

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.02.003

稳定表达 p120ctn 的人肺腺癌 A549 细胞株的构建*

毕传林 刘海艳 韩翠芳 张信玲 顾玉超[△]

(中国海洋大学医药学院 山东 青岛 266003)

摘要 目的:构建稳定表达 p120ctn 的 A549 细胞株,以研究 p120ctn 蛋白在肺癌发生和转移过程中的作用。**方法:**通过分子克隆,将 pcDNA3.1 多克隆位点插入 Flag 标签的编码序列,得到 pcDNA.Flag 表达载体。然后 PCR 扩增 p120ctn 的编码序列,插入 Flag 标签下游,构建 pcDNA.Flag-p120ctn 质粒,筛选阳性克隆并进行酶切及测序鉴定。利用脂质体 Lipofectamine 2000 将 pcDNA.Flag-p120ctn 质粒转染到肺癌细胞 A549 中,通过 G418 筛选得到稳定转染细胞株,免疫印迹法检测 p120ctn 的表达。**结果:**本文构建了融合有 Flag 标签的 p120ctn 真核表达载体并转染到 A549 中,免疫印迹结果表明 p120ctn 蛋白在 A549 细胞中高效的表达。**结论:**本文成功构建了稳定高表达 p120ctn 的 A549 细胞模型,为深入研究 p120ctn 在肺癌的发生和转移过程中的作用奠定了基础。

关键词:p120ctn;肺癌;A549 细胞株;稳定高表达

中图分类号:Q291;Q78;R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)02-213-04

The Construction of Human Lung Adenocarcinoma Cell Line of A549 Expressing p120ctn*

BI Chuan-lin, LIU Hai-yan, HAN Cui-fang, ZHANG Xin-ling, GU Yu-chao[△]

(School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao, Shandong, 266003, China)

ABSTRACT Objective: To establish a stable A549 cell line over-expressing p120ctn through pcDNA3.1. **Methods:** First, a DNA fragment encoding Flag-tag was synthesized. A p120ctn gene was cloned by PCR and inserted into the multiple cloning sites of pcDNA3.1 to construct the plasmid pcDNA.Flag-p120ctn. The vector was identified by enzyme digestion and DNA sequencing. Secondly, we transfected pcDNA.Flag-p120ctn into A549 cell by lipofectamine 2000. Then, stable transfected A549 cell line expressing p120ctn was established after screening culture by G418 and was identified by Western blot. **Results:** The plasmid pcDNA. Flag-p120ctn was constructed. Stable transfected A549 cell line was established and p120ctn was over-expressed successfully. **Conclusion:** We successfully generate a stable A549 cell line expressing p120ctn which sets a cell model for further research into the genesis and development of human lung adenocarcinoma.

Key words: p120ctn; Lung adenocarcinoma; A549 cell line; Overexpression

Chinese Library Classification(CLC): Q291; Q78; R734.2 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2015)02-213-04

前言

在我国,肺癌的死亡率约占所有癌症死亡率的 20%,且 5 年存活率只有约 15%^[1]。而肺癌的侵袭转移是肺癌复发和死亡率高的主要因素,但其发生机制并未完全阐明。E-cadherin 蛋白参与细胞与细胞间,细胞与基质间的粘附,是细胞保持形态和稳定性的重要蛋白^[2]。E-cadherin 的突变或表达缺失导致细胞粘附作用的丧失,与肺癌的发生、侵袭转移密切相关^[3,4]。p120ctn 连环蛋白(p120 catenin,p120ctn)属于 Armadillo 家族的重要成员之一^[5]。它通过形成钙粘蛋白-连环蛋白(cadherin-catenin)复合体,参与细胞粘附,信号转导,转录调节等生理过程。p120ctn 是 E-cadherin 的重要协同因子,它可以与 E-cadherin 的胞质结构域直接相互作用,调节 E-cadherin 的功能^[6]。有研究表明,肿

瘤细胞中的 E-cadherin 缺失导致的肿瘤侵袭转移与 p120ctn 的低表达相关,但其具体作用机制并未完全阐明^[7]。此外,p120ctn 还参与多种生理过程,因此其功能的研究具有重要理论意义和临床价值。本研究利用 PCR 技术,克隆鼠源的 p120ctn 基因,进而构建 p120ctn 真核表达载体。利用脂质体的方法转染 A549 细胞,经过 G418 抗生素筛选,得到稳定表达 p120ctn 的 A549 肺癌细胞株。A549-p120ctn 细胞株的构建为深入研究 p120ctn 的作用,特别是在肿瘤侵袭转移过程中的作用,建立了细胞模型。

