

小鼠甲胎蛋白基因的克隆表达鉴定及稳定表达甲胎蛋白的小鼠肿瘤细胞株的建立

田耕, 易继林, 刘积良, 翁准

■背景资料

近来的研究表明, 人AFP存在四个特殊的免疫表位, 这四个表位经加工提呈后能够被人T细胞识别, 并能分别诱导培养的人T细胞和转基因小鼠产生AFP特异性的CTL。另外还发现, 尽管小鼠AFP终生存在(甚至高于人的水平), 其免疫系统也能够产生针对此癌胚抗原的T细胞免疫。以上发现为针对AFP的肝癌免疫基因治疗提供了依据。

田耕, 刘积良, 翁准, 深圳市第二人民医院肿瘤科 广东省深圳市 518035
易继林, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科 湖北省武汉市 430030
通讯作者: 田耕, 518035, 广东省深圳市福田区笋岗西路3002号, 深圳市第二人民医院肿瘤科, tiangeng666@yahoo.com.cn
电话: 0755-83366388-2118
收稿日期: 2005-10-14 接受日期: 2006-01-11

Gene cloning and expression identification of murine α -fetoprotein gene and establishment of a cell line stably expressing α -fetoprotein

Geng Tian, Ji-Lin Yi, Ji-Liang Liu, Zhun Weng

Geng Tian, Ji-Liang Liu, Zhun Weng, Tumor Department, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518035, Guangdong Province, China
Ji-Lin Yi, Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Correspondence to: Dr. Geng Tian, Tumor Department, Shenzhen Second People's Hospital, 3002 Sungang West Road, Futian District, Shenzhen 518035, Guangdong Province, China. tiangeng666@yahoo.com.cn
Received: 2005-10-14 Accepted: 2006-01-11

Abstract

AIM: To clone the murine α -fetoprotein (mAFP) gene, construct the eukaryotic expression vector of AFP and establish a cell line stably expressing AFP.

METHODS: The total RNA was extracted from Hepa1-6 cells. The mAFP gene was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and cloned into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1 to construct pmAFP. The pmAFP was identified by restriction enzyme analysis and sequencing, and then stably transfected into EL-4 cell line. Western blot and RT-PCR were used to detect the expression of mAFP protein and mRNA, respectively. EL-4 cells stably expressing mAFP were inoculated in the back of 6 mice to observe the tumor formation.

RESULTS: The mAFP gene with a length of

1.8 kb was successfully cloned from the total RNA of Hepa1-6 cells. Restriction enzyme analysis and sequencing showed that the 1.8 kb mAFP gene was successfully cloned and inserted into pcDNA3.1. RT-PCR and Western blot showed mAFP was stably expressed in EL-4 cell line. The tumor grew to a volume of $2\,279.97 \pm 235.13\text{ mm}^3$ 22 d after inoculation in 5 mice.

CONCLUSION: The mAFP gene is successfully cloned and a cell line stably expressing mAFP, named EL-4 (mAFP), is established. EL-4 (mAFP) has a good tumor-forming capacity in mice.

Key Words: α -fetoprotein; Mice; Eukaryotic expression vector; Cell line

Tian G, Yi JL, Liu JL, Weng Z. Gene cloning and expression identification of murine α -fetoprotein gene and establishment of a cell line stably expressing α -fetoprotein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(6):626-629

摘要

目的: 克隆小鼠甲胎蛋白(AFP)基因并进行表达鉴定, 构建小鼠AFP真核表达载体并建立稳定表达甲胎蛋白的小鼠肿瘤细胞株。

方法: 从Hepa1-6细胞中提取总RNA进行RT-PCR, 克隆出小鼠AFP基因, 亚克隆于pcDNA3.1中构建真核表达载体pmAFP, 进行酶切、测序和表达鉴定, pmAFP稳定转染EL-4细胞建立EL-4(mAFP)细胞株, RT-PCR检测EL-4(mAFP)细胞mAFP mRNA的表达, Western blot检测mAFP蛋白表达, 将EL-4(mAFP)细胞种植于6只小鼠背部皮下观察成瘤情况。

结果: RT-PCR成功克隆出小鼠AFP基因, 酶切、测序和表达鉴定证实真核表达载体pmAFP构建成功, RT-PCR及Western blot检测证实EL-4(mAFP)细胞中有mAFP mRNA及蛋白的表达, 5只小鼠背部皮下种植处有肿瘤形成, 22 d肿瘤体积为 $2\,279.97 \pm 235.13\text{ mm}^3$ 。

