

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.07.006

人 LMP-1 基因腺病毒重组体的构建及其在骨肉瘤细胞 U2OS 中的表达

刘会文¹, 黄路², 韩智敏¹, 罗嘉全¹, 杨东¹, 詹平¹, 戴闽¹, 曹凯¹

(1. 南昌大学第一附属医院骨科, 南昌 330006; 2. 江西省妇幼保健院儿保科, 南昌 330006)

【摘要】目的: 构建表达人 LIM 矿化蛋白-1 (LIM mineralization protein-1, LMP-1) 基因的腺病毒重组体, 体外感染骨肉瘤 (Osteosarcoma, OS) 细胞系 U2OS, 并鉴定 LMP-1 基因在 U2OS 中的表达。方法: 以 K562 细胞的 cDNA 为文库, 采用 PCR 方法对 LMP-1 进行扩增, 通过 TA 克隆与 pGEM-T 载体连接并 DNA 测序。双酶切后将目的基因插入至腺病毒穿梭质粒 pAdtrack-CMV, 对腺病毒穿梭质粒 pAdtrack-CMV-LMP-1 行双酶切和 DNA 测序鉴定, 并通过荧光显微镜、RT-qPCR 和 Western blot 检测 pAdtrack-CMV-LMP-1 在 HEK-293T 细胞中的表达。线性化 pAdtrack-CMV-LMP-1, 在 BJ5183 菌内完成与骨架质粒 pAdeasy-1 的同源重组, 构建重组腺病毒质粒 Ad-LMP-1。通过脂质体介导, 在 HEK-293A 细胞内包装出复制缺陷的重组腺病毒 Ad-LMP-1, 大量扩增、纯化并测定滴度。用 Ad-LMP-1 感染 OS 细胞系 U2OS, 通过荧光显微镜、RT-qPCR 和 Western blot 检测 LMP-1 在 U2OS 细胞中的表达。结果: 双酶切和 DNA 测序鉴定穿梭质粒 pAdtrack-CMV-LMP-1 构建成功, 荧光显微镜证实转染了 pAdtrack-CMV-LMP-1 质粒的 HEK-293T 细胞内有绿色荧光蛋白表达, RT-qPCR 和 Western blot 验证了 LMP-1 基因的表达量明显高于对照组。通过扩增、纯化, Ad-LMP-1 滴度达到 1.5×10^9 pfu/ml。荧光显微镜下观察重组腺病毒感染的 U2OS 内有绿色荧光蛋白表达, RT-qPCR 和 Western blot 检测发现重组腺病毒感染 U2OS 后, LMP-1 的 mRNA 和蛋白表达量明显高于对照组。结论: 成功构建了人 LMP-1 基因腺病毒重组体, 为进一步的实验研究奠定了基础。

【关键词】LIM 矿化蛋白-1; 重组腺病毒载体; 表达载体构建; 骨肉瘤细胞

【中国图书分类法分类号】R738.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-01-28

作者介绍: 刘会文 (1985-), 男, 硕士,

研究方向: 恶性骨肿瘤基础与临床。

通信作者: 曹凯, 男, 副教授, Email: osteo.caokai@yahoo.com.cn。

基金项目: 江西省教育厅科研基金资助项目 (编号: GJJ07095, GJJ08076);

江西省自然科学基金资助项目 (编号: 2009GQY0204)。

graftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100 (100): 8407-8411.

[6] Kotton D N, Ma B Y, Cardoso W Y, et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium[J]. Development, 2001, 128(24): 5181-5188.

[7] Yan X, Liu Y, Han Q, et al. Injured microenvironment directly guides the differentiation of engrafted flk-1(+) mesenchymal stem cell in lung[J]. Exp Hematol, 2007, 35(9): 1466-1475.

[8] Epperly M W, Franicola D, Zhang X, et al. Reduced irradiation pulmonary fibrosis and stromal cell migration in smad3S/S marrow chimeric mice[J]. In Vivo, 2006, 20(5): 573-582.

[9] Popov B V, Serikov V B, Petrov N S, et al. Lung epithelial cells induce endodermal differentiation in mouse mesenchymal bone marrow stem cells by paracrine mechanism[J]. Tissue Eng, 2007, 13(10): 2441-2450.

[10] Field-Corbett C, O'Dea S. Soluble signals from mechanically disrupted lung tissue induce lung-related gene expression in bone mar-

row-derived cells in vitro[J]. Stem Cells Dev, 2007, 16(2): 231-242.

