论著

文章编号:1000-5404(2009)04-0326-04

MASPIN真核表达载体的构建及其对胃癌细胞株SGC7901增殖的影响

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

摘 要:目的 构建MASPIN真核表达载体,分析MASPIN过表达对胃腺癌细胞株SGC7901的影响。**方法** PCR扩增MASPIN基因全长,用载体PCR2.1构建重组质粒,转染至胃癌细胞株SGC7901。RT-PCR、Western blot检测MASPIN基因表达变化,MTT法检测细胞增殖情况,流式细胞仪(FCM)分析细胞周期,观察过表达MASPIN对SGC7901细胞株的影响。**结果** 成功构建MASPIN/ PCR2.1表达载体并转染至胃癌细胞株SGC7901,转染上调了SGC7901细胞株MASPIN在mRNA、蛋白水平的表达。转染MASPIN的SGC7901细胞增殖率随时间而减慢,第24、48、72小时的细胞增殖率分别为93.07%、81.97%、66.5%,明显低于转染空载体组(95.98%、95.79%、95.59%,$P<0.05$)。与转染空载体组相比,过表达MASPIN的SGC7901细胞株在G_0/G_1期所占比例明显提高(70.3% *vs* 55.6%),S期细胞减少(19.8% *vs* 34.9%,$P<0.05$)。**结论** 成功构建MASPIN/PCR2.1表达载体,过表达MASPIN可抑制SGC7901细胞株的增殖。

关键词: 胃肿瘤;SGC7901细胞;MASPIN;增殖

中图法分类号: R394-33;R730.23;R735.2 **文献标识码:** A

Construction of an eukaryotic vector expressing maspin gene and its effect on proliferation of gastric cancer cell line SGC7901

ZHENG Ai-hua, YI Yong-fen, ZHOU Wen-wen (Department of Pathology, Falcuty of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To construct a recombinant eukaryotic vector expressing maspin cDNA, and to explore the effect of maspin overexprssion on the proliferation of human gastric carcinoma cell line SGC7901. **Methods** The fragment of maspin gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR). An eukaryotic vector expressing maspin (maspin/PCR2.1) was constructed with PCR2.1, and transfected into SGC7901 cells. The expression of maspin at mRNA and protein level was detected by RT-PCR and Western blotting. The proliferation of SGC7901 cells was observed by MTT. Cell cycle was analyzed by flow cytometry. **Results** Recombinant plasmid maspin/PCR2.1 was constructed and transfected into SGC7901 successfully. The mRNA and protein levels of maspin were significantly higher in the maspin/PCR2.1 group (33.6±1.2, 23.4±1.6) than that in the blank PCR2.1 (15.0±1.5, 12.3±1.5) and the untreated group (13.7±2.0, 12.0±1.3) ($P<0.05$). The proliferation of SGC7901 cells was significantly lower (93.07%, 81.97%, 66.5%) in the maspin/PCR2.1 group at 24, 48, 72 h than that in the blank PCR2.1 group (95.98%, 95.79%, 95.59%) ($P<0.05$). Compared with that in the blank PCR2.1 group, the G_0/G_1 phase proportion of the maspin/PCR2.1 group at 72 h was significantly higher (70.3% *vs* 55.6%, $P<0.05$), and the S phase proportion was lower (19.8% *vs* 34.9%, $P<0.05$). **Conclusion** MASPIN overexpression can suppress the proliferation of gastric carcinoma cell line SGC7901.