结论: 小鼠mAFP基因克隆成功, 真核表达载体构建成功, 建立的EL-4(mAFP)细胞株能有效表达小鼠甲胎蛋白, 在小鼠体内成瘤性良好。

关键词: 甲胎蛋白; 小鼠; 真核表达载体; 细胞株

田耕, 易继林, 刘积良, 翁准. 小鼠甲胎蛋白基因的克隆表达鉴定及稳定表达甲胎蛋白的小鼠肿瘤细胞株的建立. 世界华人消化杂志 2006;14(6):626-629

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/626.asp>

0 引言

肝细胞肝癌(HCC)作为常见消化系统肿瘤, 复发率高, 预后较差^[1-7]. 甲胎蛋白(AFP)作为肝癌的相关抗原在70%以上的肝癌中高表达, 近来的研究发现AFP存在CTL免疫显性表位, 完全可以作为肝癌免疫治疗的靶点^[8-13], 为肝癌的免疫基因治疗开辟了新的途径. 但现在还没有合适的用来研究基于AFP的肝癌免疫基因治疗的小鼠肿瘤细胞株, 为此, 我们克隆了小鼠AFP基因, 构建真核表达载体, 并成功建立了稳定表达甲胎蛋白的小鼠肿瘤细胞株, 为进一步研究基于AFP的肝癌免疫基因治疗奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料 小鼠肝癌细胞系Hepal-6和小鼠淋巴瘤细胞系EL-4由第二军医大学王皓老师惠赠. CHO细胞株由中国典型培养物保藏中心提供. 真核表达载体pcDNA3.1/myc-His购自Invitrogen公司. RT-PCR试剂盒(Ver.2.1)、Ex Taq高保真Taq酶、限制性内切酶、T4 DNA连接酶和DNA Marker(DL2000)购自宝生物工程(大连)有限公司. Trizol试剂和RPMI 1640培养基为Gibco公司产品, 胎牛血清为Hyclone公司产品. 脂质体Lipofectamine 2000和Opti-MEM培养基为Invitrogen公司产品. 质粒小量制备试剂盒和琼脂糖凝胶核酸纯化回收试剂盒为Omega公司产品. 羊抗人AFP多克隆抗体购自Sant Cruz公司. HRP标记的抗羊二抗为北京中山生物工程公司进口分装产品. ECL显色剂为Pharmacia公司产品. 其余试剂均为国产或进口分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 小鼠AFP基因的克隆 培养Hepal-6细胞至对数期, 用Trizol试剂提取细胞总RNA. 为了克隆包括分泌信号在内的AFP全长基因, 设计的引物为P1、P2, P1: 5'-CTCAGGAATTCGCCATGAAGTGGATCACA-3', 在5'端引入酶切位点EcoR

I; P2: 5'-CTCTGCTCTAGATTACTCGAGAAGGCCCAAAGCATCACG-3', 在3'端引入酶切位点Xba I. 利用RT-PCR试剂盒反转录出cDNA第一链, 引物采用Oligo dT. 采用Ex Taq高保真Taq酶进行随后的PCR. 取3 μ L PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳, 观察结果。

1.2.2 重组质粒的构建、酶切及测序鉴定 克隆的小鼠AFP基因经EcoR I和Xba I同时双酶切后, 琼脂糖凝胶电泳回收、纯化; 质粒pcDNA3.1/myc-His同样经EcoR I和Xba I同时双酶切后, 回收纯化. 目的基因与质粒按3:1的比例混合, 加入T4 DNA连接酶进行连接反应(18 $^{\circ}$ C, 16 h). 构建的质粒命名为pmAFP. 将上述连接产物转化大肠杆菌DH5 α , 涂平板, 氨苄青霉素筛选阳性菌落. 挑取单个菌落培养, 小量质粒制备. pmAFP用EcoR I和Xba I进行单酶切或双酶切鉴定. 酶切鉴定正确的质粒, 挑取相应菌落培养后送上海博亚生物工程公司进行双向测序。

1.2.3 pmAFP转染CHO细胞与蛋白表达检测 利用脂质体Lipofectamine 2000瞬时转染CHO-K1细胞, 按说明书进行操作, 同时做空载体对照. 在6孔板每孔中加入 5×10^5 个CHO-K1细胞, 24 h后加入分别稀释于Opti-MEM培养基的4 μ g质粒和10 μ L Lipofectamine 2000, 48 h后裂解细胞, 提取蛋白. 蛋白质经电泳后, 半干法转印至硝酸纤维素膜上, 一抗为羊抗人AFP多克隆抗体, 然后用辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗羊二抗孵育, 增强化学发光(ECL)显色。

