

S100A11 慢病毒表达载体的构建及其在肝癌细胞中的表达

刘德勇¹, 张庆丽¹, 龙晓兰², 彭和人¹, 谢海龙²

(1. 湖南环境职业技术学院病理教研室, 湖南 衡阳 421005; 2. 南华大学肿瘤研究所)

摘要: **目的** 构建 S100A11 基因慢病毒表达载体, 建立 Huh-7 S100A11 稳定细胞株, 并鉴定其表达。 **方法** RT-PCR 扩增 S100A11 基因片段, 与 pWPT 载体经 Mlu I 和 Not I 同时酶切后连接, 构建慢病毒表达载体 pWPT-S100A11; 将表达载体 pWPT-GFP 和 pWPT-S100A11 与慢病毒包装质粒 pMD2. G 和 psPAX2 共同感染 293T 细胞, 获得携带 GFP 和 S100A11 基因的慢病毒, 将两种慢病毒分别感染 Huh-7 细胞, 获得 Huh-7 S100A11 和 Huh-7GFP 稳定细胞株; 利用 Real-Time PCR 和 Western Blotting 实验方法检测感染后 S100A11 的过表达情况。 **结果** 成功构建慢病毒表达载体 pWPT-S100A11; 慢病毒感染 Huh-7 细胞株后, 阳性对照 Huh-7GFP 经荧光镜检测传染率达 95%; 感染 Huh-7 细胞后 S100A11 的 mRNA 和蛋白表达量均增加。 **结论** 成功构建慢病毒表达载体 pWPT-S100A11, 并建立了 Huh-7 S100A11 稳定细胞株, 为进一步研究 S100A11 基因在肝癌中的生物学功能和机制奠定了基础。

关键词: S100A11; Huh-7 细胞; 慢病毒载体

中图分类号: R735.7 文献标识码: A

Construction of Lentivirus Vector S100A11 and its Expression in Hepatoma Cells

LIU Deyong, ZHANG Qingli, LONG Xiaolan, et al

(Institute of Pathology, Hunan Polytechnic of Environment and Biology, Hengyang, Hunan 421005, China)

Abstract: **Objective** To construct lentiviral vector carrying S100A11 gene and infected Huh-7 cells, and detect the expression of S100A11. **Methods** S100A11 gene was obtained by RT-PCR, and then cloned into the lentiviral vector pWPT digested by Mlu I and Not I to construct lentiviral vector pWPT-S100A11. The vector pWPT-GFP and pWPT-S100A11 with pMD2. G and psPAX2 co-infected 293T cells to get the recombinant lentivirus carrying GFP and S100A11 genes. The recombinant lentivirus carrying GFP and S100A11 were used to infect Huh-7 cells respectively. The expression of S100A11 in Huh-7 cells was detected by Real-Time PCR and Western blotting. **Results** The recombinant lentivirus expression vector pWPT-S100A11 has been successfully constructed. The efficiency of recombinant lentivirus transfection reached to 95% under the green fluorescent. The mRNA and protein of S100A11 expression were all increased in Huh-7 cells after infection. **Conclusion** pWPT-S100A11 and Huh-7 S100A11 cells will be used in studying the function and mechanism of S100A11 in hepatic carcinomas.

Key words: S100A11; Huh-7 cells; lentiviral vectors

我国是原发性肝癌的高发区, 死亡率居恶性肿

瘤第二位, 复发转移是肝癌死亡的主要原因^[1]。目前肝癌的主要治疗方法是分子靶向治疗、化疗栓塞治疗、肝癌规范化治疗等^[2-3]。S100 钙结合蛋白 A11 (S100A11) 是 S100 家族的重要成员之一^[4]。研究发现 S100A11 与肿瘤的发生和转移密切相关, 在结肠癌、胰腺癌等恶性肿瘤中高表达, 尤其是在肝癌中, S100A11 高表达能促进肝癌的侵袭和迁移^[5-8]。

收稿日期: 2014-06-22

基金项目: 湖南省教育厅湖南省高校科研项目 (No. 12C1051), 衡阳市科技局计划项目 (2012KJ34)。

作者简介: 刘德勇, 硕士, 讲师, 研究方向: 肿瘤治疗, E-mail: 1171dy@163.com. 通讯作者: 谢海龙, 教授, 研究方向: 肿瘤发生、发展和防治的机制, E-mail: Xhl0078@sina.com.cn.

