

## 新抑癌基因 PIG11 高表达 Hep G2 细胞株的建立

吴 艳, 王晓娟, 刘小敏, 曾春亚, 梁晓秋  
(南华大学 肿瘤研究所, 湖南 衡阳 421001)

**摘 要:** 目的 构建人 PIG11 逆转录病毒载体, 建立高表达 PIG11 基因的 Hep G2 细胞, 为进一步研究 PIG11 基因在肝癌细胞中的功能提供一个理想的试验平台。方法 将已有的 pcDNA3.1/NT-GFP-PIG11 质粒用 PCR 法扩增出 PIG11 片段, 构建含人 PIG11 cDNA 的重组质粒 pLXSN-PIG11。重组载体经 PCR 鉴定和 DNA 测序分析。将该重组质粒用 lipofectamine<sup>TM</sup>2000 转染包装细胞 PA317, 获得 pLXSN-PIG11 逆转录病毒。用病毒感染 Hep G2 细胞, 获得 PIG11 高表达的 Hep G2 细胞株。结果 获得 384 bp 人 PIG11 基因, 测序证明 PIG11 cDNA 编码序列与 Genbank 中报道的一致, 转染 PA317 细胞后用病毒上清感染 Hep G2 细胞, 经 RT-PCR 检测发现 Hep G2 细胞中 PIG11 mRNA 表达明显升高。结论 成功构建了高表达 PIG11 基因的 Hep G2 细胞株, 为进一步研究其生物学行为奠定了基础。

**关键词:** PIG11; 逆转录病毒载体; Hep G2 细胞株

**中图分类号:** R730.1; R735.7

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-7444(2007)05-0653-03

### Recombinant PIG11 Gene Retroviral Vector Construction and Its High Expression in Hep G2 Cells

WU Yan, WANG Xiao-juan, LIU Xiao-min, et al

(Cancer Research Institute, Nanhua University, Hengyang, Hunan 421001, China)

**Abstract: Objective** To construct the human PIG11 gene retroviral vector and obtain a Hep G2 cell line high expressing PIG11 gene by infection, which can be used for the further research on the function of PIG11 gene in liver cancer cell. **Methods** PIG11 gene was amplified by PCR from expression vector pcDNA3.1/NT-GFP-PIG11, this gene fragment insert was put into retroviral vector pLXSN, then this new vector pLXSN-PIG11 was identified by PCR and DNA sequencing analysis. This vector was transfected into packing cell PA317 mediate by lipofectamine<sup>TM</sup>2000, which can induce retrovirus release. Then we use this retrovirus infect Hep G2 cell to achieve PIG11 gene high expression Hep G2 cell line. **Results** 384 bp PIG11 gene fragment was obtained, which is the same as PIG11 cDNA in genbank report. RT-PCR was used to detect infected Hep G2 cells, which identified PIG11 mRNA was up-regulated. **Conclusion** The retroviral vector pLXSN-PIG11 was successfully constructed and infected into Hep G2 cells, new Hep G2 cell line was obtained, which highly express PIG11 gene.

**Key words:** PIG11; retroviral vector; Hep G2 cell

新抑癌基因 PIG11 是一个新发现的 p53 下游基因<sup>[1]</sup>, 在肝癌中 PIG11 表达下调<sup>[2]</sup>, 初步研究表

明, 该基因是 p53 调控的一个靶点, 可能是一种新的抑癌基因。本研究运用逆转录病毒载体 pLX-

通讯作者: 梁晓秋, 电话: 0734-8281510; E-mail: Liangxiaoqiu505@hotmail.com.

SN,建立 PIG11 基因高表达的 Hep G2 细胞株,为进一步研究 PIG11 基因在肝癌中的作用提供了一个理想的细胞模型。

## 1 材料和方法

1.1 材料 E. coli DH5 由本所保存。质粒 pcDNA3.1/NT- GFP- PIG11 由梁晓秋博士构建。质粒 pLXSN 由南华大学生理教研室唐小卿教授惠赠。PA317 细胞、NIH3T3 细胞由武汉中国典型培养物保藏中心引进。Hep G2 细胞由中南大学细胞中心引进。EcoR I、BamH I 购自 MBI 公司;DNAMarker 购自大连宝生物;质粒小量抽提试剂盒购自碧云天;琼脂糖凝胶回收试剂盒购自天根生物;Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;polybrene 购自 Chemicon 公司;G418、Trizol 购自 BBI 公司;Oligo(dT)、RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司;DMEM 培养基购自 GIBCO 公司;小牛血清购自杭州四季青生物工程公司。