[11] Xu J, Woods C R, Mora A L, et al. Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 293(1): 131-141.

[12] Sueblinvong V, Weiss D J. Cell therapy approaches for lung diseases: current status[J]. Curr Opin Pharmacol, 2009, 9(3): 268-273.

[13] Liu Y, Dulchavsky D S, Gao V, et al. Wound repair by bone marrow stromal cells through growth factor production[J]. J Surg Res, 2006, 136(2): 336-341.

[14] Ortiz L A, Dutreil M, Fattman C, et al. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(26): 11002-11007.

[15] Xu J, Qu J, Cao L, et al. Mesenchymal stem cell-based angiotensin-1 gene therapy for acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice[J]. J Pathol, 2008, 214(4): 472-481.

(责任编辑: 关蕴良)

Construction of recombinant adenoviral vector encoding human LMP-1 and its expression in osteosarcoma cell U2OS

LIU Huiwen¹, HUANG Lu², HAN Zhimin¹, LUO Jiaquan¹, ZHAN Ping¹, DAI Min¹, CAO Kai¹

(1. Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital, Nanchang University; 2. Department of Child Care, Jiangxi Maternal and Child Health Hospital)

[Abstract] **Objective:** To construct recombinant adenoviral vector encoding human LIM mineralization protein-1 (LMP-1) and to investigate its expression in osteosarcoma cell line U2OS. **Methods:** The cDNA of LMP-1 was amplified by PCR from K562 cell line and cloned into pGEM-T, then subcloned into shuttle plasmid pAdtrack-CMV. After restrictive enzyme digestion and DNA sequencing, the recombinant shuttle plasmid pAdtrack-LMP-1 was transferred into HEK-293T cells, which were detected by fluorescent microscopy, RT-qPCR and Western blot to confirm the expression of LMP-1. Then linearized pAdtrack-LMP-1 was homologously recombined with pAdEasy-1 in BJ5183 competent cell to transform into Ad-LMP-1 which subsequently transfected HEK-293A cells under the mediation of lipofectamine. Ad-LMP-1 was packaged and amplified in HEK-293A cells. After Ad-LMP-1 infection, the gene and protein expressions of LMP-1 in U2OS were identified by fluorescent microscopy, RT-qPCR and Western blot. **Results:** Restrictive enzyme digestion and DNA sequencing analysis revealed that the shuttle plasmid pAdtrack-LMP-1 was constructed successfully. Fluorescence microscopy found that expressed green fluorescent protein was distributed in cytoplasm of transfected HEK-293T. RT-qPCR and Western blot verified LMP-1 to be highly expressed in HEK-293T. After purification, the virus titer reached 1.5×10^9 pfu/ml. The result of fluorescent microscopy, RT-qPCR and Western blot indicated that LMP-1 mRNA and protein expression were remarkably increased in U2OS infected with Ad-LMP-1. **Conclusion:** The recombinant adenovirus Ad-LMP-1 has been successfully constructed and can be helpful for the further research involved in LMP-1.

[Key words] LIM mineralization protein-1; recombinant adenoviral vector; construction of expression vector; osteosarcoma cells

骨肉瘤 (Osteosarcoma, OS) 是一种高度恶性骨肿瘤, 其发病率在儿童及青少年原发恶性骨肿瘤中占据首位, 15% 的患者在明确诊断时已出现肺转移^[1]。研究 OS 的发生、发展及转归的分子机制无疑有助于 OS 的早期诊断及治疗。

目前认为 OS 的发生与干细胞成骨分化障碍有关^[2,3]。在 OS 细胞中, 成骨调节基因 Runx2、Osterix 和晚期成骨标志骨桥蛋白 (Osteopontin, OPN) 均出现低表达; 然而, 上调 OS 细胞的 Runx2 表达能够抑制 OS 细胞的增殖, 并出现成骨分化^[3]。人 LIM 矿化蛋白 -1 (LIM mineralization protein-1, LMP-1) 能够上调 Runx2 和碱性磷酸酶 mRNA 的表达水平^[4]。因此, 上调 OS 细胞 LMP-1 的表达可能抑制 OS 的恶性表型。

研究证明, LMP-1 作为成骨信号通路的上游分子, 能够招募众多成骨基因参与成骨分化和成骨^[4,5]。LMP-1 共包含 1 374 个碱基, 产物为含 457 个氨基酸的蛋白质, 在人类共发现 3 种不同的 LMP 剪接体, 分别是 LMP-1、LMP-2、LMP-3^[6]。研究证实 1-133 肽段是 LMP-1 发挥成骨效应所必须的^[5,7,8]。

