

重组 pDC316- MCMV/ hNIS 真核表达质粒的构建及在肿瘤细胞的功能

周泉波, 陈汝福, 李志花, 周嘉嘉, 唐启彬, 陈积圣
(中山大学附属第二医院肝胆外科, 广东 广州 510120)

摘要: 【目的】克隆人的钠/碘同向转运体(hNIS)基因可编码序列,并研究其在非甲状腺肿瘤细胞内的功能表达。【方法】利用逆转录和聚合酶链反应(RT-PCR)从毒性弥漫性甲状腺肿(又称 Graves 病)病人的甲状腺组织中扩增得到 NIS 的可编码区基因,并克隆到 T 载体,测序后亚克隆到腺病毒载体穿梭质粒 pDC316 载体上,获得重组真核表达质粒载体 pDC316-MCMV/hNIS。采用脂质体转染的方法,把 pDC316-MCMV/hNIS 重组质粒(实验组)或 pDC316 空质粒(对照组)分别导入到胰腺癌细胞株 CAPAN-1 细胞、PANC-1 细胞和卵巢癌细胞株 SK-OV-3 细胞,转染后 48 h 采用 RT-PCR 方法检测转染细胞内的 hNIS mRNA 水平,转染后第 2、3、4 天分别检测肿瘤细胞对 ^{125}I 的吸收功能。【结果】序列分析结果证实克隆片段与文献报道的 hNIS 基因 cDNA 序列完全一致。实验组转染后 48 h,在 CAPAN-1 细胞、PANC-1 细胞及 SK-OV-3 细胞内均能检测到 hNIS mRNA 高水平表达,对照组基本无 hNIS mRNA 表达。转染后第 3 天细胞吸碘达到高峰,实验组 CAPAN-1 细胞、PANC-1 细胞和 SK-OV-3 细胞对 ^{125}I 的吸收量分别比对照组高 24 倍、17 倍和 13 倍。【结论】从 Graves 病人的甲状腺组织中克隆的 hNIS 基因转染肿瘤细胞后,能使肿瘤细胞发挥高水平吸碘功能,为进一步运用放射性核素体内靶向治疗非甲状腺肿瘤奠定了基础。

关键词:人钠/碘同向转运体;逆转录聚合酶链反应;基因转染;碘放射性同位素

中图分类号:R736.1

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2007)04-0383-04

Construction of pDC316- MCMV/ hNIS and Its Effects on Non- thyroid Tumor Cell

ZHOU Quan-bo, CHEN Ru-fu, LI Zhi-hua, ZHOU Jia-jia, TANG Qi-bing, CHEN Ji-sheng
(Department of Hepatobiliary Surgery, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To clone human sodium / iodide symporter (hNIS) genes, and study the function expression of hNIS in non- thyroid tumor cell. 【Methods】 Human sodium/iodide symporter genes cDNA were amplified from thyroid tissue of the patients suffering from Graves disease by RT-PCR, and cloned into pGEM- T easy/hNIS. pGEM- T easy/hNIS was sequenced and subcloned into pDC316-MCMV/hNIS. We transfected the recombinant pDC316-MCMV/hNIS into CAPAN-1 cells, PANC-1 cells, and SK-OV-3 cells by lipofectamine 2000. 48h after recombinant plasmid transfection, the level of hNIS mRNA was determined. The 2, 3, 4 day after recombinant plasmid transfection, ^{125}I uptake in the cells was measured by gamma-counting. 【Results】 The results showed that the sequence data of hNIS gene in recombinant plasmids pGEM- T easy/hNIS and pDC316-MCMV/hNIS was corresponded to those of reference report. The level of hNIS mRNA could be determined highly expression in the cells transfection with pDC316-MCMV/hNIS, but the low level was measured in the cells transfected with pDC316. The similar results could be seen in ^{125}I uptake, a 24-fold increase in ^{125}I uptake was observed in CAPAN-1 cells transfected with pDC316-MCMV/hNIS when compared with the cells transfected with pDC316, and a 17-fold, a 13-fold increase was also been seen in PANC-1 cells and SK-OV-3 cells. 【Conclusion】 hNIS could be amplified successfully from thyroid tissue of the patient suffering from Graves disease and could be express in tumor cells after transfection with recombinant pDC316-MCMV/hNIS, it would provide academic evidence for further

收稿日期:2006-10-31

基金项目:国家高科技计划(863)基金(2002AA214061);广东省自然科学基金(2003A031700);广东省医学科学研究基金(A2005228);广州市科委基金(2004Z3-D2011)

作者简介:周泉波(1979-),男,湖南衡山人,博士生,李志花,副教授,通讯作者,E-mail:chenrf63@163.com

research.

