

文章编号:1005-6947(2008)01-0037-04

· 肝肿瘤专题研究 ·

# 稳定表达线粒体融合素基因2肝癌细胞株的建立及其意义

王尧, 郑启昌, 胡青钢, 胡文君

(华中科技大学同济医学院附属协和医院 普通外科, 湖北 武汉 430020)

**摘要:**目的 探讨将线粒体融合素基因2(mfn2)转染培养人肝癌细胞株 HepG2, 建立长期表达 mfn2 的肝癌细胞模型的可行性。方法 基因重组构建 mfn2 真核表达质粒 pEGFPmfn2, 用脂质体将质粒转染培养人肝癌细胞株 HepG2, 经 G418 筛选阳性细胞克隆, 逆转录-聚合酶链反应检测转染后 30d 细胞 mfn2 mRNA 的表达水平; Western-blot 检测线粒体融合蛋白的表达。结果 (1) 成功构建表达真核质粒 pEGFPmfn2; (2) 成功将质粒 pEGFPmfn2 转染肝癌细胞株 HepG2, 并获得阳性细胞克隆; (3) 经脂质体转染的人肝癌细胞株 HepG2 可较稳定表达 mfn2。结论 成功地建立稳定表达 mfn2 的肝癌细胞株, 为进一步研究 mfn2 在肝癌发生发展中的作用奠定了基础。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(1): 37-40]

**关键词:** 癌, 肝细胞/病理学; 基因; 转染; 线粒体基因

中图分类号: R 735.7

文献标识码: A

## Construction of hepatic carcinoma cell strain with stable expression of mitofusin-2 gene and its significance

WANG Yao, ZHENG Qichang, HU Qinggang, HU Wenjun

(Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430022, China)

**Abstract: Objective** To investigate the feasibility of constructing hepatocellular carcinoma cell strain in which mitofusin-2 gene is stably expressed. **Methods** Mitofusin-2 gene was inserted into the eukaryotic expressing vector pEGFP-N<sub>2</sub> to construct expressing plasmid pEGFPmfn2. pEGFPmfn2 was transfected into hepatocellular carcinoma cell strain HepG2 by Lipofectamine 2000 and was selected with G418 for 30 d. The mRNA expression was detected by RT-PCR and protein expression by Western-blot.

**Results** (1) pEGFPmfn2 expression plasmid was constructed successfully; (2) pEGFPmfn2 was transfected into cultured HepG2 successfully and positive cell clone was obtained; (3) mitofusin-2 gene was stably expressed in transfected HepG2/mfn2. **Conclusions** Hepatocellular carcinoma cell strain HepG2 with stable mitofusin-2 gene expression was successfully constructed, which could be applied to explore the role of mitofusin-2 gene in the genesis and development of hepatic carcinoma.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(1): 37-40]

**Key words:** Carcinoma, Hepatocellular/pathol; Gene; Transfection; Mitochondrial Gene

CLC number: R 735.7

Document code: A

收稿日期: 2007-10-23; 修订日期: 2007-12-10。

作者简介: 王尧, 男, 华中科技大学同济医学院附属协和医院博士研究生, 主要从事肝胆外科疾病基础和临床方面的研究。

通讯作者: 郑启昌 E-mail: tongjimc@126.com

线粒体融合素基因 2 (mitofusin-2 gene, mfn2) 在线粒体融合过程中发挥重要功能;近期的研究表明,其在线粒体新陈代谢、凋亡及抑制肿瘤细胞增殖方面也有重要的作用。线粒体途径是细胞凋亡的重要途径。mfn2 在细胞凋亡尤其是对肿瘤细胞凋亡的影响已引起关注,但现仍知之甚少。为了明确 mfn2 在肿瘤细胞凋亡中的作用及其机制,笔者用脂质体将 mfn2 基因转染培养人肝癌细胞株 HepG2,经 G418 筛选后建立稳定表达 mfn2 基因的细胞株 HepG2/mfn2,以期为 mfn2 在肝癌发生发展中的作用提供实验动物,现报道如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

肝癌细胞株 HepG2 购自武汉大学中国典型培养物保藏中心;pEGFP-N<sub>2</sub>、TaqDNA 聚合酶、T4DNA 连接酶、限制性内切酶 BamHI 和 EcoRI 等购自华美生物工程公司;mfn2 引物、内参照 β-actin 引物、Trizol RNA 抽提试剂、RPMI1640 培养基、新生牛血清及抗性筛选试剂 G418 等购自美国 Gibco 公司;Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;免疫印迹化学发光试剂、硝酸纤维素膜、mfn2 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司。

