

网络出版时间: 2017-5-20 11:13 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170520.1113.013.html>

TMEM88 真核表达质粒的构建及其功能研究

倪升丽¹ 胡富勇¹ 李增² 孟晓明² 王学富² 徐涛²

摘要 目的 构建 TMEM88 的真核表达质粒,并研究其对肝癌细胞增殖和凋亡的影响。方法 提取人肝星状细胞的总 RNA,逆转录成 cDNA 作为模板,利用 PCR 法扩增出 TMEM88 的 CDS 序列,双酶切后连接到 pEGFP-C2 载体上,然后进行转化、质粒抽提、酶切鉴定,最后挑取阳性克隆送生物公司测序。将 pEGFP-C2-TMEM88 真核表达质粒分别转染至人肝癌细胞株 SMMC-7721 中,通过 MTT 实验和流式细胞术检测其对细胞增殖和凋亡的影响。结果 测序结果显示 pEGFP-C2-TMEM88 真核表达质粒构建成功;MTT 实验结果显示,过表达组细胞的增殖率为 (0.625 ± 0.07) ,显著低于正常组的 (0.880 ± 0.09) ($P < 0.05$);流式细胞术结果显示,过表达组细胞的凋亡率为 22.1%,显著高于正常组的 9.1%。结论 TMEM88 能够显著抑制人肝癌细胞株 SMMC-7721 的增殖,并促进其凋亡,为进一步了解 TMEM88 的功能、寻求肝癌治疗的新方向奠定了基础。

关键词 TMEM88;转染;增殖;凋亡

中图分类号 R 349.65

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)06-0839-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.06.013

肝癌是一种常见的消化系统肿瘤,具有恶性程度高、发病率和死亡率高等特点,流行病学调查数据^[1-4]显示,肝癌位居肿瘤发病率的第 5 位,死亡率

更是高达第 3 位,仅次于胃癌和肺癌,因此寻找肝癌行之有效的治疗方法至关重要。近年来,基因工程技术快速发展,为医学研究和疾病治疗开辟了崭新的道路^[5]。TMEM88 定位在 17 号染色体的 p13.1,其 CDS 序列长度为 477 bp,编码由 159 个氨基酸残基组成,分子量约为 17 ku 的蛋白, TMEM88 是一种跨膜两次的蛋白,两个跨膜结构域分别由 43-63、88-108 位氨基酸残基组成,其在人类组织中广泛表达,且在其 C 端存在着 V-W-V 序列,能够结合 DVL 蛋白的 PDZ 结构域,从而破坏 DVL 和 LRP5/6、Frizzles 等的结合,抑制 Wnt/ β -catenin 经典通路,进而发挥其生物功能^[6-9]。目前,对于人恶性肿瘤细胞中 TMEM88 的表达、亚细胞定位以及潜在分子机制的研究还比较有限^[10]。该研究将通过构建 TMEM88 的真核表达载体,研究其对肝癌细胞增殖和凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料 人肝星状细胞 LX-2、肝癌细胞 SMMC-7721、pEGFP-C2 载体、TG1 大肠杆菌感受态均由本实验室保存。TRIzol 裂解液(美国 Sigma 公司);PrimeSTAR Max 酶、DL 2000 DNA Marker(日本 TaKaRa 公司);EcoR I、Kpn I 内切酶、T4 连接酶、逆转录试剂盒(加拿大 Ferments 公司);胶回收试剂盒、质粒小抽试剂盒(美国 Axygen 公司);细胞凋亡试剂盒(上海 BestBio 公司);LipofectamineTM 2000(美国 Invitrogen 公司);DMEM 培养基、Opti-MEM、胎牛血清(美国 Gibco 公司);引物[生工生物工程(上海)股份有限公司]。

1.2 方法

2017-02-05 接收

基金项目:合肥市科技攻关计划项目(编号:合科[2015]163号-38);
安徽医科大学博士科研资助基金(编号:XJ201536);安徽
高校自然科学研究重点项目(编号:KJ2016A348)

作者单位:¹安徽医科大学附属合肥医院(合肥市第二人民医院)肿瘤放疗科,合肥 230011

²安徽医科大学药学院,合肥 230032

作者简介:倪升丽,女,主管护师;

