

论著

文章编号:1000-5404(2012)16-1596-04

S100A9 真核表达载体 pEGFP-N3-S100A9 的构建及其对 U251 细胞生长的影响

陈松,程远,廖鹏,邓金木 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院神经外科)

[摘要] **目的** 构建 S100A9 真核表达载体 pEGFP-N3-S100A9,观察其对胶质瘤细胞系 U251 内 S100A9 基因表达及细胞生长的影响。**方法** 应用 RT-PCR 和 DNA 重组技术构建 pEGFP-N3-S100A9 融合蛋白表达载体,并用双酶切、测序进行鉴定,用脂质体转染胶质瘤细胞系 U251 细胞。荧光显微镜下动态观察 U251 细胞绿色荧光的变化;培养 24 h 后提取转染细胞的总 RNA 及总蛋白。通过荧光定量 PCR (qRT-PCR) 观察其 mRNA 表达情况,Western blot 检测其蛋白表达情况,MTT 法检测细胞增殖,流式细胞仪检测细胞周期分布。**结果** 酶切鉴定与 S100A9 全长基因长度一致(345 bp);测序证实重组质粒中含有一与 GenBank 上登录的 S100A9 基因(NM_002965)序列完全一致的片段,表明成功构建真核表达载体;荧光显微镜下转染 U251 细胞可见绿色荧光蛋白表达,12 h 后逐渐增多,24~48 h 达高峰,且稳定表达较长时间;24 h 后通过 qRT-PCR 检测到 mRNA 表达,Western blot 检测到 14×10^3 目的蛋白表达($P < 0.05$),其增殖能力明显增强($P < 0.01$),且引起细胞 G₁ 期减少,S 期增加($P < 0.05$)。**结论** 成功构建真核表达载体 pEGFP-N3-S100A9,转染到 U251 细胞后能有效上调 S100A9 基因的 mRNA 及蛋白的表达、促进细胞增殖。

[关键词] pEGFP-N3;S100A9;胶质瘤;基因转染

[中图分类号] R394.33;R730.23;R730.264

[文献标志码] A

Construction of S100A9 eukaryotic expression vector and its effect on proliferation of glioma cell line U251

Chen Song, Cheng Yuan, Liao Peng, Deng Jinmu (Department of Neurosurgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[Abstract] **Objective** To construct an eukaryotic expression vector of human S100A9 full length gene pEGFP-N3-S100A9 and to observe its effect on mRNA and protein expression of S100A9 and the proliferation of glioma cell line U251. **Methods** The full length gene of S100A9 (345 bp) was obtained by RT-PCR, and was inserted into pEGFP-N3 vector by gene recombination technique. After verified by restrictive enzyme digestion and PCR, the recombinant plasmids were transferred into U251 cells by liposome. Total RNA and protein were extracted in 24 h after transfection to detect the S100A9 expression by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blotting, respectively. The transfected U251 cells were continuously traced by fluorescent microscopy. The cell proliferation was analyzed by MTT assay, and the distribution of cell cycle was assessed by flow cytometry. **Results** The recombinant eukaryotic expression vector pEGFP-N3-S100A9 was successfully constructed, and the gene sequencing result suggested the S100A9 sequence was identical to that published in GenBank (NM-002965). Green fluorescence could be seen by fluorescence microscopy in 8 h after transfection and a peak appeared within 24–48 h. S100A9 mRNA was expressed and a 14×10^3 fusion protein was detected 24 h after transfection. The overexpression of S100A9 enhanced the cell proliferation significantly ($P < 0.01$), and the number of cells decreased at G₁ phase and increased at S phase ($P < 0.05$). **Conclusion** The eukaryotic expression vector pEGFP-N3-S100A9 is constructed and expressed successfully in U251 cells, and it can effectively increase the expression of S100A9 and enhance the proliferation of U251 cells.

