

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.17.011

人 SPOP 真核表达质粒的构建及其在胃癌细胞中的表达^{*}

曾春艳¹, 罗时文^{2△}

(南昌大学第一附属医院:1. 肿瘤科;2. 科研中心,南昌 330006)

[摘要] **目的** 构建人 pUB6/V5-HisB-SPOP 真核表达质粒及稳定表达外源性人 SPOP 基因的人胃癌 AGS 细胞系。**方法** 采用基因重组技术将人 SPOP cDNA 插入真核表达载体 pUB6/V5-HisB,构建人 pUB6/V5-HisB 真核表达质粒。脂质体介导空载体 pUB6/V5-HisB 和表达质粒 pUB6/V5-HisB-SPOP 分别转染人胃癌 AGS 细胞株,杀稻瘟菌素筛选阳性克隆,扩大培养,逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测 SPOP mRNA 和蛋白表达。**结果** 双酶切和基因测序结果均证实人 pUB6/V5-HisB-SPOP 真核表达质粒构建成功。SPOP 转染组与空白对照组、空载体组比较,SPOP 蛋白表达显著上调($P<0.05$)。**结论** 成功构建人 SPOP 真核表达质粒并获得稳定表达 SPOP 基因的胃癌 AGS 细胞系,为进一步研究 SPOP 基因在胃癌发生发展中作用奠定实验基础。

[关键词] 胃肿瘤;SPOP;AGS 细胞;基因表达

[中图分类号] R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)17-2335-03

The construction of SPOP-V5/His and cell model with up-regulation of SPOP in human gastric cancer cell line AGS^{*}

Zeng Chunyan¹, Luo Shiwen^{2△}

(1. Department of Oncology;2. Center for Experimental Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[Abstract] **Objective** To construct human speckle-type POZ protein(SPOP) expression plasmid SPOP-V5/His and cell model with up-regulation of SPOP in human gastric cancer cell line AGS. **Methods** SPOP-V5/His was constructed by use of recombinant DNA technique and was demonstrated by restriction endonuclease mapping. SPOP-V5/His and pUB6/V5-HisB vector as control were transfected into human gastric cell line AGS by using Lipofectamine 2000 for screening stable cell lines. The positive clones were selected by blasticidin, Western blot was used to detected the expression of SPOP. **Results** Eukaryotic expression plasmid SPOP-V5/His was successfully constructed and confirmed by restriction endonuclease digestion and sequencing. Western blot showed the level of SPOP in gastric cancer cell line AGS transfected with SPOP-V5/His was significantly increased compared with control. **Conclusion** We successfully constructed cell models with up-regulation of SPOP in human gastric cancer cell line AGS which is important for our further study on the role of SPOP in the development of gastric cancer.

[Key words] stomach neoplasms;SPOP;AGS;gene expression

SPOP(speckle-type POZ protein)为一种具有特异性的泛素化 E3 连接酶,同样也是一个重要的肿瘤抑制蛋白^[1]。在肿瘤细胞和小鼠动物试验中都表现出了显著抑制肿瘤生长和扩散的功能,研究发现 SPOP 作为泛素连接酶是通过泛素化和降解恶性肿瘤蛋白 SRC-3/AIB1 在肿瘤中的水平,从而起到抑制肿瘤的功能^[2]。SPOP 蛋白主要由 374 个氨基酸残基组成,含有 3 个结构区,N 端结合底物的 MATH 结构(氨基酸残基 28~166 位);中间结合 Cul 的 BTB 结构(氨基酸残基 190~297 位)及 C 端主要的其核定位/移位所需的序列(氨基酸残基 365~374 位)^[3]。本研究将运用分子生物学方法,构建 SPOP 真核表达质粒(PUB6/V5-HisB-SPOP)并将其转染入人胃癌 AGS 细胞系中,利用杀稻瘟菌素筛选,从而获得稳定表达 SPOP 蛋白的 AGS 细胞系,为进一步研究 SPOP 基因在胃癌发生发展中作用。

