

稳定表达 Trop-2 基因的 NIH3T3 细胞系的构建和特性分析

刘 玉¹, 唐小军², 曹 清², 丁贵鹏², 张慧林², 王 欢², 郑 峰¹, 徐凛锋^{2*}, 林 红^{3*}

(¹南京军区军事医学研究所, 江苏 南京 210002; ²南京医科大学卫生部抗体技术重点实验室, 江苏 南京 210029; ³江苏省血液中心, 江苏 南京 210006)

[摘要] 目的: 建立稳定表达人滋养层细胞表面抗原(Trop-2)NIH3T3 细胞, 分析过表达 Trop-2 对 NIH3T3 细胞的生长、增殖和侵袭特性的影响。方法: 将 Trop-2 基因克隆到真核表达载体 pcDNA3.1, 转染 NIH3T3 细胞, 通过 G418 筛选及 RT-PCR 鉴定获得稳定表达 Trop-2 的 NIH3T3 细胞(NIH3T3-Trop-2)。用 MTS 法检测 NIH3T3-Trop-2 细胞的增殖能力, 软琼脂集落形成实验检测 NIH3T3-Trop-2 细胞的克隆形成能力, 明胶酶谱法检测 NIH3T3-Trop-2 细胞的基质金属蛋白酶(MMP)-2 和 MMP-9 的分泌及细胞划痕实验检测 NIH3T3-Trop-2 细胞的迁移能力。结果: 稳定表达 Trop-2 的 NIH3T3 细胞在生长增殖、克隆形成及侵袭能力均较 NIH3T3 细胞强, 细胞培养上清中的 MMP-2 和 MMP-9 增多。结论: Trop-2 对细胞的增殖与迁移能力具有明显的促进作用。

[关键词] Trop-2; NIH3T3; 真核表达; 增殖与迁移

[中图分类号] R392.12

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)07-867-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20130702

Construction and characterization of Trop-2 stable expression in NIH3T3 cells

Liu Yu¹, Tang Xiaojun², Cao Qing², Ding Guipeng², Zhang Huilin², Wang Huan², Zheng Feng¹, Xu Linfeng^{2*}, Lin Hong^{3*}

(¹Huadong Medical Institute of Biotechniques, Nanjing 210002; ²Key Laboratory of Antibody Technique of Ministry of Health, NJMU, Nanjing 210029; ³Jiangsu Blood Center, Nanjing 210006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an NIH3T3 cell line to stable express human Trop-2 gene, and analysis the affection of Trop-2 on proliferation, migration and aggressiveness of NIH3T3-Trop-2 cell. **Methods:** The human Trop-2 gene was cloned into eukaryotic expression system pcDNA3.1 and transfected into NIH3T3 cells. The Trop-2 stable expression cells were selected by G418 and confirmed by RT-PCR. The cell proliferation, migration and aggressiveness were detected by MTS and wound healing assay, MMP-2/MMP-9 was analyzed. **Results:** The proliferation of NIN3T3-Trop-2 was higher than NIN3T3 cell. The wound healing assay results showed and that Trop-2 improved the cell migration, increased the number of foci generated ($P < 0.05$) and increased MMP-9 expression ($P < 0.05$) when compared to the NIH3T3 control group. **Conclusion:** These show that human Trop-2 is sufficient to improve the cell proliferation and induce the transformation of NIH3T3 cells.

[Key words] Trop-2; NIH3T3; eukaryotic expression; proliferation and migration

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(7): 867-872]

人滋养层细胞表面抗原(human trophoblast cell surface antigen, Trop-2), 又称 GA733-1, EP1, M1S1, TACSTD2, 是一种细胞表面糖蛋白。Trop-2 在早期胚

胎发育的胎盘滋养层细胞表面, 在正常人体细胞组织很少表达, 但在人滋养层细胞和上皮细胞癌组织中(包括乳腺癌、直肠癌、肺癌和前列腺癌等)高表达。研究表明, Trop-2 是一种细胞表面钙调信号蛋白, 调节细胞内的钙信号转导^[1]。Alberti 等^[2]指出 Trop-2 是人肿瘤生长和转移的主要决定因素, 使 Trop-2 成为引人注目的肿瘤治疗的新靶向。本研究构建了 Trop-2 真核表达载体 pcDNA/Trop-2, 通过转

