

· 基础研究 ·

## Max 二聚化蛋白 1(Mad1)真核表达载体的构建及其对胃癌细胞增殖和迁移能力的影响

蒋秀琴,许金金,郭文文,郑大同,胡圳圳\*

南京医科大学第二附属医院临床分子基因检测中心,江苏 南京 210003

**[摘要]** 目的:构建Max二聚化蛋白1(Max dimerization protein 1, Mad1)的真核表达载体,研究Mad1对胃癌细胞增殖和迁移能力的影响。方法:利用DNA重组技术将Mad1基因克隆至pEGFP-N1载体,构建重组真核表达载体pEGFP-N1-Mad1。经酶切和测序鉴定后,采用脂质体转染技术将重组质粒瞬时转染人胃癌AGS细胞,RT-PCR及Western blot检测Mad1基因和蛋白的表达。荧光显微镜观察Mad1在AGS细胞内的定位情况。CCK-8和Transwell实验研究Mad1对胃癌AGS细胞增殖和迁移能力的影响。结果:成功构建携带Mad1基因的真核表达载体pEGFP-N1-Mad1。将重组质粒瞬时转染AGS细胞后,RT-PCR和Western blot检测到Mad1基因和蛋白的表达。Mad1基因表达产物定位于AGS细胞核中。CCK-8和Transwell实验结果显示,转染Mad1的AGS细胞与转染空载体的AGS细胞及正常AGS细胞相比,细胞增殖活力和迁移能力明显降低。结论:成功构建了真核表达载体pEGFP-N1-Mad1,研究表明Mad1可以抑制胃癌AGS细胞的增殖和迁移。

**[关键词]** Max二聚化蛋白1;胃癌;细胞增殖;细胞迁移

**[中图分类号]** R735.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2019)01-021-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20190104

## Construction of eukaryotic expression vector containing Max dimerization protein 1 and its effect on human gastric cancer cell proliferation and migration

Jiang Xiuqin, Xu Jinjin, Guo Wenwen, Zheng Datong, Hu Zhenzhen\*

Clinical Gene Testing Center, the Second Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210003, China

**[Abstract]** **Objective:** To construct the recombinant eukaryote expression vector containing Max dimerization protein 1 (Mad1) gene and detect its effect on gastric cancer cell proliferation and migration. **Methods:** The Mad1 gene was cloned into pEGFP-N1 expression vector by recombining DNA technology. The recombinant vector was identified by restriction enzyme analysis and nucleotide sequence determination. The eukaryotic expression plasmid pEGFP-N1-Mad1 was transiently transfected into AGS cells. Expression of Mad1 gene and protein was identified by RT-PCR and Western blot, respectively. The location of Mad1 protein was detected by fluorescence microscope. The proliferation and migration of AGS cells were examined by CCK-8 and Transwell assay, respectively. **Results:** The Mad1 gene was successfully cloned to the eukaryote expression vector pEGFP-N1. Expression of Mad1 gene and protein was confirmed by RT-PCR and Western blot. After transfection, Mad1 could be detected in the nucleus of AGS cells. CCK-8 and Transwell experimental results showed that the proliferation and migration of pEGFP-N1-Mad1 transfected cells were deteriorated significantly compared to empty vector transfected AGS cells and normal AGS cells. **Conclusion:** The new recombinant expression vector pEGFP-N1-Mad1 was constructed and expressed successfully in AGS cells. Mad1 could inhibit the proliferation and migration of gastric cancer cells.

**[Key words]** Max dimerization protein 1; gastric cancer; proliferation; migration

[Acta Univ Med Nanjing, 2019, 39(01):021-025]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81301822);南京医科大学科技发展基金重点资助项目(2012NJMU088)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: huzhenzhen9@126.com

胃癌是常见的消化道肿瘤,其发生和发展是十分复杂的多基因、多阶段的演进过程,其中最常见的是抑癌基因的丢失或功能丧失<sup>[1-3]</sup>。Max二聚化蛋白1(Max dimerization protein 1, Mad1)是Max二聚化蛋白(Max dimerization protein, Mad)家族成员之一,通过抑制原癌基因MYC依赖的基因转录来发挥生物学功能<sup>[4-6]</sup>。已有研究表明, Mad1是肿瘤生长抑制因子,其在肿瘤细胞内的过表达能抑制胰腺癌等多种肿瘤细胞的生长<sup>[7-9]</sup>。目前对于Mad1在胃癌中的表达与临床病理意义,以及其在胃癌发生和发展中的作用和机制,国内外鲜有明确报道,值得深入研究。本研究旨在构建Mad1的真核表达载体,并初步观察Mad1对胃癌细胞增殖和迁移的影响,为深入研究Mad1在胃癌发生和发展中的作用及机制奠定实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

