技术与方法 文章编号：0253-3626（2011）04-0444-03

PRP基因绿色荧光蛋白载体构建及其生物学功能初步研究

王 琦[1]，郝 杰[2]，赵丽娜[1]，吕自兰[1]，王丽敏[1]，余秋波[1]，王应雄[1]，黎 刚[1]
（1. 重庆医科大学公共卫生学院卫生毒理学教研室；2. 重庆医科大学附属第一医院实验研究中心，重庆 400016）

【摘 要】目的：构建 Prolifein related protein（PRP）基因荧光表达载体，并初步探讨其生物学功能。方法：提取小鼠睾丸 RNA，RT-PCR 扩增 PRP 基因编码区片段，酶切连入 pEGFP-C1 载体，构建含有 PRP 基因片段的绿色荧光表达载体 PRP-pEGFP-C1。为了探讨 PRP 基因功能，PRP-pEGFP-C1 经 Lipofectamine 2000 介导转染 293FT 细胞，MTT 实验分析细胞增殖变化，流式细胞仪分析细胞周期分布。结果：质粒 PRP-pEGFP-C1 经测序验证，证实 PRP 基因已正确连入 pEGFP-C1 载体。免疫荧光染色显示PRP 定位于 293FT 细胞胞浆。MTT 结果表明，上调 PRP 基因引起 293FT 细胞增殖活性下降，细胞周期分布情况提示 G_1 期细胞增加，S 期细胞减少。结论：成功构建 PRP-pEGFP-C1 荧光表达载体，对其功能研究表明 PRP 具有抗人 293FT 细胞增殖，扰乱细胞增殖周期的功能。本研究为 PRP 在抗人肿瘤方面的研究提供基础。

【关键词】proliferin related protein；pEGFP-C1；细胞增殖
【中国图书分类法分类号】R339.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-10-08

Construction of the eukaryotic expression vector of proliferin related protein and preliminary study on its biological activity in 293FT cells

WANG Qi, et al
(*Department of Toxicology, College of Public Health, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the eukaryotie expression vector of proliferin related protein, and to investigate its biological function. *Methods*: The coding region of proliferin related protein amplified by RT-PCR from mouse testis RNA was cloned into the pEGFP-C1 vector to form the recombinant PRP-pEGFP-C1 plasmid. Then the recombinant plasmid was transfected into 293FT cells, and the expression of PRP was detected by RT-PCR and Western blotting. MTT and flow cytometry (FCM) analysis were employed to analysis the cell proliferation activity and the cell cycle, respectively. *Results*: PRP coding region was successfully cloned into the eukaryotic vector pEGFP-C1. The recombinant vector was transfected into 293FT, results of RT-PCR and Western blotting showed that the PRP could express in 293FT cells. Overexpressing PRP gene decreased the cell proliferation activity as well as disturbing the cell cycle distribution of 293FT cells in vitro. *Conclusion*: We have constructed a recombinant vector expressing PRP and eGFP fusion protein, which is in favour of the further study on the gene function of PRP. In addition, PRP has anti-proliferin activity in human-derived cells through disturbing the cell cycle, suggesting that PRP maybe act as a potential gene therapeutic candidate used in human tumor, not just mouse tumor.

【Key words】proliferin related protein; pEGFP-C1; cell proliferation

哺乳动物胎盘组织产生大量的激素，包括泌乳素（Prolactin，PRL）等[1]。PRL 家族成员众多，如 Placental lactogens（PLs），PRL-like proteins（PLPs），PRL-related proteins（PRPs）PLF-related protein（PLF-RP），Proliferin（PLF），以及 Proliferin related protein（PRP）等，这些激素在妊娠中发挥重要的生理功能[2-4]。

胎盘的形成是通过具侵袭能力的滋养层细胞侵袭入母体，并与母体建立直接的对话。正常妊娠的进行需要滋养层细胞适度侵袭入母体，否则因侵袭不足或侵袭过度可能导致流产、先兆子痫、宫内胎儿生长迟缓等。PRL 家族成员 PRP 被认为是调控滋养层适度侵袭的重要因素之一[5,6]。PRP 最早被发现位于胎盘，被认为是强抗血管生成的激素，高表达于妊娠后期，和妊娠后期胎盘生理功能相对应[7]。

以往的研究认为，睾丸、肝、肾脏、心等组织器官均无 PRP 表达。由于被认为主要在妊娠调控中起作用，对其功能研究局限于雌性妊娠。因此，尽管此基因发现至今已有 20 多年，但一直被排除在雄性之外，截止目前，直接的实验研究仅几篇文献报道[5-10]。本实验组发现 PRP 表达于雄性睾丸。为了进一步研究 PRP 基因功能，本研究拟构建 PRP 荧光表达载体，并对其生物学功能进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 试剂

