

网络出版时间: 2015-12-30 14:38 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20151230.1438.004.html>

## 稳定表达 NLRC5 基因肝癌细胞株的建立

何莺华<sup>1</sup> 徐涛<sup>1</sup> 倪明明<sup>1</sup> 黄成<sup>1</sup> 李娟<sup>2</sup> 孟晓明<sup>1</sup> 李俊<sup>1</sup>

**摘要** 目的 建立起能够稳定表达 NLRC5 基因的肝癌 HepG2 细胞株。方法 设计遗传霉素(G418)的浓度梯度,通过对 HepG2 细胞筛选最终确定筛选药物浓度。将构建好的人源 pEGFP-C2-NLRC5 重组质粒利用脂质体介导法转染至 HepG2 肝癌细胞株中,用 G418 筛选出耐药阳性克隆。通过免疫荧光技术观察绿色荧光蛋白稳定表达情况,Western blot 法验证 NLRC5 蛋白表达情况。结果 G418 在 14 d 内使 HepG2 细胞全部死亡的最小浓度是 300 ng/ml。用 G418 筛选瞬转 pEGFP-C2-NLRC5 14 d 在荧光显微镜下可见耐药克隆的形成。Western blot 法检测显示,稳定过表达组 NLRC5 的蛋白水平比空质粒转染组高( $t = 15.356, P < 0.05$ )。结论 成功构建稳定表达 NLRC5 基因的肝癌细胞株,为进一步研究 NLRC5 基因在肝癌的体内实验奠定了基础。

**关键词** NLRC5; 肝癌; 稳定细胞株; HepG2

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)01-0005-04

肝细胞肝癌约占原发性肝癌的 90%,已成为全世界最常见的恶性肿瘤之一,其死亡率在肿瘤相关死因中位列第三<sup>[1]</sup>。而肝癌的发生、发展主要与肝脏慢性炎症等免疫反应所导致的肝细胞反复损伤与增生密切相关<sup>[2-3]</sup>,深入了解和掌握免疫反应的分子机制将为今后治疗与炎症相关的癌症提供帮助。天然免疫系统中的核苷酸结合寡聚结构域样受体(nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat containing receptors, NLRs)家族成员之一,NLR 家族含半胱氨酸天冬氨酸酶激活招募结构域 5(NOD-like receptor family CARD domain containing 5, NLRC5)蛋白分子,其在抗病毒免疫过程、炎症小体形成以及主要组织相容性复合体-1(major histocompatibility complex-1, MHC-I)分子基因转录过程中均有参与,但其具体的机制尚不能确定<sup>[4]</sup>。研究<sup>[5]</sup>显示 NLRC5 在人

肝星状细胞(LX-2)中能正向调节核转录因子  $\kappa$ B(nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B)/Smad3 通路介导白介素-6(interleukin-6, IL-6)和白介素-1 $\beta$ (interleukin-1 beta, IL-1 $\beta$ )的分泌,提示 NLRC5 在肝癌的发生发展中可能有所参与。该研究建立能够稳定过表达 NLRC5 的 HepG2 细胞株,为研究 NLRC5 在肝癌中的生物学功能奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 细胞系** 人肝癌细胞株 HepG2 由本实验室保存。

**1.1.2 主要试剂** 无内毒素质粒大提试剂盒(北京康为世纪生物有限公司);质粒小抽试剂盒(美国 AxyGen 公司);LB-Kana 液体培养基由本实验室配制;G418、Lipofectamine™ 2000、Opti-MEM(美国 Invitrogen 公司);PCR 扩增试剂盒、引物(上海生物工程公司);一抗(英国 Abcam 公司)。

#### 1.2 方法

**1.2.1 人源重组真核表达载体 pEGFP-C2-NLRC5 质粒抽提及鉴定** 取微量 pEGFP-C2 和 pEGFP-C2-NLRC5 质粒转化 DH5 $\alpha$  感受态细菌,将其涂布于 LB-Kana 琼脂培养基上,37℃倒置过夜,第 2 天挑取单个菌落接种于 8 ml LB-Kana 液体培养基,37℃、150 r/min 摇菌 14 h。20%甘油保留 1 ml 菌液,其余菌液用小抽试剂盒抽提质粒,琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性重组质粒菌液。将阳性重组质粒菌液扩大摇菌后使用去内毒素质粒大提试剂盒抽提质粒,琼脂糖凝胶电泳鉴定并测定其浓度,-20℃保存。