胃癌AGS细胞株购自中国科学院上海细胞库;真核表达质粒pEGFP-N1和大肠杆菌DH5 $\alpha$ 由本中心保存。PCR试剂盒购于瑞士Roche公司;胶回收试剂盒和质粒纯化试剂盒为德国Macherey-Nagel公司产品;限制性核酸内切酶EcoR I、Kpn I购自美国NEB公司;卡那霉素购自美国Sigma公司;TRIzol、T4连接酶、转染试剂Lipofectamine<sup>TM</sup>为美国Invitrogen公司产品;GFP抗体购自美国Santa Cruz公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 目的基因的扩增制备

一步法抽取细胞总RNA,根据GenBank中Mad1基因mRNA全长序列(NM002357)设计如下引物,上游引物:5'-CCGGAATTCCGCCACCATGGCGGCGCGGTTTC-3'(下划线表示EcoR I的酶切位点);下游引物:5'-CGGGGTACCGTGAGACCAAGACACGCC-TTGTG-3'(下划线表示Kpn I的酶切位点)。扩增长度为689 bp。PCR引物由上海Invitrogen公司合成。用上述引物进行PCR扩增,具体反应条件如下:95℃预变性2 min,95℃30 s,58℃30 s,72℃60 s,共进行30个循环,最后72℃延伸6 min。PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离,用胶回收试剂盒回收目的基因片段。

#### 1.2.2 重组质粒pEGFP-N1-Mad1的构建及鉴定

将目的基因片段和pEGFP-N1载体分别用限制性内切酶EcoR I和Kpn I进行双酶切,酶切产物用T4连接酶于16℃连接过夜。连接产物转化DH5 $\alpha$

感受态细胞。37℃培养18 h后挑取单克隆菌落扩增培养,提取质粒进行酶切鉴定,鉴定为阳性的重组质粒交由上海基峰生物科技有限公司测序验证。测序正确的质粒命名为pEGFP-N1-Mad1。

#### 1.2.3 pEGFP-N1-Mad1转染AGS细胞

AGS细胞培养于含10%胎牛血清的F12培养基中,转染前24 h将处于对数生长期AGS细胞接种至6孔细胞培养板中,于37℃5% CO<sub>2</sub>培养24 h,使转染当天细胞处于60%~80%的汇合率。转染步骤按照Lipofectamine<sup>TM</sup>操作说明进行。培养48 h后倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达情况。

#### 1.2.4 RT-PCR检测目标分子mRNA表达

TRIzol法提取3组细胞总RNA,取1  $\mu$ g总RNA在20  $\mu$ L反应体系中逆转录生成cDNA。引物序列如下:Mad1上游引物:5'-ATGGCGGCGGCGGTTTC-3';下游引物:5'-GAGACCAAGACACGCCCTTGTG-3',扩增产物长度为663 bp。GAPDH上游引物:5'-GGCCAAGGTCATCCATGACAAC-3';下游引物:5'-GGCAGGTTTTTCTAGACGGCAG-3',扩增产物长度为280 bp。扩增反应条件为:95℃预变性2 min,95℃30 s,57℃30 s,72℃60 s,共进行28个循环,最后72℃延伸6 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测。

#### 1.2.5 Western blot检测目标分子蛋白表达

分别收集3组细胞,蛋白提取及Western blot检测参照文献<sup>[10-12]</sup>的方法进行。抗GFP的一抗1:1 000稀释,4℃孵育过夜,二抗室温孵育2 h,ECL试剂盒显影特异蛋白条带。

#### 1.2.6 荧光显微镜观察Mad1在AGS细胞内的定位

细胞转染48 h后参照以前文献<sup>[10-11]</sup>的方法进行细胞免疫荧光实验。

#### 1.2.7 细胞增殖实验

取状态良好的AGS细胞铺于96孔板(2 500个孔),分别设Mad1转染组、空载体对照组和正常对照组,每组6个复孔。作用24、48和72 h后于各孔加入CCK-8试剂10  $\mu$ L,37℃孵育2.5 h,酶联免疫测定各孔吸光度值。以时间为横坐标、吸光度值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