徐涛,男,讲师,硕士生导师,责任作者,E-mail: xutao@ahmu.edu.cn

The ROC curve of ESR, CRP and tuberculosis modeling infection was analyzed at 56 days after operation. The area under the curve of ESR was 0.953, CRP was 0.927, significantly higher than 0.5, calculate the maximum cut point for the Youden index for the best screening point. The best screening point for ESR was 7.5 mm/h; the best screening point for CRP was 5 527.50 μ g/L. **Conclusion** ESR and CRP can reflect the infection and the progression of tuberculosis in rabbits. The 56th day after modeling can be used as a reliable index for screening rabbits with spinal tuberculosis.

Key words spinal tuberculosis; animal model; rabbits; erythrocyte sedimentation rate; C reactive protein

1.2.1 RNA 抽提和逆转录 培养人肝星状细胞 LX-2, 用 TRIzol 对细胞进行裂解(4 °C, 约 10 min), 并收集细胞至离心管中, 加三氯甲烷后剧烈混匀后 4 °C、14 000 r/min 离心 10 min, 取上层液体适量, 加入等体积的异丙醇充分混匀, 低温(-20 °C)静置 1 h 后 4 °C、14 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 用 75% 的乙醇溶液清洗沉淀后干燥 10 min, 并用无酶水溶解沉淀即得到 RNA, 然后用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录, 最后得到 cDNA。

1.2.2 质粒构建 提取人肝星状细胞 LX-2 的总 RNA, 逆转录成 cDNA 作为模板, 利用 PCR 的方法扩增出 TMEM88 的 CDS 序列, 上游引物序列: CCG-GAATTCCGGATGGCGGATGTCCCG; 下游引物序列: GGGGTACCCCTTAGACCCAGACCTTTCCT, 琼脂糖电泳后(约 30 min), 用胶回收试剂盒收集 PCR 产物, 然后用限制性内切酶 EcoR I 和 Kpn I 对纯化产物和 pEGFP-C2 载体进行双酶切(37 °C, 约 4 h), 并用 T4 连接酶对两者的酶切产物进行连接(16 °C, 约 12 h), 然后用感受态细胞(TG1)对连接产物进行转化和培养(37 °C, 约 10 h), 并挑取单克隆进行扩大培养(37 °C, 250 r/min, 约 10 h), 用质粒抽提试剂盒对菌液进行抽提, 并对质粒进行酶切鉴定, 最后将鉴定正确的质粒送生物公司测序。

1.2.3 质粒转染 本文采用的是脂质体转染法, 具体步骤如下: 分别用约 200 μl 的 Opti-MEM 转染液稀释 pEGFP-C2-TMEM88 质粒和 Lipofectamine™ 2000 脂质体, 充分混匀后静置 5 min, 然后将两者轻轻混匀, 静置 20 min 后加入细胞中, 培养 4~6 h 后更换成完全培养基继续培养。

1.2.4 Western blot 对细胞进行传代后重新接种至 25 cm² 的培养瓶中(细胞密度约为 1 × 10⁸/L), 培养过夜后转染约 5 μg pEGFP-C2-TMEM88 质粒, 继续培养 48 h 后, 收集细胞, 加入 500 μl RIPA 细胞裂解液, 冰上裂解 10 min, 高速离心 20 min(4 °C, 14 000 r/min)后收集上清液, 加入适量 SDS 上样缓冲液, 沸水浴 5 min 后冰上冷却即得到蛋白样品, 取适量样品进行 SDS-PAGE 电泳(80 V, 2 h)和电转(100 V, 1 h)后即得到 PVDF 膜, 封闭 1 h 后依次孵育 GFP 一抗(1:500)和二抗(1:5000), TBST 缓冲液洗膜后进行暗室显影。

1.2.5 MTT 实验 对细胞进行传代后重新接种至 96 孔培养板中(细胞密度约为 1 × 10⁸/L), 培养过夜后每孔转染约 100 ng pEGFP-C2-TMEM88 质粒, 约 48 h 后更换为无血清培养基, 然后加入 20 μl