### 1.2 重组真核表达质粒 pEGFPmfn2 的构建及检测

根据基因库 (GeneBank) 中 mfn2 序列设计一对特异性引物,并在其 5' 端分别引入 EcoRI 和 BamHI 酶切位点。5'-cg gaattcATGTCCCTGCTCTCTCTC-3';5'-cg ggatec CTATCTGCTGGGCTGCAG-3'。从正常人的肌肉组织中用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法扩增出全长 mfn2 cDNA,约 2274bp。经 BamHI 和 EcoRI 双酶切,目的基因片段 mfn2 和载体 pEGFP-N<sub>2</sub> 片段按 5:1 经 T<sub>4</sub>DNA 连接酶连接;连接产物经转化、扩增后酶切鉴定。采用 ABI 公司 377 型 DNA 自动测序仪进行测序鉴定构建的 pEGFPmfn2。

### 1.3 基因转染及稳定筛选

HepG2 细胞在含 10% 新生牛血清的改良型 RPMI1640 培养基中培养。取  $5 \times 10^5$  个细胞/孔接种 6 孔培养板,37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中过夜培养至 80%~90% 汇合;每孔细胞中加入含 pEGFPmfn2 质粒 4μg/孔及 lipofectamine 2000 10μL/孔的无血清培养基,4h 后更换含血清培养基;48h 后加入 800μg/mL G418 筛选培养;14d 后挑取阳性细胞克隆,扩大培养,并更换含 400μg/mL G418 培养基继续筛选培养。

### 1.4 RT-PCR 检测 mfn2 基因的表达

消化收集转染 4 周细胞,按 Trizol 试剂盒说明提取总 RNA。PCR 引物如前。RT-PCR 检测 mfn2 基因的表达。RT-PCR 产物 25μL 上样琼脂糖凝胶,50V 电泳 30~45min 后照相。

### 1.5 免疫印迹法 (Western-blot) 检测目的蛋白的表达

取 40μg 细胞裂解液与上样缓冲液混合,煮沸 10min 后上样,行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳;电转移法将蛋白转移至 PVDF 膜,甲醇固定,含 5% 脱脂奶粉的封闭液 4℃ 过夜。一抗稀释度为 1:1 000 室温孵育 2h,二抗稀释度为 1:1 000 室温孵育 2h 后,ECL 化学发光试剂盒处理并暗室显影。以 β-actin 为内参照。图像运用 Quantitative one 软件进行分析,用 Mfn2 蛋白条带与 β-actin 条带的积分密度比值来表示其蛋白水平。

## 2 结 果

### 2.1 真核表达质粒 pEGFPmfn2 的成功构建

2.1.1 mfn2 的获得 在相对分子质量约为 2300bp 处有 1 条特异性扩增条带,与阳性对照及预计大小相一致 (图 1)。

2.1.2 酶切鉴定重组表达质粒 重组质粒经 BamHI 和 EcoRI 双酶切,可分别得到 1 条约 2 300bp 的条带和 1 条与 pEGFP-N<sub>2</sub> 空载体 (4.7kb) 一致的条带。表明 mfn2 基因已插入重组表达质粒中 (图 2)。

