

· 基础研究 ·

## pTet-on-PTEN-U87MG 胶质瘤细胞系的构建

黄安炆<sup>1</sup>, 程光<sup>2</sup>, 章翔<sup>2</sup>, 刘新平<sup>3</sup>

(1. 重庆市第九人民医院神经外科 400700; 2. 第四军医大学西京医院神经外科, 西安 710032; 3. 第四军医大学生物化学教研室, 西安 710032)

**摘要:**目的 建立高诱导、低背景的 pTet-on-PTEN-U87MG 神经胶质瘤细胞系。方法 pTet-on 质粒经脂质体介导稳定转染 PTEN 缺失的 U87MG 细胞系, G418 筛选, 荧光素酶活性分析, 挑选阳性单克隆, 建立 pTet-on-U87MG 细胞系; 然后, pTRE-PTEN 反应质粒经脂质体介导稳定转染 pTet-on-U87MG 细胞系, 潮霉素筛选, 荧光素酶活性分析, 挑选阳性单克隆, 构建 pTet-on-PTEN-U87MG 细胞系。结果 成功构建 pTet-on-PTEN-U87MG 细胞系。结论 pTet-on-PTEN-U87MG 神经胶质瘤细胞系的建立, 为进一步研究神经胶质瘤发病相关因素及 PTEN 相关的信号传导机制, 提供较为理想的细胞模型。

**关键词:**神经胶质瘤; 细胞系; 基因; 报告; 磷酸单酯水解酶类

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.14.022

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)14-1402-02

## Establishment of pTet-on-PTEN-U87MG glioma cell line

Huang Anyang<sup>1</sup>, Cheng Guang<sup>2</sup>, Zhang Xiang<sup>2</sup>, Liu Xinping<sup>3</sup>

(1. Department of Neurosurgery, Chongqing Ninth People's Hospital, Chongqing 400700, China; 2. Department of Neurosurgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shanxi 710032, China; 3. Department of Biochemistry, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shanxi 710032, China)

**Abstract: Objective** To establish pTet-on-PTEN-U87MG glioma cell line with higher induction and lower background.

**Methods** Firstly, pTet-on-U87MG cell line was established by liposome-mediated stable transfection of PTEN-deleted U87MG cell line with pTet-on plasmid, U87MG cell line undergone G418 selection and luciferase activity analysis, and positive cell monoclonal of pTet-on-U87MG was confirmed. Secondly, pTet-on-PTEN-U87MG cell line was established by liposome-mediated stable transfection of pTet-on-U87MG cell line with pTRE-PTEN responsive plasmid, pTet-on-U87MG cell line undergone hygromycin selection and luciferase activity analysis, and positive cell monoclonal of pTet-on-U87MG was confirmed. **Results** pTet-on-PTEN-U87MG glioma cell line was successfully established. **Conclusion** Establishment of pTet-on-PTEN-U87MG glioma cell line makes the basis for the research of glioma pathogenesis and PTEN signal transduction with suitable cell model.

**Key words:** glioma; cell line; genes; reporter; phosphoric monoester hydrolases

与张力蛋白在 10 号染色体同源缺失的磷酸酶 (phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten, PTEN) 基因于 1997 年被分离克隆后, 已被确定为抑癌基因<sup>[1]</sup>。有研究认为, PTEN 蛋白在细胞生长信号途径, 即磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT) 途径中起重要作用, PTEN 抑制 PI3K/AKT 途径, 从而间接上调 p27 蛋白表达, 最终引起细胞周期 G<sub>1</sub>/S 期阻滞。PTEN 基因主要通过等位基因缺失、基因突变和甲基化方式使 PTEN 失活<sup>[2-4]</sup>。野生型 PTEN 基因转染到该基因缺失的神经胶质瘤细胞系 SHG-44 和 U87MG 神经胶质瘤细胞系后, 肿瘤细胞的生长、侵袭力受到明显抑制, 并且诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[5-7]</sup>。为了进一步研究 PTEN 相关的信号传导机制与神经胶质瘤细胞周期及细胞增殖的关系, 须建立高诱导、低背景的 pTet-on-PTEN-U87MG 神经胶质瘤细胞系, 为此, 首先构建重组的受四环素反应性元件调控的 PTEN 反应质粒 (pTRE-PTEN; plasmid of tet-responsive element, pTRE)。在确定 U87MG 细胞系对多西环素的诱导具有良好反应性的基础上, 成功地构建了 pTRE-PTEN 反应质粒<sup>[8]</sup>, 然后 pTet-on 调节质粒和 pTRE-PTEN 反应质粒依次稳定转染 U87MG 细胞系, 通过抗性筛选和荧光素酶 (luciferase, Luc) 活性检测, 建立高诱导、低背景的 pTet-on-PTEN-U87MG 神经胶质瘤细胞系。

