维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)03－0379－04

maspin/PCR2.1 表达载体的构建及意义

阎 雄，姚榛祥

(重庆医科大学临床学院普外科，重庆 400016)

【摘 要】目的:构建 maspin/PCR2.1 表达载体，为深入研究 maspin 基因抑制肝癌生长、转移、浸润作用和机制奠定基础。方法:PCR 扩增 maspin 基因全长，将表达载体 PCR2.1 用 Hind111 + XbaI 进行双酶切后，T4DNA 连接酶连接成重组质粒，转染到人肝癌高转移细胞株 MHCC－97 中进行表达，检测转染前后 maspin 表达的变化。结果:重组质粒在大肠杆菌株 JM109 内扩增;提纯、纯化后，用 HindIII、XbaI 酶切鉴定及测序鉴定证明 maspin 基因已完整、正确的插入到 PCR2.1 表达载体，并在人肝癌 MHCC－97 细胞中上调了 maspin 基因 mRNA 和蛋白水平表达。结论:成功构建了 maspin/PCR2.1 表达载体，能在真核细胞中。

【关键词】maspin;PCR2.1 表达载体;构建;意义

【中国图书分类法分类号】Q782 【文献标识码】A 【收稿日期】2005－01－24

The construction and significance of maspin/PCR2.1 expression vector

YAN Xiong, et al

(*Department of General Surgery, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the expression vector maspin /Pcr2.1 in order to provide the evidence for the inhibitory effect of maspin gene on growth, metastasis and invasion of hepatocellular carcinoma(HCC) and to discuss its mechnism. *Methods*: The full length of maspin gene was cloned, and the expression vector PCR2.1 was digested by Hind111/XbaI, then the maspin gene and the PCR2.1 vector were ligated with T4 DNA ligase to be recombinant vector. The recombinant vector maspin/PCR2.1 was transfected into humman hcc MHCC－97 cell line, and the expressive changes of maspin gene were detected. *Results*: The recombinant plasmid was amplified in the E. coli. JM109. After the identification of redigesting by HindIII/XbaI and sequencing, the reconstructive plasmid was confirmed to contain the correct and full nucleotide sequence of maspin gene, and the mRNA and protein level of maspin gene were up－regulated in hcc MHCC－97 cell. *Conclusion*: The expression vector maspin/PCR2.1 is constructed successfully and can be expressed in eukaryotic cells.

【Key words】Maspin; PCR2.1 expression vector; Construction; Significance

maspin 基因是通过与乳腺癌细胞进行消减杂交技术和差异显示技术，在正常人的乳腺上皮细胞的 mRNA 水平上发现的丝氨酸蛋白酶抑制剂(serine protease inhibitors, serpins)，是 serpins 超家族的一个新成员。1994 年，Zou 等首先报道通过对乳腺癌细胞株 MDA－MB－435 的稳定转染，maspin 再表达可明显抑制体内、外肿瘤细胞的生长、浸润和转移[1]。随后，大量的体内、外实验证实 maspin 在肺癌、胰腺癌[2]、前列腺癌[3]、乳癌[4]中均能抑制肿瘤血管生存、抑制肿瘤细胞的生长、浸润和转移。然而，对发病率、转移率、死亡率都高的肝癌，通过再表达 maspin 基因抑制肿瘤细胞的生长、浸润和转移鲜有报道。本实验拟构建表达 maspin 基因的 maspin/PCR2.1 表达载体，并导入肝癌 MHCC－97 细胞，检测转染前后 maspin 基因表达变化，为深入研究 maspin 基因在肝癌中的抑癌作用及机制奠定基础。

作者介绍:阎 雄(1964－)，男，主治医师，博士，主要研究方向:肝胆疾病。

1 材料与方法

1.1 材料

空载质粒 PCR2.1 由爱尔兰都柏林大学生物化学系 D. M. Worrall 教授惠赠;人肝癌高转移细胞株 MHCC－97 由重庆医科大学临床学院消化内科张霞惠赠;培养基 DMEM、胎牛血清(美国 Hyclone 公司);RNA、质粒抽提试剂盒(上海华舜公司);M－MLV 逆转录酶(美国 Promega 公司);限制性

维普资讯 http://www.cqvip.com

内切酶、Surpercoiled DNA Ladder Marker、T4 连接试剂盒、胶回收试剂盒、EX Taq DNA 聚合酶(日本 Takara 公司);Lipofectamine2000 转染试剂盒(美国 Invitrogen 公司);maspin 一抗(美国 Santa Cruz 公司)及 Westtern bloting 检测试剂盒(博士得公司)。