Key words: sodium/iodide symporter; gene transformation; reverse transcription polymerase chain reaction; iodine radioisotopes

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(4):383-386]

钠/碘同向转运体(sodium iodide symporter, NIS)是主要存在于甲状腺滤泡细胞基底膜上的一种跨膜糖蛋白,在细胞对碘的摄取过程中起着举足轻重的作用^[1]。随着对 NIS 研究的不断深入,通过 NIS 基因介导放射性核素来进行肿瘤的基因治疗是目前国内外的研究热点之一^[2,3],但在胰腺癌基因治疗中少有报道^[4]。本研究从 Graves 甲亢病人的甲状腺组织中克隆出人 NIS 基因的完整编码区序列(CDS),并构建 Pdc316-MCMV/hNIS 重组穿梭质粒载体,以研究 NIS 基因转染的胰腺癌等非甲状腺肿瘤细胞对碘的摄取功能。

1 材料与方法

1.1 材料

Graves 甲亢病人的甲状腺组织取自我院乳甲外科。总 RNA 提取试剂 Trizol reagent 和脂质体 lipofectamine 2000 均为 Invitrogen 公司产品, 2 × Pfu PCR Master Mix (KP201) 为时代公司产品, 两步法 RT-PCR 试剂盒 Takara 公司产品。限制性内切酶 EcoR、Xba、Hind 及 T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司。cdi DH5, pDC316 vector 由中山大学肿瘤医院实验室提供, pGEM-T easy 载体本实验室保存。胰腺癌细胞株 CAPAN-2 购买于中山大学细胞培养室, 胰腺癌细胞株 PANC-1、卵巢癌细胞株 SK-OV-3 由本实验室保存。DMEM 培养基(GBICO 公司), 四季青胎牛血清为威佳公司产品。放射性 ¹²⁵I、NaI 及 KClO₄ 均由中山大学实验核医学实验室提供。

1.2 NIS 基因的扩增及与 T 载体连接

采用 Trizol 试剂法从 1 例 Graves 甲亢病人的甲状腺组织中抽提总 RNA 后, 使用 TaKaRa 公司反转录试剂盒把 RNA 反转录成 cDNA, 具体方法参考试剂盒说明书。根据重叠 PCR 方法设计 4 条引物以扩增 hNIS cDNA 全长 1932 bp 的基因片段: P1: ATGGAGGCCGTGGAGACCGGGGAAC; P2: CAAACATGACGATGCCACAGCAGGC; P3: CAGGT CGTGGTGATGCTAAGTGGCT; P4: TCAGAGGTTTG TCTCTGCTGGTCT。分别建立如下 3 个反应体系:

体系 1 (扩增产物为 Fragment 1): 取甲状腺 cDNA 1 μL, P1 (10 pmol/L), P2 (10 pmol/L) 各 5 μL, 2 × Pfu PCR Master Mix 25 μL, ddH₂O 14 μL。体系 2 (扩增产物为 Fragment 2): 取 P3 (10 pmol/L), P4 (10 pmol/L) 各 5 μL, 其余成份同体系 1。体系 3 (扩增产物为 NIS 基因片段): 把 Fragment 1 和 Fragment 2 的 PCR 产物稀释 50 倍后混合, 取 1 μL 此混合物作为模版, P1 (10 pmol/L), P4 (10 pmol/L) 各 5 μL, 其余成份同体系 1。3 个体系 PCR 反应的条件一致, 如下: 94 预变性 2 min, 94 变性 30 s, 65 退火 30 s, 72 延伸 3 min, 共作 30 个循环, 最后于 72 延伸 10 min, 产物放于 -20 冰箱中冻存。体系 3 的 PCR 产物行 1% 琼脂糖电泳后, 胶回收目的片段, 并与 pGEM-T easy 载体相连, 以方便保存目的基因及亚克隆到其他载体。连接产物转化大肠杆菌感受态 DH5, 利用蓝/白菌落筛选法筛选出阳性克隆, 提取其质粒 DNA, 进行 Nco + Spe 酶切鉴定。阳性克隆交由上海生物工程公司测序。

