

文章编号 1006-8147(2018)01-0007-03

论 著

卵巢癌细胞系 OVCAR3 过表达 SND1 稳定株的构建

杨 扬^{1,2}, 白 虹², 辛灵彪³

(1.天津市血液中心,天津 300110;2.天津医科大学免疫学系,天津 300070;3.天津医科大学生物化学与分子生物学系,天津 300070)

摘要 目的:通过慢病毒载体构建过表达 SND1 的 OVCAR3 稳定的表达株。方法:重组的 pLVX-FLAG-SND1 表达载体与包装质粒共同转染 293T 细胞,获得携带 FLAG-SND1 的重组慢病毒。病毒感染的 OVCAR3 细胞经 Hygromycin B 筛选出稳定表达株。用 Western blot 方法检测 SND1 蛋白表达。结果:用病毒感染 OVCAR3 细胞,药物筛选后获得的过表达稳定株中 SND1 蛋白表达水平明显增高。结论:利用慢病毒表达载体 pLVX-FLAG-SND1 成功感染并筛选出稳定表达 SND1 的 OVCAR3 细胞株,为进一步研究 SND1 在卵巢癌中的作用提供了体外细胞系模型。

关键词 SND1;慢病毒载体;OVCAR3 细胞;卵巢癌

中图分类号 R737.31

文献标志码 A

Construction of ovarian cancer OVCAR3 cell line for the stable expression of SND1

YANG Yang^{1,2}, BAI Hong², XIN Ling-biao³

(1.Tianjin Blood Centre, Tianjin 300110, China; 2.Department of Immunology,Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 3. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To screen the human ovarian cancer cell line OVCAR3 which can stably expresses SND1 protein. **Methods:** The recombinant plasmids pLVX-FLAG-SND1 was co-transfected into 293T cell line with packaging plasmids, and the culture supernatant containing the lentiviral particles was collected to infect OVCAR3 cell. Hygromycin B was used to screen the infected cells, so as to obtain a cell line for stable expression. The expression level of SND1 was detected by Western-blot. **Results:** OVCAR3 cells were infected by the lentivirus and the expression of SND1 was significantly up-regulated following screening with Hygromycin B. **Conclusion:** The cell line OVCAR3 stably overexpressing SND1 could be established successfully, thus providing an *in vitro* model for further study of molecular function and mechanism of SND1 in human ovarian cancer.

Key words staphylococcal nuclease domain containing 1; lentiviral vector; OVCAR3 cells; ovarian cancer

卵巢上皮性癌是女性常见的恶性肿瘤之一,其死亡率居妇科恶性肿瘤之首,其发生发展的机制一直被广泛研究探讨。卵巢在盆腔内位置很深,卵巢上皮性癌的起病非常隐匿,早期无临床症状,诊断难度很大,且该病治疗困难,即便采用联合化疗也很难提高 5 年生存率^[1]。人类 SND1(staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1)蛋白在乳腺癌、前列腺癌、直肠结肠癌、肝细胞癌和神经胶质细胞恶性肿瘤中均有过度表达^[2]。分子生物学的研究已经揭示了 SND1 蛋白的多功能性,包括其参与基因转录和转录后调控^[3],构成 RNA 诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)^[4],调节 mRNA 的剪切、编辑和稳定^[5],保持细胞活性等^[6]。SND1 所具有的这一系列复杂的分子功能可能是它

