

[文章编号] 1007-385X(2003)04-0253-04

## 肿瘤相关抗原编码基因 CHP2 对细胞增殖的抑制作用

曲 迅<sup>1</sup>, 杨美香<sup>1</sup>, 刘福利<sup>2</sup>, 孙宝柱<sup>1</sup>(1. 山东大学齐鲁医院临床基础研究所, 济南 250012; 2. 山东省立医院, 济南 250000)

[摘要] 目的: 研究肿瘤相关抗原编码基因 CHP2 对细胞增殖作用的影响。方法: 采用 PCR 方法获得目的基因, 克隆至真核表达载体 pcDNA3, 对产生的重组子进行酶切鉴定及 DNA 序列测定; 测序正确的重组子用脂质体转染的方法转入 293 细胞系, 药物 G418 筛选稳定转染细胞株, 分别在基因水平以及蛋白水平进行鉴定; 用<sup>3</sup>H-TdR 掺入的方法检测 CHP2 对细胞增殖的影响。结果: 经琼脂糖凝胶电泳及测序鉴定, 所插入的片断方向及序列完全正确; Western blotting 结果显示, 获得的稳定转染细胞株能够高效的表达 CHP2 蛋白。细胞增殖实验结果显示 CHP2 稳定转染细胞株的<sup>3</sup>H-TdR 掺入值明显低于对照组。结论: CHP2 在细胞中的有效表达能够显著抑制细胞的增殖, CHP2 可能是参与细胞生长调控的一个重要的调节因子。

[关键词] 肿瘤相关抗原; CHP2; 稳定转染; 细胞增殖

[中图分类号] R392 [文献标识码] A

## Tumor Associated Antigen Encoding Gene CHP2 Inhibited Cell Proliferation

QU Xun<sup>1</sup>, YANG Mei-xiang<sup>1</sup>, LIU Fu-li<sup>2</sup>, SUN Bao-zhu<sup>1</sup>(1. Basic Research Institute of Clinic Medicine, Qilu hospital, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Shandong Province Hospital, Jinan 250000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of cell proliferation transfected with tumor associated antigen encoding gene CHP2. **Methods:** Using PCR method to clone CHP2 encoding gene and inserting it into the eukaryotic expression vector pcDNA3 to construct the recombination pcDNA-CHP2. The fusion gene was identified by enzyme digestion and DNA sequencing. 293 cells transfected CHP2 genes were selected by G418 pressure and the cell proliferation was measured by <sup>3</sup>-TdR uptake. **Results:** Identified by enzyme digestion and sequencing, CHP2 gene was correctly cloned into pcDNA3. The results of the western blot showed the transfected cell could express CHP2 protein. <sup>3</sup>-TdR uptake value of the CHP2 transfected cell was lower than the control. **Conclusions:** CHP2 could inhibit cell proliferation and it maybe an important regulator involved in cell proliferation.

[Key words] tumor associated antigen; CHP2; stable transfected; cell proliferation

\* 肿瘤相关抗原编码基因 CHP2(AF146019)是最近从肝癌病人 cDNA 文库中筛选出来的肿瘤相关抗原编码基因<sup>[1]</sup>, 基因全长 2 396 bp, 开放阅读框架全长为 591 bp, 有 7 个外显子组成, 编码 196 个氨基酸, 预期分子量约 23 kD, 其蛋白序列与 CHP (calcineurin homologous protein) 有很高的同源性(61%)。据文献报道, CHP 是一种 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交换子调节蛋白<sup>[2,3]</sup>, 因此推测 CHP2 可能也参与 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交换的调节作用。Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交换子在肿瘤的发生、发展及转移的过程中发挥重要作用<sup>[4-5]</sup>, 其活性受多种调节因素的影响, 但对其直接调节蛋白的研究很少。在本文中我们构建了 CHP2 的真核表达载体, 用脂质体转染的方法获得稳定表达的细胞株, 利用此稳定表达细胞株研究了 CHP2 对细胞

增殖的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌种、质粒及细胞

JM109 为本室常规保存菌种; 重组质粒 pGEM-T-CHP2 为本室构建, 含有 CHP2 的 cDNA 片断并且经过测序证明; 质粒 pcDNA3 购自 Promega 公司; 293 细胞为本室常规保存。

