

LncRNA-GHET1 过表达胃癌细胞株的构建与验证^{*}

刘娟娟^{1**}, 周春欢¹, 夏英², 赵娟娟³, 万颖¹, 黄海^{1***}

(1. 贵州医科大学 检验学院, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵阳中医学院第一附属医院, 贵州 贵阳 550001; 3. 贵州医科大学附院, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 构建与验证 LncRNA-GHET1 过表达的胃癌细胞株 MGC803, 观察 LncRNA-GHET1 在胃癌细胞株 MGC803 中表达情况。方法: 从人胃癌细胞株 MGC803 中扩增出 LncRNA-GHET1, 将其克隆到 pcDNA3.1 (-) 载体上, 构建真核表达载体 pcDNA3.1-GHET1; 利用脂质体法将构建好的 pcDNA3.1-GHET1 转染胃癌细胞株 MGC803, 并用 G418 筛选出 LncRNA-GHET1 稳定表达的细胞株; 通过 RT-qPCR 验证筛选的细胞株。结果: 经双酶切分析以及测序验证, 成功构建真核表达载体 pcDNA3.1-GHET1; pcDNA3.1-GHET1 转染胃癌细胞株 MGC803, 转染效率达 95% 以上, 经 RT-qPCR 验证, 成功构建 LncRNA-GHET1 过表达稳定转染胃癌细胞株 MGC803。结论: 成功构建真核表达载体 pcDNA3.1-GHET1 以及 LncRNA-GHET1 过表达稳定转染胃癌细胞株 MGC803, 为进一步研究 LncRNA-GHET1 基因在胃癌发生发展中的作用奠定基础。

[关键词] 长链非编码 RNA; LncRNA-GHET1; 过表达; 胃肿瘤; 癌; 真核表达载体

[中图分类号] R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)12-1365-05

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.12.01

Construction and Identification of LncRNA-GHET1 Overexpression Cell Line

LIU Juanjuan¹, ZHOU Chunhuan¹, XIA Ying², ZHAO Juanjuan³, WAN Ying¹, HUANG Hai¹

(1. Department of Medical Laboratory Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;

2. 1st Affiliated Hospital of Guiyang University of Chinese Medicine, Guiyang 550001, Guizhou, China;

3. The Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To construct and identify overexpressing gastric cancer cell line MGC803 of LncRNA-GHET1 and observe the expression level of LncRNA-GHET1 in gastric cancer cell line MGC803. **Methods:** LncRNA-GHET1 was amplified from human gastric cancer cell line MGC803 and cloned into pcDNA3.1 (-) vector to construct eukaryotic expression vector pcDNA3.1-GHET1. pcDNA3-GHET1, which was constructed by liposome assay, was transfected into gastric cancer cell line MGC803, and the cell line which stably expressing LncRNA-GHET1 were screened by G418 and verified by RT-qPCR. **Results:** The eukaryotic expression vector pcDNA3.1-GHET1 was successfully constructed by double digestion analysis and sequencing validation. pcDNA3.1-GHET1 was transfected into gastric cancer cell MGC803 with transfection efficiency over 95%, and overexpressing stably-transfected gastric cancer cell line MGC803 of LncRNA-GHET1 was successfully constructed by RT-qPCR verification. **Conclusions:** The successful construction of eukaryotic expression vector pcDNA3.1-GHET1 and overexpressing stably-transfected gastric cancer cell line MGC803 of LncRNA-GHET1 could be utilized for further study in LncRNA-GHET1 gene in the development of gastric cancer. **[Key words]** long non-coding RNA; LncRNA-GHET1; overexpression; gastric neoplasms; carcinoma; eukaryotic expression vector

^{*}[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81460364, 81760429); 贵阳市科技计划项目(20161001015)

^{**} 贵州医科大学 2014 级硕士研究生

^{***} 通信作者 E-mail: huanghai828@gmc.edu.cn

网络出版时间: 2018-11-15 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20181115.2134.027.html>

胃癌发病率在全球癌症中排第 4 位,死亡率位居第 2 位,中国的胃癌发病率位居亚洲第 3 位,死亡率位居第 1 位^[1-3]。胃癌的发生是一个多步骤、多因素进行性发展的过程,涉及多条信号传导通路的异常改变^[4],因此研究胃癌的发生发展对胃癌的诊断与治疗至关重要。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, LncRNA) 是一类转录本长度超过 200 nt、且不能编码蛋白质的 RNA 分子,目前的研究表明 LncRNA 与胃癌的发生发展以及预后息息相关^[5-10]。胃癌高表达的 LncRNA 转录本 1 (LncRNA gastric carcinoma high expressed transcript 1, LncRNA GHET1) 可促进胃癌细胞的增殖、侵袭、迁移,增加对肿瘤药物的抵抗,具有作为临床诊断分子标志物的潜能^[11-13]。获得目的基因完整序列是研究此基因对肿瘤细胞生物学性状影响与分子机制的基础,本研究旨在通过构建真核表达载体 pcDNA3.1-GHET1 并使其在胃癌 MGC803 细胞中稳定过表达,为进一步研究 LncRNA-GHET1 在胃癌的发生发展中的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

