃癌细胞株 MKN28 和 SGC7901,均 2×10^6 ml^{-1},总 RNA 的提取按 Trizol 试剂盒提供的方法进行,总 RNA 用 M-MLV 逆转录酶和 maspin 下游引物,按以下条件进行反转录反应:30 ℃ 10 min, 42 ℃ 30 min, 99 ℃ 5 min, 5 ℃ 5 min 合成第 1 链 cDNA。用 *Ex Taq* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增,反应体系内含 cDNA 4 μl, 10 × buffer 5 μl,上下游引物各 1 μl,$MgCl_2$ 4 μl,dNTPs 4 μl,*Taq* 酶 0.25 μl,加灭菌蒸馏水至 50 μl。经 94 ℃ 2 min 预变性后,按下述条件进行循环:94 ℃ 60 s,60 ℃ 60 s,72 ℃ 60 s, 共 35 个循环,72 ℃再延伸 10 min,以水作为阴性对照。扩增产物 2% 琼脂糖凝胶电泳 20 min(100 V),EB(0.5 μg/ml)染色,用 Bio-Rad 图像分析仪观察并扫描制片,胶回收目的基因。质粒 PCR2.1 用 *Hind* Ⅲ/*Xba* Ⅰ双酶切,胶回收,T_4 连接酶连接。按氯化钙法将连接产物转化大肠杆菌 DH5α。涂 LB 平板(加氨苄),37 ℃培养过夜。挑取白色菌落,加入 LB 液体培养基(加氨苄),37 ℃摇床培养过夜。由此大量制备重组质粒。重组质粒经酶切鉴定,再经过测序分析鉴定。

1.4　重组质粒转染细胞

采用 Lipofectamine™2000 脂质体转染法进行转染。转染前 1 d 换取无抗生素培养液培养,调整细胞数均为 2×10^5 ml^{-1},以 2 ml/孔接种于 6 孔培养板中培养。待细胞增至 90% ~95% 时,将质粒-脂质体复合物转染至细胞中(质粒: 脂质体 = 1∶3),继续在无血清无抗生素的培养液中(37 ℃,5% CO_2)培养 16 ~ 18 h 后换新鲜 10% 小牛血清培养液,继续培养 3 ~5 d 后检测各项指标。

1.5　RT-PCR 检测 maspin、uPA、uPAR mRNA 水平的表达

uPA 上游: 5′-GCTGTGAGATCACTGGCTTTG-3′; 下游: 5′-CCTTGGAGGGAACAGACGAG-3′;uPAR 上游:5′-GACCCTGAGCTATCGGACTG G-3′;下游:5′-TCATCCTTTGGACGCCCTTC-3′。

分别收集正常培养转染前和转染 72 h 后的 MKN28 及 SGC7901 细胞。按 Trizol 试剂盒说明提取总 RNA,分别用 M-MLV 逆转录酶和 maspin、uPA 和 uPAR 的下游引物, 按以下条件进行反转录反应:30 ℃ 10 min, 42 ℃ 30 min, 99 ℃ 5 min, 5 ℃ 5 min 合成第 1 链 cDNA。用 *Ex Taq* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增,反应体系内含 cDNA 4 μl,10 × buffer 5 μl,上下游引物各 1 μl,$MgCl_2$ 4 μl,dNTPs 4 μl,*Taq* 酶 0.25 μl,加灭菌蒸馏水至 50 μl。经 94 ℃ 2 min 预变性后,maspin 基因按 1.3 的条件进行循环。uPA 基因和 uPAR 基因按下述条件进行循环:94 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,共 35 个循环,最后都在72 ℃再延伸 10 min,以水作为阴性对照。扩增产物 2% 琼脂糖凝胶电泳 20 min(100 V),EB(0.5 μg/ml)染色,用 Bio-Rad 图像分析仪观察并扫描制片。

1.6　Western blot 检测 maspin、uPA、uPAR 蛋白表达

分别收集转染 maspin/PCR2.1 质粒的 MKN28 和 SGC7901 细胞 2×10^6 ml^{-1}。提取总蛋白,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样本。将蛋白样本转移至 PVDF 膜上,蛋白封闭液 37℃封闭 PVDF 膜 1 h,PBST 洗涤, 一抗(1∶300)37 ℃孵育 4 h。PBST 振荡洗涤二抗,加二抗(1∶2 000) 37 ℃孵育 20 min。PBST 洗涤 4 次,5 min/次。DAB 室温显色,显影。同样进行未处理的 MKN28 和 SGC7901 细胞 maspin、uPA 和 uPAR 蛋白检测。

