

## ING4 基因真核表达载体的构建及其功能

王金志 缪竞诚 盛伟华 杨吉成<sup>△</sup>  
(苏州大学医学院基础医学系, 苏州 215007)

**摘要** 目的:构建真核表达载体 pcDNA3.0-ING4,观察 ING4 基因对人肝癌 SMMC7721 细胞周期及凋亡的影响。方法:小鼠肝组织经 RT-PCR 扩增,构建真核表达载体 pcDNA3.0-ING4,分别用双酶切、PCR、基因测序进行鉴定,将其转导进入人肝癌 SMMC7721 细胞,检测 ING4 基因的表达情况及其对细胞周期的影响,应用荧光显微镜和激光扫描共聚焦显微镜观察细胞凋亡情况。结果:RT-PCR 产物为约 750 bp 的条带,基因测序正确,转导进入人肝癌细胞株 SMMC7721 后可延长 G<sub>2</sub> 期,其凋亡率 (23.66%)明显高于对照组 (13.75%)。结论:成功分离得到了小鼠 ING4 基因并成功构建真核表达载体 pcDNA3.0-ING4,该质粒转染人肝癌 SMMC7721 细胞后可延长 G<sub>2</sub> 期并可促使细胞凋亡。

**关键词** ING4; 真核表达载体; 基因表达; 肝肿瘤; 细胞周期; 凋亡

### Construction of pcDNA3.0-ING4 eukaryotic expression vector and study on its function

WANG Jin-Zhi, MIAO Jing-Cheng, SHENG Wei-Hua, YANG Ji-Cheng  
(Department of Medicine, Medical College, Suzhou University, Suzhou 215007, China)

**Abstract Objective:** To construct pcDNA3.0-ING4 recombinant eukaryotic expression plasmid and explore the effect of ING4 on cell cycle and cell apoptosis of SMMC7721. **Methods:** Using RT-PCR method, the cDNA encoding the mouse ING4 was isolated and total RNA was extracted from mouse liver tissue. The cDNA fragment was subcloned into the eukaryotic expression vector pcDNA3.0. Analysis by PCR, restricting enzyme digestion and DNA sequencing were carried out to demonstrate the sequence of the plasmid, then the plasmid was transfected into SMMC7721 cell lines by lipofectamine-mediated transfection. Cell cycle was examined by flow cytometry after transfection with pcDNA3.0-ING4; apoptosis was detected by fluorescence microscope with Hoechst 33258 staining and laser scanning confocal microscope. **Results:** RT-PCR product was a 750 bp specific fragment. DNA sequencing revealed that ING4 cloning was successful. Flow cytometric analysis displayed an accumulation of cells in the G<sub>2</sub> phase of cell cycle after transfection with pcDNA3.0-ING4. With Hoechst fluorescence staining, we found that the apoptotic rate in SMMC7721 cells transfected with pcDNA3.0-ING4 (23.66%) was higher than that in HeLa cells transfected with pcDNA3.0 (13.75%,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The gene encoding mouse ING4 and pcDNA3.0-ING4 eukaryotic expression vector are obtained. An accumulation of cells in the G<sub>2</sub> phase of cell cycle was achieved after transfection with pcDNA3.0-ING4, and ING4 can enhance apoptosis of SMMC7721 cells.

**Key words** ING4; eukaryotic expression vector; gene expression; liver neoplasm; cell cycle; apoptosis

ING4(inhibitor of growth family, member 4)可能是一种重要的肿瘤生长抑制因子,它对神经胶质瘤的基因治疗具有潜在的重要价值<sup>[1]</sup>。为了进一步研究该因子对其他肿瘤的治疗作用,我们首先克隆小鼠 ING4 基因并成功构建真核表达载体 pcDNA3.0-ING4,然后利用阳离子脂质体 Lipofectamine 将其转导进入人肝癌 SMMC7721 细胞,通过检测 ING4 基因的表达情况及其对细胞周期及细胞凋亡的影响,进一步拓宽该基因抗肿瘤作用的范围。目前,国内文献中尚未见有类似报导,国外文献中也极少见。

### 1 材料和方法

1.1 动物、细胞、菌种和质粒 昆明鼠购自上海中国科学院基因中心。人肝癌细胞株 SMMC7721 细胞、DH5 $\alpha$  菌株由本室保存,pcDNA3.0 由上海申能博彩生物科技制品有限公司提供。

