

肿瘤抑制基因 DOC-2 真核表达载体的构建及在卵巢癌细胞 HO-8910 中的表达鉴定

刘淑娟¹, 韩军涛², 辛晓燕¹, 吴元明³, 陈苏民³

Construction of The Eukaryotic Expression Vector pCDNA3.1-p93 and Its Expression in Ovarian Cancer Cell Line HO-8910

LIU Shurjuan¹, HAN Juntao², XIN Xiaoyan¹, WU Yuanming³, CHEN Surmin³

1. Department of Gynecology and Obstetrics, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China, 2. Burn unit, Xijing Hospital; 3. Biochemistry and Molecular Biology Institute

Abstract: **Objective** To construct a recombinant vector consisted of pCDNA3.1 with DOC-2 cDNA (p93) and transfect it into human ovarian cancer cell line HO-8910 in order to investigate the function of DOC-2 gene on ovarian cancer cell. **Methods** The recombinant vector (pCDNA3.1-p93) was constructed by *XhoI* and its correction was confirmed by restriction pattern. Then pCDNA3.1-p93 was transfected into HO-8910 by Lipofectamin and the positive clone 8910-p93 and 8910-pCDNA3.1 were selected by G418. Finally, the expression of DOC-2 in 8910-p93 was proved by immunocytochemical method. **Results** The recombinant vector pCDNA3.1-p93 was constructed successfully. After being transfected into HO-8910, the pCDNA3.1-p93 positive clone could be harvested by G418 and the steady expression of protein DOC-2 was confirmed by immunocytochemical method. **Conclusion** After the recombinant vector pCDNA3.1-p93 being constructed, DOC-2 gene could express steadily in HO-8910. This will allow us to study the function of DOC-2 gene in future.

Key words: DOC-2; Eukaryotic expression vector; Ovarian cancer

摘要: **目的** 构建肿瘤抑制基因 DOC-2 的真核表达载体 pCDNA3.1-p93, 将其转入人卵巢癌细胞系 HO-8910 中, 对其基因表达进行相关检测, 为进一步研究 DOC-2 的功能奠定基础。 **方法** 利用 *XhoI* 酶切含有 p93cDNA 的质粒得到 p93cDNA 基因片段, 将其接入真核表达载体 pCDNA3.1, 并通过酶切鉴定。用脂质体介导法将真核表达载体 pCDNA3.1-p93

收稿日期: 2005-01-25; 修回日期: 2005-06-01

基金项目: 陕西省自然科学基金资助项目 (2002C2-12)

作者单位: 1. 710032 西安, 第四军医大学西京医院妇产科, 2. 烧伤科; 3. 第四军医大学生物化学教研室

手术治疗过程中, 应该考虑由此带来患者机体免疫状态的变化。

众多的研究结果表明, 体内的 TH2 漂移将对机体的抗肿瘤免疫, 并能保护肿瘤细胞发生免疫逃逸及抑制 TH1 类细胞因子的产生。我们的研究也证实在肝癌患者的 PBMC 中也有 TH2 漂移, 并且这种 TH1/TH2 紊乱状态会随着肿瘤病程的发展而加重。而早期肝癌患者通过及时的手术治疗可改善体内的免疫状态。这可能为原发性肝癌的治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] 周丽英, 王凡, 黄强, 等. 脑胶质瘤细胞优势表达 TH2 类细胞因子的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2001, 17(4): 362-363.
- [2] Kharkevith D, Diseito-DI, Balch GC, et al. Characterization of antologous tumor-specific T-helper 2 cells in tumor-infiltrating lymphocytes from a patient with metastatic melanoma[J]. Int J cancer, 1994, 58(3): 317-323.
- [3] Ren Z, Pang G, Clancy R, et al. Shift of the gastric T-cell re-

sponse in gastric carcinoma [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2001, 16(2): 142-148.