2.1.3 DNA 测序分析 重组表达质粒中插入的 mfn2 基因序列与已知的模板序列完全一致,即 mfn2 基因完整、准确地克隆入表达载体 pEGFP-N<sub>2</sub> 中,保证了目的蛋白能正确表达。

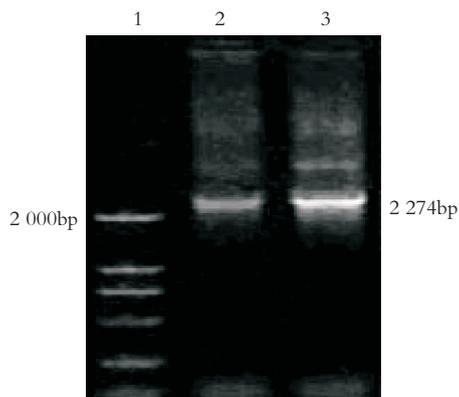


图 1 mfn2 的扩增 1: PCR marker; 2: mfn2 PCR 产物; 3: 阳性对照

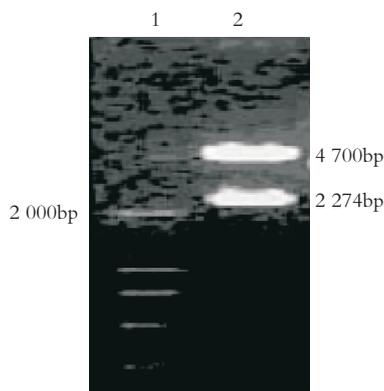


图2 pEGFPmfn2质粒的酶切产物 1: PCR marker; 2: pEGFPmfn2质粒 BamHI 和 EcoRI 双酶切产物

## 2.2 基因转染和阳性细胞克隆筛选

HepG2 筛选浓度通过前期实验确定,加入 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 2d 后可见大量细胞皱缩、变圆、悬浮、死亡,7d 后少量单细胞增殖呈克隆样生长。说明阳性克隆生长的细胞为 pEGFPmfn2 转染成功的肝癌细胞。筛选成功后挑取阳性克隆扩大培养,低浓度 G418 维持。

## 2.3 mfn2 基因的表达

RT-PCR 对转染 mfn2 基因肝癌细胞 mRNA 水平分析,转染 mfn2 基因组可见大小约 2274bp 的条带表达(图3),符合目的基因片段大小。表明转染后细胞可以稳定表达 mfn2 基因。

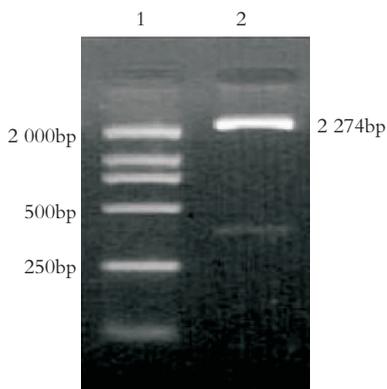


图3 HepG2/mfn2 细胞 mfn2 mRNA 表达水平 1: PCR marker; 2: HepG2/mfn2 细胞 mfn2 mRNA

## 2.4 目的蛋白的表达

Western 印迹法检测转染 pEGFPmfn2 细胞和未转染细胞 Mfn2 蛋白表达水平,以  $\beta$ -actin 为内参照。可见 Mfn2 蛋白在转染细胞中表达,与  $\beta$ -actin 积分密度比值为 0.466,而在未转染细胞中未见表达(图4)。表明转染细胞可较稳定地表达 Mfn2 蛋白。

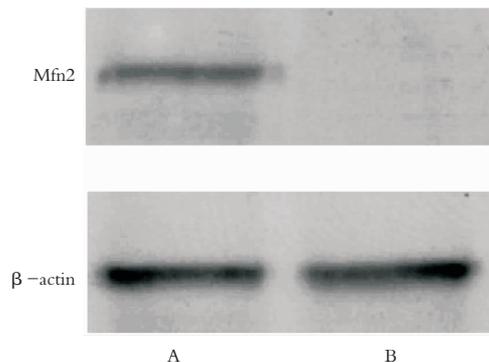


图4 HepG2/mfn2 细胞 Mfn2 蛋白水平表达 A: HepG2/mfn2 细胞; B: 未转染 HepG2 细胞

## 3 讨论

在不同类型或不同生理、病理状态的细胞中,线粒体的大小、形态、数目及排列分布不同。在哺乳动物细胞和酵母中线粒体可以通过融合与分裂之间的平衡调节其自身的大小和形态<sup>[1]</sup>。线粒体融合蛋白(mitofusin, Mfn)在哺乳动物有 Mfn1 和 Mfn2,后者定位于线粒体外膜,对线粒体的融合、形态和功能起着重要的调节作用<sup>[2-4]</sup>。研究发现,Mfn2 与线粒体的能量代谢、膜电位、细胞呼吸等相关<sup>[5]</sup>,而线粒体是细胞能量代谢的场所。mfn2 基因在线粒体的新陈代谢、凋亡和细胞信号等方面发挥重要作用<sup>[6]</sup>。它可通过抑制 Ras-Raf-ERK-MAPK 途径,从而有效地阻遏血管平滑肌细胞周期和抑制细胞增殖,证实其可以明显抑制血管平滑肌细胞的增殖、迁移和重塑<sup>[7]</sup>。mfn2 基因可通过抑制 Bcl-2 蛋白的表达,使 Bax 蛋白表达增多及 Caspase-9 激活,从而活化线粒体凋亡途径促进大鼠血管平滑肌凋亡<sup>[8]</sup>。

