

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 lipofectamineTM2000 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 lipofectamineTM2000, 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^[1], 在肝癌中 PIG11 表达下调^[2], 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 1.5×10^5 细胞接种于 24 孔板中,按 LipofectamineTM2000 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 4×10^5 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 β -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 β -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。

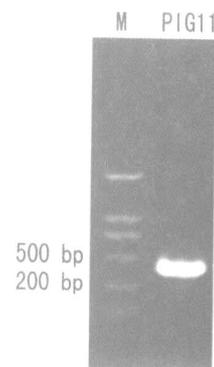


图 1 重组逆转录病毒载体 pLXSN-PIG11 鉴定 PCR 检测插入片段,有一条 384 bp 条带。

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 5×10^3 cfu/

mL。感染 Hep G2 细胞,获得阳性克隆(图 2)。

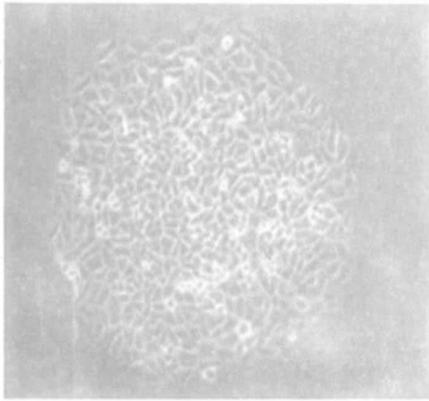


图 2 感染细胞阳性克隆

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)。

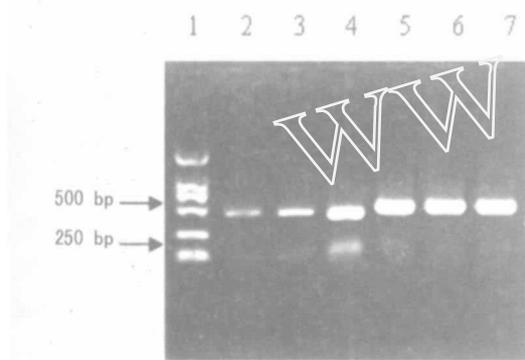


图 3 感染 PIG1 基因的 Hep G2 细胞 PIG1 mRNA 明显升高

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^[1]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^[3],由 121 个氨基酸组成。

Zhu 等^[4]研究显示,PIG11 在 p53 诱导的凋亡过程中发挥作用。Ricketts 等^[3]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^[5]。

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^[6,7],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^[8],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. 山东成人体型的研究[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)