

• 论 著 •

人上皮细胞黏附分子的真核表达及鉴定

张敏娜¹, 罗声栋², 胡 燕², 貌盼勇^{2△}

(中国人民解放军第三〇二医院: 1. 感染性疾病诊疗与研究中心; 2. 临床研究管理中心, 北京 100039)

摘 要:目的 构建人上皮细胞黏附分子(EpCAM)全基因的真核表达质粒,研究其在 HepG2 细胞中的表达。方法 将 EpCAM 基因克隆入真核表达载体 pcDNA3.1(+),构建真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-EpCAM,转染人肝癌 HepG2 细胞。通过免疫荧光、Western Blotting 及流式细胞检测对转染后细胞内 EpCAM 蛋白的表达进行鉴定。结果 双酶切鉴定结果表明重组质粒构建成功。免疫荧光、Western Blotting 及流式细胞检测结果一致表明,转染后 EpCAM 基因在 HepG2 细胞中表达成功。结论 成功构建了人 EpCAM 的真核表达载体,并在 HepG2 细胞中表达,为研究高表达人 EpCAM 的肝癌细胞的功能打下基础。

关键词:人上皮细胞黏附分子; 真核表达; 载体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.09.028

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)09-1223-03

Expression and identification of human EpCAM eukaryotic recombinant plasmid

Zhang Minna¹, Luo Shengdong², Hu Yan², Mao Panyong^{2△}

(1. Treatment and Research Center for Infectious Diseases; 2. Research Center for Clinical Medicine, the 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China)

Abstract: Objective To construct human EpCAM eukaryotic recombinant plasmid, and to study the expression of EpCAM protein in HepG2 cells. **Methods** The recombinant plasmid, named pcDNA3.1(+)-EpCAM was constructed by cloning EpCAM gene into eukaryotic vector pcDNA3.1(+). Then HepG2 cells were transfected with EpCAM recombinant plasmid. The eukaryotic expression of EpCAM protein was verified by immunofluorescence, Western Blotting and flow cytometry. **Results** The construction of EpCAM recombinant eukaryotic plasmid was identified by restriction enzyme digestion. The results of immunofluorescence, Western Blotting, and flow cytometry consistently indicated that EpCAM protein were successfully expressed in HepG2 cells. **Conclusion** Human EpCAM eukaryotic vector is constructed and EpCAM protein could be expressed well in HepG2 cells, which laid a foundation for further research on the function of hepatocarcinoma cells highly expressing EpCAM.

Key words: epithelia cell adhesion molecule; eukaryotic expression; vector

人上皮细胞黏附分子(EpCAM)是最早在结肠癌中发现的一种跨膜糖蛋白,也是第一个用单克隆抗体技术鉴定出来的人肿瘤相关抗原^[1]。EpCAM 广泛表达于上皮来源的正常组织^[2],并在多种上皮源性癌组织中不同程度的过表达^[3]。已被多项研究证实与肿瘤的诊断和预后密切相关。在肝细胞癌中,虽然 EpCAM 表达率较低,但由于近年来的研究认为 EpCAM 为肝癌干细胞标记,而受到越来越多的关注^[4]。本研究对人肝细胞癌组织来源的 EpCAM 全基因序列在肝癌细胞系中进行了真核表达研究,为探讨高表达 EpCAM 的肝癌细胞功能打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料 EpCAM RNA 由本院行肝癌切除术患者的肝癌组织中提取。HepG2 细胞由医院临床研究管理中心保存。逆转录试剂盒(SuperScript III Reverse Transcriptase)、转染试剂盒(Lipofectamine™ 2000)、RIPA 裂解液均购自 Invitrogen 公司。DNA 片段纯化试剂盒(EasyPure Quick Gel Extraction Kit)、Anti-his 鼠单克隆抗体、FITC 标记羊抗鼠-IgG 抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔 IgG 抗体、Trans1-T1 感受态细胞均购于全式金公司。鼠抗人 EpCAM 单克隆抗体 MOC-31(EpCAM 细胞外结构域抗体)购自 AbD Serotec 公司,兔抗人 Ep-ICD 单克隆抗体(EpCAM 细胞内结构域抗体)购自 Abcam 公司,anti-EpCAM-PE 抗体购自 BD 公司。限制性核酸内切酶 Kpn I、Xba I 购自 NEB 公司。质粒中量提取试剂盒购

