

小鼠 DLL1 真核表达载体的构建及其在肿瘤细胞中的表达 *

张建平¹ 李娜² 王强¹ 亢君君¹ 李永强¹ 迟明¹ 王春梅^{1△}

(1 第四军医大学基础部中心实验室 陕西 西安 710032; 2 第四军医大学唐都医院肿瘤科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:构建带绿色荧光蛋白的小鼠 DLL1 全长基因真核表达载体,并在肿瘤细胞中表达。**方法:**利用 PCR 特异性引物扩增出 DLL1 基因全长,将克隆的基因片段插入带绿色荧光蛋白的真核表达载体 pIRES2-EGFP 质粒中。然后利用脂质体将重组质粒 pIRES2-EGFP-DLL1 转染进小鼠 B16 黑色素瘤细胞中,并通过 G418 筛选后选取生长良好、荧光强度高的三株单克隆进行 mRNA 水平 DLL1 表达的鉴定。**结果:**成功扩增小鼠 DLL1 的全长基因。克隆入质粒载体后,通过 DNA 序列测定证实其序列正确。将构建的 pIRES2-EGFP-DLL1 质粒转染小鼠 B16 黑色素瘤细胞,经过 G418 筛选和荧光显微镜观察后,挑选得到 GFP 阳性率 90% 以上的稳定转染细胞株。RT-PCR 检测稳定转染细胞的 mDLL1 的表达显著增加,进一步证实了 pIRES2-EGFP-DLL1 的表达效能。**结论:**成功构建了小鼠 DLL1 基因的真核表达质粒,证实其在真核细胞 B16 中可以表达。

关键词: DLL1; 肿瘤; 质粒构建

中图分类号: Q75, Q78, R730.231 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2011)04-650-03

Construction of pIRES2-EGFP-DLL1 Eukaryotic Vector and Its Expression in Tumor Cells*

ZHANG Jian-ping¹, LI Na², WANG Qiang¹, KANG Jun-jun¹, LI Yong-qiang¹, WANG Chun-mei^{1△}

(1 Center laboratory of basic research department, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shannxi, 710032, China;

2 Department of Oncology, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

ABSTRACT Objective: To construct the full-length murine DLL1 eukaryotic expression vector with green fluorescent protein (EGFP) and to express the gene intumor cells. **Methods:** full-length DLL1 cDNA was synthesized by RT-PCR with specific primers and cloned into pIRES2-EGFP vector to construct recombinant plasmid. The constructed vector was verified and then transfected into murine B16 melanoma cells. The transfected cells were selected with G418 and three green clones were chosen. The expression of DLL1 was detected by RT-PCR at mRNA levels. **Results:** The full-length DLL1 cDNA was successfully inserted into pIRES2-EGFP eukaryotic vector. B16 melanoma cells were transfected with recombinant pIRES2-EGFP-DLL1 plasmid by liposome. After selected by G418 and fluorescent microscope, clones of which more than 90% cells were green protein positive were obtained. RT-PCR was perform to further analyze mDLL1 expression in transfected cells. **Conclusion:** pIRES2-EGFP-DLL1 eukaryotic plasmid was successfully constructed and it can express in B16melanoma.

Key words: DLL1 gene; Tumor; Vector construction

Chinese Libaray Classification: Q75, Q78, R730.231 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)04-650-03

前言

Notch 是生物体进化过程中高度保守信号通路,迄今为止,在哺乳动物中发现了四种 notch 受体 (Notch1-4) 和五种 notch 配体[Delta 1, 3, and 4 and Jagged 1, 2]。Notch 受体和配体家族均是单次跨膜蛋白,通过相邻细胞间受体与配体的结合激活下游基因的表达,调控着细胞的增殖、分化、凋亡和命运选择等诸多方面的生物功能,是生物体维持正常功能的重要信号通路^[1]。Notch 信号通路中多种受体和配体成分的异常表达和调控都与肿瘤的发生、发展以及肿瘤相关微环境的调控密切相关^[2-3]。DLL1 是重要的notch 配体,研究表明 DLL1 在小鼠胚胎的发育,T、B 淋巴细胞分化和血管稳态的维持中发挥重要作用^[4]。