1.3 pDC316-MCMV/hNIS 载体的构建

根据腺病毒穿梭质粒 PDC316 所包含的多克隆位点, 采用 PCR 方法在 hNIS 基因两端分别引入 EcoR 和 Hind 两个酶切位点, 设计引物为 P5: TAGCGAATTCATGGAGGCCGTGGAGACCGGGG 和 P6: TAGCAAGCTTTTCAGAGGTTTGTCTCTCTGCTGG。以上述经测序证实为碱基序列正确的 pGEM-T easy/hNIS 质粒作为模版, P5、P6 为引物扩增 NIS 基因, 扩增产物经 EcoR 和 Hind 双酶切后回收, 与 PDC316 载体连接后得到重组质粒 PDC316-MCMV/hNIS。重组产物酶切鉴定后转化到 DH5 大肠杆菌感受态后, 用 LB/Amp 平板筛选出阳性克隆送上海生物工程公司测序 (本节具体方法同上段)。

1.4 体外转染

在 24 孔板中接种处于对数生长期的胰腺癌细胞株 CAPAN-2、PANC-1 细胞, 卵巢癌细胞株 SK-OV-3 (1 × 10⁵/每孔), 18 h 后待细胞生长至密度达到 90%~95% 进行转染。转染过程参考 lipofectamine 2000 转染试剂说明书。

1.5 RT-PCR 方法鉴定细胞内的 hNIS 基因的 mRNA

pDC316- MCMV/hNIS 质粒 (实验组) 和 pDC316 空质粒 (对照组) 转染 48 h 后, Trizol 试剂法从肿瘤细胞内提取总 RNA, 采用 TaKaRa 公司反转录试剂盒使 RNA 反转录成 cDNA。然后根据 hNIS 的 cDNA 序列设计特异性引物 P7: GCTAA GTGGCTTCTGGGTTG 和 P8: GACTGCAGCCAT AGCATTGA, 用于扩增 hNIS cDNA 的部分基因片段 (+941 ~ +1 142), 以鉴定细胞内 hNIS 的 mRNA 表达水平。反应条件为: 94 预变性 2 min, 94 变性 30 s, 60 退火 30 s, 72 延伸 1 min, 共作 30 个循环, 最后于 72 延伸 7 min, 产物电泳分析。

1.6 放射性 ¹²⁵I 吸收实验

pDC316- MCMV/hNIS 质粒转染组为实验组, 未经重组的 PDC316 (不含 NIS 基因) 作为空白对照组 1, 实验组另设 hNIS 抑制剂 KClO₄ 组做对照 2。每组每种细胞取 4 个复孔, 重复转染 3 次。转染细胞后第 2、3、4 天分别进行 ¹²⁵I 吸收测定。具体方法: 细胞用 HBSS 溶液冲洗 2 次, 在含 10 mmol/L HEPES, 10 μmol/L NaI and 3.7 kBq Na¹²⁵I/mL (pH 7.3) 的 HBSS 溶液中, 37 培养 1 h, 对照组另加入 10 μmol/L KClO₄, 作为 NIS 吸碘的抑制剂。倒掉培养液, 用冰 PBS 冲洗 2 次, 然后 1 mol/L NaOH 裂解细胞, 细胞吸 ¹²⁵I 用 计数仪测定每分钟计数。

2 结 果

2.1 hNIS 基因 (+348 ~ +2279) 的克隆

PCR 扩增的产物电泳鉴定结果见图 1, 结果证明扩增产物与预扩增片段大小一致。PCR 扩增产物亚克隆到重组质粒 pGEM- T easy/NIS 后, 经 Nco + Spe 酶切鉴定, 表明插入片段正确 (图 2)。重组质粒送上海生物工程公司检测碱基序列, 插

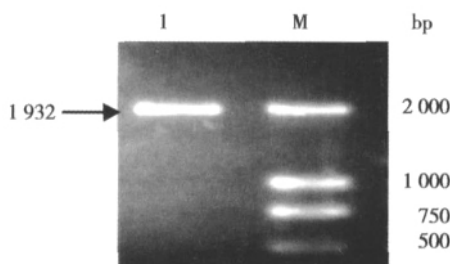


图 1 NIS 的 PCR 产物电泳结果图

Fig.1 PCR product of NIS cDNA

(M: DL2000 DNA Marker; 1: PCR product of NIS)

