

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00546

• 研究快报 •

抑癌基因 NF2 突变子真核表达载体的构建与表达

贺 华¹, 彭 彪², 卞留贯^{1*}, 孙青芳¹, 沈建康¹, 贺子建³, 林亦海⁴

1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院神经外科, 上海 200025
2. 广州市第一人民医院神经外科, 广州 510180
3. 上海瑞金医院集团闵行中心医院神经外科, 上海 201100
4. 台州市中心医院神经外科, 台州 318000

[摘要] **目的:** 分别构建抑癌基因 NF2 的 42 位和 47 位点突变的 2 种真核表达载体, 并在大鼠神经鞘瘤细胞 RT4-D6P2T 中诱导表达。**方法:** 用定点突变法分别将 pcDNA3.1-NF2 第 42 位赖氨酸(Lys)突变为脯氨酸(Pro), 第 47 位苯丙氨酸(Phe)突变为亮氨酸(Leu)构建 2 种 NF2 突变子(pcDNA3.1-NF2^{ΔLys42Pro} 和 pcDNA3.1-NF2^{ΔPhe47Leu}), 将 3 种 NF2 质粒用脂质体法分别转染 RT4 细胞, RT-PCR 和 Western 印迹法分析 NF2 基因及蛋白表达, MTT 法检测转染后 RT4 细胞的增殖情况。**结果:** 测序证实定点突变成功, 构建的重组真核表达载体 pcDNA3.1-NF2^{ΔLys42Pro} 和 pcDNA3.1-NF2^{ΔPhe47Leu} 均能表达相应的蛋白和 mRNA, 这 2 种 NF2 突变体对 RT4 细胞抑制率明显低于野生型 NF2 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:** 成功构建了 2 种能够在 RT4 中表达的单个点突变的 NF2 基因真核表达载体。

[关键词] NF2; 点突变; 真核表达载体

[中图分类号] Q 784 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)05-0546-04

Construction of eukaryotic expression vectors of two NF2 mutants and their expression in rat schwannoma cell line

HE Hua¹, PENG Biao², BIAN Liu-guan^{1*}, SUN Qing-fang¹, SHEN Jian-kang¹, HE Zi-jian³, LIN Yi-hai⁴

1. Department of Neurosurgery, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China
2. Department of Neurosurgery, The First People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510180
3. Department of Neurosurgery, Minhang Central Hospital of Shanghai, Shanghai 201100
4. Department of Neurosurgery, Central Hospital of Taizhou, Taizhou 318000

[ABSTRACT] **Objective:** To construct the eukaryotic expression vectors of two NF2 mutants (neurofibromatosis II) and to study their expression in rat schwannoma cell line (RT4). **Methods:** Site-directed mutagenesis was performed to induce the mutation of the codons for the residue Lys42 in NF2 into Pro in pcDNA3.1-NF2^{ΔLys42Pro}, and convert the codons for Phe 47 into that of Leu. RT4 cells were transiently transfected with the 3 kinds of plasmids containing the mutations and wide-type NF2 *via* lipofectin separately, then the expression levels of NF2 mRNA and protein were determined by RT-PCR and Western blotting in 3 groups. The cell proliferation was determined by the MTT after transfection. **Results:** DNA sequence analysis demonstrated the two-step mutagenesis was successful and the two plasmids of pcDNA3.1-NF2^{ΔLys42Pro} and pcDNA3.1-NF2^{ΔPhe47Leu} were obtained, both of the transfectants could produce merlin protein and mRNA. The two mutants had a significantly lower inhibitory rate for RT4 cells compared with wide-type NF2 ($P < 0.05$). **Conclusion:** The recombinant plasmids pcDNA3.1-NF2^{ΔLys42Pro} and pcDNA3.1-NF2^{ΔPhe47Leu} have been successfully constructed and they can be efficiently expressed in RT4 cells.

[KEY WORDS] NF2; point mutation; eukaryotic expression vector

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(5): 546-549]

II型神经纤维瘤病(neurofibromatosis II, NF2)是一种常见的常染色体显性遗传性疾病,以双侧听神

经受累为主,其相关基因是位于 22 号染色体上的抑癌基因 NF2^[1-2]。NF2 基因主要转录产物 merlin(或

[收稿日期] 2007-12-10 **[接受日期]** 2008-03-15

[基金项目] 上海市科委启明星跟踪计划(04qmh1414),上海市科委自然科学基金(06ZR14064). Supported by Foundation of Shanghai Science and Technology Committee(04qmh1414)and Natural Science Foundation of Shanghai(06ZR14064).

