

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01162

GPC3 增强型绿色荧光蛋白真核表达载体的构建及其对生长因子促细胞增殖效应的影响

王冰¹, 林山², 王烈^{1*}

1. 南京军区福州总医院普通外科、南京军区普通外科研究所, 福州 350025

2. 福建省莆田学院附属医院普通外科, 莆田 351100

[摘要] 目的: 通过构建 GPC3 增强型绿色荧光蛋白真核表达载体, 研究磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(Glypican-3, GPC3)对成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor-2, FGF2)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor-2, IGF2)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、骨形态发生蛋白-4(bone morphogenetic protein-4, BMP4)促细胞增殖效应的影响。方法: 应用基因重组技术及限制性内切酶酶切构建并鉴定 pEGFP-N2-GPC3 增强型绿色荧光蛋白真核表达载体, 经脂质体 LipofectamineTM2000 介导转染 SK-Hep-1 后, 通过 G418(600 μ g/ml)筛选出抗性克隆, 应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 GPC3 mRNA 在真核细胞中的表达, Western 印迹法检测 GPC3 蛋白在真核细胞中的表达, 并在荧光显微镜下观察目的蛋白在真核细胞内的表达情况, 采用 MTT 法研究 GPC3 对生长因子 FGF2、IGF2、TGF- β 1、BMP4 促细胞增殖效应的影响。结果: 限制性内切酶酶切分析、重组质粒测序鉴定表明为正确重组子, 荧光显微镜下可见转染的真核细胞胞膜区发出强绿色荧光, RT-PCR 及 Western 印迹法表明 GPC3 在真核细胞中成功表达, GPC3 抑制了 FGF2 对 SK-Hep-1 细胞的增殖效应, 而不抑制 IGF2、TGF- β 1、BMP4 的促增殖作用。结论: 编码的氨基酸序列与人 GPC3 完全一致; 构建完成真核表达重组质粒 pEGFP-N2-GPC3; GPC3 基因在 SK-Hep-1 中成功表达; GPC3 在 FGF2 信号通路中可能发挥负性调控因子的作用。

[关键词] GPC3 基因; 真核表达载体; SK-Hep-1; 绿色荧光蛋白; 生长因子

[中图分类号] R 394.36

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2008)10-1162-04

Construction of GPC3 green fluorescent protein eukaryotic expression vector and its influence on growth promoting effect of growth factors in SK-Hep-1 cells

WANG Bing¹, LIN Shan², WANG Lie^{1*}

1. Department of General Surgery, Fuzhou General Hospital, Research Institute of General Surgery, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350025, China

2. Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Putian University, Putian 351100

[ABSTRACT] **Objective:** To construct a GPC3 green fluorescent protein eukaryotic expression vector pEGFP-N2-G-PC3, and analyze its effects on the growth promoting effect of growth factors (fibroblast growth factor-2, FGF2; insulin-like growth factor-2, IGF2; transforming growth factor- β 1, TGF- β 1; and bone morphogenetic protein-4, BMP4) in human hepatoma cell line GPC3-SK-Hep-1. **Methods:** A eukaryotic expression vector for GPC3 genes (pEGFP-N2-GPC3) was constructed by recombinant DNA technique and was transfected into SK-Hep-1 cells by LipofectamineTM2000; the cells stably expressing GPC3 were screened out by G418 (600 μ g/ml). The mRNA expression of GPC3 was detected by RT-PCR method and the protein expression of GPC3 by Western blotting and fluorescence microscope. Effects of GPC3 gene on the growth promoting effects of the above growth factors were examined by MTT. **Results:** The recombinant plasmid was verified to be correctly constructed by restriction endonuclease analysis and DNA sequencing. The green fluorescence was detected in the transfected SK-Hep-1 cells under fluorescence microscope. RT-PCR and Western blotting both confirmed that GPC3 was successfully expressed in SK-Hep-1 cells. FGF2-induced cell proliferation was significantly decreased by GPC3 gene, whereas the growth promoting effects of IGF2, TGF- β 1 and BMP4 were not altered by GPC3 gene. **Conclusion:** We have successfully obtained the synthetic GPC3 protein,

[收稿日期] 2008-04-19

[接受日期] 2008-06-05

[基金项目] 福建省青年科技人才创新项目(2005J074). Supported by Innovative Projects of Young Technological Talents of Fujian Province(2005J074).

[作者简介] 王冰, 博士, 主治医师.

