

Snail 基因慢病毒载体的构建及其促进结肠癌 细胞上皮间质化的研究

张建龙, 赖东明, 周泉波, 肖治宇, 张育超, 张紫斐, 毛 凯, 陈 双*
(中山大学孙逸仙纪念医院普外科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】构建 Snail 基因慢病毒载体, 研究 Snail 基因的表达与结肠癌细胞上皮间质化的关系。【方法】利用 Gateway Technology 法构建 Snail 基因表达质粒和空白对照质粒, 行慢病毒包装。成功构建 Snail 基因慢病毒载体后, 在结肠癌细胞系 caco2 中转染 Snail 基因质粒及空白载体对照, 构建稳转细胞株 caco2-Snail 和 caco2-vc, 并在 LoVo 细胞中瞬时转染上述质粒, 对 Snail 及 E-钙黏蛋白(E-cadherin)的表达进行检测, 并用划痕、Transwell 实验对细胞的迁移侵袭能力进行研究。【结果】成功构建 Snail 基因慢病毒载体并经测序证实。在转染 Snail 的细胞株中有明显的 Snail 基因及蛋白表达, 其上皮标记 E-cadherin 的表达比转染空载体的对照组细胞明显下调, 且其迁移侵袭能力要强于对照组细胞。【结论】Snail 基因慢病毒载体在宿主细胞中表达稳定可靠, 可以作为研究上皮间质化很好的工具, Snail 基因有明显促进结肠癌细胞上皮间质化的作用。

关键词: Snail 基因; 慢病毒载体; 上皮间质化

中图分类号: R735.35; R73-37; R-331 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2012)03-0326-04

Establishment of Snail Gene Lentiviral Vector and Its Effect in Epithelial-Mesenchymal Transition of Colon Cancer Cells

ZHANG Jian-long, LAI Dong-ming, ZHOU Quan-bo, XIAO Zhi-yu, ZHANG Yu-chao,
ZHANG Ying-fei, MAO Kai, CHEN Shuang

(Department of General Surgery, Sun Yat-Sen Memorial Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To establish snail gene lentiviral vector and explore its effect in EMT (epithelial-mesenchymal transition) of caco2 colon cancer cells. 【Methods】 According to the principle of Gateway technology, the snail expressing plasmid was established and imbedded into lentiviral vector. We transfected Lenti-hSnail1-eGFP/Neo and Lenti-eGFP/Neo (vector control) into caco2 colon cancer cells, thus, two stable cells were established: caco2-snail and caco2-vc. To validate the effect of snail expressing plasmid in other colon cancer cell lines, we also performed transient transfection of snail expressing vector and empty vector in LoVo cells. The expression level of Snail and E-cadherin were detected in these cell lines. Wound-healing assay and transwell chamber assay were performed to evaluate the migration and invasive ability of these cells. 【Results】 Snail gene lentiviral vector was successfully established and was proved by gene sequencing. Significant gene and protein expression of snail can be detected in snail expressing cells. The levels of E-cadherin expression was obviously down-regulated in snail expressing cells compared with control cells. Snail promoted migration and invasion of colon cancer cells in wound-healing assay and transwell chamber assay. 【Conclusion】 Snail gene lentiviral vector is a stable and reliable tool for investigating EMT, and snail regulated the EMT of colon cancer cells by promoting cellular migration and invasion.

Key words: snail; lentiviral vector; epithelial-mesenchymal transition

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2012, 33(3): 326-329; 335]

收稿日期: 2011-12-22

基金项目: 国家自然科学基金(81071761); 广东省自然科学基金(10151008901000044)

作者简介: 张建龙, 外科学博士研究生, 主治医师, 研究方向: 消化肿瘤, E-mail: fjjohnkl@163.com, * 通信作者: 陈 双, 教授, 博士生导师, 胃肠外科主任, E-mail: chensh2@mail.sysu.edu.cn

上皮向间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指上皮细胞失去细胞间的联接和极性,获得类似纤维母细胞样的间质细胞的特性这一过程。EMT 是胚胎发育、组织损伤修复中的一个正常生理过程。近年来人们意识到 EMT 贯穿于整个肿瘤浸润和转移的过程。Snail 基因是 EMT 的一个重要的调控因子,它在转录水平抑制 E-cadherin^[1],使得这一上皮细胞维持细胞间连接的重要蛋白表达下调,从而启动一系列促进细胞 EMT 的过程。慢病毒载体系统可以将外源基因有效地整合到宿主染色体上,从而达到持久性表达。相比常用的腺病毒载体,及脂质体转染法,慢病毒载体的转染效率高,表达稳定,对细胞的毒性比脂质体小。因此,构建 Snail 基因慢病毒载体可以为研究 EMT 提供一个良好的工具。