[Key words] pEGFP-N3; S100A9; glioma; gene transfection

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30870723). Corresponding author: Cheng Yuan, E-mail: chengyuan023@yahoo.com.cn

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30870723)

[通信作者] 程远, E-mail: chengyuan023@yahoo.com.cn

S100A9 (Calgranulin B 蛋白, myeloid-related proteins 14) 属于钙结合蛋白 S100 蛋白家族成员, 具备多种生物学活性, 涉及蛋白质的磷酸化, 参与细胞骨架动态平衡, 调节钙离子稳态, 调节酶活性, 调节细胞生长分化, 参与炎症反应和细胞迁移等生物学功能^[1-2]。研究发现 S100A9 与多种免疫性疾病和肿瘤密切相关, 如系统性红斑狼疮、支气管哮喘、多发性硬化、食管癌、胃癌、卵巢癌等^[3-4]。本研究利用基因重组技术, 将 S100A9 全长基因插入到 pEGFP-N3 真核载体上, 成功构建了 pEGFP-N3-S100A9 真核表达载体, 然后转染 U251 胶质瘤细胞系, 观察 pEGFP-N3-S100A9 真核表达载体对 U251 胶质瘤细胞 S100A9 基因及蛋白的表达情况、细胞生长、增殖的影响, 为探索肿瘤治疗的新策略提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

pEGFP-N3 载体 (Clontech), Trizol RNA 提取液, RT-PCR 反转录试剂盒, 限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam* H I, T_4 DNA 连接酶, DNA 标准 (DL2000)、Wide Range DNA Marker (500 ~ 12 000), 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞均购自 TaKaRa 公司, DEPC (Sigma), DNA 凝胶回收试剂盒, 质粒 DNA 小量提取试剂盒 (Biotek), 转染试剂 LipofectamineTM 2000 (Invitrogen), 兔抗人 S100A9 抗体 (Santa Cruz)。

1.2 方法

1.2.1 目的基因 cDNA 的获得 从 GenBank 上查到 S100A9 (登录号 NM-002965) 序列, 应用 Primer Permier 5.0 软件设计 PCR 引物, 并由 TaKaRa 公司合成该引物。S100A9 引物上游: 5'-AAGCTTatgacttgcaaatgctc-3', 下游: 5'-GGATCCgggggtgccctccc-3'。其中大写字母为酶切位点, 在上游引物的 5'端加入 *Hind* III 酶切位点, 下游引物的 5'端加入 *Bam* H I 酶切位点。将 2×10^5 个细胞加入 1 ml Trizol 试剂中吹打均匀, 按照说明书上的步骤提取总 RNA, 之后逆转录成 cDNA。采用 RT-PCR 扩增目的基因, 条件如下: 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 35 s, 共 40 个循环, 72 °C 延伸 10 min。取扩增终产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳并切下目的条带, 根据胶回收试剂盒的说明从琼脂糖凝胶中回收并纯化 S100A9 的 cDNA 片段。

1.2.2 PCR 扩增产物的克隆和鉴定 经胶回收纯化的扩增产物和 pEGFP-N3 表达载体分别用 *Hind* III 和 *Bam* H I 进行酶切 (37 °C, 2 h 水浴), 经 1% 琼脂糖凝胶电泳后回收目的基因与载体片段。用 T_4 DNA 连接酶连接上述 2 个酶切产物, 16 °C 水浴过夜后转入 DH5 α 感受态细胞。37 °C 培养过夜, 经卡那霉素抗性筛选重组表达载体后, 挑取阳性菌落, 摇菌过夜后用提取重组质粒。由上海英骏生物技术有限公司完成对阳性克隆菌体的测序鉴定。

1.2.3 细胞系的培养与 pEGFP-N3-S100A9 表达载体转染 人脑胶质瘤细胞株 (U251) 采用含 1×10^4 U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素、10% 胎牛血清的 DF12 培养液, 在 37 °C、5% CO₂ 及饱和

湿度下培养, 隔天换液, 待细胞长至 80% ~ 90% 时, 用 0.02% EDTA 和 0.25% 胰酶消化, 按 1:1 传代。将 U251 胶质瘤细胞培养至对数生长期, 接种于 6 孔板, 当细胞密度为 50% 左右时, 用 LipofectamineTM 2000 进行转染。重组质粒量为 5 μ g/孔, LipofectamineTM 2000 为 10 μ l。加入 LipofectamineTM 2000 和质粒的混合液后, 细胞放置 37 °C, 5% CO₂ 细胞培养箱孵育, 4 h 后更换为含 10% 胎牛血清的 DF12 培养液, 继续培养 24 ~ 48 h, 荧光倒置显微镜下观察各个时间点的绿色荧光蛋白的表达。