1.2 酶及主要试剂和仪器 RNA 抽提试剂盒、Taq DNA 聚合酶、限制性核酸内切酶 EcoR I、Xba I、dNTPs、MgCl<sub>2</sub> 均为大连宝生物工程公司产品, pUCm-T 载体试剂盒由 Promega 公司提供,逆转录试剂为上海申能博彩生物科技制品有限公司产品。阳离子脂质体 Lipofectamine 购自 Invitrogen 公司, Hoechst 33258 染色试剂盒为 Beyotime Biotechnology 公司产品。激光扫描共聚焦显微镜 TCS SP2

<sup>△</sup> 通讯作者; E-mail: yinpp28@yahoo.com.cn

(LSCM TCS SP2)由德国 Leica 公司出品,流式细胞仪 EPICS XL 由美国 COULTER 公司出品。

1.3 引物设计 参考 GenBank 登录的小鼠 ING4 基因序列(BC009127/<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行设计,由上海生工生物工程技术有限公司合成,在上游引物中加入 *EcoR* I 酶切位点,下游引物中加入 *Xba* I 酶切位点,序列如下:上游引物 P1: 5'-TTGAATTCATGGCTGCTGGGATGTATTT-GGAAC-3', 下游引物 P2: 5'-CCTCTAGAT-CAGATACATCCACACCTTTTAGCG-3'。

1.4 RT-PCR 扩增小鼠 ING4 cDNA (1)取小鼠肝组织约 150 mg,参照 RNA 抽提试剂盒手册进行总 RNA 的提取。(2)取 3  $\mu$ l 总 RNA,15 mmol/L Oligo dT18 加入 2  $\mu$ l,65 $^{\circ}$ C 作用 5 min;然后加入 5 $\times$ RT 缓冲液 4  $\mu$ l,10 mmol/L dNTPs 2  $\mu$ l 和 0.5  $\mu$ l RNA 酶抑制剂,1  $\mu$ l M-MLV 逆转录酶,最后加双蒸水至总体积为 20  $\mu$ l,置 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h,90 $^{\circ}$ C 处理 10 min 后,可获得 cDNA 模板。(3)取 3  $\mu$ l cDNA 作为模板用上述特异引物进行 PCR 扩增,扩增体积为 50  $\mu$ l,首先 94 $^{\circ}$ C 3 min 预变性,然后进行下列循环,94 $^{\circ}$ C 45 s,58 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,共 32 个循环,72 $^{\circ}$ C 下延伸 10 min。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 真核表达载体的构建与鉴定 将小鼠 ING4 cDNA 与 pUCm-T 载体进行体外连接(参照 Promega 公司 pUCm-T 载体系统说明书进行),然后转化 DH5 $\alpha$  感受态细菌,用抗性筛选法挑选阳性菌落并进行测序,取测序正确的重组质粒进行大量扩增。用 *EcoR* I、*Xba* I 自 pUCm-T 载体上切下目的基因定向连接至 pcDNA3.0 载体对应酶切位点上,构建小鼠 ING4 基因真核表达载体 pcDNA3.0-ING4,转化感受态细菌 DH5 $\alpha$ ,挑选阳性菌落进行测序,将测序正确的 ING4 重组质粒转化 DH5 $\alpha$  细菌。阳性克隆中的真核表达载体鉴定采用 PCR 法和双酶切法(*EcoR* I、*Xba* I),最后测序。

1.6 阳离子脂质体外介导 ING4 基因的转导 取生长旺盛的 SMMC7721 细胞接种至 6 孔板中,含 10% 的小牛血清的 1640 培养基、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 温育,至细胞 80% 成片时进行转染,利用空白载体 pcDNA3.0 质粒转染的细胞作为对照组。转染按照 Lipofectamine 操作手册进行。

1.7 ING4 基因表达的测定 收集转染后 48 h 的细胞检测转录水平的表达,RT-PCR 实验同上。

1.8 流式细胞仪检测细胞周期的变化 pcDNA3.0-ING4 基因转染后的细胞在 G418 筛选培养基中选择培养 7 d,用流式细胞仪对余下存活的细胞进行检测。空白载体 pcDNA3.0 质粒转染的细胞作为对

照组也进行同样处理。

1.9 激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)观察 SMMC7721 细胞凋亡 将 pcDNA3.0-ING4 转染的 SMMC7721 细胞爬片用(Y 啶橙 AO,5  $\mu$ g/ml)作用 30 min,再用碘化丙啶(PI,5  $\mu$ g/ml)作用 30 min,在 LSCM 下观察。

