研究报告

上皮组织特异性表达 N-LMP1 和 CR2 转基因猪胚胎成纤维细胞的构建与鉴定

黄海城[1],刘 欢[2],安 靓[1]

(1. 南方医科大学肿瘤研究所, 广州 510515; 2. 深圳华大基因研究院, 深圳 518083)

【摘要】 **目的** 构建上皮组织特异性表达鼻咽癌来源潜伏膜蛋白 1(N-LMP1)和人补体受体 2(CR2)真核表达载体,转染猪胚胎成纤维细胞并筛选整合有 N-LMP1 和 CR2 基因的细胞克隆,为构建与 EBV 感染相关的猪鼻咽癌模型奠定基础。**方法** 通过直接合成 ED-L2 启动子和 N-LMP1,从人 B 淋巴细胞中的 RNA 经 RT-PCR 扩增出 CR2,将上述 3 个片段逐个连接到真核表达载体 pN1 上,构建上皮组织特异性表达 N-LMP1 和 CR2 的载体 pN1-ED-L2-N-LMP1-CR2;用脂质体转染猪胚胎成纤维细胞, 经药物 G418 筛选和 PCR 鉴定阳性克隆。**结果** 成功构建上皮组织特异性表达 N-LMP1 和 CR2 的真核表达载体 pN1-ED-L2-N-LMP1-CR2,并成功整合到猪胚胎成纤维细胞的基因组中,获得了整合有目的基因 N-LMP1 和 CR2 的猪胚胎成纤维细胞克隆。**结论** 获得了上皮组织特异性表达 N-LMP1 和 CR2 的猪胚胎成纤维细胞克隆,为通过细胞核移植方法获得表达 N-LMP1 和 CR2 转基因猪提供了供体细胞。

【关键词】 N-LMP1; CR2; 猪胚胎成纤维细胞; 鼻咽癌

【中图分类号】R33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2014) 02-0001-06

doi: 10.3969.j.issn.1671.7856. 2014.002.001

Construction and identification of transgenic porcine embryonic fibroblasts expressing epithelium-specific N-LMP1 and CR2

HUANG Hai-cheng, LIU Huan, AN Jing

(Cancer Institute, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

【**Abstract**】 **Objective** To construct an eukaryotic expression vector and identify the integration of nasopharyngeal carcinoma-derived oncogene latent membrane protein 1 (N-LMP1) and CR2 gene in porcine embryonic fibroblasts, and to provide a basis for construction of EBV-infection associated swine nasopharyngeal carcinoma model. **Methods** ED-L2 and N-LMP1 were synthesized directly. CR2 was amplified by RT-PCR from human B lymphocytes. The three fragments mentioned above were subcloned one by one into the eukaryotic expression vector pN1, and then the vector was transfected into porcine embryonic fibroblasts using the liposome reagent, according to the manufacturer's protocol. The cells were selected with G418 antibiotic and identified by PCR amplification. **Results** N-LMP1 and CR2 epithelium-specific expression vector was successfully constructed and integrated into the genome of the porcine fibroblasts, and clone cells integrating the N-LMP1 and the CR2 genes were obtained. **Conclusions** The porcine fibroblast clones integrating N-LMP1 and CR2 are obtained and they should be of great value for the construction of N-LMP1 and CR2 transgenic swine via cell

[**基金项目**]国家高技术研究发展计划(863 计划)(K1010524)。

[**作者简介**]黄海城(1989 -),男,硕士研究生,主要从事肿瘤基础研究,E-mail: haicheng891@qq.com。

[**通讯作者**]安靓(1959 -),女,教授,主要从事干细胞与肿瘤干细胞的分化研究及转基因动物的研究,E-mail: anjing77@163.com。

nuclear transfer.

