

pDsRED-LC3 真核表达载体的构建及其在肝癌细胞系 HepG2 中的表达和定位

彭琬昕 孙瑶湘 陈琛 金洁 邵根宝 王 嫒

(江苏大学基础医学与医学技术学院, 江苏 镇江 212013)

[摘要] 本实验根据已知的人 MAP-LC3 序列,以人脑胶质瘤 U251 细胞 cDNA 为模板扩增出去除终止密码子的 MAP-LC3 片段,定向克隆至红色荧光融合蛋白载体 pDsRed-N1 质粒中,构建了重组质粒 pDsRed-LC3。将 pDsRed-LC3 转染 HepG2 细胞 48 h 后用 Western Blot、激光共聚焦显微镜检测融合蛋白在细胞内的表达和分布情况,并观察血清饥饿时细胞发生自噬的情况。结果表明:(1)成功构建 pDsRFP-LC3 真核表达载体,该载体能在人肝癌细胞中表达;(2)血清饥饿应激实验证明,该载体可以良好地指示自噬泡的形成过程,为研究肿瘤细胞的自噬发生情况提供了一个重要而方便的工具。

[关键词] 红色荧光蛋白, MAP-LC3, 自噬, 肝癌

[中图分类号] Q291 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2012)01-0084-05

Construction of Recombinant pDsRed-LC3 Fusion Protein and Its Expression and Localization in HepG2 Cell

Peng Wanxin, Sun Yaoxiang, Chen Chen, Jin Jie, Shao Genbao, Wang Lei

(School of Medical Sciences and Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: In this study, according to the nucleotide sequence of MAP-LC3, we successfully constructed the vector that expressed the fusion protein of MAP-LC3 and red fluorescent protein (RFP) in mammalian cells. The recombinant plasmid was identified by restriction endonuclease enzyme analysis and DNA sequence analysis. The plasmid was transfected into HepG2 cells, and the expression and distribution of the MAP-LC3 were observed with Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) after 48 hours. All of the results indicated that this vector was highly expressed in the HepG2 cells. The red fluorescence was found over the cytoplasm by CLSM. Therefore, we had a conclusion that a recombinant plasmid of MAP-LC3 and RFP was constructed successfully, and it would be an important and convenient tool to study the process of autophagy in HCC.

Key words: red fluorescent protein, MAP-LC3, autophagy, hepatocarcinoma

细胞自噬(Autophagy)是真核生物进化保守的对细胞内物质进行周转的重要过程,是由比利时科学家 Christian de Duve 在上世纪 70 年代首次发现并命名。相对于主要降解短半衰期蛋白质的泛素-蛋白酶体系统,细胞的自噬被认为是参与绝大多数长半衰期蛋白质的降解,清除细胞内受损伤的细胞结构、衰老的细胞器,以及不再需要的生物大分子等,并产生氨基酸、游离脂肪酸等中间产物以供新的蛋白质和能量的合成,使细胞能够适应缺氧和饥饿等恶劣环境^[1-3]。近年来许多研究表明,自噬对于肿瘤细胞的存活率以及放化疗耐受性都具有一定的影响,但其分子机制及生物学效应仍在探索中^[4,5]。

微管相关蛋白 1 轻链 3 (Microtubule-associated protein 1 light chain 3, MAP-LC3) 是哺乳动物细胞中酵母自噬相关基因 ATG8 的同源物,LC3-II 定位于前自噬泡和自噬泡膜表面,常作为自噬的特异性标志物^[6]。LC3 的表达、LC3-II 与 LC3-I 蛋白的比值,常常作为检测细胞自噬是否启动的关键指标^[7]。本实验

收稿日期: 2011-11-10。

基金项目:国家自然科学基金(31100964)、江苏省高校科学研究基金(09KJB310002)、江苏大学高级人才科研启动基金(10JJD045)。

通讯联系人:彭琬昕,博士,讲师,研究方向:肿瘤细胞生物学。E-mail: pengwanxin@ujs.edu.cn

通过构建 LC3 与红色荧光蛋白(RFP)的融合蛋白,在荧光显微镜下可以观察到 LC3 在细胞中的定位、动态观察自噬的发生过程,确认该蛋白在自噬功能研究中的可用性,为深入开展自噬在肝癌细胞病理进程中的机制研究提供一种新的实验工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和细胞

pDsRed-N1 真核表达载体由南京大学医学院李朝军教授馈赠,人肝癌细胞 HepG2 购自中国科学院上海细胞库。HepG2 细胞接种于含非必须氨基酸 MEM 培养液中,10% 胎牛血清,37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养至对数生长期。