**1.2.2 确定 G418 筛选浓度** 取对数生长期的 HepG2 细胞,胰酶消化,计数板计数,12 孔板中每孔接种 1 000 个细胞。待细胞贴壁后,梯度加入 G418,其浓度分别是 100、200、300、400、500、600、700、800、900、1 000 ng/ml,37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养,每隔 1 d 更换 1640 完全培养基 1 次,对每孔细胞生长情况多进行观察。筛选 14 d 后,观察每孔细胞死亡情况,将全部杀死细胞的最小浓度确定为最终药物筛选浓度。

2015-10-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81473268、81202978);安徽省自然科学基金(编号:1308085MH145)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学药学院,合肥 230032

<sup>2</sup>合肥瑶海区长淮街道社区卫生服务中心,合肥 230011

作者简介:何莺华,女,硕士研究生;

李俊,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: lj@ahmu.edu.cn

**1.2.3 人源 pEGFP-C2-NLRC5 重组质粒转染人肝癌细胞系 HepG2** 将 HepG2 细胞消化重悬接种至 6 孔板中,置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养,待细胞融合生长至 70% ~80% 进行转染。将 1 μg 质粒和 5 μl Lipofectamine™ 2000 分别溶于 250 μl Opti-MEM 培养基中,孵育 5 min 后将两者混合,室温静置 20 min。无菌 PBS 洗涤细胞 2 次后每孔加入 1.5 ml Opti-MEM,再缓慢加入上述混合物,置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 6 h 后更换含 1640 完全培养液继续培养,24 h 后在荧光显微镜下观察转染情况并拍照,带有绿色荧光的细胞即为重组质粒转染成功的细胞,经 G418 筛选、单克隆后得到稳定过表达组,实验中同时设置未转染组和空质粒转染组。

**1.2.4 筛选稳定转染细胞株** HepG2 细胞经脂质体瞬时转染 24 h 后,以 300 ng/ml 的 G418 药物浓度筛选,每隔 1 ~2 d 更换含有 G418 的完全培养基,约 6 d 细胞出现大量死亡,换用特殊培养基培养。特殊培养基的制备方法: HepG2 生长融合约达 80%,换液,培养过夜,收集培养基,滤器消毒和新鲜培养基 1:1 混合。待未转染组细胞全部被杀死后继续筛选,转染组可见耐药克隆形成。将耐药克隆消化,有限稀释法稀释至 96 孔板中,每孔 1 个细胞,用特殊培养基培养,继续加药筛选,30 d 后在荧光显微镜下选取阳性孔,接种至新的培养皿中扩大培养,培养期间保持 300 ng/ml 的 G418 药物浓度,1 周后进行鉴定。

**1.2.5 Western blot 法检测稳定过表达组 NLRC5 的蛋白表达** 取稳定过表达组、空质粒转染组细胞,两组细胞数相同,使用 RIPA 强裂解液(含 1% 的蛋白酶抑制剂)提取总蛋白,加蛋白上样缓冲液,100 °C、10 min 后收好蛋白保存至 -20 °C。配 8% SDS-PAGE 凝胶,加 25 μl 蛋白,电泳、转膜、脱脂奶粉封闭, TBST 洗膜后,一抗孵育。次日 TBST 洗膜,在 5% 脱脂奶粉中加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜后,加入 ECL 发光剂,电脑显影成像。

**2 结果**

**2.1 质粒小抽后鉴定** 将摇菌后的菌液按小抽试剂盒说明书抽提质粒,经 1% 琼脂糖凝胶电泳,与 DNA Marker 比对,发现第 5 组质粒没有在大小符合的位置出现条带,说明这组单克隆菌液中并不含重

组载体,应该丢弃。见图 1。

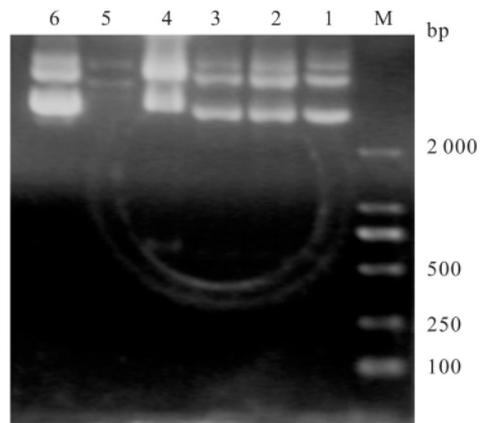


图 1 RT-PCR 鉴定质粒小抽

M: Marker; 1: 挑取的 1 号单克隆; 2: 挑取的 2 号单克隆; 3: 挑取的 3 号单克隆; 4: 挑取的 4 号单克隆; 5: 挑取的 5 号单克隆; 6: 挑取的 6 号单克隆