1 材料与方法

1.1 实验材料

非小细胞肺癌上皮细胞 A549 为中国科学院典型培养物

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81172013);高等学校博士学科点专项科研基金资助课题(20100132120012)

作者简介:毕传林(1984-),男,硕士研究生,主要研究方向:分子生物学

△ 通讯作者:顾玉超,电话:0532-82032067,E-mail:guych@126.com

(收稿日期:2014-06-19 接受日期:2014-07-13)

保藏委员会细胞库提供;RPMI1640 培养基和胎牛血清为 Gibco 公司提供;大肠杆菌 DH5 α 和 pcDNA3.1 载体为本实验室保存;限制性内切酶:*Hind* III、*Xba* I、*Kpn* I 和 *Eco* R V;T4 DNA 连接酶、pMD-18T、DNA 聚合酶、质粒提取试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒等由宝生物工程(大连)有限公司提供;抗 Flag 标签抗体(M2) 购自 Sigma 公司;抗 p120ctn 抗体、抗 GAPDH 抗体和 HRP 标记二抗购自美国 Santa Cruz 公司;ECL 化学发光试剂购自 GE 公司;PVDF 膜购自 Millipore 公司;lipofectamine 2000 购买自英潍捷基公司;G418 购买自碧云天公司。

1.2 实验方法

1.2.1 pcDNA.Flag 载体的构建 设计合成含有 Flag 标签编码序列和一系列限制性内切酶酶切位点的 DNA 片段,其正义链为 AG CTT ACC ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG GGA TCC GGT GGT ACC GCG GCC GCT GAT ATC TGA T, 反义链为 CT AGA TCA GAT ATC AGC GGC CGC GGT ACC ACC GGA TCC CTT GTC ATC GTC GTC CTT GTA GTC CAT GGT A。将两条链退火后得到两端分别含有 *Hind* III 和 *Xba* I 粘性末端的 DNA 片段,并将其克隆到 *Hind* I-II 和 *Xba* I 双酶切的 pcDNA3.1 载体中,得到 pcDNA.Flag 载体。该载体可用于在哺乳动物细胞中表达 N 端融合有 Flag 标签的目的蛋白。

1.2.2 p120ctn 基因的克隆 根据小鼠 p120ctn 的基因序列,设计并合成 PCR 引物。正向引物 GGT ACC ATG GAC GAC TCA GAG(5'端有 *Kpn* I 酶切位点);反向引物 GAT ATC CTA AAT CTT CTG CAT CAA(5'端有 *Eco* R V 酶切位点)。以小鼠 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增得到 p120ctn 编码序列。PCR 产物经过 TA 克隆,得到 pMD18T-p120ctn 载体,测序验证。

1.2.3 pcDNA.Flag-p120ctn 表达载体的构建 利用质粒小量抽提试剂盒提取 pcDNA.Flag 和 pMD18-p120ctn 质粒,两个质粒均进行 *Kpn* I 和 *Eco* R V 双酶切。琼脂糖凝胶电泳后利用胶回收试剂盒分别回收 pcDNA.Flag 载体(大约 5500 bp)和 p120ctn 基因(大约 2800 bp)两个 DNA 片段。连接并转化到 E. coli DH5 α 感受态细胞。利用 *Kpn* I 和 *Eco* R V 双酶切筛选阳性转化子,得到 pcDNA.Flag-p120ctn 表达载体。

1.2.4 细胞培养 A549 肺癌细胞利用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养。培养温度为 37℃,二氧化碳浓度 5%,按照 ATCC 提供的标准细胞培养操作对细胞进行培养和传代。

1.2.5 Flag-p120ctn 过量表达肺癌细胞株的构建 利用 Qiagen 质粒大量抽提试剂盒提取 pcDNA.Flag-p120ctn 和 pcDNA.Flag 质粒,通过 lipofectamine 2000 将这两种质粒分别转染到 A549 细胞中。转染后 24 h 加入 800 μ g/mL 的 G418,每 2 天更换含 800 μ g/mL G418 新鲜培养基,连续筛选 2 周,得到稳定表达 Flag-p120ctn 的肺癌细胞株和表达 Flag 标签的对照细胞株。

