

# 慢病毒载体法建立乳腺癌 GFP-ST3 稳定细胞株

崔红霞 王 明 赵学梅 邹 宇 张 奇

**摘 要** **目的** 慢病毒载体法建立乳腺癌 GFP-ST3 稳定细胞株。**方法** 采用 PCR 扩增  $\alpha 2,3$ -ST 全长基因片段,克隆至慢病毒载体进行测序分析,将重组慢病毒载体转染人乳腺癌细胞,嘌呤霉素抗性筛选,经荧光显微镜观察、实时定量 PCR、Western blot 检测  $\alpha 2,3$ -ST 的表达。**结果** 成功构建了慢病毒载体 pGLV5-H1-GFP-ST3,体外转染乳腺癌细胞后,荧光显微镜下可见绿色荧光蛋白的表达, $\alpha 2,3$ -ST mRNA 表达和蛋白水平均明显升高( $P < 0.05$ ),获得稳转细胞株。**结论** 成功构建了绿色荧光蛋白为报告基因的  $\alpha 2,3$ -ST 慢病毒载体,并在 MDA-MB-231 中稳定表达,为进一步研究乳腺癌细胞膜连  $\alpha 2,3$ -唾液酸水平增高与其侵袭和转移潜能的调控提供实验模型。

**关键词**  $\alpha 2,3$ -ST 绿色荧光蛋白 转染 表达

**中图分类号** R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.09.015

**Establishment of Human Breast Cancer Cells with Stable Expression of GFP-ST3 Via Lentivirus Vector.** Cui Hongxia, Wang Ming, Zhao Xuemei, et al. Department of Clinical Pharmacology, Qiqihar Medical College, Heilongjiang 161006, China

**Abstract Objective** To establish the human breast cancer cells with stable expression of GFP-ST3 via lentivirus vector. **Methods** The human  $\alpha 2,3$ -ST cDNA was obtained and amplified by polymerase chain reaction. Then the gene was incorporation into pGLV5-H1-GFP plasmid. The recombinant vector pGLV5-H1-GFP-ST3 was transfected into breast cancer cells. A stably transfected cell line was established using puromycin resistance selection. The expression of  $\alpha 2,3$ -ST was observed using fluorescence microscope and estimated by real time PCR and western blot. **Results** The recombinant plasmid pGLV5-H1-GFP-ST3 was successfully constructed. After transfection into breast cancer cells, green fluorescence was observed. Analysis displayed that the level of  $\alpha 2,3$ -ST mRNA and protein was significantly increased in MDA-MB-231 cells. **Conclusion** The  $\alpha 2,3$ -ST lentivirus vector pGLV5-H1-GFP-ST3 that can express  $\alpha 2,3$ -ST in MDA-MB-231 cells is constructed successfully and can be used to study the correlation of breast cancer metastatic potential with the overexpression of  $\alpha 2,3$ -ST gene.

**Key words**  $\alpha 2,3$ -ST; Green fluorescent protein; Transfection; Expression

细胞表面唾液酸化结构是癌症发生转移的重要特征。高表达的唾液酸可阻止癌细胞凋亡促进转移<sup>[1,2]</sup>。 $\alpha 2,3$ -唾液酸转移酶( $\alpha 2,3$ -ST)可催化形成糖链末端  $\alpha 2,3$ -唾液酸结构,并参与形成 Sle(sialyl-Lewis)抗原。研究发现,Sle 抗原在一些癌症中过度表达并与预后不良密切相关<sup>[3,4]</sup>。因此, $\alpha 2,3$ -唾液酸在肿瘤黏附、迁移和转移中的作用及分子机制就成为研究热点,而找到  $\alpha 2,3$ -唾液酸不同表达水平的细胞模型是非常关键的步骤。本研究成功地构建  $\alpha 2,3$ -ST 基因慢病毒载体 pGLV5-H1-GFP-ST3,并体外转染人乳腺癌细胞系,建立过表达  $\alpha 2,$

3-ST 基因细胞模型,为进一步研究  $\alpha 2,3$ -唾液酸与乳腺癌细胞侵袭和转移潜能的调控提供实验基础。

## 材料与方法

1. 细胞:人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 购自上海中科院细胞库。

2. 主要试剂和仪器:L15 培养基、胎牛血清、DMEM 培养基购自 Gibco 公司;中量提取试剂盒购自杭州爱思进生物技术有限公司;DNA 连接酶、DNA 内切酶均为 Fermentas 公司、实时定量 PCR 试剂盒为 TaKaRa 公司产品,引物由上海生工生物工程有限公司合成,其他试剂均为国产分析纯。PCR 仪(Applied Biosystems 公司),凝胶成像仪(天能公司)。

