

Tet调控的脑相对特异性新基因 LRRC4 表达细胞系的构建*

张秋红 王莉莉 彭 聪 曹 利 王洁如 李小玲 李桂源**

(中南大学肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 LRRC4 是一个在脑相对特异性表达的富亮氨酸重复超家族新成员, 在神经胶质瘤表达明显下调或缺失且具有抑制脑胶质瘤细胞生长的潜能. 利用 Tet-on 基因表达系统, 经过两轮转染, 先后将调控质粒 pTet-on 和表达质粒 pTRE-2hyg-LRRC4 转染 U251 细胞系, 分别用 G418 和潮霉素 Hygromycin 进行两次筛选. 在第一轮挑取的 80 个克隆中, 利用 pTRE-2hyg-luciferase 报告基因进行最佳的低背景高表达的 pTet-on 细胞克隆筛选, 在通过量效关系和动力学检测筛选的最佳克隆基础上, 再进行 pTRE-2hyg-LRRC4 的转染, 并通过 RT-PCR 和 RNA 印迹检测, 成功获得了两个具有良好诱导性 Tet 调控的 LRRC4 双稳定表达细胞系, 为进一步阐明 LRRC4 在脑胶质瘤发生发展中的作用, 提供有利的研究基础和理想的实验平台.

关键词 LRRC4, Tet-on 基因表达系统, Doxycycline

学科分类号 R73-3

LRRC4 (GenBank 登录号为 AF196976)是在染色体 7q31~32^[1,2]克隆的一个新的脑相对特异性基因, 在原发性脑肿瘤中其表达明显下调或缺失^[3], 且在体内和体外具有一定的抑制脑胶质瘤细胞生长的潜能^[3]. 以上表明 LRRC4 极有可能为一脑瘤易感基因的候选者. 脑胶质瘤发生仅占成人肿瘤的 2%, 却与 10%的肿瘤相关死亡有关^[4]. 因此研究脑瘤易感基因的候选者 LRRC4 与脑胶质瘤发生发展的关系, 对于阐明 LRRC4 功能和胶质瘤发生发展的机制及胶质瘤的临床治疗具有一定的意义. 为了模拟 LRRC4 在胶质瘤中不同表达水平和表达时期对胶质瘤发生发展的影响, 本研究选用无 LRRC4 表达的胶质母细胞瘤细胞系 U251, 建立 Tet 调控的具有 LRRC4 功能的表达细胞系, 为进一步证实和阐明 LRRC4 在脑胶质瘤发生发展中的作用提供理想的实验平台.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株. 含 LRRC4 全长 cDNA 质粒 pGEM-T/LRRC4 由王洁如博士惠赠; Tet-on 表达系统中 pTet-on、pTRE-2hyg-luciferase 和 pTRE-2hyg 购自 Clontech 公司; 菌株 JM109 为本实验室保存.

1.1.2 细胞. U251 细胞购自美国 ATCC, 并由本实验室培养提供; 培养基为 10% 小牛血清的 RPMI 1640 (Gibco BRL); 无 Dox 小牛血清购自

Clontech 公司; 传代消化所用的胰酶为 Gibco BRL 公司产品.

1.1.3 引物. 用于 RT-PCR 及 RNA 印迹探针制备的 LRRC4 及 β -actin 引物序列: LRRC4, 上游引物为 5' ttgcccacaataacctctc 3', 下游引物为 5' acaggctt gtactttcgcgt 3'; β -actin, 上游引物为 5' tccgtgga gaagagctacga 3', 下游引物为 5' gtacttgagctcagaag gag 3'. 所有引物均由上海博雅生物工程有限公司合成.

1.1.4 酶与试剂. 限制性内切酶, 核酸分子质量标准及 Taq 酶购自华美生物工程公司; T4DNA 连接酶购自 Promega 公司; 质粒抽提试剂盒及凝胶 DNA 回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司; Lipofactamine 2000 脂质体购自 Qiagen 公司; G418 购自 Sigma 公司; 潮霉素 Hygromycin 购自 Calbiochem 公司; Doxycycline (Dox) 购自 Sigma 公司; luciferase expressing system 购自 Promega 公司; TRIzol 购自 Gibco-BRL 公司; RT 试剂盒购自 Promega 公司; 随机引物标记盒购自 Promega 公司; [α -³²P]dATP 购自北京亚辉生物公司.