但 DLL1 对肿瘤增殖和生长作用的研究还很少见。本研究主要是通过构建小鼠 DLL1 基因表达载体,转染建立稳定过表达小鼠 DLL1 基因的肿瘤细胞系,为今后研究 DLL1 在肿瘤细胞中的作用打下基础。

1 实验材料与方法

1.1 材料

pIRES2-EGFP 质粒、感受态细菌、B16 黑色素瘤细胞均由本实验室保存。DNA maker, DNA 纯化试剂盒,质粒提取试剂盒,反转录试剂盒,限制性内切酶等均购于 TaKaRa 公司;脂质体 lipofetamine 2000 购自 invitrogen 公司;PCR 引物由 TaKaRa 公司合成;质粒测序由上海生工生物公司完成。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30972431)

作者简介:张建平(1984),男,硕士研究生,研究方向:肿瘤的生物治。E-mail:zhjp121@163.com

△通讯作者:王春梅,女,硕士生导师。E-mail:wangcm@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2010-11-06 接受日期:2010-12-29)

1.2 方法

1.2.1 小鼠 DLL1 基因全长片段的扩增 根据 GenBank (NM_007865) 中公布的小鼠 DLL1 基因序列, 编码区全长共 2280bp, 利用生物信息学软件分两段设计扩增引物, 第一段 5' 端引物: 5'-3'GAATTCTAGGAGAGCAAGGGC; 3' 端: 5'-3'-TTGGGTCACTGCAGTACTGGCCT; 第二段引物为 5' 端: 5'-3'GAAAGGCCAGTACTGCACTGACCCAAT; 3' 端: 5'-3'GGATCCACATCGCTTCCATCTTACACCT。在第一段 5' 端加酶切位点 *Eco*R1, 在第二段 3' 端加酶切位点 *Bam*H1, 以小鼠睾丸组织 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 条件: 预变性 94℃ 5min, 94℃ 30sec, 50-60℃ 30sec (温度梯度), 72℃ 1min 共进行 35 个循环, 最后在 72℃ 延伸 7min, 扩增出第一段和第二段, 分别命名为 D1 和 D2。

1.2.2 目的基因真核表达载体 pIRES2-EGFP-DLL1 质粒的构建 PCR 得到的目标片段经 10g/L 琼脂糖凝胶电泳, 依照 TaKaRa DNA 片段回收试剂盒操作说明, 回收 PCR 产物, 并分别克隆入 pMD18-T 载体, 得到 pMD18-T-D1 和 pMD18-T-D2。将 pMD18-T-D1、D2 质粒和 pIRES2-EGFP 载体分别用 *Eco*R I、*Ava*I 和 *Bam*H1 进行酶切, 回收预定片段。按照两目的片段分别加 2μl, 载体 1μl, Solution I 5μl 共计 10μl 的体系于 16℃ 连接 2h, 转化至 XL-10 大肠杆菌感受态, 涂 LB 琼脂 37℃ 过夜, 挑取单克隆, 过夜摇菌后用小量制备质粒盒提质粒, 然后用 *Eco*R I、*Bam*H1 双酶切鉴定, 选取正确的质粒送上海生工生物工程技术服务有限公司测序鉴定。

1.2.3 B16 黑色素瘤细胞转染 生长状态良好的 B16 黑色素瘤细胞转染前一天传代, 用含 10% 小牛血清、不含抗生素 RPMI-1640 培养基以每孔 3×10^5 个细胞, 接种于 6 孔板中, 在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中常规培养约 16 小时, 待细胞生长达 70%~80% 融合时, 换用无血清、无抗性的 1640 培养基。按 Lipofect2000 脂质体转染操作规程将构建好的 pIRES2-EGFP-DLL1 质粒转染 B16 细胞, 每孔细胞用 2μg 质粒, 5μl 脂质体。pIRES2-EGFP 空载体作为阴性对照。转染后 5 小时更换正常 RPMI-1640 培养基。