1 材料与方 法

1.1 材料 人胃癌 AGS 细胞株购于中科院上海细胞研究中

心;空载质粒 pUB6/V5-HisB、杀稻瘟菌素、总 RNA 提取液(Trizol)、逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)试剂盒及脂质体 Lipofectamine2000 试剂盒为美国 Invitrogen 公司产品;DNA marker、cDNA 文库(human brain)、胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒均为 TaKaRa 公司产品;T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Kpn* I、*Not* I 酶均为 NEB 公司产品;兔抗人 SPOP 抗体为 Proteintech 公司产品;鼠抗人 β -actin 抗体为 Santa Cruz 公司产品;SPOP 引物合成由美国 Invitrogen 公司完成;基因鉴定测序由北京诺赛基因公司完成。

1.2 方 法

1.2.1 检测胃癌细胞系 SPOP 表达,确定胃癌细胞株 检测胃癌细胞株 AGS,SGC-7901,MKN-28,MKN-45 及一株正常永生化胃黏膜上皮细胞株 GES-1 中 SPOP 的表达情况,Western blot 结果显示 SPOP 蛋白在 5 株细胞株中表达,SPOP 蛋白在胃癌细胞系 AGS 中表达最低,为后续实验选择细胞系做准备。

^{*} 基金项目:江西省研究生创新专项资金(YC2011-B007)。 作者简介:曾春艳(1983—),主治医师,博士,主要从事肿瘤基础与临床研究。

[△] 通讯作者,Tel:(0791)88692139;E-mail:shiwenluo@ncu.edu.cn。

1.2.2 引物设计 根据 GenBank 查询人 SPOP 的 cDNA 序列(NM_001007226),全长 1 125 bp,设计引物序列如下:正向 5'-GCG CGG TAC CAT GTC AAG GGT TCC AAG TCC TCC AC-3',反向 5'-GCG CGC GGC CGC CGG ATT GCT TCA GGC GTT T-3',含酶切位点 *Kpn* I, *Not* I。

1.2.3 人 SPOP 真核表达质粒的构建 先利用人脑 cDNA 文库 PCR 获得 SPOP 全长片段(1 125 bp),获得目的带进行胶回收纯化。将 pUB6/V5-HisB 载体及胶回收并纯化的 SPOP PCR 产物分别进行双酶切,置于 37 °C 孵育箱 1 h。酶切产物 PCR 电泳,目的条带进行胶回收纯化。最后 pUB6/V5-HisB 质粒加入 Elution Buffer 溶解,SPOP 产物加入 12 μ L Elution Buffer 溶解,利用分光光度计检测质粒浓度,将上述胶回收酶切产物进行连接反应,4 °C 冰箱连接过夜。取连接产物转化感受态细胞 XL-blue,37 °C 培养 12~16 h。观察是否长斑,挑菌落进行质粒验证并测序。

1.2.4 稳转表达 SPOP 细胞系的构建

1.2.4.1 筛选稳转细胞系的杀稻瘟菌素最适合的浓度 将 AGS 细胞传至 6 孔板生长,细胞生长至 80% 左右时,在培养基内加入不同浓度杀稻瘟菌素(0、1.0、3.0、5.0、7.5、10.0 μ g/mL);隔日更换含相应浓度的杀稻瘟菌素的培养基 1 次,对该抗生素敏感的细胞会变圆并漂浮起来;定期进行细胞计数以确定杀稻瘟菌素的最佳浓度,也可选择在 14 d 时造成细胞全部死亡的浓度。

1.2.4.2 PUB6/V5-HisB-SPOP 质粒的处理 首先,扩增 PUB6/V5-HisB-SPOP 质粒提取。紫外分光光度计测定质粒纯度和浓度。其次,线性化重组质粒:EP 管中加入 PUB6/V5-HisB-SPOP 质粒 200 μ L, *Ssp* I 5 μ L, Green Buffer 10 μ L 后放入 37 °C 孵育箱过夜。线性化后琼脂糖凝胶电泳,回收,用灭菌水洗脱。