因此, S100A11 可作为肝癌潜在的治疗靶点。本研究通过慢病毒感染建立 Huh-7 S100A11 稳定细胞株, 为肝癌的侵袭和迁移机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

293T 细胞购自中国科学院上海生化细胞所; Huh-7 细胞购自 ATCC 细胞库; Huh-7EGFRvIII 细胞由本实验室构建保存。3 种细胞均用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 在 37 °C 5% CO₂ 的条件下培养。

1.2 材料和试剂

限制性内切酶、DNA Marker、Taq DNA 聚合酶、Real-Time PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司; dNTP 购自 Sangon 公司; 胎牛血清、DMSO、DMEM 均购自 Gibco 公司; 6 孔板、冻存管、细胞培养皿购自 Corning 公司。T-PER 组织蛋白裂解液、BCA 蛋白分析试剂盒和 Lumi-phosWB 发光底物均购自 Pierce 公司; DNA 提纯试剂盒购自 Axygen 公司; HRP 标记的羊抗兔和羊抗鼠 IgG 抗体由上海康城公司生产; S100A11 抗体购自 abcam 公司; 慢病毒包装质粒 pWPT、pAX2、pMD2. G 由日内瓦大学 T. Didier 博士馈赠。所用引物均在上海 Invitrogen 公司合成。

1.3 慢病毒表达载体质粒构建及鉴定

提取细胞总 RNA: Huh-7EGFRvIII 细胞于 6cm 培养皿中, 37 °C 5% CO₂ 培养箱中常规培养。待细胞生长至 90% 左右, PBS 洗细胞 2 次, 加入 1 mL Trizol, 充分吹打后移至 1.5 mL EP 管中; 加入 0.2 mL 氯仿, 剧烈振荡 15s, 在室温下孵育 5 min, 12 000 g 离心 15 min; 将上清移至新的 EP 管中, 加入 0.5 mL 异丙醇, 在 -20 °C 条件下孵育 20 min, 4 °C, 12, 000 g 离心 10 min; 去上清, 加入 1 mL 75% 乙醇, 4 °C, 7500 g 离心 5 min; 室温干燥 20 min, 用 DEPC 水处理后的 H₂O 溶解, 分光光度计定量 RNA。

逆转录: 提取的细胞总 RNA 取 1 μL 与 Oligo dT (10 μmol/L) 1 μL 混合, 72 °C 孵育 5 min, 然后置于冰上 5 min; 之后加入 15 μL 反转录混合液 (6.1 μL Nuclease-free H₂O, 4 μL 5 × RT Buffer, 1 μL 10 mmol/L dNTPs, 2.2.4 μL 25 mmol/L MgCl₂, 1 μL Improm-II™ Reverse Transcriptase, 0.5 μL Rnase Ribonuclease Inhibitor), 分别于 25 °C 孵育 5 min, 42 °C 孵育 1 h, 70 °C 孵育 15 min, 获得 cDNA。

PCR: GenBank 查找 S100A11 基因序列, 设计并

合成引物: S100A11-F: 5'CGacgcgtgccgc CATGGCAAA AATCTC CAGCC3'; S100A11-R: 5'ATAAGAATgcccgcTCAGGTCCGCTTCTGGG A AG3'。扩增产物为含有 S100A11 基因完整的序列, 长度为 348 bp。以 cDNA 为模板, 反应体系: 1 μL 模板, 5 μL 10 × buffer, 5 μL 2 mM/L dNTP, 2 μL MgSO₄, 1 μL KOD-plus 酶, 引物各 1 μL, 以 ddH₂O 补足 50 μL。PCR 反应条件: 变性 94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 42 °C 30 s, 68 °C 4 min, 30 个循环; 68 °C 10 min; 10 °C 保存, 1.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

载体构建: 回收 PCR 产物与 pWPT 载体, 同时用 Mlu I 和 Not I 酶进行酶切。酶切产物经回收后, 用连 T4 DNA 接酶连接, 连接产物转化 Top10 感受态菌。阳性细菌克隆, 命名为 pWPT-S100A11, 送上海美吉生物医药科技有限公司测序。