预实验研究提示 LMP-1 能通过促进 OS 细胞成骨分化而抑制 OS 的恶性表型。因此本研究拟构建重组腺病毒 Ad-LMP-1, 并检测其在 OS 细胞

U2OS 中的表达, 为进一步的实验研究提供基础。

1 材料和方法

1.1 细胞、质粒和试剂

HEK293 细胞系和 K562 细胞系由中国医学科学院、协和医科大学基础医学研究所提供。U2OS 细胞系为南昌大学第一附属医院骨科实验室冻存。大肠杆菌 DH5 α 和 AdEasy 腺病毒载体系统由协和医科大学基础医学研究所刘长征博士惠赠; 限制性内切酶 *Bgl* II、*Hind* III、pGEM-T 载体购自 TaKaRa 公司; 转染试剂 Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司; SYBR Green qPCR Master 2 $\times$ mix、限制性内切酶 *Pme* I、*Pac* I 为 New England Biolabs 公司产品; SuperscriptTM II 逆转录酶、RNA inhibitor 购自 Invitrogen 公司; 抗 His (C-term) 抗体购自天根生物技术有限公司; 抗 LMP-1 抗体购自 Protein-tech 公司, HRP 标记的羊抗鼠和羊抗兔二抗为北京中杉金桥公司提供; RT-qPCR、PCR 引物由上海生工生物公司合成; 培养基 RPMI1640、F12 和 FBS 由 Gibco 公司提供。

1.2 细胞培养

K562、HEK-293T 和 U2OS 细胞培养条件为: 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度环境下分别用含 10% FBS 的完全培养基 RPMI1640 和 F-12 培养。

1.3 PCR 扩增 LMP-1 基因

根据 Genbank 中人 LMP-1 基因序列 (NM_005451) 设计引物进行扩增, 上游引物引入 *Bgl* II 酶切位点 (下划线部分)

和 Kozak 序列(斜体字),Kozak 序列是为了增加真核生物的翻译效率^[9]。下游引物引入 *Hind* III 酶切位点(下划线部分),在原终止密码“TGA”起始处连续引入 6 个组氨酸碱基序列(粗体字),见表 1。以 K562 细胞 cDNA 为模板,采用 20 μ l 反应体系进行 35 个循环反应(95 $^{\circ}$ C 30 s;62.5 $^{\circ}$ C 40 s;72 $^{\circ}$ C 90 s),最后延伸 10 min 后收集产物进行电泳鉴定,并利用 DNA 凝胶回收试剂盒进行纯化回收。

1.4 穿梭质粒 pAdtrack-LMP-1 的构建

按照 Takara 连接体系的标准进行,将纯化回收的 DNA 片段与 pGEM-T 按 3:1 的比例构成 10 μ l 的反应体系,4 $^{\circ}$ C 连接过夜。将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 内,并涂布于含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 平板进行筛选,置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱 8~12 h 后挑取单个阳性克隆,置于含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基 5 ml 内,37 $^{\circ}$ C,恒温摇床 8 h。按照质粒提取试剂盒操作说明提取质粒后双酶切鉴定质粒,命名为 pGEM-T-LMP-1。同法构建穿梭质粒,命名为 pAdtrack-LMP-1。

1.5 pAdtrack-LMP-1 转染 HEK-293T 细胞

按照 Lipofectamine2000 标准转染程序进行 HEK-293T 细胞转染,提取转染后 24 h 和 48 h 的 HEK-293T 细胞 mRNA,并提取转染后 48 h 和 72 h 的细胞蛋白质。

1.6 RT-qPCR 检测目的基因的表达式

提取转染 pAdtrack-LMP-1 的 HEK-293T 细胞 mRNA,逆转录成 cDNA,以之为模板,采用 20 μ l 反应体系进行两步法扩增,采取 45 个循环反应(95 $^{\circ}$ C 5 s;60 $^{\circ}$ C 30 s),LMP-1 的转录量以相对 CT 值来表示,RT-qPCR 实验为 3 次独立重复实验,分成对照组、空载 pAdtrack-CMV 组、pAdtrack-LMP-1 24 h 组、pAdtrack-LMP-1 48 h 组 4 个小组,每小组含 3 次重复,并以 β -actin 作内参,引物见表 2。