1.2.4.3 PUB6/V5-HisB-SPOP 表达质粒瞬时转染 AGS 细胞 转染前 1 天将 AGS 细胞于 3×10^5 /孔接种于 6 孔板,使次日细胞汇合达 80%~90%,分为 SPOP 转染组、空白对照组及空载体组;转染前更换培养基,配制溶液 1:240 μ L 无血清培养基+10 μ L Lipofectamine 2000,室温放置 5 min;配制溶液 2:无血清培养基+2 μ g 质粒,共 250 μ L;将溶液 1 和 2 轻轻吹打混匀后,室温孵育 20 min;将 6 孔板中的细胞用无血清培养基轻轻冲洗 2 遍,将混合的液体缓慢滴入 6 孔板中,轻轻摇动培养板,前后左右混匀,置 37 °C、5% CO₂ 孵育箱继续培养,6 h 后更换含有血清的 DMEM 培养基;更换培养基后 24 h 进行杀稻瘟菌素筛选。

1.2.4.4 稳定转染 首先决定杀稻瘟菌素杀死转染的宿主细胞的最小浓度。经过浓度的筛选验证,本实验选择杀稻瘟菌素 7.5 μ g/mL 的浓度。转染后 24 h,消化细胞,按 1:10 的比例传代接种,待细胞贴壁后加入含杀稻瘟菌素(7.5 μ g/mL)培养基中,以后每 2 天换液 1 次,直至倒置显微镜下观察细胞岛的形成(即见抗性克隆形成)。待细胞岛长至足够大时挑取细胞岛,转移到 24 孔板常规培养,待 24 孔板中细胞长满至 80%~90%后,扩增至 6 孔板中继续培养,再逐步转至 T25 培养瓶中培养。蛋白免疫印迹法(Western blot)验证细胞 SPOP 的表达。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 描述,进行 Student's *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异

具有统计学意义。

2 结 果

2.1 PUB6/V5-HisB-SPOP 重组质粒的酶切鉴定 经 *Kpn* I 和 *Not* I 双酶切,PUB6/V5-HisB-SPOP 重组质粒在 1% 琼脂糖电泳后,出现两个片段,分别在 5.5 kb (pUB6/V5-HisB 载体)和 1.1 kb(SPOP)左右位置(红色箭头所指),见图 1。重组质粒 PUB6/V5-HisB-SPOP 由上海诺赛基因公司测序后经 NCBI 基因 BLAST 比对,与 GenBank 中人 SPOP (NM_001007226)的核苷酸序列完全一致。

2.2 SPOP 表达载体构建验证 PUB6/V5-HisB-SPOP 测序正确后,脂质体转染胃癌 AGS 细胞株,杀稻瘟菌素筛选后,Western blot 检测 SPOP 表达,发现转染组 SPOP 的表达水平显著高于空白对照组和空载体对照组(以空白对照对照组为 1,转染 2、3 组分别升高 2.3、3.8 倍), $P < 0.05$,验证了稳定转染表达 SPOP 细胞系构建成功,见图 2。

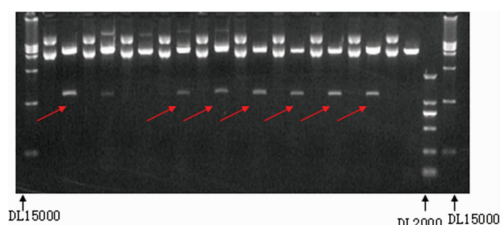
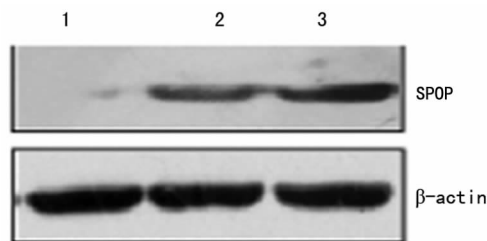