MTT(5 g/L), 继续培养 4 h, 弃去培养基并加入 150 μl DMSO, 震荡混匀 10 min 后, 测定 492 nm 波长处的吸光度。

1.2.6 流式细胞术 对细胞进行传代后重新接种至 25 cm² 的培养瓶中, 培养过夜后转染约 5 μg pEGFP-C2-TMEM88 质粒, 约 48 h 后收集细胞, 并用 PBS 缓冲液清洗细胞数次, 然后加入 400 μl Binding Buffer 重悬细胞, 并加入 5 μl Annexin V 染液, 轻轻混匀后孵育 15 min(4 °C, 避光), 然后加入 10 μl PI, 轻轻混匀后 5 min(4 °C, 避光), 并用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.3 统计学处理 利用 SPSS 19.0 软件对统计数据进行分析, 计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 来表示, 组间对比采用 *t* 检验, 计数资料采用比例表示, 组间比较采用 χ^2 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pEGFP-C2-TMEM88 真核表达质粒构建成功

将抽提的质粒用 EcoR I 和 Kpn I 进行酶切鉴定, 结果显示, 质粒酶切之后出现两条带, 经过 Marker、pEGFP-C2 载体、TMEM88 PCR 产物的横向比较, 可以确定一条是载体 pEGFP-C2, 另一条是目的片段 TMEM88, 证明质粒成功连接, 后续的测序结果进一步表明 pEGFP-C2-TMEM88 质粒构建成功, 见图 1。

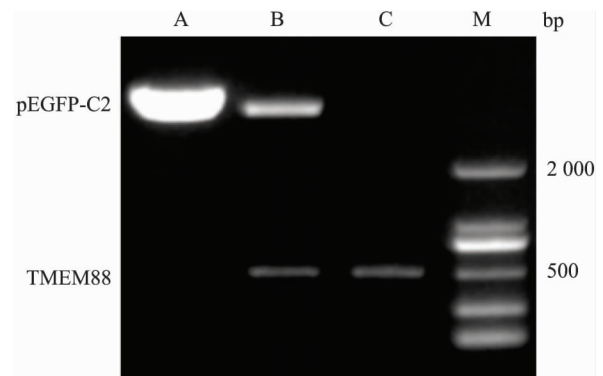


图 1 重组质粒 pEGFP-C2-TMEM88 的酶切鉴定

A: pEGFP-C2 空载体的酶切; B: 重组质粒的酶切; C: TMEM88 的 PCR 产物; M: DL2000 Marker

2.2 pEGFP-C2-TMEM88 真核表达质粒的表达

将 pEGFP-C2-TMEM88 表达质粒转染至肝癌细胞系 SMMC-7721 中, 利用 Western blot 检测其蛋白表达情况, 结果显示, 当用 GFP 抗体免疫印迹时, 过表达组在约 45 ku 的位置出现了条带, 大小与 GFP-TMEM88(27 ku + 17 ku) 基本一致, 而正常组未出现

任何条带表明 pEGFP-C2-TMEM88 能够表达成功, 见图 2。

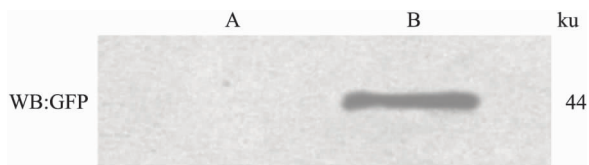


图2 重组质粒 pEGFP-C2-TMEM88 的蛋白表达

A: 未转染的 SMMC-7721 细胞裂解液; B: 转染 pEGFP-C2-TMEM88 的 SMMC-7721 细胞裂解液

2.3 TMEM88 对细胞增殖的影响 将 pEGFP-C2-TMEM88 表达质粒转染至肝癌细胞系 SMMC-7721 中, 利用 MTT 实验检测细胞增殖情况, 结果显示正常组的细胞增殖率为 (0.880 ± 0.09) , 过表达组的细胞增殖率为 (0.625 ± 0.07) , 显著低于正常组 ($P < 0.05$), 表明过表达 TMEM88 能够显著抑制人肝癌细胞株 SMMC-7721 的增殖。