1.2.4 qRT-PCR 检测转染细胞 mRNA 的表达 细胞转染 24 h 后, 提取总 RNA 并逆转录为 cDNA, 行 qRT-PCR 扩增 (7500 型 ABI, USA)。引物序列为: S100A9 上游引物 5'-CCTG-GACACAAATGCAGACAA-3', 下游引物 5'-CGTCACCCTCGTG-CATCTT-3'; 内参 GAPDH 上游引物 5'-CCACCCATGGCAAAT-TCC-3', 下游引物 5'-GATGGGATTTCCATTGATGACA-3'。扩增体系 (25 L): SYBR Green 12.5 μ l, ddH₂O 10 μ l, cDNA 1 μ l, 上游引物 0.5 μ l, 下游引物 0.5 μ l。反应条件: 95 °C 10 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环。

1.2.5 转染细胞荧光情况的观察 细胞转染后 4、8、12、24、48、72 h 于荧光倒置显微镜下观察绿色荧光的表达变化, 了解其转染基因后蛋白的表达情况。

1.2.6 融合蛋白的 Western blot 检测 细胞转染 24 h 后, 收集细胞, 用 PBS 洗 3 次, 加入细胞裂解缓冲液于冰上孵育 30 min, 之后 4 °C 离心, 12 000 \times g, 30 min, 收集上清液。BCA 法测蛋白浓度。分别配制分离胶 (12%) 和浓缩胶 (6%), 上样量为 50 μ g, 积层胶用 60 V, 分离胶用 80 V 行恒压电泳。5% 脱脂奶粉缓冲液稀释一抗, 4 °C 孵育过夜。次日用 PBST 溶液洗 PVDF 膜 3 次, 每次 15 min, 室温下标记山羊抗小鼠二抗并孵育 1 h, PBST 充分洗涤后, 在 Bio-Rad 凝胶成像仪下进行 ECL 发光行图像采集分析。GAPDH 为蛋白表达的内参。

1.2.7 MTT 法检测细胞增殖水平 转染 48 h 后, 以每孔 200 μ l (含细胞数 5×10^3) 接种于 96 孔板, pEGFP-N3-S100A9 质粒转染组与 pEGFP-N3 质粒转染对照组各设 5 个复孔。分别培养 1、2、3 d 后, 每孔加入 5 mg/ml MTT 20 μ l, 放入孵箱继续培养 4 h, 1 000 r/min 离心 5 min, 小心吸弃上清, 每孔加入 DM-SO 100 μ l, 振荡 10 min, 以充分溶解蓝色晶体, 酶标仪测定波长 570 nm 处的光密度值 $[D(570)]$, 实验重复 3 次。

1.2.8 流式细胞仪检测细胞周期相分布 U251 细胞经处理后, 收获 1×10^6 个细胞, PBS 洗涤, 70% 冰乙醇固定过夜, 加入 500 μ g/ml 碘化丙啶 (PI) 和 10 mg/ml 的 RNA 酶 A, 37 °C 避光染色 30 min, 流式细胞仪自动检测出每个细胞所处的细胞周期, 并分别计算出 G₀/G₁、S 期细胞所占的百分比。每组重复实验 5 次。

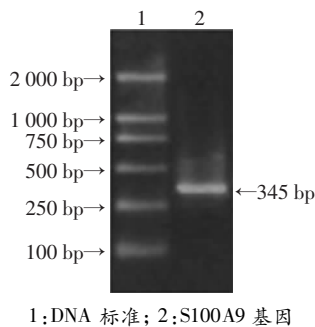
1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析及 2 个独立样本的 *t* 检验。

2 结果

2.1 S100A9 基因的扩增

总 RNA 提取并逆转录为 cDNA 后, 以其为模板行 PCR 扩增, 产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在约 345 bp 处可见明显的 DNA 条带, 大小与预期一致, 说明成功扩增了 S100A9 基因 (图 1)。