[基金项目] 国家“973”基金资助项目(No. G1999053904)和北京市自然科学基金资助项目(NO. 7001002)

[作者简介] 曲迅(1958-), 女, 山东济南人, 教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤免疫学研究

[通讯作者] 曲迅, E-mail: ymxwj@163.com

## 1.2 工具酶和试剂

限制性内切酶 Xba I, Xho I, T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司; G418 购自 GIBCO 公司; 抗 FlagM2 购自 Sigma 公司; PE-羊抗小鼠抗体购自 Pharmingen 公司。质粒抽提和纯化试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒及脂质体转染试剂盒 TransFast™ 均购自 Promega 公司。

## 1.3 目的基因 CHP2DNA 的制备

利用 Gene Runner3.04 软件根据 CHP2 的基因序列设计上游及下游引物

上游引物: 5' > ctctc gagatg ggg tgc cgc agc tcc cac < 3'

下游引物: 5' > tct tct aga tca ctt atc gtc gtc atc ctt gta atc ctt cag gat ccg gat gct c < 3'

上游引物带有 Xba I 酶切位点, 下游引物带有 Xho I 酶切位点, 在下游引物的末端带有一 FLAG 尾部标签。以重组质粒 pGEM-T-CHP2 为模板, 分别加入上下游引物, 按以下条件进行 PCR 扩增: 94℃ 变性 5 min, 94℃, 20 s, 65℃, 20 s, 72℃, 45 s, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。反应产物用 1% 琼脂糖电泳鉴定, 并按照 Promega 公司提供的试剂盒 Wizard PCR prepsDNA purification system 的说明进行 PCR 产物纯化。

## 1.4 重组真核表达载体 pcDNA3-CHP2 的构建

将所得的 PCR 产物与经同样酶切得到的线性载体 pcDNA3 按照 3:1 的比例用 T4 DNA 连接酶进行连接反应, 4℃ 连接过夜。连接产物转化感受态 JM109, 转化的菌液涂布于 LB-Amp 琼脂培养皿上, 37℃ 倒置过夜。挑取单个菌落接种 LB-Amp 液体培养基, 过夜摇菌。质粒提取试剂盒提取质粒, Xho I, Xba I 双酶切, 1% 琼脂糖电泳初步鉴定, 含有目的片段的重组质粒作进一步的测序鉴定。

## 1.5 稳定转染细胞株的筛选

转染所用的 293 细胞在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养。转染前以每孔  $2.5 \times 10^5 \text{ L}^{-1}$  的起始细胞数铺于 6 孔板中, 在含 5% CO<sub>2</sub> 的孵箱中 37℃ 培养 24 h, 待细胞长至 80% 满, 即可用于转染。按照 Promega 公司提供的 TransFast™ 转染试剂盒的说明书进行转染。将 1 μg pcDNA3-CHP2 重组质粒与 3 μL 脂质体转染试剂和适量的无血清 DMEM 培养基混合, 总体积为 1 ml。震荡混匀, 室温孵育 10~15 min, 形成重组质粒-转染试剂-无血清培养基混合物。吸出 6 孔板中含有 10% NCS 的 DMEM 培养基, 以无血清 DMEM 培养基洗 2 遍, 然后加入 1 ml 重组质粒-转染试剂-无血清培养基混合物, 于含 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 孵箱中孵育 1 h, 然后加入 37℃ 预热的含有 10% NCS 的 DMEM 培养基, 继续培养 48

h 后, 在培养基中加入药物 G418 至终浓度为 1 mg/ml, 筛选已转染重组质粒的细胞株。约 5~7 d 后对照组细胞全部死亡, 实验组细胞大部分死亡, 少数存活的细胞长成集落, 将其进行有限稀释成单细胞种于 96 孔板中, 5% CO<sub>2</sub> 的 37℃ 孵箱中培养 1 周后逐渐将其转至 24 孔、6 孔培养板及培养瓶中, 长至一定的数目, 液氮冻存。本实验中也以 pcDNA3 空载体平行转染了 293 细胞, 并鉴定出稳定表达新霉素抗性基因 mRNA 的细胞株, 作为后续实验的对照。