1.2.4 DLL1 基因稳定表达细胞株的筛选 转染细胞在正常培养基中生长 24 小时后, 将转染细胞以 1:3 比例传代, 更换含有 1000μg/mL G418 的培养基进行筛选, 3-4 天换液一次, 14 天后镜下见到 G418 抗性的单克隆株长出, 在荧光显微镜下挑选荧光强度较好的克隆株扩大培养。

1.2.5 DLL1 在细胞中表达的鉴定 参照 invitrogen Trizol Reagent 说明书提取 B16 细胞总 RNA。即每 105 个细胞中加入 1 ml Trizol, 混匀后室温放置 10 min, 加入 200μl 氯仿剧烈振荡 15 s, 室温孵育 3 min, 然后 4℃, 12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清加入 500μl 异丙醇, 于 4℃, 12 000 r/min 离心 10 min; 弃去上清, 沉淀用 75% 乙醇洗 2 次, 7 500 r/min 离心 5 min, 弃上清后空气干燥 5 min。白色沉淀溶于 DEPC 处理的水中, 并用紫外分光光度仪定量。参照 TakaRa 反转录试剂盒说明合成 cDNA 后用 DLL1 第一段的引物做 RT-PCR, 检测 B16 细胞中 DLL1 基因在 mRNA 水平的表达。

2 结果

2.1 DLL1 全长基因的获得

以 *Ava*I 为连接位点设计两对 DLL1 特异性引物, 以小鼠睾丸组织 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。第一段 PCR 产物预计为 613bp, 第二段预计为 1590bp。PCR 产物进行凝胶电泳分析表明扩增产物与预计大小一致(图 1)。

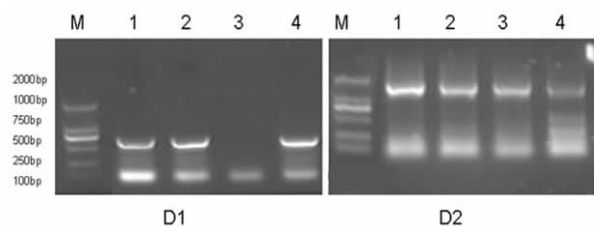


图 1 小鼠 DLL1 基因(2203bp)PCR 扩增产物的凝胶电泳分析: D1, 第一段产物(613bp);
2, 第二段产物(1590bp); M, marker 2000

Figure1 agarose gel electrophoresis of PCR amplification products of DLL1 fragments.

note: D1 product of first fragment(613bp); D2 product of second fragment (1590bp); M. DNA marker 2000

2.2 pIRES2-EGFP-DLL1 质粒的构建和鉴定

将两段 DLL1 基因片段连接到 pIRES2-EGFP 质粒, 获得 pIRES2-EGFP-DLL1 质粒后, 用 *Eco*R I、*Bam*H1 双酶切鉴定(图 2), 挑选正确的质粒送上海生工生物工程技术服务有限公司测序鉴定, 结果与 DLL1 原序列比对完全正确。最终构建质粒示意图(图 2)。