*国家自然科学基金资助项目(30100191, 30270429)和湖南省自然科学基金资助项目(03JJY3062).

** 通讯联系人.

Tel: 0731-4805090, Fax: 0731-4805383

E-mail: Ligy@xysm.net

收稿日期: 2004-11-16, 接受日期: 2004-12-28

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建.

a. 感受态的制备及质粒转化: 细菌 JM109 感受态的制备及重组质粒的转化均参照文献[5]进行.

b. pTRE-2hyg/LRRC4 重组质粒的构建: 利用 *Not* I 单酶切 pGEM-T/LRRC4 克隆及 pTRE-2hyg 载体质粒, 胶回收酶切后的 LRRC4 目的片段和载体片段. 以目的片段和载体片段 3:1 的摩尔比, T4 连接酶 16°C 连接过夜. 随后进行连接产物的转化, 并用 *Not* I 和 *Bam*H I 进行插入及插入方向的鉴定, 筛出阳性重组质粒. 鉴定后阳性克隆质粒送至上海博雅生物有限公司测序.

1.2.2 pTet-on U251 稳定表达细胞系的构建. 转染前 U251 细胞在 6 孔板中于 37°C、5% CO₂ 培养箱中生长达 50%~80% 的融合度, 按 Lipofactamin2000 脂质体转染说明书进行 pTet-on 转染, 用 800 mg/L G418 进行筛选, 2~3 周后以 300 mg/L G418 维持并挑取克隆 80 个, 扩大培养后, 用 pTRE-2hyg-luciferase 报告基因筛选对 Dox 诱导敏感的低背景、高表达的最佳阳性克隆. 对鉴定出的最佳克隆, 细胞计数后, 分别用不同浓度的 Dox 同时诱导 24 h 后, 用 pTRE-2hyg-luciferase 报告基因检测其最佳的 Dox 诱导浓度. 在此浓度下, 检测不同诱导时间内 pTRE-2hyg-luciferase 的表达差异, 寻找最佳诱导时间. 为尽量减少瞬间表达带来的不稳定性, 每一个克隆至少检测 2~3 次.

1.2.3 pTRE-2hyg/LRRC4- pTet-on U251 双稳定表达细胞系的构建. 在筛选出最佳 pTet-on U251 稳定表达细胞系的基础上, 进行 pTRE-2hyg/LRRC4 的第二轮转染, 转染方法如前, 转瓶后用 400 mg/L

潮霉素进行筛选, 2~3 周后以 100 mg/L 潮霉素维持并挑取 20 个克隆扩大培养.

1.2.4 RT-PCR. 按 TRIzol 抽提总 RNA 操作步骤, 提取经 G418 和潮霉素筛选获得的细胞克隆 Dox 诱导前后的总 RNA, 经 DNase I 消化痕量 DNA 后, 分别取各克隆细胞 2 µg 总 RNA 进行 RT 反应, 依据 AMV 逆转录试剂盒操作步骤进行. 然后以 cDNA 为模板进行 LRRC4 基因诱导前后表达差异的检测. PCR 扩增条件为: 95°C 变性 5 min; 94°C 30 s, 57°C 30 s, 72°C 50 s, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min. 同时用 β -actin 做为半定量内对照 (产物大小为 309 bp). 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 LRRC4 基因 641 bp 的表达情况, 获得 Dox 诱导前后低背景、高表达的阳性细胞克隆.

1.2.5 RNA 印迹. 按 TRIzol 抽提总 RNA 操作步骤, 提取经 RT-PCR 鉴定所获得的低背景、高表达的阳性细胞克隆, 经 Dox 诱导前后的总 RNA, 经 DNase I 消化痕量 DNA 后, 进行 RNA 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳, 利用纸巾法将 RNA 转移至尼龙膜, 紫外交联仪紫外交联, 预杂交后, 以 [α -³²P] dATP 为标记物, 用随机引物标记盒标记探针, 同一张膜先后与目的探针和 β -actin 探针杂交, 洗膜, 放射自显影, -70°C 曝光.