## 1.6 稳定转染细胞株的鉴定

### 1.6.1 基因水平上的鉴定

将筛选得到的单细胞克隆, 提取总 RNA, 根据 RT-PCR 试剂盒说明合成 cDNA, 进行 PCR 扩增。为排除内源性的 CHP2 的影响, 我们采用了两对不同的引物。首先用带有 FLAG 标签的引物进行 PCR 反应 (CHP2A1: 5' > ctc ctc gag atg ggg tgc cgc agc tcc cac < 3', FLAG: 5' > tct tct aga tca ctt atc gtc gtc atc ctt gta atc ctt cag gat ccg gat gct c < 3'), 然后用跨整个开放阅读框的引物进行 PCR 反应 (CHP2D1: 5' > ctc ctc gag tgc gcc atg ggg tgc cgc ag < 3', CHP2D2: 5' > tca ctt atc gtc gtc atc ctt gta atc < 3')。其中第一对引物为 FLAG 特异性引物, 用它只能扩增出带有 FLAG 的转录本, 而不能扩增出内源性的 CHP2。第二对引物为 CHP2 特异性引物可特异性扩增内源性的和转入的带有 FLAG 的 CHP2; 应用这 2 对引物对所克隆的 293 稳定转化株进行了筛选, 反应的条件同前。反应产物用 1% 琼脂糖电泳鉴定。

### 1.6.2 蛋白水平上鉴定稳定表达株 (Western Blot)

各取一瓶 pcDNA3 转染后、未转染以及经 PCR 鉴定的 CHP2 转染后的对数生长期的 293 细胞, 1 × PBS 洗 1 遍, 每瓶加入 1 ml 的细胞裂解液, 收集细胞于 1.5 ml 的 EP 管中, 冰上作用 30 min 后, 每管加入 100 μl 1 × SDS-PAGE 上样缓冲液, 煮沸 10 min, 13 000 r/min 离心 10 min, 收集上清。在 12.5% SDS-PAGE 胶上进行电泳 (30 mA, 2 h), 40 V 过夜转印蛋白至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入 1:1 000 稀释的小鼠抗-FLAG MAb M2, 室温作用 1 h, TBS 洗涤 3 遍, 每次 10 min, 加入 1:7 500 稀释的碱性磷酸酶标记的羊抗小鼠 IgG 抗体, 室温孵育 30 min, TBS 洗涤 3 遍, 每次 10 min, 最后在碱性磷酸酶显色液中加入 BCIP/NBT (BCIP 16.5 ml/10 L, NBT 33 ml/10 L) 显色。

### 1.7 CHP2 对细胞增殖作用的影响

将稳定转染获得的 293 细胞, pcDNA3 空载体稳定转染的细胞以及未经转染的细胞以适当的浓度接种于 96 孔板, 每孔加 200 μl DMEM 培养基, 培养 48 h, 在结

束培养前 14 ~ 16 h 每孔加入<sup>3</sup>H-TdR 0.5 μCi (18.5 kBq)。细胞培养结束后,胰酶消化,细胞收获仪(Harvester96Mach II)收获细胞至 96 孔滤纸片上。将滤纸片用塑料膜包备,每袋加入 5 ml β 液闪液,封口机封闭,β 液闪仪测定。

### 1.8 统计学处理

利用 SPSS 统计软件对所得的数据进行两两分析。

## 2 结果

### 2.1 目的基因的获得及真核表达载体的鉴定

通过 PCR 扩增的方法成功克隆了目的基因 CHP2 (图 1A)。将得到的目的基因插入用相应的限制性内切酶进行酶切并经去磷酸化处理的线性载体 pcDNA3 CMV 启动子的下游,通过限制性内切酶筛选阳性克隆(图 1B)。目的基因约为 600 bp,线性载体 pcDNA3 约为 5.4 kb。对有正确插入的克隆进行序列测定。测序结果与 Genbank 中登陆的序列进行比较,未见有突变。

