

• 短篇论著 •

肿瘤标记蛋白 Prdx1-pMSCV 质粒的构建和鉴定^{*}刘祎婷¹, 张 艳¹, 黄 菊¹, 于海静¹, 刘 明², 万 舰^{1△}(1. 广州医科大学附属广东省妇幼保健院, 广州 511400; 2. 广州医科大学附属第一医院
呼吸疾病研究所, 广州 510120)

摘要:目的 构建含有过氧化物氧化还原酶 1(Prdx1)基因的 pMSCV 重组质粒, 转染至人气道上皮细胞内, 并进行鉴定, 为进一步研究 Prdx1 在细胞内的功能奠定基础。方法 构建 Prdx1-pMSCV 质粒, 将 Prdx1 mRNA 编码区序列克隆至 pMSCV 载体上, 测序验证后大量提取, 转染至 BEAS-2B 细胞内, 细胞内可高表达 Prdx1 蛋白, 收集总 mRNA 和蛋白裂解液分别进行逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 Prdx1-mRNA 和蛋白质印迹(Western blot)检测 Prdx1 蛋白变化。观察质粒转染后细胞内 Prdx1 高表达。结果 重组质粒经限制性内切酶 EcoR I 和 Bgl II 双酶切及测序鉴定均证实 Prdx1 基因已正确克隆到 pMSCV 质粒载体中。Western blot 结果进一步证实 Prdx1-pMSCV 重组质粒构建正确。结论 本研究正确构建了 Prdx1-pMSCV 质粒。

关键词:Prdx1; 质粒载体; 转染**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.15.034**文章编号:**1673-4130(2018)15-1907-04**中图法分类号:**Q785**文献标识码:**B

过氧化物氧化还原酶 1(Prdx1)属于抗氧化蛋白超家族中的 2-Cysprdx, 其在细胞内的主要功能是还原过氧化氢发挥抗氧化和自由基清除作用, 并在应激条件下上调表达^[1]。Prdx1 在肿瘤组织中表达增加并与预后不良相关, 近年来许多研究报道 Prdx1 与食管癌、肺癌、乳腺癌、甲状腺癌和口腔癌密切相关^[2-9]。Prdx1 的表达水平增加被视为较差的临床预后而且与患者生存率呈负相关^[4,10-11]。有研究报道 Prdx1 在肺癌中高表达, 可能通过 P38MAPK 通路影响患者肺癌血管生成拟态的形成^[12], 但其在气道上皮细胞内的具体功能和生物学特性仍不清楚。肿瘤方向的研究提示 Prdx1 有可能对气道上皮细胞的损伤修复存在重要影响。

本研究通过构建 Prdx1-pMSCV 质粒并转染到人气道上皮细胞 BEAS-2B 内, 使细胞高表达 Prdx1 蛋白, 从而为探讨 Prdx1 蛋白在气道上皮细胞的潜在功能奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 CO₂ 恒温培养箱(Thermo, 美国); 高速低温离心机(Sigma, 美国); 凝胶电泳成像系统(Bio-Rad, 美国); 多功能酶标仪(Thermo, 美国)。过硫酸铵、碘乙酰胺(Bio-Rad, 美国); 十二烷基硫酸钠(SDS)、丙烯酰胺、四甲基二乙胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺(Sigma, 美国); RIPA 裂解缓冲液、无水乙醇、脱脂奶粉(广州威佳公司); BCA 蛋白定量试剂盒(Thermo, 美国); β-actin 抗体(Santacruz, 美国); 抗过氧化物氧化还原酶 I(Prdx I)、多克隆抗体(Abcam,

美国); 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG; LipofectamineTM 2000(Invitrogen, 美国); 引物序列由英骏公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 健康人气道上皮细胞株 BEAS-2B 由香港大学郑教授馈赠, 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。当细胞融合度为 80% 左右时, 胰酶消化传代。