1.7　统计学方法

采用 SPSS 10.0 软件进行 t 检验。

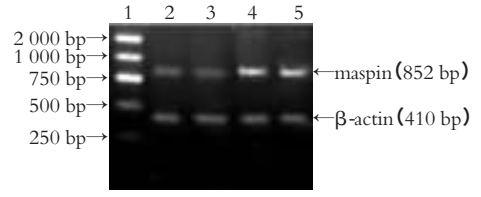
2　结果

2.1　重组质粒的酶切鉴定

重组质粒 maspin/PCR2.1 经 *Hind* Ⅲ和 *Xba* Ⅰ双酶切后得到 3 819 bp 的载体片段和 2 584 bp 的 maspin 基因片段。PCR2.1 质粒经双酶切后仅得到 3 819 bp 的载体片段,100 bp 的小片段未见。初步证明 maspin 基因被插入到 PCR2.1 质粒中。重组质粒经测序鉴定,无突变,符合 GenBank 相应序列。

2.2　maspin/PCR2.1 转染 MKN28 和 SGC7901 细胞后 maspin mRNA 表达变化

半定量 RT-PCR 检测结果以琼脂糖电泳条带的亮度来判断 maspin 的 mRNA 表达高低。实验结果(图 1)显示,未转染组 maspin mRNA 表达较弱;而 maspin/PCR2.1 转染组中 maspin mRNA 表达均明显增强。MKN 28 细胞稳定转染前后 maspin 的光密度值分别是(0.400 ± 0.081)和(1.457 ± 0.322),差异显著($P<0.05$),SGC7901 细胞稳定转染前后 maspin 的光密度值分别是(0.381 ± 0.072)和(1.462 ± 0.217),差异显著($P<0.05$)。

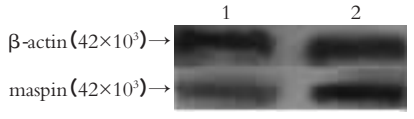


1:DNA 标准(DL 2000);2: 转染前 MKN28 细胞;3: 转染前 SGC7901 细胞;4: 转染后 MKN28 细胞;5: 转染后 SGC7901 细胞

图1 转染前后 maspin mRNA 表达变化

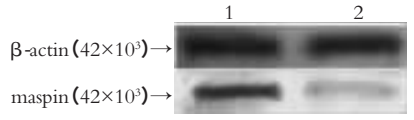
2.3 maspin/PCR2.1 转染 MKN28 和 SGC7901 细胞后 maspin 蛋白表达变化

与未处理 MKN28 和 SGC7901 细胞组中相比,maspin/PCR2.1 转染组 maspin 蛋白表达明显增强(图 2、3)。SGC7901 细胞稳定转染前后 maspin 的光密度值分别是(0.280 ±0.014)和(0.873 ±0.165),差异显著($P<0.05$)。MKN28 细胞稳定转染前后 maspin 的光密度值分别是(0.290 ±0.091)和(0.881 ±0.157),差异显著($P<0.05$)。



1: 转染前; 2: 转染后

图2 转染前后 SGC7901 细胞 maspin 蛋白表达

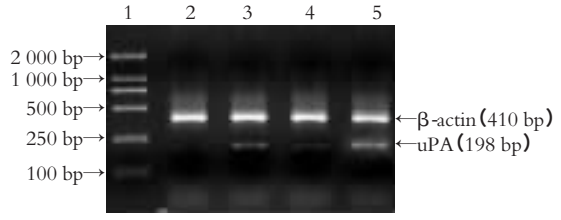


1: 转染后; 2: 转染前

图3 转染前后 MKN28 细胞 maspin 蛋白表达

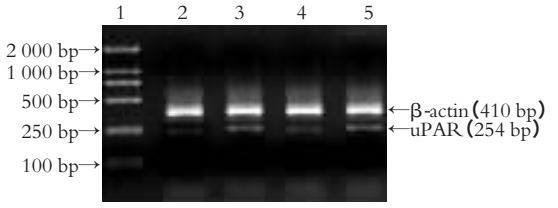
2.4 maspin/PCR2.1 转染 MKN28 和 SGC7901 细胞后 uPA 和 uPAR mRNA 表达变化

结果显示,未转染组 uPA 和 uPAR mRNA 表达均较强;而 maspin/PCR2.1 转染组中 uPA 和 uPAR mRNA 表达均明显减弱(图 4、5)。SGC7901 细胞稳定转染前后 uPA 的光密度值分别是(0.686 ±0.166)和(0.375 ±0.185),差异显著($P<0.05$),MKN28 细胞稳定转染前后 uPA 的光密度值分别是(0.673 ±0.154)和(0.361 ±0.171),差异显著($P<0.05$),SGC7901 细胞稳定转染前后 uPAR 的光密度值分别是(0.625 ±0.106)和(0.317 ±0.174),差异显著($P<0.05$),MKN28 细胞稳定转染前后 uPAR 的光密度值分别是(0.620 ±0.117)和(0.298 ±0.141),差异显著($P<0.05$)。