【Key words】 N-LMP1; CR2; Porcine embryonic fibroblasts; Nasopharyngeal carcinoma

鼻咽癌是中国最常见的头颈部肿瘤之一,发病率逐年增长,具有明显的地域性。在其多因素的发展过程中,遗传易感性、EB 病毒和环境因素被认为是主要原因。EBV 是如何进入鼻咽部上皮细胞从而引发鼻咽癌的,至今仍未定论,但 B 淋巴细胞膜上的 EB 病毒受体已经明确为 CR2[1-3],有关上皮细胞是否表达 CR2 至今仍有争论,但已有多位研究者尝试用不同的方法将 CR2 基因导入多种细胞,所有研究均证实,在提高细胞内 CR2 表达水平后,EBV 可成功感染原不能感染的细胞,或能明显提高细胞对 EBV 的感染率[4-7]。LMP1 基因是 EB 病毒最可能的瘤基因,在鼻咽癌组织中获得的 LMP1(N- LMP1)基因不仅在 DNA 序列上与标准实验株 B95-8 来源的 LMP1 (B-LMP1)存在明显差异,而且在功能上与后者也不尽一致,特别是 N-LMP1 的致瘤能力明显强于 B-LMP1[8-10]。因此构建 EBV 感染相关的猪鼻咽癌模型时,用 N-LMP1 就更具有针对性。选用特异性启动子 ED-L2 构建组织特异性表达目的基因的转基因动物已成为一种较成熟的手段。Nakagawa, H.[3, 11]曾利用 ED-L2 启动子指导目的瘤基因 CyclinD1 在转基因鼠舌头、食道、前胃和皮肤组织特异性表达。蓝柯曾用 ED-L2 启动子调节鼻咽癌来源的 LMP1 建立转基因小鼠,并观察到 LMP1 基因在 F0 代小鼠鼻咽部出现了不典型增生病变[3, 12]。从 ED-L2 的表达特性来看,它具有嗜上皮性,而且在鼻咽上皮的表达活性较高,因此,如果利用 ED-L2 构建转基因,可望使目标基因在鼻咽上皮高水平表达。

猪在解剖、组织、生理和营养代谢、血液生化指标、疾病发生过程等方面与人类极为相近[13],猪作为实验动物的一个重要应用是建立人类疾病模型,近年来,体细胞基因修饰技术、体细胞核移植技术的发展使得对猪等大动物进行高效的基因操作成为可能[14,15]。应用该技术只需要对猪的体细胞进行基因修饰,而后通过体细胞核移植即可获得可稳定遗传的基因修饰猪,此项技术的发展推进了猪作为人类疾病动物模型的研究。运用该技术,猪作为人类疾病动物模型已应用在糖尿病、心血管疾病、神经系统疾病及人类异种器官移植等方面[16-20],但在有关鼻咽癌方面尚未见报道。本实验构建了整合了 N-LMP1 和 CR2 基因的猪胚胎成纤维细胞,为制备鼻咽部高表达 N-LMP1 和 CR2 转基因猪提供前提条件,为今后构建与 EBV 感染相关的猪鼻咽癌模型奠定基础。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌种和细胞

E. coli DH5α、质粒 pN1、第一个黄种人基因组测序所使用的炎黄细胞[21](感染 EB 病毒后永生化的人淋巴细胞)和猪胚胎成纤维细胞均由华大基因研究院动物基因工程实验室提供,质粒 pGH-ED-L2 和 pGH-N-LMP1 均由上海捷瑞生物工程有限公司合成

1.2 工具酶与主要试剂

各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购于 New England Biolabs, 2 * Taq Plus PCR Master Mixture、pMD® 18-T Vector、第一链 cDNA 合成试剂盒均购自 TaKaRa (大连) 公司,基因组 DNA 提取试剂盒、质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒均购自 TIANGEN (北京) 公司,Lipofectamine 2000 来自 Invitrogen (美国)公司,胎牛血清、高糖 DMEM、G418、谷氨酰胺和非必须氨基酸均购自 Gibco(美国)公司。

1.3 引物设计与合成

表 1 引物序列

Tab. 1 Sequences of the primers

片段名称 Fragment name	引物名称和序列 Primer name and sequence (5′-3′)
ED-L2	ED-L2-F: ATTAATCCATGGCGGCGGTGATCCACACCT
	ED-L2-R: AGATCTCTCGAGAGTGAGGCACAGC
N-LMP1	N-LMP1-F: AGATCTATGGAACGCGACCTTGA
	N-LMP1-R: GTCGACGGGCCCTGGGTTGGACT
CR2	CR2-F: CCCGGGTATGGGCGCCGCGGGCCTGCT
	CR2-R: ACCGGTTCAGCTGGCTGGGTTGTATGGATC

下划线部位:酶切位点

Underline area: restriction site.