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:0591-22859811, E-mail: fzkpwk@21cn.com

which has the same amino acid sequence as that of human GPC3 protein. The eukaryotic expression vector pEGFP-N2-GPC3 has been correctly constructed and GPC3 protein has been successfully expressed in SK-Hep-1 cells. GPC3 may negatively modulate FGF2 signaling pathway.

[KEY WORDS] GPC3 gene; eukaryotic expression vector; SK-Hep-1 gene; green fluorescent protein; growth factor

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(10): 1162-1165]

磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)是一种膜性硫酸乙酰肝素糖蛋白(heparansulfate proteoglycan, HSPG),其通过磷脂酰肌醇锚定在细胞膜上^[1]。其转录子为 2 130 bp,编码 580 个氨基酸残基的蛋白质前体,相对分子质量 66 000。在不同的肿瘤中表达差异很大,不同的组织中具有不同的生物学功能。本研究旨在构建 GPC3 基因的真核表达载体,转染人肝癌细胞 SK-Hep-1 进行表达,观察 GPC3 对生长因子成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor-2, FGF2)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor-2, IGF2)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、骨形态发生蛋白-4(bone morphogenetic protein-4, BMP4)促细胞增殖效应的影响,研究 GPC3 在各种生长因子信号通路中可能具有的生物学功能。

1 材料和方法

1.1 材料 绿色荧光稳定表达载体 pEGFP-N2、*E. coli* JM109 菌株、*E. coli* DH5 α 菌株由福州总医院实验科提供;GPC3 原核扩增重组质粒 pDNR-LIB-GPC3 购自广州复能基因公司;SK-Hep-1 人肝癌细胞株购自上海中国科学院细胞库;兔抗人 GPC3 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;质粒抽提纯化试剂盒为 Qiagen 公司产品;LipofectamineTM2000 购自 Invitrogen 公司;TRIzol 购自 Promega 公司;高保真 DNA polymerase、DNA 分子量标准、T₄ DNA 连接酶、胶回收试剂盒为 TaKaRa 公司产品;限制性内切酶(*Xho* I、*Eco* R I)为 MBI 产品;生长因子 FGF2、IGF2、TGF- β 1、BMP4 购自 Sigma 公司;其他生化试剂:溴化乙啶(EB)、卡那霉素、氯霉素、琼脂糖、乙醇、CaCl₂、PBS、甘油等均为国产或进口分装试剂。

1.2 GPC3 基因的获得 根据 GenBank 中查找的 GPC3 开放读码框(1 740 bp)自行设计 GPC3 上、下游引物,并导入 *Xho* I 和 *Eco* R I 限制性内切酶酶切位点,序列如下:上游 5'-GAA CTC GAG AGC AGG ATG GCC GGG ACC GTG CGC A -3'(下划线处为 *Xho* I 酶切位点),下游 5'-GCG GAA TTC GTG CAC CAG GAA GAA GAA GCA CAC CAC-3'(下划线处为 *Eco* R I 酶切位点);以 GPC3 原核扩

增重组质粒 pDNR-LIB-GPC3 为模板进行 PCR 扩增目的基因,PCR 扩增反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,65 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物长度大小为 1 746 bp。取 5 μ l 反应产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳分析。

1.3 pEGFP-N2-GPC3 真核表达重组质粒的构建与鉴定 将上述 PCR 产物凝胶电泳,切胶回收阳性条带,用 DNA 回收纯化试剂盒纯化回收,用 *Xho* I、*Eco* R I 分别双酶切回收的 GPC3 片段和真核表达载体 pEGFP-N2,电泳线性片段并予以切胶回收、纯化。用 T₄ DNA 连接酶连接 pEGFP-N2 载体片段与 GPC3 基因片段,将连接产物转化大肠杆菌 JM109 感受态细菌,铺 Kan⁺ LB 平板,随机挑取克隆菌落并提取质粒,经酶切鉴定,测序得到 EGFP-N2-GPC3 重组质粒。

1.4 pEGFP-N2-GPC3 重组质粒转染 SK-Hep-1 细胞 将处于对数生长期的 SK-Hep-1 细胞胰酶消化收集,以 4 \times 10⁵/孔接种于 6 孔细胞培养板,每孔加完全培养基 10% FBS-MEM 3 ml,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养至细胞达 80% 铺满。用 LipofectamineTM 2000 将 GPC3 转入 SK-Hep-1 细胞,并设 pEGFP-N2 空质粒对照。重组质粒 pEGFP-N2-GPC3 转染 SK-Hep-1 人肝癌细胞后,由于报告基因可与目的基因融合表达,可通过观察绿色荧光蛋白基因的表达,提示目的基因 GPC3 在 SK-Hep-1 中是否表达,并可通过观察荧光蛋白的表达区域提示目的蛋白的表达区域。

