

## Galectin-3 重组真核表达载体的构建及其在 NIH/3T3 细胞中的表达

胡圳圳, 蒋秀琴, 高才杰, 郑大同\*

(南京医科大学第二附属医院中心实验室, 江苏 南京 210011)

**[摘要]** 目的: 构建半乳糖凝集素-3(Gal-3)的真核表达载体, 在 NIH/3T3 细胞中表达, 并检测其表达。方法: 通过 DNA 重组技术和 PCR 方法从人肿瘤细胞克隆 Gal-3 基因, 插入真核表达载体 pEGFP-N1 中, 通过酶切和测序鉴定重组载体的正确性; 采用脂质体转染技术将重组质粒 pEGFP-Gal-3 瞬时转染 NIH/3T3 细胞, 经荧光和 Western blot 方法检测 Gal-3 表达, MTT 法检测 Gal-3 对 NIH/3T3 细胞增殖的影响。结果: 限制性内切酶鉴定和核酸序列测序证实成功构建含 Gal-3 的重组真核表达载体 pEGFP-Gal-3。以重组质粒瞬时转染 NIH/3T3 细胞, 检测到 Gal-3 蛋白表达, 并证实 Gal-3 蛋白促进 NIH/3T3 细胞增殖。结论: 成功构建的 pEGFP-Gal-3 真核表达载体在小鼠 NIH/3T3 细胞中成功表达, 并促进 NIH/3T3 细胞增殖。

**[关键词]** 半乳糖凝集素-3; NIH/3T3 细胞; 细胞增殖

**[中图分类号]** Q786

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)01-018-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20140104

## Construction of recombinant eukaryote expression vector encoding gene of galectin-3 and its expression in NIH/3T3 cells

Hu Zhenzhen, Jiang Xiuqin, Gao Caijie, Zheng Datong\*

(Center Laboratory, Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011, China)

**[Abstract]** **Objective:** To construct recombinant eukaryote expression vector containing Gal-3 gene and detect protein expression in NIH/3T3 cells. **Methods:** Gal-3 gene was obtained by PCR from cancer cells. PCR product of Gal-3 was then clone into the eukaryote expression vector pEGFP-N1, then the recombinant vector pEGFP-Gal-3 was transfected into the NIH/3T3 cells. After the transfection of the recombinant vector, the protein expression of Gal-3 in NIH/3T3 cells was detected by Western blot. The effect of Gal-3 on cell proliferation was investigated by MTT assay. **Results:** The recombinant eukaryote expression vector encoding Gal-3 was constructed restriction enzyme analysis and nucleic acid sequence successfully. The expression of Gal-3 in NIH/3T3 cells transiently transfected by recombinant plasmid could be detected by Western blot. In addition, Gal-3 protein could promote the proliferation of NIH/3T3 cells. **Conclusion:** The new recombinant expression vector pEGFP-Gal-3 was constructed and expressed successfully in NIH/3T3 cells of rats. Furthermore, our study found that Gal-3 protein could promote the proliferation of NIH/3T3 cells.

**[Key words]** galectin-3 NIH/3T3 cell; cell proliferation

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(01):018-021]

半乳糖凝集素-3(Gal-3), 属于半乳糖凝集素家族(galectin family)成员, 广泛表达于正常组织和肿瘤组织中, 参与多种生理和病理过程, 包括细胞生长和凋亡、细胞粘附及新生血管形成和肿瘤浸润与转移等<sup>[1-2]</sup>, 使 Gal-3 作为疾病治疗的新靶点成为可能。目前有关 Gal-3 的许多生物学功能及其发挥效应的

机制尚未完全明了, 值得深入研究。本研究通过构建 Gal-3 蛋白的真核表达载体, 转染小鼠胚胎成纤维细胞(NIH/3T3), 观察人 Gal-3 蛋白的表达, 为进一步研究 Gal-3 的作用机制奠定基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

小鼠胚胎成纤维细胞株 NIH/3T3 购自中国科学院细胞库; EcoR I 和 BamH I 限制性核酸内切酶购自美国 NEB 公司; Quant cDNA 第一链合成试剂

