

• 论 著 •

细胞外基质蛋白 1 对 MCF-7 和 HUVEC 增殖影响的研究

侯彦强¹, 蔡丽君², 范列英¹, 罗 鹏², 何 玮², 姜加陶¹, 周演武¹, 倪 健², 孔宪涛¹, 仲人前^{1*}

(1. 第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003; 2. 上海富纯中南生物技术有限公司, 上海 201702)

[摘要] **目的:**探讨细胞外基质蛋白 1(extracellular matrix protein 1, ECM1)对乳腺癌细胞株 MCF-7 和人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)增殖的影响。**方法:**构建 ECM1-pEGFP-N2 真核表达载体, 采用 PCR 方法, 扩增出 ECM1 基因, 用 *Bgl* I 和 *Kpn* I 双酶切 ECM1 基因和 pEGFP-N2 载体, 连接酶切目的片段, 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选阳性克隆酶切、测序鉴定; 利用脂质体介导的转染技术转染 MCF-7 细胞, 药物 G418 筛选稳定转染细胞株, 荧光显微镜检测报告基因表达产物 EGFP, 免疫组化检测 ECM1 蛋白表达。用 MTT 比色法分析 ECM1 对 MCF-7 和 HUVEC 增殖的影响。**结果:**成功构建了 ECM1-pEGFP-N2 真核表达载体, 并在 MCF-7 中稳定表达; MTT 比色法检测 MCF-7 增殖结果显示未转染组、空载体转染组和 ECM1 转染组的 D_{570} 值分别为 0.95 ± 0.07 、 0.97 ± 0.09 和 1.03 ± 0.12 , 三者无明显差异; MTT 比色法检测 HUVEC 增殖结果显示培养液组、空载体转染上清组、ECM1 转染上清组 HUVEC D_{570} 值分别为 0.89 ± 0.06 、 0.92 ± 0.09 和 1.39 ± 0.10 , 差异具有显著性意义($P < 0.01$)。**结论:**ECM1 对乳腺癌细胞株 MCF-7 的增殖无影响, 但能显著促进血管内皮细胞体外增殖。

[关键词] 细胞外基质蛋白 1; MCF-7; 人脐静脉内皮细胞; 细胞增殖**[中图分类号]** R 73**[文献标识码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2004)12-1310-04

Effect of human extracellular matrix protein 1 on proliferation of MCF-7 and human umbilical vein endothelial cells

HOU Yan-Qiang¹, CAI Li-Jun², FAN Lie-Ying¹, LUO Peng², HE Wei², LOU Jia-Tao¹, ZHOU Yan-Wu¹, NI Jian², KONG Xian-Tao¹, ZHONG Ren-Qian^{1*} (1. Department of Laboratory Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Shanghai Fuchun Zhongnan Biotech Company, Ltd., Shanghai 201702)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effect of human extracellular matrix protein 1 (ECM1) on proliferation of MCF-7 and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods:** PCR was used to clone ECM1 gene and the products were inserted into the eukaryotic expression vector pEGFP-N2 to construct the recombination ECM1-pEGFP-N2. The fusion gene was identified by enzyme digestion (*Bgl* I and *Kpn* I) and DNA sequencing. ECM1-pEGFP-N2 was transfected with Lipofectamine to MCF-7 cells; MCF-7 cells harboring ECM1 genes were selected by G418 pressure and the expression of ECM1-pEGFP-N2 was determined by GFP fluorescence and anti-ECM1 immunohistochemistry. The proliferation of MCF-7 and HUVEC was measured by MTT colorimetry assay analysis. **Results:** ECM1 eukaryotic expression vector ECM1-pEGFP-N2 was successfully constructed and ECM1 gene was successfully expressed in MCF-7 cells. Proliferation of HUVEC in ECM1 transfected group (1.39 ± 0.10) was higher than those untreated (0.89 ± 0.06) and mock transfected group (0.92 ± 0.09) ($P < 0.01$). Proliferation of ECM1 transfected MCF-7 cells (1.03 ± 0.12) was not significantly different with those untreated (0.95 ± 0.07) and mock transfected MCF-7 cells (0.97 ± 0.09). **Conclusion:** ECM1 can significantly promote the proliferation of HUVEC, but has no effect on the proliferation of MCF-7.