促进癌症发生的机制。然而 SND1 与卵巢上皮性癌的发生是否有关联尚不清楚,因此 SND1 是否促进了卵巢癌的发生以及其具体机制值得探讨。本研究使用 SND1 慢病毒感染并筛选出能稳定表达 SND1 的 OVCAR3 细胞株,为进一步探讨 SND1 在卵巢癌的发生、发展和转移中的作用机制提供基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂 人卵巢癌细胞系 OVCAR3 和 293T 细胞系均为本实验室保存。OVCAR3 细胞系用含 0.01 mg/mL 胰岛素、20 %胎牛血清(BI 公司)的 1640 培养基(BI 公司)常规培养,293T 细胞系用含 10 %胎牛血清(BI 公司)的 DMEM 培养基(BI 公司)常规培养。慢病毒载体质粒 pLVX-FLAG-SND1 由本实验室构建。包装质粒 1(pMD2.G)和包装质粒 2(psPAX2)由天津医科大学生物化学与分子生物学教研室提供。Ampicillin 和 Hygromycin B 购自罗氏公司。转染试剂 Polyethyleneimine 购自 Sigma 公司。鼠源 SND1 单克隆抗体由本实验室制备。鼠源

基金项目 国家自然科学基金资助项目(31370749,31571380);天津市应用基础与前沿技术研究计划(青年基金项目)(15JCQNJC09900)
作者简介 杨扬(1982-),女,硕士,研究方向:免疫学;通信作者:辛灵彪,E-mail: xinlingbiao@tmu.edu.cn。

FLAG M2 抗体购自 Sigma 公司。辣根过氧化氢酶标抗鼠 IgG 购自美国 KPL 公司。BCA 蛋白浓度检测试剂盒购自 Pierce 公司。ECL Western 显色试剂盒购自碧云天公司。

1.2 Hygromycin B 最低致死浓度测定 按 3×10^5 /孔将 OVCAR3 细胞接种于 24 孔板上,24 h 细胞贴壁后,按 0、0.5、1、1.25、1.5 $\mu\text{g/mL}$ 浓度梯度将 Hygromycin B 加入每孔中,共设 3 组重复。培养 3 d 后结果显示,Hygromycin B 对 OVCAR3 细胞的最低致死浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$,所以选择 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 Hygromycin B 进行抗药筛选。

1.3 慢病毒毒粒制备 准备 293T 细胞,待混合率为 70%~80% 左右准备包装病毒。转染前 1 d 将 293T 细胞接种于 10 cm 细胞培养皿中,置于含 10 % FES 的高糖 DMEM 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 的培养箱中培养。将重组质粒分别与包装质粒 1(pMD2.G)和包装质粒 2(psPAX2)按照体系比(μg)22.5:7.9:14.6 加入 500 μL opti-MEM 中混匀,另用 500 μL opti-MEM 将 100 μL 转染试剂 Polyethyleneimine 混匀,后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 加热使其完全溶解。将混有质粒的 opti-MEM 加入至混有 Polyethyleneimine 的 opti-MEM 中,轻弹混匀,室温静置 5~20 min。取出事先铺好的 293 T 细胞,弃旧培养基,加入 10 mL 新完全培养基,再将混合好的质粒和转染试剂的 opti-MEM 逐滴缓慢加入至新培养基中,4~6 h 后换液。24 h 后收病毒上清至离心管,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。后更换新的完全培养基继续培养,48 h 后再收集病毒上清至同一离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 500 $\times g$ 离心 10 min 后,用 0.45 μm 的滤器过滤,置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存用于感染。

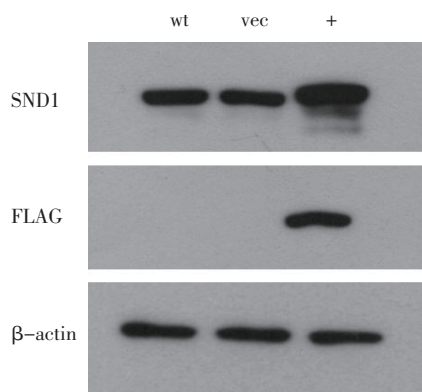
1.4 OVCAR3 细胞的感染及稳定株筛选 准备待转染慢病毒的目的细胞 OVCAR3,转染前 24 h 以 1×10^6 /孔铺到 6 孔板中,使其融合率为 60% 左右。将制备好的病毒液缓慢加入培养皿中,再加 200 μL FBS 和 12 μg polybrene。感染 24 h 后,更换新鲜完全培养基。48 h 后加入 1 $\mu\text{g/mL}$ Hygromycin B 进行筛选,并且以不加慢病毒、只加药的 OVCAR3 细胞培养基做对照,此皿细胞全部死亡即为筛选完成。FLAG-SND1 病毒感染组称为 OVCAR3-pLVX-FLAG-SND1,空载体包装病毒感染组称为 OVCAR3-pLVX。