**[基金项目]** 南京医科大学科技发展基金重点项目(2012NJMU088)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: dtzheng@njmu.edu.cn

盒、Taq 酶购自瑞士 Roch 公司; 胶回收试剂盒和质粒抽提试剂盒购自德国 Macherey-Nagel 公司; T4 连接酶、转染试剂 Lipofectamine<sup>TM</sup> 购自美国 Invitrogen 公司; 卡那霉素和 MTT 购自美国 Sigma 公司; GFP 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 Gal-3 基因的扩增

一步法抽取细胞总 RNA, 根据 GenBank (NM002306.3) Gal-3 序列设计如下引物, 上游引物: 5'-CCGGAATTCGCCACCATGGCAGACAATTTTCGCTC-3' (下划线表示 *EcoR* I 的酶切位点); 下游引物: 5'-CGCGGATCCCGTATCATGGTATATGAAGCACTG-3' (下划线表示 *Bam*H I 的酶切位点)。PCR 引物由上海 Invitrogen 公司合成。用 Gal-3 两端引物进行 PCR 扩增, 具体反应条件如下: 95°C 预变性 2 min, 95°C 30 s, 55.8°C 30 s, 72°C 60 s, 共进行 30 个循环, 最后 72°C 延伸 6 min。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 目的基因的长度为 774 bp (Gal-3 基因长度加上保护碱基、酶切位点及 kozak 序列), 用 DNA 凝胶回收试剂盒回收及纯化目的基因片段。

### 1.2.2 重组质粒 pEGFP-Gal-3 的构建及鉴定

用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Bam*H I 分别双酶切 Gal-3 片段和 pEGFP-N1 载体, 2 个酶切产物纯化后用 T4 连接酶于 16°C 条件下连接过夜。取适量连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 并将转化后的大肠杆菌涂布在含有卡那霉素的 LB 固体培养基上 37°C 倒置培养。18 h 后, 随机挑取单克隆菌落, 经 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定, 同时经进一步基因测序正确后, 采用去内毒素质粒大量提取试剂盒获得大量重组质粒, 该质粒命名为 pEGFP-Gal-3。

### 1.2.3 质粒 pEGFP-Gal-3 瞬时转染

转染前 24 h 将 NIH/3T3 细胞传代至 6 孔细胞培养板中, 在含 10% 胎牛血清的无抗生素 DMEM 培养液培养。转染的当天细胞处于 80% 的汇合率。在无菌 EP 管中制备: 溶液 A, 2  $\mu$ g 的质粒, 加入无血清无抗生素的 DMEM 培养液 100  $\mu$ l 和 Plus 试剂 4  $\mu$ l, 混匀; 溶液 B, 取脂质体 10  $\mu$ l, 加入无血清无抗生素的 DMEM 培养液 100  $\mu$ l, 混匀。溶液 A 室温下孵育 15 min 后与溶液 B 混合, 将混合液室温下孵育 15 min。用无血清无抗生素 DMEM 培养液洗板 2 次, 加入 0.8 ml 无血清无抗生素 DMEM 培养液, 将 pEGFP-Gal-3、脂质体混合液加入培养孔内。37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培养 4 h 后, 换 1 ml 完全 DMEM 培养液。培养 48 h 后倒置荧光显微镜下观察绿色荧光表

达情况。

### 1.2.4 Western blot 检测 Gal-3 表达

RIPA 蛋白裂解液裂解 NIH/3T3 细胞后提取总蛋白, BCA 比色法测定蛋白浓度。将蛋白煮沸 10 min 使其变性, 取等量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳条件为 90 V 电泳 30~40 min, 待溴酚蓝迁移出积层胶位置再换用 120 V 电泳 90 min, 电泳完毕后将蛋白经全湿电转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 抗 GFP 抗体 (1:1 000) 4°C 孵育过夜, TBST 洗膜, 羊抗鼠 IgG-HRP (1:1 000) 室温孵育 2 h, TBST 洗膜, 暗室中加入 ECL 液孵育 4 min 后曝光和显影。