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81101704); 南京市科技局(201201090)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xulinfeng@medmail.com.cn, linhong712003@yahoo.com.cn

染及筛选获得稳定表达 Trop-2 的 NIH3T3 细胞;对表达 Trop-2 的 NIH3T3 细胞进行生物学特性的研究,了解 Trop-2 对细胞增殖、克隆形成能力和侵袭的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

TRIzol[®]、RT-PCR、蛋白质浓度测定等试剂盒(美国 Invitrogen 公司)。胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒(美国 Qiagen 公司)。G418 和 FuGENE[®] 6(美国 Roche 公司)。小牛血清(美国 Invitrogen 公司)。DMEM 培养基(美国 Gibico 公司)。羊抗人 Trop-2 多克隆抗体和鼠抗羊 IgG 抗体(美国 Sigma 公司)。MTS 检测试剂盒(美国 Promega 公司);大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 、质粒 pCDNA3.1 和 NIH3T3 细胞为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 真核表达质粒 pcDNA3.1-Trop-2 的构建

根据 GenBank 中 Trop-2 基因序列(NM_002353.2)设计引物,引物序列如下:P1:5'-GCAA-GCTTCCACCATGGCTCGGGCCCCGGCCTCGCGCC-3';P2:5'-AGCTCGAGCAAGCTCGGTTCTTCTCA-ACTCCC-3',由上海 Invitrogen 公司合成。

用 TRIzol[®] 从胰腺癌细胞系 PL45 中提取总 RNA,按照 RT-PCR 试剂盒说明将 mRNA 逆转录为 cDNA,用以上设计的 Trop-2 的引物扩增 Trop-2 基因。将扩增的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳回收、DNA 胶纯化试剂盒纯化后,与 T 克隆载体连接,经蓝白斑筛选,阳性克隆经 PCR 鉴定后,由上海 Invitrogen 公司测定 DNA 序列。选取经 DNA 序列测定和 Blast 比对分析正确的阳性克隆 DNA,用限制性内切酶 *Xho* I、*Hind* III 消化处理并经琼脂糖凝胶电泳、DNA 胶纯化试剂盒纯化目的基因片段,与经相同酶切处理、纯化的表达载体 pcDNA3.1 相连接,转化感受态大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 扩增阳性克隆并保存。经 PCR 扩增和酶切鉴定后,制备阳性重组载体 pcDNA3.1-Trop-2 用于 NIH3T3 细胞的转染。

1.2.2 稳定表达 Trop-2 的 NIH3T3 细胞的筛选

NIH3T3 细胞培养于含 10%FBS 和 100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养液中,在 37 $^{\circ}$ C,含 5% CO₂ 湿度饱和的培养箱中培养。将 NIH3T3 细胞消化后以 4 \times 10⁴ 个/ml,接种到 6 孔板内,每孔 2 ml,培养 24 h 后,按照 FuGENE[®]6 操作说明将 pcDNA3.1-Trop-2 质粒及 pcDNA3.1 质粒

转染到 NIH3T3 细胞内。48 h 后加入浓度为 500 μ g/ml G418 进行筛选,每隔 2~3 d 更换含有 500 μ g/ml G418 的新鲜培养基,10 d 后将 G418 浓度调整为 300 μ g/ml,继续培养,待克隆长到足够大小时,采用局部消化挑取 10~20 个克隆于 96 孔板继续培养,待细胞长满后依次传代到 24 孔板、6 孔板及 T25 细胞瓶内。

1.2.3 RT-PCR 检测 Trop-2 的表达

提取通过 G418 筛选获得的细胞克隆的 RNA,采用 RT-PCR 检测 Trop-2 的表达(方法同前),以 GAPDH 作为内参。检测 Trop-2 表达的引物:P3:5'-GCTGCGGCTGCCGCTGCT-3',P4:5'-GGCGCGCCT-TGAAGCGG-3';GAPDH 的引物:5'-CCA-GGTGGTC-TCCTCTGACTT-3',5'-GTTGCTGTAGCCAAATTCGT-TGT-3'。PCR 反应体系为 50 μ l,反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min 后,94 $^{\circ}$ C 50 s,56 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 60 s 共 35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。目的条带大小为 300 bp 左右。选择 Trop-2 表达最高的克隆,进一步用于细胞生物学特性的研究。

