

文章编号:1005-6947(2006)10-0757-04

· 基础研究 ·

# 能稳定表达外源抑癌基因 PTEN 的胆管癌细胞系 QBC939 的建立

文言广, 汤恢焕, 孙维佳

(中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南长沙 410008)

**摘要:**目的 为研究抑癌基因 PTEN 对胆管癌细胞生物学行为的影响, 建立能稳定表达外源 PTEN 的胆管癌细胞系。方法 将野生型、突变型 PTEN 质粒和空载体质粒分别转化细菌, 提取纯化后, 脂质体介导法转染体外培养的胆管癌细胞系 QBC939; 嘌呤霉素筛选抗性克隆; Western blot 检测标签蛋白 HA 的表达; RT-PCR, Western blot 和免疫细胞化学法分析目的基因 PTEN 的表达。结果 野生型、突变型 PTEN 和空载体转染细胞株均获得嘌呤霉素抗性; 野生型和突变型 PTEN 转染细胞株均检测到 HA 的表达, 而空载体转染细胞株和未转染细胞株均未检测到 HA 的表达; 野生型及突变型 PTEN 转染细胞株中目的基因 PTEN 在 mRNA 和蛋白质表达水平上均较空载体转染细胞株和未转染细胞株增强。结论 成功构建了分别能稳定表达外源野生型 PTEN, 突变型 PTEN 或空载体 pBP 的胆管癌细胞系。

**关键词:**胆管肿瘤/遗传学; 抑癌基因 PTEN; 肿瘤细胞, 培养的

**中图分类号:** R735.8; R73-351

**文献标识码:** A

## Establishment of cholangiocarcinoma QBC939 cell lines stably expressing the tumor suppressor gene PTEN

WEN Yan-guang, TANG Hui-huan, SUN Wei-jia

(Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

**Abstract: Objective** To establish cholangiocarcinoma cell lines that could stably express exogenous tumor suppressor gene PTEN in order to study its effects on the biological behavior of cholangiocarcinoma cell lines.

**Methods** Three different plasmids including a wild type PTEN, a mutant type PTEN or an empty pBP plasmid were prepared by transformation of bacterium and purification of plasmids. Then three plasmids were separately transferred into cholangiocarcinoma cell line QBC939 cultured in vitro by using lipofectamine. After transfection, cells were selected by puromycin and the positive cell clones were chosen. The expression of the HA-tag protein was detected by Western blot. The expression of the tumor suppressor gene PTEN was separately determined by RT-PCR, Western blot and immunocytochemical staining. **Results** All of the cell lines transfected by wild-type PTEN, mutant-type PTEN or empty plasmid acquired resistance to puromycin; HA-tag protein was detected by Western blot in cell lines transfected by wild type or mutant type PTEN, whereas, it did not show in cell lines un-transfected or transfected by an empty vector. RT-PCR, Western blot and immunocytochemical staining showed respectively that the tumor suppressor gene PTEN was expressed higher in cell lines transfected by wild type or mutant type PTEN than in cell lines un-transfected or transfected by an empty vector, both on mRNA level and on protein level. **Conclusions** Successful establishment of cholangiocarcinoma cells that could stably express the exogenous gene wild-type PTEN, mutant-type PTEN or empty plasmid pBP respectively was obtained.

**Key words:** Bile Duct Neoplasms/gene; Tumor Suppressor Gene PTEN; Tumor Cells, Cultured

**CLC number:** R735.8; R73-351

**Document code:** A

收稿日期:2005-04-25; 修订日期:2006-08-22。

作者简介:文言广,男,湖南邵阳人,中南大学湘雅医院博士研究生,主要从事肝胆胰肿瘤方面的研究。

通讯作者:文言广 E-mail:lancet9028@163.com。

PTEN ( phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 ) 是 1997 年在人类染色体 10q23 发现的一种抑癌基因<sup>[1]</sup>; 在诸如神经胶质瘤、子宫内膜癌、黑色素瘤等多种肿瘤中 PTEN 频繁发生突变; 外源野生型 PTEN 转染能显著抑制这些肿瘤细胞的生长增殖<sup>[2]</sup>。本实验旨在构建能够稳定表达外源 PTEN 的胆管癌细胞系, 以研究 PTEN 对胆管癌细胞生物学行为的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

