

PDX1 真核表达载体的构建及其对 PANC-1 细胞 PI3K/AKT 信号途径的影响

栾康, 金锐, 刘莉, 罗欣, 张胜权

摘要 目的 构建胰腺十二指肠同源框蛋白 1 (PDX1) 基因真核表达载体并转染至 PANC-1 细胞, 观察其对 PI3K/AKT 信号途径的影响。方法 从 HeLa 细胞中提取总 RNA, 逆转后 PCR 扩增 PDX1 编码区片段, 然后将 PDX1 的 CDS 插入 PCMV6-Entry 质粒构建 PCMV6-Entry-PDX1 表达重组体。重组体转染至 PANC-1 细胞中通过 G418 筛选出稳定表达细胞株。Western blot 分析 PDX1 蛋白水平表达及 p-AKT 水平变化。结果 PDX1 基因成功在 PANC-1 中表达。利用 Western blot 检测验证获得了稳定的 PDX1 过表达细胞株。Western blot 结果显示: 过表达 PDX1 的细胞株 AKT 表达含量与正常细胞及对照细胞没有区别而 p-AKT 水平降低。结论 PDX1 基因过表达能够降低 PANC-1 细胞的 p-AKT 水平。

关键词 PDX1; 基因重组; PI3K/AKT 信号通路; PANC-1

中图分类号 R 735.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)02-0186-04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.02.007

胰腺癌包括胰腺内分泌细胞和外分泌细胞肿瘤。90% 以上的胰腺肿瘤起源于导管上皮细胞, 通常这类肿瘤也被成为胰腺癌^[1]。在肿瘤相关死因中胰腺癌位列第 4 位, 预后较差, 5 年生存率约 5%^[2]。胰腺癌发病机制目前仍不清楚, 可能与慢性胰腺炎、糖尿病等危险因素有关^[3-4]。胰腺十二指肠同源框蛋白 1 (pancreas and duodenum homeobox1, PDX1) 是决定胚胎内胚层时期胰腺发育

的关键性转录因子^[5]。研究^[6-7]表明在人类和小鼠胚胎发育过程中缺少 PDX1 基因会导致胰腺导管、内分泌细胞和外分泌细胞发育异常, 进而导致胰腺发育不全。在成年胰腺组织中, PDX1 主要存在胰腺 β 细胞中维持其生存及增殖^[8]。有些胰腺癌细胞系不表达 PDX1 蛋白, 因此推测 PDX1 可能在胰腺癌的发生发展中发挥作用。该研究通过建立 PDX1 过表达 PANC-1 细胞模型进而观察 PDX1 对胰腺癌细胞 PI3K/AKT 信号途径的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、细菌和细胞 PCMV6-Entry 质粒购自美国 Origene 公司; DH5α 感受态细菌购自北京天根生物公司; 人胰腺癌细胞 PANC-1 购自美国 ATCC 公司。

1.1.2 主要试剂 Asc I 和 Xho I 内切酶购自美国 NEB 公司; T4 连接酶、DNA Marker、TRIzol 试剂、PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit、PrimeSTAR® HS DNA Polymerase with GC Buffer 购自日本 TaKaRa 公司; PCR 引物由上海英骏生物公司合成; 质粒抽提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自美国 Promega 公司; Lipofectamine 3000 Transfection Reagent 购自美国 Invitrogen 公司; G418 和 DMEM 培养液购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自美国 Hyclone 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 NCBI Genbank 序列提供的人 PDX1 mRNA 序列利用 prime 6.0 软件设计引物, 序列如下: 上游引物: 5'-TTGGCGGCCATGAACG-

2016-11-28 接收

项目基金: 国家自然科学基金 (编号: 81271748)

作者单位: 安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 栾康, 男, 硕士研究生;

张胜权, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: sqz36@yahoo.com

sion, metastasis and invasion, etc. The involved signal pathways consisted of antigen processing and presentation, cytokine-cytokine receptor interaction, cell adhesion, complement and coagulation cascades, and so on. **Conclusion** The research on the potential target genes or mediated signal pathways regulated by ΔNp63α could be helpful to explain the development of cervical cancer.