[作者简介] 贺 华,硕士生. E-mail: panda1979hh@sina.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-64370045-666091, E-mail: bian6612@yahoo.com.cn

称 Schwannomin)蛋白是第一个被发现的具有肿瘤抑制作用的蛋白质,通过与众多蛋白质直接或间接的相互作用,参与了细胞活动,具有调控细胞运动、抑制细胞增殖等生物学功能^[3-5]。NF2 基因突变可导致其编码的蛋白质变性,从而丧失肿瘤抑制作用,诱导肿瘤产生^[6]。

我们的前期研究^[7-8]证实 NF2 基因突变是导致 NF2 的重要因素,其突变率约 36%,进一步的研究^[9]发现其 42 和 47 位点是最常见的两个突变位点,42 位赖氨酸突变为脯氨酸,47 位苯丙氨酸突变为亮氨酸。本研究在上述研究基础上分别构建 NF2 基因 42、47 位点突变体,并在大鼠神经鞘瘤细胞中诱导表达,以确定这些位点突变对 NF2 功能的影响,为进一步探讨 NF2 突变的致瘤机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 DMEM 培养基、胎牛血清(FCS)、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;低熔点琼脂糖购自华美公司,Lipofectamine2000 脂质体转染试剂盒、TRIzol 试剂均购自美国 Invitrogen 公司;质粒提取试剂盒 Qiagen Miniprep Kit、RT-PCR 反应试剂盒均为 Qiagen 公司产品;胰蛋白酶为美国 Gibco 公司产品;DNA Ladder、DEPC、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺等购自美国 Sigma 公司;EXL 发光试剂盒购自 Santa Cruz 生物技术公司;引物由上海英俊公司合成。QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit 购自美国 Stratagene 公司,包括 Pfu-Turbo DNA polymerase、限制性内切酶 *Dpn* I 和 XL1-Blue 感受态细胞等。兔抗 merlin 多克隆抗体 NF2 (A-19) Antibody sc-331、辣根过氧化物酶 HRP 标记羊抗兔 IgG 购自美国 Santa Cruz 公司,GAPDH 单克隆抗体购于 Sigma 公司。

1.2 质粒及细胞培养 大鼠神经鞘瘤 RT4-D6P2T 细胞购于美国 ATCC 公司(CRL2768),质粒 pcDNA 3.1-NF2 由上海交通大学医学院神经病学研究所构建。RT4 细胞培养于 DMEM 高糖培养液(体积分数为 10%胎牛血清+100 IU/ml 青霉素+100 IU/ml 链霉素),同时细胞培养液加入 0.5 U 胰岛素,并将细胞于 37℃、体积分数为 5%CO₂ 饱和湿度孵箱中培养,经过消化传代,取对数生长期的细胞进行实验。

1.3 突变体质粒的构建及鉴定 采用 QuikChange 定点突变的方法扩增 NF2 的 2 个突变体。以 pcDNA3.1-NF2 为模板,根据 GenBank 中 NF2 的编码序列设计扩增其突变体编码序列所用的引物:(1)第 42 位赖氨酸(Lys)密码子 AAA 突变为脯氨酸

(Pro)密码子 CCA,上游为 5'-GCG AGA TGA AGT GGC CAG GGA AGG ACC TCT TTG-3',下游为 5'-CAA AGA GGT CCT TCC CTG GCC ACT TCA TCT CGC-3';(2)第 47 位苯丙氨酸(Phe)密码子 TTT 突变为亮氨酸(Leu)密码子 TTA,上游为 5'-GGG AAG GAC CTC TTA GAT TTG GTG TGC CGG-3';下游为 5'-CCG GCA CAC CAA ATC TAA GAG GTC CTT CCC-3'。

基因定点突变以 pcDNA3.1-NF2 为模板,根据定点突变试剂盒说明,以第 1 对点突变引物以及 Pfu-Turbo DNA 多聚酶建立热循环反应体系,95℃ 预变性 30 s,95℃ 30 s,55℃ 1 min,68℃ 16 min 扩增 16 个循环,扩增出带缺口的突变质粒,然后加 1 μl (10 U) *Dpn* I 到热循环产物中,将无突变的模板质粒消化。取消化过的热循环产物 3 μl 转化感受态细菌,取 5 ml 转化细菌摇菌过夜。部分菌液按照 Qiagen Miniprep Kit 说明书方法提取质粒,核酸电泳证实有质粒条带。取少量菌液送公司进行质粒提取测序并冻存剩余菌液。

