

· 论著 ·

抑癌基因肌足蛋白抗体制备及其在肝细胞癌中的检测

厦门大学附属中山医院病理科 (361004) 陈守惠 邱 凯¹ 钱洪流² 梁 洁¹ 吴若华 陶 涛¹

【摘要】 目的 制备肌足蛋白 (myopodin) 抗体, 探讨 myopodin 在培养细胞以及在肝癌组织中的表达。方法 构建 pGEX4 T2-N-myopodin 重组表达质粒, 转化大肠杆菌并诱导蛋白表达, N-myopodin 蛋白纯化, 免疫新西兰家兔得到多克隆抗体。对 HeLa、T24、MG63、HEK293 T 和 NIH3 T3 等细胞株进行 myopodin 免疫荧光染色, 并对原发性肝细胞癌组织和癌周正常肝组织进行 myopodin 蛋白印迹检测。结果 兔抗 N-myopodin 多克隆抗体具有良好的特异性和敏感性。免疫荧光染色发现, 不同细胞株细胞内 myopodin 的分布不同。蛋白印迹检测显示, myopodin 在肝癌组织表达低于癌旁组织。结论 myopodin 在细胞内分布不同, myopodin 蛋白表达与肝细胞癌发生有一定关联。

【关键词】 抗体制备; 肌足蛋白; 肝细胞癌

【中图分类号】 R73-3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2009)02-0001-04

Preparation of an anti-myopodin antibody and detection of myopodin protein in hepatocellular carcinoma

Chen Souhui, Qiu Kai, Qian Hongliu, Liang Jie, Wu Ruohua, Tao Tao. Department of pathology, The Affiliated Zhongshan Hospital, Xiamen University, Xiamen 361004, China

【Abstract】 Objective To prepare anti-myopodin antibody and study the significance of myopodin expression in cell lines and hepatocellular carcinoma tissues. **Methods** Construction of the plasmid pGEX-4 T2-N-myopodin, flowed by transformed and induced it in *E. coli*, than expression and purification of N-myopodin protein. Preparation of rabbit anti-myopodin antibody. The expression of myopodin was analyzed by immunofluorescence and Western blot in HeLa, T24, MG63, HEK293 T and NIH3 T3 cell lines and hepatocellular carcinoma tissues and normal liver tissues respectively. **Results** The anti-myopodin antibody was proved having good specificity and sensitivity. Immunofluorescence staining showing that the subcellular distribution of myopodin was cell type-dependent. The myopodin expression level of hepatocellular carcinoma tissues was lower than that in normal liver tissues. **Conclusion** The subcellular distribution of myopodin is cell type-dependent. There is a correlation between myopodin protein and development of hepatocellular carcinoma.

【Key words】 Preparation of antibody; Myopodin; Hepatocellular carcinoma

肌足蛋白 (myopodin) 是 2001 年分别由 Peter Mundel 和 Jian-Hua Luo 所领导的两个科研小组发现并报道的^[1,2]。研究表明 myopodin 是突足蛋白 (synaptopodin) 家族的第二个成员, 在 myopodin 的羧基端存在着与 synaptopodin 的同源区。除此以外, 未发现 myopodin 与其他已知蛋白有同源性。突足蛋白在体内只表达于肾小球的足细胞和大脑神经元的树突^[1,3], 它的表达与神经元和足细胞的终末分化密切相关。myopodin 主要存在于肌肉组织, 其他组织也有不同程度表达^[1]。突足蛋白和 myopodin 都可与肌动蛋白直接结合, 并能促进肌动蛋白束的形成。最新研究表明, myopodin 有 3 个亚型, 分别由 1093、1109 和 1261 个氨基酸组成, 它们在氨基端的 PDZ 区域相同, 可以在细胞内同时表达^[4]。值得注意的是, 在与恶性肿瘤相关性的研究中发现, myopodin 基因缺失、甲基化和低表达与前列腺癌和膀胱癌的发生、转移和复发相关, 被认为具有肿瘤抑制作用^[5,7,2,3]。Myopodin 蛋白低表达或基因缺失, 可作为判断前列腺癌和膀胱癌预后