#### 1.2.8 细胞迁移实验

细胞以5 $\times$ 10<sup>4</sup>个/孔密度接种于涂有胶原的小室,小室内加入200  $\mu$ L无血清培养液,小室外加入600  $\mu$ L有血清培养液。置于培养箱培养过夜,棉签擦去膜内面细胞,甲醇固定2 min,结晶紫染色10 min。每孔随机选取5个视野,摄片计数后取平均值。

Mad1 转染组、空载体对照组和空白对照组均设定 3 个实验孔,实验重复 3 次。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,正态分布变量以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,3 组比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 法。 $P \leq 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒的构建、鉴定和细胞转染

重组质粒经双酶切和琼脂糖凝胶电泳鉴定正确后(图 1A),送至上海基峰生物公司进行基因测序,结果与 GenBank 中的 Mad1 阅读框序列完全一致,提示重组质粒构建成功。AGS 细胞转染 Mad1 过表达质粒后,RT-PCR 检测 Mad1 的 mRNA 表达水平。结果显示, Mad1 转染组 Mad1 的 mRNA 表达水平较空白对照组和空载体对照组明显升高(图 1B)。对收集的 3 组细胞蛋白利用抗 GFP 抗体进行 Western blot 鉴定,结果如图 1C 所示,抗 GFP 的抗体在空载体对照组和 Mad1 转染组中检测到大小不同的蛋白表达,空载体对照组为 GFP 蛋白,分子量大小为 27 kDa; Mad1 转染组为 Mad1-GFP 融合蛋白,分子量大小为 52 kDa。

### 2.2 Mad1 在 AGS 细胞中的定位

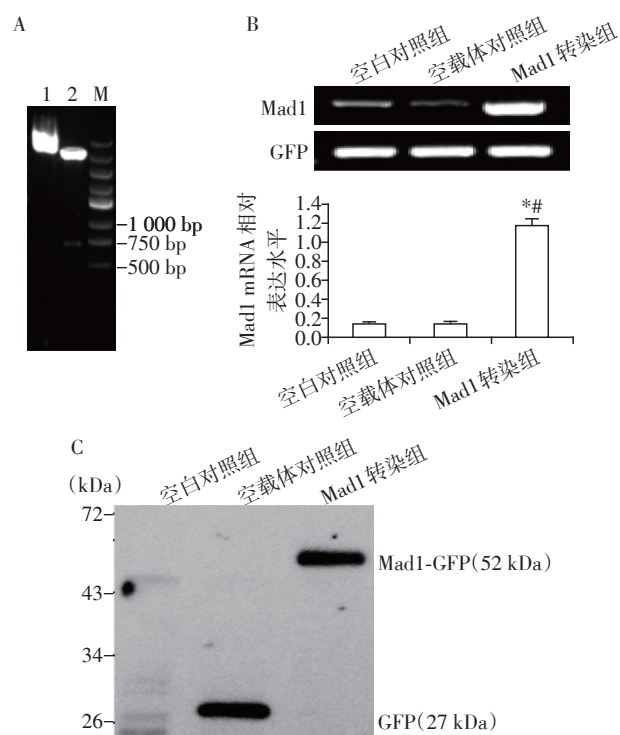
细胞免疫荧光结果显示:空载体 pEGFP-N1 转染的细胞和 pEGFP-N1-Mad1 转染的细胞具有不同的荧光分布,转染空载体的细胞中,绿色荧光均匀分布于整个细胞中,而转染 pEGFP-N1-Mad1 的细胞,绿色荧光则主要集中在细胞核中(图 2)。

### 2.3 Mad1 对 AGS 细胞增殖能力的影响

AGS 细胞转染 pEGFP-N1-Mad1 后,用 CCK-8 法进行细胞增殖能力的测定,测定 0、24、48 和 72 h 4 个时间点的吸光度值,每组细胞 6 个复孔取平均吸光度值,以表示细胞增殖能力的强弱。与空载体对照组和空白对照组相比, Mad1 转染组细胞增殖能力在 48~72 h 时明显受到抑制( $P < 0.01$ ),而两对照组之间差异无统计学意义(图 3)。