1.7 荧光显微镜观察和 Western blot 检测

在转染前 1 d,铺好密度约 60%~80%的 HEK-293T 细胞,转染 pAdtrack-LMP-1 后 24 h,在荧光显微镜下能够观察到绿色荧光。提取其转染 48 h 和 72 h 的 HEK-293T 细胞蛋白,采用 BCA 法进行蛋白定量,每泳道加入 20 μ l 蛋白进行 SDS-PAGE,转移至 PVDF 膜,室温下脱脂奶粉封闭 2 h 后加

入鼠抗人单克隆抗体(Anti-His-tag 1:1 000)和兔抗人多克隆抗体(Anti-LMP-1 1:800),4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 洗膜 3 次,室温下分别加入 HRP 标记的羊抗鼠和羊抗兔二抗(1:5 000)孵育 2 h。TBST 洗膜后,暗室中显影,蒸馏水终止反应,GAPDH 为内参。

1.8 腺病毒的同源重组和储存

按照文献[10]中采取的方法将 pAdtrack-LMP-1 和 pAdEasy-1 在大肠杆菌 BJ5183 中进行同源重组获得 Ad-LMP-1,经过 3 轮扩增、产毒和纯化后,TCID50 测定病毒滴度,同样的方法对 pAdtrack-CMV 和 pAdEasy-1 进行同源重组获得 Ad-GFP 作为对照,重组腺病毒置于 -80 $^{\circ}$ C 备用。

1.9 重组腺病毒感染 U2OS 细胞后荧光显微镜检测

感染前 24 h,在 6 孔板中种植密度 50%~70%的 U2OS 细胞,每孔加入 1 μ l 的 Ad-LMP-1 后置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵育 4 h,更换成 10% FBS 的完全培养基,孵育 24 h 后荧光显微镜观察绿色荧光蛋白。

1.10 重组腺病毒感染 U2OS 细胞后 RT-qPCR 检测

提取感染 Ad-LMP-1 24 h 和 48 h 的 U2OS 细胞 mRNA,RT-qPCR 检测步骤如上述。RT-qPCR 为 3 次独立重复实验,分成 Blank、AdGFP、AdLMP-1 24 h、AdLMP-1 48 h 4 个小组,每小组含 3 次重复,并以 β -actin 作内参。

1.11 重组腺病毒感染 U2OS 细胞后 Western blot 检测

提取感染 Ad-LMP-1 72 h 和 1 周后的 U2OS 细胞中的蛋白,Western blot 检测步骤同前述。

1.12 统计学方法

采用 SPSS 12.0 统计软件包进行分析,组间比较采用方差分析,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 穿梭质粒 pAdtrack-LMP-1 的构建与鉴定

以 K562 细胞的 cDNA 为模板的 PCR 产物经电泳显示,在 1 374 bp 处见 1 明显扩增条带(图 1A),其中:1. DNA Maker 2000;2. PCR 扩增产物;3. 阴性对照。pGEM-LMP-1 质粒经 *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切后,得到分别为 3.0 kb 载体片段和

表 1 PCR 扩增 LMP-1 的引物序列

Tab.1 Amplified primers sequences for LMP-1 PCR

目的基因	序列号	引物序列
LMP-1	NM_005451	上游引物 5' -AGATCTGCCA CCA TGGATTCCTTCAAGGTAGTGC-3'
		下游引物 5' -AAGCTTCAATGATGATGATGATGATGCACATGACAGAAGGCATGG-3'

表 2 RT-qPCR 的引物序列

Tab.2 Primer sequences for RT-qPCR

目的基因	序列号	引物序列
LMP-1	NM_005451	上游引物 5' -TAGCCAGTGTGGGAAGGTCCTGGAAGAG-3'
		下游引物 5' -CTTCTGCACTTGGCAGAGCTGGGTG-3'
β -actin	NM_351961	上游引物 5' -CTGGCACCACACCTTCTACA-3'
		下游引物 5' -AGCACAGCCTGGATAGCAAC-3'