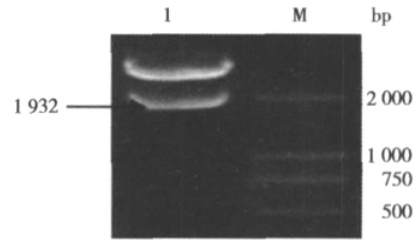


图 2 pGEM- T/NIS 酶切后电泳结果图

Fig.2 Restriction analysis of recombinant plasmid pGEM- T/NIS

(M: DL2000 DNA Marker; 1: pGEM- T easy/hNIS digested by Nco + Spe)

入基因的测序结果与参考序列 H.sapiens solute carrier family 5 (sodium iodide symporter), (GenBank accession: NM- 000453) 的 CDS 序列完全匹配, 同源率为 100%。

2.2 重组质粒 pDC316- MCMV/hNIS 构建的结果

构建的 pDC316- MCMV/hNIS 重组质粒转化 DH5 后, 用 LB/Amp 平板筛选重组子, 挑取阳性菌落, 小提质粒分别进行 Xba + EcoR 双酶切和 EcoR + Hind 双酶切, 酶切产物经电泳分析得到与预期片段大小一致条带 (图 3)。挑取阳性克隆送测序, 重组质粒中的 hNIS 基因测序结果与 T 载体内的 hNIS 基因模版序列一致, 与参考序列同源率为 100%。

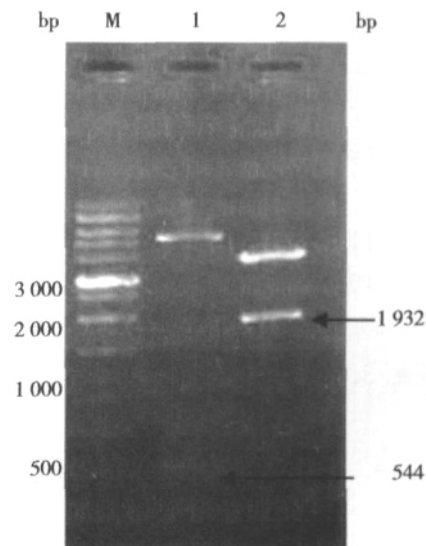


图 3 pDC316- MCMV/hNIS 酶切后电泳结果图

Fig.3 Restriction analysis of recombinant plasmid pDC316- MCMV/hNIS

M: 1 kb plus DNA; 1: pDC316- MCMV/hNIS digested by Xba +EcoR 2: pDC316- MCMV/hNIS digested by EcoR +Hind

2.3 肿瘤细胞内 hNIS 的 mRNA 水平

RT-PCR 方法扩增 pDC316- MCMV- hNIS 质粒转染后肿瘤细胞内 hNIS 的部分编码基因片段 (+941 ~ +1 142), 以检测细胞转染后胞内 hNIS 基因的 mRNA 表达情况。扩增片段电泳鉴定 (图 4) 结果表明 pDC316- MCMV- hNIS 质粒转染 CAPAN-2、PANC-1 和 SK- OV-3 细胞后都能扩增出约 500 bp 大小的目的条带, 而所有空白组都不能扩增出目的条带。这表明转染组 NIS 基因的 mRNA 在 CAPAN-2、PANC-1 和 SK- OV-3 均有较高水平表达, 而对照组 (不含 NIS 基因) 转染后没有 hNIS 的 mRNA 表达。

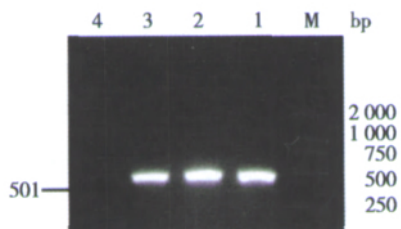


图 4 肿瘤细胞内的 hNIS 基因的表达

Fig.4 Expression of hNIS in the tumor cells

M: DL2000 DNA Marker; 1: group of PANC-1 cells; 2: group of CAPAN-2 cells; 3: group of SK- OV-3 cells; 4: control group