### 2.4 Mad1 对 AGS 细胞迁移能力的影响

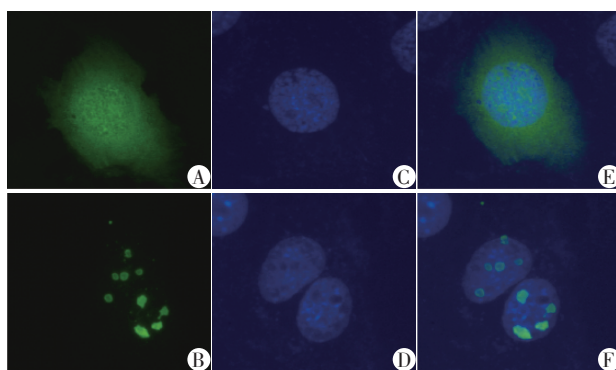
在迁移实验中,以 3 次独立重复实验的穿膜细胞均数来表示细胞迁移能力的强弱。空白对照组、空载体对照组和 Mad1 转染组的穿膜细胞数分别为(166 ± 23)个、(161 ± 13)个和(46 ± 5)个,其差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,图 4)。结果显示,上调 Mad1 表达后,AGS 细胞迁移能力下降。



A: 重组质粒双酶切, 1: Mad1 重组质粒, 2: Mad1 重组质粒双酶切结果, M: DNA 标准; B: RT-PCR 检测 Mad1 mRNA 的表达, 与空白对照组比较, \* $P < 0.01$ , 与空载体对照组比较, # $P < 0.01$ ; C: Western blot 检测 Mad1 蛋白的表达。

图 1 重组真核表达载体 pEGFP-N1-Mad1 的构建、鉴定和细胞转染

Figure 1 Construction and identification of recombinant eukaryote expression vector pEGFP-N1-Mad1 and cell transfection



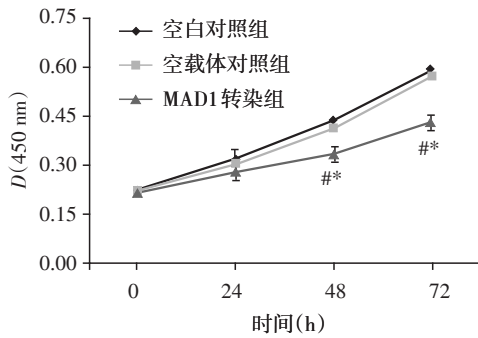
A: pEGFP-N1 在 AGS 细胞中的定位; B: pEGFP-N1-Mad1 在 AGS 细胞中的定位; C、D: DAPI 染色示细胞核; E、F: 两个图像(A 与 C、B 与 D)的叠加图像。

图 2 Mad1 在 AGS 细胞中的定位( $\times 630$ )

Figure 2 The localization of MAD1 in AGS cells( $\times 630$ )

## 3 讨论

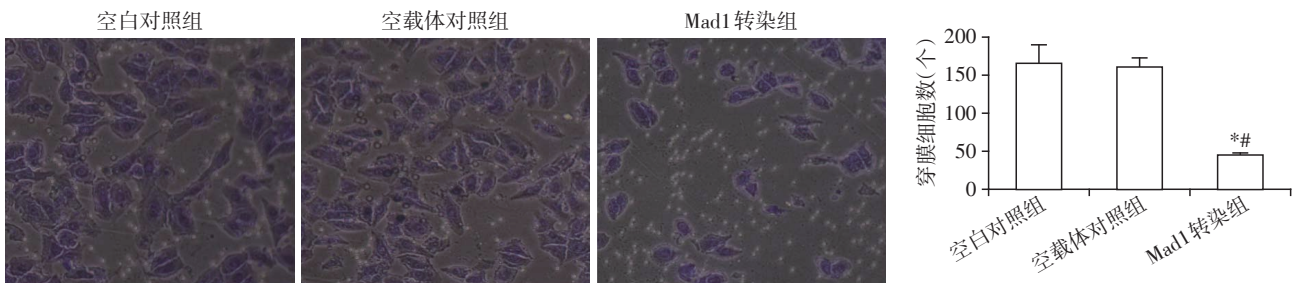
Mad1 是 Mad 转录家族的成员之一,其编码的基因全长约 27 kb,位于 2 号染色体短臂 1 区 3 带