的指标。肝癌是我国常见的恶性肿瘤, 其发病机理及复发和转移等问题还不十分清楚, 作为新的抑癌基因 myopodin 在肝癌中的表达如何, 对肝癌的发生有何作用等问题值得探讨。为此, 我们制备 N-myopodin 多克隆抗体, 并对其在培养细胞和肝细胞癌中的表达进行研究。

1 材料方法

1.1 N-myopodin 抗体的制备与鉴定:

1.1.1 质粒、菌种与细胞株: 质粒 pGEX-4 T2、重组质粒 EGFP-F-myopodin (105 Kd)、EGFP-N-myopodin (65 Kd)、EGFP-M-myopodin (65 Kd)、大肠杆菌 DH5、BL21 以及 HeLa (人宫颈癌细胞株)、T24 (人膀胱癌细胞株)、MG63 (人骨肉瘤细胞株)、HEK293 T (人胚肾细胞株)、NIH3 T3 (小鼠胚胎成纤维细胞株) 和 C2C12 (成肌细胞株) 均为本实验室保存。

1.1.2 重组表达载体的构建及鉴定: 从人肌肉组织提取总 RNA, 以其中 mRNA 为模板, 在 Oligo (dT) 和逆转录酶

国家自然科学基金资助项目 (90608007)

1 厦门大学生命科学学院; 2 厦门大学医学院

作用下反转录 cDNA。并以此为模版, 5'-AAA AAGCT-TATGTTTAA GAA GCGACGT CGG3 为上游引物 (引入 Hind 酶切位点), 以 5'-AAAGGATCCTACTCCTTG-GACCA GATTAG3 为下游引物 (引入 BamHI 酶切位点), 扩增得到人类全长 myopodin ORF (2 094bp)。再以此 DNA 为模版, 以 5'-AAAAAGG ATCCTTTAA-GAA GCGACGTCCG3 和 5'-AAA GAATTCACCTTT-GTTTGG3 为引物, 分别在上游和下游引入 BamHI 和 EcoRI 酶切位点, 扩增出 myopodin N 端 1077bp 片段 (N-myopodin, 1077bp)。将 N-myopodin 双酶切后插入 pGEX-4T-2 载体, 构建 pGEX-4T-2-N-myopodin 重组表达质粒。将重组质粒转化受体菌 *E. coli* DH5 进行鉴定。

1.1.3 重组蛋白的表达: 经鉴定无误后, 将 pGEX-4T-2-N-myopodin 转化受体菌 *E. coli* BL21, IPTG 诱导表达 GST-N-myopodin 融合蛋白。诱导表达条件为 25 ℃, 0.2 mmol/L 异丙基 -D-硫代半乳糖 (IPTG), 5 h。离心收集菌体, 超声破碎。10 000g 离心 10 min, 收集上清。

1.1.4 GST-N-myopodin 融合蛋白的纯化: 采用 GST-beads 方法, 将含有 GST-N-myopodin 融合蛋白的上清液经与 GST-beads 孵育、PBS 清洗和谷胱甘肽洗脱等步骤, 获得纯的 GST-N-myopodin。

1.1.5 GST-N-myopodin 多克隆抗体的制备: 将纯化的 GST-N-myopodin 蛋白溶液与等体积弗氏佐剂混合, 按 0.5mg 蛋白/kg 体重, 皮下多点、多次注射免疫 2 只新西兰家兔。约 10 周后, 抗血清效价达 10^{-5} , 心脏采血并分离血清保存备用。

1.1.6 N-myopodin 多克隆抗体特异性检测: 以 T24、293T、C2C12 细胞本源的 myopodin (85kD) 和分别转染了质粒 EGFP-F-myopodin (105kD)、EGFP-N-myopodin (65kD)、EGFP-M-myopodin (65kD) 的 293T 细胞所表达的不同分子量的 myopodin 作为目的蛋白, 检测 N-myopodin 多克隆抗体的特异性。主要操作为: 分别将上述细胞裂解,

将裂解液进行 SDS-PAGE, 然后将电泳条带转移至 PVDF 膜上, 以 N-myopodin 抗血清为一抗 (1:500), 过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 为二抗 (1:2000), 进行蛋白印迹检测。