1.2.4 表达 Trop-2 的 NIH3T3 细胞生物学特性研究

1.2.4.1 MTS 法绘制生长曲线

取对数生长期的细胞,胰酶消化后制成单细胞悬液,以每孔 2 \times 10³ 个细胞接种于 96 孔板培养,每组设 15 个复孔。每 12 h 取 3 列复孔,换新鲜培养基 100 μ l 后,每孔加入 20 μ l MTS 和 PMS 的混合物(MTS:PMS=4:1),孵育 1 h 后在酶标仪上读取 3 个复孔的值,计算平均值,以时间为横坐标、*D*(492 nm)为纵坐标作图,并进行相关分析。

1.2.4.2 细胞迁移试验

将处于对数生长期的 NIH3T3 和稳定表达 Trop-2 的 NIH3T3 细胞接种于 24 孔培养板中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中培养。待细胞覆盖孔底 80% 以上时,在单层细胞表面用 200 μ l 枪头在孔中划一直线后,用 PBS 漂洗 2 次以去除划下的悬浮细胞,加入培养基继续培养 24 h;倒置显微镜下观察划痕中细胞迁移情况。

1.2.4.3 软琼脂克隆形成实验

24 孔板每孔底层铺设 0.6% 琼脂,取对数生长期细胞用胰酶消化后调整细胞密度至 1 \times 10³ 个/ml,与一定量的琼脂混匀后形成上层 0.3% 琼脂培养基,加入 24 孔板中。调整细胞数分别为每孔 25、50 和 100 个细胞的梯度密度。24 孔板置于 CO₂ 孵箱,37 $^{\circ}$ C 培养 2~3 周后镜下计数直径 > 75 μ m 或含 50 个细

胞以上的克隆,并计算克隆形成率。

1.2.4.4 明胶酶谱法检基质金属蛋白酶(MMP)-2 和 MMP-9 的表达

在 6 孔板中铺细胞 1×10^5 个/孔,无血清培养基培养 24 h 后,收集上清用于检测细胞中 MMP-2 和 MMP-9 的分泌。14 μ l 上清与 $2 \times$ 上样缓冲液混合后,离心后加样,8%SDS-PAGE 胶(含明胶 1 mg/ml)电泳。电泳结束后,将凝胶置于洗脱液(2.5% Triton X-100,50 mmol/L Tris-HCl,5 mmol/L CaCl_2 , pH7.6)中振荡洗脱 2 次,每次 40 min,然后用漂洗液(除不含 Triton X-100 外其余同洗脱液)漂洗 2 次,每次 20 min,接着,将凝胶置于孵育液(50 mmol/L Tris-HCl,5 mmol/L CaCl_2 ,0.02% Brij-35, pH7.6)中 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 42 h。孵育结束后经染色液(0.05% 考马斯亮蓝,30%甲醇、10%乙酸)染色 3 h,及脱色液 A、B、C(甲醇浓度分别为 30%、20%、10%,乙酸浓度分别为 10%、10%、5%)分别脱色 0.5、1.0、2.0 h 后,显示出 MMP-2(72 000)和 MMP-9(92 000)为位于蓝色背景上的透亮带,用凝胶图像分析系统分析读取条带面积、宽度和灰度值。

1.3 统计学方法

测量所得的吸光度值运用 SPSS17.0 统计软件进行统计处理,方差分析检验试验结果。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 真核表达载体 pcDNA3.1-Trop-2 的构建

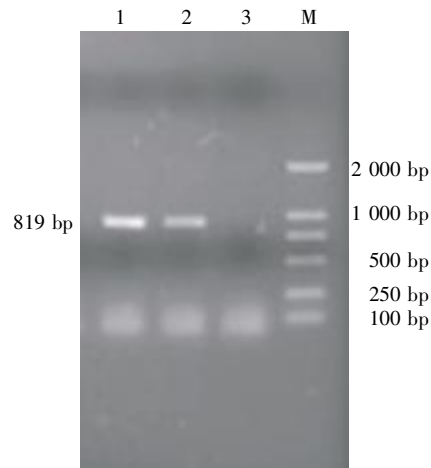
提取胰腺癌细胞 PL45 的总 RNA,经逆转录试剂盒逆转录成 cDNA。以该 cDNA 为模板,用 Trop-2 特异性引物扩增出 Trop-2(图 1)。扩增片段经琼脂糖凝胶电泳回收后通过 *Hind* III 和 *Xho* I 进行双酶切,连接到真核表达载体 pcDNA3.1 中,构建的克隆经 *Hind* III 和 *Xho* I 能够释放 Trop-2 的目的条带(图 2),测序结果与 GenBank 中对应的序列相一致。