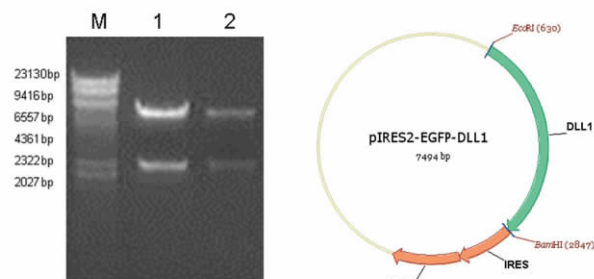


图 2 pIRES2-EGFP-DLL1 质粒 *Eco*R1、*Bam*H1 双酶切鉴定及质粒构建模式图 M DNA marker λ

Figure2 Identification of pIRES2-EGFP-DLL1 and map of the plasmid M DNA marker λ

2.3 pIRES2-EGFP-DLL1 质粒转染 B16 黑色素瘤细胞

用脂质体将 pIRES2-EGFP-DLL1 质粒转染到 B16 黑色素瘤细胞中, 筛选后在荧光显微镜下挑选出荧光表达较强的细胞株进行扩大培养。荧光显微镜下可见 90% 以上的细胞表达绿色荧光(图 3)

2.4 DLL1 mRNA 水平的检测

收集 B16 细胞, 提取 RNA 后采用 RT-PCR 的方法分别检测 B16-GFP 和 B16-DLL1 细胞中 DLL1 mRNA 水平的表达, 发现 B16-DLL1 的表达水平显著上调(图 4)。

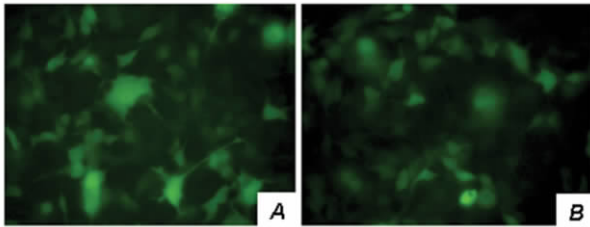


图3 荧光显微镜观察 B16 细胞绿色荧光表达(200 倍) A 转染 pIRES2-EGFP 质粒; B 转染 pIRES2-EGFP-DLL1 质粒;

Figure3 A mouse B16 melanoma cells were transfected with pIRES2-EGFP; B mouse B16 melanoma cells were transfected with pIRES2-EGFP-DLL1. Photographed under fluorescent microscopy, magnification x200

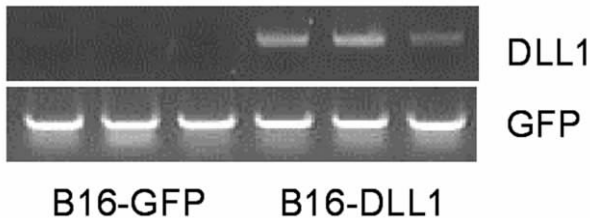


图4 RT-PCR 鉴定 DLL1 基因在 B16 黑色素瘤细胞中 mRNA 水平的表达

Figure4 Identification DLL1 mRNA expression by RT-PCR

3 讨论

DLL1 作为 notch 信号通路中重要的配体分子, 调控着生物体发育、干细胞增殖、血管形成和免疫细胞的分化。在胚胎发育过程中 DLL1 基因在中枢神经细胞、上皮宫腔细胞、肌细胞和血管内皮等多种组织细胞中广泛表达^[5]。DLL1 基因的缺失将会引起胚胎发育过程中体节紊乱, 神经系统增生, 并在胚胎 10.5 天出现严重的出血, 最终导致小鼠在胚胎 12 天死亡。在 DLL1 基因杂合剔除的成体小鼠中, DLL1 基因的缺失引起缺血损伤后血管侧枝循环形成的受阻^[6-8]。体外研究发现 DLL1 蛋白能显著诱导促进骨髓造血祖细胞的增殖, 并能促进 CD34+ 造血祖细胞向 T/NK 细胞分化而抑制其向 B 细胞分化^[9-10]。这些研究表明 DLL1 基因的表达维持着生物体正常的发育过程, 保证了生物体细胞的正常极化和体节分化, 同时还能促进干细胞的增殖, 促进免疫细胞的成熟和动脉血管内皮的生长。