1.2 N-myopodin 在培养细胞和人肝细胞癌中的检测:

1.2.1 N-myopodin 在培养细胞中的检测: 对癌细胞株 HeLa、T24 和 MG63 以及非癌细胞株 HEK293T 和 NIH3T3 进行免疫荧光染色, 一抗为上述制备的 N-myopodin 多克隆抗体, 稀释度为 1:20, 二抗为罗丹明标记的羊抗兔 IgG, 稀释度为 1:100。用 DAPI 复染胞核。

1.2.2 人肝细胞癌和正常肝组织中 N-myopodin 蛋白印迹检测: 将未经固定的肝细胞癌和癌周正常肝脏组织进行匀浆、离心取上清、测总蛋白浓度, 将上清进行 SDS-PAGE。一抗为上述制备的 N-myopodin 多克隆抗体, 稀释度为 1:500; 过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 为二抗, 稀释度为 1:2000, 进行蛋白印迹检测。

2 结果

2.1 PCR 产物鉴定结果:

2.1.1 人类全长 myopodin 基因 ORF 鉴定: 相应 RT-PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 可见在 2 000 bp 处有一特异性条带, 分子量大小与 myopodin 基因预计值 2 094 bp 相符 (图 1), 此即人类全长 myopodin 基因 ORF。

2.1.2 N-myopodin 鉴定: 相应 PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 在 1000bp 处可见清晰条带, 其大小与预计值 1077bp 相符 (图 2)。

2.2 重组表达载体鉴定: 将重组质粒 pGEX-4T-2-N-myopodin 转化 *E. coli* DH5, 挑单菌落做菌落 PCR 鉴定, 在 1 000bp 处可见清晰条带 (图 3a), 筛选出阳性克隆, 再提取质粒, 通过 BamHI 和 EcoRI 双酶切鉴定, 同样在 1 000bp 处可见清晰条带 (图 3b), 测序结果表明 N-myopodin 基因的序列也完全正确, 说明重组质粒 pGEX-4T-2-N-myopodin 构建正确。

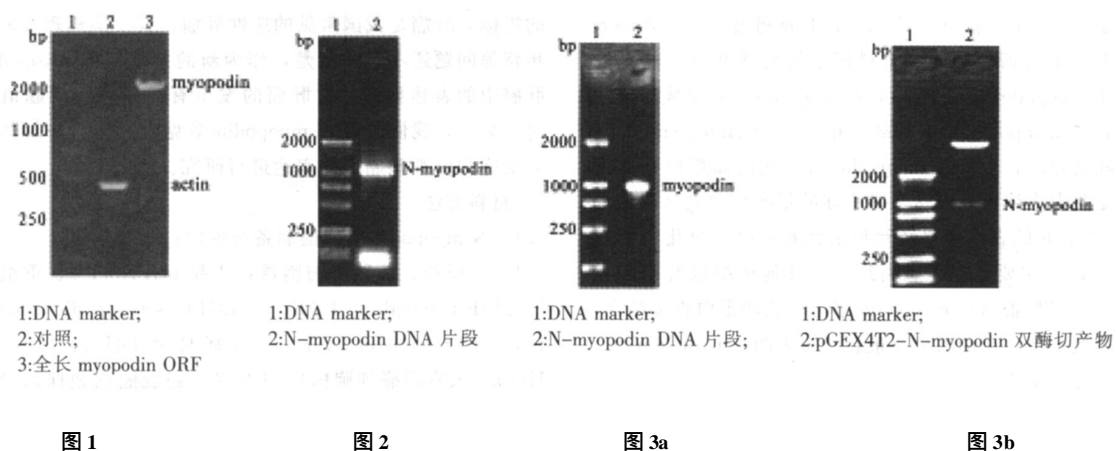


图 1 myopodin ORF RT-PCR 产物电泳图谱 图 2 N-myopodin DNA 扩增产物电泳图谱 图 3a pGEX4T2-N-myopodin 转化 DH5 后菌液 PCR 电泳图谱 图 3b pGEX4T2-N-myopodin 双酶切产物 PCR 电泳图谱