1.2.6 免疫印迹(WB)实验 细胞用预冷的 PBS 洗涤 3 遍,使用蛋白裂解液 P0013 在 4℃ 孵育 20 min,12000 rpm 离心 10 min,裂解液上清中加入 SDS-PAGE Loading buffer,100℃ 煮沸 10 min。蛋白样品经 8% SDS-PAGE 分离并转印到 PVDF 膜上。将膜用封闭液(含 4%BSA 的 TBST)封闭 1 h,TBST 洗三次,加入封闭液稀释的相应一抗(Flag 抗体、GAPDH 抗体或

p120 抗体)(1:1000 稀释),4℃ 摇床孵育过夜;TBST 洗三次,加入封闭液稀释的 HRP 标记二抗(1:5000 稀释),室温摇床孵育 1 h;TBST 洗六次。在膜上加入化学发光试剂 ECL,保鲜膜包好,在暗室内对 X 线胶片曝光后显影、定影。

2 结果

2.1 pcDNA.Flag 载体的构建

通过 DNA 测序结果说明,按照 2.1 所述方法构建的 pcDNA.Flag 载体序列正确,表明 pcDNA.Flag 载体已成功构建。

2.2 p120ctn 基因的克隆

以小鼠 cDNA 为模板,利用 LaTaq DNA 聚合酶通过 PCR 扩增得到大约 2800 bp 的 p120ctn 基因片段,该片段的 5'端带有 *Kpn* I 酶切位点、3'端带有 *Eco* R V 酶切位点。PCR 产物克隆到 pMD-18T 载体,PCR 鉴定为阳性(图 1),从而获得 pMD-18T-p120ctn 质粒。DNA 测序与 Genebank 数据库比对,结果表明通过 PCR 克隆的 2800 bp 片段确实是鼠源的 p120ctn 基因,且无碱基突变。

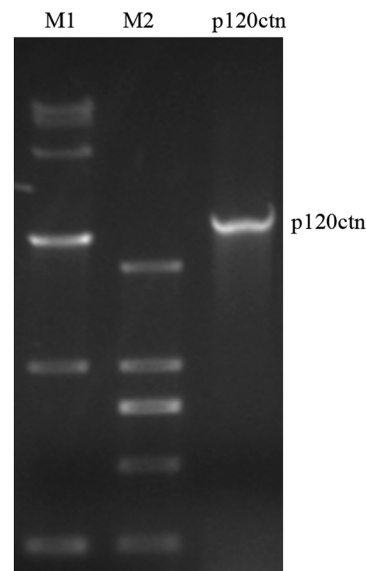


图 1 p120ctn 基因的克隆

Fig. 1 The gene cloning of p120ctn

*注:泳道 M1:DL15000 DNA marker;泳道 M2:DL2000 DNA marker;泳道 p120ctn: pMD-18T-p120ctn 的 PCR 鉴定。

*Note: Lane M1:DL15000 DNA marker; Lane M2: DL2000 DNA marker; Lane p120ctn: PCR product of pMD-18T-p120ctn.

2.3 pcDNA.Flag-p120ctn 载体的构建

p120ctn 基因片段通过 *Kpn* I 和 *Eco* R V 酶切位点克隆到 pcDNA.Flag 质粒,经 *Kpn* I 和 *Eco* R V 双酶切鉴定(图 2),阳性质粒存在 2800 bp DNA 片段,如图可知,泳道 M1 为得到的重组质粒 pcDNA.Flag-p120ctn。通过测序结果得知,本研究成功构建了携带 Flag 标签的 p120ctn 真核表达质粒。

2.4 p120ctn 过量表达肺癌细胞模型的构建

将 pcDNA.Flag-p120ctn 与 pcDNA.Flag 质粒分别转染到 A549 细胞株中,使用 G418 筛选两周,得到稳定表达 Flag-p120ctn 的肺癌细胞模型和对照细胞模型,分别命名为 A549-p120ctn 和 A549-ctrl。WB 检测结果显示,相对于对照细