自 Qiagen 公司。

1.2 引物合成 根据 GenBank 数据库中提交的 EpCAM 基因序列(ID:DQ891338)设计两对引物,对 EpCAM 全基因序列进行巢式 PCR 扩增。外引物正向序列 5'-3': TCC CGC GCC CCT CTT CTC,反向序列 5'-3': ATT TGC TAT TTC CCT TCT TCT,用于第 1 轮 PCR 扩增。内引物正向序列 5'-3': GGT ACC ATG TAC CCA TAC GAC GTC CCA GAC TAC GCT GCG CCC CCG CAG GTC CT,添加 Kpn I 酶切位点及 HA-tag 序列,反向序列 5'-3': TCT AGA TTA ATG GTG ATG GTG ATG ATG TGC ATT GAG TTC CCT AT,添加 Xba I 酶切位点及 His-tag 序列,用于第 2 轮 PCR 扩增。扩增产物预计大小为 1 002 bp,按照 pcDNA3.1(+) 载体进行翻译,可用 His-tag 及 HA-tag 抗体进行蛋白表达鉴定。

1.3 EpCAM 基因的扩增 将肝癌组织提取的 RNA 逆转录为 cDNA(操作过程严格按照试剂盒说明书)。以 EpCAM cDNA 为模板,用合成的内、外两对引物进行巢式 PCR 扩增。第一轮扩增反应体系:5×TransStart FastPu DNA 聚合酶缓冲液 10 μL,2.5 mmol/L dNTPs 4 μL,上游外引物 2 μL,下游外引物 2 μL,5×TransStart FastPu DNA 聚合酶 1 μL,EpCAM cDNA 1 μL,dH₂O 30 μL。反应条件:94 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s,52 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,扩增 30 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。第二轮扩增反应体系:5×TransStart FastPu DNA 聚合酶缓冲液 10 μL,2.5 mmol/L dNTPs 4 μL,上游内引物 2 μL,下游内引

物 2 μL , 5 $\times$ TransStart FastPu DNA 聚合酶 1 μL , 第 1 轮 PCR 产物 1 μL , dH₂O 30 μL 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 扩增 2 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 扩增 2 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 扩增 22 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。将琼脂糖凝胶电泳鉴定正确的 EpCAM 基因序列连接到平末端载体 pEASY-Blunt Simple, 转化至 Trans1-T1 感受态细胞, 扩增培养单克隆菌落并提取质粒。PCR 及酶切鉴定正确的重组质粒送 Sangon Biotech 公司测序。

1.4 EpCAM 真核表达载体的构建 用限制性核酸内切酶 Kpn I 和 Xba I 同时酶切测序正确的重组质粒及真核表达载体 pcDNA3.1(+), 胶回收纯化目的片段。连接反应体系: 10 $\times$ T4 DNA 连接酶缓冲液 10 mmol/LATP 1 μL , pcDNA3.1(+)-酶切片段 1 μL , 重组质粒酶切片段 7 μL , T4 DNA 连接酶 1 μL 。连接反应条件: 25 $^{\circ}\text{C}$ 连接反应 1 h, 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。转化至 Trans1-T1 感受态细胞, 扩增培养单克隆菌落并提取质粒, 将酶切鉴定及测序均正确的重组质粒命名为 pcDNA3.1(+)-EpCAM。中提质粒, 应用紫外分光光度计检测质粒的浓度, 备转染用。

1.5 重组质粒 pcDNA3.1(+)-EpCAM 转染 HepG2 细胞 HepG2 细胞用含有 10% 胎牛血清、1% 非必需氨基酸及双抗(链霉素+青霉素)的 DMEM 培养基于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 的培养箱中传代培养。将对数生长期的细胞接种于六孔板, 待细胞贴壁生长密度达 70%~80% 时, 换无抗菌药物培养液。按照质粒质量与转染试剂体积 2:5 的比例对其进行转染, 用 Opti-MEM (每孔 250 μL) 稀释转染试剂(每孔 10 μL), 混匀后静置 5 min; Opti-MEM(每孔 250 μL) 稀释质粒(每孔 4 μg); 转染试剂稀释液与质粒稀释液混匀后静置 20 min 后加入六孔板培养液中。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 6 h 后更换为含抗菌药物的 DMEM 全培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养。