1.2 逆转录病毒载体的构建 质粒 pcDNA3.1/NT- GFP- PIG11 经 PCR 扩增出 PIG11 片段,将 PCR 产物经 EcoR I 和 BamH I 双酶切后 1% 琼脂糖凝胶电泳分离回收 384 bp PIG11 DNA 片段。逆转录病毒载体 pLXSN 经 EcoR I 和 BamH I 双酶切后 1% 琼脂糖凝胶电泳分离回收 pLXSN 大片段。将 2 片段由 T4 DNA 连接酶连接,构建 pLXSN-PIG11 重组逆转录病毒载体。连接好的重组载体氯化钙法转化入 DH5 感受态菌中,用含氨苄青霉素的琼脂平板筛选转化子。随机挑选转化子送测序,选择测序结果正确的克隆大量扩增。

1.3 包装细胞转染 采用双嗜性包装细胞系 PA317。转染前 1 天分别将  $1.5 \times 10^5$  细胞接种于 24 孔板中,按 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 脂质体说明书分别将 pLXSN-PIG11 和 pLXSN 转染入 PA317 细胞。用 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 筛选 4~6 周可获得稳定转染并持续表达 PIG11 的抗性克隆,将细胞克隆进行扩增,收集培养液测定病毒滴度。

1.4 病毒滴度测定 将  $4 \times 10^5$  NIH3T3 细胞接种于 6 孔板中,次日取病毒上清液作  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  倍稀释,加入 polybrene 至终浓度为 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。弃去 NIH3T3 细胞的培养基,分别吸取 1 mL 稀释的病毒液,每种病毒液加 2 孔,感染 6 h 后补充含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基 3 mL。培养 24 h

后换液,加入 G418 终浓度为 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。维持 G418 浓度筛选 2~3 周后计数抗性克隆。

1.5 感染 Hep G2 细胞与阳性克隆筛选 病毒液感染 Hep G2 细胞,方法同 NIH3T3 细胞。感染 24 h 后将 Hep G2 细胞 1:2 传代,并加入终浓度为 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 筛选抗性克隆。待大部分细胞死亡后,改为含 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 的完全培养基继续筛选。经 4~6 周可获得稳定感染并持续表达 PIG11 的抗性克隆,将细胞克隆进行扩增。

1.6 RT-PCR 鉴定感染 Hep G2 细胞 PIG11 mRNA 表达情况 根据已有质粒 pcDNA3.1/NT- GFP- PIG11 设计 PIG11 引物,片段长 384 bp。上游引物 P1:5'-GCG AAT TCC AAC ACC GAT GCA CAC A-3',含有 EcoR I 酶切位点;下游引物 P2:5'-CCG GGA TCC TAG GCA GCT CTT TAG G-3',含有 BamH I 酶切位点。内参  $\beta$ -actin 引物片段长 450 bp。PCR 引物由上海生工合成。

收集细胞  $(2 \sim 3) \times 10^6$ , TRIZOL 法提取细胞总 mRNA,逆转录成 cDNA,PCR 扩增 PIG11 片段及  $\beta$ -actin,1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

## 2 结果

2.1 重组逆转录病毒载体 pLXSN-PIG11 鉴定 重组载体 PCR 扩增可得到 384 bp 的目的片段(图 1),经测序证实插入片段序列与 GenBank 报道序列完全一致。

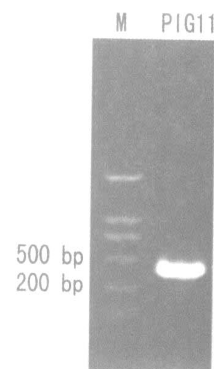


图 1 重组逆转录病毒载体 pLXSN-PIG11 鉴定 PCR 检测插入片段,有一条 384 bp 条带。

2.2 包装细胞产生 PIG11 重组逆转录病毒感染 Hep G2 细胞 包装细胞产生逆转录病毒液,由 NIH3T3 鉴定包装细胞产生病毒滴度为  $5 \times 10^3$  cfu/