Key words: MASPIN/PCR2.1; SGC7901 cells; gastric neoplasm; proliferation

胃癌是常见的消化系统恶性肿瘤之一,许多基因在胃癌的发生、发展中发挥作用。研究表明[1],MASPIN表达缺失和胃癌的发生和演进有重要关系,和胃癌的侵袭及淋巴结转移有关。本研究采用基因重组方法,构建MASPIN/PCR2.1表达载体转染至分化胃癌细胞株SGC7901,探索过表达MASPIN对胃癌细胞增殖和细胞周期的影响,以期为胃癌的治疗提供新

基金项目: 重庆市教委资助项目(040310)
Supported by the Projects of Education Committee of Chongqing Municipal(040310)

作者简介: 郑爱华,女,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事消化系统肿瘤病理方面的研究。E-mail: zhengaihua2000@yahoo.com.cn

通信作者: 易永芬,电话:(023)68012697,E-mail:yiyongfen1953@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-04-09;**修回日期:** 2008-07-29

思路。

1　材料与方法

1.1　主要试剂

RPMI1640 培养基、小牛血清购于美国 HyClone 公司,质粒抽提试剂盒购于北京天根生化科技公司,空载质粒 PCR2.1 由重庆医科大学附属第一医院肝胆外科阎雄博士惠赠,Lipofectamine2000 转染试剂盒购于美国 Invitrogen 公司,总 RNA 提取试剂、RT-PCR Kit(AMV)Ver3.0、限制性内切酶、supercoiled DNA Ladder Marker、T_4连接试剂盒、胶回收试剂盒购于大连宝生物试剂公司,MASIPIN 一抗购于美国 Santa Cruz 公司,MTT、RNase 购于美国 Sigma 公司。

1.2　细胞株和细胞培养

人胃癌细胞株 SGC7901 购于重庆医科大学病毒性肝炎研究所;在含 10% 灭活小牛血清的 RPMI1640 培养液、37 ℃、5% CO_2条件下培养。用 0.5% 的胰酶消化传代。

1.3　靶基因和载体构建

以 GenBank 上提供的 MASPIN mRNA 序列(序列号 453368)设计包含 MASPIN 基因全长和 *Hind* Ⅲ/*Xba* Ⅰ双酶位点引物,上游引物 5′-CCCAAGCTTATGGATGCCCTGCAACTAG-3′,下游引物 5′-CTAGTCTAGATTAAGGAGAACAGAATTTGCC-3′,产物长度为 2 584 bp。收集培养的正常胃上皮细胞株 HFI145 约 2×10^6,提取总 RNA 后进行两步 RT-PCR 反应(具体步骤参见说明书)。

将目的基因正向插入到 PCR2.1 载体的 *Hind* Ⅲ和 *Xba* Ⅰ克隆位点,构建重组质粒 MASPIN/PCR2.1,并经内切酶和测序证实。

1.4　质粒转染和筛选克隆的 PCR 鉴定

Lipofectamine™2000 脂质体转染法和 MASPIN/PCR2.1 重组质粒瞬时转染 SGC7901 细胞。对照组为转染空白质粒组和未处理组。转染前 1 d 换取无抗生素培养液培养,调整细胞数为 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 37 ℃,5% CO_2无血清无抗生素的培养液中培养 8 h 后换新鲜 1640 培养液,继续培养。

12 h 后收集细胞行检测转染后细胞的 PCR 鉴定。相关引物为 PCR2.1 质粒上一段寡核苷酸序列,上游引物 5′-CCCGTCACTCGCAAGCG-3′,下游引物 5′-TGGTTGAGAAAAGGCTTCC-3′,产物长度为 410 bp。

1.5　RT-PCR 检测 MASPIN mRNA 水平的表达

分别收集正常培养、转染重组质粒和空质粒 12 h 后细胞,按提取总 RNA 并按 PCR Kit(AMV)Ver3.0 试剂盒说明进行两步 RT-PCR 反应。MASPIN 上游引物 5′-CTCCAGGCCCGCAATGGATGCC-3′,下游引物 5′-GGGCTATGCCACITAAGGAG-3′,扩增产物大小 1 240 bp。内参照由 TaKaRa 公司合成,上游引物 5′-TTGACGGAAGGGCACCACCAG-3′,下游引物 5′-GCACCACCACCCACGGAATCG-3′,产物大小 270 bp,扩增产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳 20 min(100 V),EB(0.5 μg/ml)染色。用 Bio-Rad 图像分析仪成像并进行半定量分析,以测定目的基因的表达水平。

