维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)01-0057-03

ICAT 的克隆及其抑癌作用

任 静,曾昭淳

(1. 重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室;2. 重庆市生物化学与分子药理学重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:克隆人 ICAT 的 cDNA,在肿瘤细胞中表达,了解其对肿瘤细胞的抑制作用。方法:RT-PCR 获得 ICAT 的 cDNA,构建真核表达质粒 pcDNA3.1-ICAT,脂质体法转染 MCF-7 和 MDA-MB231 乳腺癌细胞,MTT 法检测肿瘤细胞的增殖情况。结果:RT-PCR 产物大小约为 260bp,测序结果与文献报道一致。pcDNA3.1-ICAT 转染 MCF-7 和 MDA-MB231 肿瘤细胞的效率约为 26%,肿瘤细胞增殖的抑制率为 18.1%和 16.2%。结论:克隆了人 ICAT 并构建其真核表达质粒,转染肿瘤细胞后对其增殖有一定的抑制作用。

【关键词】ICAT;克隆;抑癌作用

【中国图书分类法分类号】R735 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-05-23

Cloning of ICAT and its anti-cancer function

REN Jing, et al

(*Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To Clone the cDNA of human ICAT, and express it in tumor cell, to investigate its anti-tumor effect. *Method*: the ICAT cDNA was amplified by RT-PCR, the ukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-ICAT was constructed, MCF-7 and MDA-MB231 breast cancer cells were transfected by pcDNA3.1-ICAT using liposome and the cancer cell proliferation was estimated by MTT. *Result*: The product of RT-PCR was about 260bp, its sequence was the same as that reported, the transfection efficiency for MCF-7 and MDA-MB-23 cells was about 26%, and inhibiting efficiencies on the proliferation of the cancer cell transfected were 18.1% and 16.2% respectively. *Conlusion*: The cDNA of ICAT was cloned, and its expression in MCF-7 and MDA-MB-23 cells may inhibit the proliferation of these cancer cells.

【Key words】 ICAT; Cloning; Anti-tumor

Wnt 信号转导途径的调控失常是多种类型的细胞发生癌变(如肝癌、结直肠癌、肾癌、乳腺癌)的主要原因之一[1]。Wnt 信号转导能促进细胞增生和抑制细胞凋亡。beta- 连环蛋白 /T 细胞因子抑制子(Inhibitor of beta-catenin and T cell factor-4, I-CAT)基因的产物是一个含 81 个氨基酸残基、分子量为 9ku 的蛋白质[2]。它能与 beta- 连环蛋白结合并排斥后者与 T 细胞因子 4 的结合,结果阻止了 beta- 连环蛋白 /T 细胞因子 4 复合物的形成,抑制了 Wnt 信号转导[3]。试验表明 ICAT 诱导直肠癌细胞 G_2 期停滞并死亡以及抑制特殊癌细胞系的悬浮生长[4]。

为此,我们克隆 ICAT 基因,构建了真核表达载体,转染肿瘤细胞株来研究 ICAT 表达产物对肿瘤细胞体外增殖活性的影响,以证实其抑瘤功能,并为进一步研究打下基础。

作者介绍:任 静(1974-)女,硕士,主治医师,主要研究方向:肿瘤靶向治疗。

通讯作者:曾昭淳,男,教授,E-mail:zengzc88@yahoo.com.cn。

1 材料和方法

1.1 材料

质粒 PET-32a(+)(Novagen),质粒 pcDNA3.1(+),菌株 DH5a(为本实验室保存),乳腺癌细胞株 MCF-7 和 MDA-MB231 细胞:重庆医科大学基础医学院病理生理教研室保存)。TaqDNA 聚合酶、Pfu 聚合酶(上海生工),限制性内切酶 *EcoR* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ(大连 Takara),T4DNA 连接酶(Promega),核酸分子量标准、oligo $(dT)_{18}$(北京鼎国),MMLV 酶、dNTP、RNasin(上海博亚),Trizol(北京三博),PCR 纯化和质粒小量抽提试剂盒(北京三博)

1.2 实验方法

1.2.1 RT-PCR 克隆 ICAT cDNA

组织总 RNA 的提取 正常人肝组织 100mg(由重庆医

维普资讯 http://www.cqvip.com

科大学附属第一医院肝胆外科提供),液氮保存,用无 RNA 酶污染的研钵研磨,按 Trizol 试剂的说明操作,提取总 RNA,立即进行逆转录。

RT-PCR 逆转录:总 RNA 4μl,oligo(dT)18 2μl,DEPC 水 6μl,混匀,70℃水浴 5min,冰浴 30s,再加入 5×reaction buffer 4μl,Rnasin 1μl,dNTP 2μl,混匀。37℃水浴 5min,加入 1μl MMLV 逆转录,使终体积为 20μl。然后 37℃水浴 5min 后,70℃ 10min 终止反应,取 2μl 为 PCR 模板,余下的 -20℃保存。

