

PTEN 表达载体的构建及转染食管鳞癌细胞系 EC9706

侯桂琴,鲁照明,薛乐勋,田芳,范天黎,刘兰琦,许培荣

Construction of a Vector for Stable Expression of PTEN in Esophageal Squamous Cell Cancer Cell Line

HOU Gui-qin, LU Zhao-ming, XUE Le-xun, TIAN Fang, FAN Tian-li, LIU Lan-qi, XU Pei-rong
Laboratory for Cell Biology, The First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Corresponding Author: XUE Le-xun, E-mail: lxxue@public2.zz.ha.cn

Abstract :Objective To establish stable expression cell line transfected with eukaryotic expression vector of PTEN. **Methods** To clone the wild-type PTEN gene, total RNA was isolated from human placenta tissues. A cDNA of human PTEN was obtained by optimized RT-PCR and sequenced, and then the cDNA fragment was put into the eukaryotic expression plasmid pcDNA 3.1 (+) to construct pcDNA 3.1-PTEN. Cells of esophageal squamous cell cancer cell line EC9706 were transferred with pcDNA 3.1-PTEN using lipofectamine. The stable expression cells were screened by G418. RT-PCR and growth curve were done for identifying the screened cells. **Results** The cDNA fragment produced by RT-PCR had 100 % homology with wild-type PTEN gene sequence on GenBank by BLAST. The mRNA level of PTEN increased notably in the cell line we screened, and the growth of the cell line was very solely compared with control cell lines. **Conclusion** Because of cells of esophageal squamous cell cancer which stably express PTEN were successfully screened, it is concluded that a PTEN eukaryotic vector for stable expression in esophageal squamous cell cancer cell line has been constructed.

Key words: PTEN; Esophageal cancer; mTOR; Transfection

摘要:目的 筛选稳定表达野生型 PTEN 基因的食管鳞癌细胞株 EC9706。方法 提取胎盘总 RNA,设计引物,PCR 扩增人野生型 PTEN 基因,经测序鉴定后,连接于 pcDNA 3.1 (+) 真核表达载体,构建 pcDNA 3.1-PTEN,用脂质体介导的方法将其转染 EC9706。而后加抗生素 G418 筛选稳定表达株,用 RT-PCR 方法检测稳定表达株 PTEN 基因的 mRNA 水平,通过绘制生长曲线观察细胞生长情况。结果 PCR 产物的电泳结果显示,在 1 500bp 左右有一明显亮带,测序结果与 GenBank 上 PTEN 序列完全一致;稳定表达 PTEN 基因的细胞株 RT-PCR 结果显示,PTEN 的 mRNA 水平比对照细胞株相比明显升高;生长曲线结果显示,转染后的细胞生长速度明显减慢。结论 所扩基因为野生型 PTEN 基因,所构建的载体为野生型 PTEN 基因真核表达载体,并筛选出 PTEN 基因稳定表达的食管鳞癌细胞株。

关键词: PTEN; 食管鳞癌; mTOR; 转染

中图分类号: R735.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2007)03-0178-04

0 引言

mTOR(Mammalian target of rapamycin)是一种进化上高度保守的丝/苏氨酸蛋白酶。越来越多的证据显示, mTOR 信号转导在细胞的生存、生长与增殖中起中心调控作用,其通路的异常与多种恶

性肿瘤有关^[1],已成为肿瘤治疗的新靶点^[2,3],雷帕霉素是 mTOR 的特异性抑制剂^[4]。抑癌基因 PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10)是 1997 年发现并被克隆的第一个具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因,并被证实与十几种人类肿瘤的恶性增殖和转移有关^[5]。据报道,PTEN 的缺失或突变可以使 mTOR 信号通路异常激活^[6,7]。目前国内对 PTEN 的研究仅集中在肿瘤中 PTEN 蛋白的表达情况,PTEN 基因突变检测及 PTEN 基因的抑癌效果方面^[8,9],而其表达水平变化对 mTOR 通路的影响及其引起的细胞对雷帕霉素敏感性的变化在国内外均未见报道。由于河