### 1.2.5 MTT 法检测 Gal-3 对细胞增殖的影响

转染 24 h 后, 细胞无血清饥饿 24 h。取细胞制成单细胞悬液, 用完全培养基调整细胞浓度至  $2 \times 10^4$  个/ml, 每孔 200  $\mu$ l 接种于 96 孔培养板, 继续培养。分别于 0、24、48、72 h 按 20  $\mu$ l/孔加入 MTT (5 mg/ml), 继续孵育 4 h 后终止培养, 每孔加入 150  $\mu$ l DMSO, 振荡 10 min。酶标仪测定光密度值, 波长为 490 nm。

## 1.3 统计学方法

检测数据采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS13.0 分析实验数据, 组间比较采用方差分析,  $P \leq 0.05$  表示有统计学差异。

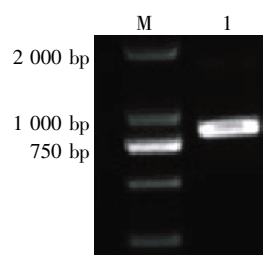
## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增目的基因片段

从肿瘤细胞中提取总 RNA, 以此为模板, RT-PCR 扩增 Gal-3 基因片段, 并进行琼脂糖凝胶电泳鉴定 (图 1), 在 774 bp 左右可见目的条带。

### 2.2 重组质粒 pEGFP-Gal-3 的鉴定

限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I 双酶切重组质粒, 产生大小两个片段 (图 2 A), 分别代表载体 pEGFP-N1 和 Gal-3 基因片段。核酸序列测定显示克隆的基因序列与 GenBank 上所公布的 Gal-3 基因序



M: DNA 标准; 1: galectin-3。

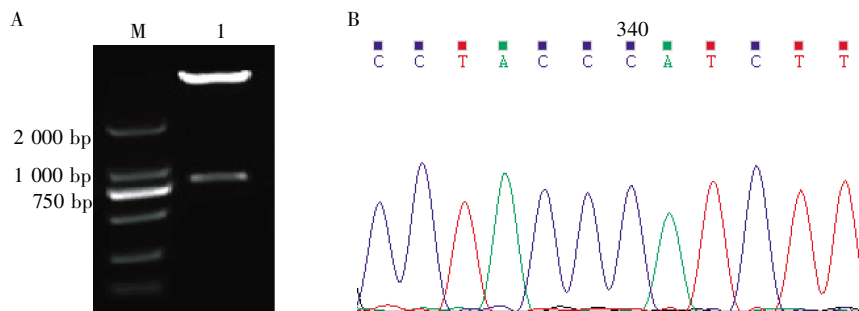
图 1 目的基因 Gal-3 PCR 扩增电泳图

Figure 1 Electrophoretogram of Gal-3 PCR amplification

列一致 (图 2 B)。提示 Gal-3 基因成功克隆到 pEGFP-N1 载体中。

### 2.3 重组质粒 pEGFP-Gal-3 瞬时转染 NIH/3T3 细胞的鉴定

使用脂质体法将重组质粒 pEGFP-Gal-3 转染 NIH/3T3 细胞,48 h 后在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光,GFP 阳性率在 30%以上(图 3),这些阳性细胞被认为可以表达目的基因,显示转染成功。



M;DNA 标准;1;pEGFP-Gal-3 双酶切结果。

图 2 重组质粒 pEGFP-Gal-3 *EcoR* I、*Bam*H I 双酶切鉴定(A)及部分测序结果(B)

Figure 2 Restriction enzyme digestion analysis of recombinant plasmid(A),and part results of sequencing(B)