3. 慢病毒载体 pGLV5-H1-GFP-ST3 的构建:目的基因  $\alpha 2,3$ -ST 从含有目的基因的 cDNA 文库中,利用 PCR 方法钓取目的基因,参照 GenBank  $\alpha 2,3$ -ST 基因 ORF 序列设计特异性引物:上游引物:5'-GTTCCAAGCTTAAGCGGCCGCGC-CACCATGGGACTCTTGGT ATTTG TGCGCA ATCTG-3',下游引物:5'-TGATGAGTATCAG TAGAGAGTGTGGATCCT-CAGATGCCACTGCT TAGATCACTGATGAC-3',分别在 5'端

基金项目:黑龙江省普通高等学校青年学术骨干计划基金资助项目(1253G067)

作者单位:161006 齐齐哈尔医学院(崔红霞、赵学梅、邹宇、张奇);150040 哈尔滨,黑龙江中医药大学(王明)

通讯作者:崔红霞,电子信箱:xutianfang@sohu.com

加上 Xho I 和 Kpn I 的酶切位点。使用 TaKaRa cDNA Kit 进行反转录反应,获得 cDNA,PCR 扩增  $\alpha 2,3$ -ST 基因,反应体系按说明书,反应条件为:95℃ 预变性 3min,94℃ 变性 30s,55℃ 退火 30s,72℃ 延伸 30s,30 个循环;最后 72℃ 延伸 5min,扩增片段经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳并切胶回收。用 Not I、BamH I 分别双酶切目的基因 hST3Gal III 及 LV5 空载体,DNA 连接酶连接,转化感受态大肠杆菌,50 $\mu$ g/ml 氨苄西林 (ampicillin) 筛选,挑取阳性克隆酶切鉴定。

4. 载体克隆和测序:阳性克隆对应的菌液送测序,并将剩余的菌液用甘油保存。将测序结果与目的基因序列进行比对,正解无误后,用保存的甘油菌液接菌 LB 培养基,进行大量质粒抽提,得到足够量的用于病毒包装的重组质粒。

5. 慢病毒载体 pGLV5-H1-GFP-ST3 转染人乳腺癌细胞 MDA-MB-231:转染前 24h 将处于对数生长期的细胞用胰酶消化,按  $3 \times 10^3$  个细胞/孔的浓度接种于 24 孔板内,37℃ 培养至细胞密度为 50% 时,用 polybrene (10 $\mu$ g/ml) 分别介导慢病毒转染 MDA-MB-231 细胞,按试剂说明书进行操作。转染 48h 后,荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的表达情况。传代后,换用含有嘌呤霉素 (2 $\mu$ g/ml) 的 L15 培养液进行筛选,得到稳定传代的细胞克隆。

6. 实时定量 PCR 鉴定  $\alpha 2,3$ -ST 基因在 MDA-MB-231 细胞中的表达:收集稳转细胞,Trizol 提取细胞总 RNA,反转录,以  $\beta$ -actin 为内参照,定量 PCR 分析  $\alpha 2,3$ -ST 基因。上游引物:5'-AGAGAA GGACGGTGCCAAG-3',下游引物:5'-CTGAATGAGGCTGAGTG CTG-3'。取 0.2ml 薄壁 PCR 管,依次加入第一链 cDNA 2 $\mu$ l,目的基因的上游引物 0.5 $\mu$ l,目的基因的下游引物 0.5 $\mu$ l,2 $\times$  SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup>,12.5 $\mu$ l,Rox Reference Dye,0.5 $\mu$ l,DEPC 处理的去离子水加至 25 $\mu$ l。轻轻混匀,瞬时离心。PCR 条件:95℃ 预变性 10s,1 个循环;95℃ 变性 5s,60℃ 退火 31s,共 40 个循环。结果分析  $\alpha 2,3$ -ST mRNA 相对含量采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值表示。使用 Sequence Detection software 软件分析各检测样本的 Ct 值,Ct 值分析方法:通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  比较各目的基因初始模板量差别。