2.2 稳定表达 Trop-2 的 NIH3T3 细胞株筛选

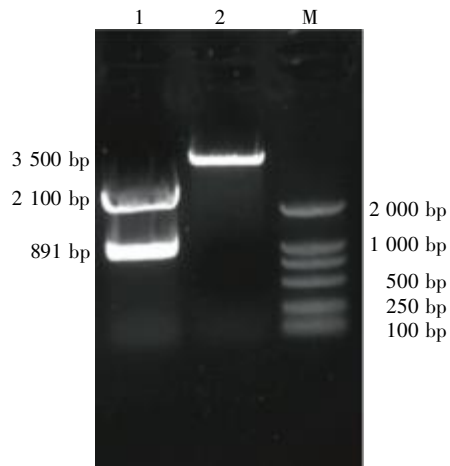
将 pcDNA3.1-Trop-2 转染到 NIH3T3 细胞后,经浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 进行筛选后,局部消化挑取了 10 个克隆,逐步放大培养后,提取总 RNA,用 RT-PCR 鉴定结果表明,有 4 个能够检测到 NIH3T3 的表达(图 3)。将 Trop-2 表达量最高的 2 号克隆命名为 NIH3T3-Trop-2。

2.3 Trop-2 对 NIH3T3 的细胞增殖的影响

将 NIH3T3-Trop-2 和 NIH3T3 细胞以 1×10^4 个/ml 的密度接种到 96 孔板,待细胞贴壁后,开始进行



1: 阳性对照;2:Trop-2 基因;3:阴性对照;M:DNA Marker(DL2000)。
图 1 经 RT-PCR 从胰腺癌细胞 PL45 中扩增出 Trop-2 基因
Figure 1 Amplification of Trop-2 in pancreatic cancer cells PL45 by RT-PCR



1:T-Trop-2 载体双酶切;2:pcDNA3.1 载体的双酶切;M:DNA Marker(DL2000)。
图 2 构建的 pcDNA3.1 和 T-Trop-2 载体经 *Hind* III 和 *Xho* I 酶切鉴定
Figure 2 Double digestion of pcDNA3.1 and T-Trop-2 vector with *Hind* III and *Xho* I



1~10:10 个克隆的 pcDNA3.1-Trop-2;M:DNA Marker。
图 3 RT-PCR 检测不同克隆中 Trop-2 的表达
Figure 3 The detection of Trop-2 expression in different clones by RT-PCR

MTS实验。每隔12 h检测3孔,测定吸光度值。结果表明,与NIH3T3细胞相比,NIH3T3-Trop-2细胞在培养到36 h($P < 0.05$),48 h($P < 0.05$),60 h($P < 0.05$)和72 h($P < 0.01$)的差异均具有统计学意义(图4)。

2.4 Trop-2对NIH3T3细胞迁移能力的影响

细胞划痕实验结果(图5)表明,表达Trop-2的NIH3T3细胞较NIH3T3细胞迁移能力明显增强。经显微拍照及用图像处理软件Image J分析后发现,12 h后表达Trop-2的NIH3T3细胞的划痕是NIH3T3

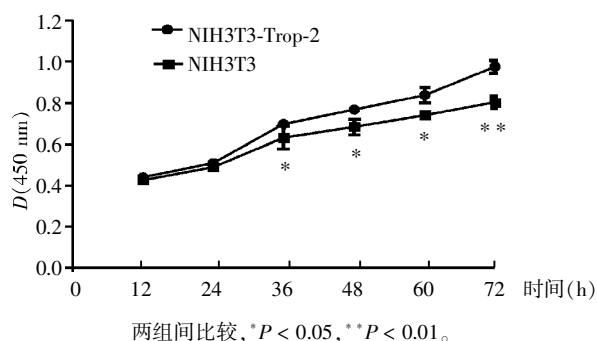


图4 NIH3T3-Trop2和NIH3T3细胞增殖的检测
Figure 4 The proliferation assay of NIH3T3-Trop2 and NIH3T3