1.2 maspin/PCR2.1 表达载体的构建

1.2.1 maspin 基因的获取

maspin 上游引物 5' - AAAAAGCTTATGGATGCCCTGCAACTA - 3',下游引物 5' - GGGGTCTAGATGCCACTTAAGGAGAA - 3'。收集培养的正常肝脏 LO2 细胞 2×10^6,按试剂盒说明提取总 RNA,用 M - MLV 逆转录酶和 maspin 下游引物合成第一链 cDNA,94℃ 5min 灭活逆转录酶;用 EX Taq DNA 聚合酶进行 PCR 扩增,反应体系 50μl,内含 cDNA 4.0μl,5.0μl 10 × buffer,上下游各引物 300nmol/L,5mmol/L $MgCl_2$,200μmol/L dNTP,Taq 酶 2.5U。按下述条件进行循环:94℃ 60s,62℃ 60s,72℃ 45s,35 cycles;以水作为阴性对照。扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳 30 min(80v),EB(0.5μg/ml)染色,用 BIO - RAD 图象分析仪上观察并扫描制片,胶回收目的基因。

1.2.2 maspin/PCR2.1 表达载体的构建

质粒 PCR2.1 用 HindIII、XbaI 双酶切,胶回收,T_4 连接酶连接,连接产物转化感受态大肠杆菌 JM109,在氨苄青霉素抗生素平板上筛选生长过夜。挑取阳性克隆大量制备重组质粒。重组质粒经酶切鉴定,再由上海生工公司测序鉴定。

1.3 重组质粒转染细胞

采用 Lipofectamine^{TM}2000 脂质体转染法。转染前 1 天,换取无抗生素培养液后调整 MHCC - 97 细胞浓度为 2×10^5 个/ml,以 2ml/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),37℃,5% CO_2,在无血清、无抗生素的培养液培养 16 ~ 18h 后换新鲜 10% FCS 培养基,继续培养 3 ~ 5 天后检测各指标。

1.4 RT - PCR 检测 maspin 在转录水平的表达

MHCC - 97 细胞接种于 6 孔板转染,72h 后,按试剂盒说明抽提总 RNA,用 M - MLV 逆转录酶和 maspin 下游引物合成第一链 cDNA,94℃ 5min 灭活逆转录酶;取 cDNA 4.0μl 用 EX Taq DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。

1.5 Western blotting 检测 maspin 蛋白表达

收集转染 maspin/PCR2.1 质粒的 MHCC - 97 细胞 2×10^6 个,提取核蛋白,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 1h,PBST 洗涤,加一抗(1:300)37℃ 孵育 4h,PBST 振荡洗涤 2 次,加二抗(1:200)37℃ 孵育 20min,PBST 洗涤 4 次,5min/次,DAB 室温显色,显影,记录结果。同样进行未处理的 MHCC - 97 细胞 maspin 蛋白检测。

1.6 统计学方法

采用 SPSS10.0 软件进行统计学分析,组间差异比较采用 t 检验,显著界限为 $P<0.01$。

2 结 果

2.1 重组质粒的酶切鉴定

重组质粒 maspin/PCR2.1 经 HindIII 和 EcoRI 双酶切后得到 3819bp 的载体片段和 2584bp 的 maspin 基因片断;PCR2.1 质粒经双酶切后仅得到 3819bp 的载体,100bp 的小片断图上未见到(图 1)。初步证明 maspin 基因已被插入到 PCR2.1 质粒中。上述重组质粒经上海生工公司测序鉴定,无突变,完全符合 Genbank 相应序列。

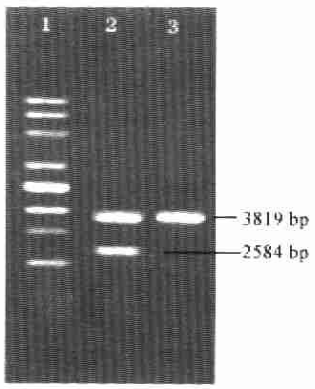


图 1 maspin/PCR2.1 重组质粒的酶切鉴定

1. Maker 2. maspin/PCR2.1 经 HindⅢ和 XbaⅠ双酶切 3. PCR2.1 质粒经 HindⅢ和 XbaⅠ双酶切

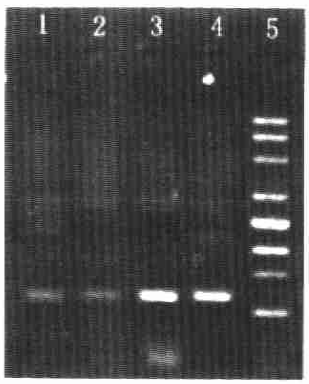


图 2 转染前后 maspin mRNA 表达变化

1,2. 转染前 MHCC - 97 细胞中 maspin mRNA 表达变化
3,4. 转染后 MHCC - 97 细胞中 maspin mRNA 表达变化
5. Maker