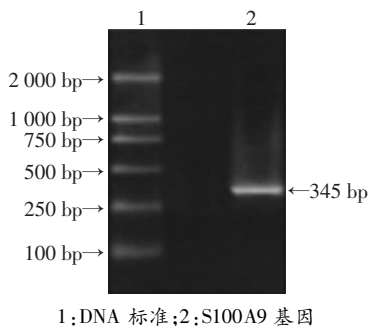
1:DNA 标准;2:S100A9 基因
图1 S100A9 基因 RT-PCR 扩增结果

2.2 S100A9 基因的测序鉴定

pEGFP-N3-S100A9 重组表达载体测定序列结果与 GenBank 的 S100A9 基因序列进行比较,证明所扩增序列完全正确。

2.3 pEGFP-N3-S100A9 表达载体的构建及鉴定

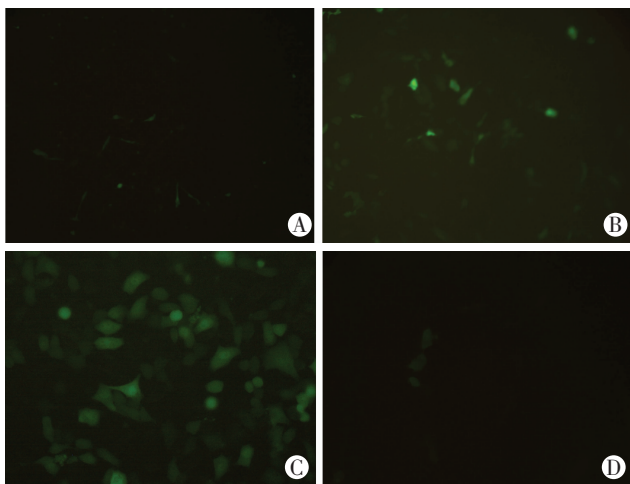
将 S100A9 基因片段与 pEGFP-N3 载体连接,构建 pEGFP-N3-S100A9 真核表达载体,并对其进行双酶切鉴定,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,在约 345 bp 处可见明显的目的条带,说明重组表达载体构建成功(图 2)。



1:DNA 标准;2:S100A9 基因
图2 pEGFP-N3-S100A9 的 PCR 结果

2.4 重组质粒转染 U251 胶质瘤细胞后绿色荧光观察

与未转染的细胞相比,转染 pEGFP-N3-S100A9 表达载体的 U251 细胞核内有绿色荧光蛋白的表达(图 3)。重组质粒转染后 4 h,在荧光倒置显微镜下观察未见明显绿色荧光产生,转染后 8 h 散在出现,12 h 明显增多,24~48 h 达高峰并稳定表达较长时间。而未转染质粒组不表达。

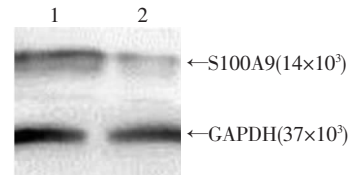


A:8 h;B:12 h;C:24 h;D:未转染质粒组

图3 重组质粒 pEGFP-N3-S100A9 转染不同时间后 U251 胶质瘤细胞绿色荧光变化 (荧光倒置显微镜 ×200)

2.5 Western blot 检测重组质粒转染后 S100A9 蛋白表达

pEGFP-N3-S100A9 转染 U251 细胞后 48 h,抽提总蛋白,Western blot 检测结果(图 4)显示,pEGFP-N3 质粒转染对照组的 U251 细胞中有少量 S100A9 表达,pEGFP-N3-S100A9 质粒转染组 S100A9 蛋白的表达量明显升高,其增加率为 $(214 \pm 38)\%$ 。