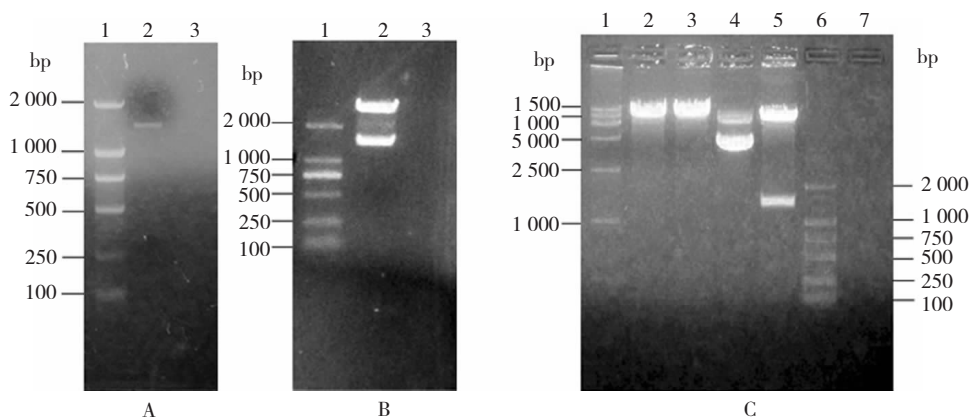


图 1 穿梭质粒 pAdtrack-LMP-1 的构建与鉴定

Fig.1 Construction and identification of shuttle plasmid pAdtrack-LMP-1

1 374 bp 大小片段(图1B),其中:1. DNA Maker 2000;2. *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切,3. 阴性对照。pAdtrack-LMP-1 穿梭质粒经 *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切后,得到分别为 9.2 kb 载体片段和 1 374 bp 大小片段(图1C),其中:1. DNA Maker 15 000;2. *Bgl* II 单酶切,3. *Hind* III 单酶切;4. pAdtrack-LMP-1 载体;5. *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切;6. DNA Maker 2000;7. 阴性对照。DNA 测序证实目的基因序列与 GeneBank 中的序列完全一致。

2.2 pAdtrack-LMP-1 在 HEK-293T 细胞中的表达

2.2.1 荧光显微镜观察 pAdtrack-LMP-1 转染 24 h 后 HEK-293T 细胞绿色荧光 荧光显微镜观察结果见图 2A~C,其中:A. 普通光视野(4 倍),B. 绿色荧光视野(4 倍),C. 重叠视野(4 倍);发现转染 pAdtrack-LMP-1 24 h 后,HEK-293T 细胞胞质中有明显的绿色荧光表达,并且通过重叠视野观察,发现绿色荧光蛋白表达率约达 90%。

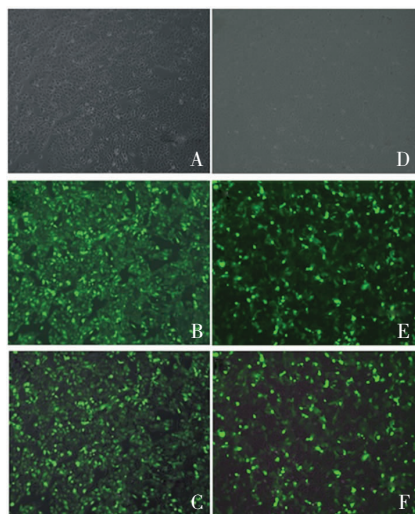


图 2 荧光显微镜观察绿色荧光蛋白

Fig.2 Green fluorescent protein observed by fluorescent microscopy

2.2.2 HEK-293T 细胞 LMP-1 mRNA 的表达 LMP-1 mRNA 表达见图 3,其中:pAdtrack-LMP-1 48 h 组最多,升高 1 500 倍,pAdtrack-LMP-1 24 h 组次之,升高 800 倍;对照、

空载组仅微弱表达,转染 pAdtrack-LMP-1 的 HEK-293T 细胞 24、48 h 组与对照、空载 pAdtrack-CMV 组组间具有统计学意义(* $P < 0.01$)。