1.10 Hoechst 核染色法检测 SMMC7721 细胞凋亡 将实验组(pcDNA3.0-ING4 质粒转染组)和对照组(pcDNA3.0 质粒转染组)的 SMMC7721 细胞接种至 6 孔板中的盖玻片上,在 G418 选择培养基中培养 7 d,采用 Hoechst 染色试剂盒按照说明书进行染色,在荧光显微镜下观察细胞凋亡。随机选取不同的高倍视野,分别计数正常细胞(细胞核较大,呈弥散均匀的荧光)和凋亡细胞(细胞核皱缩呈致密浓染或碎裂成块状),2 组均取 12 个样本,每个样本均计数 100 个细胞。

1.11 统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件包进行两组间单因素方差分析,统计学处理采用  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

2.1 小鼠 ING4 cDNA 的克隆 经 RT-PCR 扩增得到的产物于 1.2% 琼脂糖凝胶电泳中检测,可见 750 bp 大小的 DNA 片段,与理论预测结果相符(图 1)。

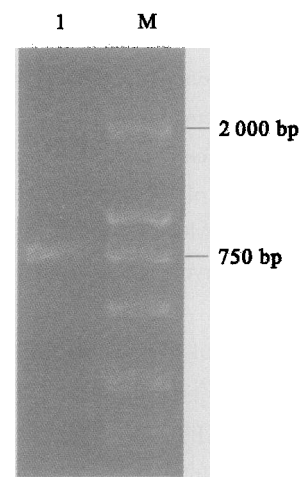


图 1 RT-PCR 扩增产物凝胶电泳分析

Fig 1 Analysis of RT-PCR product by 1.2% agarose gel electrophoresis  
1: products of RT-PCR; M: DNA marker

2.2 基因测序与分析 测序结果与已发表的序列(BC009127/<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)相比除有 1 个碱基发生同义突变外,其余均一致。

2.3 重组质粒 pcDNA3.0-ING4 的鉴定 pcDNA3.0-ING4 质粒经 PCR 和双酶切法(*EcoR* I、*Xba* I)鉴定均出现 750 bp 大小的条带(图 2),测序

结果同上,表明重组载体构建正确。

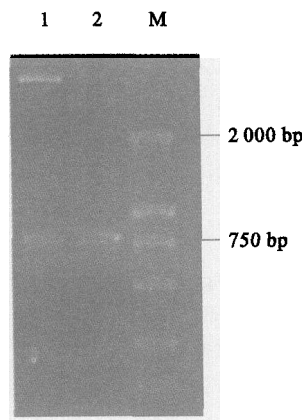


图2 重组质粒的PCR及酶切鉴定

Fig 2 Identification of recombinant vector pcDNA3.0-ING4 by PCR and restriction enzyme digestion

1:pcDNA3.0-ING4/*EcoR*I + *Xba*I ;  
2:PCR product; M:DNA Marker

2.4 ING4 基因在转染细胞中的表达检测 经 RT-PCR 检测证实 ING4 基因转染细胞内有 ING4 mRNA

表达,而转染空白载体 pcDNA3.0 的细胞内无 ING4 mRNA 表达(图 3)。

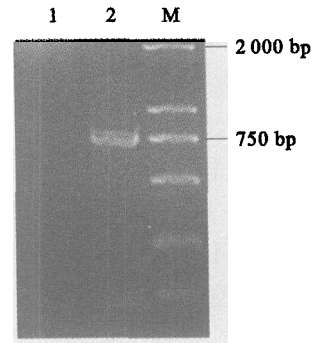


图3 RT-PCR 鉴定 ING4 mRNA

Fig 3 Identification of ING4 mRNA by RT-PCR

1:pcDNA3.0; 2:pcDNA3.0-ING4; M:DNA Marker

2.5 ING4 基因的转染后细胞周期变化的初步观察 经流式细胞仪检测发现转染有 pcDNA3.0-ING4 质粒细胞的 G<sub>2</sub> 期(32.7%)大于转染有 pcDNA3.0 质粒细胞的 G<sub>2</sub> 期(13.4%)。见图 4