2.4 肿瘤细胞的 ^{125}I 吸收

转染后第 2、3、4 天分别进行细胞 ^{125}I 吸收测定, 结果表明实验组转染后第 3 天细胞吸 ^{125}I 量最高, 在 CAPAN-2、PANC-1 和 SK- OV-3 细胞内累计量分别为 $(2 859 \pm 225) \text{ min}^{-1}$ 、 $(2 650 \pm 214) \text{ min}^{-1}$ 、 $(3 105 \pm 325) \text{ min}^{-1}$, 比对照组分别提高 24 倍、17 倍和 13 倍, 实验组的高水平吸碘均能够显著被 KClO_4 所抑制。结果表明 pDC316- MCMV/hNIS 转染组的 3 种细胞都有较高水平吸收 ^{125}I 的功能, 并且这种 ^{125}I 的吸收功能都能够显著被 NIS 功能抑制剂 KClO_4 所抑制。对照组 pDC316 质粒 (不含 NIS 基因) 转染后 3 种细胞 ^{125}I 的吸收水平都很低。

3 讨论

钠/碘同向转运体 (sodium iodide symporter, NIS) 是一种跨膜糖蛋白, 属于钠/葡萄糖协同转运体家族。NIS 主要表达于甲状腺滤泡上皮细胞, 另外在唾液腺、泪腺、胃黏膜、脉络丛、乳腺、卵巢等非甲状腺组织也有低表达^[1]。在某些甲状腺疾病如

Graves 病患者甲状腺组织中, NIS 的表达量显著超过正常组织。NIS 的功能主要是通过转运细胞外相对稀少的碘离子进入甲状腺细胞, 而能使胞内碘浓度超过血浆碘浓度的 20~40 倍。我们采用 RT-PCR 方法从 Graves 病患者的甲状腺组织扩增出 NIS, 因为扩增序列较长, 采用一对引物均未能扩增出 NIS 基因片段, 故选用重叠 PCR 方法扩增。考虑到重叠 PCR 引起扩增序列突变概率增加, 我们选用了 Pfu DNA 聚合酶以减少错配或插入引起的碱基突变, 结果得到与参考序列完全一致的 hNIS 编码序列。扩增序列为 NIS 基因的 CDS 序列 (+348 ~ +2 279), 碱基数为 1 932 bp, 含有完整的阅读框架, 编码 643 个氨基酸蛋白质。

随着对 NIS 深入研究, 人们不再局限于 NIS 在甲状腺疾病包括甲状腺癌的诊断及治疗中运用^[2,3], 众多的研究^[4-7]已经表明运用 NIS 介导的核素放射治疗非甲状腺肿瘤已成为可能。Dwyer 等^[8,9]利用肿瘤相关抗原的特异性启动子驱动 NIS 在乳腺癌及卵巢癌细胞内靶向表达, 并结合 ^{131}I 治疗肿瘤取得了较好的效果。我们用脂质体方法转染重组质粒 pDC316- MCMV/hNIS 进入胰腺癌细胞株 CAPAN-2、PANC-1 和卵巢癌细胞株 SK- OV-3, 运用 RT-PCR 方法检测出转染的肿瘤细胞内有 hNIS 的 mRNA 的高水平表达, 而空白组 pDC316 转染肿瘤细胞后无 hNIS 的 mRNA 表达或极低表达。 ^{125}I 吸收试验表明 pDC316- MCMV/hNIS 转染后的 3 种肿瘤细胞都有较高水平的吸碘, 且在转染后第 3 天吸碘达到高峰, 实验组细胞对 ^{125}I 吸收量是空白组的 13 倍以上。同时, 这种高水平吸碘 ^{125}I 能够被 hNIS 功能抑制剂 KClO_4 所抑制。这充分说明了 hNIS 转染肿瘤细胞后能正常表达和发挥吸碘的功能, 为进一步 ^{131}I 治疗肿瘤的研究打下基础。

目前, 所有的基因治疗载体均难以转导肿瘤全部的细胞, 尤其是在体内, 因此人们试图赋予治疗基因以“旁观者效应”, 从而使未转导的肿瘤细胞也得以被杀灭。由于 ^{131}I 等核素发射的 β 粒子射程达数毫米, 因此, 联合应用 NIS 和放射性核素治疗肿瘤具有明显的优势^[10]。并且 hNIS 基因转导整合了体内基因表达显像和基因靶向性放射性核素治疗的潜能, 通过治疗前的精确剂量计算可实现放射性核素治疗用量的个体化。因此, 我们如果能找到适合的特异性启动子驱动 NIS 基因在肿瘤细

(下转第 407 页 to page 407)