1.4 慢病毒载体包装

取 6 代 293T 细胞复苏于 6 cm 培养皿, 长满后接种到 10 cm 培养皿, 常规培养至细胞密度为 70%。包装当天早上将培养基换成无血清 DMEM, 37 °C 孵育 2 h。目的基因质粒 pWPT-S100A11、pWPT-GFP 为对照各 20 μg, 包装质粒 PAX2 质粒 10 μg, 外壳质粒 pMD2. G 质粒 6 μg, 加水补足至 500 μL, 逐滴加入 2.5 mol/L CaCl₂ 50 μL, 轻轻混匀, 再逐滴加入 500 μL 2 × HBS (280 mmol/L NaCl, 10 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L Na₂HPO₄, 12 mmol/L Glucose, 50 mmol/L HEPES, pH 7.05), 每滴加入后均需充分混匀, 然后室温放置 5 ~ 20 min。再滴加入 293T 细胞 10 cm 培养皿中, 滴入部分的培养基颜色变浅, 滴加完毕后轻柔摇晃混匀。6 ~ 8 h 后, 将培养基更换为新鲜的 DMEM + 10% FBS, 此时显微镜下可以观察到培养皿底部未长细胞的部分有沙状钙颗粒。37 °C 培养 48 h, 荧光显微镜观察 pWPT-GFP 组感染效率, 收集 293T 细胞培养上清至 5 mL 离心管中, 2 000 rpm 离心 5 min, 用 10 mL 针筒吸取上清, 然后将针头换成 0.22 μm 滤器, 过滤后分装于 EPP 管中, 即为包装得到的慢病毒颗粒悬液, 该病毒可直接用于感染或 -80 °C 保存。

1.5 慢病毒感染 Huh-7 细胞

将生长良好的 Huh-7 细胞铺于 6 孔板中, 种植数目不宜过多, 细胞生长至 50% 时开始感染。更换培养基, 以 4 μg/mL 的终浓度加入 Polybrene, 37 °C 富裕 30 min 后分别加入 pWPT-GFP 与 pWPT-S100A11 慢病毒悬液 100 μL, 继续培养 8 h, 更换培

培养基。待细胞生长至 90% 后传代。48 小时后 GFP 病毒感染的细胞可见荧光, 以此初步判断病毒包装及感染是否成功。

1.6 Real-Time PCR 检测感染细胞 S100A11 mRNA 的表达

Huh-7 细胞、经上述步骤感染的 Huh-7GFP 细胞和 Huh-7-S100A11 细胞培养于 6 cm 皿中, 生长至 90% 后收集。按照上述方法提取细胞总 RNA, 并进行逆转录得产物 cDNA, 将 cDNA 进行定量。以 cDNA 为模板进行 TR-PCR。引物: S100A11 上游引物 GAGTCCCTGATTGCTGTCTTCC, S100A11 下游引物 AGGGTCCTTCTGGTCTTTGTG。反应体系: 1 μ L 模板, 5 μ L 10 \times buffer, 5 μ L 2 mmol/L dNTP, 2 μ L MgSO₄, 1 μ L KOD-pLus 酶, 引物各 1 μ L, 以 dd H₂O 补足 50 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 68 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物用 1.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。仪器采用 ABI PRISM 7900HT。采用比较 CT(Cycle threshold)法相对定量。

1.7 Western blotting 检测感染细胞 S100A11 蛋白的表达

取 Huh-7 细胞、Huh-7GFP 细胞、Huh-7-S100A11 细胞种植于 6 cm 皿中, 37 $^{\circ}$ C 培养生长至 90% 后, 用

预冷的 PBS 缓冲液洗 3 遍, 加入 100 μ L 预冷的蛋白裂解液, 收集细胞至 1.5 mL EP 管中, 放在冰上裂解 30 min 后, 12 000 g 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 取上清用 BCA 试剂盒测定浓度。剩余上清移至另外 EP 管中并加入 SDS loading buffer 混匀后, 煮沸 10 min, 置 -20 $^{\circ}$ C 保存。三种蛋白各取 20 μ g 样品蛋白经 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 取 PVDF 膜与电泳后的凝胶于转膜仪上进行转移 40 min。转膜结束后用 PBS 于振荡器上洗膜 10 min, 将 PVDF 膜放入 5% 脱脂奶粉配置的封闭液中, 封闭 2 h。S100A11 抗体 1:100 稀释, GAPDH 抗体 1:5 000 稀释后加一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日用 PBST 洗 3 次, 每次 15 min。用 HRP 标记的羊抗鼠抗体 1:1 000 稀释后, 孵育 2 h。用 PBS 洗 3 次, 每次 10 min 后, 加显影剂显影。

2 结 果

2.1 慢病毒表达载体质粒构建及鉴定

PCR 扩增得到 S100A11 基因片段, 长度为 348 bp(图 1A)。将 S100A11 基因片段经 Mlu I 和 Not I 酶切后, 克隆入 pWPT 载体, 酶切鉴定(图 1B), 阳性克隆送 Invitrogen 公司测序。测序结果经对比与 GenBank 中标准一致(图 1C)。