mL。感染 Hep G2 细胞,获得阳性克隆(图 2)。

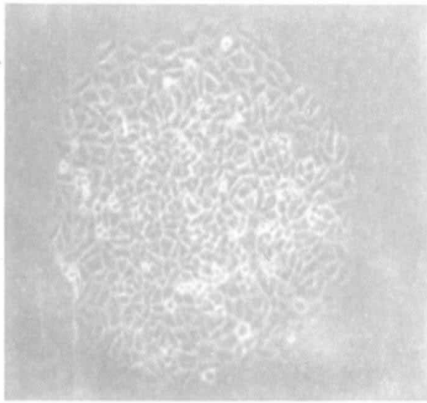


图 2 感染细胞阳性克隆

2.3 感染 PIG1 基因的 Hep G2 细胞 PIG1 mRNA 表达 对 3 组细胞进行 mRNA 水平的检测,以 - actin 做为内参照,感染目的基因的 Hep G2 细胞 PIG1 mRNA 明显上调(图 3)。

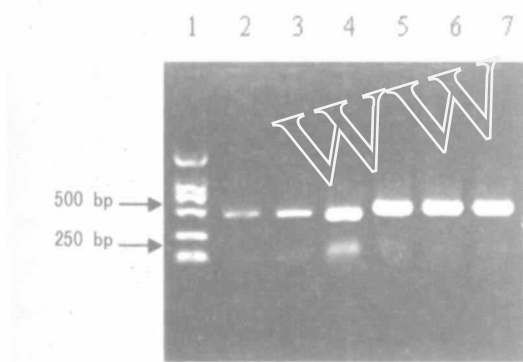


图 3 感染 PIG1 基因的 Hep G2 细胞 PIG1 mRNA 明显升高

1. Marker; 2. Hep G2 细胞; 3. Hep G2 - pLXSN 细胞; 4. Hep G2 - pLXSN - PIG1 细胞; 5. Hep G2 细胞的 - actin 内参照; 6. Hep G2 - pLXSN 细胞的 - actin 内参照; 7. Hep G2 - pLXSN - PIG1 细胞的 - actin 内参照。

### 3 讨 论

Polyak 等<sup>[1]</sup>研究人结肠癌细胞经历 p53 依赖的凋亡机制中,应用 SAGE 技术,首先鉴定的 p53 高表达明显地诱导 PIGs(p53 - induced genes)的表达,命名为 PIG1 - 13, PIG11 是其中之一。PIG11 基因也称为 TP53I11 (tumor protein p53 inducible protein 11),是一个 p53 下游靶基因,位于人类染色体 11p11.2<sup>[3]</sup>,由 121 个氨基酸组成。

Zhu 等<sup>[4]</sup>研究显示,PIG11 在 p53 诱导的凋亡过程中发挥作用。Ricketts 等<sup>[3]</sup>用微细胞介导的染色体转移技术 (microcell mediated chromosome transfer) 发现人第 11 号染色体 11p11.2 ~ p12 存在着肝脏肿瘤抑制基因。对人肝细胞癌细胞系的研究发现,PIG11 基因在 Hep G2 和 Hep3B 中的转录明显减少甚至消失,因此,PIG11 基因可能是人类肝细胞癌的抑癌基因。近年来有研究也暗示了这一点<sup>[5]</sup>。

为了更好的认识 PIG11 和肝癌的关系,本研究采用逆转录病毒载体 pLXSN 感染肝癌细胞株 Hep G2。逆转录病毒载体是病毒载体中最为常用的一种<sup>[6,7]</sup>,可感染分裂细胞,将目的基因稳定的整合到染色体 DNA 内,在理论上可以实现目的基因的长期表达。本研究所采用的逆转录病毒载体 pLXSN 来源于 Moloney 小鼠白血病病毒 (Mo-MuLV),由于剔除了 DNA 基因结构中的 gag、env、pol 3 部分致病性的反式功能序列,具有感染性但无复制能力,安全性较好。包装细胞 PA317 是目前较广泛使用的第 2 代包装细胞<sup>[8]</sup>,可为逆转录病毒载体提供结构蛋白组分,且不需要共转染辅助病毒。能产生宽宿主谱的双向性毒种,而不产生可测出的辅助病毒,是一种较安全的包装细胞。成功转染病毒载体的包装细胞能长期保存,便于感染各种细胞,操作简单,感染效率较高,较容易感染多种难于转染的细胞株。