胞模型 A549-ctrl, A549-p120ctn 存在清晰的 Flag 条带, 这说明 A549-p120ctn 可以表达融合有 Flag 标签的 p120ctn 蛋白。更有意义的是 A549-p120ctn 细胞中的 p120ctn 蛋白水平是 A549-ctrl 对照细胞的 5.8 倍。以上结果说明构建的 A549-p120ctn 细胞可以稳定高表达携带 Flag 标签的鼠源 p120ctn, 实现了 p120ctn 在肺癌细胞中的过量表达(图 3)。

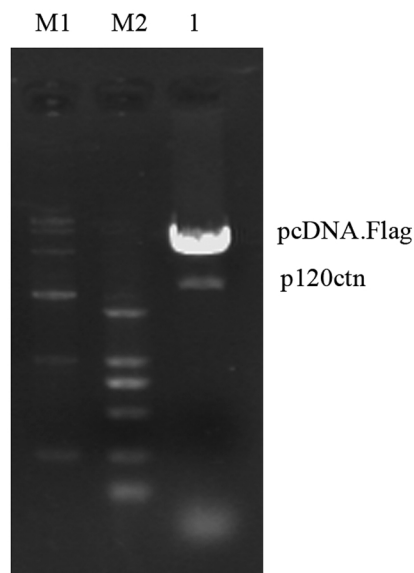


图 2 p120ctn 重组质粒的构建

Fig. 2 The recombinant expression of p120ctn

* 注:泳道 M1:DL15000 DNA marker;泳道 M2:DL2000 DNA marker;
泳道 1:pcDNA.Flag-p120ctn 的 *Kpn*I 和 *Eco*RV 双酶切鉴定。

*Note: Lane M1:DL15000 DNA marker; Lane M2: DL2000 DNA marker;
Lane 1: pcDNA.Flag-p120ctn was digested by *Kpn*I and *Eco*RV.

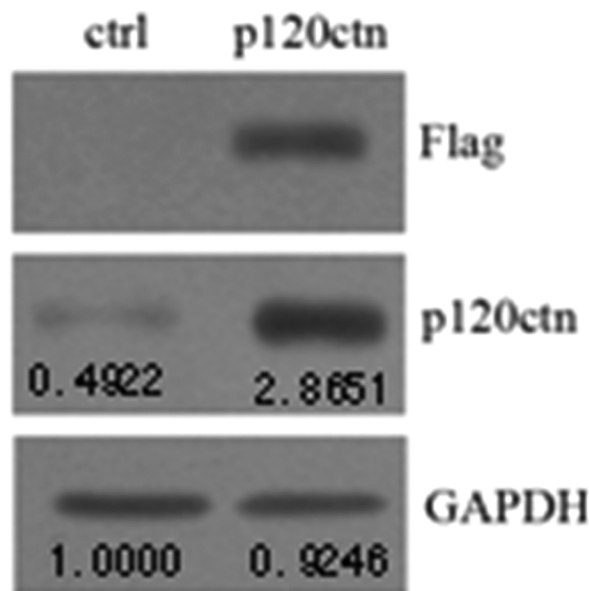


图 3 p120ctn 的表达

Fig. 3 The expression of p120ctn

* 注:WB 检测 p120ctn 在对照细胞和 p120ctn 过量表达肺癌细胞中的表达情况,其中 Flag 代表利用抗 Flag 抗体、p120ctn 代表利用抗 p120 抗体, GAPDH 代表利用抗 GAPDH 抗体。

*Note: The protein of p120ctn was detected by western blotting in stable cell line with antibody: anti-Flag, anti-p120 and anti-GAPDH.

3 讨论

p120ctn 在许多人类肿瘤中表达异常。p120ctn 基因的缺失、突变和重排与肿瘤预后有关。p120ctn 可以作为原癌基因,也可以作为侵袭抑制因子发挥作用,这取决于和 p120ctn 相互作用的 E-cadherin 是否被下调^[89]。在上皮癌症中 E-cadherin 通常表现为表达下降,研究发现 p120 缺失直接导致 E-cadherin 的降低。此时的 p120ctn 作为肿瘤抑制因子发挥作用^[90,91]。另外, p120ctn 也可以分别在细胞浆中调节 RhoGTPases 活性影响细胞运动能力^[12,13]。因此, p120ctn 是一个多功能的蛋白,其功能与其所在组织或细胞的遗传背景相关。本研究构建的 Flag-p120ctn 载体将 Flag 与 p120ctn 蛋白融合表达,对于 p120ctn 蛋白的检测、定位和纯化都具有明显优势,尤其在免疫共沉淀检测蛋白质相互作用的实验中,利用 Flag 标签检测到的结果的特异性和灵敏度会更好。这为更好的研究 p120ctn 参与的蛋白质复合体的形成奠定了基础。