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

①质粒构建:Gateway[®] BP Clonase[®] II Enzyme Mix 和 Gateway[®] LR Clonase[™] II Plus Enzyme Mix 来自美国 invitrogen 公司,QIAquick Gel Extraction Kit 来自德国 QIAGEN 公司,PrimeSTAR[™] HS DNA Polymerase 来自 Takara 公司,Taq DNA Polymerase,dNTP Mix 和 GeneRuler[™] 100 bp DNA Ladder 来自美国 Fermentas 公司,质粒小提试剂盒来自北京 TIANGEN 公司。②病毒包装:转染试剂 Lipofectamine 2000 来自美国 invitrogen 公司,转染细胞为 293FT,培养液 H-DMEM + 10% FBS,转染混合液 Opti-MEM[®] I 为美国 invitrogen 公司。③抗体:兔抗人 Snail 和兔抗人 E-cadherin 来自美国 CST 公司 GAPDH 兔抗人一抗和羊抗兔二抗来自武汉 Boster 公司。④其它耗材:细胞培养液 RPMI1640 来自美国 invitrogen 公司,transwell 小室来自美国 corning 公司。

1.2 载体质粒构建

PCR 扩增 attB1-Snail-attB2,引物序列为:5' to 3'attB1 +hSnail1:GGGGACAAGTTTGTACAAA AAAGCAGGCTGCCACCATGCCGCGCTCTTTCTCG TCAG;attB2 +hSnail:GGGGACCACTTTGTACAAG AAAGCTGGGTTTCAGCGGGGACATCCTGAGCAG。扩增后根据 Gateway Technology 法,构建 pDown-Snail,*Pst* I 酶切鉴定阳性克隆,送交测序。构建

pLV.Ex3d.P/neo -EF1A >Snail >IRES/eGFP,*Sca* I 酶切筛选阳性克隆,送交测序。

1.3 病毒包装

①293FT 细胞,按照细胞数 5×10^6 个/皿接种于 10 cm 培养皿中过夜;②制备 DNA-Lipofectamine 2000 复合物;③将 DNA-Lipofectamine 2000 复合物添加到 293FT 细胞中,轻轻地前后摇晃以混匀复合物。④转染后 1 d,换培养液。⑤转染 48 h 后收集培养上清进行浓缩;加入 10 mL 新鲜的培养液继续培养,转染后 72 h 再次收集浓缩。

1.4 滴度测定

①宿主细胞接种到 6 孔板中,能使转染当天的融合度达到 30%~50%。②病毒转染:A.转导当天,融解病毒,准备 10 倍稀释系列样品。B.在含有病毒的培养液中加入聚凝胺(工作浓度是 6 mg/L),以促进病毒感染细胞。C.去除细胞中的培养液,加入已含有不同病毒量的完全培养液。D.转染后 1 d,去除含有病毒的培养液,加入 2 mL 新鲜的完全培养液。③加入含有 neo(400 mg/L)完全培养液以筛选稳定转导的细胞④结晶紫染色,计数被染成蓝色的克隆数目,并计算病毒滴度。

1.5 构建稳转细胞株

①转导前,每孔细胞换成 1.5 mL 完全培养基,选取两孔细胞分别加入 30 μ L 的 Lenti-hSnail-eGFP/Neo 和 Lenti-eGFP/Neo,充分摇匀。②转导 7 h 后,吸去培养基,并用 PBS 洗两次;换成完全培养基。

1.6 细胞株的纯化筛选

①在荧光显微镜下观察,对荧光纯度较高的克隆进行标记。在体视镜下将有标记的克隆细胞挑取后接种至 12 孔板进行培养;②次日,在荧光显微镜下观察挑取的克隆荧光的纯度,选择荧光较纯的克隆细胞进行消化,然后混合接种至 6 孔板中进行培养。

1.7 Snail 表达质粒的瞬时转染

使用无血清的 Opti-MEM[®] I 分别稀释目的质粒和转染试剂 Lipofectamine 2000,混合后室温孵育 20 min,加入到含细胞及培养液的 6 孔板内,轻轻摇匀,置入细胞培养箱。

1.8 RT-PCR 检测 Snail 基因表达

用 Trizol 法提取细胞总 RNA。所用引物序列为:F:CAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT;R:

GGAGCAACATAGTTAAGAATACC PCR 反应条件为:预变性 94 °C, 3 min;变性 94 °C, 30 s;退火 60 °C, 1 min;延伸 72 °C, 1min;循环数 30;充分延伸 72 °C, 5 min;保存温度 12 °C。