**2.2 显微镜下观察确定 G418 筛选药物浓度** 接种 HepG2 细胞的 12 孔板,经不同浓度 G418 筛选 14 d 后在显微镜下观察细胞的死亡情况,发现 300 ng/ml 以及比其浓度更高的 G418 浓度可将细胞全部杀死,最终确定 G418 筛选浓度为 300 ng/ml。见图 2。

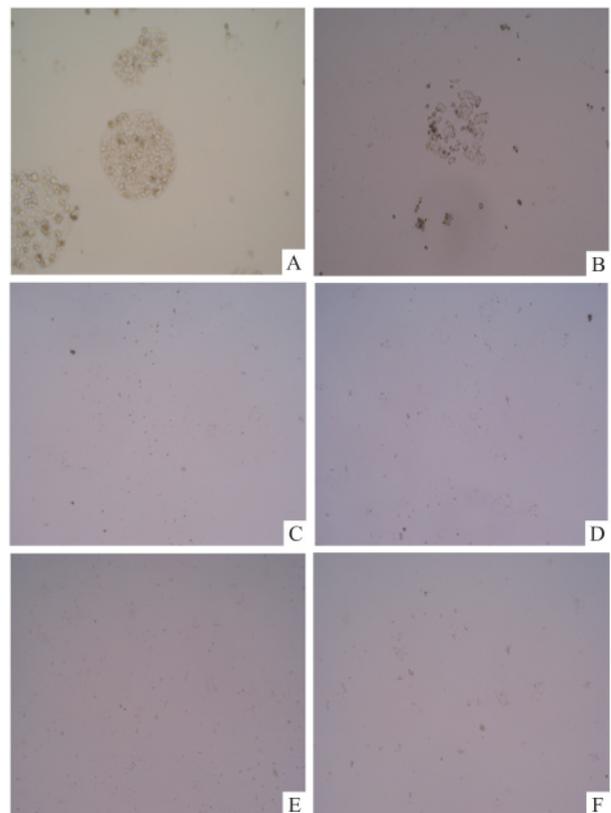


图 2 G418 不同浓度筛选 14 d 后 HepG2 细胞结果 ×100

A: 100 ng/ml; B: 200 ng/ml; C: 300 ng/ml; D: 400 ng/ml; E: 500 ng/ml; F: 600 ng/ml

### 2.3 荧光显微镜下观察稳定细胞株的筛选情况

细胞经脂质体转染后,因重组质粒携带 GFP 绿色荧光基因以及 Neomycin 抗性基因,若质粒基因转入细胞内,则在荧光倒置显微镜中可观察到绿色荧光并能够在 G418 筛选压力下存活。结果如图 3 所示,转染后 24 h,荧光显微镜下可见绿色荧光细胞团;G418 持续筛选 14 d 后,单克隆化的细胞耐药群形成。

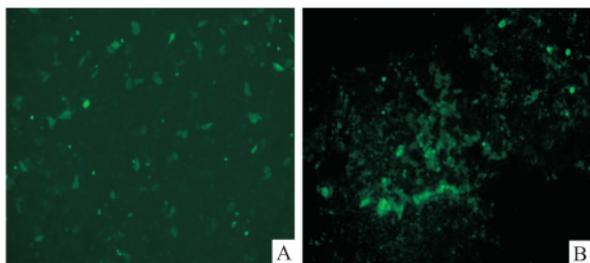


图 3 荧光显微镜下观察 NLRC5 蛋白表达 ×200  
A: 瞬染 pEGFP-C2-NLRC5 48 h; B: G418 稳定筛选 14 d

### 2.4 稳定细胞株中 NLRC5 蛋白的表达

Western blot 法检测结果显示,稳定过表达组和空质粒转染组的细胞内均有 NLRC5 蛋白表达,稳定过表达组 NLRC5 蛋白表达明显高于空质粒转染组,差异有统计学意义( $t = 15.356$ ,  $P < 0.05$ ) (见图 4)。