2 结 果

2.1 pTRE-2hyg-LRRC4 重组质粒的构建和鉴定

用 *Not* I 和 *Bam*H I 单酶切进行插入及插入方向的鉴定(图 1), *Not* I 酶切结果显示, 1~6 号克隆均为 LRRC4 插入的克隆, 但是 *Bam*H I 酶切显示仅有 5 号和 6 号克隆为 LRRC4 正向插入克隆. 遂

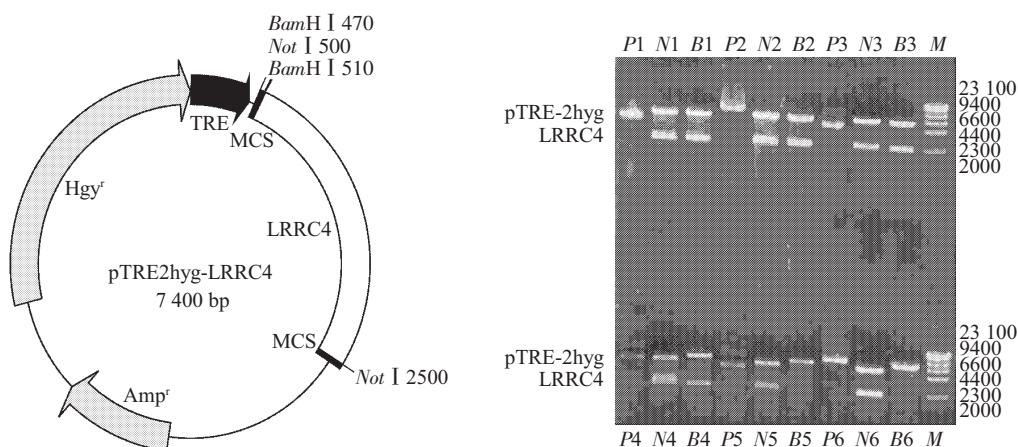


Fig.1 Identification of pTRE-2hyg-LRRC4 recombination plasmid

P: plasmid; N: *Not* I digestion; B: *Bam*H I digestion; M: λ marker.

取 6 号克隆送上海博雅生物有限公司测序, 测序结果显示重组质粒无移码、缺失和突变, 可用于细胞转染.

2.2 pTet-on U251 稳定表达细胞系的构建

2.2.1 G418^r 细胞 Tet-on 功能的验证. 将质粒 pTRE-2hyg-luciferase 分别瞬时转染 80 株具有 G418 抗性 (G418^r) 的 U251 与未转染 Tet-on 的 U251 细胞 (对照组), 然后各分成 2 组: 1 组加入 Dox 至终浓度为 2 mg/L, 另 1 组不加 Dox, 24 h 后通过液体闪烁仪检测单光子 cpm 值来反映荧光素酶活性. 结果显示: 80 个克隆在同等条件下 pTRE-2hyg-luciferase 瞬时转染后, Dox 诱导与非诱导两组比较, 荧光素酶活性呈现 3 种状态 (图 2). 第一种状态, Dox 诱导后表达显著增加, 如 22、23、24 及 52 号克隆. 表明荧光素酶基因对 Dox 的诱导具有良好的反应性, 荧光素酶基因受到了 Dox 的严密调控. 往该细胞克隆中进一步导入目的基因, 在 Dox 的严格调控下进行表达, 将可以周密细致地研究该基因的功能. 第二种状态, 荧光素酶表达活性高, 但对 Dox 诱导无反应, 如 14 号克隆. 这可能是质粒 DNA 整合入宿主细胞 DNA 中, 插入位点处恰好有一增强子所致. 第三种状态, 表达活性低, Dox 诱导无反应, 如 77 号克隆, 表明该克隆为假阳性克隆.

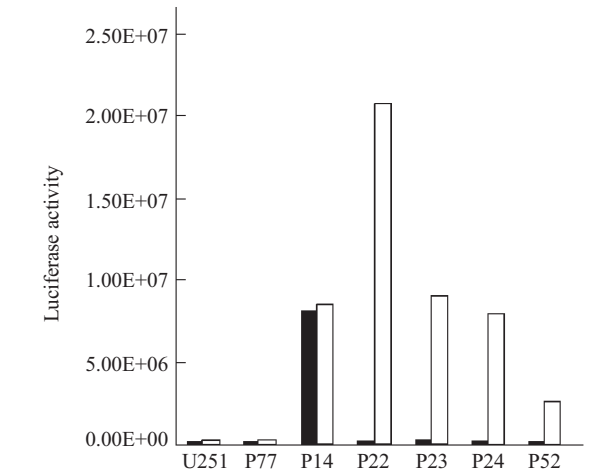


Fig.2 U251 Tet-on cell lines screened by testing luciferase activity
■:Dox-; □:Dox+ (not shown all).