限制性内切酶 *EcoR* Ⅰ、*Sal* Ⅰ，T_4 DNA 连接酶，PCR 试剂购于 Takara 公司；pEGFP-Cl 载体，TOP10 大肠杆菌由本实验室

作者介绍：王 琦（1982-），女，硕士，研究方向：生殖毒理。
通信作者：黎 刚，男，副教授，Email：lg168sn@sina.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30772346、30300422、30901062）；重庆市教委资助项目（编号：KJ070320）。

保存；Trizol 试剂，Lipofectamine2000 和 293FT 为 Invitrogen 公司产品；胎牛血清、DMEM 培养基购于 Hyclone 公司；抗PRP单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司；蛋白提取 Kit，BeyoECL Plus Western blot 检测 kit 购自碧云天公司。

1.2 PRP-pEGFP-C1 重组质粒构建

1.2.1 PRP 基因克隆 用 Trizol 试剂提取 C57BL/6J 小鼠（重庆医科大学实验动物中心提供）睾丸总 RNA，质量鉴定后进行 20 μl 逆转录反应，保存 cDNA 备用。

用 Primer 5 软件设计扩增 PRP（NM_011120）编码区全长，上游：5'-CAGGAATTCCGAGATGCTCCCTTCTTTGATC-3'，下游：5'-CAGGTCGACTCATTCAGAGTAGCAGACATCATC-3'，分别包含 *EcoR* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ 酶切位点（下划线部分），预计扩增基因片段长度为 736 bp。

50 μl PCR 反应体系中加入 0.25 μl Pyrobest DNA 多聚酶（5 U/μl），5 μl 10×buffer，4 μl dNTP（各 2.5 mmol/L），上下游引物各 1 μl。94℃ 40 s，58℃ 30 s，72℃ 1 min，32 个循环；72℃ 延伸 10 min。回收 PCR 产物。

1.2.2 连接 PRP 基因片段与 pEGFP-C1 质粒 *EcoR* Ⅰ与 *Sal* Ⅰ双酶切 PRP 扩增片段与 pEGFP-C1 质粒，回收酶切产物，用 T_4 DNA 连接酶连接。连接产物转化感受态 Top10 大肠杆菌，提取质粒测序验证 PRP-pEGFP-C1 重组质粒构建是否正确。

1.3 293FT 细胞培养与 PRP-pEGFP-C1 重组质粒转染

293FT 细胞培养于含 10%FBS DMEM 培养基，置于37℃，5%CO_2 培养箱，每天换液 1 次。细胞生长到 80%~90%时，采用 Lipofectamine2000 转染 PRP-pEGFP-C1 重组质粒，同时转染 pEGFP-C1 质粒作为对照。

1.4 免疫荧光染色

转染 PRP-pEGFP-C1 重组质粒的 293FT 细胞培养于含载玻片的 6 孔板内，48 h 后，取出载玻片，PBS 洗涤 3 次，加 1:200 稀释大鼠抗小鼠 PRP mAb，4℃过夜，漂洗后加入荧光标记二抗，荧光显微镜下观察。

1.5 RT-PCR 和 Western blot 方法检测 293FT 细胞 PRP 基因表达

转染 PRP-pEGFP-C1 重组质粒 48 h 后，收集细胞，提取 RNA 及蛋白，分析 PRP mRNA（同前）与蛋白表达情况。蛋白检测用 Western blot 方法。蛋白质提取试剂盒提取培养细胞的总蛋白，BCA 蛋白定量检测试剂盒测定蛋白含量，50 μg 总蛋白进行的聚丙烯酰胺凝胶电泳，电转移至 PVDF 膜，奶粉封闭后加入 1:1 000 稀释大鼠抗小鼠 PRP mAb 或兔抗鼠 β-actin 抗体，4℃过夜，漂洗后加入二抗 37℃ 2 h。BeyoECL Plus 化学发光试剂显色，检测。

1.6 PRP 基因对 293FT 细胞增殖的影响

转染 PRP-pEGFP-C1 重组质粒的 293FT（简称 293FT-PRP）与 pEGFP-C1 质粒的 293FT（简称 293FT-NC）按 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板，加入 0.1 ml 培养液，于接种后 24 h，48 h 使用 MTT 法检测各组细胞的 $A_{570\,nm}$ 值（n=3），比较不同处理情况下细胞增殖情况。

1.7 细胞周期分析

为了研究 PRP 基因对 293FT 细胞周期的影响，采用流式细胞分析技术。转染质粒 48 h 后，0.1%胰酶消化 293FT 细胞，PBS 洗 3 次后用 70%乙醇固定。PI 染色 30 min 后，FACSVantage SE 流式细胞仪（Becton dickinson，USA）检测。

