文章编号:1000-5404(2009)12-1209-04

论著

重组 PinX1 真核表达载体的构建及其对胃癌 MKN28 细胞增殖的抑制作用

王洪斌,王伟强,汪兴伟,孙勇刚,周 钢,杨仕明,房殿春 (第三军医大学西南医院全军消化病研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨 PinX1 基因对胃癌 MKN28 细胞生长及周期的作用,初步探讨该基因用于胃癌治疗方面的可能性。**方法** 构建重组 PinX1 真核表达载体,酶切及测序鉴定无误后,应用脂质体转染法转染入胃癌 MKN28 细胞,建立稳定转染 PinX1 基因的 MKN28 细胞系;应用 Western blot 技术从蛋白水平检测转染前后目标蛋白 PinX1 的改变;MTT 法检测转染前后细胞生长曲线的变化;流式细胞仪检测转染目的基因后细胞生长周期的改变。**结果** 成功构建重组 PinX1 真核表达载体;建立了稳定转染入 PinX1 基因的胃癌 MKN28 细胞系;转染 PinX1 基因后,胃癌细胞细胞生长明显减缓($P<0.05$),增殖变慢($P<0.05$),细胞生长阻滞于 G_0/G_1 期。**结论** PinX1 基因可抑制胃癌 MKN28 细胞的生长和增殖。

关键词: 胃癌;PinX1 基因;载体;构建;细胞增殖
中图法分类号: R394-33;R73-362;R735.2 **文献标识码:** A

Construction of recombinant eukaryotic expression vector of PinX1 and its roles in human gastric cancer MKN28 cell line

WANG Hong-bin, WANG Wei-qiang, WANG Xing-wei, SUN Yong-gang, ZHOU-gang, YANG Shi-ming, FANG Dian-chun (Institute of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effects of PinX1 gene on the growth and the cell cycles of gastric carcinoma cell line MKN28 and the possible functions of PinX1 gene in treatment of gastric cancer. **Methods** After construction of the recombinant eukaryotic expression vector of PinX1 confirmed by enzyme digestion, PinX1 gene was transfected into the gastric carcinoma cell line MKN28 by liposome method. The changes in PinX1, the cell growth, and the cell cycles were detected by Western blot, MTT, and flow cytometry, respectively. **Results** The recombinant eukaryotic expression vector of PinX1 was constructed successfully. Establishment of the stable transfection PinX1 into the gastric cancer MKN28 cell line was also successful. Transfection of PinX1 gene significantly inhibited the growth and proliferation of gastric cancer cells ($P<0.05$). The cell growth was arrested at G_0/G_1 stage. **Conclusion** As a potent telomerase inhibitor and a putative tumor suppressor, PinX1 gene may be used for the treatment of gastric cancer in clinical practice.

Key words: gastric cancer; PinX1 gene; vector; construction

端粒、端粒酶在肿瘤细胞的永生化和演进中扮演重要角色[1,2]。端粒酶在人类肿瘤细胞中高表达,而在人正常细胞中无表达或仅在生殖细胞中低表达。正因为端粒酶在肿瘤细胞的生存、生长中的有着重要作用,因此在肿瘤治疗上常作为治疗靶标[3]。

PinX1 是强力的端粒酶抑制剂,可以直接结合于 hTERT,进而抑制端粒酶活性[4]。同时它是潜在的抑癌基因,但是它能否应用于胃癌的治疗?因此本研究拟将该基因转染入胃癌 MKN28 细胞,建立稳定表达 PinX1 的细胞系,观察转染前后细胞的生长周期等改变,探讨该基因用于临床治疗胃癌的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料

胃癌 MKN28 细胞株由第四军医大学西京医院消化实验室惠赠,质粒 PIRES2-EGFP、大肠杆菌 DH5α 为本实验室保存。RPMI1640、G418 为 Gibco 公司产品,标准胎牛血清为天津 TBD 公司出品;含有全长 PinX1 目的基因的质粒 PCMV·SPORT6、脂质体 Lipofectamine™2000 为 Invitrogen 公司产品,质粒提取试