2.2 maspin/PCR2.1 转染 MHCC - 97 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 2)显示,未转染组 maspin mRNA 表达较弱;

维普资讯 http://www.cqvip.com

而 maspin/PCR2.1 转染组中 maspin mRNA 表达明显增强。

2.3 maspin/PCR2.1 转染 MHCC－97 细胞后 maspin 蛋白表达变化

与未处理 MHCC－97 细胞组相比，maspin/PCR2.1 转染组中 maspin 蛋白表达明显增强（图 3A）。将各目的条带与内参 actin 的光密度比较后，与未处理 MHCC－97 细胞组相比，maspin/PCR2.1 转染组中 maspin 蛋白表达平均上升了 28.2%（图 3B）。

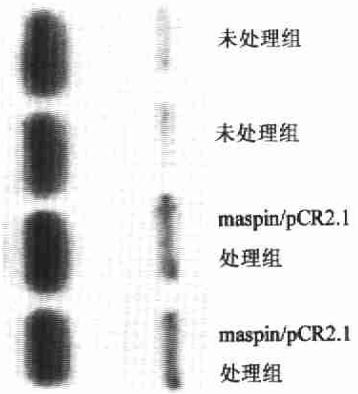


图 3A

转染前后maspin蛋白表达变化

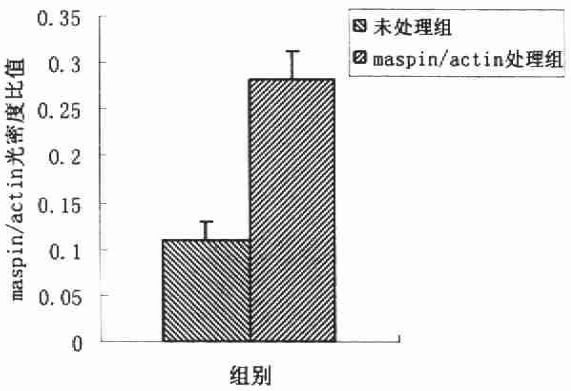


图 3B

图 3 转染前后 maspin 蛋白表达变化

3A maspin/PCR2.1 转染 MHCC－97 细胞前后 maspin 蛋白表达变化 3B 与未处理 MHCC－97 细胞组相比，maspin/PCR2.1 转染组中 maspin 蛋白表达平均上升了 28.2%

3 讨 论

原发性肝癌（Hepatocellular carcinoma，HCC）是我国最常见的恶性肿瘤之一，近 20 年来其死亡率增加了 41.17%，已成为我国第二位的恶性肿瘤。目前，手术治疗是公认的肝癌较好治疗方法，但由于肝癌具有临床症状出现较晚的特点，有 70% 的患者确诊时已是晚期，错过了手术时机。因此，研究生物学治疗等新的肝癌治疗方案具有重要意义。

maspin 的 cDNA 序列包含 2584bp，编码着 42kDa 蛋白质（含 376 氨基酸），该蛋白质包括 1 个与氨基结合的终末蛋氨酸和 1 个与羧基结合的终末缬氨酸，还包括 8 个内在的半胱氨酸残基，可组成两个或更多的二硫键，以稳定该蛋白的三级结构。maspin 的 －COOH 端附近有 1 个活性位点环（reative site loop，RSL），该区域在 serpin 家族中高度保守；活性中心的 NH2 端有一绞链区（hinge region），这一模序（motif）对肿瘤抑制因子 serpin 有重要作用，其变异可影响 serpin 的抑制作用的发挥。maspin 在 P1 位点（P1 site）有 1 个精氨酸残基。maspin 基因位于染色体 18q21.3－q23 位点上，主要定位于细胞浆及细胞表面。