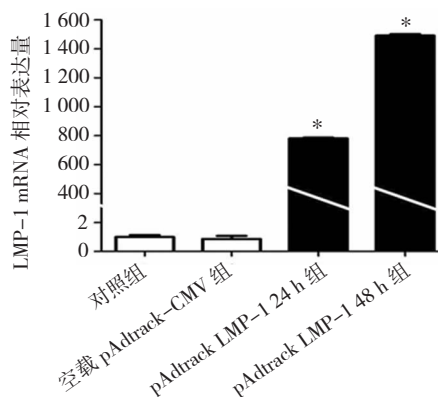


图 3 RT-qPCR 检测 HEK-293T 细胞 LMP-1 的 mRNA 表达

Fig.3 mRNA expression of LMP-1 in HEK-293T cell detected by RT-qPCR

2.2.3 HEK-293T 细胞 LMP-1 蛋白的表达检测 Western blot 检测 LMP-1 蛋白的表达结果见图 4,其中:在 His 标签蛋白组中,pAdtrack-LMP-1 48 h 和 72 h 组的表达量最多,而对照、空载 pAdtrack-CMV 组没有表达,GAPDH 为内参,与对照、空载 pAdtrack-CMV 组相比,转染 pAdtrack-LMP-1 转染 HEK-293T 细胞 His 标签蛋白表达水平上的差异有统计学意义($P < 0.01$);同时在 LMP-1 蛋白组中,pAdtrack-LMP-1 48 h 和 72 h 组的表达量最多,对照、空载 pAdtrack-CMV 组仅微弱表达,与对照、空载 pAdtrack-CMV 组相比,转染 pAdtrack-LMP-1 转染 HEK-293T 细胞 LMP-1 蛋白表达水平上的差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 Ad-LMP-1 在 U2OS 细胞中的表达

2.3.1 荧光显微镜观察 Ad-LMP-1 感染 24 h 后 U2OS 细胞绿色荧光 荧光显微镜观察结果见图 2D~F,其中:D. 普通光视野(4 倍),E. 绿色荧光视野(4 倍),F. 重叠视野(4 倍)。发现转染 Ad-LMP-1 24 h 后,U2OS 细胞胞质中有明显的绿色荧光表达,表明包含 LMP-1 基因的腺病毒在 U2OS 细胞中成功表达,并且通过重叠视野观察,发现绿色荧光蛋白表达率约达 65%。

2.3.2 U2OS 细胞 LMP-1 mRNA 的表达 LMP-1 mRNA 表达结果见图 5,其中:LMP-1 mRNA 表达,Ad-LMP-1 48 h 表达量升高 650 倍,Ad-LMP-1 24 h 组次之,升高 420 倍,对照、空载组仅微弱表达,感染 Ad-LMP-1 的 U2OS 细胞 24、48 h 组与对照、空载 AdGFP 组组间具有统计学意义 (* $P < 0.01$)。

2.3.3 U2OS 细胞 LMP-1 蛋白的表达检测 Western blot 检测 LMP-1 蛋白的表达结果见图 6,其中:Ad-LMP-1 72 h 和 Ad-LMP-1 1 W 的表达量大致相同,对照、空载组 AdGFP 仅微弱表达,GAPDH 为内参,与对照、空载 AdGFP 感染组相比,感染 Ad-LMP-1 的 U2OS 细胞 LMP-1 蛋白表达水平上的差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

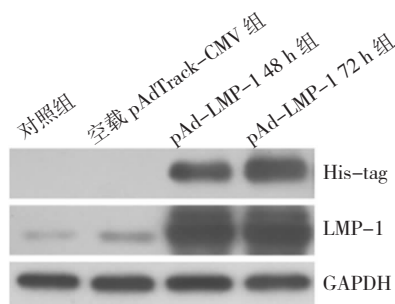


图 4 Western blot 检测转染 pAdtrack-LMP-1 后 HEK-293T 细胞中蛋白的表达

Fig.4 His-tag/LMP-1 protein expression of HEK-293T cells after transfection demonstrated by Western blot

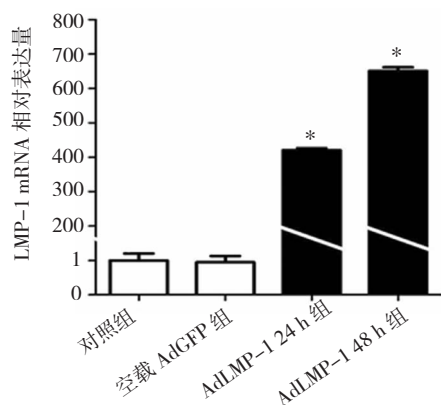


图 5 RT-qPCR 检测 U2OS 细胞中 LMP-1 mRNA 的表达

Fig.5 mRNA expression of LMP-1 in U2OS cell detected by RT-qPCR

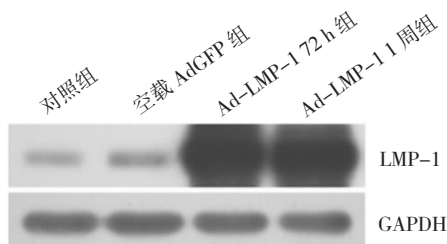


图 6 Western blot 检测 Ad-LMP-1 感染 U2OS 细胞后蛋白的表达

Fig.6 LMP-1 protein expression of U2OS after Ad-LMP-1 infection demonstrated by Western blot