## 1 材料与与方法

1.1 质粒和主要试剂 Tet-on 基因表达系统购自 Clontech

公司, 按介绍的方法将质粒转化大肠埃希菌 DH5 $\alpha$ , 抽提质粒, Not I 和 Sal I 酶切鉴定后, 置 -20 °C 保存。Lipofectamine 购自生命技术公司 (Gibco BRL), Dual-Luciferase Reporter Assay System 为 Promega 公司产品。

1.2 细胞培养 U87MG 神经胶质瘤细胞系: 常规条件下细胞培养于生长培养基为 DMEM+15% 胎牛血清, 呈上皮样, 贴壁生长。CHO-AA8-Luc Tet-Off 购自 Clontech 公司, 常规条件下培养于生长培养基为 DMEM+15% 胎牛血清, 呈上皮样, 贴壁生长。

1.3 Lipofectamine 介导的瞬间转染 (1) 超纯质粒的抽提。按杭州 Vitagene 试剂盒说明书的操作步骤抽提质粒, 抽提后的质粒经紫外分光光度计定量。(2) 瞬间转染。a 液: 1.8  $\mu$ g DNA 加入 150  $\mu$ L 无血清 DMEM 培养液中混匀。b 液: 加入 3.6  $\mu$ L Lipofectamine 2000 至无血清的 DMEM 培养液中 (以上为每 3 孔用量)。将 a、b 两种溶液温和地混匀, 室温放置 30 min, 令 DNA 与脂质体形成复合物。同时, 用 1 mL 的无血清的 DMEM 培养液洗涤 24 孔板的细胞, 重复 1 次, 每个孔内各加入 100  $\mu$ L 上述混合液, 2 h 后观察细胞变化情况, 发现仅有极少数细胞死亡, 5 h 后, 每孔加入含血清的 DMEM 培养液 1 mL。培养 24 h 或 36 h 观察细胞生长状况, 如状态良好, 则将每孔内的培养液吸干用无菌磷酸缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 冲洗 1 次。(3) 收获、裂解细胞。加入 1 $\times$  裂解液 100  $\mu$ L 振荡 5 min, 吹打至细胞碎片充分分散, 吸取混合裂

解液至 1.5 mL Eppendorf 管,并离心,吸取上清液至另一个 1.5 mL Eppendorf 管内,备检测。

**1.4 Lipofectamine 介导的稳定转染** 按照试剂说明操作:(1)将  $2 \times 10^5$  个细胞重悬于 2 mL 完全培养液中接种 6 孔板,将 6 孔板置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中,待细胞融合至 50%~80% 水平即可开始转染实验(一般需要 18~24 h)。(2)在无菌的 Eppendorf 管中准备好 A、B 两种溶液(A 溶液:4  $\mu\text{g}$  DNA+250  $\mu\text{L}$  无血清培养液。B 溶液:10  $\mu\text{L}$  脂质体+250  $\mu\text{L}$  无血清培养液。以上为每孔的用量)。(3)将 A、B 两种溶液温和地混匀,室温下放置 15~45 min,令 DNA 与脂质体形成复合物;同时,用 2 mL 无血清培养液洗涤 6 孔板中的细胞,洗涤 2 次。(4)往复合物中加入 1.5 mL 无血清培养液(不含抗生素),温和地混匀,加入到 1 个孔中。(5)将 6 孔板置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中,放置 6 h。(6)分别往每个孔中加入 2 mL 完全培养液(含 2 倍浓度的血清),放置 13~19 h(推荐 15 h)。(7)常规细胞培养,注意观察细胞的存活状况。培养液中含有 G418,G418 浓度为 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。(8)挑选抗性克隆,扩大培养,有限稀释法建立稳定传代的转染细胞系。6 孔板安排:1~5 号孔加入带有目的基因的载体;6 号孔留空。