PCR:根据 GenBank 中 ICATmRNA 序列,应用 Prime premier5.0 软件设计引物,由上海博亚合成。P1 序列为:5'-CAGAATTCATGAACCGCGAGGGAGC-3',引入了 *EcoR* Ⅰ酶切位点。P2 序列为:5'-CTAAAGCTTCTGCCTCCGGTCT TCCGT-3',引入了 *Hind* Ⅲ酶切位点。反应总体积为 50μl,94℃预变性 4min,然后 94℃ 40s,61℃ 40s,72℃ 35s,10 个循环之后,将退火温度升至 63℃,23 个循环,最后 72℃延伸 5min。所得 PCR 产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳。

构建 pcDNA3.1-ICAT 载体:用优晶公司试剂盒纯化 PCR 产物、*EcoR* Ⅰ和 *BamH* Ⅰ分别处理 PCR 产物和 pET-32a(+)质粒,按 10∶1(摩尔比)的比例加入缓冲液,用 T4DNA 连接酶进行连接,转化 $CaCl_2$ 法制备的感受态大肠杆菌 DH5a,氨苄青霉素培养基筛选。扩增转化后的 DH5a,提取质粒,酶切,测序进行鉴定。用 *EcoR* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切 pcDNA3.1 (+)、pET32a-ICAT 质粒:1.5%琼脂糖电泳回收 pET32a-ICAT 质粒酶切小片段;过柱回收酶切后的 pcDNA3.1(+),连接 ICAT 与 pcDNA3.1(+)质粒,用连接产物转化感受态细胞,筛选重组质粒,比较重组 DNA 分子量大小、限制性内切酶、PCR 鉴定重组质粒,阳性克隆命名为 pcDNA3.1-ICAT。按 Qiagen plasmid maxi kit 操作说明大量制备 pcDNA3.1-ICAT 质粒。把 MCF-7 和 MDA-MB231 乳腺癌细胞接种于 96 孔板,每孔加入 0.1μg pcDNA3.1-ICAT 和适量 Lipofectamine™ 脂质体转染细胞,pcDNA3.1 (+) 为对照用 pcDNA3.1-GFP 测定转染效率。培养 72h 后,加入 MTT 至终浓度 50μg/ml,37℃温箱内继续培养 4h,吸出培养液,每孔加入 DMSO 150μl,室温下于振荡器上振荡 10min,酶标仪上测 570nm 处吸光值(A)。

2 结 果

2.1 组织总 RNA 的提取

提取的总 RNA 经琼脂糖电泳结果出现 28S、18S、5S 3 条带。表明提取得总 RNA 结构完整、可用于逆转录的模板(图 1)。

2.2 RT-PCR 扩增 ICATcDNA

RT-PCR 产物经琼脂糖电泳,结果显示约 260bp,大小与 ICAT 一致(图 2)。

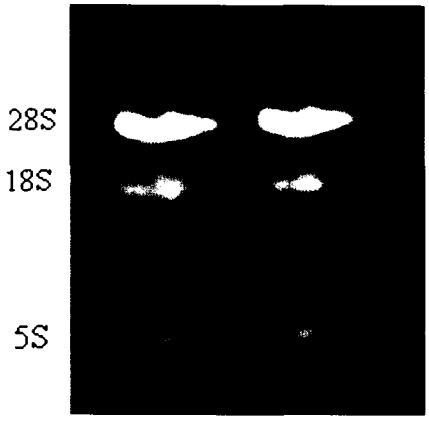


图 1 人正常肝组织总 RNA1.5 琼脂糖电泳

2.3 pcDNA3.1-ICAT 的鉴定

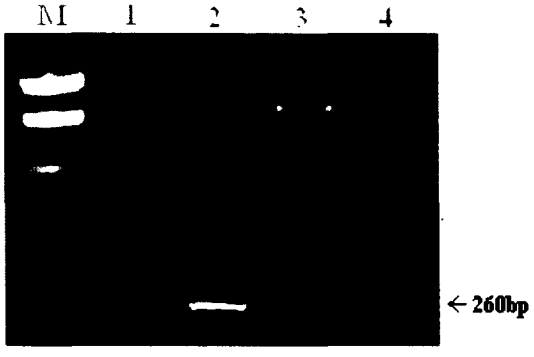
取制备的 pcDNA3.1-ICAT,经 *EcoR* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切,结果见图 3。