2.3 重组蛋白表达与纯化鉴定: 质粒 pGEX-4T-2-N-myopodin 转化的 *E. coli* BL21 菌体经诱导后, SDS-PAGE 显示在 65kD 的位置有 1 条强表达带 (图 4, 孔 2), GST-N-myopodin 融合蛋白的分子量为 65kD 与理论推算值一致。经 GST

beads 回收纯化后的电泳条带清晰, 未见其他杂带 (图 4, 孔 1)。

2.4 N-myopodin 抗体特异性检测: 蛋白印迹结果显示, T24、293T、C2C12 细胞裂解液 (检测细胞本源 myopodin)

均在 85kD 处见清晰条带 (图 5a), 分别转染质粒 EGFP-F-myopodin (105kD)、EGFP-N-myopodin (65kD)、EGFP-M-myopodin (65kD) 的 293T 细胞的裂解液, 在相应 105kD 和 65kD 处可见清晰条带 (图 5b)。说明 N-myopodin 的多克隆抗体具有良好的特异性。

2.5 N-myopodin 在培养细胞中检测: 荧光显微镜观察发

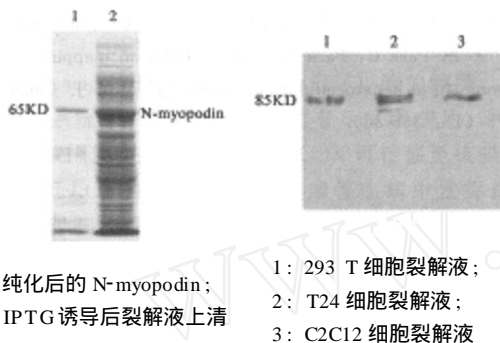


图 4

图 5a

现, HeLa 和 T24 细胞, myopodin 主要分布在胞质中, MG63 细胞, 胞质和胞核中都有; 而在非癌的 NIH3T3 和 HEK293T 细胞中, myopodin 主要分布在细胞核中。

2.6 N-myopodin 在肝细胞癌中表达: 经蛋白印迹检测发现, 癌周肝组织 myopodin 蛋白表达较肝癌组织高 (图 6)。

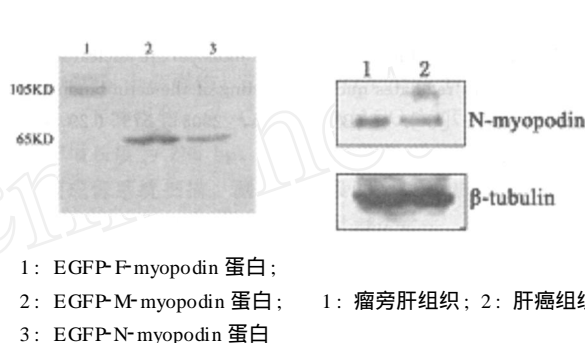


图 5b

图 6

图 4 N-myopodin 蛋白表达和纯化的 SDS-PAGE 电泳图谱 图 5a N-myopodin 抗体对细胞内源性 myopodin 蛋白检测电泳图谱 图 5b 细胞内转染的 EGFP-F-myopodin、EGFP-N-myopodin、EGFP-M-myopodin 蛋白特异性检测电泳图谱 图 6 癌组织和癌旁肝组织蛋白印迹电泳图谱

3 讨论

前列腺癌和膀胱癌的体内外试验表明, myopodin 是一个新的肿瘤抑制基因, 细胞内 myopodin 高表达可抑制肿瘤细胞生长、转移和复发。反之, 表达降低或不表达预示肿瘤不良预后^[3,7]。因此, 检测癌组织 myopodin 表达可作为肿瘤预后的重要指标。目前这方面研究限于前列腺癌和膀胱癌, 我国高发的胃癌、食道癌和肝癌等还未进行系统研究。为此, 我们制备 myopodin 多克隆抗体, 为各种恶性肿瘤研究提供试剂。myopodin 蛋白脯氨酸含量较高 (~13%) 且在蛋白质结构中均匀分布, 使得 myopodin 蛋白以直链形式存在, 提纯后易被降解。所以, 我们没有制备针对全长 myopodin 分子的抗体, 而是克隆并表达 N-myopodin, 制备抗 N-myopodin 多克隆抗体。经蛋白印迹试验, 无论是细胞本源 myopodin, 还是不同分子量的外源性 myopodin, 均能被 N-myopodin 抗体准确检测出来, 说明该抗体具有良好的特异性。