收稿日期:2006-05-15;修回日期:2006-08-28
基金项目:教育部“十五”211 工程“重点学科建设项目(教重字[2002]第 2 号)
作者单位:450052 郑州大学细胞生物研究室,郑州大学第一附属医院
通讯作者:薛乐勋,E-mail:lxxue@public2.zz.ha.cn
作者简介:侯桂琴(1977-),女,博士,主要从事肿瘤分子生物学的研究

南省是食管癌的高发区,故本研究以食管鳞癌为研究对象,从胎盘中克隆野生型 PTEN 基因,构建真核表达载体并转染食管癌细胞,筛选出稳定的表达株,为进一步研究 PTEN 与 mTOR 通路之间的关系提供了很好的实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株及组织 人食管鳞癌细胞株 EC9706 由本校病理教研室提供;正常人胎盘组织来源于河南省人民医院妇产科,液氮保存。

1.1.2 载体与宿主菌 pcDNA 3.1(+)载体购自 Invitrogen 公司,pMD18-T 载体购自大连宝生物公司;大肠杆菌 JM109 由本室保存。

1.1.3 酶及试剂 内切酶及试剂盒购自大连宝生物(TaKaRa)公司;DNA marker、IPTG、X-gal 购自上海生物工程公司;G418 为 Sigma 公司产品。

1.1.4 培养基 RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清购自 Gibco 公司,含 Amp 的 LB(LA)培养基本室配制。

1.1.5 引物 根据 GenBank 上登录的人野生型 PTEN 及 Actin 序列用 Primer Premier 5.0 软件设计三对引物。

引物 1:PTEN 全序列扩增引物:上游 P1 5' AAGCTT ATG ACA GCC ATC ATC AAA GAG AT 3',含 Hind 酶切位点,下游 P2 5' GGA TCC GGA ATA AAA CGG GAA AGT GCC 3',含 BamH 酶切位点,下划线部分为相应酶切位点,序列全长为 1 512bp;

引物 2:PTEN 的 RT-PCR 检测引物:上游 P11 5' TTG AAG ACC ATA ACC CAC CA 3' 下游 P22 3' GGT CAG TCT CCG CGA TAC AC 5' 长度为 257bp;

引物 3:内参 Actin 基因引物:上游 AP1:5' ACC AAC TGG GAC GAC ATG GAG AAA ATC 3', 下游 AP2:5' GTA GCC GCG CTC GGT GAG GAT CTT CAT 3',长度为 409bp。引物均由北京奥克生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 胎盘总 RNA 的提取 将约 50mg 液氮保存的胎盘组织剪碎,然后按 Trizol 试剂说明书提取总 RNA。

1.2.2 PTEN 基因的 RT-PCR 扩增 根据 TaKaRa 一步法 RNA PCR Kit 说明书进行,反应体系 50 μ l。RT-PCR 扩增条件:50 30min,94 2min;94 30sec,52 30sec,72 6min,共 35 个

循环;继之 72 延伸 10min,4 终止。结束后取 5 μ l 产物电泳检测。

1.2.3 PTEN 基因的克隆及鉴定 回收 PCR 产物并与 T 载体连接,构建重组质粒 pMD18-PTEN,转化感受态大肠杆菌 JM109,37 过夜培养。随机挑取白色菌落,接种于 LA 液体培养基中,37 震荡过夜培养。提质粒,Hind 和 BamHI 37 双酶切,酶切产物进行电泳鉴定。酶切鉴定正确的质粒测序。

1.2.4 真核表达载体的构建及鉴定 把经测序鉴定正确的重组质粒用 Hind 和 BamH 双酶切,回收约 1.5kb 的 PTEN 片段;同样用 Hind 和 BamH 双酶切 pcDNA 3.1(+)载体,回收大片段。连接两片段并转化感受态大肠杆菌 JM109,过夜培养,挑克隆,提质粒,双酶切鉴定。然后用无内毒素质粒提取试剂盒提取鉴定正确的质粒备用。