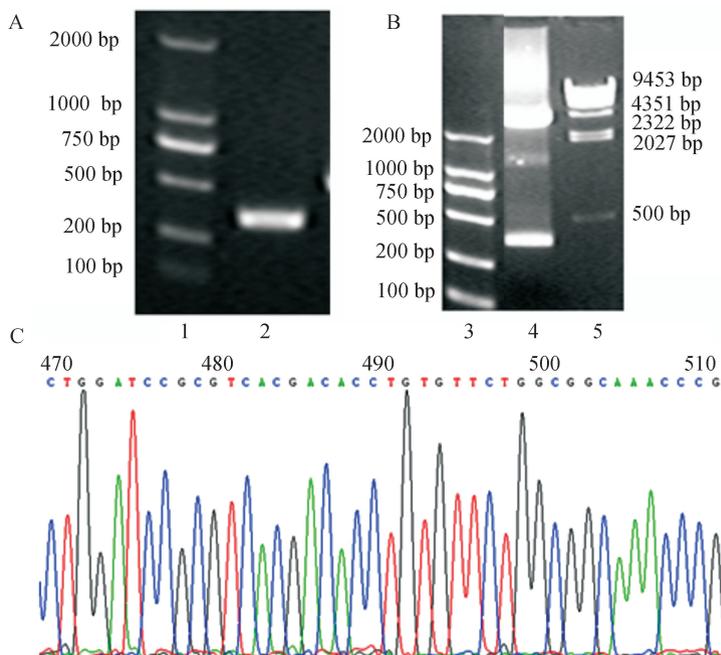


图 1 慢病毒表达载体构建 A: 1. Mark- λ Hind III, 2. S100A11 基因片段; B: 3. Mark- λ Hind III, 4. pWPT-S100A11 基因片段经 Mlu I 和 Not I 酶切后片段, 5. Mark-DS2000; C: S100A11 基因序列

2.2 慢病毒载体包装

pWPT-S100A11、pWPT-GFP 慢病毒表达载体包装于 293T 细胞,37 °C 培养 48 h 后,荧光显微镜观察可见绿色荧光(图 2),说明病毒包装成功。

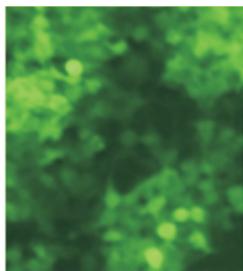


图 2 包装 48 h 后荧光图($\times 100$)

2.3 慢病毒感染 Huh-7 细胞

pWPT-S100A11 与 pWPT-GFP 慢病毒感染 Huh-7 细胞培养 48 h 后 GFP 病毒感染的细胞可见荧光,由此可以判断病毒感染成功。

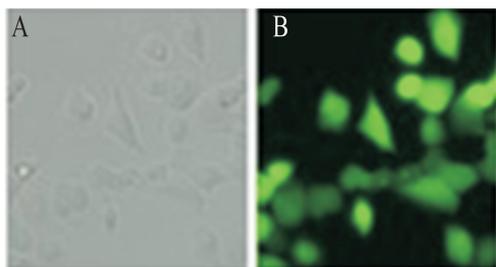


图 3 pWPT-GFP 慢病毒感染 Huh-7 细胞荧光图($\times 400$)
A:白光图;B:荧光图

2.4 Real-Time PCR 检测感染细胞 S100A11 mRNA 的表达

pWPT-S100A11 与 pWPT-GFP 慢病毒感染 Huh-7 细胞后,通过 Real-Time PCR 检测 Huh-7、Huh-7GFP、Huh7-S100A11 三总细胞中 S100A11mRNA 的表达情况,结果显示 Huh7-S100A11 中 S100A11mRNA 表达量最高,Huh7-S100A11 细胞中 S100A11 的表达量明显高于其它两组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 Western blotting 检测感染细胞 S100A11 蛋白的表达

通过 Western blotting 检测 Huh7、Huh7-GFP、Huh7-S100A11 三种细胞中 S100A11 蛋白的表达,结果显示 Huh7-S100A11 中 S100A11 的表达量明显高于其他两种细胞(图 4)。