编码人类野生型 PTEN 的真核表达质粒、突变型 PTEN 质粒及空载体质粒 pBP 均由美国加州大学 Ludwig 癌症研究所 Furnari 教授惠赠; 3 种质粒均携有氨苄和嘌呤霉素 ( puromycin ) 抗性基因, 野生型和突变型 PTEN 质粒携有流感血凝素标签 ( HA ), 突变型 PTEN 在磷酸酯酶催化活性域的 129 位氨基酸的点突变 G-129R ( 甘氨酸 → 精氨酸 ) 致其失去磷酸酯酶活性。JM109 为我室保存菌种, 质粒小量和中量抽提试剂盒分别购自 Promega 公司和 Omega 公司; 人胆管癌细胞系 QBC939 由第三军医大学西南医院王曙光教授建系提供; Lipofactamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司; 嘌呤霉素购自美国 Cloneteck 公司; RT-PCR 试剂盒、PTEN 引物 ( 上游 5'-GTAAG-GACCAGAGACAAAAG-3', 下游 5'-CTTTTITAGCA TCTTGTCTG-3', PCR 产物全长 329 bp ) 和  $\beta$ -actin 引物 ( 上游 5'-TGACGGTCAGGTCATCACTATCGGCAATGA-3 下游 5'-TTGATCTTCATGGGAGCGAGGGCA -3', PCR 产物全长 260 bp ) 购自大连宝生物公司; 小鼠抗人 PTEN 单克隆抗体和小鼠抗 HA 单克隆抗体分别购自美国 Santa Cruz 和 Zymed 公司; UltraSensitive S-P 免疫组化试剂盒购自福建迈新公司。

### 1.2 方法

1.2.1 质粒的制备和酶切鉴定 根据质粒类型, 质粒的制备实验分为 3 组: 野生型 PTEN 质粒组、突变型 PTEN 质粒组、空载体 pBP 质粒组。质粒转化和酶切鉴定参照姜泊等推荐的方法进行<sup>[3]</sup>; 质粒小量和中量抽提分别按试剂盒说明操作。

1.2.2 基因转染和转染克隆的筛选 根据转染质粒类型, 实验分为 4 组: 野生型 PTEN 转染细胞

组、突变型 PTEN 转染细胞组、空载体转染细胞组、未转染细胞组。

(1) 细胞培养 QBC939 细胞用含 100 U/mL 青霉素、链霉素及 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 完全培养基于 37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度的培养箱中培养, 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

(2) 确定嘌呤霉素筛选浓度 按  $5 \times 10^5$  / 孔接种 QBC939 细胞于 6 孔板中, 待细胞接近融合时, 分别加入含嘌呤霉素浓度为 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 / mL 的 RPMI 1640 培养基, 每种浓度 3 个复孔, 2 d 换液 1 次, 以 7 d 内 3 孔细胞全部死亡的最低浓度为嘌呤霉素筛选浓度。

(3) 脂质体介导的基因转染 按  $1 \times 10^6$  / 孔接种 QBC939 细胞于 6 孔板中, 在无双抗无血清的 RPMI 1640 培养基中培养, 待细胞汇率达到 90% 左右开始转染。转染方法参照 Lipofactamine 2000 试剂说明的方法进行。

(4) 稳定转染克隆的筛选、转移和扩增 换用含 2.0  $\mu$ g/mL 嘌呤霉素的选择性培养基培养, 以未加转染液的 QBC939 细胞为对照, 每 2 ~ 3 d 换液。待对照组细胞完全死亡, 嘌呤霉素浓度减半为 1.0  $\mu$ g/mL。抗性克隆增大后滤纸片法转移和扩增培养细胞。

#### 1.2.3 稳定转染细胞系的鉴定

(1) 嘌呤霉素抗性实验 取各克隆扩增后细胞, 以未转染的 QBC939 细胞为对照, 按  $5 \times 10^5$  / 孔接种 6 孔板, 待细胞接近融合时, 提高嘌呤霉素浓度为 2.0  $\mu$ g/mL, 观察细胞对嘌呤霉素的抵抗性。

(2) 逆转录 - 多聚酶链反应 ( RT-PCR ) 检测 PTEN mRNA 表达 TRIzol 法提取总 RNA。以  $\beta$ -actin 为内对照, 按 RT-PCR 试剂盒说明进行 RT 反应和 PCR 反应。RT 反应条件和步骤: 42℃ 30 min, 99℃ 5 min, 5℃ 5 min。PCR 反应条件和步骤: 94℃ 2 min, 94℃ 30 s, 53℃ 30 s, 72℃ 60 s, 共 35 个循环。