1.2.2 RT-PCR 使用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 测定 RNA 浓度后取 1 μg RNA 进行逆转录反应为 cDNA。取 1 μL 逆转录产物进行 PCR 反应, 反应体系为 20 μL。采用 Primer5.0 设计引物。Prdx1 引物正义链: GGA GGA TTG GGA CCC ATG AA; 反义链: AGA GCG GCC ACA GGA AGA TC。IL-6 引物正义链: GGA GAC TTG CCT GGT GAA; 反义链: CTG AGG TGC CCA TGC TAC。IL-8 引物正义链: TGG CAG CCT TCC TGA TTT; 反义链: CTT CTC CAC AAC CCT CTG。肿瘤坏死因子 α(TNF-α)引物正义链: CGA GTC TGG GCA GGT CTA; 反义链: AGC CGT GGG TCA GTA TGT GAG A。GAPDH 引物正义链: TCC TCC ACC TTT GAC GCT; 反义链: TCT TCC TCT TGT GCT CTT GC。PCR 产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳后, EB 染色成像系统拍照, Image J 软件分析各组灰度值后统计比较。

1.2.3 蛋白质印迹(Western blot)检测 PrxI 的表达 BCA 蛋白定量后, 总蛋白上样 40 μg 于 12% 的

^{*} 基金项目: 广东省自然科学基金面上项目(2014A030313505)。[△] 通信作者, E-mail: doctor_wanjian@126.com。

本文引用格式: 刘祎婷, 张艳, 黄菊, 等. 肿瘤标记蛋白 Prdx1-pMSCV 质粒的构建和鉴定[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(15): 1907-1910.

SDS-PAGE 电泳,根据目的蛋白相对分子质量大小调整转膜时间,蛋白转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭液封闭膜 1 h,抗 Prdx1 抗体(1:2 000)4 °C 孵育过夜。漂洗 3 次后辣根过氧化物酶标记兔抗 IgG(1:20 000)室温孵育 1 h,内参蛋白选择 β -actin。漂洗后加入发光液曝光,显影定影胶片。Image J 软件分析内参及目的条带的灰度值。

1.2.4 Prdx1-pMSCV 质粒构建 根据 Prdx1-mRNA 编码区设计引物,分别在引物两端加入酶切位点 EcoR I 和 Bgl II,正义链:AGA TCT ATG TCT TCA GGA AAT GCT AA;反义链:GAA TTC TCA CTT CTG CTT GGA GAA AT;PCR 扩增出带有酶切位点的 Prdx1 编码区序列,连接至 pMD19-T 载体后转化至感受态细菌 DH5 α ,分别进行菌落 PCR 鉴定和酶切鉴定成功;EcoR I 和 Bgl II 双酶切下 Prdx1 序列,电泳割胶回收纯化,连接到 pMSCV 载体再次转化到感受态细菌 DH5 α ,菌落 PCR 鉴定和酶切鉴定成功后,送至广州英骏生物技术公司测序、鉴定。

1.2.5 质粒转染 在转染前一天用胰蛋白酶将细胞按每孔 2×10^5 个细胞的密度接种于 24 孔板内,加入 500 μ L 含 10% 血清的培养基中(不含抗生素),至细胞密度达 90%~95% 时进行转染。50 μ L Opti-MEM 稀释质粒 DNA。50 μ L Opti-MEM 中加入 2 μ L LipofectamineTM 2000,混匀后室温孵育 5 min。二者混匀室温静置 20 min。将每孔待转染的细胞中均加入 DNA-LipofectamineTM 2000 混合,轻混匀后置 37 °C 培养箱培养,每种细胞均做 3 个复孔。转染后 6 h 更换培养基,24~48 h 可以检测靶基因表达。