- [4] 张筱茵, 陈咏仪, 等. 胃癌局部细胞因子表达谱分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2002, 24(1): 14-16.
- [5] 曹志新, 陈孝平, 吴在德, 等. 肝癌合并肝硬化患者脾脏 TH1/TH2 细胞因子免疫状态的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2001, 18(6): 518-519.
- [6] 杨兰泽, 高静, 等. 胃癌患者血清 IL-6、IL-8、sIL-2R 和 TNF- α 水平的检测分析[J]. 上海免疫学杂志, 2003, (23) 4: 224-275.
- [7] Cao ZX, Chen XP, Wu ZD. Changes of immune function in patients with liver cirrhosis after splenectomy combined with resection of hepatocellular carcinoma [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2003, 4(2): 562-565.
- [8] Tagawa M. Cytokine therapy for cancer[J]. Curr Pharm. Des, 2000, 6(6): 681-689.
- [9] Ishikawa M, Nishioka M, Hanaki N, et al. Hepatic resection induces a shift in the Th 1/2 balance toward Th2 and produces hypermetabolic and hyperhemodynamic states[J]. Hepatogastroenterology, 2004, 51(59): 1422-1427.

[编辑: 贺文]

转染 HO-8910,通过 G418 筛选稳定表达克隆;用免疫组化法观察人 DOC-2 蛋白在 HO-8910 中的表达。结果 构建了 DOC-2 的真核表达载体 pCDNA3.1-p93,并通过酶切鉴定。免疫细胞化学结果显示 pIRES2-EGFP-p93 成功转入 HO-8910 中。结论 成功构建了真核表达载体 pCDNA3.1-p93 并在 HO-8910 中得到稳定表达,为研究 DOC-2 蛋白的功能奠定了基础。

关键词:DOC-2;真核表达载体;卵巢癌

中图分类号:R737.31 文献标识码:A

文章编号:1000-8578(2006)01-0029-03

0 引言

卵巢癌是妇科肿瘤中最常见的恶性肿瘤,其发病机制与抑癌基因的关系一直是该领域研究的热点^[1]。1994 年 Mok 等^[2]在研究人正常卵巢上皮细胞与卵巢癌细胞的基因差异表达时,发现该基因在正常卵巢上皮细胞中有表达,而在卵巢癌细胞系及组织中无表达,故将其命名为 DOC-2 (Differentially expressed in ovarian cancer 2)。人类 DOC-2 位于染色体 5p13,长约 35kb,含有 15 个外显子和 14 个内含子,cDNA 共 3268bp,编码长度为 770 个氨基酸的蛋白质,分子量约为 82.5 kDa^[3]。DOC-2 是具有信号转导功能的新的磷蛋白,它能抑制多种肿瘤细胞的生长,被认为是一种可能的肿瘤抑制基因,但其作用机制尚未完全阐明。本研究中,我们构建了含有 DOC-2cDNA (p93)的真核表达载体,并转染人卵巢癌细胞系 HO-8910,为研究 DOC-2 在卵巢癌发生发展中的作用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料 质粒 pCDNA3.1(-)由本校生化教研室陈苏民教授惠赠;含有人 DOC2cDNA 的质粒 p93 由美国 Dr. Xu Xiangxi 惠赠;质粒转染试剂盒 (Lipofectamine 2000)购自 GIBCO 公司;质粒提取及胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司;限制性内切酶购自 GIBCO 公司;T4 DNA 连接酶购自华美生物工程公司;人卵巢癌 HO-8910 细胞系由妇产科实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 pCDNA3.1-p93 的构建 对 p93 质粒进行测序鉴定,证实 DOC2 cDNA 上游 23 位和下游 1154 位均有 XhoI 酶切位点。将 p93 质粒和 pCDNA3.1(-)质粒均行 XhoI 单酶切,回收连接于表达载体 pCDNA3.1 中。对重组载体 pCDNA3.1-p93 进行 XhoI 及 Bam HI 酶切鉴定。经鉴定的阳性克隆,提质粒,无水乙醇浓缩沉淀,并用紫外分光光度仪定量待转染用。

1.2.2 细胞的转染及阳性克隆筛选 按每瓶 4×10^5 个细胞接种于 35ml 培养瓶中,细胞达 80% 融合时,用无血清 DMEM 换液,备转染用。按 Lipofectamin2000 转染试剂盒说明将 pCDNA3.1-p93 质粒转入 HO-8910 细胞中(同时设空载体和空白对照)。转染 48h 后,向培养基中加入 G418 进行筛选,瓶中 G418 终浓度由 $100 \mu\text{g/L}$ 逐渐升至 $400 \mu\text{g/L}$,每 3d 提高 1 次浓度。