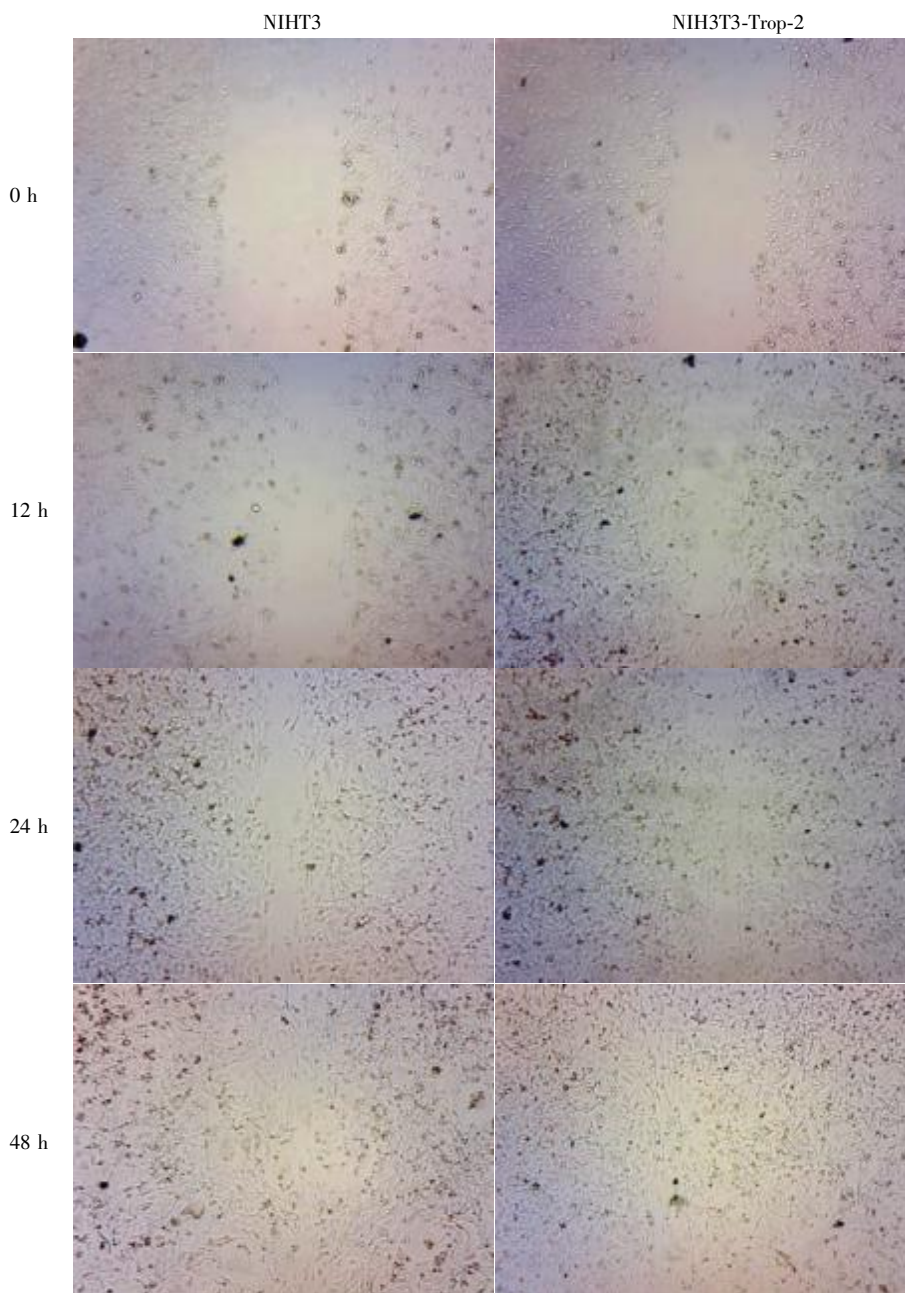


图5 细胞划痕试验(×100)
Figure 5 Cell scratch assay(×100)

细胞的 92%;24 h 后表达 Trop-2 的 NIH3T3 细胞的划痕是 NIH3T3 细胞的 56%;48 h 后表达 Trop-2 的 NIH3T3 细胞的划痕是 NIH3T3 细胞的 13%。