1.5 GPC3 稳定转染的 SK-Hep-1 肝癌细胞系的建立 重组质粒 pEGFP-N2-GPC3 转入 SK-Hep-1 细胞 48 h 后,转染细胞按 1:8 传代,并更换含 G418 终浓度(600 μ g/ml)的 MEM 培养液进行筛选,4 周后挑取克隆到 24 孔板进行扩增。

1.6 RT-PCR 检测转基因细胞 GPC3 基因的表达 回收转染的 SK-Hep-1 细胞,提取总 RNA,逆转录成 cDNA,PCR 方法扩增目的基因 GPC3,PCR 反应条件同 1.2。

1.7 Western 印迹法检测 GPC3 蛋白的表达^[2] 收集 SK-Hep-1 细胞(1 \times 10⁶),按试剂盒说明加入 RIPA 充分裂解细胞,经 BCA 法进行蛋白定量后,取 80 μ g 蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳,常规转膜、曝

光、显像分析,检测蛋白的表达水平。

1.8 GPC3 对生长因子 FGF2、IGF2、TGF-β1、BMP4 促细胞增殖效应的影响 每种生长因子分4组;GPC3-SK-Hep-1 实验组、GPC3-SK-Hep-1 对照组,pEGFP-SK-Hep-1 实验组、pEGFP-SK-Hep-1 对照组。取生长良好的细胞,制成 1×10^5 /ml 的细胞悬液;96 孔细胞培养板中每孔加入 5 000 个细胞,置 37℃、体积分数为 5% CO₂ 孵箱培养,在无血清、无双抗、含不同浓度的生长因子的培养液中培养 48 h,各种生长因子的浓度分别为:FGF2(5、10、25 ng/ml),IGF2(10、25、50 ng/ml),TGF-β1(0.1、0.5、1、2 ng/ml)、BMP4(5、10、25、50 ng/ml)^[3],用 MTT 比色法进行检测,检测波长 570 nm,测定光密度(D)值,结果以 $(D_{\text{实验组}}/D_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 表示。

1.9 统计学处理 所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 GPC3 cDNA 的 PCR 扩增 pDNR-LIB-GPC3 重组质粒以自行设计的引物进行 PCR 反应,产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳时,出现一条特异性区带,位于 1 500~2 000 bp 之间,与预期大小(1 746 bp)相符(图 1)。

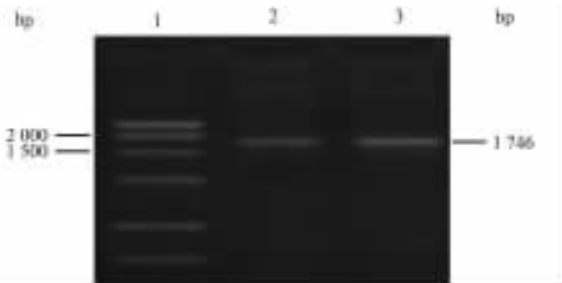


图 1 GPC3 cDNA PCR 产物

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of PCR product of GPC3 cDNA

1:DNA marker;2,3:GPC3 cDNA PCR product

2.2 真核表达载体 pEGFP-N2-GPC3 的鉴定 挑取阳性克隆,提取重组质粒。重组质粒经 Xho I 和 EcoR I 双酶切后,可见 1 746 bp 的插入片段,提示重组质粒含有 GPC3 基因编码区全长(图 2)。分别采用通用引物正向测序、反向测序及设计引物反向测序,测序结果证明插入片段读框和方向正确。

2.3 在荧光显微镜下观察细胞的荧光 转染 48 h 后,在荧光显微镜下观察,实验组细胞与空质粒组细胞相比,实验组的绿色荧光蛋白主要表达于细胞膜上,空质粒组荧光均匀分布于整个细胞(图 3)。

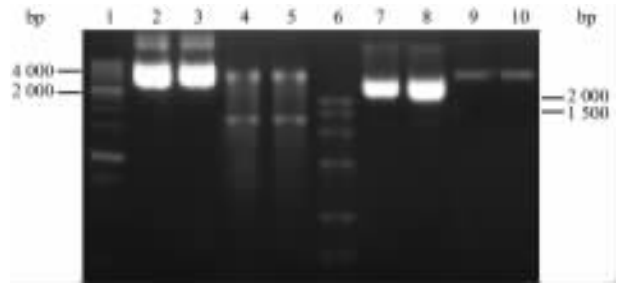


图 2 重组质粒的 Xho I /EcoR I 酶切鉴定

Fig 2 Restrictive digestion analysis of recombinant plasmid by Xho I /EcoR I

1:10 000 bp DNA marker;2,3:Recombinant plasmid before digestion;4,5:Recombinant plasmid after digestion;6:2 500 bp DNA marker;7,8:Void plasmid before digestion;9,10:Void plasmid after digestion