1.4 各元件 PCR 产物的获得与克隆

1.4.1 ED-L2 启动子的获得:以质粒 pGH-ED-L2 为模板,表 1 中 ED-L2-F 和 ED-L2-R 为引物进行 PCR 扩增,扩增程序为: 95℃预变性 5 min,95℃变性 30 s,62℃退火 30 s,72℃ 延伸 2 min,30 个循环;最后 72℃延伸 5 min。将所获得的 ED-L2 片段与 pMD18-T Simple 载体连接、转化,构建 ED-L2 的克隆质粒,经 PCR 鉴定后由华大基因测序。

1.4.2　N-LMP1 基因的获得：以质粒 pGH-N-LMP1 为模板，表 1 中 N-LMP1-F 和 N-LMP1-R 为引物进行 PCR 扩增，扩增程序为：95℃ 预变性 5 min，95℃ 变性 30 s，62℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 2 min，30 个循环；最后 72℃ 延伸 5 min。将所获得的 N-LMP1 片段与 pMD18-T Simple 载体连接、转化，构建 N-LMP1 的克隆质粒，经 PCR 鉴定后由华大基因测序。

1.4.3　CR2 基因的获得：培养炎黄细胞后提取细胞总 RNA，反转录成第一链 cDNA，按照第一链 cDNA 合成试剂盒说明书操作。以第一链 cDNA 为模板，表 1 中 CR2-F 和 CR2-R 为引物进行 PCR 扩增，扩增程序为：95℃ 预变性 5 min，95℃ 变性 30 s，62℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 3 min，30 个循环；最后 72℃ 延伸 7 min。将所获得的 CR2 片段与 pMD18-T Simple 载体连接、转化，构建 CR2 的克隆质粒，经 PCR 鉴定后由华大基因测序。

1.5　N-LMP1 和 CR2 上皮组织特异表达载体的构建

用 Sma Ⅰ 和 Age I 双酶切 CR2 基因回收产物，与同样酶切处理的 pN1 载体进行连接，构建 pN1-CR2 重组质粒；用 Bgl II 和 Sal I 双酶切 N-LMP1 基因回收产物，与同样酶切处理的 pN1-CR2 载体进行连接，构建 pN1-N-LMP1-CR2 重组质粒；用 Ase I 和 Bgl II 双酶切 ED-L2 启动子回收产物，与同样酶切处理的 pN1-N-LMP1-CR2 载体进行连接，转化 *E. coli* DH5α 感受态，卡那青霉素筛选培养，挑取阳性克隆后提取质粒，获得表达载体 pN1-ED-L2-N-LMP1-CR2，对重组质粒进行酶切和 DNA 测序鉴定。

1.6　转染

将猪胚胎成纤维细胞接种于 12 孔板培养皿中，待细胞生长至 85% ~90% 融合度时弃培养基，用 PBS 洗涤细胞 2 次。在微量离心管中准备溶液 A、B。A 液：1 μg 质粒 + 50 μL 无血清培养基；B 液：5 μL Lipofectamine 2000 + 50 μL 无血清培养基。A、B 两液室温孵育 5 min 后温和混合，室温放置 20 min，加入到培养皿内，再用 15% 胎牛血清-DMEM 完全培养基稀释至 1 mL，将培养皿放入 38℃、5% CO_2 培养箱中孵育培养，整个过程不加双抗。