1.6　Western blot 检测 MASPIN 蛋白水平的表达

分别收集正常培养、转染重组质粒和空质粒 12 h 后细胞提取总蛋白,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(MASPIN 1∶300)37 ℃孵育 4 h。PBST 振荡洗涤二抗,加二抗(1∶200) 37 ℃孵育 20 min。PBST 洗涤 4 次,5 min/次。DAB 室温显影,记录结果。

1.7　MTT 法测定细胞增殖率

实验分组:转染重组质粒组、转染空质粒组、空白细胞组。分别将细胞接种于 96 孔板中,每组每孔约 1×10^3 个细胞,连续培养。每组分 12、24、48、72 h 取出 3 孔,在吸取每孔的培养液后加入 20 μl MTT 和 100 μl 无血清培养液,在 37 ℃,5% CO_2条件下培养 2 h。用 Model-550 ELISA Plate Reader 读取波长 490 nm 处的吸光度值[$D(490)$],并按下式计算细胞增殖抑制率。

细胞增殖抑制率(%) = [$D(490)_{空白组}$ − $D(490)_{处理组}$]/$D(490)_{空白组}$ ×100%

1.8　FCM 分析细胞周期

分别将转染重组质粒组细胞、转染空载体组细胞和未处理 SGC7901 细胞接种于 96 孔板中,每组 12 孔,调整细胞数约 1.0×10^6 ml^{-1},连续培养 72 h。0.5% 胰酶消化离心,PBS 洗 2 次后 1 000 r/min 离心去上清。调整细胞数为 5.0×10^5 ml^{-1},加入预冷 70% 乙醇 2 ml 固定,RNase 消化,4 ℃放置 24 h,取出 PBS 洗 2 次。流式细胞仪检测。所有资料用用 Muhiplus Soflwire Ⅱ软件分析数据。

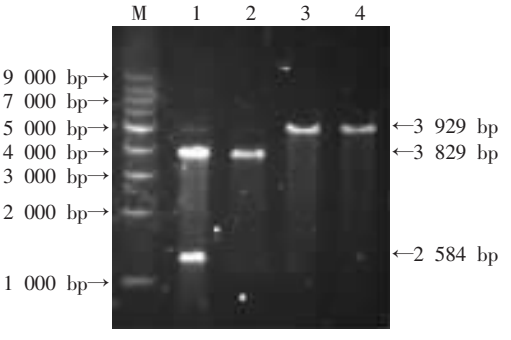
1.9　统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　载体 MASPIN/PCR2.1 的鉴定及转染重组质粒后细胞的 PCR 鉴定

测序鉴定结果 MASPIN 已成功连接到载体上 PCR2.1 上,无突变,完全符合 GenBank 相应序列。重组质粒 MASPIN/PCR 2.1 经 *Hind* Ⅲ和 *Xba* Ⅰ双酶切后得到 3 829 bp 的载体片段和 2 584 bp 的 MASPIN 基因片段;PCR2.1 质粒经双酶切后无插入片段显示(图 1)。初步证明 MASPIN 基因被插入到 PCR2.1 质粒中。



M:标准;1:MASPIN/PCR2.1 经 *Hind* Ⅲ和 *Xba* Ⅰ双酶切;2:PCR 2.1 经 *Hind* Ⅲ和 *Xba* Ⅰ双酶切;3:MASPIN/PCR2.1 经 *Hind* Ⅲ单酶;4:MASPIN/PCR2.1 经 *Xba* Ⅰ单酶切