**1.5 荧光素酶活性分析** 按照试剂说明操作:(1)在荧光素酶

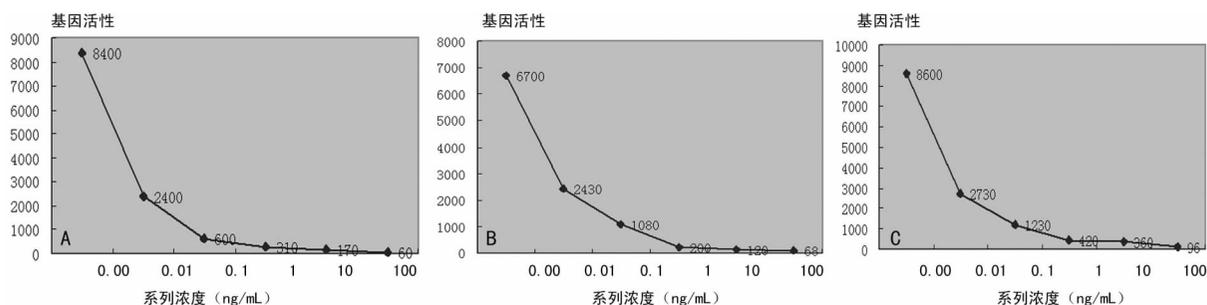
检测专用管内加入 100  $\mu\text{L}$  LAR II 溶液。(2)加入 20  $\mu\text{L}$  上述 PLB 细胞裂解液上清,混匀。(3)检测荧光素酶活性。(4)加入 100  $\mu\text{L}$  Stop&Go Reagent。(5)检测荧光素酶活性。

**1.6 U87MG 细胞对多西环素诱导的反应性** 用瞬间转染的方法,将 pTet-on 调节质粒和 pTRE-luc 反应质粒共转染 U87MG 细胞。分别加入系列浓度多西环素(0.001、0.01、0.1、1、10、100 ng/mL),观察转染的 U87MG 细胞的荧光素酶活性。

**1.7 CHO-AA8-Luc Tet-Off 细胞的剂量反应曲线的建立**  $0.5 \times 10^5$  个 CHO-AA8-Luc Tet-Off 细胞接种于 6 孔板,常规条件下细胞培养。待细胞融合至 50%~80% 水平,分别加入系列浓度多西环素(0.001、0.01、0.1、1、10、100 ng/mL),诱导 24 h,收获细胞,检测荧光素酶活性。

## 2 结 果

系列浓度多西环素(0.001、0.01、0.1、1、10、100 ng/mL)对 CHO-AA8-Luc Tet-Off 细胞具有良好的诱导抑制性、Tet-on-U87MG 的 pTRE、pTet-on-PTEN-U87MG 的 luc 报告基因的多西环素剂量反应见图 1。G418 筛选 3 周后的 Tet-on-U87MG 阳性细胞单克隆、潮霉素筛选 3 周后的 pTet-on-PTEN-U87MG 阳性细胞单克隆见图 2。



A:多西环素对 CHO-AA8-Luc Tet-Off 细胞的诱导抑制性;B:系列浓度多西环素诱导后,Tet-on-U87MG 的 pTRE 的 luc 报告基因的多西环素剂量反应;C:系列浓度多西环素诱导后的 pTet-on-PTEN-U87MG 的 luc 报告基因的多西环素剂量反应。

图 1 系列浓度多西环素对 CHO-AA8-Luc Tet-off 细胞、Tet-on-U87MG 的 pTRE、pTet-on-PTEN-U87MG 的 luc 报告基因剂量反应曲线图

## 3 讨 论

基因的表达调控特别是转录水平的调控,涉及多个因素的相互作用,尤其是反式作用因子。Gossen 等<sup>[9]</sup>提出了一种可调控的、高效的基因表达系统,称为 Tet-off 基因表达系统。该系统有 2 种表达质粒(即调节质粒和反应质粒)组成。调节质粒可表达一种融合蛋白,称四环素反应转录活化因子。该因子可与反应转录的四环素反应性元件结合,在没有四环素(tetracycline, Tet)或其衍生物多西环素存在的情况下,引起插入启动子下游目的基因的高效表达。随着四环素浓度的增加,基因的表达以一种剂量依赖性的方式逐渐关闭直至为零。在 Tet-Off 基因表达系统的基础上,Gossen 等<sup>[9]</sup>通过改变四环素反应转录活化因子的氨基酸顺序构建了受四环素正性调节的基因表达系统,称为 Tet-on 基因表达系统。该系统受四环素的作用刚好与 Tet-Off 系统相反,即在没有四环素存在的情况下表达水平为零,而在加入四环素或多西环素后目的基因高效表达。Tet-on 基因表达系统被认为是目前最为理想的真核生物基因表达系统,该系统具有严密性、特异性、高效性等优点<sup>[10]</sup>。利用 Tet-on 基因表达系统,以 pTet-on 作为调节质粒,带有荧光素酶报告基因 pTRE-PTEN 为反应质粒,通过检测荧光素酶活性,建立高诱导、低背景神经胶质瘤细胞系,从而为进一