Key words cervical cancer; gene expression profiles; ΔNp63α; quantitative real-time PCR

GCGAGGAGCAGTA-3'(带有 Asc I 酶切位点及保护碱基);下游引物:5'-CCGCTCGAGTCATCGTGGTTC-CTGCGGC-3'(带有 Xho I 酶切位点及保护碱基)。

1.2.2 **Hela 细胞培养及总 RNA 提取** 复苏 Hela 细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,待其状态良好,弃去培养液用 PBS 洗 3 次后加入 TRIzol 试剂放置在冰上裂解提取细胞总 RNA 并定量。

1.2.3 **RT-PCR 法检测** 利用逆转录试剂盒 Prime-Script™1st Strand cDNA Synthesis Kit 将总 RNA 转录成 cDNA。该方法分 2 步:① 加入 1 μl Oligo dT Primer, dNTP Mixture 1 μl, RNA 1 μg(体积 4 μl), 无 RNase 水 4 μl, 65 °C、10 min 并迅速放置在冰上;② 上述变性反应液中加入 5 × PrimeScript Buffer 4 μl, RNase Inhibitor(40 U/μl) 0.5 μl, PrimeScript RTase 1 μl, 无 RNase 水 4.5 μl。点动离心 30 °C、10 min, 42 °C、60 min, 70 °C、15 min。反应结束后将其放置在 -20 °C 备用。

1.2.4 **PCR 扩增 PDX1** 利用 PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase 扩增 PDX1。依次加入 2 × Prime-STAR GC Buffer 12.5 μl, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2 μl, 上游引物 1 μl, 下游引物 1 μl, cDNA 1 μl, PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/μl) 0.8 μl, 去离子水 6.7 μl。94 °C、5 min, 98 °C、10 s, 60 °C、5 s, 72 °C、1 min, 进行 35 个循环, 72 °C、10 min。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳并利用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物。

1.2.5 **真核表达载体构建** 将 PCMV6-Entry 和 PDX1 胶回收产物分别用限制性内切酶 Asc I 和 Xho I 在 37 °C 条件下双酶切 5 h。琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果并进行胶回收。回收的酶切产物按质粒和 PDX1 PCR 产物 1:9 的比例加入 T4 连接酶体系,在 16 °C 条件下连接过夜。将连接产物转化至 DH5α 感受态细菌中,并涂在含有 25 μg/ml 卡那霉素的 LB 平板上放置在 37 °C 培养箱中约 12 h,观察平板菌落并挑取单克隆菌落进行 PCR 和测序。将测序正确的重组菌扩大培养并提取质粒置 -80 °C 备用。

1.2.6 **重组质粒转染 PANC-1 细胞** 待 PANC-1 细胞生长良好时,将其种入 24 孔板,每孔 4 × 10⁴ 个细胞。待其汇合度在 80% 时先换成无抗生素无血清的 DMEM 并利用 Lipofectamine™ 3000 Transfection

Reagent 分别转染 PCMV6-Entry 和重组 PDX1 质粒,6 h 后换成完全 DMEM 培养基。48 h 后加入 800 ng/ml 的 G418 进行筛选,每 2~3 d 换 1 次培养基,2 周后可观察到空白对照组细胞全部死亡,而转染 PCMV6-Entry 和重组 PDX1 质粒仍有细胞存在说明转染成功。经胰酶消化后转入培养瓶中并加入 400 ng/ml 的 G418 进行培养。

1.2.7 **Western blot 法检测 PDX1 基因表达产物** 将 PANC-1 空白对照、PCMV6-Entry 和 PCMV6-PDX1 稳定转染的细胞提取细胞总蛋白利用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳。

1.2.8 **Western blot 法检测 AKT 1/2/3 和 p-AKT 表达含量** 将 PANC-1 空白对照、PCMV6-Entry 和 PCMV6-PDX1 稳定转染的细胞种入 24 孔板中,每孔 5 × 10⁴ 个细胞。培养 4 d 后提取总蛋白利用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳。

1.3 **统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 *t* 检验,多组均数比较采用方差分析。

2 结果

2.1 **PDX1 基因 CDS 的获取** 通从从 Hela 细胞中提取的 RNA 进行 RT-PCR 法检测,然后利用引物扩增出 PDX1 的 CDS。全长 852 bp(图 1A)。

2.2 **PDX1 真核表达载体的构建及鉴定** 获取 PDX1 基因全长后,经酶切、连接、转化。挑取单克隆菌落进行 PCR 及扩大培养后进行酶切。可以看出酶切质粒得到 5 000 bp 左右的 PCMV6-Entry 条带及 850 bp 左右的 PDX1 条带(图 1B)。质粒测序结果经 NCBI blast 比对显示序列正确(图 1C)。

2.3 **Western blot 法分析转染后 PDX1 基因在 PANC-1 中表达情况以及分析其对 PI3K-AKT 信号通路的影响** 未转染组、转染空质粒组、过表达组细胞接种 24 孔板,至 70% 融合时,收集细胞提取细胞总蛋白。3 组细胞各指标分别进行方差分析 ($F_{AKT} = 46.50$ 、 $F_{p-AKT} = 39.64$),各组方差均为齐性 ($P > 0.05$),对各指标进行两两比较,结果显示:过表达组与未转染组及转染空质粒组比较,PDX1 相对表达量明显上升,p-AKT 相对水平降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),AKT 相对表达量差异无统计学意义。见图 2。