7. Western blot 法转染后细胞中  $\alpha 2,3$ -ST 蛋白:收集稳转细胞,按照细胞质蛋白提取试剂盒操作,提取细胞质蛋白,经分光光度计定量,取 50 $\mu$ g 蛋白上样进行 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移至 NC 膜,5% 的脱脂牛奶室温封闭 2h,分别用  $\alpha 2,3$ -ST 抗体 (1:500)、GAPDH 抗体 (1:1000),4℃ 孵育过夜,辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2h,TBST 洗膜 10min $\times$ 3 次,配置新鲜发光液,将膜孵育 3min,暗室 X 线片曝光 30s~5min,显影 30s,定影 30s 成像,凝胶成像系统成像,凝胶分析软件进行灰度值分析,以目的基因与 GAPDH 基因条带积分光密度比值表示  $\alpha 2,3$ -ST 蛋白表达。

## 结 果

1. 慢病毒 pGLV5-H1-GFP-ST3 载体的构建:从含有目的基因的 cDNA 文库中,利用 PCR 方法钓取目的基因,PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳

可见 1246bp 处有明显的扩增条带,与预期结果一致。目的基因 hST3Gal III 和慢病毒载体经 Not I 酶切后电泳,在 1246bp 对应区域有酶切得到的条带对应的克隆即为阳性克隆 (图 1)。

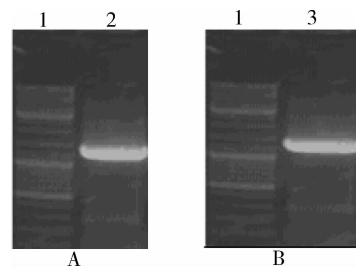


图 1 钓取序列片段 PCR 产物电泳及克隆到 LV5 载体的酶切鉴定

A.  $\alpha 2,3$ -ST 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳;B. LV5-ST3 重组质粒 Not I 酶切产物;1. marker;2.  $\alpha 2,3$ -ST 基因 PCR 产物;3. LV5-ST3 重组质粒 Not I 酶切产物

2. 克隆鉴定与测序:阳性转化子菌液测序结果显示,插入载体的序列与 GenBank 中登录的  $\alpha 2,3$ -ST 基因编码区 (CDS) 报道序列 99% 一致。说明成功构建了慢病毒载体 pGLV5-H1-GFP-ST3。

3. 荧光显微镜检测  $\alpha 2,3$ -ST 在乳腺癌细胞中的表达:将构建好的慢病毒载体分别转染两株乳腺癌细胞:MDA-MB-231、Bcap-37。转染细胞分为 3 组:未转染组 (mock cell, M),转染对照慢病毒组 (parent cells, P),转染目的基因慢病毒组 (ST3)。转染 48h 后,荧光显微镜观察,转染效率可达 90% 以上,pGLV5-H1-GFP-ST3 的细胞内有较强的绿色荧光,GFP-ST3 融合蛋白主要定位在细胞质 (图 2)。

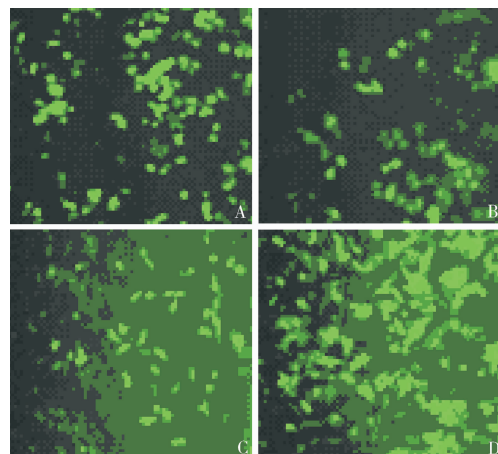


图 2 荧光显微镜观察  $\alpha 2,3$ -ST 在乳腺癌细胞中的表达 ( $\times 100$ )

A. Bcap-37 (P);B. Bcap-37 (ST3);C. 231 (P);D. 231 (ST3)

4. MDA - MB - 231 细胞转染后目的基因  $\alpha 2,3$  - ST 的 mRNA 表达,以  $\beta$  - actin 为内参照,实时定量 PCR 检测外源  $\alpha 2,3$  - ST mRNA 在 MDA - MB - 231 细胞中表达, $\alpha 2,3$  - ST mRNA 相对含量采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  值表示。乳腺癌细胞 MDA - MB - 231 转染后,经过嘌呤霉素  $2\mu\text{g/ml}$  抗性筛选,与 P 组相比, $\alpha 2,3$  - ST 表达为 1.665 倍 ( $P < 0.05$ ),而 Bcap - 37 细胞未见明显差异 (图 3)。