1.5 Western blot 检测 FLAG-SND1 表达量 重组质粒包装毒粒感染目的细胞 OVCAR3,筛选稳定细胞株检测相应 SND1 蛋白表达量。用 RIPA 裂解重组慢病毒感染的 OVCAR3 细胞(OVCAR3-pLVX-FLAG-SND1)离心取上清作为样品,野生型

OVCAR3 细胞(OVCAR3-CN)裂解液作为阴性对照,BCA 蛋白定量试剂盒测定样品蛋白浓度,取等量蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,湿转印至 PVDF 膜后,用 5 % 脱脂奶粉封闭,一抗、二抗孵育后,加入曝光底物进行曝光。Western blot 以 β -actin 为内参。

2 结果

OVCAR3 慢病毒稳定株的筛选与鉴定:选取包装病毒感染 OVCAR3 细胞,48 h 后加 1 $\mu\text{g/mL}$ Hygromycin B 进行筛选。3 d 后,不加慢病毒只加药的细胞全部死亡,结束筛选,将 OVCAR3 慢病毒稳定株冻存保存。剩余的细胞制备成细胞裂解液,Western 印迹鉴定 SND1 蛋白表达情况,同时选择野生型 OVCAR3 细胞作为空白对照,见图 1。结果显示 OVCAR3 稳定株的 SND1 蛋白表达明显增加,证明 OVCAR3 慢病毒稳定株构建成功。



wt: 野生型 OVCAR3 全细胞裂解液;vec: vector, 空载体病毒感染的 OVCAR3 全细胞裂解液;+: 慢病毒稳定转染 pLVX-FLAG-SND1 重组质粒的 OVCAR3 全细胞裂解液

图 1 OVCAR3 慢病毒稳定株 Western-blot 表达鉴定图

Fig 1 The expression level of SND1 detected by western-blot

3 讨论

SND1 蛋白分子量为 100 kDa,所以又称之为 p100 蛋白,它的 N 端由 4 个相同结构的葡萄球菌核酸酶样(staphylococcal nucleases-like,SN-like)的 SN 结构组成,C 端具有 Tudor-SN5(TSN)结构域,所以又被称为 Tudor-SN(Tudor staphylococcal nuclease)蛋白^[7]。SND1 是一种具有复杂功能的蛋白,它参与基因转录的调控和转录后的基因表达,维持 mRNA 的稳定,参与 mRNA 的剪切以及维持细胞活性等^[4-6]。1995 年,SND1 作为 EB 病毒核蛋白 2(Epstein-Barr virus nuclear protein 2,EBNA2)的转录协同调控因子被首次发现^[8]。EBNA2 可以激活转录因子介导 B 淋巴细胞的转化。SND1 是 STAT5 和 STAT6 的转录激活因子,SND1 的 SN 端结构和 Tudor 端结构共同参与 STAT5 的协同免疫作用,但

是只有 SN 端结构参与 STAT6 的活化^[9]。SND1 还作为一个衔接分子建立起 CREB 蛋白(cAMP-response element binding protein)和 STAT6 之间的桥梁。本实验室之前破解了 SND1 蛋白 N 端 TSN 结构域的晶体结构,并且证实 SND1 不仅参与基因转录调控,还可以促进剪接体的装配和 pre-mRNA 剪接加工过程。另外,SND1 在 RNA 诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)中发挥核酸酶样作用来调节转录后的基因表达水平,从而影响 siRNA 和 miRNA 的表达^[10]。研究证明,SND1 增强了 RISC 的活性可能会促进癌症的形成。