图 1 SPOP-V5/His 酶切电泳



1:空载体组;2、3,转染组。

图 2 Western blot 验证检测稳转细胞系

3 讨 论

胃癌是全世界发病率和病死率均非常高的恶性肿瘤,全球近半数胃癌发生在我国,并且近年来发病呈年轻化的趋势^[4]。研究表明胃癌与 Hh/Gli 信号通路的异常激活可能有关^[5-7],但其具体的分子机制目前尚不清楚。存在 SHh 配体时,Hedgehog 配体的作用是将 Gli 分子从转录抑制因子变成激活因子^[8-10]。Gli 蛋白是 Hh/Gli 信号通路的终端效应因子,有研究认为有时 Gli3 也可表现为激活该信号通路的活性,但更多认为 Gli2 是 Hedgehog 信号通路激活的初级信号,并起着将激活信号放大并传递至 Gli1(二级激活信号)的作用^[11]。正常情况下,SuFu 和 SPOP 通过竞争结合 Gli2 及 Gli3,使其量保持一定的浓度^[12-14]。SPOP 蛋白是一个泛素化连接酶,介导 Gli2 及 Gli3 全长蛋白的降解。该基因位于人染色体 17q21 位点,在肿瘤细胞中具有高缺失率及杂合性丢失(LOH)现象。在肿瘤细胞和小鼠动物实验中都表现出了显著抑制肿瘤生长和扩散的功能,研究发现 SPOP 作为泛素连接酶是通过泛素化和降解恶性肿瘤蛋白 SRC-3/AIB1 在肿瘤中的水平,从而起到抑制肿瘤的功能^[2],SRC-3/AIB1 同样也是一个重要的肿瘤抑制蛋白,其有望成为胃癌等肿瘤诊断一个重要指标^[1]。SPOP 可以抑制脑胶质瘤细胞的增殖与侵袭,并与胶质瘤的预后相关^[15],在

前列腺癌中有较高的突变率^[16]。*SPOP* 作为一个抑癌基因，是否可以通过促进 Gli2 蛋白全长降解或抑制 Gli2 全长蛋白的入核，从而使得 Hh/Gli 信号通路受到抑制？

为了研究 *SPOP* 是否通过介导 Hh/Gli 信号通路参与胃癌的发生发展，本研究利用基因转染技术成功构建 *SPOP* 表达质粒 PUB6/V5-HisB-*SPOP*，并将其转入靶细胞胃癌 AGS 细胞系，成功构建稳定表达 *SPOP* 的细胞模型以便研究 *SPOP* 在胃癌细胞中的功能。

本研究中表达质粒采用的载体是 pUB6/V5-HisB，选择酶切位点 *Kpn* I 和 *Not* I，先 PCR 法获得 *SPOP* 基因全长，双酶切接入载体，成功构建表达质粒 PUB6/V5-HisB-*SPOP*。为了构建稳转表达 *SPOP* 的胃癌细胞系，将表达质粒 PUB6/V5-HisB-*SPOP* 转染入胃癌细胞系 AGS，根据 pUB6/V5-HisB 载体上有 BSD 耐受基因，作者选择杀稻瘟菌素进行反复筛选，以便得到稳定表达 *SPOP* 的同源细胞系，用于后续观察。

总之，本研究成功构建 PUB6/V5-HisB-*SPOP* 表达质粒，并成功筛选出稳定表达外源性人 *SPOP* 基因的胃癌 AGS 细胞系，为进一步研究 *SPOP* 对胃癌细胞生物学行为实验研究及为胃癌发生发展的研究奠定基础。

参考文献

- [1] Liu J, Ghanim M, Xue L, et al. Analysis of drosophila segmentation network identifies a JNK pathway factor over-expressed in kidney cancer[J]. Science, 2009, 323(5918): 1218-1222.
- [2] Li C, Ao J, Fu J, et al. Tumor-suppressor role for the *SPOP* ubiquitin ligase in signal-dependent proteolysis of the oncogenic co-activator SRC-3/AIB1 [J]. Oncogene, 2011, 30(42): 4350-4364.
- [3] Zhuang M, Calabrese MF, Liu J, et al. Structures of *SPOP*-Substrate complexes; insights into molecular architectures of BTB-Cul3 ubiquitin ligases[J]. Mol Cell, 2009, 36(1): 39-50.
- [4] Han ME, Lee YS, Baek SY, et al. Hedgehog signaling regulates the survival of gastric cancer cells by regulating the expression of Bcl-2[J]. Int J Mol Sci, 2009, 10(7): 3033-3043.
- [5] Shiotani A, Kamada T, Yamanaka Y, et al. Sonic hedgehog and CDX2 expression in the stomach[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2008, 23(2): S161-166.