2 结 果

含酶切位点序列的 Prdx1 编码区 PCR 扩增,产物为 612 bp,割胶回收后用于连接 pMD19-T 载体,见图 1。

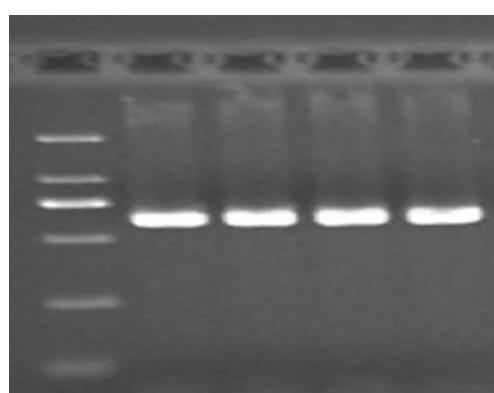


图 1 含酶切位点序列的 Prdx1 编码区 PCR 扩增

连接至 pMD19-T 载体后,转化至感受态细菌,青霉素筛选 LB 培养基中挑取阳性菌落扩增,提取质粒 EcoR I 和 Bgl II,双酶切后电泳,切下带有黏性末端的 Prdx1 片段。割胶纯化回收 DNA,见图 2。Prdx1-pMSCV 质粒酶切电泳,纯化后带有黏性末端的 Prdx1 片段连接至线性化后的 pMSCV 载体,转化提

取阳性菌落的质粒,分别单酶切和双酶切后电泳。双酶切后显示可以切下 609 bp 的目的片段,提示为阳性质粒,见图 3。挑取克隆菌落分别与阴性对照、阳性对照 PCR 后电泳相比,菌落可以 PCR 出目的片段,说明挑取菌落为阳性菌落,见图 4。Prdx1-pMSCV 质粒转染后 Prdx1-mRNA 表达水平增加,见图 5。Prdx1-pMSCV 质粒转染后 Prdx1 蛋白表达水平增加,见图 6。

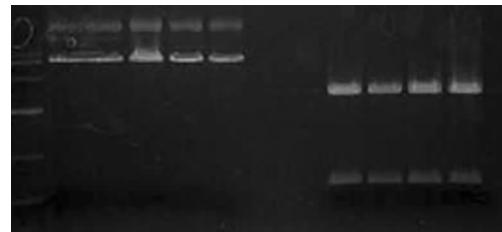


图 2

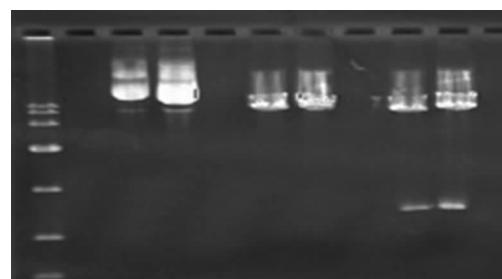


图 3

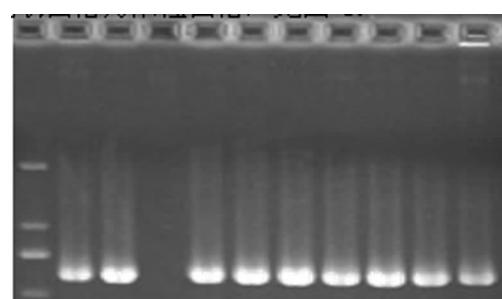


图 4 菌落 PCR 鉴定

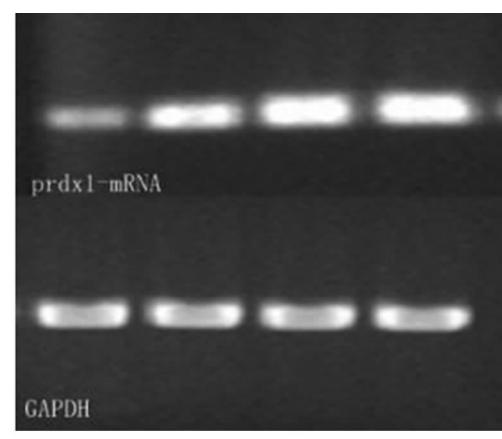
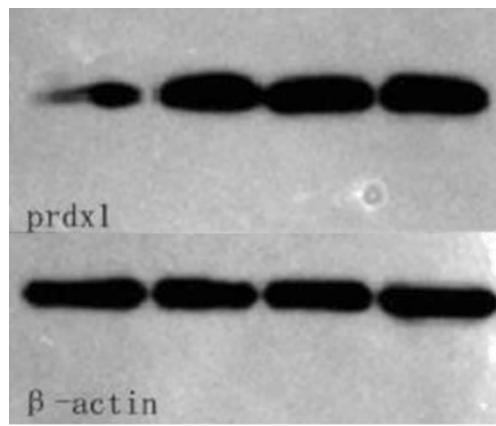


