DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.02.002
第23卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 2
2001年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2001

文章编号:1000-5404(2001)02-0125-03

论著

人肺癌细胞 NHE-1 基因部分正调控序列的克隆

吴国明,黄桂君,钱桂生,姚 伟 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要:目的 克隆人肺癌细胞 Na^+/H^+ 交换泵-1(NHE-1)基因上游正调控序列部分,为进一步将该片段导入肺癌细胞株,竞争性结合转录因子,达到抑制细胞内 NHE-1 基因的表达奠定基础。方法 采用 PCR 技术从人肺癌 A549 细胞基因组中扩增长约 170 bp 的 NHE-1 基因调控序列中起正调控作用的片段。在上、下游引物的 5'-端带上 *BamH*Ⅰ 和 *EcoR*Ⅰ 酶切位点。然后将该片段连接到 pUC18 载体上。最后对产生的重组子进行酶切、PCR 和测序鉴定。结果 经酶切及 PCR 鉴定,所克隆的目的片段大约为 180 bp,而 DNA 测序证实克隆并插入到载体中的片段为目的片段,长度为 168 bp,与报道的序列比较缺失 2 个 t。结论 本实验已成功地克隆了人肺癌细胞 NHE-1 基因调控序列中正调控序列片段。

关键词:基因;肺肿瘤;调控序列
中图法分类号:R394.3;R734.2 文献标识码:A

Cloning and identification of partial positive regulatory sequence of Na^+/H^+ exchanger-1 gene from human lung cancer cells

WU Guo-ming, HUANG Gui-jun, QIAN Gui-sheng, YAO Wei (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To clone the partial positive regulatory fragment of Na^+/H^+ exchanger-1 (NHE-1) gene from human lung cancer cells. Methods After *BamH*Ⅰ and *EcoR*Ⅰ cut sites were added to the 5' ends of the upstream and downstream primers respectively, the partial positive regulatory sequence of NHE-1 gene was cloned with the length of 170 bp from genomic DNA of lung cancer cell line A549 cells with PCR method. The cloned fragment was ligated to plasmid pUC18. Finally, the constructed recombinant was identified with enzyme cut, PCR and DNA sequencing. Results The cloned fragment was about 170 bp in size and successfully ligated to pUC18 with identifiation of double enzyme cut and PCR. DNA sequencing approved that the fragment cloned was objective one with 168 bp in length. Compared with the reported sequence, two t were lost. Conclusion The positive regulatory fragment of NHE-1 gene from human lung cancer cells was successfully cloned.

Key words: gene; pulmonary neoplasm; regulatory fragment

Na^+/H^+ 交换泵-1(Na^+/H^+ exchanger-1, NHE-1)是一种管家基因,能通过 Na^+/H^+ 交换将胞内 H^+ 排出,从而维持细胞内 pH(pHi)的稳定。肿瘤细胞由于其糖酵解明显增强,导致酸性产物异常增加,但肿瘤细胞可依靠其表达增强的 NHE-1 膜蛋白,将细胞内 H^+ 泵出细胞外,阻止癌细胞酸化[1,2]。我们的前期工作已经证实人肺癌组织 NHE-1 基因的表达比正常肺组织高 12 倍左右[3]。并证实以寡聚反义核酸抑制人肺癌细胞 NHE-1 基因上调表达将诱发细胞酸化和凋亡[4]。因而 NHE-1 可能是抗癌策略中的一个有用靶点[1~5]。本研究试图从人肺癌细胞株 A549 细胞中克隆 NHE-1 基因部分关键的正调控序列,并拟应用脂质体包裹该序列,转染至 A549 细胞内,利用转录因子圈套原理,达到竞争性结合相应的转录因子,从而抑制 NHE-1 的转录,达到下调 NHE-1 表达、降低 pHi、抑制肿瘤细胞生长并诱导其凋亡的目的。

1 材料与方法

1.1 A549 细胞 NHE-1 基因部分调控序列的克隆及初步鉴定

1.1.1 A549 细胞的培养 采用 RPMI-1640 培养基按常规培养肿瘤细胞。

1.1.2 基因组 DNA 的提取 按常规方法提取 A549 细胞基因组 DNA。

1.1.3 PCR 引物的设计与合成 根据 Genebank 上公布的人胎肺 NHE-1 基因调控序列,设计以下 1 对引物(由上海生工生物工程公司合成):

P1(上游引物):5'-atg gat ccg aaa gcc ctt atg aga ctg c-3'
*BamH*Ⅰ

P2(下游引物):5'-tga att cgc cga ggg aaa gaa gta tcg c-3'
*EcoR*Ⅰ

该对引物可扩增 NHE-1 基因调控序列(-270)~(-100)位点,长为 170 bp。引物 5' 端带上 *BamH*Ⅰ 和 *EcoR*Ⅰ 酶切位点便于以粘性末端连接于 pUC18 载体上(含酶切位点及保护性碱