- [6] Wan J, Zhou J, Zhao H, et al. Sonic hedgehog pathway contributes to gastric cancer cell growth and proliferation [J]. Biores Open Access, 2014, 3(2): 53-59.
- [7] Yan RW, Peng X, Yuan XG, et al. Suppression of growth and migration by blocking the hedgehog signaling pathway in gastric cancer cells[J]. Cell Oncol (Dordr), 2013, 36(5): 421-435.
- [8] Eaton S. Multiple roles for lipids in the Hedgehog signaling pathway[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9C(6): 437-445.
- [9] Wang Y, McMahon AP, Allen BL. Shifting paradigms in Hedgehog signaling[J]. Curr Opin Cell Biol, 2007, 19(2): 159-165.
- [10] Wilson CW, Chuang PT. New "hogs" in hedgehog transport and signal reception[J]. Cell, 2006, 125(3): 435-438.
- [11] Ruiz Altaba A, Mas C, Stecca B. The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer [J]. Trends Cell Biol, 2007, 17(9): 438-447.
- [12] Chen MH, Wilson CW, Li YJ, et al. Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved [J]. Genes Dev, 2009, 23(16): 1910-1928.
- [13] Wang C, Pan Y, Wang B. Suppressor of fused and Spop regulate the stability, processing and function of Gli2 and Gli3 full-length activators but not their repressors [J]. Development, 2010, 137(12): 2001-2009.
- [14] Ruel L, Théron PP. Variations in Hedgehog signaling: divergence and perpetuation in Sufu regulation of Glii [J]. Genes Dev, 2009, 23(16): 1843-1848.
- [15] Ding D, Song T, Jun W, et al. Decreased expression of the *SPOP* gene is associated with poor prognosis in glioma [J]. Int J Oncol, 2015, 46(1): 333-341.
- [16] Garcia-Flores M, Casanova-Salas I, Rubio-Briones J, et al. Clinico-pathological significance of the molecular alterations of the *SPOP* gene in prostate cancer[J]. Eur J Cancer, 2014, 50(17): 2994-3002.

(收稿日期: 2014-11-08 修回日期: 2015-03-14)

(上接第 2334 页)

质形态学改变与年龄的相关研究[J]. 中华心血管病杂志, 1995, 23(4): 288-291

- [10] 宋一璇, 胡小领, 姚青松, 等. 人窦房结胶原纤维比例与分型年龄变化的研究[J]. 解剖学杂志, 2000, 23(4): 306-308.
- [11] 李娜娜, 王庆志, 周立, 等. 动脉粥样硬化致兔窦房结起搏细胞和细胞间质脂质浸润[J]. 中国临床解剖学杂志, 2011, 29(4): 433-435.
- [12] 王超群, 梁栋. 窦房结间质增生与年龄及右冠状动脉病变程度的关系[J]. 中国法医学杂志, 2010, 25(6): 395-397.
- [13] Larson ED, St Clair JR, Sumner WA, et al. Depressed

pacemaker activity of sinoatrial node myocytes contributes to the age-dependent decline in maximum heart rate [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(44): 18011-18016.

- [14] 杨晓梅, 杨琳, 孙超峰, 等. 兔窦房结 HCN2 通道蛋白表达的不均一性和增龄性变化[J]. 中华心律失常学杂志, 2005, 4(4): 295-299.
- [15] 王超群, 包义喜, 陈飞, 等. 人窦房结缝隙连接蛋白 cx43 表达的增龄性变化[J]. 中国医药指南, 2012, 10(33): 234-235.

(收稿日期: 2014-10-25 修回日期: 2015-02-28)