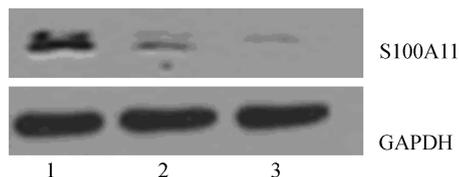


图 4 不同细胞中 S100A11 蛋白的表达 1:Huh7-S100A11 细胞;2:Huh7-GFP 细胞;3:Huh7 细胞

3 讨 论

目前研究认为,S100A11 参与多种生物学过程的调节,例如,调节酶的活性、细胞的生长和凋亡、炎症反应等^[9]。编码 S100A11 的基因位于 1 号染色体 q21 区,该区易发生重排,引起肿瘤的发生和转移。S100A11 对肿瘤细胞具有双向调节的作用,在食管癌、膀胱癌中低表达,在大肠癌、胰腺癌、淋巴瘤中高表达。S100A11 在肺鳞癌和肺腺癌中高表达,在小细胞肺癌中低表达。S100A11 也可以作为肿瘤抑制因子,抑制 P21 的表达,从而抑制肿瘤细胞的生长增值^[10]。S100A11 在对肿瘤细胞具有双向调节作用,在肿瘤的诊断和防治上具有一定的意义。研究发现 S100A11 的表达升高,可以促进肝癌细胞的侵袭迁移。

慢病毒载体(lentiviral vectors, LV) 包含了包装、感染、稳定整合所需要的遗传信息,是新发展起来的基因载体。利用表达载体和包装质粒同时共感染细胞可以产生高滴度的病毒颗粒,在细胞中进行病毒的包装,包装好的假病毒颗粒分泌到细胞外的培养基中,离心取得上清液后,可以直接用于宿主细胞的感染。目的基因进入到宿主细胞之后,经过反转录,慢病毒载体可以将携带的目的基因整合到宿主的基因组中,从而高水平的表达效应分子^[11]。慢病毒载体可感染分裂细胞和非分裂细胞、转移基因片段容量较大、目的基因表达时间长、不易诱发宿主免疫反应等优点^[12]。

本研究采用基重组技术,构建重组慢病毒载体 pWPT-S100A11,感染 Huh7-细胞,获得稳定 Huh7 S100A11 细胞,并鉴定 S100A11 表达量升高,为进一步研究 S100A11 基因在肝癌侵袭迁移中的作用机制奠定了一定的实验室基础。

参考文献:

- [1] Shin JW, Chung YH. Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma: current and future[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(37): 6144-6155.

(上接第 557 页)

- [2] Kim HY, Park JW. Clinical trials of combined molecular targeted therapy and locoregional therapy in Hepatocellular carcinoma: past, present, and future [J]. Liver Cancer, 2014, 3(1):9-17.
- [3] Bruix J, Gores GJ, Mazzaferro V. Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives [J]. Gut, 2014, 63(5):844-855.
- [4] Sakaguchi M, Huh NH. S100A11, a dual growth regulator of epidermal keratinocytes [J]. Amino Acids, 2011, 41(4):797-807.
- [5] Melle C, Ernst G, Schimmel B, et al. Different expression of calgizzarin (S100A11) in normal colonic epithelium, adenoma and colorectal carcinoma [J]. Int J Oncol, 2006, 28(1):195-200.
- [6] Ohuchida K, Mizumoto K, Ohhashi S, et al. S100A11, a putative tumor suppressor gene, is overexpressed in pancreatic carcinogenesis [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(18):5417-5422.
- [7] Xiao MB, Jiang F, Ni WK, et al. High expression of S100A11 in pancreatic adenocarcinoma is an unfavorable prognostic marker [J]. Med Oncol, 2012, 29(3):1886-1891.
- [8] Luo X, Xie H, Long X, et al. EGFRvIII mediates hepatocellular carcinoma cell invasion by promoting S100 calcium binding protein A11 expression [J]. PLoS One, 2013, 20, 8(12):1-9
- [9] Gross SR, Sin CG, Barraclough R, et al. Joining S100 proteins and migration: for better or for worse, in sickness and in health [J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71(9):1551-1579.
- [10] Salama I, Malone PS, Mihaimed F, et al. A review of the S100 proteins in cancer [J]. Eur J Surg Oncol, 2008, 34(4):357-364.
- [11] 方芳, 朱平. 慢病毒载体的改进为基因治疗带来了新的希望 [J]. 中国实验血液学杂志, 2013, 21(5):1336-1339.
- [12] Segura MM, Mangion M, Gaillet B, et al. New developments in lentiviral vector design, production and purification [J]. Expert Opin Biol Ther, 2013, 13(7):987-1011.

(此文编辑:秦旭平)