1.9 免疫印迹法检测 Snail 和 E-cadherin 蛋白的表达

Snail 和 E-cadherin 兔抗人一抗工作浓度为 1:1 000, GAPDH 兔抗人一抗工作浓度为 1:2 000 羊抗兔二抗工作浓度为 1:3 000 来自武汉 Boster 公司。RIPA 裂解液冰上裂解细胞 30 min, 裂解产物(4 °C, 12 000 ×g)离心 30 min, 取上清, 煮沸 5 min, 在酶标仪上检测蛋白浓度, 加入 loading buffer 上样至 SDS-PAGE 胶电泳分离后, PVDF 膜恒流电转 1 h, 50 g/L 脱脂奶粉封闭 1 h, 洗膜后(TBST 液, 3 min × 5 次)加入一抗 4°C 下过夜, 洗膜后(TBST 液, 3 min × 5 次)加入二抗室温孵育 1 h, 洗膜后(TBST 液, 3 min × 5 次)加入 ECL 发光液, 暗室曝光。

1.10 划痕试验

6 孔板内铺入细胞长至约 95% 满, 用 200 μL 无菌移液枪头划痕, PBS 小心洗去漂浮细胞重复 3 次, 培养 24 h 后显微镜下观察, 观察前再用 PBS 小心洗去漂浮细胞。

1.11 transwell 小室侵袭实验

transwell 上室底部预先包被 Matrigel 胶, 每孔加入 1×10^5 个细胞, 常规培养 24 h 后, 小心擦去上室的 Matrigel 胶, 置入 750 mL/L 酒精固定 15 min, 结晶紫染色 15 min, PBS 反复漂洗, 洗去多余的结晶紫。200 倍显微镜下观察, 随机计数 5 个视野, 取均值。

1.12 统计学方法

应用 SPSS17.0 统计学软件分析。均值检验采用 student's *t* test, 以 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 构建 hSnail-eGFP-Neo 质粒

PCR 筛选 hSnail-eGFP-Neo, Lane 1-Lane 5 分别是 1 号至 5 号克隆的 PCR 鉴定结果, 目的片段约为 848 bp(图 1)。选取 4 号克隆进行测序验证。

2.2 病毒包装与稳转细胞株 caco2-Snail 和 caco2-vc 构建

病毒滴度测定结果: Snail 为 4.7×10^{10} TU/L,

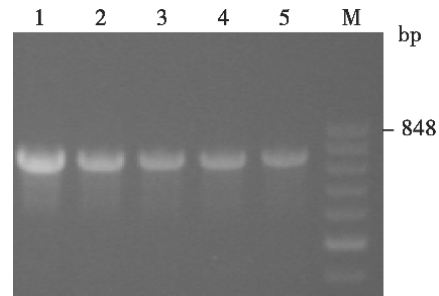


图 1 hSnail-eGFP-Neo 质粒电泳结果

Fig.1 Electrophoresis of hSnail-eGFP-Neo plasmid

Lane 1: clone 1; lane 2: clone 2; lane 3: clone 3; lane 4: clone 4; lane 5: clone 5; M=Marker

GFP 对照为 5.5×10^{10} TU/L。转导 72 h 后观察 Snail 和 GFP 的转导率分别为 70% 和 90%, 经挑克隆纯化后 caco2-Snail 细胞的荧光率可达到 95%。

2.3 RT-PCR 检测稳转细胞株 caco2-Snail 和 caco2-vc 中 Snail 基因表达

琼脂糖凝胶电泳显示 caco2-Snail 细胞中有 Snail 基因表达, 与目的质粒一致, 而 caco2-vc 细胞中无 Snail 基因表达。(图 2)。

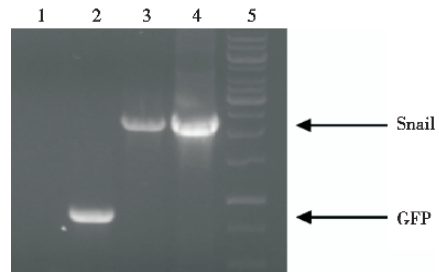


图 2 Snail 和 GFP 基因 RT-PCR 产物电泳结果

Fig.2 Electrophoresis of Snail and GFP gene RT-PCR products

Lane 1: caco-2; lane 2: caco-2-vc/GFP; lane 3: caco-2-Snail; lane 4: Plasmid; lane 5: marker

2.4 Snail 和 E-cadherin 蛋白在结肠癌细胞中的表达呈负相关

无论是在稳定转染还是在瞬时转染的细胞中, 高表达的 Snail 蛋白下调了 E-cadherin 蛋白的表达。(图 3)。

2.5 Snail 基因表达促进了结肠癌细胞的迁移

划痕试验显示 caco2-Snail 细胞的迁移速度明显快于对照细胞 caco2-vc, 说明 Snail 基因表达促进了结肠癌细胞的迁移能力(图 4)。

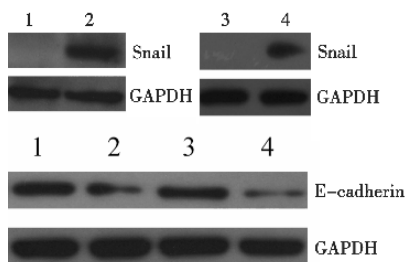


图 3 免疫印迹法检测 Snail 和 E-cadherin 蛋白在结肠癌细胞 caco2 和 LoVo 中的表达

Fig.3 Protein expression of Snail and E-cadherin in caco2 and LoVo colon cancer cells detected by immunoblotting