图 5 Prdx1-pMSCV 质粒转染后

注: A 为对照, B 为 Prdx1-pMSCV 转染后 6 h, C 为 Prdx1-pMSCV 转染后 12 h, D 为 Prdx1-pMSCV 转染后 24 h



注: A 为空白对照, B 为 Prdx1-pMSCV 转染后 6 h, C 为 Prdx1-pMSCV 转染后 12 h, D 为 Prdx1-pMSCV 转染后 24 h

图 6 Prdx1-pMSCV 质粒转染后

3 讨 论

Prdx1 对癌症的发生和发展有着极为重要的调节作用, 其关键处在于能够对抗活性氧簇(ROS)和抗氧化, 为 Prdx 蛋白家族中的重要一员。Prdx1 在肿瘤中发挥的作用极为复杂, 其首要作用为降解 H_2O_2 , 同时又可抑制 ROS 来诱导肿瘤细胞的凋亡。因此, 研究 Prdx1 对气道上皮的损伤修复对于进一步探索 Prdx1 对人体的影响至关重要。Prdx1 具有催化活性基团 Cys 极其容易被过氧化的特点^[12], 从而造成在高浓度 H_2O_2 的条件下 Prdx1 不能有效快速分解 H_2O_2 ; 在 H_2O_2 较低浓度情况下, Prdx1 与 H_2O_2 有高亲和力, 能快速清除 H_2O_2 。但其自身容易被过氧化的特点说明该蛋白对清除 H_2O_2 存在局限性^[13]。然而这种局限性却赋予 Prdx1 更多的生物学功能, 例如, Prdx1 可与其他蛋白相互作用, 以复合体的形态调节其他蛋白。然而, H_2O_2 浓度升高后, Prdx1 与 JNK 以及磷酸化形式的 PTEN 复合物数量随之减少, 导致 JNK 的活化、磷酸化形式 PTEN 失活^[14]。PTEN 下游主要的信号蛋白 AKT 又为细胞信号的中心枢纽, 能够广泛参与多种下游信号途径。并且, 与上皮细胞损伤修复相关的细胞增殖(细胞周期)、细胞凋亡等信号传导密切相关^[15-20]。

为研究 Prdx1 蛋白在细胞中的定位及其相关功能。本实验根据 GENE BANK 中人 Prdx1 基因序列设计能够扩增出 Prdx1 基因编码区全长的引物, 并在引物两端加上相应的酶切位点序列, 使用 PCR 扩增方法从 BEAS-2B 细胞中的 DNA 中扩增出 Prdx1 的 DNA 片段, 经 2% 琼脂糖凝胶电泳后对基因扩增产物进行初步鉴定, 发现 DNA marker 在 500 bp 和 1 000 bp 中间可见一清晰条带, Prdx1 基因长度为 612 bp, 条带所处位置基本与 Prdx1 基因长度大小一致, 说明经初步鉴定已成功扩增出 Prdx1 基因。Taq 酶会自动在产物末端加上“A”位点, 在 T 载体上拓扑异构酶的作用下, 目的基因可接入 PMD19-T 载体中, 经限制性内切酶双酶切可得到用于连接 pMSCV 载体的

DNA 片段, 该 DNA 片段酶切后带有黏性末端, 更有利于和 pMSCV 载体的连接。DNA 片段和载体连接重组是否成功通过 PCR 法初步鉴定, 试验中随机挑取 10 个细菌克隆中, 经菌落 PCR 鉴定 9 个成功连接, 随机挑取 3 个菌落进行序列分析证明重组质粒构建成功。为了鉴定重组 Prdx1-pMSCV 质粒的正确性, 本研究采用 EcoR I 和 Bgl II, 双酶切后电泳鉴定重组质粒正确。