1.6 间接免疫荧光 转染前 1 d 于六孔板中放入无菌盖玻片, 将胰酶消化的 HepG2 细胞铺于六孔板。转染 pcDNA3.1(+)-EpCAM 质粒的 HepG2 细胞继续于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24~48 h, 至细胞长至单层密度约 90%, 将细胞玻片取出, PBS 洗片, 冷丙酮固定, 晾干。取制备好的细胞片置于载玻片上, 放置于黑色湿盒内, PBS 洗片; 拟行抗-EpICD 染色的细胞片加 0.1% Trixon 100 破膜处理 5 min, PBS 洗片; 加 5% 牛血清白蛋白封闭 30 min; 分别加一抗: 抗-his 鼠单克隆抗体(浓度 1:200)或鼠抗人 EpCAM 单克隆抗体 MOC-31(浓度 1:200)或兔抗人抗-EpICD 抗体(浓度 1:200), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 洗片后加 FITC 标记山羊抗鼠单抗(浓度 1:200)、伊文蓝衬染细胞核, 湿盒内室温避光孵育 40 min; PBS 洗片后用 10% 甘油封片。于荧光显微镜下观察拍照。

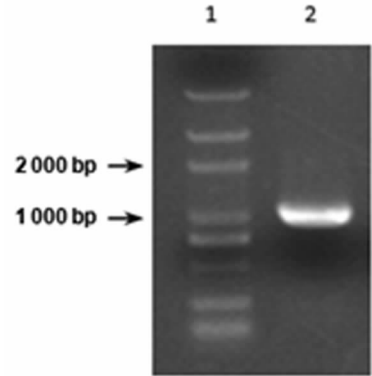
1.7 Western Blotting 检测 EpCAM 真核表达蛋白 收集转染 pcDNA3.1(+)-EpCAM 质粒 24 及 48 h 后的 HepG2 细胞, 用 RIPA 裂解液冰上裂解细胞, 加入蛋白上样液, 煮沸 5 min, 12 000 g 离心 5 min, 取上清进行 SDS-PAGE 电泳; 转膜及脱脂牛奶封闭后, 加兔抗人抗-EpICD 抗体(浓度 1:5 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用 PBST 洗膜, 加 HRP 标记羊抗兔 IgG(浓度 1:3 000), 室温孵育 1 h, PBST 洗膜后显影成像。

1.8 流式细胞仪检测 HepG2 细胞 EpCAM 表达率 收集转染 pcDNA3.1(+)-EpCAM 质粒 48 h 的 HepG2 细胞; PBS 洗细胞 2 次; 100 μL PBS 重悬后加入抗-EpCAM-PE 抗体, 室温避光染色 20 min; PBS 洗细胞 2 次; 用 200 μL PBS 重悬细胞,

流式细胞仪检测。

2 结果

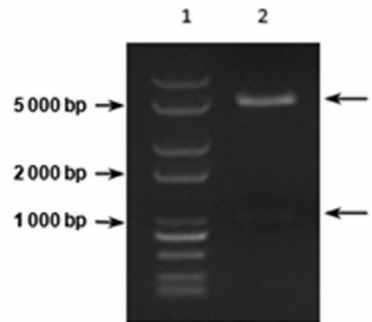
2.1 EpCAM 基因扩增电泳结果 经巢式 PCR 扩增后, 1% 琼脂糖凝胶电泳分析显示 1 条约 1 000 bp 的 DNA 片段, 与预计条带大小相符, 见图 1。测序分析后与 Genbank 中 EpCAM 基因(ID: DQ891338)ORF 序列比对, 完全一致, 表明 EpCAM 基因扩增成功。