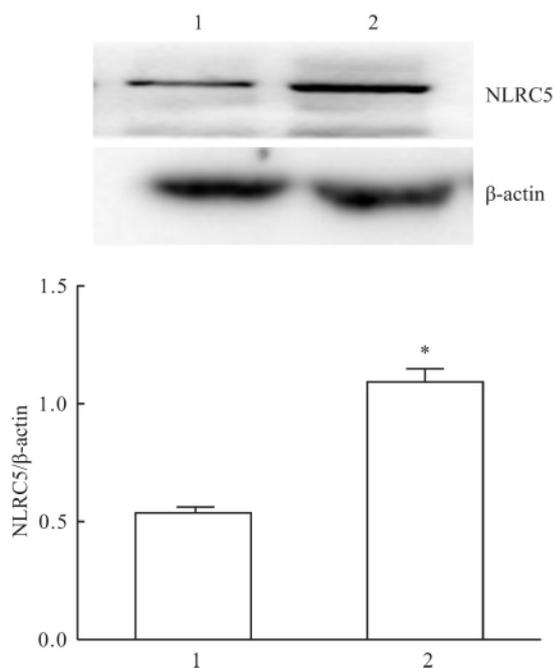


图 4 Western blot 法检测 NLRC5 蛋白表达

1: 空质粒转染组; 2: 稳定表达组; 与空质粒转染组比较: \*  $P < 0.05$

## 3 讨论

NLRs 是细胞内模式识别受体家族,该家族包括 5 个亚家族,其中在人类至少发现了 23 个成员,在鼠中至少发现了 34 个成员。这些成员通常含有 3 个结构区域: 碳端为亮氨酸重复区域,能够识别相应的配体;中部区域为中心核酸结合结构域,在 NLRs 与核苷酸链的结合以及自我聚合方面具有重要作用<sup>[6]</sup>。NLRs 的氨基端为半胱天冬酶激活招募结构域、热蛋白结构域,能够结合下游效应分子从而激活 NLRs,故这个区域称为功能结构域。近期新发现的 NLRC5 是 NLRs 家族中的一员,其基因定位于人类基因组的 16q13,基因全长约 96 000 bp<sup>[7]</sup>,编码蛋白由 1 866 个氨基酸分子组成,是所有 NLRs 家族中分子量最大的一个成员。研究<sup>[8]</sup>显示,NLRC5 在人类及小鼠的多种组织中都能表达,造血细胞中具有较高的表达量,人体和小鼠骨髓、淋巴结、胸腺和脾这些免疫组织具有高表达量的 mRNA<sup>[8-10]</sup>。

NLRC5 被证明能够参与到多种免疫反应,但其在免疫调节过程中具体扮演什么角色还具有争议性。Cui et al<sup>[11]</sup>研究发现 NLRC5 负向调节 NF-κB 途径以及 I 型干扰素信号发生途径。Tong et al<sup>[12]</sup>发现 NLRC5 基因缺陷性小鼠在受到水疱性口炎病毒感染后,体内多种细胞内的 NF-κB 以及 I 型干扰素信号途径得到了加强。Neerinx et al<sup>[9]</sup>发现切除 NLRC5 基因的人单核细胞(THP-1)以及人真皮成纤维细胞受到 Sendai 病毒及聚胞嘧啶核苷酸感染后,胞内 I 型干扰素表达量会降低,认为 NLRC5 是 I 型干扰素产生途径中的一个正向调节子。最近研究<sup>[5]</sup>显示 NLRC5 在 LX-2 细胞中正向调节 NF-κB/Smad3 通路介导 IL-6 和 IL-1β 的分泌。有关 NLRC5 在免疫反应中的作用的研究很多,但其在炎症小体的形成过程中所起的激活作用尚不明确。然而慢性炎症终归是导致癌症的主要原因之一,发展免疫疗法也成为治疗癌症的理想靶点分子<sup>[13]</sup>。