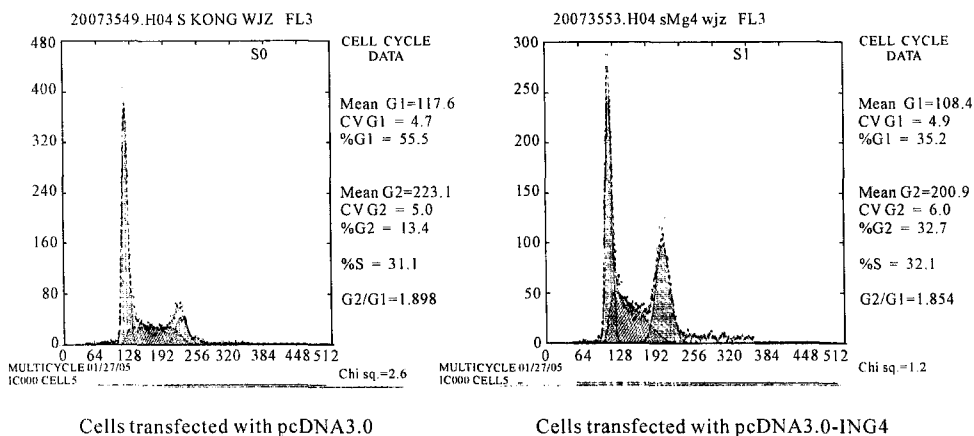


图4 流式细胞仪检测 SMMC7721 细胞周期

Fig 4 Cell cycle of SMMC7721 analyzed by flow cytometry

2.6 LSCM 检测细胞凋亡 正常细胞核较大,呈弥散均匀的荧光,核膜清晰。凋亡细胞核皱缩呈致密浓染或碎裂成块状,核膜模糊或消失(图 5)。

2.7 Hoechst 染色检测 SMMC7721 细胞凋亡 经 Hoechst33258 染色后,正常细胞核较大,呈弥散均匀的荧光,凋亡细胞核皱缩呈致密浓染或碎裂成块状(图 6)。统计结果显示 pcDNA3.0-ING4 质粒转染 SMMC7721 细胞组平均凋亡率为(23.66±11.20)%,明显高于空载体转染 SMMC7721 细胞组平均凋亡率(13.75±6.76)%,差异有显著性( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

肿瘤生长抑制因子家族是肿瘤抑制基因 p53 活动所必需的一个蛋白家族,1996 年 Garkavtsev 等克隆了人生长抑制基因 ING1,ING1 与 p53 相互作用

能够抑制细胞生长,促进细胞凋亡。以后又陆续发现了 ING2 基因、ING3 基因、ING4 基因、ING5 基因。其中人 ING4 基因定位于 12p13-32,有 8 个外显子和 7 个内含子组成,编码 248 个氨基酸<sup>[1~3]</sup>。人与小鼠 ING4 氨基酸组成 99% 以上相同(见 NP-057246/<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 和 NP-579923/<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。人与小鼠 ING4 编码基因(含终止密码子 tag)长度均为 747 bp,本实验得到的 ING4 基因序列与已发表的序列(BC009127/<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)相比有 1 个碱基改变,即第 232 位的 a 变成了 g 导致原来的密码子 gaa 变成了 gag,但两者均编码谷氨酸,故该碱基突变是同义突变,我们获得了小鼠 ING4 编码基因的正确序列。

ING4 基因在神经胶质瘤中几乎丧失功能,该基因编码蛋白的表达水平越低,神经胶质瘤恶性程度越

高<sup>[1]</sup>。在本实验中,我们初步观察了转染 ING4 基因后人肝癌 SMMC7721 细胞周期及凋亡的变化,发现 ING4 基因不但可引起 G<sub>2</sub> 期阻滞(与已有的文献报道<sup>[4]</sup>一致),还可促使细胞凋亡。由于目前市场上尚无 ING4 蛋白的检测试剂盒,所以仅能在转录水平检测 ING4 的表达。

ING4 的功能和作用机制目前还不完全清楚,目前认为 ING4 的作用与核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)和 p53 密切相关。NF- $\kappa$ B 可通过调控 IL-8 转录,刺激肿瘤血管生成并促进肿瘤的浸润和转移<sup>[5,6]</sup>。而新近的研究发现 ING4 可与 NF- $\kappa$ B 蛋白的 P65 亚基结合并抑制 NF- $\kappa$ B 蛋白的活动,引起对 NF- $\kappa$ B 敏感的 IL-8 基因的表达量减少,从而抑制胶质瘤细胞生长和新血管生成<sup>[1]</sup>。ING4 以 p53 依赖的方式抑制细胞生长,促使细胞凋亡<sup>[2]</sup>。ING4 影响细胞周期的进程并提高细胞对 DNA 损伤试剂的化学敏感性<sup>[4]</sup>。从本实验的研究情况来看,ING4 可促使肝癌细胞凋亡,这为以后的基础和临床研究奠定了基础。

图版说明(图见封 2)

图 5 共聚焦显微镜观察细胞凋亡。A:正常 SMMC7721 细胞;B:凋亡的 SMMC7721 细胞。

图 6 Hoechst33258 荧光染色。A:正常 SMMC7721 细胞核;B:凋亡的 SMMC7721 细胞核。

Explanation of figures (See inside front cover)

Fig 5 Detection of apoptosis by LSCM. A: normal SMMC7721 cell; B: apoptotic SMMC7721 cell.