步研究神经胶质瘤发病相关因素及 PTEN 相关的信号传导机制<sup>[11]</sup>,提供较为理想的细胞模型。Tet-on 基因表达系统具有调控严密、诱导效果好的特点。将该系统引入神经胶质瘤的研究,可以建立起受多西环素诱导表达的神经胶质瘤细胞系,期待在神经胶质瘤发病的分子机制上有所发现。

应用 Tet-on 基因表达系统,首先要检测被研究细胞对四环素诱导的反应性,这是因为在 Tet-on 表达系统中,调节质粒表达由 CMV 启动子启动,一般认为,CMV 启动子在大多数细胞中是无活性、处于静止状态的。但在极少数细胞中,CMV 启动子具有一定的活性。因此,要通过检测细胞对四环素或多西环素诱导的反应性,来排除内源性 CMV 启动子的影响<sup>[7]</sup>。

在 U87MG 细胞对多西环素的诱导具有良好反应性的基础上,通过 G418 筛选,荧光素酶基因的活性检测等,成功构建了 Tet-on 神经胶质瘤细胞系。将 pTRE-PTEN 质粒转入 pTet-on-U87MG 细胞中,经潮霉素筛选,荧光素酶基因的活性检测,成功得到了 pTet-on-PTEN-U87MG 细胞系。有的学者在构建过程中应用了“池克隆”技术,这样大大地减少了挑选单个克隆的巨大工作量,节省大量的实验时间,是一种快捷有效的细胞克隆筛选的途径。但其缺点是阳性克隆的性质没有单个克隆那样单纯,给后续研究带来一定的难度<sup>[12]</sup>。(下转第 1406 页)

佬族、毛南族各个年龄段 VCA-IgA、Zta-IgA 的 ArA 值均分别高于汉族,而仡佬族同毛南族各个年龄段 VCA-IgA、Zta-IgA 的 ArA 值的比较差异无统计学意义,3 个民族之间各年龄段 EBNA1-IgA 的 ArA 值差异无统计学意义。根据仡佬族、毛南族和汉族 EB 病毒抗体阳性率的比较结果,结合 3 个民族间各个年龄段抗体 ArA 值的比较结果,提示仡佬族和毛南族相对于汉族 EB 病毒溶解期的抗体水平偏高,说明其感染的 EB 病毒更多地处于再激活状态,提示同年龄段内仡佬族和毛南族罹患鼻咽癌的风险要比汉族高。此次对广西罗城县仡佬族、毛南族以及汉族 EB 病毒抗体水平的检测,只是单次的筛查结果,如果可以持续追踪,进而比较抗体水平的动态变化,将更加有利于研究 3 个民族 EB 病毒的感染状况及其与民族倾向性之间的关系。