作者简介:王洪斌,男,湖北省武汉市人,博士研究生,主治医师,主要从事胃癌的基础与临床方面的研究,现在解放军 324 医院。E-mail: hongbin324@yahoo.cn
通信作者:房殿春,电话:(023)68754124,E-mail: fangdianchun@hotmail.com
收稿日期:2009-03-04;修回日期:2009-04-17

剂盒分别为 Axygen 公司产品,胶回收试剂盒为天根公司产品,核酸内切酶 *Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ、*Sal* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ、T_4 DNA ligase 为 TaKaRa 公司产品,ECL 发光试剂盒(Supersignal West Dura Extended Duration Substrate Kit)为 Thermo 公司产品。测序由上海生工及 TaKaRa 公司完成。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的获得 Invitrogen 公司含有全长 PinX1 目的基因的质粒 PCMV·SPORT6 经 TaKaRa 公司测序,与基因库中的报道一致(GenBank 登录号: BC015479)。

1.2.2 重组 PinX1 真核表达质粒的构建及鉴定 *Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ双酶切 PCMV·SPORT6,得到含有全长 PinX1 基因的目的片段,胶回收后定向连接至经*Sal* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ双酶切得到的线性化的真核表达载体质粒 PIRES2-EGFP 中。将得到的重组质粒转化、扩增细菌,提取重组质粒进行酶切及测序鉴定。先用 *Bam*H Ⅰ酶切所得的重组质粒,初步证实所得重组质粒正确后,再送上海生工公司测序进一步鉴定,正确测序后方进行后续实验。

1.2.3 重组质粒 DNA 的转染与筛选 预实验表明,胃癌 MKN28 细胞中无目标基因的表达。常规培养 MKN28 细胞,按 Lipofectamine™ 2000 说明书操作,将鉴定后所得到的重组质粒经脂质体转染入胃癌细胞株 MKN28 中,同时将仅含有空载体 PIRES2-EGFP 的质粒转染入胃癌细胞株 MKN28 作为对照;G418 筛选具有抗性的细胞克隆,挑取克隆扩大培养。

1.2.4 转染前后目标蛋白 PinX1 的改变 首先提取各细胞组的总蛋白并测浓度,步骤如下:每瓶细胞入 4 ℃预冷的 PBS 洗细胞 3 次,加入预先配制好的含 PMSF 的裂解液,冰上裂解 30 min,裂解完后,用干净的刮棒将细胞碎片和裂解液移至离心管中。于 4 ℃下16 000 r/min 离心 20 min。将离心后的上清取部分应用 BCA 法测蛋白浓度,其余分装冻存。取等量预处理的蛋白样品上样,恒压 80V 电泳跑胶,电转至 PVDF 膜,封闭后,分别加入一抗(Abnova 公司)及二抗(Santa 公司),按 ECL 发光试剂盒说明书操作,凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)曝光、照相并记录。

1.2.5 MTT 法检测细胞生长曲线 常规消化各组细胞并计数,然后以 1×10^3/孔接种于 96 孔培养板中,每孔体积 200 μl,将培养板移入 CO_2 孵箱中常规培养,每个样本设 4 个复孔。自第 2 天起,每天呈色一块板,共进行 5 d,每孔加入 MTT 20 μl,37 ℃继续培养 4 h 后,小心移去上清,每孔加入二甲亚砜(DMSO) 150 μl 振荡 10 min,使结晶物充分溶解。选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪(美国 Syntron 公司)上测定各孔吸光度值[D(490)],然后以时间为横坐标,D(490)为纵坐标绘制细胞生长曲线。所有的实验均独立重复 3 次。

