DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.06.012
第22卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 6
538 2000年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)06-0538-03

人肺癌细胞NHE-1基因片段的克隆及其反义表达载体的构建

黄桂君,吴国明,张 青,钱桂生 (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 构建人肺癌细胞Na^+/H^+交换泵-1(Na^+/H^+ exchanger-1,NHE-1)基因的反义表达载体,为将来能在体内应用抑制NHE-1基因表达的肿瘤治疗奠定基础。方法 采用PCR技术从人肺癌A549细胞基因组中克隆出长为454 bp的NHE-1基因外显子部分序列,在上、下游引物的5'-端带上*BamH*Ⅰ和*EcoR*Ⅰ酶切位点。然后将该片段反向插入逆转录病毒载体pLXSN的多克隆位点。最后对产生的重组子进行琼脂糖凝胶电泳和测序鉴定。结果 经琼脂糖凝胶电泳鉴定,所克隆的目的片段大约为467 bp,并成功地连接到pLXSN载体上,而DNA测序证实克隆并插入到载体中的片段为目的片段。结论 本实验已成功地克隆了NHE-1的目的片段,并将其反向插入到pLXSN中,构建了NHE-1反义表达载体pNHE-1。

关键词:NHE-1基因;肺肿瘤;反义技术;重组载体
中图法分类号:R394—3;R734.2 文献标识码:A

Cloning of Na^+/H^+ exchanger-1 gene fragment from human lung cancer cells and construction of its antisense expression vector

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

Abstract: Objective To construct an antisense expression vector of Na^+/H^+ exchanger-1 (NHE-1) of human lung cancer cell in order to found a basis for tumor gene therapy by inhibiting the expression of NHE-1 gene *in vivo*. Methods Partial sequence of the exon of NHE-1 gene was cloned with the length of 454bp from genomic DNA of A549 cells with PCR method. *Bam*HI and *Eco*RI cleaving sites were added to 5' ends of the upstream and downstream primers respectively. The cloned fragment was reversely inserted into the multiclone site of plasmid reverse transcription virus vector pLXSN. Finally, the constructed recombinant was identified with agarose gel electrophresis and DNA sequencing. Results The cloned fragment was in the length of 461bp and successfully bound to pLXSN. It also proved to be the objective one by DNA sequencing. Conclusion The objective fragment was cloned and reversely inserted into pLXSN in our study. The antisense vector of NHE-1, namely, pNHE-1 was constructed successfully.

Key words: NHE-1 gene; pulmonary neoplasm; antisense technology; recombinant vector

Na^+/H^+交换泵(Na^+/H^+ exchanger, NHE)基因家族有5个亚型,分别命名为NHE-1, 2, 3, 4及β—NHE。其中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的反巴士德效应,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]。而目前已经证实细胞内的H^+蓄积和pHi降低将会诱发细胞凋亡[3]。我们的前期工作亦已证明人肺癌组织NHE-1基因的表达比正常肺组织高12倍左右[5]。因此,抑制人肺癌细胞NHE-1基因上调表达将可能诱发细胞酸化和凋亡,达到肿瘤治疗的目的。本研究试图从人肺癌细胞株A549细胞中克隆NHE-1基因的部分

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900067)
作者简介:黄桂君(1964—),男,广西省南宁市人,博士,主治医师,讲师,主要从事肺癌、疾病基因组方面的研究,发表论文12篇。电话:(023)68755644
收稿日期:2000-02-17;修回日期:2000-04-28

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

序列, 并构建其反义表达重组载体。为将来能在体内应用 NHE-1 基因抑制的肿瘤治疗研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　A549 细胞 NHE-1 基因片段的克隆

1.1.1　A549 细胞的培养　　采用 RPMI1640 培养基按常规方法培养肿瘤细胞。

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 Sardet 等[4] 克隆的人 NHE-1 基因序列, 设计以下一对引物(由上海生工生物工程公司合成):

P1(正义引物): 5'-tcg gat cca gtc act ttc ctc agc-3'

BamH Ⅰ

P2(反义引物): 5'-cga att caa cca cga gta agg-3'

EcoR Ⅰ

该对引物可扩增 NHE-1 基因第 1 外显子序列, 相当于其 cDNA 的－384 bp 至＋70 bp 处的序列, 长为 454 bp。引物 5' 端带上 *BamH* Ⅰ 和 *EcoR* Ⅰ 酶切位点便于反向连接于病毒载体的 5' －LTR 启动子下游(含酶切位点 PCR 产物长为 467 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, 60℃退火 40 s, 72℃延伸 45 s。作 35 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 1% 琼脂糖电泳, 待引物二聚体与扩增片段分离后, 切下扩增片段, 再用"V"型 DNA 电泳洗脱回收槽回收该凝胶中的目的片段, 用酚/氯仿抽提、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 20 μl 去离子水溶解后, 置－20℃保存备用。