将 pcDNA3.1-ICAT 进行测序分析(北京三博进行),结果显示读码框架正确,没有突变碱基。



M. 分子量标准;1、2、3. RT-PCR 产物;4. 阴性对照

图 2 ICAT cDNART-PCR 扩增产物



M. DNA marker(Lamada DNA/*EcoR* Ⅰ+*Hind* Ⅲ);1.阴性对照;2.PCR 产物;3. 重组质粒 pcDNA3.1-ICAT *EcoR* Ⅰ+*Hind* Ⅲ双酶切;4.质粒 pcDNA3.1

图 3 以重组质粒为模板 PCR 扩增 ICAT 及重组质粒 pcDNA3.1-ICAT 限制性双酶切的结果

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 MTT 法测定的 A_{570} 值（$\bar{x} \pm s$）

细胞	MCF-7（$n=8$）		MDA-MB-231（$n=8$）	
	pcDNA3.1	pcDNA3.1-ICAT	pcDNA3.1	pcDNA3.1-ICAT
A_{570}	1.100 ± 0.022	0.922 ± 0.031*	1.212 ± 0.025	0.990 ± 0.018*

*$P<0.05$

2.4 转染效率

倒置荧光显微镜观察转染 pcDNA3.1-GPF 质粒的肿瘤细胞内的绿荧光蛋白，在一些细胞显示了较强的绿荧光，证明转染是成功的。效率约为 26%。

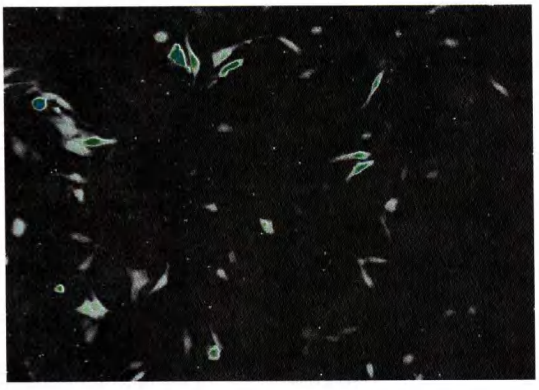


图 4 倒置荧光显微镜观察到 pcDNA3.1-GPF 转染的 MCF-7 乳腺癌细胞

2.5 ICAT 的表达对肿瘤细胞和正常细胞增殖的影响

MTT 法检测实验组和对照组的 A570 值见表 1。表明实验组肿瘤细胞均有抑制，对照组相比有显著差异，抑制率分别是是 16.1%和 18.3%。

3 讨 论

本试验通过 RT-PCR 扩增出 ICAT，并将 ICAT 亚克隆到 pcDNA3.1 载体上构建了重组质粒 pcDNA3.1-ICAT。经双酶切后，进行琼脂糖电泳，结果显示酶切产生的片段大小与预期的一致，但 pcDNA3.1 电泳显示 2 条带，可能系提取的 pcDNA3.1 中有超螺旋和双股带缺口的两种状态引起。pcDNA3.1-ICAT 转染 MCF-7 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞，对这些细胞的抑制率分别是 16.1%和 18.3%，看起来并不太理想。但由于转染效率为 26%，只有转染了的细胞才可能产生抑制，这样 16.1%和 18.3%就相当高了。说明 ICAT 对 MCF-7 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞有一定的抑制作用，这为进一步研究 ICAT 在肿瘤中的作用打下了基础。

参 考 文 献

[1] Tago K, Nakamura T, Nishita M, et al. Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel β-catenin-interacting protein[J]. Genes Dev, 2000; 14(14): 1 741-1 749.

[2] Graham TA, Clements WK, Kimelman D, et al. The crystal structure of the beta-catenin/ICAT complex reveals the inhibitory mechanism of ICAT[J]. Mol Cell, 2002; 10(3): 563-571.

[3] Daniels DL, Weis WI. ICAT inhibits beta-catenin binding to Tcf/Lef-family transcription factors and the general coactivator p300 using independent structural modules[J]. Mol Cell, 2002; 10(3): 573-584.

[4] Sekiya T, Nakamura T, Kazuki Y, et al. Overexpression of Icat Induces G2 Arrest and Cell Death in Tumor Cell Mutants for Adenomatous Polyposis Coli, β-catenin, or Axin1 [J]. Cancer Research, 2002; 62: 3 322-3 326.

（责任编辑：关蕴良）