前期研究发现肿瘤中存在 p120ctn 的下调,比如在乳腺癌和结肠癌细胞系中均发现有 p120 的 CTNND1 突变^[14-16]。一项研究报道了在非小细胞肺癌细胞(NSCLC)中, p120 被 FOXC2 在转录水平下调^[17]。除此之外,在前列腺癌中也发现 p120ctn 表达下调,而这种下调机制为表观遗传学中的 micro-RNA 介导的转录沉默^[18]。因此 p120 的缺失和下调在肿瘤发生发展过程中扮演了重要角色。本研究构建的过表达 p120ctn 细胞株可以通过恢复肺癌细胞中 p120ctn 的水平,研究 p120ctn 如何参与肺癌发生。此外,为研究 p120ctn 表观遗传学调控机制提供了细胞模型。

通过 Gene bank 数据库比对分析,发现小鼠 p120ctn 蛋白与人 p120ctn 蛋白的同源性达到 98%,但二者在 DNA 水平的同源性较低^[19,20],因此本研究选择了构建鼠源 p120ctn 表达载体。鼠源 p120ctn 基因的优势在于,为后续研究中利用基因沉默抑制内源性 p120ctn 表达的同时,不影响外源性 p120ctn 的表达。

综上所述,本研究成功构建了鼠源 p120ctn 表达载体,并建立了稳定转染的 A549-p120ctn 细胞株。WB 检测表明,该细胞株中 p120ctn 的表达水平远远高于内源性 p120ctn 水平,为后续研究 p120ctn 在肺癌发生和转移过程中的作用奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] 陈万青,张思维,邹小农. 中国肺癌发病死亡的估计和流行趋势研究[J]. 中国肺癌杂志, 2010, 13(5): 488-493
Chen Wan-qing, Zhang Si-wei, Zou Xiao-nong. Estimation and projection of lung cancer incidence and mortality in China [J]. Chin J Lung Cancer, 2010, 13(5): 488-493
- [2] Wheelock M J, Johnson K R. Cadherins as modulators of cellular phenotype[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2003, 19: 207-235
- [3] Bremnes R M, Veve R, Hirsch F R, et al. The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis [J]. Lung Cancer, 2002, 36(2): 115-124
- [4] Yanagisawa M, Anastasiadis P Z. p120 catenin is essential for

- mesenchymal cadherin-mediated regulation of cell motility and invasiveness[J]. *J Cell Biol*, 2006, 174(7): 1087-1096
- [5] van Hengel J, Vanhoenacker P, Staes K, et al. Nuclear localization of the p120 (ctn) Armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(14): 7980-7985
- [6] Fukumoto Y, Shintani Y, Reynolds A B, et al. The regulatory or phosphorylation domain of p120 catenin controls E-cadherin dynamics at the plasma membrane [J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314(1): 52-67
- [7] Soto E, Yanagisawa M, Marlow L A, et al. p120 catenin induces opposing effects on tumor cell growth depending on E-cadherin expression[J]. *J Cell Biol*, 2008, 183(4): 737-749
- [8] Miyashita Y, Ozawa M. A dileucine motif in its cytoplasmic domain directs beta-catenin-uncoupled E-cadherin to the lysosome [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 24): 4395-4406
- [9] Ishiyama N, Lee S H, Liu S, et al. Dynamic and static interactions between p120 catenin and E-cadherin regulate the stability of cell-cell adhesion[J]. *Cell*, 2010, 141(1): 117-128
- [10] Miyashita Y, Ozawa M. Increased internalization of p120-uncoupled E-cadherin and a requirement for a dileucine motif in the cytoplasmic domain for endocytosis of the protein[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(15): 11540-11548
- [11] Stairs D B, Bayne L J, Rhoades B, et al. Deletion of p120-catenin results in a tumor microenvironment with inflammation and cancer that establishes it as a tumor suppressor gene [J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(4): 470-483
- [12] Fang X, Ji H, Kim S W, et al. Vertebrate development requires ARVCF and p120 catenins and their interplay with RhoA and Rac[J]. *J Cell Biol*, 2004, 165(1): 87-98
- [13] Elia L P, Yamamoto M, Zang K, et al. p120 catenin regulates dendritic spine and synapse development through Rho-family GTPases and cadherins[J]. *Neuron*, 2006, 51(1): 43-56
- [14] Wood L D, Parsons D W, Jones S, et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers [J]. *Science*, 2007, 318(5853): 1108-1113
- [15] Ireton R C, Davis M A, van Hengel J, et al. A novel role for p120 catenin in E-cadherin function[J]. *J Cell Biol*, 2002, 159(3): 465-476
- [16] Davis M A, Ireton R C, Reynolds A B. A core function for p120-catenin in cadherin turnover[J]. *J Cell Biol*, 2003, 163(3): 525-534
- [17] Mortazavi F, An J, Dubinett S, et al. p120-catenin is transcriptionally downregulated by FOXC2 in non-small cell lung cancer cells[J]. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(5): 762-774
- [18] Hamada S, Satoh K, Miura S, et al. miR-197 induces epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells by targeting p120 catenin[J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(6): 1255-1263
- [19] Oas R G, Xiao K, Summers S, et al. p120-Catenin is required for mouse vascular development[J]. *Circ Res*, 2010, 106(5): 941-951
- [20] Davis M A, Reynolds A B. Blocked acinar development, E-cadherin reduction, and intraepithelial neoplasia upon ablation of p120-catenin in the mouse salivary gland[J]. *Dev Cell*, 2006, 10(1): 21-31