1.2　NHE-1 基因反义表达载体的构建

1.2.1　构建策略, 见图 1

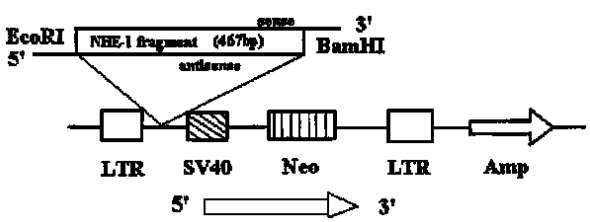


图 1　构建策略图

Fig 1　Construction strategy

1.2.2　pLXSN 质粒(5 843 bp, Dr. Miller 惠赠)　　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。

1.2.3　DNA 重组连接　　连接反应体系由 10× Buffer 10 μl, 酶切后的 PCR 扩增片段 3 μl(3.9 μg), 上述酶切后的 pLXSN 载体 1.3 μl(1.3 μg), T4 连接酶 8 μl, 水 77.7 μl 组成, 合计 100 μl; 在 16℃条件下连接 16 h。

1.2.4　重组载体(pNHE-1)的细菌转导　　采用电穿孔法。取 45 μl XL1-Blue 感受态细菌, 加入 2 μl 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 25 μF, 电阻 200Ω 的条件下电击细菌 4～5 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 100 μl 转化细菌涂布于半固体培养基(含 100 μg/ml Amp)筛选平板上, 37℃孵育箱中过夜。

1.3　pNHE-1 的鉴定

1.3.1　酶切鉴定　　从筛选平板上挑取菌落, 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。采用 *BamH* Ⅰ 和 *EcoR* Ⅰ 酶切提取的质粒 DNA, 进行电泳鉴定。

1.3.2　测序鉴定　　经初步鉴定 pNHE-1 为设计的反义重组子后, 对重组质粒 DNA 进行序列测定。测序引物为我们设计的上游引物, 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, 见图 2

结果显示 PCR 产物与预期的长度相吻合, 提示扩增的 DNA 片段为目的片段。

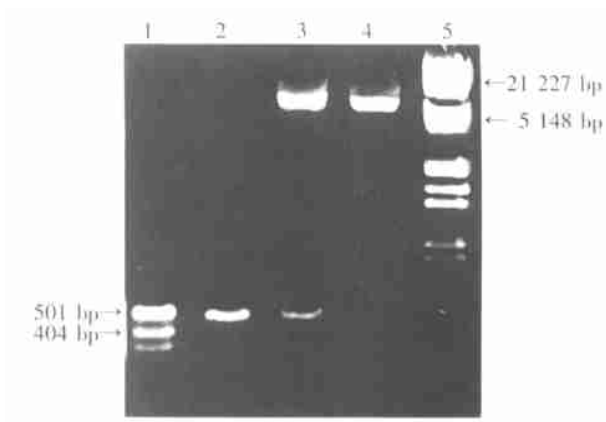


图 2　目的片段及 **pNHE-1** 的酶切电泳鉴定结果

泳道 1: 小分子量 marker; 泳道 2: PCR 产物; 泳道 3: pNHE-1 双酶切后释放的目的片段; 泳道 4: 双酶切的 pLXSN; 泳道 5: Marker(λDNA/ *EcoR* Ⅰ ＋ *Hind* Ⅲ)

Fig 2　Electrophoresis of objective DNA fragment and enzyme cleaving pNHE-1

Lane 1: low molecular marker; Lane 2: PCR product; Lane 3: pNHE-1 double enzyme cleaving; Lane 4: pLXSN double enzyme cleaving; Lane 5: DNA marker (λDNA/ *EcoR* Ⅰ ＋ *Hind* Ⅲ)