与空白对照组比较, \* $P < 0.01$ ; 与空载体对照组比较, \* $P < 0.01$  ( $n=6$ )。

图3 Mad1对AGS细胞增殖能力的影响  
Figure 3 The effect of Mad1 overexpression on the proliferation of AGS cells

(2p13),所编码完整的Mad1蛋白由221个氨基酸组成<sup>[4]</sup>。主要包含碱性螺旋-环-螺旋-亮氨酸拉链区(basic helix-loop-helix leucine zipper, bHLH-zip)、近氨基末端Sin3结合区(sin3 interacting domain, SID)及羧基末端保守区域(carboxyl terminus, CT)3部分。其中,bHLH-zip区具有结合DNA以及与其他bHLH-zip蛋白相互作用的能力,SID区可以募集Sin3-HDAC相关共转录抑制因子<sup>[4-5]</sup>。临床病理资料显示,在白血病、前列腺癌、神经胶质瘤及乳腺癌的活检标本中均可检测到Mad1低表达或表达缺失,且与这些肿瘤的发生、发展存在一定关系<sup>[7-9]</sup>。Mad1介导的转录调控网络十分复杂,其调控的基因涉及细胞增殖、分化、凋亡、发育等多个方面<sup>[6]</sup>。在



与空白对照组比较, \* $P < 0.01$ ; 与空载体对照组比较, \* $P < 0.01$  ( $n=3$ )。

图4 Mad1对AGS细胞迁移能力的影响( $\times 100$ )  
Figure 4 The effect of Mad1 overexpression on the migration of AGS cells( $\times 100$ )

不同环境、不同细胞中,甚至同一细胞不同状态下, Mad1的调控作用也会不同,其调控的最终结果取决于它下游靶基因及产生作用的效应蛋白质<sup>[6,13-14]</sup>。为研究Mad1在胃癌发生和发展中的作用及机制,本研究构建携带Mad1基因的重组真核表达载体,并转染人胃癌AGS细胞从而进一步探讨Mad1对胃癌细胞体外生物学的影响。

蛋白质分子在细胞内活性的发挥及功能的特异性通常由其在细胞内的定位所决定。本实验将重组质粒以脂质体介导的方法体外瞬时转染人胃癌AGS细胞,转染后利用荧光显微镜观察,可见空载体转染的细胞荧光均匀分布于整个细胞中,而重组质粒转染的细胞,其荧光集中在细胞核中。这一结果表明Mad1定位于AGS细胞核中。Mad1的这一细胞核定位可能与其作为c-MYC的拮抗因子有关。c-MYC作为转录因子,通过其C末端的b-HLH-ZIP结构和MAX形成异源二聚体与靶基因的DNA结合,进而激活转录<sup>[15]</sup>。Mad1蛋白的C末端也有b-HLH-ZIP结构域,能和c-MYC竞争结合Max,抵消c-MYC的促转录作用<sup>[4-6]</sup>。因此,Mad1在AGS细胞核

中的定位表明其有可能通过调节c-MYC来影响胃癌细胞的恶性生物学行为。

细胞增殖实验结果显示,增加AGS细胞内Mad1表达后,从48h起细胞生长比正常对照组和空载体对照组均缓慢,说明Mad1表达上调能抑制AGS细胞增殖。虽然近年来的实验证实Mad1能抑制包括胰腺癌等多种肿瘤细胞增殖<sup>[7-9]</sup>,但对其具体的作用机制并未进行探讨,仍需从细胞和分子水平研究Mad1对于细胞增殖的影响。肿瘤的发生离不开细胞增殖的失控和细胞凋亡的抑制,两者共同引起体内活细胞动态平衡的破坏<sup>[16]</sup>。有研究表明,Mad1可激活细胞内PI3K/AKT信号通路抑制Fas诱导的肿瘤细胞凋亡,发挥抗凋亡功能<sup>[17]</sup>。Mad1是否参与胃癌细胞凋亡的调控,目前尚未可知,需要进一步研究Mad1对胃癌细胞凋亡的影响。

细胞迁移实验结果显示,增加AGS细胞内Mad1表达后,穿过Transwell膜的细胞数从(161 ± 13)个下降至(46 ± 5)个,AGS细胞的迁移能力显著下降。说明上调Mad1表达能抑制AGS细胞的迁移能力。Mad1对胃癌细胞迁移的抑制作用可能与c-MYC有