在前列腺, 无论是正常腺上皮还是癌细胞, myopodin 均定位在胞核^[7]。在膀胱移行上皮和移行上皮癌, myopodin 为核、浆分布^[3]。由此可见, myopodin 在不同组织细胞内的分布是有差异的。我们在对不同细胞株进行 myopodin 免疫荧光染色时发现, HeLa 和 T24 细胞, myopodin 主要分布在胞质中, MG63 细胞, 胞质和胞核中都有; 而在非癌的 HEK293T 和 NIH3T3 细胞中, myopodin 主要分布在细胞核中。其中 HeLa 和 HEK293T 的结果与文献报道一致^[8]。这一结果表明, myopodin 在培养细胞内的分布也是有差异的。这种差异可能体现了 myopodin 不同的功能状态。有研究表明, 当分化成熟的肌细胞受到热休克刺激时 (43 °C), 原分布于胞质的 myopodin 又重新回到胞核, myopodin 可以在胞质和胞核之间穿梭^[11]。myopodin 在胞质内, 体现它作为结构蛋白的功能; myopodin 进入核内, 则与信号传导有关。有文献报道, 介导大分子蛋白进出胞核的

importin 蛋白超家族成员之一 importin 13 参与介导 myopodin 的入核过程, 对这一过程进行调控无论对正常细胞还是肿瘤细胞的分化都有重要的意义^[9]。

经蛋白印迹检测发现, 肝癌组织 myopodin 蛋白的表达低于癌周肝组织, 此外, 40 例肝癌组织免疫组化染色结果亦如此 (结果待发表)。myopodin 基因定位在 4 号染色体长臂 2 区 5 带 (4q25), myopodin 蛋白羧基端的 19 个氨基酸具有肿瘤抑制活性, 在超过 50% 的浸润性前列腺癌中可检测到 myopodin 基因的全部或部分缺失, 或 myopodin 基因的杂合子缺失^[2,6]。myopodin 蛋白的低表达与 myopodin 基因的杂合现象、基因缺失和甲基化有关^[10]。肝癌也存在着各种染色体的异常^[11], 如一些染色体上基因的杂合子缺失: 1p、8p、13q、16q, 以及 4q 缺失和一些基因的杂合现象^[12]。我们的试验结果, 肝癌细胞 myopodin 蛋白的低表达可能和癌细胞 myopodin 基因缺失或甲基化有关, myopodin 蛋白低表达与肝细胞癌发生有一定关联。

参 考 文 献

- Weins A, Schwarz K, Faul C, et al. Differentiation and stress-dependent nuclear cytoplasmic redistribution of myopodin, a novel actin-bundling protein [J]. *J Cell Biol*, 2001, 155 (3): 393-403.
- Lin F, Yu YP, Woods J, et al. Myopodin, a synaptopodin homologue, is frequently deleted in invasive prostate cancers [J]. *American Journal of Pathology*, 2001, 159 (5): 1603-1612.
- Sanchez-Carbayo M, Schwarz K, Charytonowicz E, et al. Tumor suppressor role for myopodin in bladder cancer: loss of nuclear expression of myopodin is cell-cycle dependent and predicts clinical outcome [J]. *Oncogene*, 2003, 22 (34): 5298-5305.
- De GA, De CV, Staes A, et al. Multiple isoforms of the tumor suppressor myopodin are simultaneously transcribed in cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 370 (2): 269-273.
- Jing L, Liu LJ, Yu YP, et al. Expression of myopodin induces

- suppression of tumor growth and metastasis [J]. American Journal of Pathology, 2004, 164 (5): 1799-1806.
- 6 Yu YP, Luo JH. Myopodin-mediated suppression of prostate cancer cell migration involves interaction with zyxin [J]. Cancer Res, 2006, 66 (15): 7414-7419.
 - 7 Yu YP, Tseng GC, Luo JH. Inactivation of myopodin expression associated with prostate cancer relapse [J]. Urology, 2006, 68 (3): 578-582.
 - 8 Ganck AD, Hubert T, Impe KV, et al. A monopartite nuclear localization sequence regulates nuclear targeting of the actin binding protein myopodin [J]. FEBS Letters, 2005, 579 (29): 6673-6680.
 - 9 Liang J, Ke GF, You WJ, et al. Interaction between importin 13 and myopodin suggests a nuclear import pathway for myopodin [J]. Mol Cell Biochem, 2008, 307 (1-2): 93-100.
 - 10 Cebrian V, Alvarez M, Aleman A, et al. Discovery of myopodin methylation in bladder cancer [J]. J Pathol, 2008, 216 (1): 111-119.
 - 11 陈国璋, 周晓军, 刘晓红. 肿瘤病理诊断中遗传学应用进展 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2007, 23 (6): 641-644.
 - 12 Piao Z, Park C, Park JH, et al. Deletion mapping of chromosome 4q in hepatocellular carcinoma [J]. Int. J. Cancer, 1998, 79 (4): 356-360.