2.2　pNHE-1 的酶切鉴定, 见图 2

重组载体在双酶切后释放出一约 462 bp 的短片段, 提示扩增的片段已成功地插入载体 DNA 中。

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

2.3 pNHE-1 中目的片段的测序结果

测序结果表明我们所克隆的目的片段与 Sardet 等人于1989年报道的几乎完全一致，只是在－360 和－364 分别有 C 和 G 插入。

3 讨论

实验结果表明，我们已经成功地克隆了目的片段，并将该片段反向插入到逆转录病毒载体 pLXSN 上，成功构建了 NHE-1 的反义表达载体 pNHE-1。测序结果显示所克隆的目的片段与他人报道的 NHE-1 相应序列有细微差异，这种差异可能与肿瘤组织细胞 NHE-1 基因突变有关；亦不排除为 PCR 扩增时所产生的错配所致，但我们扩增的序列不足 500 bp，2 个碱基的差异以前者的可能性更大。因此直接从肿瘤细胞克隆 NHE-1 基因片段并构建其反义表达载体，对肿瘤细胞基因表达的抑制可能具有一定的选择性。

以往采用 PCR 克隆基因及构建其反义表达载体均从 mRNA 入手，而 RNA 提取条件严格，还需逆转录步骤，耗时耗力。由于在反义技术中，一般针对基因 cDNA 的任何序列均可产生抑制效应，因此，在本实验中我们设计引物直接从基因组 DNA 扩增对应于 NHE-1 cDNA 的序列，而该序列含 5′ 端非翻译区和翻译起始密码子，并从基因组直接转录而来，不经剪接加工。这样既可获得反义抑制的最有效靶序列，又省时省力。我们在引物设计时还加入了酶切位点，使 NHE-1 基因片段按反向插入要求连接到 pLXSN 上，从而也使重组载体构建工作高效简便。目前，以缺陷病毒为载体在有机整体中表达外源基因，仍然是肿瘤基因治疗的活跃领域。近年我们的研究发现，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[5]；在细胞培养的实验中亦证明，针对 NHE-1 的反义寡聚脱氧核苷酸对人肺癌细胞具有抑制 NHE-1 活性，酸化肿瘤细胞的作用，并能诱导肺癌细胞的凋亡[6]。因此，NHE-1 基因反义表达载体的构建，为将来实施 NHE-1 基因抑制的肿瘤治疗研究奠定了基础。我们相信这一工作将具有重要价值。

参考文献：

[1] 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.

[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，钱桂生. pH 对细胞凋亡的调控及 pH 调节的肿瘤治疗研究[J]. 科学，1997，228(8)：51－52.

[4] 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: 271－280.

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

[6] Wu Guoming, Huang Guijun, Qian Guisheng, *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.

（编辑 王 红）

（上接 537 页）

理诊断为内翻性乳头状瘤，无恶变。术后患者左侧头痛无缓解，并发生左眼视力逐渐下降。术后 20 d 左眼视力无光感，并有Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ脑神经症状，出现左侧眶尖综合症。随即采取放射治疗。放射剂量为连续放射，每次 1.7 Gy，每周 5 次，总剂量为 70 Gy。放疗 10 次后，患者头痛逐渐缓解。右眼视力开始恢复，放疗 18 次后，头痛基本消失，左眼视力已恢复到 4.4(0.25)。左眼上睑下垂减轻。放疗结束时，病情稳定准予出院。随访 4 年，情况良好。

讨论

鼻腔和鼻窦的内翻性乳头状瘤侵入颅内罕见，Van[1] 1988 年和卜国铉[2] 1987 年各报道 1 例肿瘤侵入前颅窝，但肿瘤侵入中颅窝未见报道，我科 1995 年 3 月收治 1 例。此病的病理特征为鼻粘膜基底细胞增生并向粘膜下层浸润，呈内翻性生长，容易破坏鼻及鼻腔骨质向周围蔓延，多起于单侧，少数在晚期可波及对侧，手术后易复发，本例为复发。累及颅中窝并与海绵窦，颈内动脉关系密切，术中颅内部分难予彻底切除，国外有报道放射治疗鼻腔内翻性乳头状瘤有一定疗效[3]，本例术后采用放疗，效果满意，故作者认为该病侵犯颅内，手术切除困难时，放疗不失为一治疗手段。

关键词：鼻腔；内翻性乳头状瘤；颅内侵犯
中图法分类号：R739.62 文献标识码：B

参考文献：

[1] Van Olphen A F, Lubsen H, Van' T Verlaat. An inverted papilloma with intracranial extension[J]. J Laryngology Otol, 1988, 102(6): 534－537.

[2] 卜国铉，樊 忠 主编. 耳鼻咽喉神经外科学[M]. 长春：吉林科学技术出版社，1992. 132－133.

[3] Menderhall W N, Million R P, Cassisi N J, *et al*. Biologicall aggressive papilloma of the nasal cavity: The role of radiation therapy[J]. Laryngoscope, 1985, 95(4): 344－346.

（编辑 冷怀明）

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