图 1 CHP2 编码基因的获得以及重组载体 pcDNA3-CHP2 的酶切鉴定

Fig.1 The clone of CHP2 encoding gene and the enzyme digestion analysis of the recombination of pcDNA3-CHP2

A: PCR products of CHP2 (1: DNA marker; 2,3: PCR)

B: The result of recombinant enzyme (1: DNA marker; 2: pcDNA3-CHP2; 3: pcDNA3)

### 2.2 稳定转染细胞株的筛选以及鉴定

#### 2.2.1 基因水平的鉴定

将构建的 pcDNA3-CHP2 重组质粒转染 293 细胞,通过药物 G418 筛选,有限稀释获得了多个单细胞克

隆。对获得的稳定转染细胞株首先在 RNA 水平进行鉴定。结果如图 2, 3 所示,在所检测的 4 株细胞中,有 2 株细胞用 2 对引物均能扩增出目的大小特异条带,空载体转染的细胞株以及未转染的细胞株均无条带出现。

图 2 pcDNA3-CHP2 稳定转染 293 细胞株中 CHP2 mRNA 的检测

Fig. 2 Analysis of CHP2 mRNA in the pcDNA3-CHP2 stably transfected 293 cells

A: The primers for PCR was CHP2A1 and Flag;

B: The primers for PCR was D1 and D2

(A1, B1, CHP2-Flag; 1: DNA marker; 2-6: pcDNA3-CHP2; 7: pcDNA3; 8: Positive control; 9: Negative control; A2, B2, G3PDH; 1: DNA marker; 2-6: pcDNA3-CHP2; pcDNA3)

#### 2.2.2 蛋白水平的鉴定 (Western blot)

对基因水平上鉴定出的稳定转染细胞株用 Western blot 的方法在蛋白水平进行进一步的鉴定。结果如(图 3)所示,pcDNA3-CHP2 重组表达子转染后的 293 细胞的裂解物在 23 kD 处存在能被抗 FLAG 抗体 M2 识别的蛋白条带,它与 CHP2 理论上预测的分子量完全相同。而未经转染的 293 细胞和经 pcDNA3 空载体转染的 293 细胞的裂解物均不存在能被 M2 识别的蛋白条带。这证明稳定转染的 293 细胞能够正确的表达 CHP2 蛋白。

#### 2.3 CHP2 蛋白对细胞增殖功能的影响

通过对 CHP2 稳定转染细胞株的筛选,鉴定出两株蛋白表达量不同的 293 细胞 5G9 和 4A10。用<sup>3</sup>H-TdR 掺入的方法检测其对细胞增殖功能的影响。结果发现,与对照组相比 CHP2 蛋白在细胞中的高效表达

能够显著抑制细胞的增殖。CHP2 转染细胞株<sup>3</sup>-TdR 掺入值为( 3770 ± 958. 882 cpm ), 显著低于空载体转染 ( 8188. 111 ± 3236. 745 cpm ) 和未转染细胞株 ( 7816. 556 ± 3038. 974 cpm ) ( *P* < 0. 01 )。

未转染组和空载体转染组之间<sup>3</sup>H-TdR 掺入值的差异无统计学意义, 而这 2 组对照与实验组之间<sup>3</sup>H-TdR 掺入值的差异具有统计学意义 ( *P* < 0. 01 )。

胞 CCL39 中高表达 CHP 能够抑制血清以及小 G 蛋白诱导的 NHE1 的活性, 提示在受到丝裂原刺激时, CHP 可从 NHE1 上解离下来。Pang<sup>[3]</sup>等报道在体内 CHP 能够与 NHE1, NHE2, 以及 NHE3 发生免疫共沉淀, 这提示 CHP 可能参与调解 NHE1-NHE3 以及钙调素 A 亚单位的活性。在我们进行该实验的过程中, 日本学者通过实验提出 CHP2 能够与 NHEs 相互作用, 并且能够抑制细胞的凋亡<sup>[8]</sup>。我们利用筛选得到的稳定转染细胞株, 用<sup>3</sup>H-TdR 掺入的方法检测了 CHP2 对细胞增殖功能的影响, 结果发现 CHP2 在细胞内的高效表达能够明显的抑制细胞的增殖。CHP2 对细胞生物学行为影响的差异可能与其在细胞内的表达量有关, 表达量的差异导致了 CHP2 对 NHEs 的调节方式发生改变, 其具体的机制还有待于进一步的实验证实。

[ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Wang Y, Han KJ, Pang XW, *et al.* Large scale identification of human hepatocellular carcinoma-associated antigens by autoantibodies[ J ]. J Immunol, 2002, 169 ( 2 ): 1102-1109.