BEAS-2B 细胞是目前被广泛接受的用于研究肺气道上皮细胞的模型, 是人类细支气管上皮细胞转染了猴腺病毒-40 而建立的永生化细胞系。通过试验证实 Prdx1 基因在 BEAS-2B 细胞中处于低表达状态, 因此, 我们构建的人 Prdx1 真核表达载体, 转染至 BEAS-2B 细胞中观察其能否稳定高表达。本实验通过 RT-PCR 和 Western blot 方法证实, 体外转染 Prdx1 质粒的 BEAS-2B 细胞能够稳定地上调表达 Prdx1 蛋白, 而转染了空质粒的 BEAS-2B 细胞和 BEAS-2B 细胞本身表达 Prdx1 较少。Prdx1 蛋白的相对灰度值与空白对照有显著性差异。这说明 Prdx1-pMSCV 重组质粒的构建是正确的且能高效表达出相关的蛋白。

4 结 论

本实验通过克隆的方法已成功构建了 Prdx1-pMSCV 重组质粒, 并且能高效正确表达出相关蛋白, 为研究 Prdx1 基因在细胞中的生物学功能提供了良好的试验基础, 期望能通过调控 Prdx1 蛋白的表达而观察其功能作用。

参考文献

- WOOD Z A, SCHRODER E, ROBIN H J, et al. Structure mechanism and regulation of peroxiredoxins [J]. Trends Biochem Sci, 2003, 28(1): 32-40.
- KIM H J, CHAE H Z, KIM Y J, et al. Preferential elevation of Prx I and Trx expression in lung cancer cells following hypoxia and in human lung cancer tissues [J]. Cell Biol Toxicol, 2003, 19(5): 285-298.
- NOH D Y, AHN S J, LEE R A, et al. Overexpression of peroxiredoxin in human breast cancer [J]. Anticancer Res, 2001, 21(3B): 2085-2090.
- QUAN C, CHA E J, LEE H L, et al. Enhanced expression of peroxiredoxin I and VI correlates with development, recurrence and progression of human bladder cancer [J]. Urol, 1995, 175(4): 1512-1516.
- YANAGAWA T, ISHIKAWA T, ISHII T, et al. Peroxiredoxin I expression in human thyroid tumors [J]. Cancer Lett, 1999, 145(1/2): 127-132.
- YANAGAWA T, IWASA S, ISHII T, et al. Peroxiredoxin I expression in oral cancer: a potential new tumor marker [J]. Cancer Lett, 2000, 156(1): 27-35.
- CHANG J W, JEON H B, LEE J H, et al. Augmented expression of peroxiredoxin I in lung cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 289(2): 507-512.