(3) Western blot 检测 HA 和 PTEN 蛋白的表达 提取细胞总蛋白质, 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶 ( SDS-PAGE ) 电泳, 再电转膜、免疫印迹与显色。一抗 ( 抗 - PTEN 或抗 - HA ) 稀释度为 1: 1000。

(4) 免疫细胞化学检测 PTEN 蛋白的表达 采用超敏 SP 法, 按试剂盒说明操作。一抗 ( 抗 -

PTEN)工作浓度为 1:50。结果判断:PTEN 蛋白阳性表达红色颗粒定位于胞浆。按胞浆显色深度分为:强阳性反应(++),胞浆呈深红色;弱阳性反应(+),胞浆呈淡红色;阴性反应(-),胞浆无红色染色。

## 2 结果

### 2.1 质粒的制备和酶切鉴定

小量抽提 3 种质粒后以限制性内切酶 EcoR I 和 Nco I 分别酶切。酶切产物经凝胶电泳,显示产物片段与预期相符合(图 1),即为本实验所需之质粒。

M: 100bp DNA 分子量标准

- |                         |                  |
|-------------------------|------------------|
| 1: EcoR I 酶切野生型 PTEN 质粒 | 产物 1209bp 5.1 kb |
| 2: EcoR I 酶切突变型 PTEN 质粒 | 产物 1209bp 5.1 kb |
| 3: EcoR I 酶切空载体 pBP 质粒  | 产物 5.1 kp        |
| 4: Nco I 酶切野生型 PTEN 质粒  | 产物 6.0kb 389 bp  |
| 5: Nco I 酶切突变型 PTEN 质粒  | 产物 6.0kb 389 bp  |
| 6: Nco I 酶切空载体 pBP 质粒   | 产物 5.1 kp        |

图 1 野生型 PTEN、突变型 PTEN 和空载体 pBP 质粒 EcoR I 和 Nco I 酶切图

### 2.2 基因转染和转染克隆的筛选

QBC939 对嘌呤霉素敏感。7d 内 2.0 μg/mL 及

以上浓度培养孔中均未见存活细胞,1.0 μg/mL 浓度的孔中尚有 2 孔中有存活细胞,1.0 μg/mL 以下浓度的孔中均见较多的活细胞。据此确定嘌呤霉素浓度 2.0 μg/mL 作为细胞稳定转染的筛选浓度。未加转染液的对照组细胞,在含 2.0 μg/mL 的嘌呤霉素的选择性培养基培养下,约 7d 左右细胞完全死亡。此时换用含 1.0 μg/mL 嘌呤霉素的选择性培养基继续培养,可见转染组于 2 周左右出现抗性克隆。观察克隆生长,发现野生型 PTEN 转染细胞克隆较突变型 PTEN 转染克隆和空载体转染克隆生长缓慢,而克隆细胞的形态无明显差别。

### 2.3 稳定转染细胞系的鉴定

嘌呤霉素抗性实验显示未转染组细胞在 2 μg/mL 浓度的嘌呤霉素作用下,第 2 天大量细胞死亡,而各转染组细胞均生长良好。Western blot 检测到野生型 PTEN 转染细胞、突变型 PTEN 转染细胞均有 HA 标签蛋白的表达,而空载体转染细胞和未转染细胞未检测到 HA 蛋白的表达(图 2)。RT-PCR 检测到野生型 PTEN 转染细胞、突变型 PTEN 转染组细胞中目的基因 PTEN 在 mRNA 水平表达明显上调(图 3)。Western blot 检测到野生型 PTEN 转染细胞、突变型 PTEN 转染细胞中 PTEN 蛋白表达水平较空载体转染和未转染细胞明显上调(图 2)。免疫细胞化学也检测到野生型 PTEN 和突变型 PTEN 转染细胞中 PTEN 蛋白表达明显增强,呈强阳性表达;而空载体转染细胞和未转染细胞染色呈弱阳性表达(图 4)。

M: 100bp DNA Ladder Maker; 1: 野生型 PTEN 转染细胞; 2: 突变型 PTEN 转染细胞; 3: 空载体转染细胞; 4: 未转染

QBC939 细胞

图 2 Western blot 检测 4 种胆管癌细胞中 HA, PTEN 蛋白的表达

图 3 RT-PCR 检测 4 种胆管癌细胞中 PTEN mRNA 的表达

a:野生型 PTEN 转染细胞表达强阳性; b:突变型 PTEN 转染细胞表达强阳性; c:空载体转染细胞表达强阳性; d:未转染 QBC939 细胞表达强阳性

图4 免疫细胞化学检测4种胆管瘤细胞中PTEN蛋白的表达( $\times 100$ )