[ 2 ] Lin X, Barber DL. A calcineurin homologous protein inhibits GT-Pase-stimulated Na-H exchange[ J ]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93: 12631-12636

[ 3 ] Pang T, Su X, Wakabayashi S, *et al.* Calcineurin homologous protein as an essential cofactor for Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchangers[ J ]. J Biol Chem, 2001, 276 ( 20 ): 17367-17372.

[ 4 ] Rotin D, Steele-Norwood D, Grinstein S, *et al.* Requirement of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger for tumor growth[ J ]. Cancer Res, 1989, 49( 1 ): 205-211.

[ 5 ] Reshkin SJ, Bellizzi A, Caldeira S, *et al.* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-dependent intracellular alkalization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes[ J ]. FASEB J, 2000, 14: 2185-2197.

[ 6 ] Lin X, Sikkink RA, Rusnak F, *et al.* Inhibition of calcineurin phosphatase activity by a calcineurin B homologous protein[ J ]. J Biol Chem, 1999, 274( 51 ): 36125-36131.

[ 7 ] Pang T, Wakabayashi S, Shigekawa M, *et al.* Expression of calcineurin B homologous protein 2 protects serum deprivation-induced cell death by serum-independent activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger [ J ]. J Biol Chem, 2002, 277( 46 ): 43771-43777.

[ 收稿日期 ] 2003 - 08 - 17

[ 修回日期 ] 2003 - 09 - 27

图 3 pcDNA3-CHP2 稳定转染 293 细胞株中 CHP2 蛋白的表达  
Fig. 3 The CHP2 protein expression in the pcDNA3-CHP2 stably transfected 293 cells

1: Marker; 2: The cCHP2-FLAG transfected cell lysate  
3: Vector transfected cell lysate; 4: Untransfected cell lysate

3 讨 论

CHP2 是从肝癌组织中筛选的与肿瘤有关的新的基因。它在肿瘤发生、发展中的作用还没有研究清楚。CHP2 编码蛋白与 CHP 有很高的同源性, 而 CHP 是 NHEs 的重要协同因子。最近有学者报道 CHP 能够抑制钙调素磷酸酶的活性<sup>[6]</sup>。Lin 等<sup>[2]</sup>报道在成纤维细

《 肿瘤防治杂志 》2004 年征订启事

《 肿瘤防治杂志 》由中华人民共和国卫生部主管, 系中华预防医学会系列杂志。“以防为主( 三级预防 ), 防治并举”为本刊的办刊宗旨; 以从事肿瘤基础研究与临床工作者以及医学院校师生为主要读者对象。主要栏目有: 流行病学·预防医学、基础·临床研究、综述·讲座、短篇·病案报道、简讯等。本刊为国家新闻出版署“双效期刊”、“中国生物医学核心期刊”、“中国科技核心期刊”、“中国科技论文统计源期刊”; 被国际著名检索系统美国《 化学文摘( CA ) 》及俄罗斯《 文摘杂志( AJ ) 》收录。

本刊为月刊, 112 页码, 国际标准 A4 开本, 每月底出版, 每期定价 10 元, 全年订价 120 元。刊号 CN37-1355/R, ISSN1009-4571, 国内邮发代号 24-145, 国际代号 4917BM。欢迎读者在当地邮局订阅, 也可直接向本刊编辑部邮购, 每期需增加邮寄费 2 元。

联系地址: 山东省济南市济兗路 440 号 山东省肿瘤医院内《 肿瘤防治杂志 》编辑部( 邮编: 250117 )

电话: ( 0531 ) 7984777-82516; 传真: ( 0531 ) 7984783; E-mail: zgzl@public.jn.sd.cn