1.1.2 主要试剂

Marker、Pyrobest Taq 酶、*Bgl*III、*Hind*III 和 T4 连接酶均购自大连宝生物公司,PCR 产物琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒均购自北京全式金(Transgen)公司,MEM、非必须氨基酸、Lipofectin 2000 购自美国 Invitrogen 公司,鼠抗人 β -actin 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司,兔抗 MAP-LC3 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司,兔抗 RFP 单克隆抗体购自美国 Biovision 公司,增强型化学发光试剂(ECL)购自美国 Pierce 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组表达质粒的构建及鉴定

以人脑胶质瘤细胞 U251 cDNA 为模板,根据人 LC3 序列设计引物,上游引物带 *Bgl*III 酶切位点,其序列为 5'-GGAAGATCTATGCCCTCAGACCGGCTT-3',下游引物带 *Hind*III 酶切位点,并且不含有终止密码子,其序列为: 5'-CCCAAGCTTGAAGCCGAAGGTTTCTGG-3',用 pfu 高保真聚合酶进行 PCR 反应(94℃, 50 s; 55℃, 30 s; 72℃, 2 min; 循环 30 次),扩增片段大小为 366 bp。将 PCR 产物用 *Bgl*III/*Hind*III 过夜酶切,次日电泳回收、纯化 PCR 产物,随后与用相同内切酶消化的 pDsRed-N1 载体片段按分子比 3:1(mol/mol)混合,在 T4 DNA 连接酶催化下,于室温连接 3 h 后,转化 DH5 α 感受态细胞。将转化液涂布于含 50 mg/mL 卡那霉素的 LB 琼脂板上,37℃ 孵育过夜。随机挑取单菌落摇菌,小量提取质粒 DNA,双酶切鉴定,并以重组体为模板、应用上述 PCR 引物对重组体进行 PCR 鉴定。酶切及 PCR 鉴定产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳并在凝胶图像分析仪上成像。对初步鉴定为正确的重组体进行 DNA 序列分析(由南京金斯瑞公司完成),将构建的重组质粒命名为 pDsRed-LC3。

1.2.2 重组表达质粒的转染及融合蛋白的表达检测

按 8×10^5 个细胞/孔,将 HepG2 细胞接种于 6 孔板中,待细胞融合至 80% 时参照 Lipofectin 2000 说明书进行转染,设未转染组、空载体对照组和实验组。24 h 后分别收集细胞总蛋白,将蛋白煮沸 5 min 使其变性,取处理后的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳并电转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,抗 MAP-LC3 多克隆抗体(1:3 000)或抗 RFP 抗体(1:2 000)或抗 β -actin 抗体(1:5 000)4℃ 孵育过夜,用 TBST(含有 0.1% Tween-20 的 TBS)漂洗 3 次,加入 HRP 标记的羊抗鼠和羊抗兔 IgG(1:10 000 稀释),室温孵育 1 h,再以 TBST 漂洗 3 次后,用 ECL 发光剂显示阳性条带,在 Typhoon(GE healthcare)分子成像系统下记录结果。

1.2.3 荧光显微镜下观察融合蛋白定位

按 8×10^5 个细胞/孔,将 HepG2 细胞接种于加有盖玻片的 6 孔板中,待细胞融合至 80% 时参照 Lipofectin 2000 说明书分别转染空载质粒和 LC3 蛋白融合质粒。24 h 后吸去培养基,取出盖玻片,PBS 漂洗 2 次,固定液(3.7% 多聚甲醛和 0.1% 戊二醛)固定 45 min,0.05% PBST 充分漂洗 3 次,5 min/次,封片($V_{\text{甘油}}:V_{\text{水}}=9:1$)后置于荧光显微镜专用载物台上,观察融合蛋白的表达和定位情况。

1.2.4 血清饥饿实验检测自噬发生

1.2.4.1 激光共聚焦显微镜观察自噬体的形成

按 8×10^5 个细胞/孔,将 HepG2 细胞接种于加有盖玻片的 6 孔板中,待细胞融合至 80% 时参照 Lipofectin 2000 说明书转染重组质粒 pDsRed-LC3。24 h 后将其分为两组,分别为:① 对照组:继续正常培养基

培养 24 h; ② 实验组: 0.2% 血清 DMEM 继续培养 24 h. 于共聚焦显微镜(Carl Zeiss 公司, 德国) 下观察两组细胞, 随机选取多个视野, 观察红色荧光蛋白的表达和细胞内点状聚集的自噬体的形成.