泳道 1: Trans2K Plus II DNA 标记物; 泳道 2: EpCAM 基因扩增产物。

图 1 EpCAM 基因的扩增

2.2 EpCAM 真核表达质粒的酶切鉴定结果 用 Kpn I 和 Xba I 酶切重组真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-EpCAM, 电泳结果显示大小约 5.4 kbp 和 1 000 bp 的两条 DNA 条带, 其中 5.4 kbp 的条带为载体 pcDNA3.1(+), 1 000 bp 的条带为插入的 EpCAM 基因, 均与预计大小相符, 表明 EpCAM 基因重组真核表达质粒构建成功, 酶切电泳图见图 2。

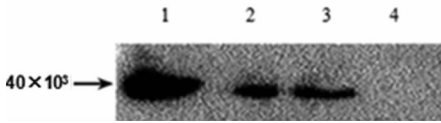


泳道 1: Trans2K Plus II DNA 标记物; 泳道 2: EpCAM 重组质粒的酶切产物。

图 2 重组真核表达质粒的酶切分析

2.3 pcDNA3.1(+)-EpCAM 质粒转染 HepG2 细胞的免疫荧光检测结果 荧光显微镜下观察到成功转染入 pcDNA3.1(+)-EpCAM 质粒的 HepG2 细胞, 经 EpCAM 胞外域抗体(MOC-31)、胞内域抗体(抗-EpICD)、抗-His 抗体染色均可于胞浆见翠绿色荧光。对照组 HepG2 细胞呈暗红色, 未见荧光。见图 3(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.4 Western Blotting 检测 EpCAM 表达的结果 pcDNA3.1(+)-EpCAM 质粒转染入 HepG2 细胞的蛋白提取物进行 SDS-PAGE 电泳, Western Blotting 结果显示转染重组质粒 24 h 及 48 h 后的细胞蛋白样品均在约 40×10^3 处出现目的条带, 提示 EpCAM 融合蛋白的成功表达, 并验证了所表达蛋白的抗原活性。如图 4 所示。



1. EpCAM 蛋白阳性对照(EpCAM 原核表达融合蛋白);2. 转染 pcDNA3.1(+)-EpCAM 质粒 24 h 后的蛋白样品;3. 转染 48 h 后;4. 阴性对照(HepG2 细胞蛋白样品)。

图 4 Western Blotting 分析 EpCAM 真核表达蛋白的特异性

2.5 流式细胞仪检测 HepG2 细胞 EpCAM 阳性率的结果 未转染质粒的 HepG2 细胞 EpCAM 阳性细胞率 0.6%, 转染 pcDNA3.1(+)-EpCAM 重组质粒后 EpCAM 阳性细胞率升高到 20.2%。见图 5(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

3 讨 论

EpCAM 为 I 型跨膜糖蛋白,相对分子质量约为 40×10^3 , 由 314 个氨基酸构成,分子结构包括:细胞外结构域(EpEX)、单次跨膜结构域和细胞内结构域(EpICD)。EpCAM 可介导非 Ca^{2+} 依赖性同源细胞间的黏附,促进细胞周期和细胞增殖^[5],并与肿瘤的发生、进展、侵袭及转移等相关^[6]。近年来,EpCAM 被多项研究证实为肿瘤干细胞标记。由于 EpCAM 是目前表达最强和最广泛的肿瘤抗原之一,可能成为大多数上皮源性肿瘤免疫治疗的靶点。目前,EpCAM 抗体对于结肠癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌等的治疗主要还处于临床试验阶段。已经在德国上市的鼠来源抗 EpCAM 单克隆抗体 Edrecolomab(ED)是第一个用于治疗人类胃肠道肿瘤并显示出延长整体生存期的临床疗效的单克隆抗体^[7-8]。EpCAM 双特异性抗体 Catumaxomab 也于 2009 年被欧盟委员会批准应用于 EpCAM 表达阳性肿瘤患者的恶性腹水的治疗,并显示出仅次于上皮癌的明确的临床获益^[9]。在肝细胞癌方面,近年研究认为 EpCAM 为肝癌干细胞标记物,EpCAM 表达阳性的肝癌细胞也同时表达其他肝干细胞标记,具备自我更新和分化能力及较高的侵袭性,能够在 NOD/SCID 小鼠(非肥胖糖尿病严重联合免疫缺陷小鼠)中诱生高侵袭性的肝癌^[10]。但对于 EpCAM 在肝癌中的作用机制及未来可能的诊疗方面的应用还有待于进一步研究。本研究为最大程度地模拟表达 EpCAM 的肝癌细胞的生物学行为,选择 HepG2 细胞系作为 EpCAM 的真核表达细胞。前期流式细胞仪及细胞免疫荧光检测均显示其 EpCAM 天然表达率很低。HepG2 细胞转染 EpCAM 真核表达重组质粒后,应用 EpCAM 特异性胞外域、胞内域抗体及抗-His 标签抗体行免疫荧光检测,均观察到表达 EpCAM 蛋白的细胞胞浆翠绿色荧光染色;Western Blotting 分析显示转染真