- [8] QI Y, CHIU J F, WANG L, et al. Comparative proteomic analysis of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Proteomics, 2005, 5(11): 2960-2971.
- [9] SHEN J, PERSON M D, ZHU J, et al. Protein expression profiles in pancreatic adenocarcinoma compared with normal pancreatic tissue and tissue affected by pancreatitis as detected by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry[J]. Cancer Res, 2004, 64(24): 9018-9026.
- [10] KIM J H, BOGNER P N, RAMNATH N, et al. Elevated peroxiredoxin 1, but not NF-E2-related factor 2, is an independent prognostic factor for disease recurrence and reduced survival in stage I non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(13): 3875-3882.
- [11] CHEN M F, KENG P C, SHAU H, et al. Inhibition of lung tumor growth and augmentation of radiosensitivity by decreasing peroxiredoxin I expression[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006, 64(2): 581-591.
- [12] BARRANCO-MEDINA S, LAZARO J J, DIETZ K J. The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function[J]. FEBS Lett, 2009, 583(12): 1809-1816.
- [13] NEUMANN C A, CAO J, MANEVICHY. Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling[J]. Cell Cycle, 2009, 8(24): 4072-4078.
- [14] KIM Y J, LEE W S, IP C, et al. Prx1 suppresses radiation-induced c-Jun NH2-terminal kinase signaling in lung
- 短篇论著 •
- cancer cells through interaction with the glutathione S-transferase Pi/c-Jun NH2-terminal kinase complex[J]. Cancer Res, 2006, 66(14): 7136-7142.
- [15] 高军, 朱虹, 高国兰. 慢性心理应激对人卵巢癌移植瘤中 Prdx1 和 Prdx3 蛋白的影响[J]. 广东医学, 2015, 36(7): 989-992.
- [16] 刘尚辉, 姜琳琳, 张海燕, 等. 蛋白酶体抑制剂对人甲状腺癌细胞中过氧化还原蛋白表达的影响分析[J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(29): 8-12.
- [17] SUN Q K, ZHU J Y, WANG W, et al. Diagnostic and prognostic significance of peroxiredoxin 1 expression in human hepatocellular carcinoma[J]. Medical Oncology (Northwood, London, England), 2014, 31(1): 786.
- [18] GUO Q J, MILLS J N, BANDURRAGA S G, et al. MicroRNA-510 promotes cell and tumor growth by targeting peroxiredoxin1 in breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2013, 15(4): R70.
- [19] REN P, YE H, DAI L, et al. Peroxiredoxin 1 is a tumor-associated antigen in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Oncology Reports, 2013, 30(5): 2297-2303.
- [20] JIANG H, WU L, MISHRA M, et al. Expression of peroxiredoxin 1 and 4 promotes human lung cancer malignancy[J]. Am J Cancer Res, 2014, 4(5): 445-460.

(收稿日期:2018-01-10 修回日期:2018-03-25)

化学发光法检测鲁西健康人群肾素-血管紧张素-醛固酮系统参考范围及影响因素

冷 敏, 刘爱云, 司家峰, 肖纯新, 王晓丽, 王 健, 王 斌, 朱 琳, 贺珊珊

(东阿县人民医院检验科, 山东聊城 252200)

摘要:目的 建立鲁西地区健康成年人肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)3项指标正常参考值范围, 为继发性高血压的筛查提供依据。方法 收集该院社会招募的健康成年人288例, 研究对象排除已知对RAAS水平有影响的疾病, 于清晨空腹采集卧位及立位血液标本, 应用郑州安图生物全自动化学发光仪(AutoLumo A2000)检测卧位及立位血浆肾素水平(PRC)、血管紧张素Ⅱ(AⅡ)水平、醛固酮(ALD)水平以确定参考范围。结果 RAAS 3项 PRC、ALD、AⅡ 卧、立位检测数值呈偏态分布, 以双侧限值(2.5%~97.5%)表示参考范围, RAAS(卧位)3项指标: PRC 为 2.84~29.25 pg/mL, AⅡ 为 24.09~139.54 pg/mL, ALD 为 16.05~166.25 pg/mL; RAAS(立位)3项指标: PRC 为 3.90~36.62 pg/mL, AⅡ 为 35.23~305.86 pg/mL, ALD 为 36.43~318.33 pg/mL。PRC、ALD 和 AⅡ 卧、立位水平在不同性别之间差异无统计学意义($P>0.05$), 随着年龄的增长, >55 岁组 PRC、AⅡ 卧、立位活性水平较 $\leqslant 55$ 岁组下降, 差异有统计学意义($P<0.05$); 而 >55 岁组 ALD 卧、立位水平较 $\leqslant 55$ 岁组无明显变化, 差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 鲁西地区健康成人 RAAS 正常参考值范围与试剂说明书参考值有所不同。该调查的统计结果为鲁西地区健康人群 RAAS 3 项指标建立参考范围。

关键词: 血浆肾素水平; 醛固酮; 血管紧张素Ⅱ; 参考范围; 化学发光法; 鲁西

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.15.035

文章编号: 1673-4130(2018)15-1910-05

中图法分类号: R446.11

文献标识码: B

高血压是人类最常见的脑血管系统疾病并发

症的原因之一, 是导致冠心病、心肌梗死、脑卒中、肾