Fig 6 Hoechst33258 fluorescence staining ( $\times 400$ ). A: a nucleus of normal SMMC7721 cell; B: a nucleus of apoptotic SMMC7721 cell.

#### 参考文献

- Igori G, Sergey K, Olga C, *et al.* The candidate tumour suppressor protein ING4 regulates brain tumour growth and angiogenesis. *Nature*, 2004, 428(6980):328-332.
- Shiseki M, Nagashima M, Pedoux RM, *et al.* P29ING4 and p28ING5 bind to p53 and p300, and enhance p53 activity. *Cancer Res*, 2003, 63:2373-2378.
- 徐路生,韩泽广,黄尚志,等. 候选抑癌基因 ING1 的研究进展. *生命的化学*, 2002, 22(3):245-247.
- Zhang X, Xu LS, Wang ZQ, *et al.* ING4 induces G<sub>2</sub>/M cell arrest and enhances the chemosensitivity to DNA-damage agents in HepG2 cells. *FEBS Lett*, 2004, 570(1-3):7-12.
- Inoue K, Slaton JW, Kim SJ, *et al.* Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastasis in human bladder cancer. *Cancer Res*, 2000, 60:2290-2299.
- 付浩,袁媛,孙秀菊,等. IL-8 基因在胃癌及癌前状态中的表达. *中国肿瘤临床*, 2002, 29:237-240.

解剖学杂志 2005 年第 28 卷第 4 期

## 对《人体结构与功能》再版时的几点建议

李 军

(荆州职业技术学院医药卫生系, 荆州 434100)

《人体结构与功能》教材“是根据卫生部 2000 年 3 月在天津召开的卫生部护理学专业教材编写工作会议精神编写的”<sup>[1]</sup>,该教材结合高级护理专业的培养目标,将传统的人体解剖学、组织学与胚胎学和生理学合编于一体,很大程度上减少了三门学科的重复内容和教学时数,同时注意“三基”、“五性”。通过在教学实践中的检验,笔者认为该书不失为一本适合我国护理学专业的面向 21 世纪课程教材。但由于该教材刚刚“出炉”,难免存在一些有待改进的地方。下面就教材中某些方面提出几点建议:

### 1 内容编排方面

1.1 目录内容过多 “目录是书刊上列出的篇章名目”<sup>[2]</sup>,主要便于读者查阅书籍中的内容。但该教材中目录过于详细,有些甚至列出了每节内容中的段落标题。全书目录多达 38 页,约占全书总页数的 5%。

1.2 同一内容重复出现 教材第 1 页“广义的解剖学包括细胞学、组织学、解剖学和人体发育学”,本段文字描述了人体发育学的研究内容,而标题(三)又专门讲述了人体发育学的研究内容。