### 3 讨论

胆管癌预后很差,5年生存率仅约10%,中位生存时间仅1.5年<sup>[4]</sup>。由于其所处的特殊解剖位置及其具有易向周围组织浸润等特点,仅有不到10%的早期病例适宜根治性手术,放疗和/或化疗对延长生命改善预后的作用十分有限<sup>[5]</sup>。因此,急需探索新的治疗方法以提高疗效。基因治疗为胆管癌的治疗开辟了新的前景。由于大部分胆管癌可通过内镜或经皮经肝途径触及;而且,由于胆道系统是一个相对封闭隔离的腔道,有利于基因载体的弥散,并有利于减轻可能的毒性反应<sup>[5]</sup>。因此胆管癌适合施行局部基因治疗。抑癌基因治疗是基因治疗肿瘤的一个重要策略。PTEN是一种具有双特异性磷酸酶活性的强有力的抑癌基因。已发现PTEN在多种肿瘤中频繁发生突变,Mutter<sup>[6]</sup>统计约有17%~70%的脑胶质瘤,34%~84%的子宫内膜癌,6%~45%的卵巢癌,15%~18%的乳腺癌,32%~33%的恶性黑色素瘤,17%~41%的前列腺癌,37%的甲状腺癌存在PTEN的突变或缺失。PTEN蛋白在许多肿瘤中表达也降低,而且往往比基因的改变更为频繁。文献报道<sup>[1]</sup>有66%的胶质母细胞瘤,61%的子宫内膜癌,24%的非小细胞癌,38%的乳腺癌,27%的卵巢癌,20%的前列腺癌,17%~41%的结直肠癌发现PTEN蛋白表达降低。笔者在前期的研究中,应用免疫组化法检测发现PTEN在胆管癌中的表达明显低于正常胆管组织和胆管癌旁组织,并且其表达与胆管癌的分化程度及有无转移相关。谷化平等也有类似的发现<sup>[8]</sup>。这些事实说明PTEN可能在胆管癌的发生发展中起着重要作用,有可能成为胆管癌基因治疗的新靶点。本实验采用目前常用且转染效率较高的脂质体介导法转染QBC939细胞,发现野生型PTEN转染克隆较突变型PTEN转染克隆和空载体pBP转染克隆生长缓慢,提示

野生型PTEN的转染可能抑制胆管癌细胞的生长。嘌呤霉素抗性实验证实3种转染细胞株均已获得嘌呤霉素抗性,间接证明转染细胞已获得外源基因的表达。Western blot检测结果显示在野生型和突变型PTEN转染细胞株中均有HA蛋白的表达,而在空载体pBP转染细胞株和未转染细胞株则未检测到HA蛋白的表达,进一步说明外源基因已获得成功转染。本实验还应用RT-PCR,Western blot和免疫细胞化学法分别从mRNA和蛋白质表达水平直接证明了外源目的基因PTEN在野生型和突变型PTEN转染细胞株中成功得以表达。综合以上结果证明本实验已成功建立能稳定表达外源野生型PTEN、突变型PTEN或空载体pBP的胆管癌细胞株,为研究抑癌基因PTEN及其磷酸酯酶活性对胆管癌细胞生物学行为的影响及其机制提供了实验模型,也为胆管癌的抑癌基因治疗奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Li J, Yen C, Liaw D, *et al.* PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer[J]. *Science*. 1997,275(5308):1943-1947.
- [2] Cantley LC, Neel BG. New insights into tumour suppression: PTEN suppresses tumour formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999,96(8):4240-4245.
- [3] 姜泊,张亚力,周店元. 分子生物学常用实验操作[M]. 北京:人民军医出版社,1996:1-23.
- [4] Kennedy A, Darwin P, Bonheur JL. Cholangiocarcinoma[J]. *eMedicine Journal*. 2001,2.
- [5] Nagi P, Vickers SM, Davydova J, *et al.* Development of a therapeutic adenoviral vector for cholangiocarcinoma combining tumor-restricted gene expression and infectivity enhancement[J]. *J Gastrointest Surg*, 2003,7(3):364-371.
- [6] Mutter GL. PTEN, a protean tumor suppressor[J]. *Am J Pathol*, 2001,156(6):1895-1898.
- [7] Ramon Parsons. Human cancer, PTEN and the PI-3 kinase pathway[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2004,15(2):171-176.
- [8] 谷化平,尚培中,周翠玲. 胆管癌中PTEN和P16抑癌基因蛋白的表达及其临床意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2004,13(2):101-103.