1.2.6 流式细胞仪检测转染目的基因后细胞生长周期的改变 采用碘化丙啶(PI)法。因为细胞内 DNA 含量随细胞周期发生时相性变化,通过荧光探针对细胞进行相对 DNA 含量测定,可分析细胞周期各时相的百分比。其步骤是:先将贴壁生长的培养细胞用 0.25% 胰酶消化 3 ~ 7 min,使其成为单细胞悬液。离心后,注入 70% 冷乙醇固定,置 4 ℃冰箱过夜。弃去固定剂,PBS 洗 2 次,离心;加入 RNA 酶 37 ℃水浴,再加入 PI,混匀,避光 30 min 后,流式细胞仪(美国 BD 公司)检测细胞周期。增殖指数(PI) = $(S+G_2M)/(G_0/G_1+S+G_2/M)$。所有的实验均独立重复 3 次。

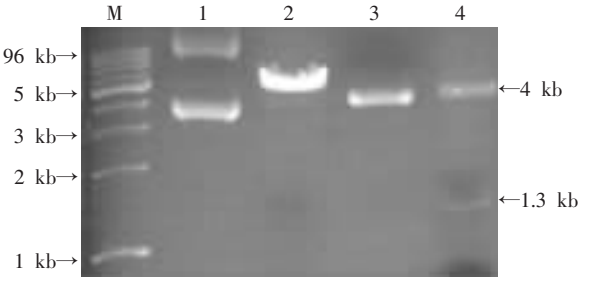
1.3 统计学分析

数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件行 t 检验。

2 结果

2.1 双酶切质粒 PCMV·SPORT6 及 PRES2-EGFP

Sal Ⅰ、*Xho* Ⅰ为同尾酶,酶切后可产生相同的黏性末端,因此 2 质粒分别经双酶切后可再次环化,形成重组质粒(图 1)。

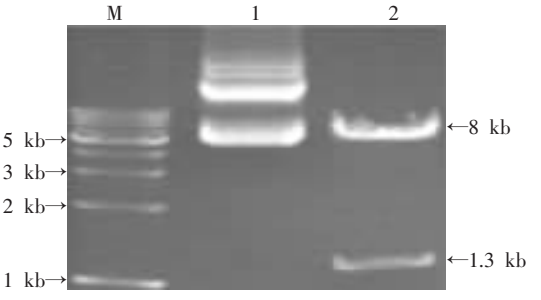


M:标准;1:PRES2-EGFP 酶切前;2:PRES2-EGFP 酶切后;3:PCMV·SPORT6 酶切前;4:PCMV·SPORT6 酶切后

图 1 质粒 PCMV·SPORT6 及 PRES2-EGFP 双酶切结果

2.2 重组质粒的酶切鉴定

经 DNAstar 软件分析,质粒 PCMV·SPORT6 及 PRES2-EGFP 上 *Bam*H Ⅰ均为唯一酶切位点。因此,若重组载体构建成功,应用 *Bam*HⅠ酶切后,理论上应释放出大小约 1.3 kb 的片段(图 2)。



M:标准; 1:重组质粒 PRES-PinX1 酶切前; 2:重组质粒 PRES-PinX1 经 *Bam*H Ⅰ酶切后

图 2 重组质粒的酶切鉴定结果

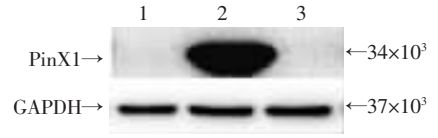
2.3 转染前后目标蛋白 PinX1 的变化

未转染的胃癌 MKN28 细胞及仅转染入空载体的 MKN28 细胞(K28)中无目的 PinX1 基因的表达,而转染入 PinX1 基因的 MKN28 细胞(P28)有 PinX1 基因的表达见图 3。