#### 参考文献:

- [1] Niedobitek G. The Epstein-Barr virus; a group 1 carcinogen[J]. *Virchows Arch*, 1999, 435(2): 79-86.
- [2] Dardari R, Hinderer W, Lang D, et al. Antibody responses to recombinant Epstein-Barr virus antigens in nasopharyngeal carcinoma patients; complementary test of ZEBRA protein and early antigens[J]. *J Clin Micro*, 2001, 39(9): 3164-3169.
- [3] Ng MH, Chan KH, Ng SP, et al. Epstein-Barr virus serology in early detection and screening of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Ai Zhong*, 2006, 25(2): 250-256.
- [4] 魏矿荣, 梁智恒, 刘小红, 等. EB 病毒血清学筛查对鼻咽癌死亡率的影响[J]. *中华流行病学杂志*, 2003, 24(3): 171.
- [5] 沈亚华, 季明芳, 苏年华, 等. 在鼻咽癌高发区采用风险评估方案和高危人群随访检出早期鼻咽癌[J]. *流行病学与人群防治*, 2011, 25(6): 274-276.
- [6] Cheng WM, Chen KH, Chen HL, et al. Assessing the risk of nasopharyngeal carcinoma on the basis of EBV antibody spectrum[J]. *Int J Cancer*, 2002, 97(4): 489-492.
- [7] Ji MF, Ou XT, Zong YS, et al. A follow-up survey of 42 048 subjects tested with Epstein-Barr viral serology in a high-incidence area of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Chin Ger J Clin Oncol*, 2002, 1(4): 222-225.
- [8] Thompsom MP, Kurzrock R. Epstein-Barr virus and cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(3): 803-821.
- [9] Rennekamp AJ, Wang P, Lieberman PM. Evidence for DNA hairpin recognition by Zta at the Epstein-Barr virus origin of lytic replication[J]. *J Virol*, 2010, 84(14): 7073-7082.
- [10] 邓洪, 曾毅, 郑裕明, 等. 自然人群 413 164 人鼻咽癌血清学普查[J]. *中国癌症杂志*, 2003, 13(2): 109-111.
- [11] 兰桂萍, 林辉, 廖建, 等. 2007~2008 年广西苍梧县石桥镇鼻咽癌普查结果初步分析[J]. *中国肿瘤临床*, 2010, 37(10): 576-578.
- [12] 邓洪, 曾毅, 梁建平, 等. 488 683 人鼻咽癌普查基本方案分析[J]. *肿瘤*, 2005, 25(2): 152-154.
- [13] 邓兆享. 血清中 EBNA1-IgA 和 EBVCA-IgA 检测对鼻咽癌的诊断价值[J]. *中国热带医学*, 2009, 9(9): 1718.
- [14] 易冰, 顾耀亮, 宗永生, 等. 鼻咽癌高发区健康成人六项 EB 病毒抗体检测结果的分析[J]. *癌症*, 2009, 28(8): 822-826.
- [15] Deng H, Zeng Y, Lei Y, et al. Serological survey of nasopharyngeal carcinoma in 21 cities of south china[J]. *Chin Med J(Engl)*, 1995, 108(4): 300-303.

(收稿日期: 2012-01-10 修回日期: 2012-03-09)

(上接第 1403 页)

#### 参考文献:

- [1] Li DM, Sun H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(11): 2124-2129.
- [2] 刘媛, 蒋建新, 王正国, 等. 磷酸酶 PTEN 在中枢神经系统中的研究进展[J]. *生理科学进展*, 2008, 39(4): 368-370.
- [3] Sonoda Y, Otawa T, Aldape KD, et al. AKT pathway activation converts anaplastic astrocytoma to glioblastoma multiforme in a human astrocyte model of glioma[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(18): 6674-6678.
- [4] Endersby R, Baker SJ. PTEN signaling in brain: neuropathology and tumorigenesis[J]. *Oncogene*, 2008, 27(41): 5416-5430.
- [5] 李侠, 章翔, 吴景文, 等. 外源性 PTEN 基因稳定转染对 SHG44 细胞周期和增殖的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2001, 26(2): 79-81.
- [6] 田新霞, 王晋芬, 张晋夏, 等. 野生型 PTEN 转染对胶质母细胞瘤基因表达的影响[J]. *中华病理学杂志*, 2002, 31(1): 46-49.
- [7] Furukawa K, Kumon Y, Harada H, et al. PTEN gene transfer suppresses the invasive potential of human malignant gliomas by regulating cell invasion-related molecules[J]. *Int J Oncol*, 2006, 29(1): 73-81.
- [8] 黄安扬, 章翔, 陈长春, 等. PTEN 基因亚克隆和 pTRE-PTEN 反应质粒的构建[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2004, 3(5): 441-444.
- [9] Gossen M, Freundlieb S, Bender G, et al. Transcriptional activation by tetracycline in mammalian cells[J]. *Science*, 1995, 268(5218): 1766-1769.
- [10] 曹晓敏, 林仲秋, 庞战军, 等. 四环素及其衍生物诱导表达的 pTet-on 肺癌细胞系 A549 的建立[J]. *数理医药学杂志*, 2009, 22(2): 158-160.
- [11] Sakata K, Kato S, Fox JC, et al. Autocrine signaling through RAS regulates cell survival activity in human glioma cells: potential cross-talk between RAS and the phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2002, 61(11): 975-983.
- [12] 廖伟, 易红, 顾焕华, 等. 一株受四环素及其衍生物诱导表达的 Tet-on 鼻咽癌细胞系[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15(1): 132-135.

(收稿日期: 2011-12-23 修回日期: 2012-02-07)