2.4 TMEM88 对细胞凋亡的影响 将 pEGFP-C2-TMEM88 表达质粒转染至肝癌细胞系 SMMC-7721 中, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 结果显示, 正常组的细胞凋亡率为 9.1%, 过表达组的细胞凋亡率为 22.1%, 显著高于正常组 ($P < 0.05$) 表明过表达 TMEM88 能够显著促进人肝癌细胞株 SMMC-7721 的凋亡, 见图 3。

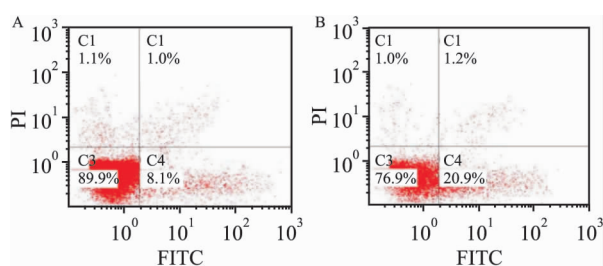


图3 正常组和过表达组流式细胞术检测结果

A: 正常组; B: 过表达组

3 讨论

肝癌的发病具有一定的地域性, 亚洲和非洲为高发区, 在我国的东南沿海地区, 每年确诊的肝癌患者就高达 30 余万人次, 占世界新发肝癌病例的一半以上, 而且近年来还呈现逐年递增的趋势, 因此我国面临着非常严峻的肝癌形势^[11-12]。TMEM88 在爪蟾属的胚胎细胞中定位于细胞膜上, 人类组织的基因芯片结果也显示, TMEM88 蛋白在胎盘中表达量最高, 且广泛分布于胚胎、肌肉、脾脏、心脏、肾脏、骨

骼等组织中。人类的 TMEM88 蛋白包括两种亚型, 即 CRA-a 和 CRA-b, CRA-a 即通常称之为 TMEM88, 蛋白大小约为 17 ku, 能够抑制经典的 Wnt 通路, 而 CRA-b 蛋白大小约为 25 ku, 由于其缺乏 VWV 序列, 不能与 DVL 发生相互作用, 本研究的 TMEM88 即为 CRA-a^[13-14]。

本研究首先构建了野生型 TMEM88 的真核表达质粒, 然后将质粒瞬时转染至肝癌细胞系, Western blot 结果显示质粒表达成功, TMEM88 真核质粒的成功构建和表达为接下来研究其在细胞增殖和凋亡中的功能奠定了基础。MTT 和流式细胞术的结果显示过表达 TMEM88 后 SMMC-7721 的增殖率显著降低, 而凋亡率则显著升高, 表明 TMEM88 能够抑制肝癌细胞的增殖, 并促进肝癌细胞的凋亡。TMEM88 之所以能发挥以上功能与 Wnt 信号通路有着密切的关系, TMEM88 能够通过其 C 端的 Val-Trp-Val 序列与 DVL 蛋白的 PDZ 结构域结合, 阻断了其与 Frizzled 家族蛋白及低密度脂蛋白受体相关蛋白等的结合, 从而发挥抑制 Wnt/ β -catenin 经典通路的功能。而 Wnt 信号转导通路是一个非常复杂的体系, 其中涉及许多生物分子, 它们共同参与、相互协同、彼此制约, 共同维持着体系的稳定, 是胚胎发育、调控细胞增殖和凋亡的关键途径。该途径一旦被异常激活, 可以启动 cyclin、c-myc、survivin、mmp-7 等下游靶基因的异常表达, 刺激细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 导致肿瘤的形成等, 因此 TMEM88 抑制增殖、促进凋亡的功能很可能是通过抑制 Wnt/ β -catenin 经典通路的活性来实现的。Wnt2b、Wnt3a、Wnt8c 等信号分子是 Wnt 通路信号转导的关键诱导者, 所以在今后的研究中, 可以进一步研究过表达 TMEM88 后对这些信号分子的影响, 进一步阐明其与 Wnt 通路之间的关系。

本研究成功构建了 TMEM88 的真核表达载体, 并确定了 TMEM88 能够显著抑制人肝癌细胞株 SMMC-7721 的增殖, 并促进其凋亡, 为进一步了解 TMEM88 的功能、寻求肝癌治疗的新方向奠定了基础。

参考文献

- [1] Parkin D M. Global cancer statistics in the year 2000 [J]. Lancet Oncol 2001 2(9):533-43.
- [2] 潘泽凤, 王宏宾. 原发性肝癌的诊断与治疗现状 [J]. 2015 28(9):359-60.
- [3] 郑访, 李良平. 代谢综合症与肝癌的流行病学研究 [J]. 实用医院临床杂志 2013 10(3):170-3.