1: DNA 标准(DL 2000);2:转染后 MKN28 细胞;3:转染前 MKN28 细胞;4:转染后 SGC7901 细胞;5:转染前 SGC7901 细胞

图4 转染前后 MKN28 和 SGC7901 细胞 uPA mRNA 表达

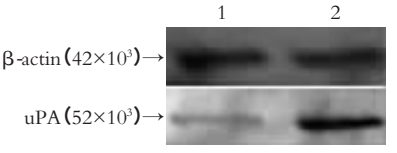


1: DNA 标准(DL 2000);2:转染后 MKN28 细胞;3:转染前 MKN28 细胞; 4:转染后 SGC7901 细胞;5:转染前 SGC7901 细胞

图5 转染前后 MKN28 和 SGC7901 细胞 uPAR mRNA 表达

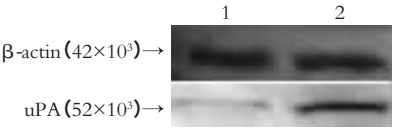
2.5 maspin/PCR2.1 转染 MKN28 和 SGC7901 细胞后 uPA 和 uPAR 蛋白表达变化

与未处理 MKN28 和 SGC7901 细胞组中相比。maspin/PCR2.1 转染组 uPA 和 uPAR 蛋白表达明显增强(图 6 - 9)。SGC7901 细胞稳定转染前后 uPA 的光密度值分别是(0.686 ±0.231)和(0.268 ±0.083),uPAR 的光密度值分别是(0.625 ±0.141)和(0.205 ±0.071),差异显著($P<0.05$)。MKN28 细胞稳定转染前后 uPA 的光密度值分别是(0.660 ±0.143)和(0.264 ±0.082), uPAR 的光密度值分别是(0.607 ±0.126)和(0.201 ±0.070),差异显著($P<0.05$)。



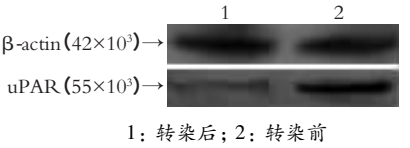
1: 转染后; 2: 转染前

图6 转染前后 SGC7901 细胞 uPA 蛋白表达



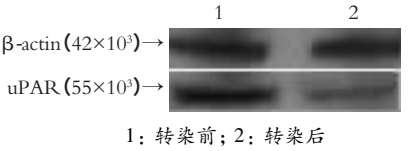
1: 转染后; 2: 转染前

图7 转染前后 MKN28 细胞 uPA 蛋白表达



1: 转染后; 2: 转染前

图8 转染前后 SGC7901 细胞 uPAR 蛋白表达



1: 转染前; 2: 转染后

图9 转染前后 MKN28 细胞 uPAR 蛋白表达

3 讨论

maspin 首先是 Zou 等[2]于 1994 年在正常乳腺上皮中发现的一种抑癌基因,编码的蛋白是丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族中的一员。maspin 在正常乳腺、前列腺、小肠、卵巢等组织中高表达,在相应的恶性肿瘤中

表达下调或不表达。前期研究结果显示胃癌组织中 maspin mRNA 及蛋白表达均下调,且与胃癌的侵袭和淋巴结转移有关[1]。有学者应用逆转录病毒转染技术在几种人癌细胞株和鼠细胞株获得了 maspin 再表达,证实 maspin 再表达后的肿瘤细胞株的生长、侵袭能力都有显著性降低[3]。然而,通过再表达 maspin 基因抑制胃癌细胞的生长、浸润和转移鲜见报道。本研究成功构建了 maspin/PCR2.1 表达载体,转染入人胃癌株 MKN28 和 SGC7901 后,maspin 基因 mRNA 和蛋白水平的表达都有显著性提高,并能抑制 uPA 和 uPAR 的表达,从而降低癌细胞侵袭转移的潜能[4]。