mfn2 的同源基因 rHSG 在大鼠组织中睾丸、肝脏、心肌、脑组织中呈高表达,在肾、骨骼肌中较高表达<sup>[9]</sup>。mfn2 基因在正常人的骨骼肌中呈高表达,乳腺组织、肝脏中较高表达,在肝癌组织中低表达。mfn2 基因定位于人的 1 号染色体短臂 36.3 位置上;此区域为多种肿瘤的突变高发区,许多肿瘤患者染色体的这一区带会出现缺失或易位<sup>[10-11]</sup>。因此,笔者设想 mfn2 基因对肿瘤等增殖性疾病可能具有重要抑制增殖的作用;其发挥作用的机制可能与阻遏细胞周期、促进肿瘤细胞凋亡及抑制肿瘤血管增生有关<sup>[12-13]</sup>。

目前对该基因在肿瘤方面的影响及作用机制的研究很少。为了探讨 mfn2 基因对肿瘤细胞的作用及其可能机制,笔者构建了 mfn2 基因的真核

表达载体,通过脂质体介导进行基因转染,并筛选出可稳定表达该基因的阳性细胞克隆,并通过检测验证其为阳性细胞。本文结果为进一步研究该基因在肿瘤细胞系的凋亡和增殖方面的作用,以及其作用的可能机制提供了研究基础,因而对认识肿瘤的发生发展及治疗可能有重要的潜在的意义。

#### 参考文献:

[1] Tondera D, Czauderna F, Paulick K, *et al.* The mitochondrial protein MTP18 contributes to mitochondrial fission in mammalian cells [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118 (14): 3049 - 3059.

[2] Santel A, Fuller MT. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin [J]. *J Cell Sci*, 2001, 114 (5): 867 - 874.

[3] Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, *et al.* Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development [J]. *J Cell Biol*, 2003, 160 (2): 189 - 200.

[4] Ishihara N, Eura Y, Mihara K. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117 (26): 6535 - 6346.

[5] Honda S, Aihara T, Hontani M, *et al.* Mutational analysis of action of mitochondrial fusion factor mitofusin-2 [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118 (14): 3153 - 3161.

[6] Bach D, Pich S, Soriano FX, *et al.* Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278 (19): 17190 - 17197.

[7] Chen KH, Guo X, Ma D, *et al.* Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders [J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6 (9): 872 - 873.

[8] 李俐,王剑明,陈光慧,等. mfn2 基因对大鼠血管平滑肌细胞凋亡的促进作用及其机制 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2007, 36 (1): 57 - 59.

[9] Bach D, Pich S, Soriano FX, *et al.* Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278 (19): 17190 - 17197.

[10] Hofmann WK, Takeuchi S, Xie D, *et al.* Frequent loss of heterozygosity in the region of D1S450 at 1p36.2 in myelodysplastic syndromes [J]. *Leuk Res*, 2001, 25 (10): 855 - 858.

[11] Hogarty MD, Maris JM, White PS, *et al.* Analysis of genomic imprinting at 1p35 - 36 in neuroblastoma [J]. *Med Pediatr Oncol*, 2001, 36 (1): 52 - 55.

[12] 李志红,王志明,穆拉德. 三氧化二砷与阿霉素对人肝癌细胞株 HepG2 中 survivin 表达的影响 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14 (6): 441 - 447.

[13] 黄文广,李杰,王峰,等. 维甲酸诱导肝癌细胞株凋亡及其与 midkine 基因表达关系的研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13 (10): 783 - 785.

## 本刊 2008 年各期重点内容安排

本刊 2008 年各期重点内容安排如下,欢迎赐稿。

第 1 期	肝脏外科及肝肿瘤	第 7 期	肝脏外科及肝移植
第 2 期	胆道外科及胆石症	第 8 期	胆道外科及胆道肿瘤
第 3 期	胰腺外科及胰腺炎	第 9 期	胰腺外科及胰腺肿瘤
第 4 期	胃肠道外科及消化道肿瘤	第 10 期	胃肠道外科及大肠肿瘤
第 5 期	乳腺、甲状腺外科	第 11 期	甲状腺、乳腺外科
第 6 期	血管外科及门静脉高压症外科	第 12 期	微创外科及其他