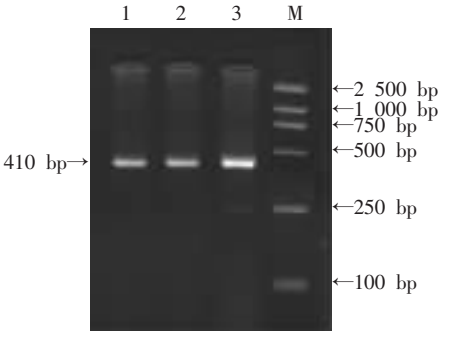
图 1　MASPIN/PCR2.1 重组质粒酶切鉴定

表1 转染重组质粒及空质粒组 SGC7901 细胞吸光度值

组别	12 h		24 h		48 h		72 h	
	D(490)	抑制率(%)	D(490)	抑制率(%)	D(490)	抑制率(%)	D(490)	抑制率(%)
未处理组	0.583 ± 0.018[a]	0	0.718 ± 0.012[a]	0	0.951 ± 0.014[a]	0	1.274 ± 0.011[a]	0
空质粒组	0.586 ± 0.057[a]	0.04	0.696 ± 0.022[a]	3.01	0.876 ± 0.017[a]	4.21	1.218 ± 0.012	4.41
重组质粒组	0.526 ± 0.025	0.98	0.668 ± 0.015	6.93	0.750 ± 0.021	18.03	0.847 ± 0.025	33.50

a: $P<0.05$,与重组质粒组比较

对已转染 MASPIN/PCR2.1 的胃癌细胞 SGC7901,通过 PCR 扩增,得到了 410 bp 的扩增产物(图 2),说明转染质粒 DNA 已经整合到 SGC7901 细胞染色质上。

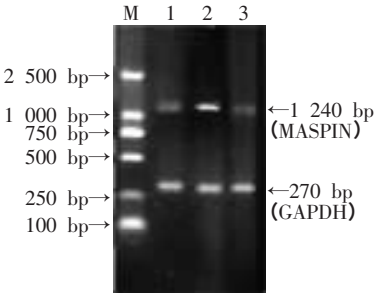


M: 标准; 1,2,3: 转染重组质粒 SGC7901 细胞

图2 转染重组质粒后细胞的 PCR 鉴定

2.2 MASPIN/PCR2.1 转染 SGC7901 细胞后 MASPIN mRNA 表达变化

半定量 RT-PCR 检测结果以各目的条带和内参 GAPDH 的亮度比较来判断 MASPIN mRNA 表达高低。未转染组和转染空质粒组 MASPIN mRNA 表达较弱相对光密度值分别为(13.7 ± 2.0)、(15.0 ± 1.5);而 MASPIN/PCR2.1 转染组与前 2 者比较 MASPIN mRNA 表达均明显增强,相对光密度值(33.6 ± 1.6)($P<0.05$)。未转染组和转染空质粒比较无显著性差异($P>0.05$)。见图 3。

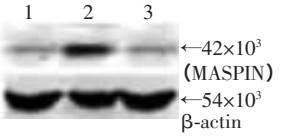


M:标准; 1: SGC7901 MASPIN mRNA 表达; 2: 转染重组质粒后 SGC7901 MASPIN mRNA 表达; 3 转染空质粒 SGC7901 MASPIN mRNA 表达

图3 转染前后 MASPIN mRNA 表达变化

2.3 Western blot 检测转染前后 MASPIN 蛋白表达变化

Western blot 检测结果以条带的灰度来判断 MASPIN 的蛋白表达高低。未转染组及转染空质粒组蛋白表达较弱,相对灰度值分别为(12.0 ± 1.3)、(12.3 ± 1.5);而 MASPIN/PCR2.1 转染组中 MASPIN 蛋白表达明显增强相对灰度值为(23.4 ± 1.6)($P<0.05$)。未转染组和转染空质粒比较无显著性差异($P>0.05$)。见图 4。



1: SGC7901 MASPIN 蛋白表达; 2: 转染重组质粒后 SGC7901 MASPIN 蛋白表达; 3: 转染空质粒 SGC7901 MASPIN 蛋白表达

图4 转染前后 MASPIN 蛋白表达变化

2.4 转染 MASPIN 对细胞增殖的影响

与转染空质粒组相比,转染重组质粒组细胞在第 24 小时开始出现明显细胞增殖抑制效应,并随时间的延长,抑制率明显增高($P<0.05$)。提示过表达 MASPIN 能抑制 SGC7901 细胞增殖率(图 5,表 1)。