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900067)
作者简介:吴国明(1961-),男,湖南省浏阳市人,博士研究生,主任医师,教授,主要从事肺癌和呼吸衰竭方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68755320
收稿日期:2000-10-03;修回日期:2000-12-23

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

基的 PCR 产物长为 182 bp)。

1.1.4 PCR 条件 95℃预变性 5 min 后加入 Taq 酶(Sangon 产品),然后 94℃变性 40 s,68℃退火 40 s,72℃延伸 45 s。作 30 个循环,末次循环 72℃延伸 5 min。

1.1.5 PCR 产物纯化及酶切 取 PCR 产物走 2%琼脂糖电泳,待证实扩增的条带可能为目的片段后。用 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化;纯化片段用 *BamH*Ⅰ 和 *EcoR*Ⅰ 酶切,反应完毕后加等体积酚/氯仿抽提 1 次,无水乙醇沉淀、离心,用 20μl 去离子水溶解后,置-20℃保存备用。

1.2 目的片段与 pUC18 载体的重组

1.2.1 pUC18 质粒双酶切 pUC18 质粒用 *BamH*Ⅰ 和 *EcoR*Ⅰ 酶切后,等体积酚/氯仿抽提 1 次,离心沉淀,用去离子水溶解,并置-20℃保存备用。

1.2.2 DNA 重组连接 连接反应体系由 10× Buffer 2μl,酶切后的 PCR 扩增片段 3μl(1.5μg),上述酶切后的 pUC18 载体 1μl(0.6μg),T4 连接酶 1.5μl,水 12.5μl 组成,合计 20μl;在 16℃ 条件下连接 16 h,然后 65℃× 10 min 灭活 T4 连接酶。

1.2.3 重组体的细菌转导 采用电穿孔法。取 45μl DH5α 感受态细菌,加入 2μl 重组载体(连接反应液),混匀后加入电穿孔杯中,采用电穿孔仪(美国 Bio-Rad 产品)在电压为 1.25 kV,电容 25μF,电阻 200Ω 的条件下电击细菌 4.3 ms。立即用 1 ml SOC 轻轻冲洗细菌并转移至培养管中,于 37℃,225 r/min 振摇 1 h。取 100μl 转化细菌涂布于半固体培养基(含 100 μg/ml Amp,表面涂布 IPTG 和 X-gal 各 800 mg)筛选平板上,37℃ 孵育箱中过夜。

1.3 重组体的鉴定

1.3.1 酶切鉴定 从筛选平板上挑取 4 个白色菌落,分别接种于 3 ml LB 培养基中(含 100 μg/ml Amp),37℃振摇过夜。收集细菌采用碱裂解法小量提取质粒。用 *BamH*Ⅰ 和 *EcoR*Ⅰ 酶切提取的质粒 DNA,进行电泳鉴定。

1.3.2 PCR 鉴定 取 1μl 质粒用作模板,采用扩增目的片段的体系及反应条件,进行 PCR,取 10μl PCR 产物走 2%的琼脂糖凝胶电泳。

1.3.3 测序鉴定 经初步鉴定重组体含目的片段后,对重组质粒 DNA 进行序列测定。测序引物为通用引物,采用 ABI377 全自动 DNA 测序仪(基康公司),应用四色荧光、双脱氧终止法进行测序。

2 结果

2.1 目的片段的克隆

结果显示 PCR 产物在 190 bp 之前,与预期的长度相吻合,提示扩增的 DNA 片段可能为目的片段,见图 1。

2.2 重组体的酶切及 PCR 鉴定

重组载体在双酶切后释放出一约 173 bp 的片段,提示扩增的片段已成功地插入载体 DNA 中。用重组后的质粒作 PCR,扩增出的片段与重组前的大小一致,进一步证实了重组成功,见图 1。

2.3 目的片段的测序结果

DNA 测序证实所克隆并连接到载体的 DNA 片段是我们所需要的目的片段。测序结果表明我们所克隆的目的片段与 Genebank 上公布的序列基本一致,只是在-153 位点和-152 位点有 2 个 t 缺失。