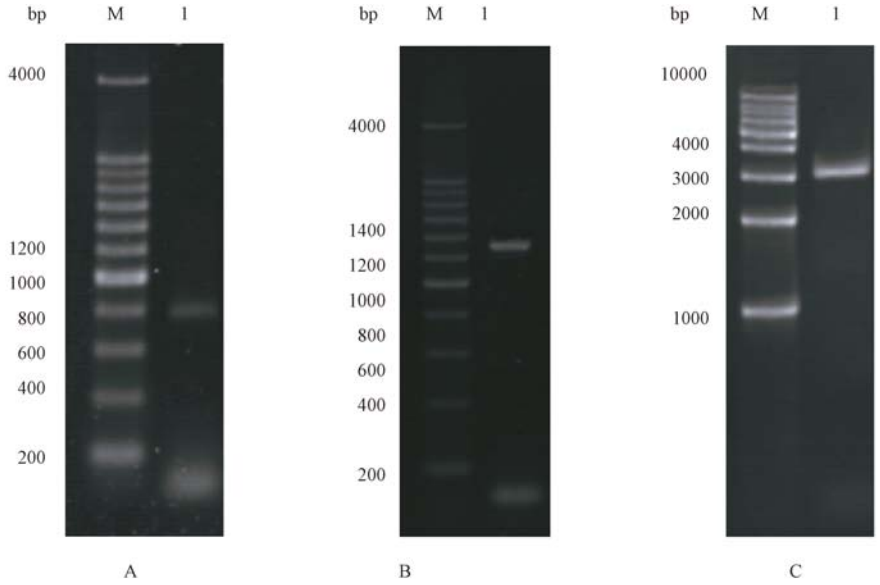
1.7　阳性克隆的筛选与鉴定

转染 72 h 后，在含有 G418（500 mg/mL）的选择培养基中加压筛选 8 d，获得具有抗生素抗性的阳性细胞克隆，扩增培养。取少量细胞提取基因组 DNA 进行 PCR 鉴定，将鉴定阳性的细胞扩大培养冻存，留作核移植供体细胞。

2　结果

2.1　ED-L2、N-LMP1 和 CR2 的扩增

通过 PCR 扩增，获得 794 bp 的 ED-L2 序列和 1 290 bp 的 N-LMP1 序列（图 1），获得的 DNA 片段，大小与预期结果一致，经测序鉴定正确。通过 RT-



A. Lane 1：ED-L2；M：DNA marker（200 bp）；B. Lane 1：N-LMP1；M：DNA marker（200 bp）；C. Lane 1：CR2；M：DNA marker（1000 bp）

图 1　ED-L2、N-LMP1 和 CR2 的 PCR 扩增

Fig. 1　PCR amplification of ED-L2, N-LMP1 and CR2

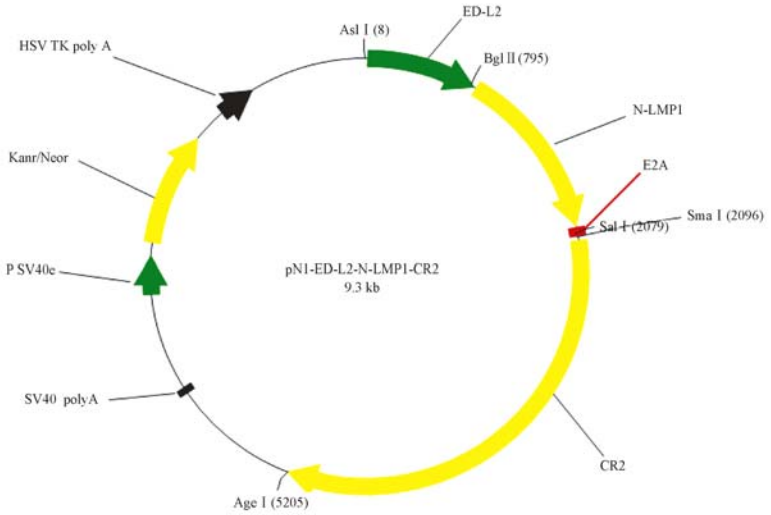


图 2 重组质粒 pN1-ED-L2-N-LMP1-CR2 的构建

Fig. 2 Construction of recombinant plasmid pN1-ED-L2-N-LMP1-CR2

PCR 扩增,获得3 115 bp 的 CR2 片段(图 1),经测序鉴定与 GenBank 中序列进行 Blast 比对,结果一致。

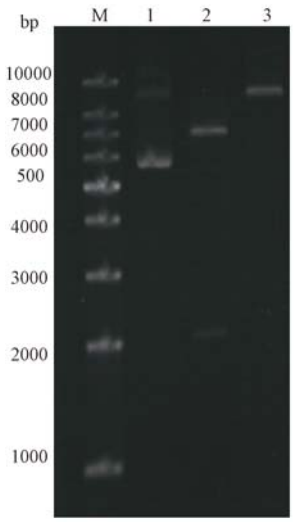
2.2 上皮组织特异性表达 N-LMP1 和 CR2 的表达载体 pN1-ED-L2-N-LMP1-CR2 的构建与鉴定