丝氨酸蛋白酶在肿瘤细胞的侵袭和转移的中发挥着重要作用。而 uPA 和 uPAR 属于蛋白水解酶家族的重要成员,他们能有效地降解细胞外基质。一方面 uPAR 与 uPA 相结合,不仅固定 uPA 使之位于细胞表面形成促进纤溶酶产生的环境,而且与 uPA 前体结合后通过自分泌或旁分泌机制使 uPA 前体转变为具有活性 uPA 分子,活化的 uPA 能启动纤溶途径降解肿瘤细胞外基质,并激活金属蛋白水解酶降解基底膜中的Ⅳ型胶原和弹性蛋白。另一方面 uPA 与细胞表面 uPAR 结合,能使 uPAR 与细胞表面亲玻黏连蛋白(vitronectin)、整合素(integrin)受体蛋白等的亲和力增强,并使以上蛋白与其他蛋白如 caveolin 等在瘤灶局部黏附、积聚,启动细胞内信号,激活细胞内蛋白激酶,促进肿瘤细胞分裂及迁移[5]。有作者报道 maspin 可与 uPA 结合形成一种抗 SDS 的蛋白酶复合物,降低 uPA 的释放能力,减少纤溶酶原活化为纤溶酶。此外,重组 maspin 的反应活性部位 RSL 结构,能特异地与单链纤维蛋白溶酶原激活物结合,形成稳定复合物,从而抑制 uPA 与 uPAR 结合[6-8]。最近的研究表明,maspin 的这些作用可能与调节 PAKl、PI3K 和 ERK1/2 的活性有关[9]。本实验结果显示,中分化胃癌细胞株 uPA 和 uPAR 的表达均高于高分化胃癌细胞株,成功转染 maspin/PCR2.1 质粒后,两株胃癌细胞的 uPA 和 uPAR 表达在 mRNA 和蛋白水平都明显减弱。表明 maspin 的再表达能有效降低胃癌细胞 uPA 和 uPAR 的表达。通过抑制 uPA 和 uPAR 蛋白的功能,来阻止肿瘤细胞附着于基底膜,抑制基底膜的降解,使胃癌细胞的穿膜活力下降,阻止肿瘤细胞的移出,从而实现抑制肿瘤的发生、发展和浸润的目的。

参考文献:

[1] 邓　玮,易永芬,刘丹丹. 胃癌组织 Maspin,uPA,MMP-7 表达的意义[J]. 世界华人消杂志, 2006, 14(7): 660-665.

[2] Zou Z, Anisowicz A, Hendrix M J, *et al*. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells[J]. Science, 1994, 263(5146): 526-529.

[3] Shi H Y, Zhang W, Liang R, *et al*. Blocking tumor growth, invasion, and metastasis by maspin in a syngeneic breast cancer model[J]. Cancer Res, 2001, 61(18): 6945-6951.

[4] 阎　雄, 姚榛祥. maspin/PCR2.1 表达载体的构建及意义[J]. 重庆医科大学学报, 2005, 30(3): 379-382.

[5] Amir S, Maragaryan N V, Odero-Marah V, *et al*. Maspin regulates hypoxia-mediated stimulation of uPA/uPAR complex in invasive breast cancer cells[J]. Cancer Biol Ther, 2005, 4(4): 400-406.

[6] Kumamoto H, Ooya K. Immunohistochemical detection of uPA, uPAR, PAI-1, and maspin in ameloblastic tumors[J]. J Oral Pathol Med, 2007, 36(8): 488-494.

[7] Cher M L, Biliran H R, Jr., Bhagat S, *et al*. Maspin expression inhibits osteolysis, tumor growth, and angiogenesis in a model of prostate cancer bone metastasis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(13): 7847-7852.

[8] Kitoh T, Yanai H, Saitoh Y, *et al*. Increased expression of matrix metalloproteinase-7 in invasive early gastric cancer[J]. J Gastroenterol, 2004, 39(5): 434-440.

[9] Odero-Marah V A, Khalkhali-Ellis Z, Chunthapong J, *et al*. Maspin regulates different signaling pathways for motility and adhesion in aggressive breast cancer cells[J]. Cancer Biol Ther, 2003, 2(4): 398-403.

(编辑　王小寒)

中华医学会第十五次全国放射学学术会议通知

中华医学会定于2008年10月16-20日在重庆国际会议展览中心召开第十五次全国放射学学术会议。这是放射界的全国盛会首次选择在西部地区召开。届时将有众多国际、国内著名专家到会作专题学术报告,并进行多种形式的学术交流。凡未在正式出版物上公开发表的以下有关内容均可投稿参会:常规X线及数字X线成像的临床应用;CT、MRI及其新技术临床应用与基础研究;介入放射学诊疗技术应用及研究;PACS系统的应用经验;放射学设备管理、维修、维护以及放射技术学;放射学护理。详情请登录网址:http://www.chinaradiology.org/ccr15/。本次会议在学术交流方面得到了《第三军医大学学报》和《重庆医科大学学报》的鼎力支持,大会组委会将选出部分优秀论文在《第三军医大学学报》(CSCD核心库)2008年第20期、《重庆医科大学学报》(CSCD扩展库)2008年第20期刊出。有意者请按杂志稿约要求将论文全文投至邮箱fsxh2006@sina.com,并在主题中注明"XX学报+作者名"。《第三军医大学学报》稿约可登录http://aammt.tmmu.com.cn。截稿日期:2008年6月30日。