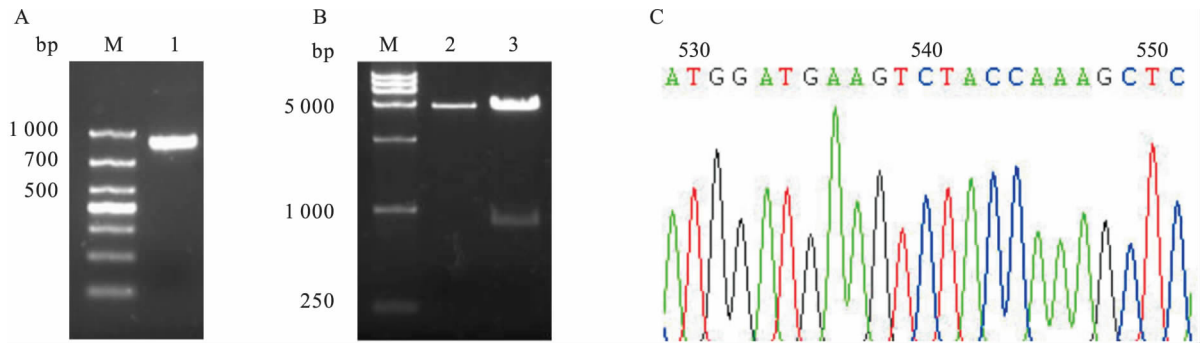


图1 PDX1 基因的扩增及重组质粒构建与鉴定

A: PDX1 基因 PCR 扩增图; B: PDX1 重组质粒酶切鉴定图; C: PDX1 重组质粒部分测序结果; M: DNA Marker; 1: PDX1 基因全长 PCR 产物; 2: 双酶切 PCMV6-Entry 质粒; 3: 双酶切 PDX1 重组质粒

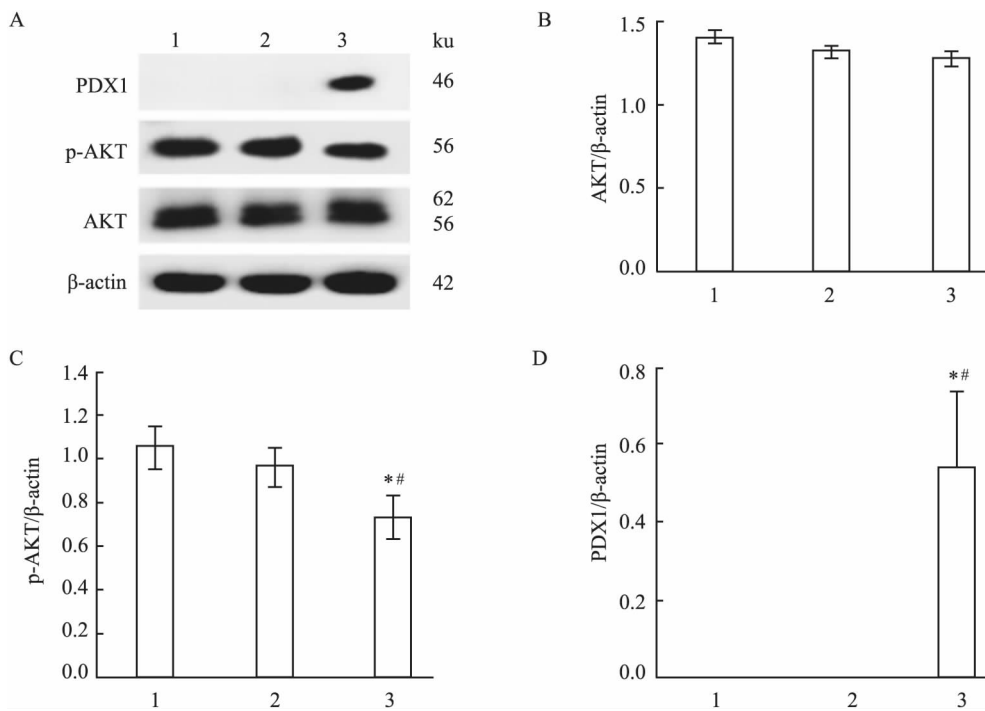


图2 Western blot 法分析 PDX1、AKT 及 pAKT 结果

1: 未转染组; 2: 转染空质粒组; 3: 过表达组; 与未转染组比较: * $P < 0.05$; 与转染空质粒组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

在胰腺发育过程中, PDX1 决定胚胎内胚层向胰腺祖细胞发展的机制, 目前还不是很清楚。由于其在胰腺中的关键作用, 许多研究试图利用 PDX1 将相应的组织和细胞重编程为胰腺细胞系。研究^[9-10]表明在人皮肤角质化细胞和人肝脏细胞中过表达 PDX1 细胞转变成胰腺 β 细胞并分泌胰岛素。PDX1 是胰腺发育中的关键性调节分子, 控制胰腺细胞的生长和分化, 而胰腺癌细胞的显著特点是低分化。因此, 在胰腺癌细胞中 PDX1 表达缺失