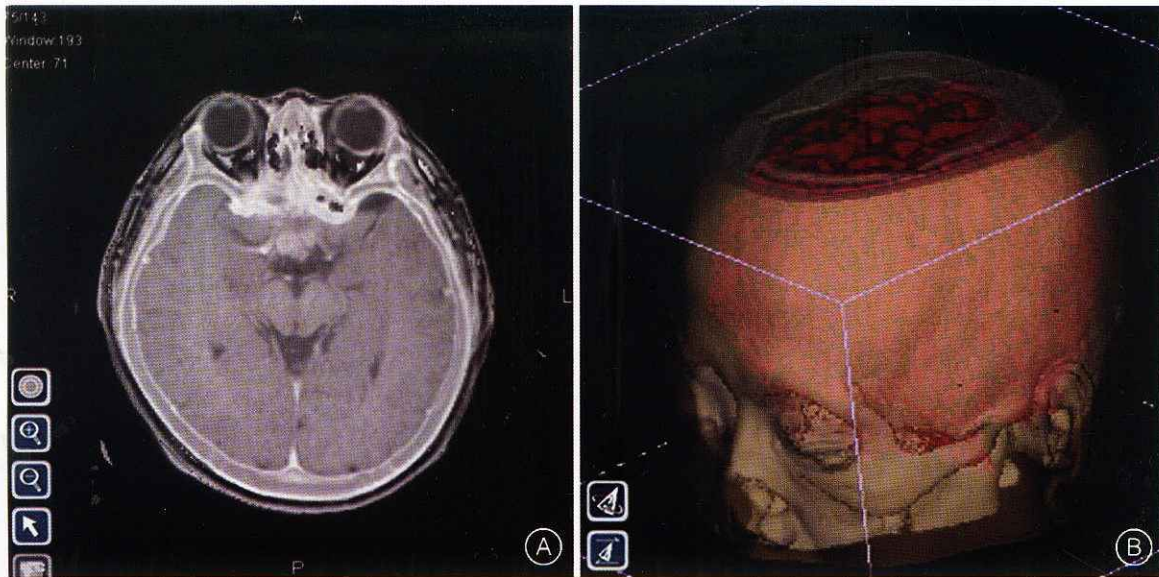
1.3 学习内容的先后顺序安排上,应遵循由浅入深的原则可参考第四版《人体解剖学》。将本书的内容编排如下:绪论;细胞学;运动系统;呼吸系统;消化系统;泌尿系统;生殖系统;血液;循环系统;内分泌系统;免疫系统;感觉器;神经系统;皮肤;能量代谢与体温;人体发育。如此编排,体现了难度上的阶梯式,避免了在学习之初就接触形态学中的难点—神经系统。

### 2 知识点编写方面

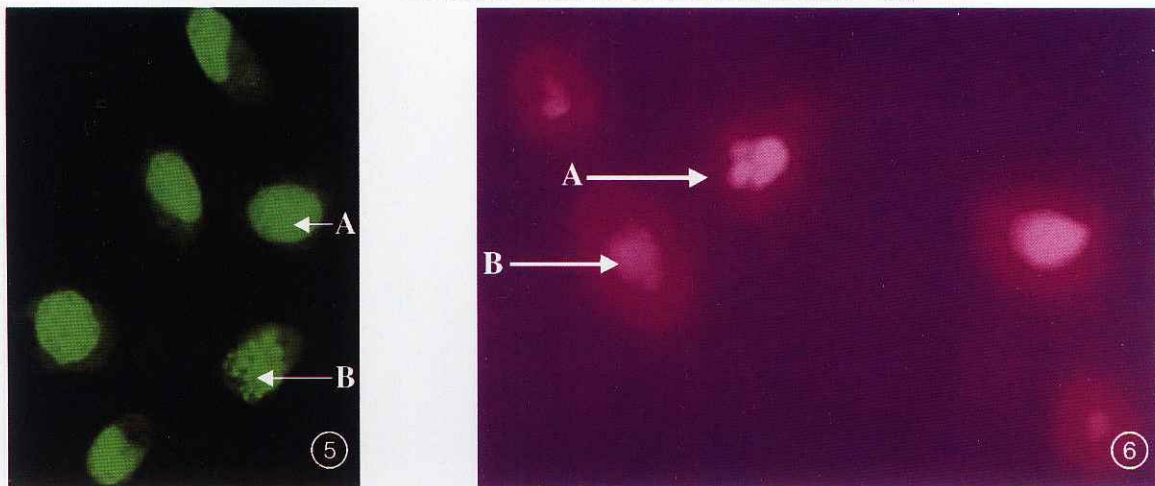
2.1 有些知识点在编写时不够完整,但又是教学中需要弄清楚的问题 例 1:教材第 83 页关于斜方肌的作用的描述,“收缩时使肩胛骨向脊柱靠拢”,但斜方肌起点很广,上、中、下三部分肌束作用不尽相同,应补充入“上部肌束可上提肩胛骨,下部肌束使肩胛骨下降”。例 2:教材第 84 页,有关膈上的 3 个孔,在描述主动脉裂孔时提到了它的位置高度即第 12 胸椎前方,而食管裂孔、腔静脉孔均未提及其位置高度。例 3:教材第 103 页,文中提到了 4 种中枢神经系统的神经胶质细胞的作用,但室管膜细胞的作用只字未提。本章第四节讲述脑脊液

(下转 431 页)

穆晓兰等. 神经外科导航系统基于迭代局部最近点法技术的形态学三维数据场的快速配准与融合 (正文见395页)



王金志等. ING4基因真核表达载体的构建及其功能 (正文见383页)



胡凯猛等. 重组CCL2小鼠黑色素瘤B-16细胞的建立及生物学活性的鉴定 (正文见397页)