脂质体瞬时转染中,外源性基因片段整合到基因组的概率非常低,主要以染色体外的形式存在,并且不能随细胞分裂一同复制,常用于 24 ~ 72 h 内就进行处理分析结果的实验中。而稳定转染相对于瞬时转染而言,其进入细胞的质粒能整合入基因组中,随细胞的分裂一同复制。但稳定转染并不是不同于瞬时转染的方法,只是对瞬时转染的细胞进行筛选,

得到稳定整合的细胞株。通过构建稳定表达 NLRC5 的细胞株可以大大降低转染该基因的频率,降低成本,方便实验研究。并且在后续动物实验中,需要向动物体内注射表达有外源片段的细胞,需要构建稳定表达细胞株,以防止注入动物体内后,外源片段很快丢失。

### 参考文献

- [1] Kudo M. Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma: bench to bedside [J]. *Dig Dis* 2011 29(3): 273–7.
- [2] Zhang D Y, Friedman S L. Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis [J]. *Hepatology*, 2012, 56(2): 769–75.
- [3] He G, Karin M. NF- $\kappa$ B and STAT3—key players in liver inflammation and cancer [J]. *Cell Res* 2011 21(1): 159–68.
- [4] 陈亚冰, 兰道亮, 汤程, 等. NLRC5: 一种新发现的天然免疫调节分子 [J]. *中国兽医科学* 2013 43(4): 436–40.
- [5] Xu T, Ni M M, Huang C, et al. NLRC5 mediates IL-6 and IL-1 $\beta$  secretion in LX-2 cells and modulated by the NF- $\kappa$ B/Smad3 pathway [J]. *Inflammation* 2015 38(5): 1794–1804.
- [6] Magalhaes J G, Sorbara M T, Girardin S E, et al. What is new with Nods? [J]. *Curr Opin Immunol* 2011 23(1): 29–34.
- [7] Kuenzel S, Till A, Winkler M, et al. The nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor NLRC5 is involved in IFN-dependent antiviral immune responses [J]. *J Immunol*, 2010, 184(4): 1990–2000.
- [8] Benko S, Magalhaes J G, Philpott D J, et al. NLRC5 limits the activation of inflammatory pathways [J]. *J Immunol*, 2010, 185(3): 1681–91.
- [9] Neerinx A, Lautz K, Menning M, et al. A role for the human nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat-containing family member NLRC5 in antiviral responses [J]. *J Biol Chem* 2010 285(34): 26223–32.
- [10] Davis B K, Roberts R A, Huang M T, et al. Cutting edge: NLRC5-dependent activation of the inflammasome [J]. *J Immunol*, 2011, 186(3): 1333–7.
- [11] Cui J, Zhu L, Xia X, et al. NLRC5 negatively regulates the NF- $\kappa$ B and type I interferon signaling pathways [J]. *Cell*, 2010, 141(3): 483–96.
- [12] Tong Y, Cui J, Li Q, et al. Enhanced TLR-induced NF- $\kappa$ B signaling and type I interferon responses in NLRC5 deficient mice [J]. *Cell Res* 2012 22(5): 822–35.
- [13] Oldstone M B. Virus-lymphoid cell interactions [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012 93(23): 12756–8.

## Construction of stable a human hepatoma cell line HepG2 with over-expression of NLRC5

He Yinghua, Xu Tao, Ni Mingming, et al

(School of Pharmacy Anhui Medical University Hefei 230032)

**Abstract Objective** To establish a human hepatoma cell line HepG2 with over-expression of NLRC5. **Methods** Identified the suitable G418 concentration in the selection of stable transfection HepG2 cell. The eukaryotic expression plasmid pEGFP-C2-NLRC5 was transfected into the HepG2 cells mediated by lipofectamine and then selected with G418. Immunofluorescence assay and Western blot were used to analyze the expression of NLRC5. **Results** HepG2 cells were killed by G418 after 14 days with the minimum concentration of 300 ng/ $\mu$ l. Drug-resistant clones were formed after 14 days by selecting with G418. In the protein level, pEGFP-C2-NLRC5 HepG2 cell line was higher expression than pEGFP-C2 HepG2 cell line, the difference was statistically significant. **Conclusion** A hepatoma stable cell line over-expressing NLRC5 is successfully established, which may provide critical foundation for functional research of NLRC5 in liver cancer.

**Key words** NLRC5; liver cancer; stable cell line; HepG2