[KEY WORDS] extracellular matrix protein 1; MCF-7; human umbilical vein endothelial cells; cell proliferation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(12): 1310-1313]

细胞外基质蛋白 1(extracellular matrix protein 1, ECM1)是 1994 年 Mathieu 等^[1]在鼠的成骨基质细胞系 MN7 中分离出来的一种分泌性糖蛋白。ECM1 基因有 3 个不同的剪切体 ECM1a、ECM1b 和 ECM1c, 分别编码 540、415 和 559 个氨基酸的蛋白质^[2]。基于细胞外基质与肿瘤的发生、发展及转移等有密切的关系, 目前对 ECM1 和肿瘤关系的研究是一个热点。本研究将 ECM1a 基因定向克隆到带

有绿色荧光蛋白(GFP)报告基因的真核表达载体 pEGFP-N2 质粒中, 构建 ECM1-pEGFP-N2 真核表

[基金项目] 国家自然科学基金(30080027); 上海市基础研究重大项目(02JC14005); 上海市卫生系统百名跨世纪优秀学科带头人培养基金(沪卫科 9713)。

[作者简介] 侯彦强(1973-), 男(汉族), 博士生, 主管技师。
E-mail: houyanqiang@yahoo.com.cn

*Corresponding author. E-mail: rqzhong@guomai.sh.cn

达载体,转染人乳腺癌细胞株 MCF-7,研究 ECM1 对乳腺癌细胞株 MCF-7 和人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞株、质粒和菌种 MCF-7 细胞株由第二军医大学东方肝胆外科医院王红阳教授惠赠; pBlueScript-ECM1 质粒由上海富纯中南生物技术有限公司 Ni J 博士惠赠; pEGFP-N2 质粒购自 BD Biosciences Clontech 公司; DH5 α 为本室常规保存菌种。

1.2 工具酶和实验试剂 Vent DNA 聚合酶、dNTP、T₄ DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bgl* I、*Kpn* I 购自 New England Biolabs 公司; 质粒小量抽提试剂盒、胶小量回收试剂盒、MTT 均购自上海华舜生物工程有限公司; DNA marker (D016-22、DGL2000) 购自北京鼎国生物技术责任有限公司; Wizard plus midipreps DNA purification system 购自 Promega 公司; Lipofectamine Reagent、OPTI-MEM 购自 Invitrogen 公司; DMEM、M199、G418、6 孔培养板购自 Gibco 公司; FBS 购自中科院上海实生细胞生物技术有限公司; ABC 免疫组化检测试剂盒购自华美生物工程有限公司。

1.3 重组真核表达载体 ECM1-pEGFP-N2 的构建

根据 ECM1 基因序列自行设计引物,由上海博亚生物技术有限公司合成,扩增长度为 1 637 bp。上游引物包含 ECM1 启动的编码序列,引入酶切位点 *Bgl* I 和保护性碱基,下游引物去除 ECM1 终止密码子,引入酶切位点 *Kpn* I 和保护性碱基,并保持 ECM1 阅读框正确。上游引物:5'-CAA GAT CTA TGG GGA CCA CAG CCA GAG C-3'; 下游引物:5'-CAG GTA CCG TTC TTC CTT GGG CTC AGA G-3'。以 ECM1 cDNA 质粒为模板,按以下条件进行 PCR 扩增:94℃变性 10 min,94℃ 90 s,58℃ 90 s,72℃ 90 s,共 30 个循环,72℃延伸 10 min,获得 ECM1 基因经测序证实后进行定向克隆构建重组正义真核表达载体。采用 *Bgl* I、*Kpn* I 双酶切鉴定。鉴定正确后用 Wizard plus midipreps DNA purification system 提取重组质粒,用于细胞转染。

1.4 ECM1-pEGFP-N2 在 MCF-7 中的表达

1.4.1 MCF-7 细胞转染 转染前 1 d 将 MCF-7 细胞接种于 6 孔板中(1.5×10^5 /孔),置 37℃、5% CO₂ 培养 24 h 后细胞生长约达 60% 汇合。基因转染(Lipofectamine 法)参照试剂盒说明书进行:分别将

1.5 μ g 质粒和 12 μ l 脂质体溶于 100 μ l OPTI-MEM 中,混合后置室温静置 30 min,加入 800 μ l OPTI-MEM,将其覆盖在细胞上,37℃、5% CO₂ 培养 5 h,然后加入含 20% FBS 的 DMEM 培养液 1 ml,继续培养,分别于转染后 24、36、48、72 h 在荧光显微镜下(488 nm)观察,实验中同时设置未转染细胞组、pEGFP-N2 转染组作为对照。转染后细胞用 G418 800 mg/L 选择培养 14 d,得到稳定转染的空质粒转染细胞(MCF-7-pEGFP-N2)和 ECM1 转染细胞(MCF-7-ECM1)。