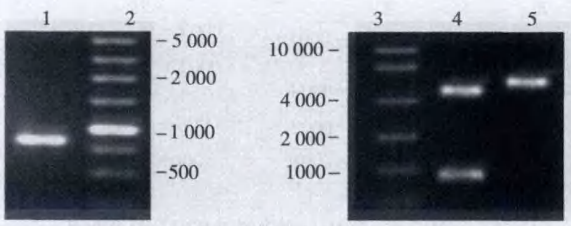
1.8 统计学处理

数据以均数±标准差表示，采用SPSS11.5统计软件分析，细胞增殖活性的比较采用析因方差分析，293FT-PRP 细胞与 293FT-NC 细胞周期的比较采用 t 检验，P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 成功构建 PRP-eGFP-C1 重组质粒

PCR 产物可见成功扩增出约 736 bp 产物（图 1，lane1）。连接 eGFP-C1 质粒后，转染大肠杆菌，提取质粒进行 *EcoR* Ⅰ与 *Sal* Ⅰ酶切，1%琼脂糖凝胶电泳可见约 736 bp 与 4.7 kb 大小的两条带，符合预期（图 1，lane 4）。经测序验证，序列与 Genebank PRP 基因序列完全一致，表明质粒 PRP-eGFP-C1 构建成功。



1. PRP 基因 PCR 扩增产物；2. Marker 1；3. Marker 2；4. PRP-pEGFP-C1 重组质粒 *EcoR* Ⅰ/*Sal* Ⅰ双酶切产物；5. PRP- pEGFP -C1 重组质粒

图 1 PRP 基因 PCR 产物与 PRP- pEGFP -C1 重组质粒酶切鉴定电泳图

2.2 PRP 在 293FT 细胞中表达与定位情况

荧光倒置显微镜下观察，可见细胞转染效率高，可达80%以上（图 2）。PRP 免疫荧光染色显示，和我们以前观察 PRP 在睾丸间质细胞中的定位于胞浆中一样，PRP 蛋白也定位于 293FT 胞浆（图 3）。RT-PCR 与 Western blot 检测 PRP 结果（图 4、5），可见正常 293FT 细胞、转染 eGFP-C1 293FT 细胞

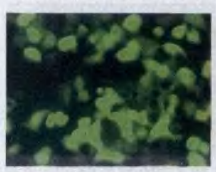


图 3 PRP 在 293FT 细胞内定位观察（400×）

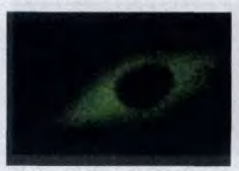
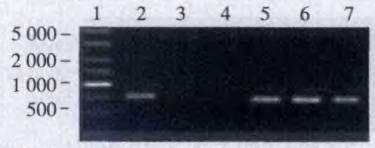


图 2 PRP-eGFP-C1 转染 293FT 细胞（100×）



1. Marker；2~4. PRP 基因扩增；2. PRP- eGFP-C1 转染组 PRP；3. eGFP-C1 转染组；4. 对照组；5~7. β-actin 基因扩增产物

图 4 RT-PCR 检测各组 PRP 基因表达情况



1. PRP-eGFP-C1 转染组；2. eGFP-C1 转染组；3. 对照组

图 5　Western blot 检测 293FT 细胞 PRP 蛋白表达情况

均无 PRP 表达，而转染 PRP-eGFP-C1 质粒的 293FT 细胞出现相应 PRP 表达。

2.3　上调 PRP 表达抑制 293FT 细胞增殖

MTT 实验显示（表 1），293FT-NC 组细胞与 293FT-PRP 细胞 24 h 时 OD_{570} 分别为 0.390 ± 0.036 与 0.306 ± 0.025，48 h 时 OD_{570} 分别为 0.790 ± 0.060 与 0.546 ± 0.047。经方差分析，293FT-NC 组细胞与 293FT-PRP 细胞增殖活性有差异（F=41.219，P < 0.001），且从 24 ~48 h，293FT-NC 细胞增殖改变比 293FT-PRP 细胞更加明显（F=9.888，P=0.014），提示 PRP 具有抑制 293FT 细胞增殖的作用。

表 1　MTT 实验分析 293FT-NC 细胞与 293FT-PRP细胞增殖活性（n=3）

组别	OD_{570}
293FT-NC（24 h）	0.390 ± 0.036
293FT-PRP（24 h）	0.306 ± 0.025
293FT-NC（48 h）	0.790 ± 0.060
293FT-PRP（48 h）	0.546 ± 0.047

2.4　PRP 基因引起 293FT 细胞周期变化

293FT-PRP 细胞与 293FT-NC 细胞相比较，细胞周期分布发生明显改变，主要体现在 G_0/G_1 期细胞增加［(36.94 ± 2.70)% 与 (26.15 ± 0.87)%］(t=6.585，P=0.003)，S 期细胞减少［(45.21 ± 4.34)% 与(58.44 ± 1.32)%］(t=5.048，P=0.007)，而 G_2/M 期无统计学意义的变化［(17.85 ± 1.97)% 与(15.40 ± 2.09)%］(t=1.47，P=0.216)（表 2）。