1.2.3 DOC2 在细胞中的表达 筛选出的阳性克隆经传代培养后取其第 3 代细胞,制备单细胞悬液,爬片固定,利用兔抗人 DOC-2 抗体^[4],以 DAB 为显色剂,按 ABC 反应试剂盒说明进行染色。

2 结果

2.1 重组质粒 pCDNA3.1-p93 的酶切鉴定 质粒经 Xho I 单酶切下大小约 2.2kb 片段,用 Bam HI 行单酶切下大小约 0.5kb 片段,证实 p93 片段正向插入 pCDNA3.1 载体中,构建成重组表达载体 pCDNA3.1-p93,见图 1。纯化后的质粒浓度测定 pCDNA3.1-p93 为 2.76g/L ,达到脂质体转染的要求。

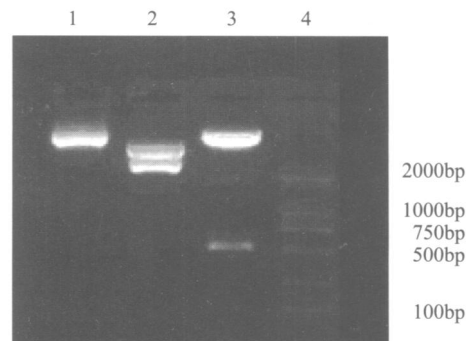


图 1 pCDNA3.1-p93 重组体的酶切鉴定图

注:1:pCDNA3.1-p93 重组体;2:pCDNA3.1-p93 重组体 XhoI 单酶切;3:pCDNA3.1-p93 重组体 Bam HI 单酶切;4:DL-2000

2.2 阳性克隆的筛选 G418 终浓度 0.4g/L 筛选 14d 后,空白对照瓶细胞全部死亡,p93 转染组和空载体转染组的细胞均有存活,并形成克隆。将 G418 浓度逐渐降至 0.15g/L ,待细胞逐渐长满后,进行传代、冻存,并将这种细胞命名为 8910-p93。

2.3 DOC2 在蛋白中的表达 免疫细胞化学染色结果显示,8910-p93 细胞胞浆内有 DOC2 蛋白的表达,呈棕黄色颗粒,而 HO-8910 和 8910-pCDNA3.1 细胞内均未检测到 DOC2 蛋白的表达。

3 讨论

DOC-2/DAB2 在正常组织中广泛存在,它能抑制多种肿瘤细胞系的生长,包括前列腺癌、肺癌、结肠癌、乳腺癌等^[5-10]。尤其在卵巢及乳腺中其表达

水平很高,对正常卵巢、良性、交界性及浸润性卵巢肿瘤的研究表明,DOC-2/DAB2 的表达在恶性卵巢肿瘤组织中下调,在起源于乳腺及卵巢上皮的肿瘤细胞系中,有 90% 的细胞系用 Western blot 的方法无法检测到 DOC-2/DAB2 的表达^[10,11],这些结果显示,DOC-2/DAB2 可能是人上皮性卵巢癌中潜在的一个抑癌基因,并且可能在卵巢肿瘤的形成中起重要作用。对人卵巢组织的免疫定位研究表明 DOC-2/DAB2 主要于卵巢表面上皮层高表达,但 DOC-2/DAB2 表达的缺失与肿瘤分级无关,提示 DOC-2/DAB2 表达缺失是肿瘤发生的早期步骤^[11]。此外研究发现,DOC-2/DAB2 的缺失也发生于高度增生但组织类型为良性的上皮细胞,说明其与卵巢上皮细胞形态学上的转化密切相关,它的发生出现于恶性变前阶段。

本研究中,pCDNA3.1 为真核表达载体,具有表达克隆化 cDNA 所需的启动子、增强子、加 poly(A) 信号等调控元件,及 SV40 病毒复制子、G418 筛选标记基因等序列,是一个高效真核表达载体,为了便于基因操作,多克隆位点有正反两套酶切位点,本实验采用的是 pCDNA3.1(-) 载体。我们对 p93 质粒进行测序,结果证实我们所需的 DOC2cDNA (p93) 位于该载体的多克隆位点中,上游 23 位有 Xho I 酶切位点,下游 100 位有 Hind III、137 位有 SmaI、154 位有 Xho I 酶切位点。为了将 p93 克隆入 pCDNA3.1(-) 真核表达载体中,并且保证 DOC2cDNA 读框正确,只能选择 Xho I 位点行单酶切后进行连接反应。为证实 p93 正向克隆入载体中,我们选择了 DOC2cDNA 第 2311 位 Bam HI 酶切位点,同时选择 pCDNA3.1(-) 多克隆位点中 Bam HI 酶切位点,由于 Xho I 位点在这个载体中位于 Bam HI 上游,故正向克隆在经 Bam HI 单酶切后应切下大小约 0.5 kb 片段,而反向克隆则应切下大小约 2.3 kb 片段。实验结果证实我们成功的克隆了 pCDNA3.1-p93 重组表达载体。