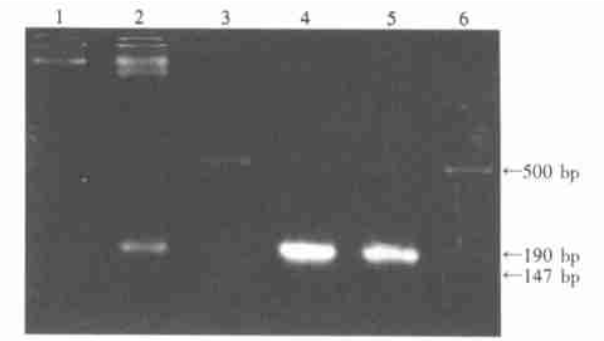


图 1 重组体的 PCR 及酶切鉴定

Fig 1 Result of PCR and enzyme cut of the recombinant

Lane 1: The recombinant; Lane 2: Double enzyme cut of the recombinant; Lane 3 and 6: Low molecular marker; Lane 4: PCR product of the recombinant; Lane 5: PCR of genomic DNA

3 讨论

1989 年 Sardet 等[6] 首先克隆出人 NHE-1 基因编码区及部分 5' 端非翻译序列。Miller 等[7] 于 1991 年进一步克隆出 NHE-1 5' 端有 1 377 bp 的调控序列,并将 5' 端非翻译区从 400 多 bp 延长到 786 bp。采用酶切和亚克隆的方法,将调控序列全长和-349 bp 下游分别克隆到含 CAT 报告基因的质粒上,发现二者的调控活性都比胸苷激酶调控序列的活性强的多。Kolyada 等[8] 于 1994 年对 NHE-1 调控序列的调控活性作了更深入的研究。发现人肝癌细胞(HepG2)和鼠血管平滑肌细胞(VSM A7r5)的 NHE-1 正调控序列位于-252 位点下游,其转录活性为全长的 198%~214%,而鼠成纤维细胞(3T3)的正调控序列则位于-654 位点下游。他们还证实(-239)~(-215)位点片断对 HepG2 和 VSM A7r5 的 NHE-1 转录起重要作用。删除该序列或替换该序列中部分核苷酸可使其转录活性下降到 15%~37%。仅保留调控序列-92 位点下游部分(含 TATA Box)其转录活性也只有全长的 30%~33%。从以上文献我们得到启发,肺癌细胞的 NHE-1 呈高表达,其转录因子的活性势必处于较高水平。如果我们将其正调控序列部分导入肿瘤细胞,应该能够竞争结合其关键的转录因子,抑制 NHE-1 的表达,从而达到降低肿瘤细胞(pHi)和诱导其凋亡的作用。本实验结果初步表明,我们已经成功地克隆了 NHE-1 基因调控序列-268 位点到-100 位点,其中含可能起关键作用的(-239)~(-215)片段,为下一阶段的实验奠定了基础。我们所克隆的片段与 Kolyada 等[8] 公布在 Genebank 上的序列比较,缺失了 2 个 t,这有 2 种可能性;其一是测序技术上的进步,最早的序列为 Miller 等[7] 于 1991 年报道,但与 Kolyada 等[8] 于 1993 年公布在 Genebank 上的序列即有部分差异,包括碱基插入、缺失和替换。而目前的测序技术应该更为可靠。其二

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

是组织差异所致，可能与肿瘤组织细胞 NHE-1 基因存在突变有关。也不排除为 PCR 扩增时所产生的错配所致，但我们扩增的序列不足 200 bp，这种可能性应该是很小的。

近年我们研究发现，人肺癌组织细胞的 NHE-1 基因 mRNA 表达较正常肺组织增高约 12 倍[3]；在细胞培养的实验中亦证明，抑制 NHE-1 活性，具有酸化肿瘤细胞的作用，并能诱导肺癌细胞的凋亡[4]。因此，我们相信将所克隆的 NHE-1 正调控序列部分导入肺癌细胞，将影响 NHE-1 的表达，可能能够达到酸化肺癌细胞，并诱导其凋亡的目的，有关实验正在研究中。

参考文献：

[1] McLean L A, Roscoe J, Jorgensen N K, *et al*. Malignant gliomas display altered pH regulation by NHE-1 compared with nontransformed astrocytes [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2000, 278(4): C676—688.