2.2.2 U251 Tet-on 细胞功能对 Dox 的剂量依赖关系. 用质粒 pTRE-2hyg-luciferase 转染 4 株在诱导与非诱导差异较大 U251 Tet-on 细胞后, 各分为 6 组, 分别向培养基中加入不同终浓度的 Dox, 然后

测定各组细胞裂解液的 LucA. 4 株细胞的 LucA 均随 Dox 浓度的增加而升高; 尤以第 22 号克隆诱导前后差异最大且表达背景很低. 在 2 mg/L 时表达到最高水平(图 3, 4). 大于 2 mg/L 后由于 Dox 对细胞产生毒性作用, 导致诱导后基因表达不稳定. 尽管 23 号与 24 号克隆受 Dox 诱导后荧光素酶基因的表达也很高, 但其基础表达比较高, 有一定的表达泄露.

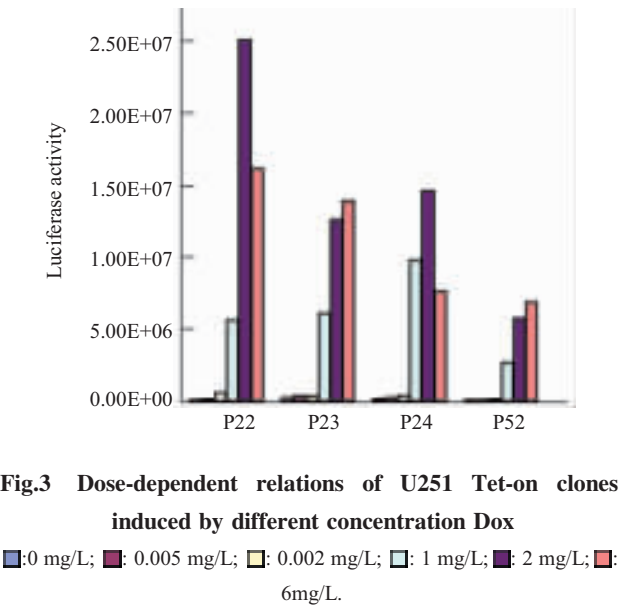


Fig.3 Dose-dependent relations of U251 Tet-on clones induced by different concentration Dox

■:0 mg/L; ■: 0.005 mg/L; ■: 0.002 mg/L; ■: 1 mg/L; ■: 2 mg/L; ■: 6mg/L.

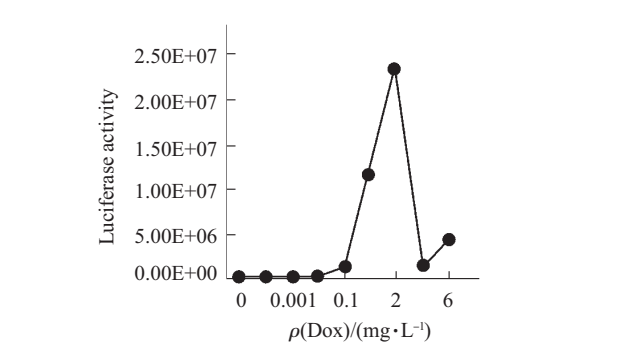


Fig.4 Dose-dependent relations of the 22th U251 Tet-on clone induced by different concentration Dox

2.2.3 Dox 诱导 U251 Tet-on 细胞功能的动力学分析. 转染了 pTRE-2hyg-luciferase 的 U251 Tet-on Clone22 细胞的培养基中, 加入 Dox 至终浓度为 2 mg/L, 然后分别检测在 37℃ 培养不同时间后细胞裂解液的 LucA, 结果发现, 诱导后的 LucA 迅速上升, 并于 36 h 达到最高水平(图 5).