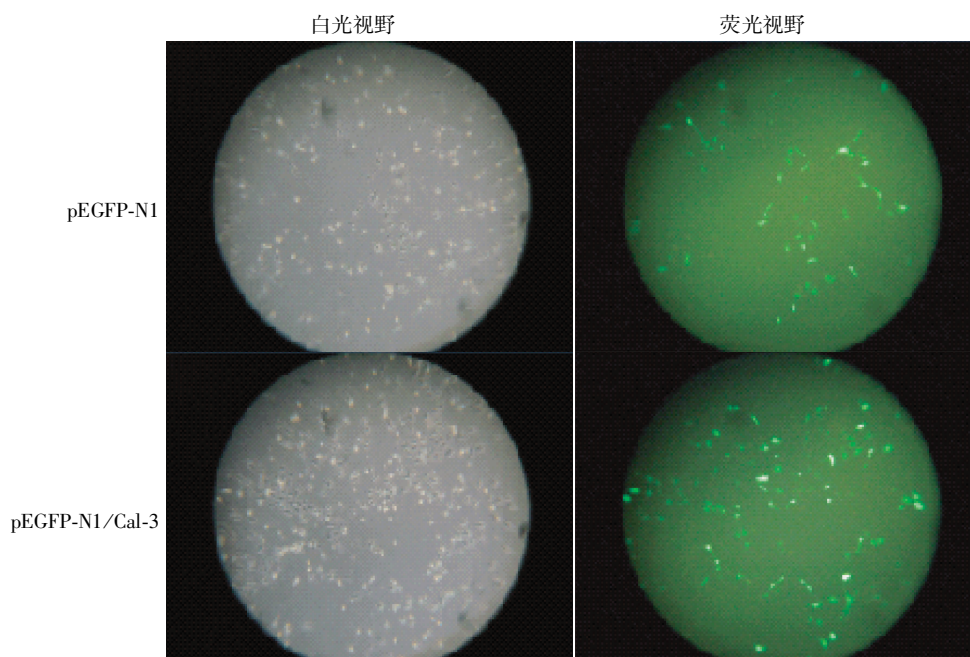


图 3 GFP 在转染的 NIH/3T3 细胞中的荧光表达

Figure 3 EGFP Fluorescence in transfected NIH/3T3 cells

### 2.4 重组质粒转染 NIH/3T3 细胞中 Gal-3 蛋白的表达

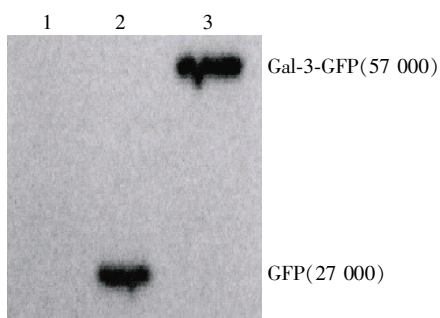
我们用 RIPA 裂解液提取转染目的基因的 NIH/3T3 细胞总蛋白,用 Western blot 鉴定 GFP 和 Gal-3-GFP 重组蛋白的表达。结果表明,转染空载体 pEGFP-N1 和重组质粒 pEGFP-Gal-3 的两个细胞株分别显示大小约为 27 000 和 57 000 的蛋白条带(图 4),与目的蛋白分子量大小一致。该结果进一步验证了 GFP 和 Gal-3-GFP 重组蛋白在 NIH/3T3 细胞中的表达。

### 2.5 Gal-3 基因表达对 NIH/3T3 细胞增殖的影响

MTT 实验结果显示,转染 pEGFP-Gal-3 的 NIH/3T3 细胞增殖能力显著高于未转染和转染 pEGFP-N1 的 NIH/3T3 细胞( $P < 0.05$ ,图 5)。表明 Gal-3 可明显促进 NIH/3T3 细胞增殖。

## 3 讨论

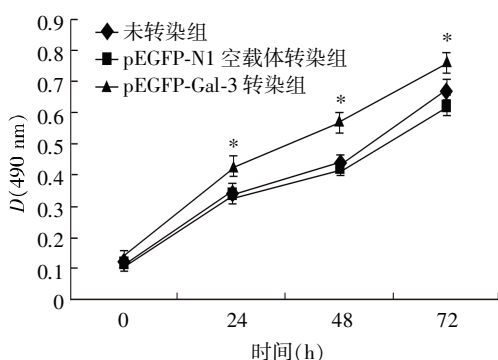
半乳糖凝集素家族(galectin family)在结构上都有 1 或 2 个糖识别域 (the carbohydrate recognition domain,CRD),对  $\beta$  半乳糖苷有特殊的亲和力<sup>[3-4]</sup>。