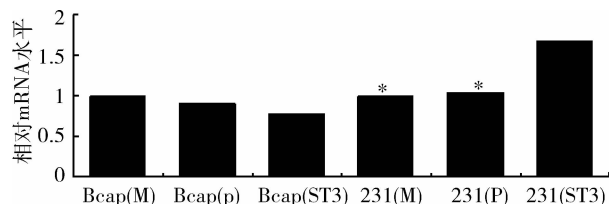


图 3 实时定量 PCR 检测细胞转染慢病毒载体后  $\alpha 2,3$  - ST mRNA 的表达  
与 231 (ST3) 组相比, \*  $P < 0.05$

5. Western blot 法检测  $\alpha 2,3$  - ST 蛋白表达:收集筛选出的稳转细胞,提取细胞质蛋白,Western blot 法检测外源  $\alpha 2,3$  - ST 基因的蛋白表达,以目的蛋白  $\alpha 2,3$  - ST 与 GAPDH 条带的积分光密度比值代表  $\alpha 2,3$  - ST 表达量。如图 4,与 M、P 组相比,ST3 组转染外源基因在 MDA - MB - 231 细胞中蛋白表达量明显增加 ( $P < 0.05$ ),而 Bcap - 37 细胞未见明显差异。

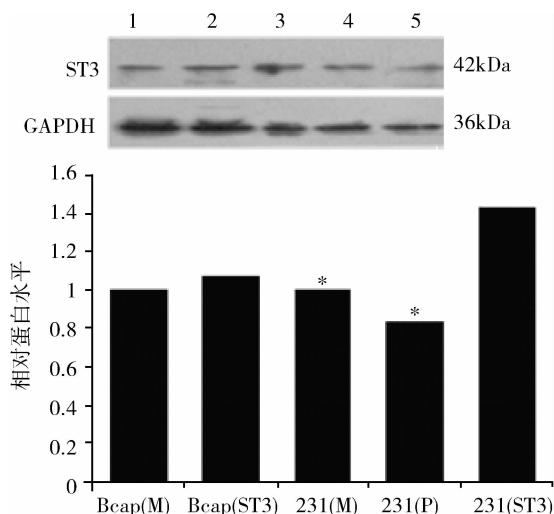


图 4 Western blot 法检测转染过表达载体后  $\alpha 2,3$  - ST 的蛋白表达

1. Bcap (M); 2. Bcap (ST3); 3. 231 (M); 4. 231 (ST3); 5. 231 (P);  
与 231 (ST3) 组相比, \*  $P < 0.05$

## 讨 论

近年来,有关异常糖基化修饰与肿瘤侵袭转移关

系的研究相继出现,但大多是大体组织的染色观察,缺乏系统的实验研究。肿瘤细胞表面唾液酸在肿瘤细胞与细胞外基质黏附和迁移过程具有调节作用,目前以唾液酸为靶点的抗肿瘤转移药物和血清多糖肿瘤标志物的研究正成为关注热点<sup>[5-7]</sup>。研究表明, $\alpha 2,3$  - ST 抑制剂大豆皂苷可增加细胞黏附和减少乳腺癌细胞迁移<sup>[8]</sup>。而 Lith - O - Asp 通过抑制  $\alpha 2,3$  - 唾液酸转移酶活性下调肿瘤细胞黏附、侵袭和转移潜能<sup>[9]</sup>。由此可见不同实验室可能得出不同结论,考虑到糖链结构的复杂性,以及肿瘤发生的异质性,有关单一  $\alpha 2,3$  - 唾液酸改变有关侵袭转移分子机制的详细研究尚未阐述,因此,提供单一  $\alpha 2,3$  - 唾液酸改变的肿瘤细胞模型是非常必要的。

将外源基因导入宿主细胞并使其表达的过程中,外源性目的基因携带的载体选择成为最关键的技术环节。慢病毒载体具有可将目的基因高效的整合到宿主细胞基因组内,实现长期而稳定的表达并可以传代给子代细胞,不会引起免疫反应,具有生物安全性等优点而常被采用。