1.2.5 细胞培养 食管鳞癌细胞株 EC9706 用含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基于 37、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。

1.2.6 转染 接种细胞于 24 孔板中培养,当细胞达 80%~90%融合时,按 Lipofectamine™ 2000 说明,把 pcDNA 3.1-PTEN 转染 EC9706,以转染 pcDNA 3.1(+)空载体及不转染细胞为对照。培养 24h 后按 600 μ g/ml 加入 G418 筛选阳性细胞克隆。

1.2.7 检测转染细胞中 PTEN 水平 培养阳性细胞克隆,提取细胞总 RNA,RT-PCR 检测转染细胞中 PTEN 水平变化。

1.2.8 生长曲线绘制 稳定生长的阳性细胞克隆按 1 \times 10⁴/孔接种于 24 孔板中,每天取 3 个复孔进行计数,共计 7 天,绘制生长曲线。

1.2.9 统计学处理 数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行单因素方差分析(ANOVA);抑制率 = (处理孔细胞计数值-对照孔细胞计数值)/对照孔细胞计数值,t 检验,在 SPSS 13.0 上完成。

2 结果

2.1 胎盘总 RNA 及 PCR 扩增结果 总 RNA 电泳结果显示,提取的 RNA 较完整,见图 1。PCR 扩增结果显示,在约 1.5kb 处有一明显亮带,见图 2。

2.2 阳性克隆鉴定及测序结果分析 阳性质粒用 BamHI 和 HindIII 双酶切鉴定如图 3 显示,四个质粒均有大小正确的插入片段,测序结果与 GenBank 上人野生型 PTEN 基因序列完全相同。

2.3 筛选阳性细胞株 转染的食管鳞癌细胞培养 24h 后加 600 μ g/ml G418 进行筛选,2~3 天更换 1 次新鲜培养基,继续加 G418 筛选,至正常细胞全部死亡后停止筛选,两株转染细胞还有少数存活,即为阳