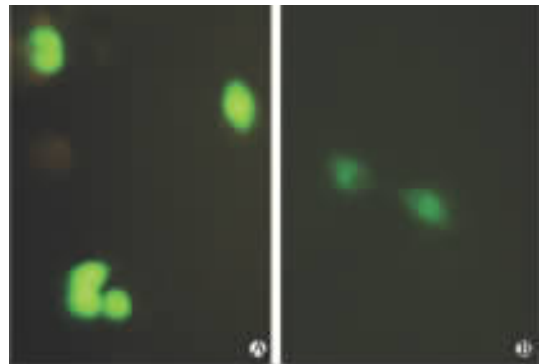


图 3 转染 48 h 后细胞的荧光情况

Fig 3 Fluorescence of transfected cells after 48 h

A:pEGFP-SK-Hep-1;B:GPC3-SK-Hep-1. Original magnification: $\times 400$

2.4 RT-PCR 检测转染细胞 GPC3 mRNA 的表达 收集稳定转染的细胞约 5×10^6 个,提取总 RNA 进行逆转录 PCR,实验组可扩增出长度为 1 746 bp 大小的特异性条带即 GPC3 cDNA,而空质粒对照组无特异性条带(图 4)。

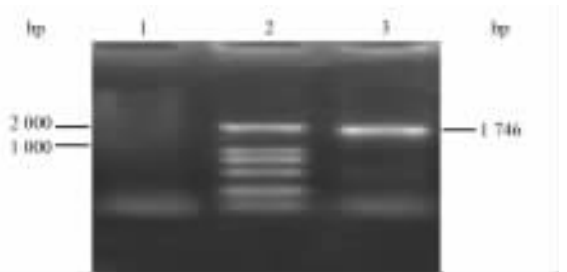


图 4 转染细胞的 RT-PCR 鉴定产物

Fig 4 RT-PCR identification in transfected cells

1:pEGFP-SK-Hep-1 RT-PCR product;2:DNA marker;3:GPC3-SK-Hep-1 RT-PCR product

2.5 Western 印迹检测 GPC3 蛋白的表达 结果显

示, 稳定转染 GPC3 基因后的 SK-Hep-1 细胞可见明显的 GPC3 蛋白表达条带, 而空白对照组和空质粒对照组无条带出现(图 5)。

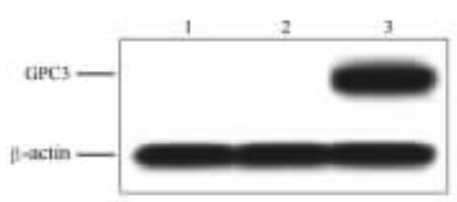


图 5 3 组细胞 GPC3 蛋白的表达

Fig 5 Expression of GPC3 protein in cells of 3 groups

1; SK-Hep-1; 2; pEGFP-SK-Hep-1; 3; GPC3-SK-Hep-1

2.6 GPC3 对生长因子 FGF2、IGF2、TGF- β 1、BMP4 促细胞增殖效应的影响 结果如表 1 所示, FGF2 实验组与空质粒对照组相比有显著性差异 ($P < 0.01$), 表明 GPC3 一定程度上参与 FGF2 的信号途径, 抑制了 FGF2 对细胞的增殖作用, 而对 IGF2、TGF- β 1、BMP4 则无此作用。

表 1 GPC3 对 FGF2、IGF2、TGF- β 1、BMP4 促细胞增殖的影响

Tab 1 Effect of GPC3 on FGF2, IGF2, TGF- β 1, and BMP4 growth factor signaling

($n=5, \bar{x} \pm s, \%$)