1.4.2 转染细胞中 ECM1 蛋白的免疫组化检测

稳定转染后的 MCF-7 细胞爬片,用 ABC 免疫组化检测试剂盒进行免疫组化检测,兔抗人 ECM1 多抗 1:200 稀释,DAB 显色,苏木精复染。

1.5 ECM1 对 MCF-7 细胞增殖的影响 取对数生长期细胞 MCF-7、MCF-7-pEGFP-N2、MCF-7-ECM1 细胞,用含 10% FBS 的 DMEM 培养液调整细胞密度,接种细胞于 96 孔板, 3×10^3 /孔,每孔 200 μ l,每组设 3 个平行孔,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,72 h 后每孔加入 MTT 溶液(5 g/L)20 μ l,继续培养 4 h 后终止培养。吸弃上清,加入 150 μ l DMSO,振荡 10 min,用酶联检测分析仪测定 D_{570} 值,以只加含 10% 血清的 DMEM 培养液不加细胞的空白对照为调零孔。实验重复 3 次。

1.6 ECM1 对 HUVEC 增殖的影响 MCF-7、MCF-7-pEGFP-N2、MCF-7-ECM1 细胞在 6 孔板内传代, 2×10^5 /孔,37℃、5% CO₂ 培养 36 h 后收集细胞上清备用。HUVEC 接种于 96 孔板, 3×10^3 /孔,10% 血清的 M199 培养液培养过夜后用 PBS 洗 2 遍,以 1:1 的比例(100 μ l+100 μ l)分别加入以上收集的细胞上清和含 10% 血清的 M199 培养液,每组设 3 个复孔。培养 48 h 后每孔加入 MTT 溶液(5 g/L)20 μ l,继续培养 4 h 后终止培养。吸弃上清,加入 150 μ l DMSO,振荡 10 min,用酶联检测分析仪测定 D_{570} 值,以不加细胞的含 10% 血清的 M199 培养液空白对照为调零孔。

1.7 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,用 SPSS10.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 ECM1-pEGFP-N2 在 MCF-7 中的表达 将构建好的 ECM1-pEGFP-N2 转染 MCF-7 细胞,转染 36 h 后,荧光显微镜下即可见绿色荧光细胞,但强度较弱,48 h 后阳性细胞明显增多,荧光强度也增加,72 h 时阳性细胞的荧光强度最强,荧光物质

遍布整个细胞;免疫组化检测稳定转染 MCF-7 细胞中的 ECM1,可见细胞胞质中棕褐色颗粒(图 1)。



图 1 转染后 72 h MCF-7 细胞中 EGFP 和 ECM1 的表达

Fig 1 Detection of ECM1 and expression of EGFP in transfected MCF-7 cells(72 h, $\times 200$)

A: MCF-7; B: MCF-7-EGFP; C: MCF-7-ECM1

2.2 ECM1 对 MCF-7 和 HUVEC 细胞增殖的影响 以 MTT 掺入为指标,间接反应 MCF-7 和 HUVEC 的增殖情况。MCF-7 的增殖: MCF-7 组的 D_{570} 值为 0.95 ± 0.07 , MCF-7-pEGFP-N2 为 0.97 ± 0.09 , MCF-7-ECM1 为 1.03 ± 0.12 , 三者增殖无明显差异; HUVEC 的增殖: 培养液组 D_{570} 值为 0.89 ± 0.06 , 空载体转染上清组为 0.92 ± 0.09 , ECM1 转染上清组为 1.39 ± 0.10 , ECM1 组与其他两组相比有明显差异($P < 0.01$)。结果显示, ECM1 对乳腺癌细胞株 MCF-7 的增殖无影响, 但能显著促进血管内皮细胞体外增殖。

3 讨论

ECM1a 是表达最广泛的剪切体,可表达于各种组织,但基因表达最丰富的是胎盘和心脏,与之不同的是,ECM1b 为限制性表达模式,仅在扁桃体和角化细胞中可检测到,而 ECM1c 的表达现仍未确定,但在皮肤中约占 ECM1 RNA 的 15%^[3,4]。目前主要发现 ECM1 是一种软骨内骨形成的负调节因子,可抑制碱性磷酸酶的活性和骨的矿化^[5]; ECM1 基因的功能性缺失可导致类脂蛋白沉积症的发生^[6]; 硬化性苔癣患者血清中存在高滴度的 ECM1 自身抗体,提示 ECM1 可能是硬化性苔癣患者体液免疫的一个作用靶点^[7]。ECM1 作为细胞外基质的确切功能还有待于深入研究。