目的基因的有效转移及其在靶细胞中的表达是基因治疗研究中必不可少的条件。本实验采用的是脂质体介导的基因转移法,它转染效率高,可直接在含血清的培养基中转染,简便快速。基因转染的关键是要有一定纯度的质粒 DNA 分子,并将其与脂质体按合适比例混合。因此我们将 pCDNA3.1-p93 质粒纯化,并进行了纯度测定。转染时,我们选用健

康且增殖良好的细胞,经规律传代后,在细胞融合约 80% 时进行转染,从而保证了转染的可靠性。由于重组载体中含有 neo 抗性基因,实验中,G418 浓度由 100 μ g/L 逐渐升至 400 μ g/L,并在 400 μ g/L 的浓度下筛选 14 天后,空白对照组细胞全部死亡,而转染空载体和 pCDNA3.1-p93p 的细胞仍有存活,并形成克隆,即转染成功的细胞。为进一步确定这一点,我们对阳性克隆传代后的第 3 代细胞进行了免疫细胞化学染色鉴定,结果不仅证实了 DOC2 已成功转入 HO-8910 中,且在其传代过程中得到稳定表达。

外源性 DOC2 蛋白在卵巢癌细胞中的表达为进一步研究其对细胞生物学特性的影响提供了条件。

参考文献:

- [1] 郭东平,陈惠祯,龚玲玲. 卵巢癌 p53 蛋白表达与细胞增殖状态及预后的关系[J]. 肿瘤防治研究, 2003,30(4):294-295.
- [2] Mok SC, Wong KK, Chan RKW, et al. Molecular cloning differentially expressed genes in human epithelial ovarian cancer [J]. Gynecol Oncol, 1994,52(2):247-252.
- [3] Sheng Z, He J, Tuppen JA, et al. Structure, sequence and promoter analysis of human disabled-2 gene (DAB2) [J]. Genomics, 2000,70(3):381-386.
- [4] 刘淑娟,辛晓燕,韩军涛,等. 兔抗人 DOC-2 抗血清的制备与鉴定[J]. 免疫学杂志, 2004,20(6):465-467.
- [5] Zhou J, Scholes J, Hsieh J T. Characterization of a novel negative regulator (DOC-2/DAB2) of c-Src in normal prostatic epithelium and cancer[J]. J Biol Chem, 2003,278(9):6936-6941.
- [6] Chen H, Toyooka S, Gazdar AF, et al. Epigenetic regulation of a novel tumor suppressor gene (hDAB2IP) in prostate cancer cell lines[J]. J Biol Chem, 2003,278(5):3121-3130.
- [7] Yano M, Toyooka S, Tsukuda K, et al. Aberrant promoter methylation of human DAB2 interactive protein (hDAB2IP) gene in lung cancers[J]. Int J Cancer, 2005,113(1):59-66.
- [8] Kleeff J, Huang Y, Mok SC, et al. Down-regulation of DOC-2 in colorectal cancer points to its role as a tumor suppressor in this malignancy[J]. Dis Colon Rectum, 2002,45(9):1242-1248.
- [9] Dote H, Toyooka S, Tsukuda K, et al. Aberrant promoter methylation in human DAB2 interactive protein (hDAB2IP) gene in gastrointestinal tumor [J]. Br J Cancer, 2005,28:92(6):1117-1125.
- [10] Dote H, Toyooka S, Tsukuda K, et al. Aberrant promoter methylation in human DAB2 interactive protein (hDAB2IP) gene in breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2004,10(6):2082-2089.
- [11] He J, Xu J, Xu XX, et al. Cell cycle-dependent phosphorylation of Disabled-2 by cdc2[J]. Oncogene, 2003,22(29):4524-4530.

[编辑:周永红]