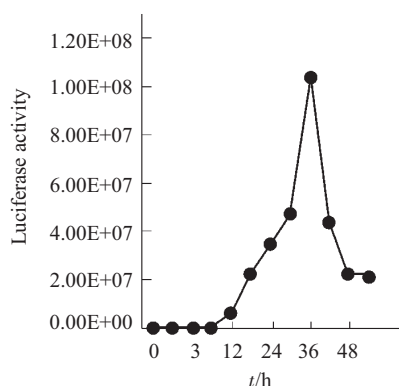


Fig.5 Kinetics analysis of the 22th U251 Tet-on clone induced by 2 mg/L Dox

2.3 pTRE-2hyg/LRRC4- pTet-on U251 双稳定表达细胞系的构建

2.3.1 Hyg^r 细胞 pTRE-2hyg/LRRC4- pTet-on U251

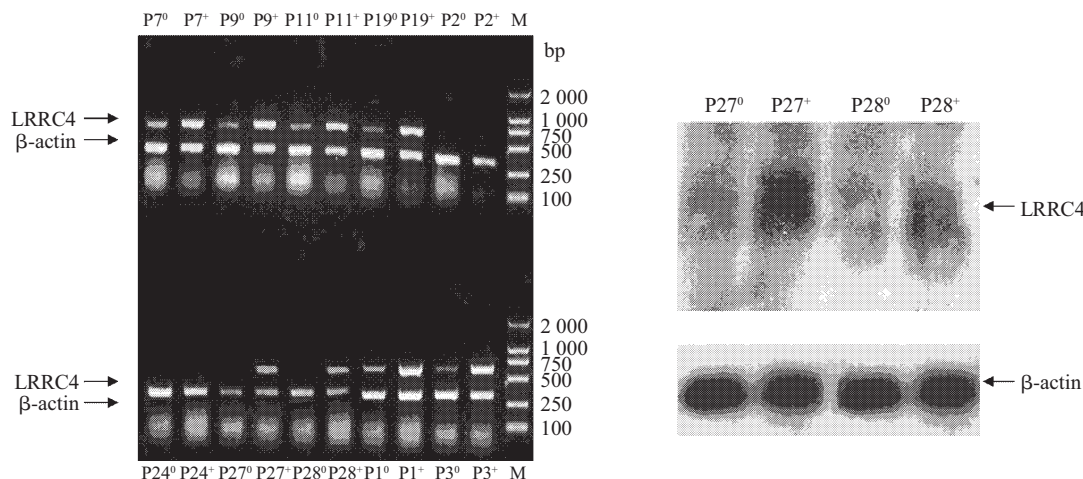


Fig.6 Screen of the positive pTRE-2hyg/LRRC4- pTet-on U251 dual-stable clones induced by 0 or 2 mg/L Dox
not shown all. 0: Dox(-); +: Dox (2 mg/L).

2.3.2 pTRE-2hyg/LRRC4- pTet-on U251 细胞功能对 Dox 的剂量依赖关系. 将 27 号和 28 号 pTRE-2hyg/LRRC4- pTet-on U251 细胞, 各分为 6 组, 分别向培养基中加入不同终浓度的 Dox, 24 h 后抽提细胞总 RNA, 进行 RT-PCR 检测 pTRE-2hyg/LRRC4- pTet-on U251 细胞在不同 Dox 浓度诱导时 LRRC4 的表达情况. 结果显示, 随 Dox 浓度的增加, LRRC4 表达增加, 在 2 mg/L Dox 诱导时 LRRC4 表达最高 (图 7).

2.3.3 Dox 诱导 pTRE-2hyg/LRRC4- pTet-on U251 细胞功能的动力学分析. 将 27 号和 28 号 pTRE-2hyg/LRRC4- pTet-on U251 细胞的培养基中

稳定整合及功能的鉴定. 在 U251 Tet-on 22 号的基础上进行 pTRE-2hyg/LRRC4- pTet-on U251 双稳定表达细胞系的构建, 将由潮霉素筛选获得的 20 个克隆分别分为 2 组: 1 组加入 Dox 至终浓度为 2 mg/L, 另 1 组不加 Dox, 24 h 后抽提细胞总 RNA, 进行 RT-PCR 检测 LRRC4 的表达. RT-PCR 结果显示 2 号和 24 号克隆未见 LRRC4 表达, 为阴性克隆; 1、3、7、9、11、19 虽为阳性克隆, 但均有不同程度的 LRRC4 表达泄露; 而 27 和 28 号克隆诱导前后 LRRC4 的表达差异大, 且其无 Dox 诱导时基因表达量极低, 基本无 LRRC4 表达泄露, 符合 Tet-on 基因表达系统基因研究的要求, 故对此 27 号和 28 号克隆进一步进行 RNA 印迹鉴定 (图 6).