5-脂氧合酶在大鼠脊髓缺血组织中表达的实验研究

福建医科大学附属协和医院神经外科 (350001) 蔡冬生¹ 石松生 杨卫忠 陈春美 王春华

【摘要】目的 研究 5-脂氧合酶 (5-LOX) 在大鼠不同缺血时间点脊髓组织中的表达特点。方法 50 只雄性 SD 大鼠随机分成 5 组, 假手术组及缺血 6、12、24、48h 组。采用阻断左肾下 5 条腰动脉的方法建立大鼠脊髓缺血模型, 运用改良的 Tarlov 评分和 HE 染色的方法对脊髓模型进行评价; 免疫组化染色, RT-PCR 方法检测大鼠脊髓组织中 5-LOX 的表达。结果 Tarlov 评分: 假手术组 10 只大鼠均为 4 分, 无一发生瘫痪, 缺血 48h 组 2 只 1 分, 余 8 只完全瘫痪; HE 染色: 假手术组神经细胞外形清楚、结构正常, 缺血 24、48h 组出现大量神经元坏死, 组织中有灶性出血, 可见脊髓组织软化; 免疫组化染色评分 (H-score 法): 5-LOX 正常脊髓组织低表达, 缺血 6、12、24、48h 组表达高于假手术组并呈递增趋势 ($P < 0.01$); RT-PCR 检测: 5-LOX mRNA 在正常脊髓组织表达低, 在缺血 6、12、24、48h 脊髓组织表达高于假手术组并呈递增趋势 ($P < 0.01$)。结论 5-LOX 参与了脊髓缺血继发性的炎症反应, 可作为治疗脊髓缺血的重要靶点。

【关键词】脊髓缺血; 5-脂氧合酶; 靶点

【中图分类号】R744 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1002-2600(2009)02-0004-04

The experimental study of 5-lipoxygenase expression after spinal cord ischemia in rats

Cai Dongsheng, Shi Songsheng, Yang Weizhong, Chen Chunmei, Wang Chunhua. Department of Neurosurgery, the Affiliated Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China

【Abstract】 Objective To study the expression of 5-lipoxygenase (5-LOX) in spinal cord ischemia. **Methods** Ischemia model was set up by ligation of five lumbar arteries below the left renal artery. Fifty Male Sprague Dawley rats were randomly allocated into the following groups: sham group (n = 10), groups separately subjected to 6h (n = 10), 12h (n = 10), 24h (n = 10), 48h (n = 10) of spinal cord ischemia. They were evaluated by tarlov hind limb locomotor rating scale and HE staining. The expressions of 5-LOX were detected by immunohistochemistry and RT-polymerase chain reaction (RT-PCR) in lumbar spinal cord specimens. **Results** Tarlov hind limb locomotor rating scale showed that values of all animals from sham group were 4 and none of them was completely paralyzed. Compared with sham group, 8 animals from group subjected to 48h of spinal cord ischemia were completely paralyzed and tarlov values of the other 2 animals were 1. HE staining showed that the shape and structure of neuron was normal in animals from sham group. But hemorrhage, significant neuron necrosis and myelomalacia was observed in animals from groups subjected to 24h and 48h of spinal cord ischemia. Immunohistochemistry showed that sham group expressed low level of 5-LOX. The expression of 5-LOX was significantly higher in experiment groups than in sham group and increased with prolongation of ischemia time ($P < 0.01$). RT-PCR showed that sham group contains low level of 5-LOX mRNA. The content of 5-LOX mRNA was significantly higher in experiment groups than in sham group and increased with prolongation of ischemia time ($P < 0.01$). **Conclusion** 5-LOX involved in the inflammatory after spinal cord ischemia and caused

福建省教育厅科研资助项目 (JA08099)

1 福建医科大学协和临床医学院神经外科在读硕士