从遗传学的角度来说, 在生物体发育过程中发挥重要作用的信号通路在肿瘤的发生发展过程中同样具有重要的作用^[12]。事实上, 研究结果证实 DLL1 基因在多种肿瘤细胞中表达升高并促进了肿瘤的生长和转移^[13-16]。近年来的研究发现 notch 信号对通路在肿瘤血管形成有重要作用。Notch 配体 DLL4 在肿瘤血管中的表达增高^[17-18], 阻断 DLL4 介导的 notch 信号通路促进了小鼠肿瘤内部新生血管的形成^[19-20], 而在肿瘤中过表达 DLL4 基因则抑制了肿瘤血管形成^[21]。尽管 DLL1 对胚胎和成体血管形成都具有调节作用^[6,22], 但其对肿瘤血管形成和肿瘤的生长是否发挥作用还没有得到明确的证。为了深入研究 DLL1 基因对肿瘤细胞体外增殖和体内成瘤的影响, 在本实验中我们通过克隆重组技术, 成功构建了

pIRES2-EGFP-DLL1 真核表达载体, 并通过脂质体转染和药物筛选建立了稳定表达 DLL1 基因的黑色素瘤细胞系。荧光显微镜观察发现 90% 的肿瘤细胞表达绿色荧光蛋白, PCR 检测进一步证实 DLL1 基因在肿瘤细胞中的表达显著升高。这些实验结果表明我们成功建立了表达 DLL1 基因的肿瘤细胞系, 为后续的实验提供了可能。

参考文献(References)

- [1] Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism[J]. Cell, 2009,137:216-33
- [2] Allenspach EJ, Maillard I. Notch signaling in cancer [J]. Cancer Biol Ther, 2002, 1:466-76
- [3] Bolos V, Grego B. Notch signaling in development and cancer[J]. Endocr Rev, 2007,28:339-63
- [4] Maillard I, Fang T, Pear WS. Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway [J]. Annu Rev Immunol, 2005,23:945-74
- [5] Beckers J, Clark A, Wunsch K, et al. Expression of the mouse Delta1 gene during organogenesis and fetal development [J]. Mech Dev, 1999,84:165-8
- [6] Hrabe de AM, McIntyre J. Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1[J]. Nature, 1997,386:717-21
- [7] Miceli LL, Johnson MJ, Harrington A, et al. Widespread delta-like-1 expression in normal adult mouse tissue and injured endothelium is reflected by expression of the Dll1LacZ locus[J]. J Vasc Res, 2008,45: 1-9
- [8] MacGrogan D, Nus M, de la Pompa JL Notch signaling in cardiac development and disease[J]. Curr Top Dev Biol, 2010,92:333-65
- [9] Han W, Ye Q, Moore MA. A soluble form of human Delta-like-1 inhibits differentiation of hematopoietic progenitor cells [J]. Blood, 2000,95:1616-25
- [10] Jaleco AC, Neves H, Hooijberg E, et al. Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation[J]. J Exp Med, 2001,194:991-1002
- [11] O'Neil J, Calvo J, McKenna K, et al. Activating Notch1 mutations in mouse models of T-ALL[J]. Blood, 2006, 107:781-5
- [12] Bolos V, Grego J, Pompa JL. Notch signaling in development and cancer[J]. Endocr Rev. 2007,28:339-63
- [13] Zhang P, Yang Y, Zweidler PA, et al. Critical role of notch signaling in osteosarcoma invasion and metastasis [J]. Clin Cancer Res. 2008,14:2962-9
- [14] Yin D, Xie D, Sakajiri S, et al. DLK1: increased expression in gliomas and associated with oncogenic activities [J]. Oncogene. 2006,25:1852-61
- [15] Purow BW, Haque RM, Noel MW, et al. Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation[J]. Cancer Res, 2005,65:2353-63
- [16] Qian CF, Yan W, Zhang JX, et al. Notch1 induces enhanced expression of Delta-like-1 in the U251MG glioma cell line [J]. Int J Mol Med, 2009,24:445-51
- [17] Mailhos C, Modlich U, Lewis J, et al. Delta4, an endothelial specific notch ligand expressed at sites of physiological and tumor angiogenesis[J]. Differentiation, 2001,69:135-144