1.2.4 建立EL-4(mAFP)细胞系 采用脂质体Lipofectamine 2000将pmAFP转染EL-4细胞, G418(0.4 g/L)筛选, 并以G418(0.3 g/L)维持筛选. 抗药克隆用RT-PCR检测mAFP mRNA的表达. Western blot检测mAFP蛋白表达。

1.2.5 检测EL-4(mAFP)细胞在小鼠体内的成瘤情况 5-8周龄 η C57BL/6小鼠6只, 按 2×10^9 细胞/L于小鼠背部皮下接种EL-4(mAFP)细胞, 观察肿瘤生长情况, 每周两次测量肿瘤大小, 按 $4/3 \pi R^3$ (R = 半径)计算肿瘤体积。

2 结果

2.1 小鼠AFP基因的克隆 提取的总RNA A_{260}/A_{280} 比值为1.885, 表明总RNA较纯. 以反转录的cDNA为模板, 用设计引物进行PCR扩增, 所得特异性条带与预期长度为1.8 kb的目的基因相符(图1)。

2.2 重组质粒酶切及测序鉴定 酶切结果证明重

■ 研发前沿

肝癌的免疫基因治疗作为一种有潜力的新疗法, 是当今研究的热点. 目前表达AFP的小鼠肝癌细胞系均来源于小鼠自发肝癌细胞系BW7756. 由于此细胞系从1957年传代至今, 已检测不到MHC I和MHC II的表达. 所以现在还没有合适的研究基于AFP的肝癌免疫基因治疗的小鼠细胞株. 建立表达AFP的小鼠肝癌细胞系是肝癌免疫基因治疗研究的必备条件之一。

■创新盘点

EL-4细胞是一种小鼠淋巴瘤细胞,高表达MHC I和MHC II,易于在C57BL/6小鼠体内成瘤,非常适合作为肿瘤免疫治疗研究。本实验建立的EL-4(mAFP)细胞株既保留了高表达MHC I和MHC II的特点,又能表达mAFP,为开展基于AFP的肝癌免疫基因治疗提供了较好的研究对象。

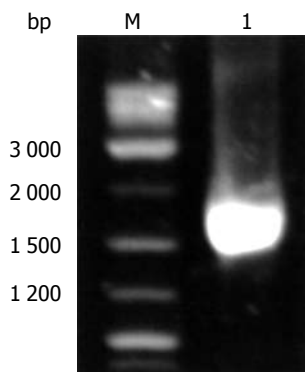


图1 RT-PCR获得小鼠AFP基因. M: DNA marker; 1: 小鼠AFP基因.

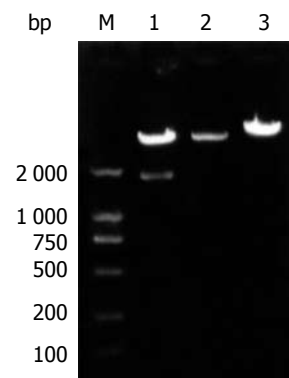


图2 重组质粒pmAFP酶切鉴定. M: DNA marker (DL2000); 1: pmAFP (*EcoR* I + *Xba* I); 2: pcDNA3.1 (*EcoR* I); 3: pmAFP (*EcoR* I).

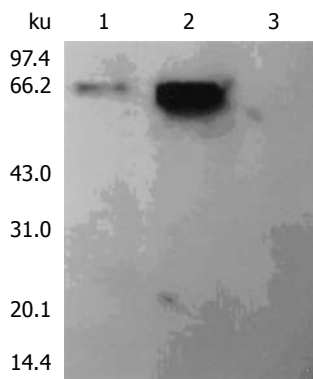


图3 Western blot检测结果. 1: CHO-K1/pmAFP; 2: Hepa 1-6; 3: CHO-K1/pcDNA3.1.

组质粒带有相应的目的基因(图2). 对重组子进行测序, 结果与GenBank blast比对, 本实验克隆出的小鼠AFP基因与GenBank所给出的小鼠AFP基因有99.7%的碱基相同, 共有5个碱基不同, 其中有两个碱基为密码子的第3位碱基, 未改变所编码的氨基酸.