[2] Strazzabosw M, Poci C, Zsembery A, *et al*. Intracellular pH regulation in Hep G2 cells: effects of epidermal growth factor, transforming growth factor-α and insulinlike growth factor-Ⅱ in Na^+/H^+ exchange activity[J]. Hepatology, 1995, 22(2): 588—597.

[3] 黄桂君，厉为良，钱桂生，等. 人肺癌组织细胞 NHE-1 mRNA 表达及其意义的研究[J]. 中华结核和呼吸杂志，1998, 21(10): 636—638.

[4] Wu G M, Huang G J, Qian G S, *et al*. Acidification and apoptosis of human lung cancer cells induced with antisense nucleotides against NHE-1 [J]. J Med Coll PLA, 1998, 13(4): 291—293.

[5] Garcia-Canero R, Trilla C, Perez de Diego J, *et al*. Na^+/H^+ exchange inhibition induces intracellular acidosis and differentially impairs cell growth and viability of human and rat hepatocarcinoma cells[J]. Toxicol Lett, 1999, 106(2-3): 215—228.

[6] Sardet C, Franchi A, Pouyssegur J. Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na^+/H^+ antiport [J]. Cell, 1989, 56(2): 271—280.

[7] Miller R T, Counillon L, Pages G, *et al*. Structure of 5'-flanking regulatory region and gene for the human growth factor-activatable Na^+/H^+ exchanger NHE-1[J]. J Biol Chem, 1991, 266(17): 10 813—10 819.

[8] Kolyada A Y, Lebedeva T V, Johns C A, *et al*. Proximal regulatory elements and nuclear activities required for transcription of the human Na^+/H^+ exchanger (NHE-1) gene[J]. Biochim Biophys Acta, 1994, 1217(1): 54—64.

（编辑　王　红）

文章编号：1000-5404(2001)02-0127-01

经验与短篇

针灸治疗产后尿潴留 50 例临床观察

Clinical observation on 50 cases of postpartum retention of urine treated by acupunture and moxibustion

吴杰凤　（第三军医大学附属西南医院中医科，重庆 400038）

产后尿潴留是妇产科常见病，多因产后气血皆虚弱、肾阳虚惫致膀胱气化不利，小便闭塞，点滴不通。我科采用针灸方法治疗产后尿潴留 50 例，疗效显著，现报告如下。

1　临床资料与方法

1.1　病例情况

患者均为 22～37 岁女性。尿潴留 2 d 有 9 人；尿潴留 3～5 d 有 29 人；尿潴留 6 d 以上 12 人。完全性尿潴留 23 名；不完全性尿潴留 27 名。“B 超”检查均有不同程度的残存尿。患者子宫恢复均差，触诊子宫松驰，子宫大，收缩差，95% 以上患者子宫在脐上或平脐。

1.2　治疗方法

患者均是临床采用不同方法(药物、热敷、按摩、导尿等)治疗，效果不佳者。

1.2.1　治疗原则　　温补肾气、通调三焦。取足太阳膀胱经、任脉、脾经腧穴为主。取穴：中极、关元、归来、足三里、阴陵泉、地机、三阴交、合谷、肾俞、膀胱俞。

1.1.2　操作方法　　首先针刺中极、关元、归来、合谷、足三里、三阴交、阴陵泉、地机，得气后再将合谷、归来、中极、三阴交接 D8605 电针仪，输出电流开在患者能感到轻微跳动的电位位置上，留针 30～40 min，同时艾灸关元、足三里穴[1]，取针后点刺肾俞、膀胱俞。

2　结果

2.1　治愈标准

顺利解出小便，“B 超”检查膀胱无残存尿。

2.2　排尿效果

针刺 1 次治愈者 36 人，占总数 72%；针刺 2 次治愈者 10 人，占 20%；针刺 3 次治愈者 4 人，占 8%，治愈率 100%。

2.3　子宫恢复效果[2]

患者经针灸治疗 1 次后，大多数患者子宫变硬，收缩频率增加，子宫有不同程度缩小，一般子宫下降 1～3 横指。

2.4　典型病例

胡×，女，27 岁，2000 年 5 月 28 日，顺产 1 子，产后不能自行解小便，经用药、按摩、热敷后仍不能解出，行导尿术、留置尿管3d，取尿管后患者仍无法自行解小便。于2000年6月1日

（下转 130 页）

作者简介：吴杰凤(1963—)，女，四川省遂宁市人，主管护师，主要从事针灸临床治疗方面的研究，发表论文 7 篇。电话：(023)68754309

收稿日期：2000-07-02；修回日期：2001-01-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net