通过对 SND1 敲除的小鼠模型的研究发现 SND1 蛋白通过影响基因表达在胚胎形成和细胞分化的早期发挥关键性作用^[11]。越来越多的研究证实 SND1 蛋白的过度表达与促进癌症形成有关,它的具体机制有待深入研究。SND1 是 RISC 复合物的组成成分,而 RISC 与肝细胞癌的发展息息相关。SND1 通过多种方式影响着肝癌形成,大多数肝细胞癌患者血液中的 SND1 呈现高表达,并且升高的程度与肝癌的严重程度呈正相关^[12];进一步的研究证实,SND1 蛋白的过度表达能促进癌症的侵袭、增殖、转移和血管再生。在一个乳腺癌的肺转移模型中普遍检测出 SND1 表达的上调,大量临床数据显示,SND1 的表达水平与乳腺癌肺转移的发生率和生存率相关;星型胶质细胞上调基因 1(astrocyte elevated gene-1, AEG-1)作为一种致瘤性的细胞因子影响着肿瘤的发生、转移、血管再生、抗药性和细胞凋亡,SND1 已被证实与 AEG-1 相互作用。c-Myb 是一种不成熟的造血干细胞的变异生长因子,可以促进乳腺癌的淋巴转移,它的功能也早已发现与 SND1 蛋白相关,在出现转移的患者中,c-Myb 与 SND1 同时高表达。在 174 例前列腺癌患者的研究中,发现 SND1 蛋白与癌症的组织学分期呈正相关。SND1 与结肠直肠癌也极具相关性,从 196 例结肠癌的免疫组织化学的分析得出,伴随着肿瘤分期和疾病的进展,细胞质表达 SND1 和 AEG-1 蛋白也逐渐增多^[13]。在结肠癌患者中,SND1 通过转录后的修饰下调了结肠腺瘤息肉肉易感基因(adenomatous Polyposis Coli, APC)的蛋白表达水平,破坏了细胞极性和细胞间的粘附力。最近的一项关于恶性神经胶质细胞肿瘤的研究发现,患者大脑中 SND1 mRNA 的水平较正常人显著升高,这可以为该病的治疗提高新的靶点^[14]。本实验室之前的研究已经发现 TGF- β 信号通路可以调控 SND1 蛋白的表达。鉴于现有的报道,SND1 在多种恶性疾病中均有异常表达,我们

推测 SND1 在卵巢癌的发生发展中也可能发挥一定的调控作用。

慢病毒载体是逆转录病毒载体的一种亚型,是在 HIV-1 病毒基础上改建而来的病毒载体系统,能将目的基因高效地导入人或者动物的原代细胞或细胞系中。慢病毒载体基因组是正链 RNA,目的基因整合到宿主细胞基因组中,可以随着细胞基因组的分裂而分裂,因此慢病毒介导的基因表达持续而且稳定^[15]。本实验利用慢病毒表达载体 pLVX-FLAG-SND1 与慢病毒包装质粒共同转染 293T 细胞,在细胞中进行慢病毒包装。用包装好的慢病毒颗粒感染 OVCAR3 细胞,经过抗药性筛选,建立过表达 SND1 的 OVCAR3 稳定株。通过 Western 印迹鉴定证实 SND1 在慢病毒毒粒感染后的 OVCAR3 细胞中稳定表达,证实已成功构建 OVCAR3 慢病毒稳定株。

本次实验成功地构建了能够稳定表达 SND1 的 OVCAR3 稳定株,为从分子水平上研究 SND1 对卵巢癌细胞的调控作用提供了体外细胞系模型,为研究 SND1 与卵巢癌发生、发展及转移的关系奠定了基础,也为进一步研究卵巢癌的治疗提供了新的方向。

参考文献:

- [1] Gutierrez-Beltran E, Denisenko T V, Zhivotovsky B, et al. Tudor staphylococcal nuclease: biochemistry and functions[J]. Cell Death Differ, 2016,23(11):1739
- [2] Miller M B, Bi W L, Ramkissoon L A, et al. MAPK activation and HRAS mutation identified in pituitary spindle cell oncocytoma[J]. Oncotarget, 2016,7(24):37054
- [3] Tong L, Wang C, Hu X, et al. Correlated overexpression of metadherin and SND1 in glioma cells[J]. Biol Chem, 2016,397(1):57
- [4] Yu L, Liu X, Cui K, et al. SND1 Acts downstream of TGF β 1 and upstream of smurf1 to promote breast cancer metastasis[J]. Cancer Res, 2015,75(7):1275
- [5] Gao X, Fu X, Song J, et al. Poly (a)(+) mRNA-binding protein Tudor-SN regulates stress granules aggregation dynamics[J]. FEBS J, 2015, 282(5):874
- [6] Jariwala N, Rajasekaran D, Srivastava J, et al. Role of the staphylococcal nuclease and Tudor domain containing 1 in oncogenesis (review)[J]. Int J Oncol, 2015,46(2):465
- [7] Guo F, Wan L, Zheng A, et al. Structural insights into the tumor-promoting function of the MTDH-SND1 complex[J]. Cell Rep, 2014, 8(6):1704
- [8] Kannan N, Eaves C J. Tipping the balance: MTDH-SND1 curbs oncogene-induced apoptosis and promotes tumorigenesis[J]. Cell Stem Cell, 2014,15(2):118
- [9] Permeth J B, Reid B, Earp M, et al. Inherited variants affecting RNA editing May contribute to ovarian cancer susceptibility: results from a large-scale collaboration[J]. Oncotarget, 2016,7(45):72381
- [10] Aviram N, Ast T, Costa E A, et al. The SND proteins constitute an al-

3 讨论

自然杀伤细胞是固有免疫系统中一类重要的免疫细胞,它主要分布于次级淋巴组织器官以及外周血中^[9-11],NK 细胞不像 T 细胞,它不需要预先致敏就能发挥杀伤作用或分泌细胞因子、趋化因子等能力^[12-14]。截止到目前为止,对 NK 细胞的发育分化以及功能方面的调控仍然存在很多的未知,而现在转基因小鼠的应用,对于 NK 细胞的进一步研究提供了非常有效的工具。

NKp46-Cre 转基因小鼠是一种专门介导表达 NKp46 受体的 NK 细胞的敲除小鼠^[7]。现阶段,Cre 重组酶介导的基因敲除检测主要集中在基因组的基因型鉴定,RT-PCR 以及 Western 等技术在 DNA、mRNA 和蛋白水平上进行验证,而这些实验对于做免疫功能实验较为困难,并且不利于活体实验的研究。因此,在本次实验中引入了 ROSA26R-YFP 荧光报告基因小鼠与 NKp46-Cre 小鼠杂交,借助 Cre 重组酶系统切除 ROSA26R-YFP 荧光报告基因前面的终止子从而表达 YFP 蛋白^[15],形成观察 NK 细胞的一种有效手段。

在本次实验中,我们得到了 ROSA26R-YFP(+/-) 或 ROSA26R-YFP(+/+) 的 NK 细胞,并且在各个免疫器官(脾脏、淋巴结、骨髓)中得到 YFP 的阳性表达,证实了 YFP 阳性 NK 细胞的阳性表达率在 80% 以上,而在 ROSA26R-YFP(+/+) 纯合的小鼠中的阳性率更高达 90% 左右。虽然 YFP 标记 NK 细胞并不是 100%,可能还是与 Cre 重组酶的敲除效率有关,但其结果证实 YFP 阳性细胞可代表 NK 细胞,为了以后进一步的研究我们会采取 ROSA26R-YFP(+/+) 纯合的小鼠进行实验。