2.2.1 pN1-ED-L2-N-LMP1-CR2 的构建:构建的载体以 ED-L2 为启动子,N1 自带的 SV40polyA 为终止信号,Neomycin 是 G418 筛选标记。见图 2。

2.2.2 pN1-ED-L2-N-LMP1-CR2 载体的酶切鉴定结果:重组质粒 pN1-ED-L2-N-LMP1-CR2 经 Ase I 和 Sal I 双酶切后理论上可切出7 218 bp 的片段和 2 071 bp 的片段,经 Ase I 单酶切为 9.3 kb 的片段,电泳图片符合理论要求,且测序与预期序列完全一致,载体构建成功。见图 3。

2.3 阳性克隆的鉴定

在含有 G418 的选择培养基中筛选 8 d,获得具有抗生素抗性的阳性细胞克隆,提取细胞基因组 DNA 为模板扩增出 N-LMP1 基因(1 290 bp)和 CR2 基因(3 115 bp)片段,说明所得到的阳性细胞的基因组已经插入了目的片段。见图 4。



M: DNA marker (1kb); Lane 1: pN1-ED-L2-N-LMP1-CR2 before enzyme digestion; Lane 2: pN1-ED-L2-N-LMP1-CR2 Ase I/Sal I enzyme digestion; Lane 3: pN1-ED-L2-N-LMP1-CR2 Ase I enzyme digestion.

图 3 重组质粒 pN1-ED-L2-N-LMP1-CR2 的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of the recombinant plasmid pN1-ED-L2-N-LMP1-CR2 by enzyme digestion

3 讨论

LMP1 基因是 EB 病毒最可能的瘤基因,在 EB 病毒与鼻咽癌的关系这一研究领域中,LMP1 的研究是一大热点。LMP1 是一跨膜蛋白,标准株 EBV 来源的 LMP1(B-LMP1)含有 386 个氨基酸,它由一个短的 N 端胞内区,跨膜区及一个长的 C 端胞内区组成。NPC 来源的 LMP1 基因(N-LMP1)由 Hu 等克隆,来自中国鼻咽癌患者,它的 DNA 序列与标准株 LMP1 存在明显差异,最明显的差异在于它的第三外显子有一个 30 bp 碱基的缺失和 3 个 33 bp 重复序列的插入,从而导致它编码 404 个氨基酸[8]。研究表明,N-LMP1 在生物学功能上与标准株 LMP1 至少存在如下不同点[3, 9, 10, 22, 24]:1、N-LMP1 比 B-LMP1 致瘤性强;2、N-LMP1 活化 NFkB 的能力比 B-LMP1 强;3、N-LMP1 的免疫原性比 B-LMP1 低;4、N-