乳腺癌是当今世界各大城市女性发生率最高的癌症之一,且常早期出现转移。乳腺上皮细胞癌变过程中,细胞表面  $\alpha 2,3$  - 唾液酸化修饰增高<sup>[10,11]</sup>。唾液酸修饰对肿瘤细胞异常生物学行为的影响备受关注<sup>[12]</sup>。前期研究表明,乳腺癌转移潜能与  $\alpha 2,3$  - 唾液酸水平密切相关<sup>[13]</sup>。充分理解肿瘤唾液酸化修饰将是未来治疗癌症转移的新的视角,而建立单一糖基化改变的细胞模型是研究最为理想的手段之一。本研究成功地构建  $\alpha 2,3$  - ST 基因慢病毒载体 pGLV5 - H1 - GFP - ST3,并体外转染人乳腺癌细胞 MDA - MB - 231,建立单一  $\alpha 2,3$  - 唾液酸改变的细胞模型,为进一步研究细胞膜连  $\alpha 2,3$  - 唾液酸含量增加与乳腺癌侵袭和转移潜能的调控提供实验基础。

## 参考文献

- Jin XL, Zheng SS, Wang BS, et al. Correlation of glycosyltransferases mRNA expression in extrahepatic bile duct carcinoma with clinical pathological characteristics [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2004, 3(2): 292 - 295
- Bassagañas S, Pérez - Garay M, Peracaula R. Cell surface sialic acid modulates extracellular matrix adhesion and migration in pancreatic adenocarcinoma cells. Cell surface [J]. Pancreas, 2014, 43 (1): 109 - 117
- Peracaula R, Yabares G, Loperz - Ferrer A, et al. Role of sialyltransferases involved in the biosynthesis of Lewis antigens in human pancreatic tumour cells [J]. Glycoconj J, 2005, 22(2): 135 - 144

(下转第 62 页)

成分脱落形成内毒素,当这些细菌大量复制增殖及被机体免疫细胞灭杀时,肠管内部的内毒素浓度显著提升,过量的内毒素将借此进入循环系统,产生菌血症<sup>[12]</sup>。IL-4 与 IL-10 都是抗炎性细胞因子,可抵抗炎症反应及调节免疫功能,可降低促炎因子基因的翻译及相应蛋白因子的分泌,在肠管免疫系统中处于相当关键的位置<sup>[13]</sup>。而肠管内菌群失调致使机体产生或加剧炎症反应,增加肠管黏膜通透性,促使内毒素与相应的致炎因子分泌显著增加,而抗炎性细胞因子分泌减少,使机体不能有效的控制肠道炎症,结果使肠道炎症难以消除而长期持续。

本研究发现,UC 活跃期病患肠管内部菌群结构与数量已经失去平衡,乳酸杆菌、双歧杆菌、拟杆菌等优势细菌显著降低,大肠杆菌、肠球菌和小梭菌等机会致病菌显著增多,超出机体免疫系统所能控制的水平,引起机体免疫反应,致使肠管黏膜的免疫屏障作用下降,进而引发以结肠为主的肠管局部炎症反应。对相关炎症因子进行检测发现,与缓解期 UC 组及健康组相比较,活动期 UC 组 IL-6、TNF- $\alpha$  与内毒素增高显著( $P < 0.05$ ),IL-10 与 IL-4 降低明显( $P < 0.05$ ),这与黄夺夏等<sup>[14]</sup>及汪志军等<sup>[15]</sup>的研究结果相似。

综上所述,UC 病患肠道菌群结构失衡可促进肠道炎症的发生、发展,并能影响机体内部相关免疫炎症因子的水平,对临床 UC 的治疗具有指导意义,可进一步研究维持肠道菌群平衡在临床治疗 UC 中的价值。