2.3 Western blot检测蛋白表达 利用脂质体Lipofectamine 2000瞬时转染CHO-K1细胞, 48 h后

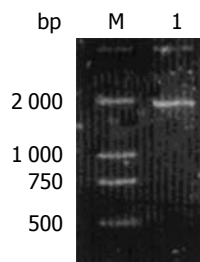


图4 RT-PCR检测EL-4(mAFP)细胞mAFP mRNA的表达. M: DNA marker; 1: EL-4(mAFP).

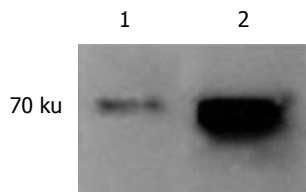


图5 Western blot检测EL-4(mAFP)细胞mAFP的表达. 1: EL-4(mAFP); 2: Hepa 1-6.

提取蛋白. Western blot检测可检出转染细胞中有 M_r 70 000的特异性蛋白条带(图3), 表明小鼠AFP基因在真核细胞内得到表达.

2.4 RT-PCR检测EL-4(mAFP)细胞mAFP mRNA的表达 RT-PCR检测EL-4(mAFP)细胞mAFP mRNA的表达(图4), 方法同上.

2.5 Western blot检测EL-4(mAFP)细胞mAFP蛋白的表达 Western blot检测EL-4(mAFP)细胞mAFP的表达(图5), 方法同上.

2.6 EL-4(mAFP)细胞在小鼠体内的成瘤情况 肿瘤潜伏期8-12 d, 至2 wk时5只小鼠种植处皮下可触及肿瘤; 22 d时, 肿瘤体积为 $2279.97 \pm 235.13 \text{ mm}^3$, 3只小鼠于4 wk时死亡, 2只于5 wk时死亡.

3 讨论

AFP是由胚胎卵黄囊和胎肝合成、分泌的胚性糖蛋白, 因其与肝癌的高度相关性已被作为诊断肝癌的两个重要指标之一. 由于对胚胎期经胸腺阴性选择后体内是否仍然存在抗AFP的T细胞存有疑虑, 致使以AFP结构本身作为肝癌免疫基因治疗靶点的设想一直未能付诸实施. 近来的研究表明, 人AFP存在四个特殊的表位, 这四个表位经加工与HLA-A0201结合后能够被人T细胞识别, 并能分别诱导培养的人T细胞和HLA-A0201/ K^b 转基因小鼠产生AFP特异性的CTL^[8-10]. 另外还发现, 尽管小鼠AFP终生存在(甚至高于人的水平), 其免疫系统也能够产生针

对此癌胚抗原的T细胞免疫^[10-13]. 这些研究结果为探索基于AFP的肝癌免疫基因治疗提供了理论依据. 针对多种肿瘤抗原的DNA疫苗研究已取得了令人瞩目的进展^[14-19].

本实验克隆出的小鼠AFP基因共有1 818个核苷酸, 与GenBank所给出的小鼠AFP基因有99.7%的核苷酸相同, 共有5个核苷酸不同, 其中有2个核苷酸为密码子的第三位核苷酸, 未改变所编码的氨基酸. 存在差异的原因可能是GenBank所给出的小鼠AFP基因来源于小鼠13 d胚胎的肝脏^[20].

目前表达AFP的小鼠肝癌细胞系有BWIC3和由其派生出的Hepa1-6. 这两个细胞系来源于小鼠自发肝癌细胞系BW7756. 由于此细胞系从1957年传代至今, 已检测不到MHC I 和MHC II 的表达^[12]. 所以现在还没有合适的研究基于AFP的肝癌免疫基因治疗的小鼠细胞株. 故本实验建立了EL-4(mAFP)细胞株, EL-4细胞^[15]是一种小鼠淋巴瘤细胞, 高表达MHC I 和MHC II, 易于在C57BL/6小鼠体内成瘤, 非常适合用作肿瘤免疫治疗研究. 本实验建立的EL-4(mAFP)细胞株既保留了高表达MHC I 和MHC II 的特点, 又能表达mAFP, 为开展基于AFP的肝癌免疫基因治疗提供了较好的研究对象. 但EL-4(mAFP)细胞不是肝脏来源的细胞, 其生物学特性必然与肝癌细胞有差异, 是其不足之处.