1.4 质粒转染 按照 Lipofectamine2000 说明书分别将编码人野生型 NF2 真核表达质粒 pcDNA3.1-NF2、突变型 pcDNA3.1-NF2^{ΔLys42Pro} 和 pcDNA3.1-NF2^{ΔPhe47Leu} 转染对数生长期的 RT4 细胞;未转染 RT4 细胞作阴性对照。

1.5 RT-PCR 检测转染后 NF2 mRNA 表达 用质量分数为 0.25%胰蛋白酶消化,收集培养细胞。制成悬浮液并计算细胞数,每个样本收集等量细胞(3.0×10^6),用 TRIzol 试剂分别提取各组细胞中的总 RNA,总 RNA 沉淀溶解于 DEPC 处理过的无 RNase 的三蒸水中。利用引物合成软件 Premier5 和 oligo6 自我设计 NF2 (预期产物 348 bp)引物序列为 NF2/sense primer:5'-CTC CTG GCT TCT TAC GCC GT-3',NF2/antisense primer:3'-TGT AGA GCA TGT CAC TGT TC-5';GAPDH(预期产物 226 bp)/sense primer:5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3',GAPDH/antisense primer:5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'。反应体系:50℃ 30 min (RT 反应),95℃ 15 min (预变性),94℃ 45 s (变性),55℃ 1 min (退火),72℃ 1 min (延伸),共 30 个循环,72℃ 10 min (后延伸);PCR 产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.6 Western 印迹检测转染后 NF2 蛋白的表达 0.25%胰蛋白酶消化,收集培养的各組细胞,制成悬浮液并计算细胞数,每个样本收集等量细胞(5.0×10^6),加入细胞裂解液,提取蛋白质,以质量

分数为10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,然后将蛋白电泳转移至硝酸纤维素膜(PVDF)上,硝酸纤维素膜上加入质量分数10%脱脂奶粉封闭后,加入一抗工作液(兔抗 merlin 多克隆抗体,工作浓度为1:500),4℃过夜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:4 000),ECL 发光试剂进行显像后拍照,图像经扫描仪扫描后,用 Scion Image 图像分析软件进行光密度积分值(integral of optical density,IOD)分析。

1.7 MTT 法检测转染后细胞的增殖情况 分别取各组细胞在含10%FCS的DMEM中培养48h,加入10mg/ml MTT 10 μl,继续培养4h,每孔加入100 μl DMSO,取出后用酶标仪测定光密度值(D_{570}),取3个平行孔的均值,实验重复3次。肿瘤细胞相对增殖率(%)=(实验组 D_{570} /阴性对照组 D_{570})×100%。

1.8 统计学处理 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 15.0 统计软件进行统计学分析,行单因素方差分析和 q 检验,两组抑制率比较行 t 检验。

2 结果

2.1 突变体质粒的构建及测序结果 测序结果显示 pcDNA3.1-NF2 编码序列上原第42位赖氨酸密码子 AAA 突变成丙氨酸密码子 CCA,证实 pcDNA3.1-NF2 Δ Lys42Pro 已构建成功(图1A);pcDNA3.1-NF2 编码序列上原第47位苯丙氨酸(Phe)密码子 TTT 突变为亮氨酸(Leu)密码子 TTA,证实 pcDNA3.1-NF2 Δ Phe47Leu 构建成功(图1B)。

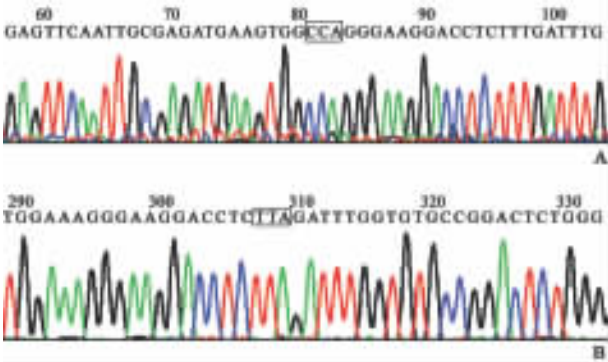


图1 pcDNA3.1-NF2 突变体的测序结果
Fig 1 Sequence analysis of mutants of pcDNA3.1-NF2 DNA fragment

A: pcDNA3.1-NF2 Δ Lys42Pro; B: pcDNA3.1-NF2 Δ Phe47Leu

2.2 转染后 NF2 mRNA 的表达结果 RT-PCR 结果发现,转染 pcDNA3.1-NF2 以及突变子细胞 348 bp 处有清晰明亮的条带,5 组细胞 226 bp 处均出现明亮的条带(图2)。结果表明 RT4 细胞和转染空载