2.4 转染 PinX1 基因后的 MKN28 细胞(P28)生长

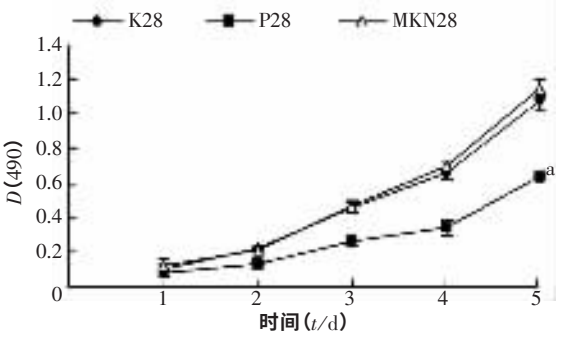
分别绘制 MKN28、转染入目的基因 PinX1 后的 MKN28 细胞(P28)、转染入空载体的 MKN28 细胞(K28)的生长曲线(图 4)。结果表明,与未转染的 MKN28 细胞及仅转染入空载体的 MKN28 细胞比较,转染入 PinX1 基因后,MKN28 细胞生长明显

减慢($P<0.05$)。



1:MKN28 细胞;2:转染入 PinX1 基因的 MKN28 细胞 P28;3:仅转染入空载体的 MKN28 细胞 K28

图 3　转染前后目标蛋白 PinX1 表达的变化



a:$P<0.05$,与 K28 及 MKN28 细胞比较

图 4　转染 PinX1 基因前后细胞生长曲线

2.5　转染 PinX1 基因后对 MKN28 细胞增殖的影响

转染 PinX1 基因后的 MKN28 细胞增殖变慢。通过流式细胞仪检测转染前后细胞周期的水平发现,转染入 PinX1 基因后,细胞增殖变慢,细胞生长阻滞于 G_0/G_1 期(表 1)。P28 为转染入 PinX1 的 MKN28 细胞;K28 为仅转染空载体的 MKN28 细胞。检测结果表明,与转染前及仅转染空载体相比,转染入 PinX1 基因后,细胞的增殖能力明显减慢($P<0.05$)。

表 1　转染 PinX1 后对胃癌细胞周期分布的影响　(%, $\bar{x}\pm s$)

细胞	G_0/G_1	S	G_2/M	PI
MKN28	68.74±6.96	8.65±6.82	22.64±1.17	31.28±0.53[a]
P28	84.76±3.92	4.44±3.68	10.80±2.48	15.24±0.61
K28	65.91±3.00	6.06±6.43	28.02±5.80	34.08±0.80[a]

a:$P<0.05$,与 P28 细胞比较

2.6　转染 PinX1 基因后细胞形态的改变

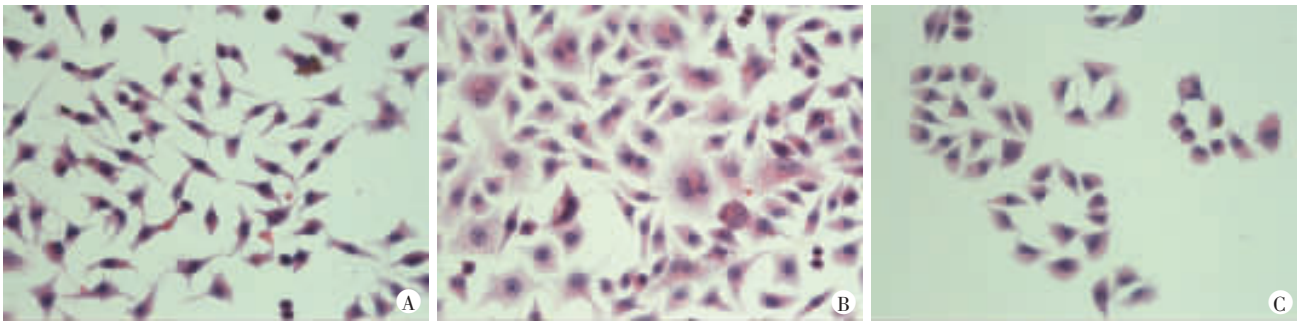
转染 PinX1 基因后的 MKN28 细胞形态发生明显改变。HE 染色后光学显微镜下观察,MKN28 细胞特点为:细胞贴壁生长,呈梭形、短梭形,大小不一,大的细胞体积为小细胞的 2~3 倍;转入 PinX1 基因后的 MKN28 细胞(P28)为多边形,但是大小不一更为明显,大而扁平的细胞更为常见,巨细胞比例明显增加,最大的细胞体积可以达到小细胞的 5~10 倍,多核细胞常见;转入空载体的 MKN28 细胞(K28)形态上也为多边形,但不如 P28 细胞明显(图 5)。