#### 参考文献

- 1 常有. 益生菌制剂在溃疡性结肠炎中的应用及其可能机制[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(2): 194-196
- 2 徐佰国, 王英凯, 王策, 等. 肠道菌群与溃疡性结肠炎[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(12): 2665-2667
- 3 Tursi A, Brandimarte G, Papa A, *et al.* Treatment of relapsing mild - to - moderate ulcerative colitis with the probiotic VSL#3 as adjunctive to a standard pharmaceutical treatment: a double blind, randomized, placebo - controlled study [J]. Am J Gastroenterol, 2010, 105 (10): 2218 - 2227
- 4 中华医学会消化病分会炎症性肠病学组. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2012 年广州)[J]. 中华内科杂志, 2012, 51(10): 818-831
- 5 Miele E, Pascarella F, Giannetti E, *et al.* Effect of a probiotic preparation(VSL#3) on induction and maintenance of remission in children with ulcerative colitis[J]. Am J Gastro enterol, 2009, 104(2): 437-443
- 6 Tomasello G, Sciume C, Rappa F, *et al.* Hsp10, Hsp70, and Hsp90 immunohistochemical levels change; in ulcerative colitis after therapy [J]. Eur J Histochem, 2011, 55(4): e38
- 7 Conen A, Zimmerer S, Trampuz A, *et al.* A pain in the neck: probiotics for ulcerative colitis[J]. Ann Intern Med, 2009, 151(12): 895-897
- 8 王旭霞, 赵曙光, 刘震雄, 等. 双歧杆菌对溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜屏障功能及细胞因子的影响[J]. 山西医科大学学报, 2011, 42(8): 621-623
- 9 Durbdn A, Abellan JJ, Jimenez - Hernandez N, *et al.* Assessing gut microbial diversity from feces and rectal mucosa[J]. Microb Ecol, 2011, 61(1): 123-133
- 10 刘勇, 谭瑞明. 益生菌联合美沙拉嗪治疗溃疡性结肠炎的临床疗效观察. [J] 吉林医学, 2010, 31(15): 2228-2230
- 11 李贞娟, 张彩凤, 夏永华, 等. 溃疡性结肠炎患者外周血单个核细胞 TLR4 的表达及其与 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的相关性[J]. 广东医学, 2011, 32(9): 1166-1168
- 12 Kumari R, Ahuja V, Paul J. Fluctuations in butyrate - producing bacteria in ulcerative colitis patients of North India[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(22): 3404-3414
- 13 钱家鸣, 沈冰冰. 肠道菌群与炎症性肠病. [J] 现代消化与介入诊疗, 2010, 15(3): 161-162
- 14 黄夺夏, 陆翠钦, 何张平, 等. 美沙拉嗪与康复新液联合治疗老年溃疡性结肠炎的疗效及对血清炎症细胞因子、凝血指标的影响[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(15): 3769-3770
- 15 汪志军, 汤永志, 燕飞, 等. 双歧杆菌四联活菌对肝硬化患者血浆内毒素及肠黏膜通透性的影响[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(7): 1166-1168 (收稿日期: 2015-03-03) (修回日期: 2015-03-11)
- metastasis pathways[J]. Cancer Res, 2011, 71(2): 473-483
- 10 Dalziel M, Whitehouse C, McFarlane I, *et al.* The relative activities of the C2GnT1 and ST3Gal - I glycosyltransferases determine O - glycan structure and expression[J]. J Biol Chem, 2001, 276 (14): 11007-11015
- 11 Picco G, Julien S, Brockhausen I, *et al.* Over - expression of ST3Gal - I promotes mammary tumorigenesis [J]. Glycobiology, 2010, 20 (10): 1241-1250
- 12 Kang R, Loux T, Tang D, *et al.* The expression of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is permissive for early pancreatic neoplasia[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109 (18): 7031-7036
- 13 Cui H, Lin Y, Yue L, *et al.* Differential expression of the alpha2, 3 - sialic acid residues in breast cancer is associated with metastatic potential[J]. Oncol Rep, 2011, 25(5): 1365-1371 (收稿日期: 2015-01-22) (修回日期: 2015-02-03)

(上接第 59 页)

- 4 Varki A. Glycan - based interaction involving vertebrate sialic acid recognizing proteins[J]. Nature, 2007, 446(7139): 1023-1029
- 5 Ochoa Alvarez JA, Krishnan H, Shen Y, Acharya NK, *et al.* Plant lectin can target receptors containing sialic acid, exemplified by podoplanin, to inhibit transformed cell growth and migration[J]. PLoS One, 2012, 7 (7): e41845
- 6 Lu DY, Lu TR, Wu HY. Development of antimetastatic drugs by targeting tumor sialic acids[J]. Sci Pharm, 2012, 80 (3): 497-508
- 7 Kuzmanov U, Kosanam H, Diamandis EP. The sweet and sour of serological glycoprotein tumor biomarker quantification[J]. BMC Medicine, 2013, 11 (1): 31-51
- 8 Hsu CC, Lin TW, Chang WW, *et al.* Soyasaponin - I - modified invasive behavior of cancer by changing cell surface sialic acids[J]. Gynecol Oncol, 2005, 96(2): 415-422
- 9 Chen JY, Tang YA, Huang SM, *et al.* A novel sialyltransferase inhibitor suppresses FAK/paxillin signaling and cancer angiogenesis and