体 pcDNA3.1 的 RT4 细胞 NF2 mRNA 几乎没有表达,而转染 pcDNA3.1-NF2 以及突变型 pcDNA3.1-NF2 Δ Lys42Pro 和 pcDNA3.1-NF2 Δ Phe47Leu 组细胞中 NF2 mRNA 高表达。

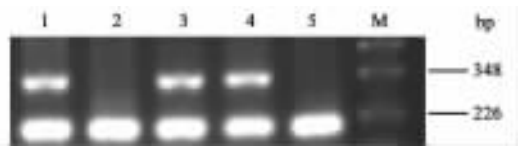


图2 RT-PCR 法检测 NF2 的表达

Fig 2 Expression of NF2 detected by RT-PCR

1: pcDNA3.1-NF2; 2: pcDNA3.1; 3: pcDNA3.1-NF2 Δ Lys42Pro; 4: pcDNA3.1-NF2 Δ Phe47Leu; 5: RT4 cell; M: Marker

2.3 转染后 NF2 蛋白的表达结果 转染 pcDNA3.1-NF2、突变型 pcDNA3.1-NF2 Δ Lys42Pro 和 pcDNA3.1-NF2 Δ Phe47Leu 的 RT4 细胞具有明显的 merlin 蛋白条带,而 RT4 细胞 merlin 蛋白条带不明显(图3)。结果说明,RT4 细胞 merlin 蛋白表达水平较低,而转染后 merlin 蛋白表达水平升高。

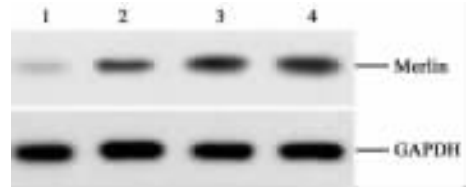


图3 Western 印迹检测 NF2 蛋白的表达

Fig 3 Expression of NF2 protein detected by Western blotting

1: RT4 cell; 2: pcDNA3.1-NF2; 3: pcDNA3.1-NF2 Δ Lys42Pro; 4: pcDNA3.1-NF2 Δ Phe47Leu

2.4 转染后 RT4 细胞的增殖情况 与阴性对照相比,转染 pcDNA3.1-NF2 的 RT4 细胞增殖明显受到抑制;而突变型 pcDNA3.1-NF2 Δ Lys42Pro 和 pcDNA3.1-NF2 Δ Phe47Leu 的 RT4 细胞增殖率与阴性对照组无统计学差异,其抑制率明显低于 pcDNA3.1-NF2 组($P < 0.05$,表1)。

表1 转染后 RT4 细胞的增殖情况比较

Tab 1 Comparison of proliferation of transfected RT4 cells

Group	D_{570}	Inhibitory rate(%)
RT4	0.553 9±0.021	0.00±0.00
pcDNA3.1-NF2	0.287 8±0.017 *	47.74±2.50 *
pcDNA3.1-NF2 Δ Lys42Pro	0.573 8±0.014 Δ	6.58±1.67 Δ
pcDNA3.1-NF2 Δ Phe47Leu	0.594 6±0.016 Δ	7.54±3.20 Δ

* $P < 0.05$ vs RT4 group; $\Delta P < 0.05$ vs pcDNA3.1-NF2 group

3 讨论

癌基因的激活与抑癌基因的失活是目前较为公认的肿瘤发生发展的重要机制。在研究诸如听神经瘤、脑膜瘤、胶质瘤发病机制的过程中,人们发现抑癌基因 NF2 的突变、缺失、失活极为关键^[10-11]。NF2 编码的 merlin 蛋白包含 3 个结构域:氨基末端 FERM 区域、 α 螺旋臂和带电荷的羧基末端区域^[12-13]。Merlin 蛋白存在“开放”和“关闭”两个构型,关闭状态的 merlin 蛋白具有抑制肿瘤细胞生长,维护机体健康的作用;当其两端发生改变,处于开放状态时,其生长抑制作用即丧失。本研究根据前期发现的 2 个错义突变,构建 NF2 基因 42、47 位点突变体,并在大鼠神经鞘瘤细胞中诱导表达,观察转染后肿瘤细胞的增殖率,以确定这些位点突变对 NF2 功能的影响,为进一步探讨 NF2 突变的致瘤机制奠定基础。

本研究测序结果证实 NF2 基因第 42 位和第 47 位的突变体均构建成功,RT-PCR 结果证实转染后 NF2 基因的表达,MTT 法确定这些位点突变对抑制肿瘤细胞增殖的功能发生了变化。结果显示,与野生型 NF2 相比,各突变体抑制肿瘤细胞增殖的功能明显降低,这说明这 2 个突变位点所在的氨基末端 FERM 区域是一个高度保守区域,一旦发生有义突变会导致功能上的失活。可进一步认为,有鉴于 FERM 区域是蛋白质三级结构区,merlin 的功能可能高度依赖于整个蛋白质的三级结构。临床中也同样发现,在被鉴定出的大多数的人类 NF2 突变多是缺失或点突变产生,而其中导致功能完全丧失的突变大部分分布于整个 FERM 结构域。