关。近年来研究发现,c-MYC的表达水平与胃癌的浸润、转移和不良预后呈正相关<sup>[18]</sup>。蔡民等<sup>[19]</sup>通过转染c-MYC siRNA降低胆囊癌细胞中c-MYC下游靶基因的表达水平,从而使胆囊癌细胞的迁移和侵袭能力受到抑制。所以c-MYC在胃癌细胞的迁移与侵袭过程中也有可能发挥重要作用。Mad1在AGS细胞的细胞核定位提示其很有可能参与c-MYC活性调节,但其是否通过调节c-MYC活性抑制胃癌细胞迁移尚待进一步研究。

总之,本研究成功构建了携带Mad1基因的真核表达载体,并初步探索了Mad1对胃癌细胞增殖和迁移功能的影响,为以后进一步进行相关机制的研究奠定了基础。

#### [参考文献]

- [1] Carcas LP. Gastric cancer review[J]. J Carcinog, 2014, 13: 14
- [2] Park JY, Von Karsa L, Herrero R. Prevention strategies for gastric cancer: a global perspective[J]. Clin Endosc, 2014, 47(6): 478-489
- [3] Massarrat S, Stolte M. Development of gastric cancer and its prevention[J]. Arch Iran Med, 2014, 17(7): 514-520
- [4] Lüscher B. MAD1 and its life as a MYC antagonist: an update[J]. Eur J Cell Biol, 2012, 91(6/7): 506-514
- [5] Montagne M, Naud JF, Lavigne P. Elucidation of the structural determinants responsible for the specific formation of heterodimeric Mxd1/Max b-HLH-LZ and its binding to E-box sequences[J]. J Mol Biol, 2008, 376(1): 141-152
- [6] Cascon A, Robledo M. MAX and MYC: A heritable break-up[J]. Cancer Res, 2012, 72(13): 3119-3124
- [7] Farhana L, Dawson MI, Fontana JA. Down regulation of miR-202 modulates Mxd1 and Sin3A repressor complexes to induce apoptosis of pancreatic cancer cells[J]. Cancer Biol Ther, 2015, 16(1): 115-124
- [8] Wu Q, Yang Z, An Y, et al. MiR-19a/b modulate the metastasis of gastric cancer cells by targeting the tumour suppressor MXD1[J]. Cell Death Dis, 2014, 5(3): e1144
- [9] Boulton JK, Tanière P, Hallissey MT, et al. Oesophageal adenocarcinoma is associated with a deregulation in the MYC/MAX/MAD network[J]. Br J Cancer, 2008, 98(12): 1985-1992
- [10] 胡圳圳,李璐,吴小芸,等. pEGFP-N1-Mxi1-0重组质粒的构建与表达[J]. 蚌埠医学院学报, 2015, 40(3): 318-321
- [11] 蒋秀琴,胡圳圳,花荣,等. Max作用蛋白1-0缺失突变体的构建、表达及细胞内定位的研究[J]. 蚌埠医学院学报, 2015, 40(11): 1465-1468
- [12] 胡圳圳,蒋秀琴,许金金,等. 过表达Mxi1对人胃癌SGC-7901细胞增殖和凋亡的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2017, 37(4): 423-427
- [13] Gallant P. Myc/max/mad in invertebrates: the evolution of the max network[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2006, 302(1): 235-253
- [14] Grinberg AV, Hu CD, Kerppola TK. Visualization of Myc/max/mad family dimers and the competition for dimerization in living cells[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(10): 4294-4308
- [15] Kress TR, Sabò A, Amati B. MYC: connecting selective transcriptional control to global RNA production[J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15(10): 593-607
- [16] Fuller BG, Stukenberg PT. Cell division: ring the check[J]. Curr Biol, 2009, 19(14): 1182-1187
- [17] Rottmann S, Speckgens S, Lüscher-Firzlaff J, et al. Inhibition of apoptosis by MAD1 is mediated by repression of the PTEN tumor suppressor gene[J]. FASEB J, 2008, 22(4): 1124-1134
- [18] 李良庆,宋俊,潘敦,等. 胃癌组织中LIN28和c-myc的表达及临床意义[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2015, 24(2): 176-181
- [19] 蔡民,李立波. 靶向c-myc基因小RNA干扰对胆囊癌细胞侵袭运动的影响[J]. 第二军医大学学报, 2010, 31(9): 1029-1031

[收稿日期] 2018-04-28