核表达质粒的细胞蛋白样品呈现 EpCAM 的特异性条带;流式细胞仪检测显示,转染后的 HepG2 细胞 EpCAM 阳性率显著升高。以上结果均表明 EpCAM 重组质粒真核表达成功,与原核表达系统相比,真核表达产物更接近于天然分子的构象,为研究 EpCAM 表达阳性的肝癌细胞的生物学行为奠定了基础。

参考文献

- [1] Herlyn M, Steplewski Z, Herlyn D, et al. Colorectal carcinoma specific antigen; detection by means of monoclonal antibodies[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979, 76(3): 1438-1442.
- [2] Winter MJ, Nagtegaal ID, Van Krieken JH, et al. The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology[J]. Am J Pathol, 2003, 163(6): 2139-2148.
- [3] Went PT, Lugli A, Meier S, et al. Frequent EpCAM protein expression in human carcinomas[J]. Hum Pathol, 2004, 35(1): 122-128.
- [4] Gires O, Klein CA, Baeuerle PA. On the abundance of EpCAM on cancer stem cells[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(2): 143.
- [5] Münz M, Kieu C, Mack B, et al. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation[J]. Oncogene, 2004, 23(34): 5748-5758.
- [6] Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, et al. The biology of the 17-1A antigen (EpCAM)[J]. J Mol Med, 1999, 77(10): 699-712.
- [7] Sears HF, Atkinson B, Mattis J, et al. Phase-I clinical trial of monoclonal antibody in treatment of gastrointestinal tumours[J]. Lancet, 1982, 1(8275): 762-765.
- [8] Riethmüller G, Schneider-Gädick E, Schlimok G, et al. Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma[J]. Lancet, 1994, 343(8907): 1177-1183.
- [9] Heiss MM, Murawa P, Koralewski P, et al. The trifunctional antibody catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer; results of a prospective randomized phase II / III trial[J]. Int J Cancer, 2010, 127(9): 2209-2221.
- [10] Yamashita T, Ji J, Budhu A, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features[J]. Gastroenterology, 2009, 136(3): 1012-1024.

(收稿日期:2016-01-02)



(上接第 1222 页)

- 工作性能评价[J]. 检验医学, 2012, 27(7): 531-533.
- [9] 吴新忠, 庞鑫, 姚妍娇. UF-100 尿液分析仪细菌计数对泌尿道感染的诊断性能评价[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(16): 2764-2766.
 - [10] 齐杰, 潘健, 韩江, 等. 尿流式有形成分及干化学分析在尿路感染诊断中的应用评价[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(6): 630-634.
 - [11] Shang YJ, Wang QQ, Zhang JR, et al. Systematic review and meta-analysis of flow cytometry in urinary tract infection screening[J]. Clin Chim Acta, 2013, 424(1): 90-95.

- [12] 梅燕萍, 崔薇薇, 王一杉. COBIO XS 尿有形成分分析仪在筛查尿路感染中的应用[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(7): 884-885.
- [13] 徐媛. 尿液有形成分分析与尿培养诊断尿路感染的临床研究[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(12): 1680-1681.
- [14] Manoni F, Fornasiero L, Ercolin M, et al. Cutoff values for bacteria and leukocytes for urine flow cytometer Sysmex UF-1000i in urinary tract infections[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2009, 65(2): 103-107.

(收稿日期:2015-12-28)