Lane 1: caco2-vc; lane 2: caco2-Snail; lane 3: LoVo-vc; lane 4: LoVo-Snail

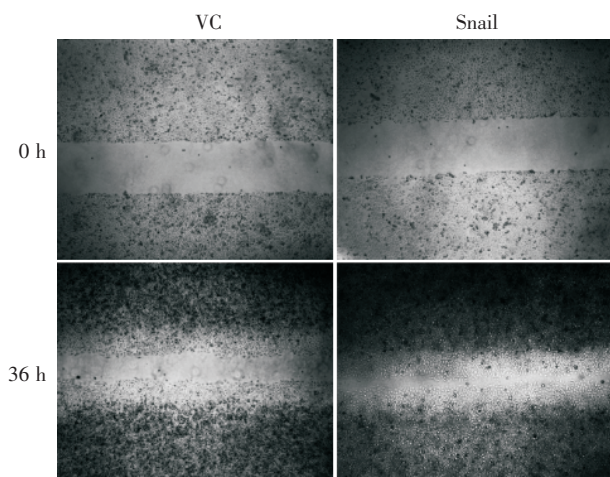


图 4 划痕试验检测 caco2 细胞的迁移能力

Fig.4 Migration of caco2 cells detected by wound-healing assay

2.6 Snail 基因表达促进了结肠癌细胞的侵袭 (100×镜下)

transwell 小室侵袭实验中,穿过 Matrigel 胶的 Snail 表达细胞明显多于对照细胞,具有统计学意义 ($P < 0.05$, student's *t* test),显示表达 Snail 的细胞具有更强的侵袭能力(图 5)。

3 讨论

Snail 基因作为调节 EMT 的一个重要因子,在 EMT 机制研究中有越来越多的应用。因此,构建一个稳定高效的表达平台,是必不可少的。慢病毒载体系统有着以下优势:它能将目的基因整合入宿

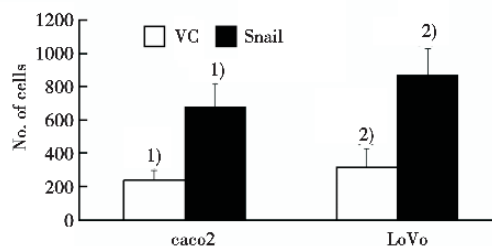
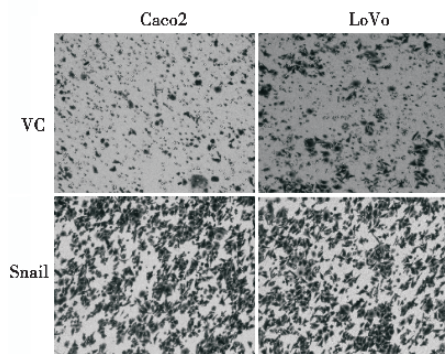


图 5 侵袭试验检测 caco2 和 LoVo 细胞的侵袭能力

Fig.5 Invasion ability of caco2 and LoVo cells detected by transwell chamber assay

× 200, 1) $P = 0.014$, 2) $P = 0.009$

主细胞的基因组内,或得持续稳定的表达,而腺病毒、脂质体系统则无此功能;另外,本试验中,Snail 和 GFP 的转导率分别为为 70%和 90%,经挑克隆纯化后 caco2-Snail 细胞的荧光率可达到 95%以上,说明其转染的高效率,而且也免去后续培养中类似脂质体转染需不断加入药物筛选的麻烦。慢病毒载体的缺点在于目前人们对它潜在的感染风险仍有顾虑,因此,必须遵守严格的实验操作规程。我们构建的 Snail 基因慢病毒载体在 caco2 细胞中获得了稳定的基因和蛋白表达,并在 LoVo 细胞中瞬时转染证实了表达质粒的可靠性,为后续的研究提供了保证。

目前研究对 EMT 调控的关键靶点多集中于 E-cadherin 上。正常的上皮细胞间通过多种连接紧密排列在一起,包括由 E-cadherin、连环蛋白、肌动蛋白组成的黏附连接,以及由细胞顶端的极性复合体组成的紧密连接,还有整联蛋白与基底膜间的交联。在 EMT 始动因素的诱导下,编码上述细胞连接蛋白的基因转录受抑制,E-cadherin 内陷降解,胞间的连接破坏,细胞极性丢失。EMT 参与了肿瘤细胞转移过程的概念是基于研究发现:获

(下转第 355 页 to page 355)