表 2　转染 PRP-eGFP-C1 质粒48 h 对 293FT 细胞周期的影响（n=3）

组别	G_0/G_1(%)	S(%)	G_2/M(%)
293FT-NC	26.15 ± 0.87	58.44 ± 1.32	15.40 ± 2.09
293FT-PRP	36.94 ± 2.70*	45.21 ± 4.34*	17.85 ± 1.97

*P<0.01：与 293FT-NC 组比较

3　讨　论

我们首次发现 PRP 基因表达于雄性睾丸间质细胞胞浆，其功能值得研究。本实验利用 PCR 技术将 PRP 基因克隆至真核表达载体 pEGFP-C1 中，构建了重组表达载体 PRP-pEGFP-C1，用脂质体介导转染 293FT，倒置荧光显微镜下观察可见转染效率较高。免疫荧光染色显示 PRP 定位于 293FT 胞浆，与 PRP 在睾丸间质细胞中表达定位一致。RT-PCR 与 Western blot 检测转染 PRP-eGFP-C1 质粒后，可检测到 PRP mRNA 与蛋白高水平表达。

Jackson 等发现 PRP 抑制体外培养血管内皮细胞迁移和体内血管形成[8]。由于其能够抑制血管发生，可能影响肿瘤的发生发展。为了验证其抗肿瘤活性，Bengtson 等通过在小鼠 3T3 成纤维细胞株或大鼠 C6 神经胶质瘤细胞株引入 PRP 基因后，能够抑制肿瘤血管生成和肿瘤的生长，其机制可能与抑制精氨琥珀酸释放有关[9]。

在前期研究中，我们已证实下调 PRP 基因可以促进小鼠睾丸间质细胞的增殖。在本研究中，MTT 结果显示转染 PRP-eGFP-C1 质粒后，293FT 细胞生长变缓，增殖活性下降，提示 PRP 具有抗增殖的活性。进一步用流式细胞术检测细胞周期，发现 PRP 抗增殖与阻滞 G_1 期，减少 S 期细胞分布有关。

以前的研究发现 PRP 具有肿瘤细胞的生长抑制作用，是基于大鼠或小鼠源肿瘤细胞，而我们采用人源的 293FT 细胞，并明确其抗增殖与 G_1 期阻滞有关。因此，本研究的意义在于在于直接验证 PRP 这一目前发现仅存在于小鼠与大鼠的基因也能作用于人源细胞，为拓展其在人源细胞中的研究提供基础，特别是其抑制细胞增殖的活性，可能在人类肿瘤预防与治疗方面有潜在运用价值。

综上，本研究成功构建了 RPR 的荧光真核表达载体，为研究 PRP 基因功能提供基础。对其功能初步研究显示，PRP 基因能够引起细胞增殖活性下降，与 G_1 期细胞阻滞有关。

参　考　文　献

[1] Bachelot A, Binart N. Reproductive role of prolactin[J]. Reproduction, 2007, 133(2): 361-369.

[2] Freeman M E, Kanyicska B, Lerant A, et al. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion[J]. Physiol Rev, 2000, 80(4): 1523-1531.

[3] Soares M J, Konno T, Alam S M. The prolactin family: effectors of pregnancy-dependent adaptations[J]. Trends Endocrinol Metab, 2007, 18(3): 114-121.

[4] Haig D. Placental growth hormone-related proteins and prolactin-related proteins[J]. Placenta, 2008, 29(sA): 36-41.

[5] Colosi P, Swiergiel J J, Wilder E L, et al. Characterization of proliferin-related protein[J]. Mol Endocrinol, 1988, 2(6): 579-586.

[6] Toft D J, Linzer D I. Identification of three prolactin-related hormones as markers of invasive trophoblasts in the rat[J]. Biol Reprod, 2000, 63(2): 519-525.

[7] Linzer D I, Nathans D. A new member of the prolactin-growth hormone gene family expressed in mouse placenta[J]. Embo J, 1985, 4(6): 1419-1423.

[8] Jackson D, Volpert O V, Bouck N, et al. Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein[J]. Science, 1994, 266(5190): 1581-1584.

[9] Bengtson N W, Linzer D I. Inhibition of tumor growth by the antiangiogenic placental hormone, proliferin-related protein[J]. Mol Endocrinol, 2000, 14(12): 1934-1943.

[10] Yamaguchi M, Imai T, Maeda T, et al. Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate stimulation of placental proliferin and proliferin-related protein secretion[J]. Endocrinology, 1995, 136(5): 2040-2046.

（责任编辑：冉明会）