1.2.4.2 Western blot 检测 LC3-I 向 LC3-II 的转化

将 HepG2 细胞按 8×10^5 个细胞/孔接种于 6 孔板中, 待细胞融合至 80% 时参照 Lipofectin 2000 说明书转染重组质粒 pDsRed-LC3. 24 h 后将其分为两组, 分别为: ① 对照组: 继续正常培养基培养 24 h; ② 实验组: 0.2% 血清 DMEM 继续培养 24 h. 收集对照组、实验组细胞总蛋白, 将蛋白煮沸 5 min, 使其变性. 取处理后的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳并电转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 抗 MAP-LC3 多克隆抗体 (1:3 000) 或抗 β -actin 抗体 (1:5 000) 4℃ 孵育过夜, 用 TBST (含有 0.1% Tween-20 的 TBS) 漂洗 3 次, 加入 HRP 标记的羊抗鼠和羊抗兔 IgG (1:10 000 稀释), 室温孵育 1 h, 再以 TBST 漂洗 3 次后, 用 ECL 发光剂显示阳性条带, 在 Typhoon (GE healthcare 公司, 美国) 分子成像系统下记录结果.

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定和序列分析

可疑重组子经 *Bgl*III、*Hind*III 双酶切后, 得到大小约 360 bp 的特异性条带. 以重组质粒为模板, 反应体系及条件同前, 扩增插入片段, 得到大小正确的条带, 与酶切分析的结果相一致 (图 1a, b). DNA 测序结果显示, 所插入的 LC3 基因序列与 GenBank 中所公布的序列完全一致, 以上结果表明重组质粒构建成功.

2.2 融合蛋白在 HepG2 细胞中的表达的鉴定

用 pDsRed-LC3 重组质粒转染 HepG2 细胞, 对照组转染 RFP 空载质粒, 36 h 后在荧光显微镜下观察到红色荧光的表达. 继续培养至 48 h, 裂解细胞检测融合蛋白在细胞中的表达情况 (图 2).

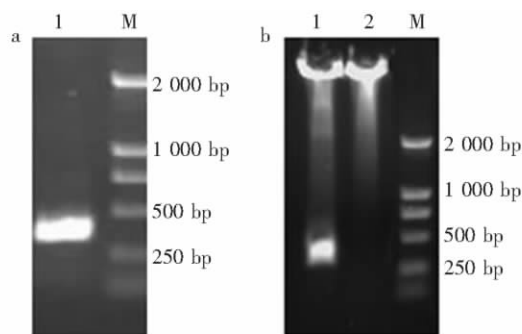


图 1 重组质粒鉴定
a) PCR 反应鉴定重组子; 1. PCR 产物; M. 分子量 marker; b) *Bgl*III、*Hind*III 双酶切产物鉴定重组子; 1. 重组质粒; 2. 空载体; M. 分子量 marker

图 1 重组质粒鉴定
Fig.1 Identification of recombinant pDsRed-LC3

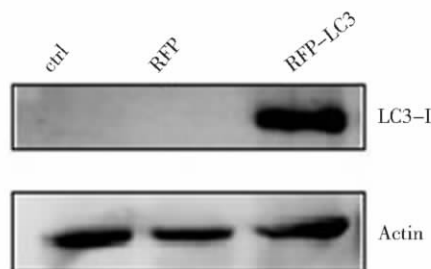


图 2 Western blot 检测 HepG2 细胞中 Red-LC3 融合蛋白的表达
Fig.2 Detection of Red-LC3 protein level by western blot

2.3 血清饥饿诱导自噬小体的形成

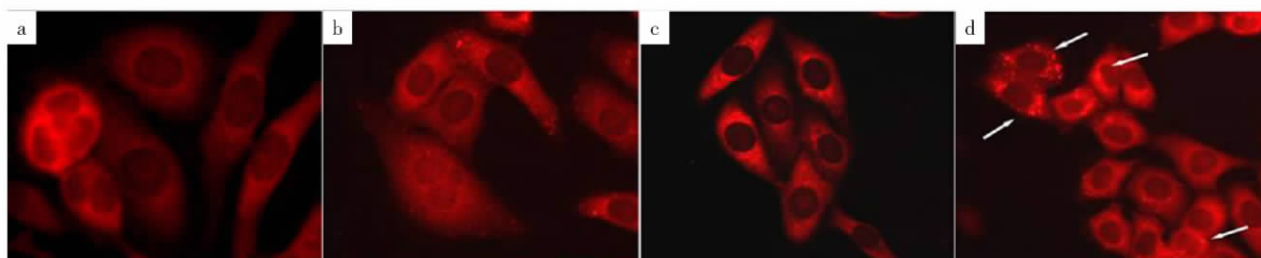
在实体肿瘤的发生过程中, 由于肿瘤细胞的生长速度远大于血管新生的速度, 常常会发现营养供应不足的情况. 因此我们采用血清饥饿的方法模拟实体肝癌的营养供应不足. 在共聚焦显微镜下观察, 转染了 RFP-LC3 重组质粒的细胞, 血清饥饿组 (图 3d) 多数细胞胞质中出现明显点状聚集的自噬体, 而对照组中 (图 3c) 只有极少量细胞中有自噬体的出现.