综上所述,本次实验结果表明 YFP 基因报告系统可行,在以后的实验中选择 YFP 阳性的细胞进行实验,对 NK 细胞的发育进行实时监测,有利于分析 NK 细胞的分化和增殖,而对于功能方面利用 YFP 阳性细胞进行杀伤实验,也有着重要的作用,因此,这个系统的建立可以更加深入地探讨 NK 细

胞地发育和功能方面的问题,为免疫细胞的研究提供了方向。

参考文献:

- [1] Zhang C, Tian Z. NK cell subsets in autoimmune diseases[J]. J Autoimmun, 2017, 83:22
- [2] Post M, Cuapio A, Osl M, et al. The Transcription factor ZNF683/HOBIT regulates human NK-cell development[J]. Front Immunol, 2017, 8:535
- [3] Holmes M L, Huntington N D, Thong R P, et al. Peripheral natural killer cell maturation depends on the transcription factor Aiolos[J]. EMBO J, 2014, 33(22): 2721
- [4] Bollino D, Webb T J. Chimeric antigen receptor-engineered natural killer and natural killer T cells for cancer immunotherapy[J]. Transl Res, 2017, 187:32
- [5] Sun J C, Lanier L L. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8(+) T cells [J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(10):645
- [6] Lopez-Soto A, Gonzalez S, Smyth M J, et al. Control of metastasis by NK cells [J]. Cancer Cell, 2017, 32(2):135
- [7] Narni-Mancinelli E, Chaix J, Fenis A, et al. Fate mapping analysis of lymphoid cells expressing the NKp46 cell surface receptor[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(45):18324
- [8] Deng Y, Kerdiles Y, Chu J, et al. Transcription factor Foxo1 is a negative regulator of natural killer cell maturation and function[J]. Immunity, 2015, 42(3):457
- [9] Male V, Brady H J. Transcriptional control of NK cell differentiation and function[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2014, 381:173
- [10] Moretta L, Montaldo E, Vacca P, et al. Human natural killer cells: origin, receptors, function, and clinical applications[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2014, 164(4):253
- [11] Paolini R, Bernardini G, Molfetta R, et al. NK cells and interferons[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2015, 26(2):113
- [12] Levy E M, Roberti M P, Mordoh J. Natural killer cells in human cancer: from biological functions to clinical applications[J]. J Biomed Biotechnol, 2011, 2011:676198
- [13] Hsu H T, Mace E M, Carisey A F, et al. NK cells converge lytic granules to promote cytotoxicity and prevent bystander killing[J]. J Cell Biol, 2016, 215(6):875
- [14] Leavy O. Maturation and function of NK cells[J]. Nat Rev Immunol, 2012, 12(3): 150
- [15] Guan C, Ye C, Yang X, et al. A review of current large-scale mouse knockout efforts[J]. Genesis, 2010, 48(2):73

(2017-08-05 收稿)

(上接第 9 页)

- ternative targeting route to the endoplasmic reticulum[J]. Nature, 2016, 540(7631):134
- [11] Jang J S, Wang X, Vedell P T, et al. Custom gene capture and Next-Generation sequencing to resolve discordant ALK status by FISH? and IHC in lung adenocarcinoma[J]. J Thorac Oncol, 2016, 11(11): 1891
 - [12] Wang N, Du X, Zang L, et al. Prognostic impact of Metadherin-SND1 interaction in colon cancer[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(12): 10497

- [13] Cappellari M, Bielli P, Paronetto M P, et al. The transcriptional co-activator SND1 is a novel regulator of alternative splicing in prostate cancer cells[J]. Oncogene, 2014, 33(29):3794
- [14] Heinrich E M, Wagner J, Krüger M, et al. Regulation of miR-17-92a cluster processing by the microRNA binding protein SND1[J]. FEBS Lett, 2013, 587(15):2405
- [15] Fashe T, Saarikettu J, Isomäki P, et al. Expression analysis of Tudor-SN protein in mouse tissues[J]. Tissue Cell, 2013, 45(1):21

(2017-03-04 收稿)