maspin 抑癌基因在正常的乳腺、前列腺、胎盘、肝、肺、睾丸、大肠、小肠、舌、胸腺、表皮角化细胞中均有表达；然而，一旦这些正常组织恶性变，maspin 基因表达则明显减弱，甚至不表达[5]。生物学的研究表明 maspin 的再表达会促进对肿瘤的生长抑制，而这种生长抑制是由于细胞凋亡作用增强的结果[6]。maspin 基因再表达可抑制肿瘤浸润、血管生存和肿瘤转移。应用转染或逆病毒转染技术在几种人癌细胞株和鼠细胞株已获得 maspin 再表达[7]。在乳癌细胞 MDA－MB－435 和前列腺癌细胞 DU145 中已证实 maspin 表达能阻止肿瘤细胞的侵袭，及肿瘤细胞的活性。Abraham 等最近在逆病毒转染的鼠前列腺肿瘤细胞 TRAMP C2N 中的研究证明 maspin 的再表达，能特异性地促进细胞对纤维结合素的结合[8]，这些结果说明，maspin 在与 ECM 调控细胞互相作用中起着重要的作用。最近的研究表明，maspin 对细胞粘连、移动和侵袭作用与特异性信号途径有关，Odero－Marah 等用 maspin 转染 MDA－MB－235 细胞株，证明 maspin 对细胞活性的阻止作用与 Rac1 的效应基因 PAK1、PI3K 和 ERK1/2 的活性有关[9]。

大量的体内、外实验现已证实再表达 maspin 在胰腺癌、前列腺癌、乳癌、中均抑制了肿瘤生长、浸润和转移。然而，对发病率、转移率、死亡率都高的肝癌却鲜有报道。因此，在本研究中扩增获得了 maspin 全基因序列，成功构建了 maspin/PCR2.1 表达载体，并导入人肝癌高转移株 MHCC－97 细胞，

维普资讯 http://www.cqvip.com

增强了 maspin 基因表达,为深入研究 maspin 基因对抑制肝癌生长、浸润、转移作用及机制奠定了基础。

参 考 文 献

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

[2] Duan. H, H. J. Zhang, J. Q. Yang, et al. MnSOD up - regulates maspin tumor suppressor gene expression in human breast and prostate cancer cells[J]. Antioxid Redox Signal, 2003; 5 (5):677 - 688.

[3] Reddy. K. B, R. McGowen, L. Schuger, et al. Maspin expression inversely correlates with breast tumor progression in MMTV/TGF - alpha trangenic mouse model[J]. Oncogene, 2001;20(45):6538 - 6543.

[4] Feldman. R. J, V. I. Sementchenko, M. Gayed, et al. Pdef expression in human breast cancer is correlated with in invasive potential and altered gene expression[J]. Cancer Res, 2003; 63 (8):4626 - 4631.

[5] Riewald. M, R. R. Scheef. Molecular cloning of bomapin (protease inhibitor 10), a novel human serpin that is expressed specially in the bone marrow[J]. J Biol Chem, 1995;270(45): 26754 - 26757.

[6] Biliran. H. J, S. Sheng. Pleiotrophic inhibition of pericellular urokinase - type plasminogen activator system by endogenous tumor suppressive maspin[J]. Cancer Res, 2001;61(24):8676 - 8682.

[7] Sager. R, S. Sheng, A. Anisowicz, et al. RNA genetics of breast cancer: maspin as paradigm[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1994;59:537 - 546.

[8] Abraham. S, W. Zhang, N. Greenberg, et al. Maspin functions as tumor suppressor by increasing cell adhesion to extracellular matrix in prostate tumor cells[J]. J Urol, 2003;169(3): 1157 - 1161.

[9] Odero - Marah. V. A., Z. Khalhali - Ellis, J. Chunthapong, 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.

(上接第 344 页)

[9] Bohula EA, Salisbury AJ, Sohail M, et al. The efficacy of small interfering RNAs targeted to the type 1 insulin - like growth factor receptor(IGF1R)is influenced by secondary structure in the IGF1R transcript[J]. J Biol Chem, 2003;278(18): 15991 - 15997.

[10] Miyagishi M, Hayashi M, Taira K. Comparison of the suppressive effects of antisense oligonucleotides and siRNAs directed against the same targets in mammalian cells[J]. Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 2003;13(1):1 - 7.

[11] Vickers TA, Koo S, Bennett CF, et al. Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H - dependent antisense agents. A comparative analysis[J]. J Biol Chem, 2003;278(9):7108 - 7118.

[12] Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3' - kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk - 1/KDR activation[J]. J Biol Chem, 1998;273(46):30336 - 30343.

[13] Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl - 2 and A1 in vascular endothelial cells[J]. J Biol Chem, 1998;273(21):13313 - 13316.

[14] 任 娟,董 蕾,徐仓宝,等. KDR 反义寡核苷酸对人胃癌细胞的作用[J]. 第四军医大学学报, 2002;23(4):333 - 336.