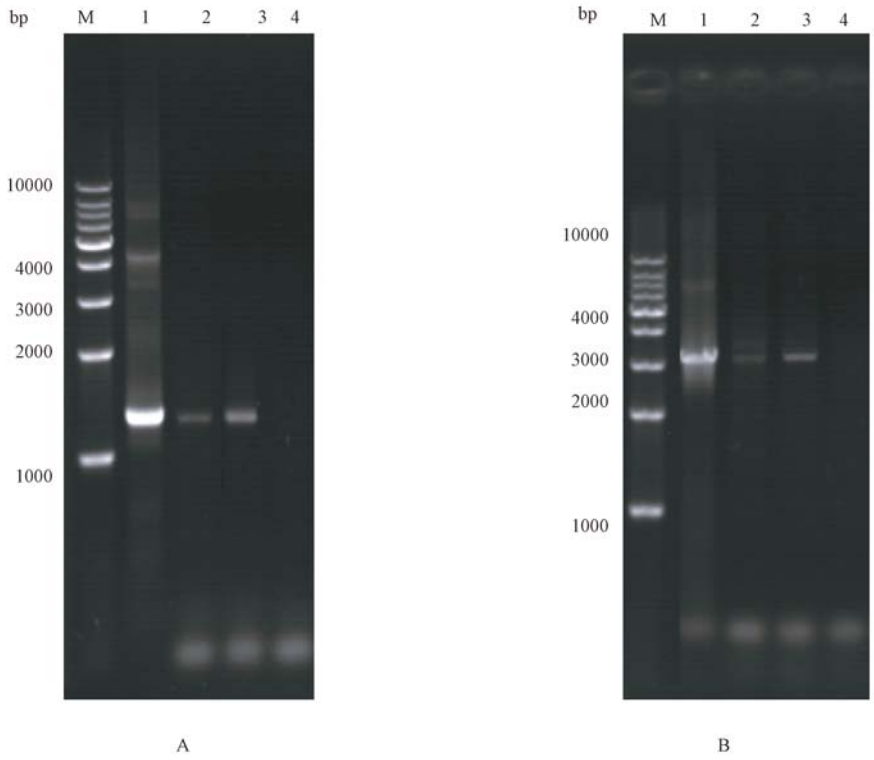


图 4 阳性克隆的鉴定

A: PCR products of the N-LMP1 gene; M: DNA marker (1kp); Lane 1: Positive control; Lane 2-3: Clone cells; Lane 4: Negative control; B: PCR products of the CR2 gene; M: DNA marker (1kp); Lane 1: Positive control; Lane 2-3: Clone cells; Lane 4: Negative control.

Fig. 4 Identification of the positive clone cells

LMP1 比 B-LMP1 能更大程度上调 EGFR 的表达。CR2 是一个分子量为 145 kD 的单链糖蛋白,N 端在细胞外,含 20 个氨基酸的疏水信号肽及 1005 个氨基酸的膜外区,接着是 24 个氨基酸的疏水跨膜区,C 端由 34 个氨基酸构成胞浆尾,属单一跨膜蛋白受体。CR2 原为补体 C3d 的配体,后来的研究发现,EBV 主要壳膜糖蛋白 gp350/220 分子中含有与 C3d 分子受体结合区核心序列 EDPGKQLYNVEA 高度同源的序列 EDPGFENVEI,因而 EBV 同样可与 CR2 分子结合[25]。为了能在鼻咽部上皮组织细胞里同时表达 N-LMP1 和 CR2 这两种蛋白,本实验运用了上皮特异性启动子 ED-L2,构建了载体 pN1-ED-L2-N-LMP1-CR2,N-LMP1 和 CR2 之间含有环-螺旋结构,导致两个目的基因翻译后不会形成融合蛋白。本研究所构建的载体经酶切与测序鉴定正确,将载体转入猪胚胎成纤维细胞,所获得克隆细胞经 PCR 鉴定目的基因 N-LMP1 和 CR2,获得整合了两个目的基因的胚胎成纤维细胞,为以后利用核移植技术生产鼻咽部上皮表达 N-LMP1 和 CR2 转基因猪提供了供体细胞,为今后构建与 EBV 感染相关的猪鼻咽癌模型奠定了基础。

参考文献:

[1] Chodosh J, Gan Y, Holder VP, et al. Patterned entry and egress by Epstein-Barr virus in polarized CR2-positive epithelial cells [J]. Virology, 2000, 266(2):387 - 396.

[2] Nemerow GR, Moore MD, Cooper NR. Structure and function of the B-lymphocyte Epstein-Barr virus/C3d receptor [J]. Adv Cancer Res, 1990, 54:273 - 300.

[3] Frade R, Barel M, Ehlin-Henriksson B, et al. gp140, the C3d receptor of human B lymphocytes, is also the Epstein-Barr virus receptor [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985, 82(5):1490 - 1493.

[4] Volsky DJ, Shapiro IM, Klein G. Transfer of Epstein-Barr virus receptors to receptor-negative cells permits virus penetration and antigen expression [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980, 77(9):5453 - 5457.

[5] Li QX, Young LS, Niedobitek G, et al. Epstein-Barr virus infection and replication in a human epithelial cell system [J]. Nature, 1992, 356(6367):347 - 350.