3　讨论

由于存在末端复制问题,即细胞分裂时伴有末端端粒的部分丢失,当端粒缩短到一定程度时,染色体失去端粒的保护而变得不稳定,导致细胞进入危急状态,出现凋亡、死亡等改变。正是由于端粒酶的存在[5-7],它的作用在于补充 DNA 复制时所丢失的端粒,使端粒长度不因复制而进行性缩短,从而维系细胞稳定。因此,端粒酶活性增强将导致细胞永生化、肿瘤形成[8-10]。

在肿瘤的发展过程中,端粒、端粒酶对肿瘤细胞的生存、生长起着重要作用,因此在治疗上常作为治疗的靶标。目前针对端粒酶主要有端粒酶抑制剂、逆转录酶抑制剂、核酶、反义基因治疗等方法,针对端粒的治疗则有反义核酸技术、RNA 干扰技术及核酶等方法[9]。

上述回顾表明,作为端粒酶抑制剂及潜在的抑癌基因的 PinX1 似乎可作为肿瘤治疗的理想基因,但目前少见将该基因用于肿瘤治疗方面的报道。基于这个设想,我们首先构建了包含目的基因全长的重组质粒,经酶切及测序证明与理论吻合,表明重组质粒构建成功;接着应用脂质体转染技术,将构建成功的带有目标基因的重组质粒转染入本身并无该基因表达的胃癌 MKN28 细胞中,通过 Western blot 技术从蛋白水平检测转染前后目标蛋白 PinX1 的改变,证明 PinX1 基因成功转染入胃癌 MKN28 细胞中。进一步通过 MTT 法检测转染前后细胞生长曲线的变化,发现相对于未处理的 MKN28 细胞或仅转染入空载体的 MKN28 细胞(K28),转染 PinX1 基因后的 MKN28 细胞(P28)生长



A:MKN28 细胞;B:P28 细胞;C:K28 细胞

图 5　转染 PinX1 基因后各组细胞的形态学改变　(HE×100)

明显减缓,说明 PinX1 基因能抑制细胞生长;通过流式细胞仪检测转染目的基因后细胞生长周期的改变后发现,相对于未处理的 MKN28 细胞或仅转染入空载体的 MKN28 细胞(K28),转染 PinX1 基因后的 MKN28 细胞(P28)增殖变慢,细胞生长阻滞于 G_0/G_1 期,细胞形态上发生体积增大、核仁明显增多等进入危急状态改变[10]。说明 PinX1 基因可使细胞阻滞于细胞间期或脱离细胞周期。

以往研究表明,PinX1 是一个强的端粒酶抑制剂和一个潜在的抑癌基因。PinX1 及其端粒酶抑制域 TID 域可以直接结合于 hTERT,进而抑制端粒酶活性、缩短端粒、诱导凋亡[4]。不仅如此,有作者还发现在体外 PinX1 可直接结合于 TERT 蛋白及端粒 RNA 的亚单位,认为 PinX1 还可通过结合 hTERT-hTR 复合体或抑制核糖核蛋白复合体等途径抑制端粒酶活性[11,12]。另外也有作者证明,PinX1 介导 hTERT 的核酸定位和抑制端粒酶活性是 2 个不同的功能,因为在突变型的 PinX1 虽然失去了介导 hTERT 的核酸定位功能,但仍然保存有抑制端粒酶活性的功能[13]。

这与以前的报道一致,以往研究表明当该基因转染入肿瘤细胞后,能强力抑制端粒酶活性,缩短端粒[10,11],进而使肿瘤细胞失去永生化,出现生长、增殖变慢、凋亡等改变。这样从体外实验证明了该基因对胃癌 MKN28 细胞的抑制作用,初步为该基因应用于临床治疗打下一定的实验基础。

参考文献:

[1] Blasco M A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond [J]. Nat Rev Genet, 2005, 6(8): 611-622.