(上接第 390 页)

- [20] Gandia J, Galino J, Amaral OB, et al. Detection of higher-order G protein-coupled receptor oligomers by a combined BRET-BiFC technique[J]. *FEBS Lett*, 2008, 582(20): 2979-2984
- [21] Gilbert BJ. The role of amyloid beta in the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *J Clin Pathol*, 2013, 66(5): 362-366
- [22] Sahara N, Murayama M, Mizoroki T, et al. In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation [J]. *J Neurochem*, 2005, 94(5): 1254-1263
- [23] Chun W, Waldo GS, Johnson GV. Split GFP complementation assay for quantitative measurement of tau aggregation in situ [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 670: 109-123
- [24] So PP, Khodr CE, Chen CD, et al. Comparable dimerization found in wildtype and familial Alzheimer's disease amyloid precursor protein mutants[J]. *Am J Neurodegener Dis*, 2013, 2(1): 15-28
- [25] Chen CD, Oh SY, Hinman JD, et al. Visualization of APP dimerization and APP-Notch2 heterodimerization in living cells using bimolecular fluorescence complementation[J]. *J Neurochem*, 2006, 97(1): 30-43
- [26] Oh SY, Chen CD, Abraham CR. Cell-type dependent modulation of Notch signaling by the amyloid precursor protein [J]. *J Neurochem*, 2010, 113(1): 262-274
- [27] Gazewood JD, Richards DR, Clebak K. Parkinson disease: an update [J]. *Am Fam Physician*, 2013, 87(4): 267-273
- [28] Putcha P, Danzer KM, Kranich LR, et al. Brain-permeable small-molecule inhibitors of Hsp90 prevent alpha-synuclein oligomer formation and rescue alpha-synuclein-induced toxicity[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 332(3): 849-857
- [29] Hillmer AS, Putcha P, Levin J, et al. Converse modulation of toxic alpha-synuclein oligomers in living cells by N'-benzylidene-benzohydrazide derivatives and ferric iron [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(1): 461-466
- [30] Vidi PA, Chemel BR, Hu CD, et al. Ligand-dependent oligomerization of dopamine D (2) and adenosine A (2A) receptors in living neuronal cells[J]. *Mol Pharmacol*, 2008, 74(3): 544-551
- [31] Bauer PO, Nukina N. The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies[J]. *J Neurochem*, 2009, 110(6): 1737-1765
- [32] Margulis BA, Vigont V, Lazarev VF, et al. Pharmacological protein targets in polyglutamine diseases: mutant polypeptides and their interactors[J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(13): 1997-2007
- [33] Herrera F, Outeiro TF. alpha-Synuclein modifies huntingtin aggregation in living cells[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(1): 7-12