Growth factor $\rho_B / (\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1})$	GPC3-SK-Hep-1	pEGFP-SK-Hep-1
FGF2		
5	100.22 \pm 3.49 **	110.48 \pm 3.65
10	101.76 \pm 3.61 **	116.95 \pm 2.92
25	99.16 \pm 2.88 **	118.67 \pm 3.21
IGF2		
10	101.15 \pm 3.47	102.09 \pm 3.65
25	112.57 \pm 3.71	111.91 \pm 3.38
50	113.01 \pm 2.97	112.17 \pm 3.15
TGF- β 1		
0.1	91.45 \pm 3.55	92.09 \pm 3.44
0.5	82.33 \pm 3.07	81.88 \pm 3.26
1	78.21 \pm 3.01	77.37 \pm 2.85
2	76.66 \pm 2.91	76.61 \pm 2.81
BMP4		
5	90.35 \pm 3.11	90.01 \pm 3.34
10	85.44 \pm 3.12	86.19 \pm 3.02
25	83.94 \pm 3.74	84.24 \pm 3.18
50	84.78 \pm 3.06	83.97 \pm 3.38

** $P < 0.01$ vs pEGFP-SK-Hep-1 group

3 讨论

GPC3 功能丧失突变导致出生前、出生后过度生长和畸变综合征 (Simpson Golabi-Behmel syndrome, SGBS)^[4], 推测 GPC3 可能通过调节生长因

子信号通路发挥其生物学功能。已有研究表明, GPC3 基因抑制机体的生长同 IGF 信号转导通路是相互独立的作用途径^[5], GPC3 与 BMP2-Smad、FGF2 及 Wnt 信号通路存在联系^[6-9], 本实验通过研究 GPC3 对 4 种生长因子 (FGF2、IGF2、TGF- β 1、BMP4) 促细胞增殖效应的影响, 分析 GPC3 在生长因子信号通路中的作用。

本实验构建完成真核表达重组质粒 pEGFP-N2-GPC3, 所构建的重组质粒经酶切鉴定和序列分析, 证实 GPC3 序列和方向的正确性。将重组质粒转染 SK-Hep-1 细胞后, 经 RT-PCR、Western 印迹及荧光显微镜检测, 结果表明目的基因已经成功整合到真核细胞中, 并在真核细胞中成功表达, 蛋白定位于胞膜区。观察 GPC3 对生长因子促细胞增殖效应的影响, FGF2 实验组与空质粒对照组相比有显著性差异 ($P < 0.01$), IGF2、TGF- β 1、BMP4 实验组与空质粒对照组相比无显著性差异, 表明 GPC3 一定程度上参与 FGF2 的信号途径, 抑制了 FGF2 对细胞的增殖作用, 而对其他 3 种生长因子 IGF2、TGF- β 1、BMP4 则无此作用。

[参考文献]

- [1] 方 芳, 王红阳, 吴秀菊, 周 赟. 聚糖蛋白 3 在原发性肝癌病理诊断中的意义[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28: 568-570.
- [2] 刘亚萍, 李忆东, 王晓慧, 杨 瑞, 卢 建. 热应激对大鼠肝组织及人前列腺癌 PC-3 细胞 RhoB 表达的影响[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28: 381-384.
- [3] Kwack M H, Choi B Y, Sung Y K. Cellular changes resulting from forced expression of glypican-3 in hepatocellular carcinoma cells[J]. Mol Cells, 2005, 21: 224-228.
- [4] Pilia G, Hughes-Benzie R M, MacKenzie A, Baybayan P, Chen E Y, Huber R, et al. Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome[J]. Nat Genet. 1996, 12: 241-247.
- [5] Chiao E, Fisher P, Crisponi L, Deiana M, Dragatsis I, Schlessinger D, et al. Overgrowth of a mouse model of the Simpson-Golabi-Behmel syndrome is independent of IGF signaling[J]. Dev Biol, 2002, 243: 185-206.
- [6] Hartwig S, Hu MC, Cella C, Piscione T, Filmus J, Rosenblum N D. Glypican-3 modulates inhibitory Bmp2-Smad signaling to control renal development *in vivo*[J]. Mech Dev, 2005, 122: 928-938.
- [7] Song H H, Shi W, Xiang Y Y, Filmus J. The loss of glypican-3 induces alterations in Wnt signaling[J]. J Biol Chem, 2005, 280: 2116-2125.
- [8] Midorikawa Y, Ishikawa S, Iwanari H, Imamura T, Sakamoto H, Miyazono K, et al. Glypican-3, overexpressed in hepatocellular carcinoma, modulates FGF2 and BMP-7 signaling[J]. Int J Cancer, 2003, 103: 455-465.
- [9] Song H H, Shi W, Filmus J. OCI-5/rat glypican-3 binds to fibroblast growth factor-2 but not to insulin-like growth factor [J]. J Biol Chem, 1997, 272: 7574-7577.

[本文编辑] 尹 茶