本研究利用转基因方法制备了 NF2 基因突变细胞模型,并初步证实了 NF2 第 42 位和第 47 位为病理性突变。因此该模型可以用于 NF2 发病分子和细胞水平的机制研究以及药物筛选和药物作用机制的探讨,为进一步研究奠定了基础。国外文献^[14-15]报道 merlin 蛋白抑制肿瘤细胞生长的作用可能与 Rac 信号转导途径有关,在以后的研究中我们将努力提高对呈网络状的信号转导通路的认识,为寻找肿瘤细胞药物治疗的靶点提供理论依据。

[参考文献]

[1] Eddleman C S, Liu J K. Optic nerve sheath meningioma: current di-

agnosis and treatment[J]. *Neurosurg Focus*, 2007, 23: E4.

- [2] Scheffler A C, Dubovy S R, Berrocal A M. Optical coherence tomography characteristics of epiretinal membranes in neurofibromatosis 2[J]. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*, 2008, 39: 73-77.
- [3] Sestini R, Bacci C, Provenzano A, Genuardi M, Papi L. Evidence of a four-hit mechanism involving SMARCB1 and NF2 in schwannomatosis-associated schwannomas [J]. *Hum Mutat*, 2008, 29: 227-231.
- [4] Jacoby L B, Jones D, Davis K, Kronn D, Short M P, Gusella J, et al. Molecular analysis of the NF2 tumor-suppressor gene in schwannomatosis[J]. *Am J Hum Genet*, 1997, 61: 1293-1302.
- [5] Fisher L M, Doherty J K, Lev M H, Slattery W H 3rd. Distribution of nonvestibular cranial nerve schwannomas in neurofibromatosis 2[J]. *Otol Neurotol*, 2007, 28: 1083-1090.
- [6] Evans D G, Ramsden R T, Shenton A, Gokhale C, Bowers N, Huson S M, et al. What are the implications in individuals with unilateral vestibular schwannoma and other neurogenic tumors [J]? *J Neurosurg*, 2008, 108: 92-96.
- [7] 卞留贯, 孙青芳, 沈建康, 赵卫国, 罗其中, 张天锡. 神经鞘瘤的 NF2 基因 2、4、6、13 外显子突变分析[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2001, 27: 401-404.
- [8] Bian L G, Tirakotai W, Sun Q F, Zhao W G, Shen J K, Luo Q Z. Molecular genetics alterations and tumor behavior of sporadic vestibular schwannoma from the People's Republic of China [J]. *J Neurooncol*, 2005, 73: 253-260.
- [9] 沈建康, 卞留贯, 孙青芳, 赵卫国, 罗其中, 王利民. 神经鞘瘤的 NF2 基因突变分析[J]. *中华神经外科杂志*, 2002, 18: 96-99.
- [10] 贺子建, 王晓强, 卞留贯, 孙青芳. NF2 基因及其蛋白 merlin 的生物学研究进展[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2006, 33: 194-197.
- [11] 贺子建, 卞留贯, 贺 华, 孙青芳, 赵卫国, 沈建康. 野生型 II 型神经纤维瘤病基因 II 亚型真核表达载体的构建及其功能[J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2007, 7: 305-309.
- [12] Shimizu T, Seto A, Maita N, Hamada K, Tsukita S, Tsukita S, et al. Structural basis for neurofibromatosis type 2. Crystal structure of the merlin FERM domain[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 10332-10336.
- [13] Schulze K M, Hanemann C O, Müller H W, Hanenberg H. Transduction of wild-type merlin into human schwannoma cells decreases schwannoma cell growth and induces apoptosis[J]. *Hum Mol Genet*, 2002, 11: 69-76.
- [14] Nakai Y, Zheng Y, MacCollin M, Ratner N. Temporal control of Rac in Schwann cell-axon interaction is disrupted in NF2-mutant schwannoma cells[J]. *J Neurosci*, 2006, 26: 3390-3395.
- [15] Shaw R J, Paez J G, Curto M, Yaktine A, Pruitt W M, Saotome I, et al. The Nf2 tumor suppressor, merlin, functions in Rac-dependent signaling[J]. *Dev Cell*, 2001, 1: 63-72.

[本文编辑] 贾泽军