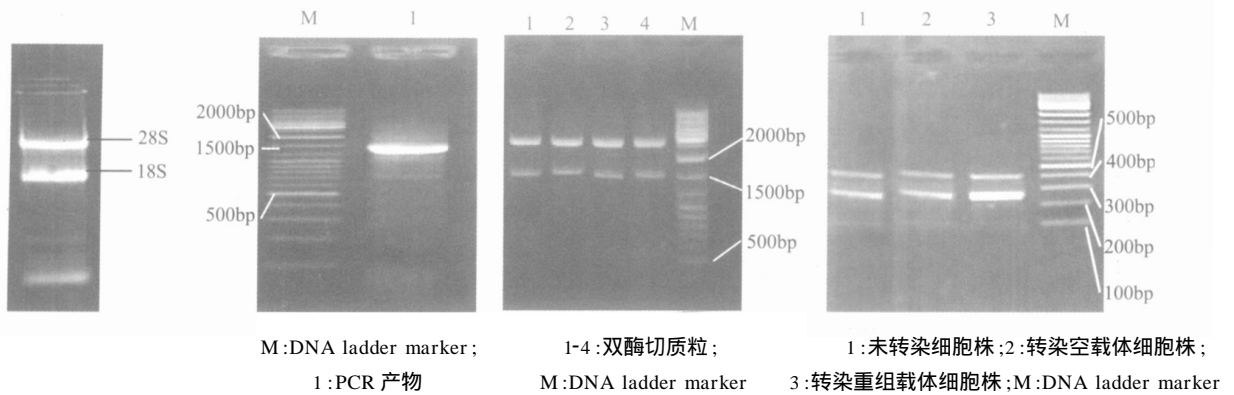


图 1 胎盘总 RNA 的电泳结果

图 2 PTEN 基因的 RT-PCR 结果

图 3 阳性质粒双酶切结果

图 4 三种细胞株 PTEN 及 Actin 基因的 RT-PCR

性细胞。挑取阳性单克隆细胞至新培养孔中,低浓度 G418 (200 μ g/ml) 维持培养。

2.4 RT-PCR 结果 与转染前的细胞相比,转染 PTEN 的细胞 mRNA 水平明显升高,而转染空载体的细胞无明显变化,见图 4。内参为 Actin,大小为 409bp。

2.5 生长曲线 与未转染细胞相比,转染细胞生长速度明显减慢,而转染 PTEN 的细胞生长速度最慢,见图 5。细胞计数结果及统计学处理,见表 1。

转空载体及重组载体在不同时间对细胞的抑制率见表 2。经 *t* 检验,转空载体细胞和转 PTEN 重组质粒载体的细胞在第 3 天抑制率在统计学上无差异 ($P > 0.05$);从第 4 天开始,2 组间的细胞生长抑制率有明显差异 ($D4 \sim 7$ 均 $P < 0.01$),即与转空载体细胞比较,转 PTEN 重组质粒载体的细胞生长明显受抑制。

3 讨论

抑癌基因 PTEN 作为迄今为止发现的第一个具有磷酸酶活性的抑癌基因,在十几种恶性肿瘤中广泛存在突变^[10],自发现以来一直是研究的热点。

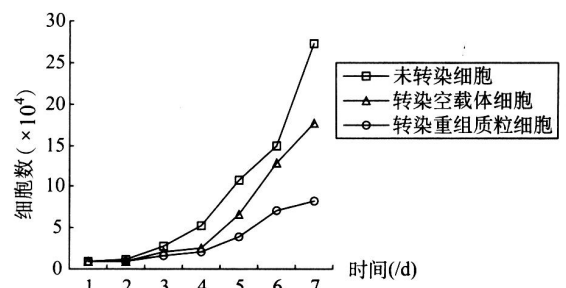


图 5 三种细胞株的生长曲线图

mTOR 又叫 FRAP、RAFT1 或 RAPI,是新发现的蛋白激酶家族中的一员,在由磷酸肌醇激酶 3 (PI3K)/Akt 传导通路介导的增生信号的传导中起重要作用。多数肿瘤中存在 PTEN 的缺失或突变,而 PTEN 的缺失或突变又可引起 mTOR 异常激活^[11,12]。

从本试验结果可以看出,PCR 扩增 PTEN 全序列的条带非常特异,而测序结果也表明所克隆的片段为野生型 PTEN 基因。根据转染细胞 PTEN 的 RT-PCR 结果,可以看出在转染 PTEN 的细胞中,PTEN 的水平有了显著的升高,生长曲线图显示,转 PTEN 细胞比转空载体细胞及未转染细胞的生长速

表 1 三种细胞株计数结果及 F 值

组别	D1 细胞株	D2 细胞株	D3 细胞株	D4 细胞株	D5 细胞株	D6 细胞株	D7 细胞株
1 组	1.00 \pm 0.00	1.05 \pm 0.02	2.41 \pm 0.06	4.83 \pm 0.07	9.36 \pm 0.08	13.63 \pm 0.17	23.73 \pm 0.93
2 组	1.00 \pm 0.00	1.03 \pm 0.02	1.47 \pm 0.22	3.35 \pm 0.26	7.27 \pm 0.26	7.41 \pm 0.32	14.51 \pm 0.34
3 组	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.01	1.08 \pm 0.13	1.61 \pm 0.33	2.94 \pm 0.61	4.59 \pm 0.45	6.54 \pm 0.40

注:1 组代表未转染细胞株;2 组代表转染空载体细胞株;3 组代表转染重组载体的细胞株;从第 3 天开始,经单因素方差分析,3 组间细胞计数有明显差异 ($P < 0.001$)

表 2 3~7d 转空载体细胞株和转重组载体细胞株的抑制率

组别	第 3 天			第 4 天			第 5 天			第 6 天			第 7 天		
	抑制率 (%)	<i>t</i>	<i>P</i>	抑制率 (%)	<i>t</i>	<i>P</i>	抑制率 (%)	<i>t</i>	<i>P</i>	抑制率 (%)	<i>t</i>	<i>P</i>	抑制率 (%)	<i>t</i>	<i>P</i>
2 组	38.94 \pm 7.57			30.50 \pm 6.27			22.37 \pm 2.15			45.62 \pm 1.75			38.79 \pm 3.48		
3 组	54.87 \pm 6.62	2.744	0.052	70.18 \pm 10.02	5.817	0.004	73.48 \pm 11.46	7.590	0.002	70.69 \pm 7.94	5.342	0.006	74.39 \pm 5.90	9.004	0.001