3 讨论

LMP-1 作为细胞内非分泌的骨生成诱导蛋白,首次由 Boden 等^[11]在体外研究糖皮质激素诱导骨髓间充质细胞 (Mesenchymal stem cells, MSCs) 成骨细胞分化时发现,也是成骨细胞分化的正调节因子。人 LMP-1 基因位于染色体 5q35.3 上,包含 13 个外显子和 12 个内含子,编码 457 个氨基酸,包含保守的 LIM 功能域和 PDZ 功能域, LIM 功能域参与机体多个方面的生物行为,如骨骼生长、细胞分化、细胞骨架功能和肿瘤生成等^[12]。近年研究证实 LMP-1 作为成骨分化信号上游分子,通过招募众多的成骨分化基因参与成骨分化过程,并最终诱导骨生成^[4,5,13]。尽管这种精确的机制尚不明确,但有文献报道^[14]骨形态发生蛋白 (Bone morphogenetic proteins, BMPs) 和 LMP-1 的成骨作用是通过 E3 连接酶 (Smurf1) 实现的。

研究证实 OS 的发生可能与干细胞成骨分化障碍有关^[2,3]。上调 OS 细胞的 Runx2 表达能够抑制 OS 细胞的增殖,并出现成骨分化^[3]。因此,上调 OS 细胞 LMP-1 的表达可能能够抑制 OS 的恶性表型。我们通过构建含 LMP-1 的腺病毒来感染 OS 细胞并获得外源性的表达,从而为进一步研究 LMP-1 抑制 OS 恶性表型的机制奠定基础。本实验选择 pAdtrack-CMV 作为真核表达质粒,是因为其具有两个 CMV 启动子,可以实现目的基因的在感染后的细胞中稳定表达;质粒编码的绿色荧光蛋白也能为早期观察病毒产量和转染效率提供便利;同时,含有卡那霉素抗性基因能够便于进行阳性克隆的筛选;另外, *Pme* I 和 *Pac* I 酶切位点方便与骨架质粒 pAd-Easy-1 进行同源重组。

Kozak 发现大多数真核生物的信使 RNA 都包含一段与核糖体进行结合并提高翻译效率的序列^[9],即 Kozak 序列-(GCC)GCCGCCATGG。其中 R 可以换成 A 或 G,同时序列包含起始密码子 ATG。为了增加翻译效率,在上游引物引入了 Kozak 序列。在下游引物处引入 6 个连续的组氨酸标签蛋白,解决了目前尚无 LMP-1 特异性单克隆抗体对蛋白质表达鉴定的困难^[15,16]。Western blot 结果证实不但 LMP-1 蛋白表达,而且标签蛋白也成功表达。

天然蛋白都普遍存在于未处理的 HEK-293T 细胞中,例如:促肾上腺皮质激素释放激素 1 型受体^[17], 1-磷酸-鞘氨醇 EDG1、EDG3、EDG5^[18], 葑毒碱的乙

酰胆碱受体 M3^[19], 瞬时受体电位 TRPC1、TRPC3、TRPC4、TRPC6^[20]。我们也发现未作任何处理的 HEK-293T 细胞能够表达 LMP-1 蛋白, 结果同样也说明 LMP-1 蛋白分布广泛。

荧光显微镜发现经 Ad-LMP-1 感染的 OS 细胞中有大量绿色荧光蛋白的表达, 说明在腺病毒能够有效的感染 OS 细胞系 U2OS。而且 RT-qPCR 证实含 LMP-1 基因的腺病毒可以高效的感染 U2OS, Western blot 结果证实在 Ad-LMP-1 感染 U2OS 细胞后 1 周仍可见 LMP-1 高表达, 说明 Ad-LMP-1 感染的 U2OS 细胞可持续表达目的蛋白 LMP-1。

综上所述, 荧光显微镜, RT-qPCR 和 Western blot 证实含目的基因 LMP-1 的重组腺病毒构建成功, 不但能够高效感染 U2OS, 而且能够持续表达 LMP-1 蛋白, 为后续实验奠定了研究基础。