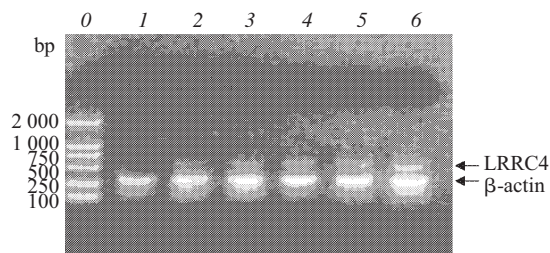


Fig.7 Expression of the 27th positive pTRE-2hyg/LRRC4- pTet-on U251 dual-stable clone induced by different concentration Dox

0: DL2000 marker; 1: 0 mg/L; 2: 0.001 mg/L; 3: 0.1 mg/L; 4: 0.6 mg/L; 5: 1 mg/L; 6: 2 mg/L (the 28th not shown).

加入 Dox 至终浓度为 2 mg/L, 然后 RT-PCR 检测不同诱导时间 LRRC4 的表达. 结果发现, 诱导后的 LRRC4 迅速上升, 并于 24 h 达到最高水平 (图 8).

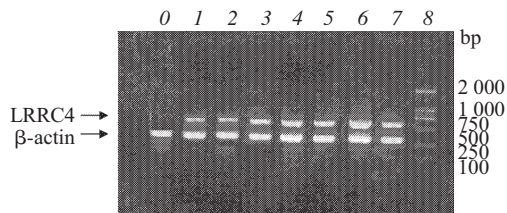


Fig.8 Kinetics analysis of the 27th positive pTRE-2hyg/LRRC4- pTet-on U251 dual-stable clone induced by 2 mg/L Dox

0: 0 h; 1: 4 h; 2: 8 h; 3: 12 h; 4: 16 h; 5: 20 h; 6: 24 h; 7: 36 h; 8: DL2000 marker (the 28th not shown).

3 讨 论

因为某些基因的表达对细胞有剧毒性, 可导致细胞和胚胎的死亡, 所以给基因的表达和调控研究带来了一定的困难. 可调控基因表达系统, 可以使研究者根据研究方案, 灵活调控目的基因表达, 并消除基因本身对细胞的毒性作用, 因此备受青睐. 目前, 已经发现了许多种用于基因功能研究的调控表达系统, 如 MT^[6]、热休克蛋白启动子^[7]、蜕皮素表达系统^[8]及 Tet 调控表达系统^[9]等. 在这些已经发现的可诱导的哺乳动物基因表达系统中, 大多数存在缺乏诱导特异性和表达的精确调控, 且诱导剂本身对细胞具有毒性等缺点, 因此, 它们在基因功能研究中的应用受到了限制. 相对而言, 近年来发展起来的, 具有严密开关功能、受异源细菌调控单位调控的, Tet 调控基因表达系统, 以其表达的可诱导性、高效性和无毒性等普通表达载体不可比拟的优点, 成为广大研究者进行基因研究的有利工具^[10].

为了进一步研究脑胶质瘤抑制基因候选者 LRRC4 的功能, 本研究选用 Tet-on 表达系统构建 LRRC4 基因的可调控稳定表达细胞系. 尽管已有学者为研究 LRRC4 构建了体外表达细胞模型, 但至今还未涉及诱导调控 LRRC4 的表达模型. 为了研究 LRRC4 在胶质瘤发生发展中的作用, 本研究选用无 LRRC4 表达的胶质母细胞瘤细胞系 U251 为

人源 LRRC4 体外表达细胞, 率先构建了以 Dox 诱导的 Tet 调控的 LRRC4 表达细胞模型 U251/Tet-on/TRE-LRRC4 双稳定表达细胞系. 该模型具有高效的可诱导性, 且诱导前无表达泄露, 符合可调控表达系统低背景、高表达的特点, 对于进一步研究 LRRC4 的生理功能和机制、全面阐述其生物学意义具有十分重要的理论和应用价值, 对于胶质瘤发生的机制的阐明及其治疗也具有一定的意义.