可能在发病中起一定作用, 本研究显示过表达 PDX1 下调 p-AKT 水平。PI3K-AKT 信号通路是细胞生存信号转导下游的共有途径, 该途径激活进而导致细胞增殖, 抑制细胞凋亡^[11-12]。AKT 是一个非常重要的信号中心, 其能与 100 多种下游物质结合进而发生作用, 例如: 能够与糖原合成酶激酶-3 (GSK-3) 结合促进葡萄糖的摄取及合成糖原来储存能量^[13]。该途径具有很重要的生理学功能, 在癌症中该途径活性上调。因此, PDX1 过表达可能调控胰腺癌细胞的生物学行为, 但其机制有待进一步研究。

综上所述,本研究成功建立 PDX1 过表达的 PANC-1 细胞模型,并初步显示 PDX1 能够下调 p-AKT 水平,为进一步研究 PDX1 在胰腺癌的作用奠定基础。

参考文献

- [1] Muniraj T, Jamidar P A, Aslanian H R. Pancreatic cancer: a comprehensive review and update [J]. *Dis Mon*, 2013, 59(11):368-402.
- [2] Arundhathi A, Chuang W H, Chen J K, et al. Prorenin receptor acts as a potential molecular target for pancreatic ductal adenocarcinoma diagnosis [J]. *Oncotarget*, 2016: [Epub ahead of print].
- [3] Raimondi S, Lowenfels A B, Morselli-Labate A M, et al. Pancreatic cancer in chronic pancreatitis: aetiology, incidence, and early detection [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2010, 24(3):349-58.
- [4] Bosetti C, Rosato V, Li D, et al. Diabetes, antidiabetic medications and pancreatic cancer risk: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium [J]. *Ann Oncol*, 2014, 25(10):2065-72.
- [5] Gu G, Dubauskaite J, Melton D A. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN³⁺ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors [J]. *Development*, 2002, 129(10):2447-57.
- [6] Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, et al. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice [J]. *Nature*, 1994, 371(6498):606-9.
- [7] Offield M F, Jetton T L, Labosky P A, et al. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum [J]. *Development*, 1996, 122(3):983-95.
- [8] Feanny M A, Fagan S P, Ballian N, et al. PDX-1 expression is associated with islet proliferation *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Surg Res*, 2008, 144(1):8-16.
- [9] Mauda-Havakuk M, Litichever N, Chernichovski E, et al. Ectopic PDX-1 expression directly reprograms human keratinocytes along pancreatic insulin-producing cells fate [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10):e26298.
- [10] Donelan W, Li S, Wang H, et al. Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (Pdx1) down-regulates hepatic transcription factor 1 alpha (HNF1 α) expression during reprogramming of human hepatic cells into insulin-producing cells [J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(6):995-1008.
- [11] Vivanco I, Sawyers C L. The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(7):489-501.
- [12] Fresno Vara J A, Casado E, de Castro J, et al. PI3K/AKT signaling pathway and cancer [J]. *Cancer Treat Rev*, 2004, 30(2):193-204.
- [13] Roberts M S, Woods A J, Dale T C, et al. Protein kinase B/AKT acts *via* glycogen synthase kinase 3 to regulate recycling of alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(4):1505-15.

Construction of eukaryotic expression vector of PDX1 gene and the effect of PDX1 on PI3K/AKT pathway in PANC-1

Luan Kang, Jin Rui, Liu Li, et al

(Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To construct eukaryotic expression vector of PDX1 gene, and study the effect of PDX1 on PI3K/AKT pathway in PANC-1. **Methods** Total RNA was isolated from Hela cell, followed by synthesis of complementary DNA (cDNA) and CDS of PDX1 gene was obtained by PCR. The expression vector of PCMV6-Entry-PDX1 was constructed by inserting the CDS of PDX1 into PCMV6-Entry plasmid, and then PANC-1 cell transfected with PCMV6-Entry-PDX1 was screened by G418 to get stable overexpression cells. Western blot was performed to detect the level of PDX1, p-AKT and AKT. **Results** PDX1 was expressed in PANC-1 cells successfully. The Western blot results showed that the expression level of AKT had no difference between PDX1 overexpression cells and control cells and vector cells, while the level of p-AKT decreased in PDX1 overexpression cells, compared with the control cells. **Conclusion** Overexpression PDX1 can decrease the level of p-AKT in PANC-1 cells.

Key words PDX1; genetic recombination; PI3K/AKT signaling pathway; PANC-1