参 考 文 献

- [1] Kim H J, Chalmers P N, Morris C D. Pediatric osteogenic sarcoma[J]. Curr Opin Pediatr, 2010, 22(1):61-66.
- [2] Haydon R C, Luu H H, He T C. Osteosarcoma and osteoblastic differentiation: a new perspective on oncogenesis[J]. Clin Orthop Relat Res, 2007, 1(454):237-246.
- [3] Luo X, Chen J, Song W X, et al. Osteogenic BMPs promote tumor growth of human osteosarcomas that harbor differentiation defects[J]. Lab Invest, 2008, 88(12):1264-1277.
- [4] Wang X, Cui F, Madhu V, et al. Combined VEGF and LMP-1 delivery enhances osteoprogenitor cell differentiation and ectopic bone formation[J]. Growth Factors, 2011, 299(1):36-48.
- [5] Liu H, Bargouti M, Zughaier S, et al. Osteoinductive LIM mineralization protein-1 suppresses activation of NF-kappaB and selectively regulates MAPK pathways in pre-osteoclasts [J]. Bone, 2010, 46(5):1328-1335.
- [6] Pola E, Gao W, Zhou Y, et al. Efficient bone formation by gene transfer of human LIM mineralization protein-3[J]. Gene Ther, 2004, 11(8):683-693.
- [7] Sangadala S, Titus L, Boden S D. Expression, purification and mass spectrometric analysis of LIM mineralization protein-1 in human lung epithelial cells[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2008, 40(11):909-918.
- [8] Sangadala S, Okada M, Liu Y, et al. Engineering, cloning, and functional characterization of recombinant LIM mineralization protein-1 containing an N-terminal HIV-derived membrane transduction domain [J]. Protein Expr Purif, 2009, 65(2):165-173.
- [9] Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs[J]. Nucleic Acids Res, 1987, 15(20):8125-8148.
- [10] He T C, Zhou S, da Costa L T, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Proc Natl Acad Sci, 1998, 95(5):2509-2514.
- [11] Boden S D, Liu Y, Hair G A, et al. LMP-1, a LIM-domain protein, mediates BMP-6 effects on bone formation[J]. Endocrinology, 1998, 139(12):5125-5134.
- [12] Strohbach C, Kleinman S, Linkhart T, et al. Potential involvement of the interaction between insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-6 and LIM mineralization protein (LMP)-1 in regulating osteoblast differentiation[J]. J Cell Biochem, 2008, 104(5):1890-1905.
- [13] Minamide A, Boden S D, Viggeswarapu M, et al. Mechanism of bone formation with gene transfer of the cDNA encoding for the intracellular protein LMP-1[J]. J Bone Joint Surg, 2003, 85-A(6):1030-1039.
- [14] Sangadala S, Boden S D, Viggeswarapu M, et al. LIM mineralization protein-1 potentiates bone morphogenetic protein responsiveness via a novel interaction with Smurf1 resulting in decreased ubiquitination of Smads[J]. J Biol Chem, 2006, 281(25):17212-17219.
- [15] Sangadala S, Okada M, Liu Y, et al. Engineering, cloning, and functional characterization of recombinant LIM mineralization protein-1 containing an N-terminal HIV-derived membrane transduction domain [J]. Protein Expr Purif, 2009, 65(2):165-173.
- [16] 陈文昭, 黄路, 黄山虎, 等. 尤文肉瘤 EWS-FLI1 基因原核表达质粒的构建及鉴定[J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(5):645-648.
- [17] Chen W Z, Huang L, Huang S H, et al. The construction and identification of prokaryotic expression vector pQE30-EWS-FLI1 [J]. Journal of Chongqing Medical University, 2010, 35(5):645-648.
- [17] Dautzenberg F M, Higelin J, Teichert U. Functional characterization of corticotropin-releasing factor type 1 receptor endogenously expressed in human embryonic kidney 293 cells[J]. Eur J Pharmacol, 2000, 390(1-2):51-59.
- [18] Meyer zu Heringdorf D, Lass H, Kuchar I, et al. Stimulation of intracellular sphingosine-1-phosphate production by G-protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors[J]. Eur J Pharmacol, 2001, 414(2-3):145-154.
- [19] Luo J, Busillo J M, Benovic J L. M3 muscarinic acetylcholine receptor-mediated signaling is regulated by distinct mechanisms[J]. Mol Pharmacol, 2008, 74(2):338-347.
- [20] Zagranichnaya T K, Wu X, Villereal M L. Endogenous TRPC1, TRPC3, and TRPC7 proteins combine to form native store-operated channels in HEK-293 cells[J]. J Biol Chem, 2005, 280(33):29559-29569.

(责任编辑: 关蕴良)