GFP 基因来源于 Jellyfish Aequorea Victoria, 是由 238 个氨基酸组成的一种蛋白质,相对分子质量约为 27 000。与其他发光报告分子(如 lacZ、CAT、luc)不同的是, GFP 发光不需要另外的蛋白质、底物或辅助因子的参与,只需要一定波长的光激发,不影响靶蛋白的功能和宿主细胞,目前 GFP 被用作一种新型的报告分子用来检测细胞的基因表达

和细胞定位^[8~10]。我们先前的研究发现 ECM1 在一些肿瘤(肝癌、乳腺癌、结直肠癌等)中过表达(主要为 ECM1a), 且与肿瘤的转移密切相关,说明 ECM1 可能在肿瘤的发生、发展中起一定作用。另外, 现有研究表明, 血管的生成是肿瘤发生、发展及转移的一重要因素, 因此我们构建了 ECM1 的 GFP 真核表达载体, 并选取不表达 ECM1 的乳腺癌细胞株 MCF-7 将 ECM1 基因转入其中, 来研究 ECM1 对肿瘤细胞及血管内皮细胞增殖的影响, 也为 ECM1 其他功能的进一步研究打下基础。

本研究选取 ECM1a 作为研究对象, 为了构建 ECM1 和 EGFP 融合基因的表达载体, 采用 PCR 方法, 在引物的设计中引入 2 个酶切位点, 去除终止密码子, 并保持阅读框的正确, 将目的基因定向克隆装入 pEGFP-N2 载体的 EGFP 上游。实验的电泳结果表明, PCR 产物符合预期大小, 构建的质粒经双酶切和测序鉴定证明 ECM1-pEGFP-N2 真核表达载体构建成功。MCF-7 是一个恶性程度稍弱的乳腺癌细胞株, 我们先前的研究发现其不表达 ECM1。我们采用脂质体转染法转染 MCF-7 细胞, 在荧光显微镜下观察荧光产生情况, 可见阳性细胞内融合蛋白广泛、弥漫地分布于细胞内; 转染后细胞经 G418 800 mg/L 筛选 14 d, 可获得稳定转染的 MCF-7 转染细胞, 用免疫组化方法可检测到 ECM1, 表明基因转染和表达均获得成功。

ECM1 对细胞增殖的影响, 实验结果表明, 转染 ECM1 后的 MCF-7 细胞增殖未见有明显变化, 但 ECM1 能显著促进 HUVEC 的增殖。我们推测在血管内皮细胞上可能存在 ECM1 的受体, ECM1 可能是通过直接与血管内皮细胞相作用, 或是通过间接诱导血管内皮细胞内一些因子来发挥作用, 促进细胞的增殖。ECM1 在肿瘤中的作用及机制, 还需进一

步深入研究,以及更多的体内研究来确定。

总之,本研究成功构建了ECM1-pEGFP-N2真核表达载体,在MCF-7中成功表达,发现ECM1能显著促进血管内皮细胞的增殖,而对肿瘤细胞的增殖无明显影响,为进一步ECM1生物功能的研究及ECM1在肿瘤中作用的探讨奠定了基础。

参考文献

- [1] Mathieu E, Meheus L, Raymackers J, et al. Characterization of the osteogenic stromal cell line MN7: identification of secreted MN7 proteins using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, Western blotting and microsequencing[J]. *J Bone Miner Res*, 1994, 9(6): 903-913.
- [2] Bhalerao J, Tylzanowski P, Filie JD, et al. Molecular cloning, characterization and genetic mapping of the cDNA coding for a novel secretory protein of mouse. Demonstration of alternative splicing in skin and cartilage[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(27): 16385-16394.
- [3] Smits P, Ni J, Feng P, Wauters J, et al. The human extracellular matrix gene 1 (ECM1): genomic structure, cDNA cloning, expression pattern and chromosomal localization[J]. *Genomics*, 1997, 45(3): 487-495.
- [4] Mongiat M, Fu J, Oldershaw R, et al. Perlecan protein core interacts with extracellular matrix protein 1 (ECM1), a glycoprotein involved in bone formation and angiogenesis[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(19): 17491-17499.
- [5] Deckers MM, Smits P, Karperien M, et al. Recombinant human extracellular matrix protein 1 inhibits alkaline phosphatase activity and mineralization of mouse embryonic metatarsals *in vitro*[J]. *Bone*, 2001, 28(1): 14-20.
- [6] Hamada T, McLean WH, Ramsay M, et al. Lipoid proteinosis maps to 1q21 and is caused by mutations in the extracellular matrix protein 1 gene (ECM1)[J]. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(7): 833-840.
- [7] Oyama N, Chan I, Neill SM, et al. Autoantibodies to extracellular matrix protein 1 in lichen sclerosus[J]. *Lancet*, 2003, 362(9378): 118-123.
- [8] Lauer SA, Rathod PK, Ghori N, et al. A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malaria parasite[J]. *Science*, 1997, 276(5315): 1122-1125.
- [9] Woodrow CJ, Penny JJ, Krishna S. Intraerythrocytic plasmodium falciparum expresses a high affinity facilitative hexose transporter[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(11): 7272-7277.
- [10] 于丽莉, 陈诗书. 绿色荧光蛋白 GFP 在转化细胞和肿瘤细胞中的表达[J]. 上海第二医科大学学报, 2000, 20(5): 408-411.