注:本表中 2 组和 3 组第 3~7 天的抑制率按照公式[抑制率 = (处理孔细胞计数值-对照孔细胞计数值)/对照孔细胞计数值]计算得出。2 组代表转空载体细胞株;3 组代表转重组载体细胞株

度明显减慢(从第 3 天开始 $P < 0.001$)。我们推测,转染细胞中 PTEN 蛋白表达确实对细胞生长起抑制作用,说明野生型 PTEN 已成功转入食管鳞癌细胞中。

总之,本试验克隆了人野生型 PTEN 基因并导入食管鳞癌细胞中,成功筛选出 PTEN 稳定表达株,且 PTEN 蛋白对细胞生长有抑制作用。由于食管鳞癌在河南的发病率高,并且 PTEN 在食管癌中的研究已取得了一定进展^[13],本研究筛选出的稳定表达株为进一步研究食管癌细胞中 PTEN 蛋白表达水平对 mTOR 通路的影响提供了实验依据,也为从分子水平上治疗食管癌奠定了基础。

致谢:本研究在河南省分子医学重点学科开放实验室完成

参考文献:

- [1] Kim JE, Chen J. Cytoplasmic-nuclear shuttling of FKBP-12-rapamycin-associated protein is involved in rapamycin-sensitive signaling and translation initiation[J]. Proc Natl Acad Sci, USA, 2000, 97(26):14340-14345.
- [2] Gera JF, Mellinghoff IK, Shi Y, et al. AKT activity determines sensitivity to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors by regulating cyclin D1 and c-myc expression[J]. J Biol Chem, 2004, 279(4):2737-2746.
- [3] Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy[J]. Nature Rev, 2004, 4(5):335-348.
- [4] Tolcher AW. Novel therapeutic molecular targets for prostate cancer: the mTOR signaling pathway and epidermal growth factor receptor[J]. J Urol, 2004, 171(2 Pt 2):S41-S44.
- [5] Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast and prostate cancer[J]. Science, 1997, 275(5308):1943-1947.
- [6] Neshat MS, Mellinghoff IK, Tran C, et al. Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR[J]. Proc Natl Acad Sci, USA, 2001, 98(18):10314-10319.
- [7] De Graffenried LA, Fulcher L, Friedrichs WE, et al. Reduced PTEN expression in breast cancer cells confers susceptibility to inhibitors of the PI3K kinase/Akt pathway[J]. Ann Oncol, 2004, 15(10):1510-1516.
- [8] 肖绍文,谢小薰,陈维平,等. 脑肿瘤中 pten/MMAC1/Tep1 蛋白的表达[J]. 中国肿瘤, 2000, 9(7):332-333.
- [9] 徐寿水,沈文律. 转 PTEN 基因对人结肠癌细胞的抑制作用[J]. 肿瘤防治研究, 2005, 32(4):202-205.
- [10] Sulis ML, Parsons R. PTEN: from pathology to biology[J]. Trends Cell Biol, 2003, 13(9):478-483.
- [11] De Graffenried LA, Friedrichs WE, Russell DH, et al. Inhibition of mTOR activity restores tamoxifen response in breast cancer cells with aberrant Akt activity[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(23):8059-8067.
- [12] Levitt RJ, Georgescu MM, Pollak M. PTEN-induction in U251 glioma cells decreases the expression of insulin-like growth factor binding protein-2[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 336(4):1056-1061.
- [13] Ding Y, Shimada Y, Kano M, et al. PTEN/MMAC1 expression in esophageal squamous cell carcinomas[J]. Int J Oncol, 2000, 17(4):695-699.

[编辑:刘红武]