1: 未转染组; 2: pEGFP-N1 空载体转染组; 3: pEGFP-Gal-3 转染组。

图 4 EGFP 重组蛋白在 NIH/3T3 细胞中的表达

Figure 4 Expression of EGFP recombination protein in transfected NIH/3T3 cells



与未转染组相比, \* $P < 0.05$ ,  $n = 3$ 。

图 5 表达 Gal-3 促进 NIH/3T3 细胞增殖

Figure 5 Expression of Gal-3 gene promotes NIH/3T3 cell proliferation

Galectin 根据 CRD 不同分为 3 类: 原型结构、串联重复结构和嵌合体结构。Gal-3 是该家族中唯一具有嵌合体结构的蛋白<sup>[1-2,5]</sup>。近年来的研究显示 Gal-3 与肿瘤侵袭和转移的某些过程密切相关, 如肿瘤血管生成、细胞基质相互作用、肿瘤细胞沿血管播散及渗出<sup>[6-7]</sup>。Gal-3 在肿瘤中的这些功能使其有望成为一种可靠的肿瘤转移诊断标记物及癌症治疗靶向蛋白。为进一步研究 Gal-3 的作用机制, 本研究从人肿瘤细胞克隆 Gal-3 基因, 插入真核表达载体 pEGFP-N1 中, 构建了包含 Gal-3 基因的真核表达载体 pEGFP-Gal-3。获得的真核表达载体经 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切后电泳, 同样可见与预期长度相符的片段。测序结果证明, PCR 扩增获得并克隆的 Gal-3 片段序列与 GenBank 中的序列完全一致。通过上述实验可以证明成功构建并获得了包含 Gal-3 的真核表达载体。

为进一步研究目的基因 Gal-3 的表达, 本研究采用脂质体转染技术将重组质粒 pEGFP-Gal-3 瞬

转染 NIH/3T3 细胞, 通过荧光观察和 Western blot 方法检测 Gal-3 的表达情况。实验中将 pEGFP-Gal-3 和 pEGFP-N1 空质粒采用脂质体的方法转染 NIH/3T3 细胞, 转染 48 h 后, 在荧光显微镜下观察到绿色荧光的表达, 初步证明构建的质粒转染细胞成功, 目的基因 Gal-3 得以表达。通过 Western blot 进一步鉴定转染后 NIH/3T3 细胞 Gal-3 蛋白的表达情况, 结果显示转染了 pEGFP-Gal-3 的 NIH/3T3 细胞中明显可见 Gal-3-GFP 融合蛋白的表达, 而对对照组只有 GFP 蛋白的表达。通过上述实验结果证明已成功构建 pEGFP-Gal-3 的真核表达载体, 能够在 NIH/3T3 细胞中表达。

Gal-3 调控细胞生长的机制是当前的热点之一。pEGFP-Gal-3 转染 NIH/3T3 细胞后, 本研究用 MTT 法对其表达的 Gal-3 的功能进行了检测。与未转染组相比, 表达 pEGFP-N1 的 NIH/3T3 细胞的生长趋势未发生明显变化, 而表达 Gal-3 的细胞其生长受到明显促进, 表明 Gal-3 促进 NIH/3T3 细胞增殖。

本研究为进一步研究 Gal-3 在肿瘤发生发展中的作用及机制, 以及针对 Gal-3 的分子靶向治疗奠定了基础。

#### [参考文献]

- [1] Radosavljevic G, Volarevic V, Jovanovic I, et al. The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression [J]. Immunol Res, 2012, 52(1-2): 100-110
- [2] Takenaka Y, Fukumori T, Raz A. Galectin-3 and metastasis [J]. Glycoconj J, 2004, 19(7-9): 543-549
- [3] Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins [J]. Cell, 1994, 76(4): 597-598
- [4] Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression [J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(1): 29-41
- [5] Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential [J]. Expert Rev Mol Med, 2008, 10(1): e17
- [6] Wesley UV, Vemuganti R, Ayvaci ER, et al. Galectin-3 enhances angiogenic and migratory potential of microglial cells via modulation of integrin linked kinase signaling [J]. Brain Res, 2013, 1496(1): 1-9
- [7] Friedrichs J, Manninen A, Muller DJ, et al. Galectin-3 regulates integrin alpha2beta1-mediated adhesion to collagen-I and -IV [J]. J Biol Chem, 2008, 283(47): 32264-32272

[收稿日期] 2013-07-29