2.5 Trop-2 对 NIH3T3 细胞克隆形成能力的影响

克隆形成实验表明表达 Trop-2 的 NIH3T3 细胞克隆形成能力明显强于 NIH3T3 细胞。将细胞克隆经结晶紫染色后,进行细胞克隆计数,表达 Trop-2 的 NIH3T3 细胞平均形成的克隆数为(248 ± 26)个,而 NIH3T3 细胞平均形成的克隆数仅为(186 ± 21)个,经方差检验表明,两组细胞形成的克隆数有显著差异($P < 0.05$)。

2.6 Trop-2 对细胞中 MMP-2 和 MMP-9 活性影响

明胶酶谱法检测结果(图 6)表明,表达 Trop-2 的 NIH3T3 细胞分泌 MMP-9 活性能力高于 NIH3T3 细胞,而 MMP-2 的分泌量变化不明显。经 Image J 软件分析表明,NIH3T3-Trop-2 细胞的 MMP-9 活性是 NIH3T3 细胞的 1.8 倍($P < 0.05$)。

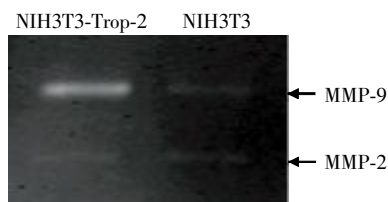


图 6 明胶酶谱法检测 MMP-2 和 MMP-9 的分泌

Figure 6 Detection of secretion of MMP-2 and MMP-9 by gelatin zymography assay

3 讨论

Trop-2 首次由 Lipinski 等^[3]在研究人滋养层细胞单克隆抗体时发现并命名的,其后又被不同的研究人员根据不同的抗体识别后重新命名,所以有不同的名称,现在已知它们都是由 TACSTD2 编码的含 323 个氨基酸的蛋白。TACSTD2 基因定位于染色体 1p32-p31,全长约 1.8 kb,由 6 个外显子构成,无内含子^[4],与现在研究较多的 EpCAM(又叫 Trop-1)同源^[5]。Trop-2 在人早期胚胎滋养层细胞表面和眼角膜等上皮组织表达,基因突变会导致眼角膜胶滴状营养不良,严重时会导致失明^[6]。已有的研究表明,在小鼠肺的胚胎发育过程中上调^[7],在斑马鱼的侧线形成过程中起作用^[8]。近几年的免疫组化分析结果显示,Trop-2 在乳腺癌^[9]、卵巢癌^[10]、胰腺癌^[11]、鳞状上皮口腔癌^[12]、胃癌^[13]和结肠癌^[14]中高表达,并被称为“唯一的肿瘤预后标记物”。Wang 等^[15]的研究发现,Trop-2 有致癌性,促进细胞的生长和黏附。

本研究通过将 Trop-2 基因转染 NIH3T3 细胞,

研究 Trop-2 基因的功能。成功转染的 NIH3T3-Trop-2 细胞与 NIH3T3 细胞相比,细胞特性发生了变化。细胞生长实验的结果显示 NIH3T3-Trop-2 的增殖能力增强;细胞划痕实验显示 NIH3T3-Trop-2 的迁移能力明显提高;明胶酶谱实验结果显示 MMP-9 的分泌增加,但 MMP-2 的分泌未明显改变,这说明 NIH3T3-Trop-2 侵袭转移能力提高的可能潜在机制。这些结果表明,Trop-2 能够促进细胞的增殖、迁移和侵袭。

目前对 Trop-2 及其基因的研究还有很多不明确的地方,比如它的配体尚未鉴定,它是通过何种机制调控细胞,以及对其上游信号的转导通路和下游转录调控的直接靶点都有待进一步研究。本实验通过转染正常的 NIH3T3 细胞发现,转染后的细胞生长速度明显高于未转染细胞,进一步证明 Trop-2 促进细胞的生长。制备的表达膜型 Trop-2 的转染细胞提供了对 Trop-2 分子结构和功能研究所必须的工具。

[参考文献]