2.4 血清饥饿诱导 LC3-I 向 LC3-II 的转化

运用 Western blot 检测蛋白质的表达, 结果显示对照组 (control) 和血清饥饿组 (SS) 细胞中均明显检测到 LC3 和 RFP 融合蛋白的表达, 灰度分析结果显示实验组的细胞 LC3-I 向 LC3-II 的转化率与对照组相比有明显增加 (图 4).

3 讨论

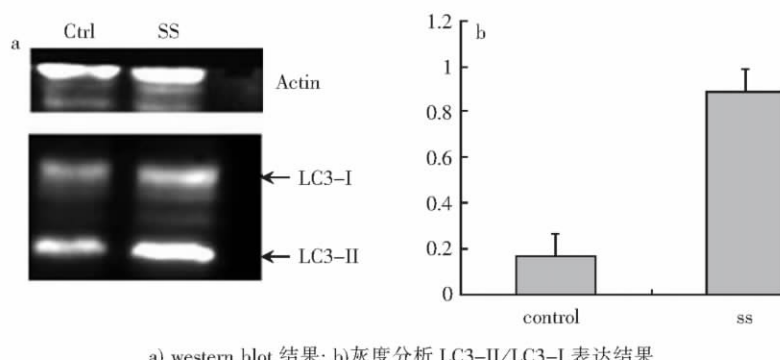
自噬是真核细胞内蛋白质降解的主要途径, 可以实现细胞内一些长半衰期蛋白质和某些细胞器的循环利用和更新, 满足细胞本身的代谢需要, 同时参与调控细胞的生长. 有研究表明, 自噬活性的变化与恶



a) 正常培养; b) 血清饥饿,转染 RFP-LC3 质粒; c) 正常培养; d) 血清饥饿,转染 RFP-LC3 重组质粒,箭头所示为自噬泡

图 3 共聚焦观察血清饥饿后转染了 Red-LC3 的 HepG2 细胞中自噬小体的形成情况(X40)

Fig.3 RFP-LC3 fluorescence images by confocal microscope (X40)



a) western blot 结果; b) 灰度分析 LC3-II/LC3-I 表达结果

图 4 Western blot 检测血清饥饿后 HepG2 细胞中 LC3-I 向 LC3-II 的转化

Fig.4 Detection of the change in the amount of conversion of LC3-I into LC3-II by western blot in the serum starvation treated with HepG2 cells

性肿瘤的发生和发展相关^[8-9]. 在分子水平,自噬与细胞的凋亡、增殖信号相互作用,共同影响肿瘤细胞的存活与死亡^[10-12]. 越来越多的研究证实自噬是肿瘤自我保护的机制之一,当化疗、放疗后,肿瘤能通过提高自噬及时清除细胞产生^[4,13]的大量破损细胞器、损坏的蛋白质等有害成分,并提供应急的底物和能量,为修复受损 DNA 赢得时间和条件^[13,14]. 因此探明肿瘤细胞中自噬发生的分子机制必将对肿瘤治疗带来新的思路^[15]. LC3 是自噬过程中的关键调控蛋白,在细胞自噬时被激活,并且在 Atg4B 的调控下完成 LC3-I 型蛋白(游离形式)向 LC3-II 型蛋白(膜结合形式)的转变,这一过程对于自噬体(Autophagosome)的形成起着关键的调控作用. LC3-II 与 LC3-I 蛋白的比值常常作为检测细胞自噬是否启动的关键指标^[16,17]. 在对自噬现象的研究中,常常利用荧光标记的 LC3 对自噬泡的形成情况进行定量、定位分析,这样即可以根据荧光斑点的数量判断自噬体数目的变化,又可以根据荧光的强度判断自噬体和溶酶体融合后底物降解的情况^[18].