- [4] 魏矿荣, 彭侠彪, 梁智恒, 等. 全球肝癌流行概况[J]. 中国肿瘤 2015 24(8):621-30.
- [5] 郭海涛, 何光志. 基因工程技术在医学中的应用[J]. 北方药学 2013 10(12):54-6.
- [6] Zhang X, Yu X, Jiang G, et al. Cytosolic TMEM88 promotes invasion and metastasis in lung cancer cells by binding DVLS [J]. *Cancer Res* 2015 75(21):4527-37.
- [7] Yu X, Zhang X, Zhang Y, et al. Cytosolic TMEM88 promotes triple-negative breast cancer by interacting with Dvl [J]. *Oncotarget*, 2015 6(28):25034-45.
- [8] Gao C, Chen Y G. Dishevelled: The hub of Wnt signaling [J]. *Cell Signal* 2010 22(5):717-27.
- [9] Palpant N J, Pabon L, Rabinowitz J S, et al. Transmembrane protein 88: a Wnt regulatory protein that specifies cardiomyocyte development [J]. *Development* 2013 140(18):3799-808.
- [10] de Leon M, Cardenas H, Vieth E, et al. Transmembrane protein 88 (TMEM88) promoter hypomethylation is associated with platinum resistance in ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol* 2016 142(3):539-47.
- [11] 陈建国. 中国肝癌发病趋势和一级预防 [J]. 临床肝胆病杂志, 2012 28(4):256-60.
- [12] 吴孟超. 肝癌在中国 [J]. 中华肝脏外科手术学电子杂志, 2012 1(1):3-4.
- [13] Lee H J, Finkelstein D, Li X, et al. Identification of transmembrane protein 88 (TMEM88) as a dishevelled-binding protein [J]. *J Biol Chem* 2010 285(53):41549-56.
- [14] Bernatik O, Ganji R S, Dijksterhuis J P, et al. Sequential activation and inactivation of Dishevelled in the Wnt/beta-catenin pathway by casein kinases [J]. *J Biol Chem* 2011 286(12):10396-410.

Construction of TMEM88 eukaryotic expression plasmid and its function research

Ni Shengli¹, Hu Fuyong¹, Li Zeng², et al

[¹Dept of Tumor Radiotherapy, The Affiliated Hefei Hospital of Anhui Medical University (The Second People's Hospital of Hefei), Hefei 230011; ²School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032]

Abstract Objective To construct the eukaryotic expression plasmid TMEM88, and study its effects on cell proliferation and apoptosis of liver cancer cells. **Methods** Extract total RNA of human hepatic stellate cells, reverse transcription into cDNA as templates, and obtain amplification TMEM88 CDS sequence by PCR, after connect to pEGFP-C2 carrier by using the double enzyme, and then make the conversion, plasmid extraction, and enzyme identification, finally take positive clones to be sequenced in biological company. pEGFP-C2-TMEM88 eukaryotic expression plasmid was transfected respectively to human liver cancer cell line SMMC-7721, then, MTT and flow cytometry methods were used to detect their effects on cell proliferation and apoptosis. **Results** The sequencing results showed that pEGFP-C2-TMEM88 eukaryotic expression plasmid was built successfully. MTT experiment results showed that the cell proliferation rate of transfection group was (0.625 ± 0.07) , was significantly lower than that of normal group (0.880 ± 0.09) ($P < 0.05$); Flow cytometry results showed that cell apoptosis rate of transfection group was 22.1%, significantly higher than that of normal group (9.1%). **Conclusion** TMEM88 can significantly inhibit the proliferation of human liver cancer cell line SMMC-7721, and promote its apoptosis, further understand the function of TMEM88, and lay a foundation for searching a new direction in the therapy of liver cancer.

Key words TMEM88; transfection; proliferation; apoptosis