PIG11 作为肿瘤抑制物 p53 蛋白诱导的一系列下游基因 PIGs 之一,其编码产物在 p53 介导的细胞信号传导过程中的作用还不清楚。PIG 11 作为一种新发现的基因,对其认识还甚少,其在肝癌中发生作用的机制也不清楚。本研究构建的 Hep G2 - pLXSN - PIG11 细胞模型为进一步研究 PIG11 基因在肝癌细胞株 Hep G2 中的功能提供了一个良好的试验平台。

### 参考文献:

- [1] Polyak K, Xia Y, Zweier JL, et al. A model for p53 - induced apoptosis [J]. Nature, 1997, 389:300 - 305.
- [2] 刘小敏,唐荣军,周秀田,等. PIG11 蛋白在人体正常组织及其相应肿瘤组织中表达的研究[J]. 南华大学学报·医学版, 2006, 34 (2): 176 - 180. (下转第 659 页)

性占 34.4%,女性占 28.8%。女性在瘦和偏瘦两方面较男性多见,男性在偏胖和胖两方面较女性多见,可能与现下流行减肥,女学生更注意饮食有关。瘦型中男性占 1.6%,女性占 6.4%,比例很低,这可能与人们生活水平提高有关。

臀形分型中,可见都是以中等最多见,男性占 37.6%,女性占 51.2%。男性较扁和中等共占 72.8%,女性较扁和中等共占 73.6%,均超过 70%,说明无论男性还是女性,臀形都是以较扁和中等为主。

#### 参考文献:

- [1] 齐连枝,王树勋,陆舜华,等. 内蒙古地区汉族成人体的分析[J]. 解剖学杂志,2004,27(4):434-437.
- [2] 赵凌霄. 运用体型研究中国学生(山西)的体格发育[J]. 人类学学报,1992,11(3):260-271.
- [3] 唐锡麟,王志强,王冬妹. 中国汉族青年身高水平的地域分布[J]. 人类学学报,1994,13

(2):143-147.

- [4] 金利新. 山东成人体的研究[J]. 人类学学报,2003,22(1):37-44.
  - [5] 花兆合,李玲,刘再群,等. 芜湖市区汉族青少年的 Health-Carter 法体型研究[J]. 解剖学杂志,2004,27(1):89-92.
  - [6] 吴汝康. 人体测量方法[M]. 北京:科学出版社,1984.
  - [7] 邵象清. 人体测量手册[M]. 上海:上海辞书出版社,1985.230-256.
  - [8] 韩在柱,郑连斌,陆舜华. 达斡尔族学生皮下脂肪发育的研究[J]. 人类学学报,1998,17(2):158-164.
  - [9] 徐飞,李岩. 大连学生肢体长和躯干宽的生长发育[J]. 解剖学杂志,2003,26(3):285-288.
  - [10] Dunn HK, Hess WE. Total hip reconstruction in chronically dislocated hips[J]. J Bone Joint Surg (Am),1976,58(6):838-845.
- (收稿日期:2007-04-21)

(上接第 655 页)

- [3] Ricketts SL, Carter JC, Coleman WB. Identification of three 11p11.2 candidate liver tumor suppressors through analysis of known human genes[J]. Mol Carcinog,2003,36(2):90-99.
- [4] Zhu J, Jiang J, Zhou W, et al. Differential regulation of cellular target genes by p53 devoid of the PXXP motifs with impaired apoptotic activity[J]. Oncogene,1999,18(12):2149-2155.
- [5] Chiba T, Yokosuka O, Fukai K, et al. Cell growth inhibition and gene expression induced by the histone deacetylase inhibitor, trichostatin

A, on human hepatoma cells[J]. Oncology,2004,66(6):481-491.

- [6] Kim SH, Kim S, Robbins PD. Retroviral vectors[J]. Adv Virus Res,2000,55:545-563.
  - [7] Baum C, Schambach A, Bohne J, et al. Retrovirus vectors: toward the plentivirus[J]. Mol Ther,2006,13(6):1050-1063.
  - [8] Rigg RJ, Chen J, Dando JS, et al. A novel human amphotropic packaging cell line: high complement resistance, and improved safety[J]. Virology,1996,218:290-295.
- (收稿日期:2007-05-08)