荧光蛋白作为分子标签,在分析生物技术和细胞内分子示踪方面具有广泛的应用^[19]. 可以通过融合蛋白技术,将荧光蛋白融合到细胞内的某个靶标蛋白上,直接标记靶标蛋白在细胞内的定位、分布并可以在活体状态下实时观察蛋白在细胞内的运动^[20]. 源于 *Discosoma* sp. 的红色荧光蛋白 DsRed 能在紫外线激发下发出红色荧光,由于其发射波长较长,灵敏度与信噪比均比 GFP 高,为基于 GFP 的体内研究提供了一个很好的互补工具^[21]. 目前 RFP 已经广泛应用于示踪活细胞内的基因表达调控、蛋白转运及蛋白相互作用^[22]. 本研究中我们将目的基因插入到红色荧光表达质粒上,在细胞内表达红色荧光蛋白融合的 LC3 蛋白. 转染 pDsRed-LC3 的 HepG2 细胞,持续培养 48h 后,荧光显微镜下观察,发现该细胞高水平表达红色荧光蛋白; Western blot 法测定结果表明,转染 pDsRed-LC3 的 HepG2 细胞可大量表达 LC3,同时发现在由血清饥饿模拟肿瘤细胞缺血致营养不足应激状态时,细胞中有大量呈点状聚集的自噬体形成,同时 LC3-I 向 LC3-II 的转化明显,表明营养不足可以引起细胞发生自噬. 本研究成功构建了 pDsRed-LC3 融合蛋白表达载体,其转染的真核细胞可以大量表达 LC3-RFP. 研究中应用该质粒可以更简便快速且真实准确地标示细胞自噬的发生、发展的过程. pDsRed-LC3 的成功构建可以为进一步深入研究自噬在肿瘤发生、发展过程中的作用机制及其生物学效应提供更为有效的示踪工具.

[参考文献]

- [1] Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, et al. A protein conjugation system essential for autophagy [J]. *Nature*, 1998, 395 (6700): 395-398.
- [2] Levine B, Klionsky D J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy [J]. *Dev Cell*, 2004, 6(4): 463-477.
- [3] Moretti L, Yang E S, Kim K W, et al. Autophagy signaling in cancer and its potential as novel target to improve anticancer therapy [J]. *Drug Resist Updat*, 2007, 10(4/5): 135-143.
- [4] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease [J]. *Cell*, 2008, 132(1): 27-42.
- [5] Shinohara E T, Maity A. Increasing sensitivity to radiotherapy and chemotherapy by using novel biological agents that alter the tumor microenvironment [J]. *Curr Mol Med*, 2009, 9(9): 1 034-1 045.
- [6] 张志才, 邵增务, 熊鑫茗, 等. LC3II 在骨肉瘤组织中的表达及自噬上调对其化疗敏感性的影响 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2010, 12(18): 1-5.
- [7] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(1): 2 503-2 518.
- [8] Rubinsztein D C, Gestwicki J E, Murphy L O, et al. Potential therapeutic applications of autophagy [J]. *Nature Rev Drug Discov*, 2007, 6(4): 304-312.
- [9] 杜海磊, 杨卫平, 陈聆, 等. 自噬的特异性抑制对肝癌细胞凋亡的调控及其相关机制 [J]. *外科理论与实践*, 2010, 15(6): 636-640.
- [10] Maiuri M C, Tasdemir E, Criollo A, et al. Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(1): 87-93.
- [11] Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferreros C, Menendez J A. Autophagy facilitates the development of breast cancer resistance to the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab [J]. *PLoS One*, 2009, 4(7): e6251.
- [12] Song J, Qu Z, Guo X, et al. Hypoxia-induced autophagy contributes to the chemoresistance of hepatocellular carcinoma cells [J]. *Autophagy*, 2009, 5(8): 1 131-1 144.
- [13] Maiuri M C, Zalckvar E, Kimchi A, et al. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis [J]. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2007, 8(9): 741-752.
- [14] Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, et al. Anti-and pro-tumor functions of autophagy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(9): 1 524-1 532.
- [15] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(12): 2 503-2 518.
- [16] Fujita N, Itoh T, Omori H, et al. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy [J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(5): 2 092-2 100.
- [17] Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research [J]. *Cell*, 2010, 140(3): 313-326.
- [18] Hoffman R M, Yang M. Dual color whole-body imaging in mice [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(7): 790.
- [19] 樊晋宇, 崔宗强, 张先恩. 红色荧光蛋白的光谱多样性及体外分子进化 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2008, 35(10): 1 112-1 120.
- [20] 郝丽梅, 李唐棣, 梅兴国. 红色荧光蛋白的研究进展 [J]. *国外医学药学分册*, 2006, 33(2): 131-136.
- [21] Matz M V, Fradkov A F, Labas Y A, et al. Fluorescent proteins from nonbioluminescent anthozoa species [J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(10): 969-973.

[责任编辑:黄 敏]