- Natl Acad Sci, 2002, 99(10):7160- 7165.
- [3] TAAL MW,ZANDI - NEJAD K,WEENING B, et al. Proinflammatory gene expression and macrophage recruitment in the rat remnant kidney [J]. *Kidney Int*, 2000,58(4):1664- 1676.
- [4] MORIYAMA T, KAWADA N, NAGATOYA K, et al. Fluvastatin suppresses oxidative stress and fibrosis in the interstitium of mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction [J]. *Kidney Int*,2001,59 (6):2095- 2103.
- [5] 申洪.免疫组织化学染色定量方法研究[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*,1995, 4(1):89- 91.
- [6] 高修仁,彭龙云,曾群英,等.充血性心衰 ACEI 治疗中醛固酮逃逸现象与心率变异的研究[J]. *中山大学学报·医学科学版*, 2003, 24 (3) :277- 280.
- [7] DELANO F A, SCHMID - SCHONBEIN G W. Enhancement of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor density in the microcirculation of the spontaneously hypertensive rat [J]. *Microcirculation*, 2004, 11(1): 69- 78.
- [8] DE RESENDE M M, KAUSER K, MILL J G. Regulation of cardiac and renal mineralocorticoid receptor expression by captopril following myocardial infarction in rats [J]. *Life Sci*, 2006, 78(26):3066- 3073.
- [9] MASSAAD C, LOMBE S M, AGGERBECK M, et al. Cell - specific, promoter - dependent mineralocorticoid agonist activity of spironolactone [J]. *Mol Pharmacol*, 1997, 51(2): 285- 292.
- [10] RAHMOUNI K, SIBUG R M, DE KLOET, et al. Effects of brain mineralocorticoid receptor blockade on blood pressure and renal functions in DOCA - salt hypertension [J]. *Eur J Pharmacol*, 2002, 436(3):207- 216.
- [11] LAI L Y, GU Y, CHEN J, et al. Production of aldosterone by rat mesangial cell and the accumulation of extracellular matrix induced by aldosterone[J]. *中华医学杂志*, 2003, 83(21):1900- 1905.

(编辑 孙慧兰)

(上接第 386 页 from page 386)

胞内靶向表达,则可能实现肿瘤的靶向性放射性核素治疗。

参考文献:

- [1] 陈立波,朱瑞森.NIS在肿瘤核素基因显像与治疗中的应用研究[J].*国外医学:放射医学核医学分册*,2005, 29(2):70- 73.
- [2] 张一帆,李彪,赵龙,等.杆状病毒介导 NIS 基因放射治疗甲状腺癌的实验研究[J]. *中华核医学杂志*, 2004,24 (5):264- 267.
- [3] BOLAND A, RICARD M, OPOLON P, et al. Adenovirus - mediated transfer of the thyroid sodium/iodide symporter gene into tumors for a targeted radiotherapy[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(13): 3484- 3492.
- [4] FAIVRE J, CLERC J, GEROLAMI R, et al. Long - term radioiodine retention and regression of liver cancer after sodium iodide symporter gene transfer in wistar rats [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(21):8045- 8051.
- [5] SCHOLZ I V, CENGIC N, BAKER C H, et al. Radioiodine therapy of colon cancer following tissue - specific sodium iodide symporter gene transfer [J]. *Gene Ther*, 2005, 12(3): 272- 280.
- [6] MITROFANOVA E, UNFER R, VAHANIAN N, et al. Rat sodium iodide symporter for radioiodine therapy of cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2004,10(20):6969- 6976.
- [7] 陈立波,黄芳,费俭,等. hNIS 基因转导黑色素瘤细胞介导 ¹²⁵I 摄取的实验研究 [J]. *中华核医学杂志*, 2003,23 (2):72- 75.
- [8] DWYER R M, BERGERT E R, O CONNOR M K, et al. In vivo radioiodide imaging and treatment of breast cancer xenografts after MUC1 - driven expression of the sodium iodide symporter[J]. *Clin Cancer Res*, 2005,11 (4):1483- 1489.
- [9] DWYER R M, BERGERT E R, O CONNOR M K, et al. Sodium iodide symporter - mediated radioiodide imaging and therapy of ovarian tumor xenografts in mice[J]. *Gene Ther*, 2006, 13(1):60- 66.
- [10] CARLIN S, MAIRS R J, WELSH P, et al. Sodium - iodide symporter (NIS) - mediated accumulation of ²¹¹At - astatide in NIS - transfected human cancer cells [J].*Nucl Med Biol*,2002,29(7):729- 739.

(编辑 徐杰)