[2] Poole J C, Andrews L G, Tollefsbol T O. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT) [J]. Gene, 2001, 269(1-2): 1-12.

[3] Olaussen K A, Dubrana K, Domont J, *et al*. Telomeres and telomerase as targets for anticancer drug development [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2006, 57(3): 191-214.

[4] Zhou X Z, Lu K P. The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor [J]. Cell, 2001, 107(3): 347-359.

[5] Lantuejoul S, Soria J C, Morat L, *et al*. Telomere shortening and telomerase reverse transcriptase expression in preinvasive bronchial lesions [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(5): 2074-2082.

[6] Cairney C J, Keith W N. Telomerase redefined: integrated regulation of hTR and hTERT for telomere maintenance and telomerase activity [J]. Biochimie, 2008, 90(1): 13-23.

[7] Masutomi K, Possemato R, Wong J M, *et al*. The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(23): 8222-8227.

[8] Shin J S, Hong A, Solomon M J, *et al*. The role of telomeres and telomerase in the pathology of human cancer and aging [J]. Pathology, 2006, 38(2): 103-113.

[9] Shay J W, Wright W E. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase [J]. Carcinogenesis, 2005, 26867-874.

[10] Sung Y H, Choi Y S, Cheong C, *et al*. The pleiotropy of telomerase against cell death [J]. Mol Cells, 2005, 19(3): 303-309.

[11] Lin J, Blackburn E H. Nucleolar protein PinX1p regulates telomerase by sequestering its protein catalytic subunit in an inactive complex lacking telomerase RNA [J]. Genes Dev, 2004, 18(4): 387-396.

[12] Banik S S, Counter C M. Characterization of interactions between PinX1 and human telomerase subunits hTERT and hTR [J]. J Biol Chem, 2004, 279(50): 51745-51748.

[13] Lin J, Jin R, Zhang B, *et al*. Characterization of a novel effect of hPinX1 on hTERT nucleolar localization [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 353(4): 946-952.

(编辑 张 维)

中华临床医师杂志(电子版)征稿、征订

由中华人民共和国卫生部主管,中华医学会主办,中华医学电子音像出版社出版的中华临床医师杂志(电子版)ISSN 1674-0785 CN 11-9147/R 于 2007 年正式创刊,月刊,以光盘附纸质导读形式面向全国公开发行,邮发代号:80-728。本刊为《万方数据——数字化期刊群》全文上网期刊,《中国核心期刊(遴选)数据库》《中文科技期刊数据库(全文版)》《中国学术期刊网络出版总库》收录期刊。

主要栏目:述评、专家笔谈、临床研究、实验研究、综述、临床经验、病例报告等。本刊特色栏目:(1)讲座(视频);(2)外科手术案例分析(视频);(3)影像及电生理诊断典型图像分析(动态图像)。欢迎投稿! 2009 年度,本刊将陆续刊出 24 个重点栏目,每期包含 5~10 个精品视频。同时,本刊特别邀请北大第一医院录制病例讨论系列视频。其内容详实,图像清晰,全部由临床一线名家主讲,是广大临床医师难得的学习资料。欢迎订阅!

投稿信箱:北京市 100035-50 信箱 编辑部 收 **邮编:**100035

网址:www. clinicmed. net **电子邮件:**Lcdoctor@163. com

电话:(010)62219211 **传真:**(010)62234701