- [1] Alberti S, Miotti S, Stella M, et al. Biochemical characterization of Trop-2, a cell surface molecule expressed by human carcinomas; formal proof that the monoclonal antibodies T16 and MOv-16 recognize Trop-2[J]. *Hybridoma*, 1992, 11(5):539-545
- [2] Ripani E, Sacchetti A, Corda D, et al. Human Trop-2 is a tumor-associated calcium signal transducer [J]. *Int J Cancer*, 1998, 76(5):671-676
- [3] Lipinski M, Parks DR, Rouse RV, et al. Human trophoblast cell-surface antigens defined by monoclonal antibodies [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(8):5147-5150
- [4] El Sewedy T, Fornaro M, Alberti S. Cloning of the murine TROP2 gene; conservation of a PIP2-binding sequence in the cytoplasmic domain of TROP-2 [J]. *Int J Cancer*, 1998, 75(2):324-330
- [5] Calabrese G, Crescenzi C, Morizio E, et al. Assignment of TACSTD1 (alias TROP1, M4S1) to human chromosome 2p21 and refinement of mapping of TACSTD2 (alias TROP2, M1S1) to human chromosome 1p32 by in situ hybridization [J]. *Cytogenet Cell Genet*, 2001, 92(1-2):164-165
- [6] Tsujikawa M, Kurahashi H, Tanaka T, et al. Identification of the gene responsible for gelatinous drop-like corneal dystrophy [J]. *Nat Genet*, 1999, 21(4):420-423
- [7] Villablanca EJ, Renucci A, Sapede D, et al. Control of cell migration in the zebrafish lateral line; implication of the gene “tumour-associated calcium signal transducer,” tac-

std[J]. Dev Dyn,2006,235(6):1578-1588

[8] Sozo F,Wallace MJ,Zahra VA,et al. Gene expression profiling during increased fetal lung expansion identifies genes likely to regulate development of the distal airways [J]. Physiol Genomics,2006,24(2):105-113

[9] Kluger HM,Kluger Y,Gilmore-Hebert M,et al. cDNA microarray analysis of invasive and tumorigenic phenotypes in a breast cancer model[J]. Lab Invest,2004,84(3):320-331

[10] Santin AD,Zhan F,Bellone S,et al. Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium;identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy[J]. Int J Cancer,2004,112(1):14-25

[11] Fong D,Moser P,Krammel C,et al. High expression of TROP2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer[J]. Br J Cancer,2008,99(8):1290-1295

[12] Fong D,Spizzo G,Gostner JM,et al. TROP2:a novel prognostic marker in squamous cell carcinoma of the oral cavity[J]. Mod Pathol,2008,21(2):186-191

[13] Muhlmann G,Spizzo G,Gostner J,et al. TROP2 expression as prognostic marker for gastric carcinoma[J]. J Clin Pathol,2009,62(2):152-158

[14] Ohmachi T,Tanaka F,Mimori K,et al. Clinical significance of TROP2 expression in colorectal cancer[J]. Clin Cancer Res,2006,12(10):3057-3063

[15] Wang J,Day R,Dong Y,et al. Identification of Trop-2 as an oncogene and an attractive therapeutic target in colon cancers[J]. Mol Cancer Ther,2008,7(2):280-285

[收稿日期] 2013-02-23

本刊来稿题名和作者署名的注意事项

1.题名

- (1)题名应以简明、确切的词语反映文章中最重要特点内容,要符合编制题录、索引和检索的有关原则,并有助于选定关键词。
- (2)中文题名一般不超过 20 个字,必要时可加副题名。
- (3)英文题名应与中文题名含义一致。
- (4)题名应避免使用非公用的缩写词、字符、代号,尽量不出现数学式或化学式。

2.作者署名和工作单位

- (1)文章都应有作者署名,这是文责自负和拥有著作权的标志;
- (2)作者姓名署于题名下方;
- (3)英文摘要中附与中文同样的作者姓名与排列顺序,写法为:姓前名后,姓和名的首字母大写,其余字母小写,如 Zhou Ping, Shi Honglei;
- (4)作者单位需注明全称(标注到二级或三级单位,如“南京医科大学第一附属医院心内科”,“南京医科大学公共卫生学院流行病与统计学系”)、所在城市及邮政编码;
- (5)对于有基金课题资助的论文需在课题负责人的名字后加上标“*”,并在论文首页下补充基金的名称、编号,以及课题负责人的 E-mail。
- (6)本刊对于没有课题资助的文章一律不标注通讯作者。

(本刊编辑:接雅俐)