[收稿日期] 2004-07-23

[修回日期] 2004-11-23

[本文编辑] 贾泽军, 邓晓群

(上接第1283页)

密度影, 境界清晰, 增强后无强化, 提示脾梗死; 右下肺外基底段见小片状密度增高影, 提示右下肺炎。骨髓象有核细胞增生明显活跃, 颗粒增多的异常早幼粒细胞为 0.96, 该类细胞体积中等, 圆形、椭圆及不规则形, 部分有瘤状突出, 胞核较大, 不规则, 有折叠、凹陷、扭曲, 核染色质致密粒状, 可见 1~4 个核仁, 胞质量中等, 胞质内可见大量粗细不一的嗜天青颗粒, Auer 小体易见。粒系早幼粒以下阶段偶见, 红系、巨系增生受抑。白血病细胞化学染色 POX 大部分强阳性, PAS 大部分呈弥漫性至细颗粒样阳性, NAE 大部分强阳性, 不被 NAF 抑制。流式细胞仪检测: CD117⁺ (60%), CD34⁺ (13%), CD33⁺ (99%), CD13⁺ (94%), CD56⁺ (98%), CD64⁺ (22%), MPO⁺ (67%)。染色体分析结果显示 20 个分裂像均呈 46, XY, t(15;17)(q22;q11.2)。荧光分子原位杂交检查显示 PML/RAR α 融合基因阳性。血液生化检查 LDH 533 U/L, β_2 微球蛋白 2.31 mg/L, IgG 6.87 g/L, IgA 0.642 g/L, IgM 0.683 g/L, PT 13.7 s, PT 对照 12.8 s, APTT 27.0 s, APTT 对照 35.0 s, TT 15.2 s, TT 对照 18.0 s, FIB 2.29 g/L, FDP⁺⁺, D-二聚体 1.98 mg/L。转入后予维 A 酸 40 mg/d 诱导分化治疗, 第 3 天加用 As₂O₃ 10 mg/d 行双诱导治疗, 并应用低分子肝素预防 DIC。维 A 酸诱导分化治疗第 7

天, WBC 升至 $35.7 \times 10^9/L$, 加用去甲氧柔红霉素 10 mg/次, 1 次/2 d, 共 3 次, 维 A 酸诱导分化第 15 天, WBC 升至最高值 $64.2 \times 10^9/L$, 患者有轻微胸闷, 骨痛明显, 考虑维 A 酸综合征可能, 维 A 酸减为 30 mg/d, 予地塞米松 5 mg/d, 静滴, 胸闷、骨痛缓解, 维 A 酸诱导分化第 30 天, 骨髓检查提示完全缓解, 停 As₂O₃, 继续维 A 酸口服, 于 2004 年 5 月 19 日出院。

2 讨论 脾梗死是慢性髓细胞白血病常见的并发症, 而急性髓细胞白血病很少发生脾梗死, 而以脾梗死症状为主要原因就诊者更罕见。该患者就诊时以腹痛伴发热为主要症状, 无贫血、出血症状, 血常规检查三系均在正常范围, B 超提示脾梗死, 遂收入普外科, 术前发现血常规分类异常, 幼稚细胞达 0.60, 行骨髓检查确诊为急性早幼粒细胞白血病。该患者有明显的高凝倾向, 是引起脾梗死的主要原因。有报道急性早幼粒细胞白血病维 A 酸诱导分化过程中, WBC 增高并发脾梗死, 本例患者在维 A 酸和 As₂O₃ 双诱导过程中, WBC 最高升至 $64.2 \times 10^9/L$, 我们应用了低分子肝素治疗, 并在 WBC 上升过程中即时加用了化疗, 因此在诱导分化过程腹痛症状逐渐好转, 未出现脾梗死加重症状。

[收稿日期] 2004-07-06

[修回日期] 2004-09-09

[本文编辑] 曹 静