4 参考文献

- Hubner M, McCormack L, Clavien PA. Surgical therapy of liver tumors: resection vs. ablation. *Schweiz Rundsch Med Prax* 2005; 94: 1255-1259
- Tang ZY. Hepatocellular carcinoma-cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 445-454
- Parks RW, Garden OJ. Liver resection for cancer. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 766-771
- Lin NF, Tang J, Ismael HS. Study on environmental etiology of high incidence areas of liver cancer in China. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 572-576
- Wang JH, Lin G, Yan ZP, Wang XL, Cheng JM, Li MQ. Stage II surgical resection of hepatocellular carcinoma after TAE: a report of 38 cases. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 133-136
- Wu MC. Clinical research advances in primary liver cancer. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 471-474
- He XS, Huang JF, Liang LJ, Lu MD, Cao XH. Surgical resection for hepatoportal bile duct cancer. *World J Gastroenterol* 1999; 5: 128-131
- Mizukoshi E, Nakamoto Y, Tsuji H, Yamashita T, Kaneko S. Identification of alpha-fetoprotein-derived peptides recognized by cytotoxic T lymphocytes in HLA-A24+ patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2006; 118: 1194-1204
- Butterfield LH, Meng WS, Koh A, Vollmer CM, Ribas A, Disette VB, Faull K, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS. T cell responses to HLA-A*0201-restricted peptides derived from human alpha fetoprotein. *J Immunol* 2001; 166: 5300-5308
- Butterfield LH, Koh A, Meng W, Vollmer CM, Ribas A, Disette V, Lee E, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS. Generation of human T-cell responses to an HLA-A2.1-restricted peptide epitope derived from alpha-fetoprotein. *Cancer Res* 1999; 59: 3134-3142
- Meng WS, Butterfield LH, Ribas A, Disette VB, Heller JB, Miranda GA, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS. alpha-Fetoprotein-specific tumor immunity induced by plasmid prime-adenovirus boost genetic vaccination. *Cancer Res* 2001; 61: 8782-8786
- Vollmer CM Jr, Eilber FC, Butterfield LH, Ribas A, Disette VB, Koh A, Montejo LD, Lee MC, Andrews KJ, McBride WH, Glaspy JA, Economou JS. Alpha-fetoprotein-specific genetic immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59: 3064-3067
- Hanke P, Serwe M, Dombrowski F, Sauerbruch T, Caselmann WH. DNA vaccination with AFP-encoding plasmid DNA prevents growth of subcutaneous AFP-expressing tumors and does not interfere with liver regeneration in mice. *Cancer Gene Ther* 2002; 9: 346-355
- Prud'homme GJ, Lawson BR, Chang Y, Theofilopoulos AN. Immunotherapeutic gene transfer into muscle. *Trends Immunol* 2001; 22: 149-155
- Stevenson FK, Zhu D, Rice J. New strategies for vaccination and immunomodulation in NHL. *Ann Hematol* 2001; 80: B132-B134
- Xu HY, Yang YL, Guan XL, Song G, Jiang AM, Shi LJ. Expression of regulating apoptosis gene and apoptosis index in primary liver cancer. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 721-724
- Grimm CF, Ortmann D, Mohr L, Michalak S, Krohne TU, Meckel S, Eisele S, Encke J, Blum HE, Geissler M. Mouse alpha-fetoprotein-specific DNA-based immunotherapy of hepatocellular carcinoma leads to tumor regression in mice. *Gastroenterology* 2000; 119: 1104-1112
- Irvine KR, Parkhurst MR, Shulman EP, Tupesis JP, Custer M, Touloukian CE, Robbins PF, Yafal AG, Greenhalgh P, Suttmuller RP, Offringa R, Rosenberg SA, Restifo NP. Recombinant virus vaccination against "self" antigens using anchor-fixed immunogens. *Cancer Res* 1999; 59: 2536-2540
- Han R, Cladel NM, Reed CA, Peng X, Budgeon LR, Pickel M, Christensen ND. DNA vaccination prevents and/or delays carcinoma development of papillomavirus-induced skin papillomas on rabbits. *J Virol* 2000; 74: 9712-9716
- Carninci P, Hayashizaki Y. High-efficiency full-length cDNA cloning. *Methods Enzymol* 1999; 303: 19-44

■名词解释

1 表位: 又称抗原决定簇, 是指抗原性物质表面决定该抗原特异性的特殊化学基团。
2 主要组织相容性复合体(MHC): 是位于脊椎动物某对染色体的特定区域、紧密连锁的编码主要组织相容性抗原系统的基因群, 其编码产物主要分布在细胞膜表面, 在免疫应答过程中起重要作用。

电编 张敏 编辑 张海宁