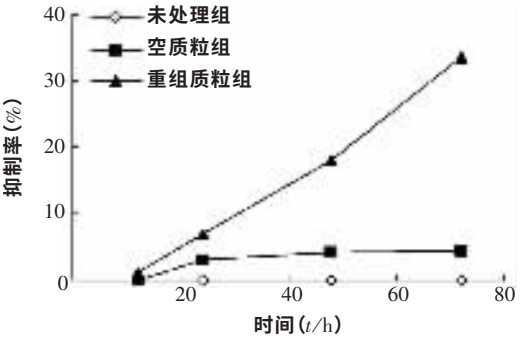


图5 转染重组质粒及空质粒组 SGC7901 细胞增殖抑制率

2.5 FCM 检测 SGC7901 细胞细胞周期的变化

流式细胞仪分析周期相分布结果显示,与转染空质粒组相比,转染重组质粒 12、24、48、72 h 后出现 G_0/G_1 期阻滞,表现为 72 h G_0/G_1 期细胞百分比升高达 70.3%,S 期细胞百分比降低至 19.8%。此外,转染重组质粒组细胞还见到凋亡细胞群,凋亡率约为 15.3%(表 2)。

表2 转染 MASPIN/PCR2.1 对 SGC7901 细胞周期的影响(%)

组别	G_0/G_1	S	G_2/M	凋亡率
未处理组	55.5[a]	35.0[a]	9.5[a]	-
空质粒组	57.0[a]	33.5[a]	9.5[a]	-
重组质粒组	70.3	19.8	9.9	15.3

a: $P<0.05$,与重组质粒组比较

3　讨论

MASPIN 基因是丝氨酸蛋白酶抑制剂家族中的一员。国内外研究表明,它在肿瘤的发生、发展阶段存在多种抑制效应,以对乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、唾液腺癌等的研究为最多。其主要防癌机制为抑制肿瘤细胞生成、侵袭、新生血管形成以及诱导凋亡的各个环节。

本实验用 MSPIN/PCR2.1 表达载体转染人胃癌细胞株 SGC7901,转染上调了 MASPIN 在 SGC7901 细胞株 mRNA 和蛋白水平的表达,成功建立了过表达 MASPIN 的细胞系。MTT 实验结果显示, SGC7901 细胞转染 MASPN 基因以后,细胞的增殖明显受到抑制,且具有时间依赖性,时间越长,增殖率抑制越明显。同样的,时平等[2]用姜黄素处理转染 PGL-3/MASPIN 载体的前列腺癌细胞株 LNCaP 后该细胞株凋亡率增加,MTT 法检测到了细胞增殖活力降低。Tahmatzopoulos 等[3]研究过表达 MASPIN 的前列腺癌细胞株 DU-145 对多沙唑嗪的反应时亦发现同样的结果,并进一步检测了 VEGF、TGFbetaR Ⅱ、Smad4、bax 相关基因的表达变化,发现伴随有以上基因在 mRNA,蛋白水平的表达变化,为 MASPIN 用于胃癌的基因治疗提供了强有力的证据。

转染 MASPIN 还影响了 SGC7901 细胞的周期分布,流式细胞仪检测结果显示细胞周期的阻滞主要在 G_0/G_1期,提示 MASPIN 过表达能抑制肿瘤的发展,与唐波等[4]的研究结果一致,他们用 5-Aza-2'-deoxycytidine 解除人结肠癌细胞株 PKO 中 MASPIN 基因启动区的超甲基化作用后,PKO 细胞株增殖率明显抑制,细胞周期停滞在 G_0/G_1。