(下转第 667 页)

CREB 和 NF-κ B 在 p38MAPK 所致脊髓星形胶质细胞活化中的作用

王 强¹ 陈宇东¹ 刘伟英¹ 王领军¹ 韩 刚¹ 宋 波²

(1 解放军第二五二医院泌尿外科 河北 保定 071000;2 第三军医大学西南医院全军泌尿外科研究所 重庆 400038)

摘要 目的:探讨 CREB 和 NF-κ B 在 p38MAPK 所致脊髓星形胶质细胞活化中的作用,明确脊髓星形胶质细胞活化中 p38MAPK 细胞信号转导途径的作用。**方法:**分离培养 SPF 大鼠脊髓星形胶质细胞,设正常组、SP 刺激组 (SP 组,10⁻⁷ mol/L)、SP 刺激 +SB203580(10 μ mol/L) 阻断 p38MAPK 组(SP+SB 组)、SP 刺激 + PD98059(10 μ mol/L)阻断 CREB 组(SP+PD 组)、SP 刺激 + SN50 (10 μ mol/L) 阻断 NF-κ B (SP+SN 组)。WB 法、免疫荧光法、ELISA 法检测 12 h 和 24 h 时 p-p38、p-CREB、NF-κ Bp65 水平及 GFAP、TNF-、IL-1β 水平变化。**结果:**SP 组脊髓星形胶质细胞 p-p38、p-CREB、NF-κ Bp65 显著升高,GFAP 水平显著增高,同时 TNF- 和 IL-1β 水平显著增高。与 SP 组比较,用 SB203580 阻断 p38MAPK 通路后,SP+SB 组 p-p38、p-CREB、NF-κ Bp65 显著降低,GFAP、TNF- 和 IL-1β 水平显著降低。用 PD98059 阻断 CREB 通路后,SP+PD 组 p-p38、NF-κ Bp65 无显著变化,p-CREB 显著降低,GFAP 水平降低,同时 TNF- 和 IL-1β 水平降低。用 SN50 阻断 NF-κ B 通路后,SP+SN 组 p-p38、p-CREB 无显著变化,NF-κ Bp65 显著降低,GFAP 水平降低,同时 TNF- 和 IL-1β 水平降低。**结论:**体外培养中,SP 刺激后脊髓星形胶质细胞显著活化,p38MAPK 活化后通过 CREB 及 NF-κ B 信号途径导致胶质细胞炎症因子水平显著升高。

关键词:星形胶质细胞;活化;p38MAPK;CREB;NF-κ B

中图分类号:Q95-3,Q813,R329 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)04-662-06

作者简介:王强(1976-),男,医学博士,主治医师,研究方向:主要从事前列腺疾病方面的研究。电话:13833079249,
E-mail:09wangq@sohu.com
(收稿日期:2010-11-03 接受日期:2010-11-30)

(上接第 652 页)

[18] Patel NS, Dobbie MS, Rochester M, et al. Upregulation of endothelial delta-like 4 expression correlates with vessel maturation in bladder cancer[J]. Clin Cancer Res, 2006;12:4836-4844

[19] Noguera TI, Daly C, Papadopoulos NJ, et al. Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis [J]. Nature, 2006;444:1032-7

[20] Ridgway J, Zhang G, Wu Y, et al. Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis [J]. Nature, 2006;444:1083-7

[21] Segarra M, Williams CK, Sierra Mde L, et al. Dll4 activation of Notch signaling reduces tumor vascularity and inhibits tumor growth [J]. Blood, 2008;112:1904-11

[22] Limbourg A, Ploom M, Elligsen D, et al. Notch ligand Delta-like 1 is essential for postnatal arteriogenesis[J]. Circ Res. 2007;100:363-71