参 考 文 献

- 1 王洁如, 钱俊, 李桂源, 等. 富亮氨酸重复超家族新成员 LRRC4 的克隆与在脑瘤中的表达分析. 生物化学与生物物理进展, 2002, **29** (2): 233~239
Wang J R, Qian J, Li G Y, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2002, **29** (2): 233~239
- 2 Tan G L, Xiao J Y, Tian Y Q, *et al.* Microsatellite analysis of loci at 7q31~36 reveals a minimum of two common regions of deletion in nasopharyngeal carcinoma. Otolaryngol Head Neck Surg, 2002, **126** (3): 296~300
- 3 王洁如, 李小玲, 李桂源, 等. LRRC4 基因表达能降低胶质母细胞瘤细胞系 U251 的生长和成瘤潜能. 癌症, 2003, **22** (9): 897~902
Wang J R, Li X L, Li G Y, *et al.* Chinese Journal of Cancer, 2003, **22** (9): 897~902
- 4 Kleihues P, Cavenee W K. Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous System. Paris: IARC Press, 2000. 129~137
- 5 Sambrook J, Russell DW. 黄培堂, 等译. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 2002. 8
Sambrook J, Russell D W. Translated by Huang P T, *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Beijing: Science Press, 2002. 8
- 6 Palmiter R D. Molecular biology of metallothionein gene expression. Experientia Suppl, 1987, **52**: 63~80
- 7 Bienz M, Pelham H R. Heat shock regulatory elements function as an inducible enhancer in the Xenopus hsp70 gene and when linked to a heterologous promoter. Cell, 1986, **45** (5): 753~760
- 8 No D, Yao T, Evans R M. Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, **93** (8): 3346~3351
- 9 Gossen M, Freundlieb S, Bender G, *et al.* Transcriptional activation by tetracycline in mammalian cells. Science, 1995, **268** (5218): 1766~1769
- 10 Van Craenenbroeck K, Vanhoenacker P, Haegeman G, *et al.* Evaluation of the tetracycline-and ecdysone-inducible systems for expression of neurotransmitter receptors in mammalian cells. Eur J Neurosci, 2001, **14** (6): 968~976

Establishment of Brain Relatively Specific Gene LRRC4 With Doxycycline Induced Tet Regulating System in U251 Glioblastoma Cell Line*

ZHANG Qiu-Hong, WANG Li-Li, PENG Cong, CAO Li, WANG Jie-Ru, LI Xiao-Ling, LI Gui-Yuan**

(Cancer Research Institute, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract LRRC4 is a novel brain relatively specific gene and a member of LRR superfamily, which displayed significant down-regulation in primary brain tumor biopsies and has the potential to suppress brain tumor growth. The establishment of LRRC4 with doxycycline (Dox) induced Tet regulating system in U251 glioblastoma cell line was reported. Firstly, Tet-on regulating plasmid was transfected into U251 cells and screened by G418 to construct the single-stable U251 Tet-on cell line. Low background and high expression clone was acquired by testing luciferase activity. Successively, pTRE-2hyg/LRRC4 plasmid was transfected into the clone and screened by hygromycin. Two positive clones were received by RT-PCR and Northern blot analysis. The positive clones showed well dose-response and time-response in expression of LRRC4 with Dox inducement. Results show that establishment of LRRC4 with doxycycline induced Tet regulating system in U251 glioblastoma cell line is successfully, which provides an ideal experimental platform for understanding the mechanism of LRRC4 in glioma tumorigenesis and development.

Key words LRRC4, Tet-on gene expression system, doxycycline (Dox)

*This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30100191, 30270429) and The National Natural Science Foundation of Hunan (03JJY3062).

**Corresponding author . Tel: 86-731-4805090, Fax: 86-731-4805383, E-mail: Ligy@xysm.net

Received: November 16, 2004 Accepted: December 28, 2004