IRF6(Interferon regulatory factor 6,干扰素调节因子 6)是 IRF 家族中具有特殊作用的成员,肿瘤细胞中 IRF6 的再表达能引起细胞周期停滞。Bailey 等[5]在研究乳腺癌中 IRF6 和 MASPIN 的关系时发现,MASPIN 和 IRF6 联合作用通过促进肿瘤细胞进入 G_0/G_1期而促进了肿瘤细胞的分化。抑癌基因 P53 在调节细胞周期的方面的重要作用已得到广泛的认同,作用机制主要其为参与了细胞周期中导致 G_1期停滞或 DNA 损伤细胞凋亡的信号传导过程。Lee 等[6-9]应用免疫组织化学、蛋白印迹法等多种方法检测胃癌组织中 MASPIN 和 P53 的表达情况,发现胃癌组织中 MASPIN 表达和 P53 具有负相关性,MASPIN 联合 P53 可以作为一个独立的胃癌诊断指标。Zhang 等[10]利用组织芯片技术研究不同肿瘤组织中 MASPIN 蛋白的表达及其与突变 P53 蛋白的负相关性后,提出 P53 蛋白在体内能真正激活 MAPSIN 基因表达,MASPIN 作为一个潜在的 p53 靶基因,直接参与了肿瘤的侵染和恶化过程。本实验中 SGC7901 细胞增殖抑制,细胞周期出现 G_0/G_1阻滞的原因可能由于和以上因素有密切关系。但 Zhang 等[11]用 5-Aza-CdR 上调乳腺癌细胞 MDA-MB-435S 的 MASPIN 表达以后,检测到了细胞增殖率的抑制和 G_2/M 期阻滞。以上现象提示 MASPIN 对肿瘤细胞周期的调节方式是多样化的,可能和肿瘤的类别有密切关系。

综上所述,转染 MASPIN 体现出了抑制胃癌细胞增殖的作用,而这些作用和过表达 MASPIN 有关,但其具体机制还应进一步研究。

参考文献:

[1] Zheng H C, Wang M C, Li J Y, *et al*. Expression of maspin and kai1 and their clinicopathological significance in carcinogenesis and progression of gastric cancer[J]. Chin Med Sci J, 2004, 19(3): 193 - 198.

[2] 时　平, 陈蔚文, 胡晓燕, 等. 姜黄素上调前列腺癌细胞 LNCaP 中 maspin 基因的表达[J]. 药学学报, 2006, 41(12): 1152 - 1156.

[3] Tahmatzopoulos A, Sheng S, Kyprianou N. Maspin sensitizes prostate cancer cells to doxazosin-induced apoptosis[J]. Oncogene, 2005, 24(34): 5375 - 5783.

[4] 唐　波, 彭志红, 余佩武, 等. 5-氮-2'-脱氧胞苷对 RKO 结肠癌细胞株 MASPIN 基因去甲基化的转录调节作用[J]. 中华胃肠外科杂志, 2006, 9(3): 260 - 263.

[5] Bailey C M, Abbott D E, Margaryan N V, *et al*. Interferon regulatory factor 6 promotes cell cycle arrest and is regulated by the proteasome in a cell cycle-dependent manner[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(7): 2235 - 2243.

[6] Lee D Y, Park C S, Kim H S, *et al*. Maspin and p53 protein expression in gastric adenocarcinoma and its clinical applications[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2008, 16(1): 13 - 18.

[7] 贺　岩, 张　磊, 李莹杰, 等. maspin 蛋白在胃癌患者中的表达及其与 P53 蛋白的相关性[J]. 中华医学杂志, 2007, 87(13): 909 - 912.

[8] 阎　雄, 姚榛祥. maspin/pEFIRES-N 表达载体的构建及应用[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(22): 2205 - 2208.

[9] Ito R, Nakayama H, Yoshida K, *et al*. Loss of maspin expression is associated with development and progression of gastric carcinoma with p53 abnormality[J]. Oncol Rep, 2004, 12(5): 985 - 990.

[10] ZHANG W, Zhang M. Tissue microarray analysis of maspin expression and its reverse correlation with mutant p53 in various tumors[J]. Int J Oncol, 2002, 20(6): 1145 - 1150.

[11] ZHANG B, Huang T, Liu K, *et al*. Effects of 5-Aza-CdR on cell proliferation of breast cancer cell line MDA-MB-435S and expression of maspin gene[J]. J Huazhong UNIV Sci Technolog Med Sci, 2007, 27(5): 543 - 546.

(编辑　龙　亮)