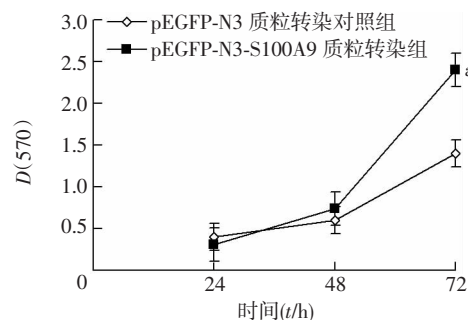
1: pEGFP-N3-S100A9 质粒转染组;2:pEGFP-N3 质粒转染对照组
图4 pEGFP-N3-S100A9 转染后 U251 细胞 S100A9 蛋白的表达

2.6 重组质粒转染后 qRT-PCR 分析

转染 24 h 后,pEGFP-N3-S100A9 质粒转染组、pEGFP-N3 质粒转染对照组经 PCR 扩增后电泳均得到一约 345 bp 长的扩增产物,与预期大小一致。pEGFP-N3 质粒转染对照组 U251 细胞内只检测到低水平扩增产物的泳出,pEGFP-N3-S100A9 质粒转染组可见较高水平扩增产物的表达,说明 pEGFP-N3-S100A9 基因能有效转染 U251 细胞并表达为 S100A9。S100A9 mRNA 的定量结果显示 pEGFP-N3-S100A9 质粒转染组转染 24 h 后,较 pEGFP-N3 质粒转染对照组 S100A9 mRNA 表达水平增加,其增加率为 $(290 \pm 22)\%$ (GAPDH 基因作为内参照),差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.7 S100A9 过表达对 U251 细胞增殖的影响

MTT 检测结果显示,转染了 pEGFP-N3-S100A9 质粒的 U251 细胞生长明显快于转染 pEGFP-N3 质粒的 U251 细胞,促进了细胞生长(图 5)。



a: $P < 0.05$,与 pEGFP-N3 质粒转染对照组比较

图5 pEGFP-N3-S100A9 转染对 U251 细胞增殖的影响

2.8 流式细胞仪检测 S100A9 过表达对 U251 细胞周期相分布的影响

流式细胞仪分析结果显示,与 pEGFP-N3 质粒转染对照组相比,pEGFP-N3-S100A9 质粒转染组 G_1 期所占比例减少,而 S 期细胞所占比例增加,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$,表 1)。

表1 转染后 48 h 2 组 U251 细胞的细胞周期变化 [$n=5$, ($\bar{x} \pm s$)%]

组别	G_1	S	G_2/M
pEGFP-N3 质粒转染对照组	42.51 ± 2.45	27.17 ± 3.2	30.32 ± 4.28
pEGFP-N3-S100A9 质粒转染组	23.89 ± 2.16^a	46.64 ± 1.26^a	29.47 ± 4.20

a: $P < 0.05$,与 pEGFP-N3 质粒转染对照组比较

3 讨论

胶质瘤是中枢神经系统常见的恶性肿瘤,其死亡率、复发率高。由于缺乏有效的治疗,恶性胶质瘤患者诊断后2年生存率不超过3%,因而对脑胶质瘤的研究仍是目前神经科的热点和难点。目前胶质瘤的治疗主要包括手术和化、放疗,均不能达到理想的效果,分子靶向技术为胶质瘤治疗提供了新思路。因此,从分子生物学方面研究神经胶质瘤的恶性进展成为新的延长患者生命的可行方法。

S100A9蛋白属于S100蛋白家族成员,常与S100A8通过化学结合形成异二聚体。其主要功能是抑制酪蛋白激酶I和II活性,生物学功能多涉及蛋白质的磷酸化,参与细胞骨架建立,调节钙离子稳态,调节酶活性,调节细胞生长分化,参与炎症反应等,成为新药靶标候选蛋白之一^[5-6]。S100A9起初是作为一个重要的炎症因子主要在感染和创伤中发现^[7],现在发现S100A9在肺腺癌、肝细胞癌、乳腺癌、结直肠癌、胃癌、前列腺癌、胰腺癌等多种原发和浸润性肿瘤中高表达^[8-12]。它们的表达及功能提示其在肿瘤的发生中起着至关重要的作用。我们在前期研究中采用iTRAQ技术结合2DLC-MS/MS蛋白组学方法对人U251胶质瘤细胞与人U251胶质瘤干细胞进行差异蛋白质组学比较,发现了S100A9在胶质瘤干细胞中表达特异,且已证实与胶质瘤的恶性程度明显相关。现在S100A9蛋白的生物学功能仍未十分明确,因此深入研究S100A9蛋白在肿瘤发生、发展中的生物学功能是必要而迫切的。