[6] 纪志武, 李保民, 曾毅. 采用病毒受体基因转移技术建立 EB 病毒细胞感染模型 [J]. 病毒学报, 1994, 10(2):154 - 158.

[7] Fingeroth JD, Diamond ME, Sage DR, et al. CD21-Dependent infection of an epithelial cell line, 293, by Epstein-Barr virus [J]. J Virol, 1999, 73(3):2115 - 2125.

[8] Hu LF, Zabarovsky ER, Chen F, et al. Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma [J]. J Gen Virol, 1991, 72 (Pt 10): 2399 - 2409.

[9] Hu LF, Chen F, Zheng X, et al. Clonability and tumorigenicity of human epithelial cells expressing the EBV encoded membrane protein LMP1[J]. Oncogene, 1993, 8(6):1575 - 1583.

[10] Li SN, Chang YS, Liu ST. Effect of a 10-amino acid deletion on the oncogenic activity of latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus [J]. Oncogene,1996, 12(10):2129 - 2135.

[11] Nakagawa H, Wang TC, Zukerberg L, et al. The targeting of the cyclin D1 oncogene by an Epstein-Barr virus promoter in transgenic mice causes dysplasia in the tongue, esophagus and forestomach [J]. Oncogene, 1997, 14(10):1185 - 1190.

[12] 蓝轲, 乔贵林, 沈新民, 等. 鼻咽癌来源潜伏膜蛋白 1 的表达诱发转基因小鼠鼻咽不典型增生 [J]. 动物医学进展, 2002, 23(5):46 - 48.

[13] 王桂花, 尹晓敏, 孙霞, 等. 国内外小型猪资源概况 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(2): 71 - 73.

[14] Dinnyes A, De Sousa P, King T, et al. Somatic cell nuclear transfer: recent progress and challenges [J]. Cloning Stem Cells, 2002, 4(1):81 - 90.

[15] 魏庆信, 郑新民, 赵浩斌, 等. 转基因猪研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2005, 15(2):112 - 115.

[16] Umeyama K, Watanabe M, Saito H, et al. Dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1alpha induces diabetes in transgenic-cloned pigs [J]. Transgenic Res, 2009, 18(5):697 - 706.

[17] Yang D, Yang H, Li W, et al. Generation of PPARgamma mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning [J]. Cell Res, 2011, 21(6):979 - 982.

[18] 陈华. 小型猪动脉粥样硬化模型 [J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(5):376 - 380.

[19] Kragh PM, Nielsen AL, Li J, et al. Hemizygous minipigs produced by random gene insertion and handmade cloning express the Alzheimer's disease-causing dominant mutation APPsw [J]. Transgenic Res, 2009, 18(4):545 - 558.

[20] 俞远京. 转基因克隆猪与人类异种器官移植 [J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(1):50 - 53.

[21] Wang J, Wang W, Li R, et al. The diploid genome sequence of an Asian individual [J]. Nature, 2008, 456(7218):60 - 65

[22] Johnson RJ, Stack M, Hazlewood SA, et al. The 30-base-pair deletion in Chinese variants of the Epstein-Barr virus LMP1 gene is not the major effector of functional differences between variant LMP1 genes in human lymphocytes [J]. J Virol, 1998, 72(5): 4038 - 4048.

[23] Miller WE, Cheshire JL, Baldwin AJ, et al. The NPC derived C15 LMP1 protein confers enhanced activation of NF-kappa B and induction of the EGFR in epithelial cells [J]. Oncogene, 1998, 16(14):1869 - 1877.

[24] Trivedi P, Hu LF, Chen F, et al. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded membrane protein LMP1 from a nasopharyngeal carcinoma is non-immunogenic in a murine model system, in contrast to a B cell-derived homologue [J]. Eur J Cancer, 1994, 30A(1):84 - 88.

[25] Nemerow GR, Houghten RA, Moore MD, et al. Identification of an epitope in the major envelope protein of Epstein-Barr virus that mediates viral binding to the B lymphocyte EBV receptor (CR2) [J]. Cell, 1989, 56(3):369 - 377.

〔修回日期〕2013-11-19