本实验利用基因重组技术,将S100A9基因插入到pEGFP-N3载体上,成功构建了pEGFP-N3-S100A9真核表达载体并经双酶切鉴定证实S100A9基因片段与表达载体的正确连接。通过PCR鉴定,可见约345 bp的S100A9基因表达,证明pEGFP-N3-S100A9真核表达载体成功构建。将其转染U251胶质瘤细胞后,在荧光倒置显微镜下可见细胞核内有绿色荧光蛋白表达,说明构建的表达载体能成功转染到细胞内并表达。随后我们采用MTT比色法检测S100A9过表达对U251细胞增殖的影响,结果表明,转染S100A9后U251细胞生长增快。细胞的增殖主要在于G₁期的长短,G₁期越长,细胞增殖越慢,相反G₁期越短细胞增殖越快。通过分析转染后48 h pEGFP-N3-S100A9质粒转染组与pEGFP-N3质粒转染对照组细胞周期的分

布情况,发现S100A9的加强表达可以使G₁期细胞减少,而S期细胞增多,因此我们推测S100A9过表达能使U251细胞周期分布发生改变,通过促使S期细胞增加,从而使细胞增殖能力增强。

本研究结果为今后进一步研究S100A9基因对细胞生物行为的影响及其在肿瘤发生、发展中的作用机制提供了一个有效的方法,并有望成为胶质瘤基因治疗的一个重要手段。

参考文献:

- [1] Carafoli E, Brini M. Calcium signalling and disease[M]. New York: Springer, 2007: 93 - 138.
- [2] Goyette J, Geezy C L. Inflammation-associated S100 proteins: new mechanisms that regulate function [J]. Amino Acids, 2011, 41(4): 821 - 842.
- [3] Yin L M, Jiang G H, Wang Y, et al. Use of serial analysis of gene expression to reveal the specific regulation of gene expression profile in asthmatic rats treated by acupuncture[J]. J Biomed Sci, 2009, 16: 46.
- [4] Gebhardt C, Nemeth J, Angel P, et al. S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer [J]. Biochem Pharmacol, 2006, 72(11): 1622 - 1631.
- [5] Donato R. RAGE: a single receptor for several ligands and different cellular responses: the case of certain S100 proteins [J]. Curr Mol Med, 2007, 7(8): 711 - 724.
- [6] Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins [J]. Microsc Res Tech, 2003, 60(6): 540 - 551.
- [7] Bjork P, Bjork A, Vogl T, et al. Identification of human S100A9 as a novel target for treatment of autoimmune disease via binding to quino-line-3-carboxamides [J]. PLOS Biol, 2009, 7(4): e97.
- [8] Kawai H, Minamiya Y, Takahashi N. Prognostic impact of S100A9 overexpression in non-small cell lung cancer [J]. Tumour Biol, 2011, 32(4): 641 - 646.
- [9] Nemeth J, Stein I, Haag D, et al. S100A8 and S100A9 are novel nuclear factor kappa B target genes during malignant progression of murine and human liver carcinogenesis [J]. Hepatology, 2009, 50(4): 1251 - 1262.
- [10] Yang W S, Moon H G, Kim H S, et al. Proteomic approach reveals FKBP4 and S100A9 as potential prediction markers of therapeutic response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer [J]. J Proteome Res, 2012, 11(2): 1078 - 1088.
- [11] Minami S, Sato Y, Matsumoto T, et al. Proteomic study of sera from patients with bladder cancer: usefulness of S100A8 and S100A9 proteins [J]. Cancer Genomics Proteomics, 2010, 7(4): 181 - 189.
- [12] Moon A, Yong H Y, Song J I, et al. Global gene expression profiling unveils S100A8/A9 as candidate markers in H-ras-mediated human breast epithelial cell invasion [J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(10): 1544 - 1553.

(收稿:2012-02-03;修回:2012-03-12)

(编辑 王小寒)