胃癌细胞株 MGC803 为本实验室保存,真核表达载体 pcDNA3.1(-) 为贵州医科大学分子生物重点实验室赠予。RNA 提取试剂盒购于上海生工生物,PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase 高保真酶、反转录试剂盒、SYBR[®] Premix Ex Taq[™]、大肠杆菌 DH-5 α 均购于 TAKARA 公司,胎牛血清、胰蛋白酶、谷氨酰胺、双抗均购于美国 gibco 公司、Opti-MEM、Lipofectamine[™] 2000 Transfection Reagent 均购于 thermo 公司,DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒及琼脂糖凝胶电泳胶回收试剂盒均购自 tiangen 公司,G418 购自索莱宝公司,限制性内切酶(XH_oI、BamH I)、T4 连接酶均购于美国 NEB。PCR 仪(美国 thermo),实时荧光定量 PCR(瑞士 Roche),CO₂ 培养箱(美国 thermo),生物安全柜(美国 thermo)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与限制性内切酶选择 引物设计见表 1。根据 NCBI 中 gene 数据库提供的人 LncRNA-GHET1(NR_130107.1) 的序列,应用 oligo6 软件查找基因中存在的酶切位点,结合 pcDNA3.1(-) 上的酶切位点,选择限制性内切酶 XH_oI 与

BamH I。

表 1 LncRNA-GHET1 的引物序列
Tab.1 Primer sequence of LncRNA-GHET1

引物	序列(5'-3')
GHET1-Forward	CCGCTCGAGAGCCACCGCAAGGTACCAGA
GHET1-Reward	CGCGGATCCATTATGCCCATTTCTTCAGGAG

1.2.2 构建重组真核表达载体 pcDNA3.1-GHET1

提取人胃癌细胞株 MGC-803 全基因组 DNA,采用 pfu 酶通过 PCR 扩增 LncRNA-GHET1,全长 1 903 bp,引物见表 1。PCR 反应条件:预变性 98 ℃ 2 min,98 ℃ 10 s,59 ℃ 60 s,72 ℃ 5 s,此阶段 35 循环;72 ℃ 5 min,PCR 产物纯化试剂盒纯化后,PCR 产物与质粒 pcDNA3.1(-) 均用限制性内切酶 XH_oI 与 BamH I 双酶切,酶切后产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳验证并切胶回收,T4 连接酶 16 ℃ 连接过夜;连接后产物用大肠杆菌 DH-5 α 采用热激法进行转化,接种于含有氨苄青霉素的 LB 固体平板,于培养箱 37 ℃ 培养过夜,次日挑取 8 个单克隆菌落,挑选质粒双酶切验证阳性的 3 个质粒送公司双向测序验证;挑选测序验证 100% 的菌落扩大培养,摇菌过夜,提取无内毒素的重组质粒用于后续实验。

1.2.3 细胞转染以及稳转细胞株的筛选 用含 10% 的胎牛血清,1% 的 100 000 U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素、1% 的谷氨酰胺以及 1640 培养基的完全培养基于 37 ℃,5% CO₂ 恒温培养箱中常规培养胃癌细胞 MGC803;当细胞处于对数生长期时用胰酶消化制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 1.0 \times 10⁸ 个/L,按 2 mL/孔将细胞铺于 6 孔板中,实验分为 control 组(C 组,不做任何处理),negative control 组[NC 组,转染空质粒 pcDNA3.1(-)]及过表达组(转染重组质粒 pcDNA3.1-GHET1)。质粒(μ g)与转染试剂 lipotransfection 2000 按 2:1 的比例进行转染,并验证转染效率[pcDNA3.1(-)-GFP 质粒带绿色荧光],转染后用最佳浓度的 G418 筛选(400 mg/L),当 NC 组和过表达组出现明显的克隆且 C 组细胞全部死亡时,进行传代直至获得稳定细胞株,此后稳定细胞株用最佳浓度的 G418 维持培养。

1.2.4 验证稳定转染细胞株内 LncRNA-GHET1 的表达水平 收集 3 组筛选后的 MGC803 细胞,按照 RNA 提取试剂盒分别提取 3 组细胞总 RNA,琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 完整性并测定 RNA 浓度与纯度(OD260/OD280),按逆转录试剂盒说明书操

作将总 RNA 逆转录为 cDNA。SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒进行实时荧光定量 PCR,基因定量经罗氏的 Light Cycler480 (LC480) 荧光定量 PCR 仪检测,反应条件设置为预变性 95 ℃ 30 s,PCR 反应 95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,40 个循环;溶解曲线条件为 95 ℃ 5 s,60 ℃ 1 min,95 ℃ 1 s,1 个循环降温 50 ℃ 30 s。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 LncRNA-GHET1 的相对表达量。

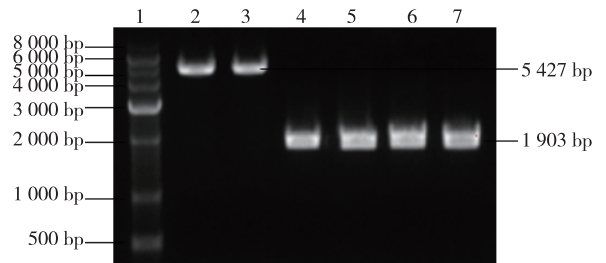
1.3 统计学方法

数据分析采用 GraphPad Prism5 软件统计分析并作图,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,各组之间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 构建重组真核表达载体 pcDNA3. 1-GHET1

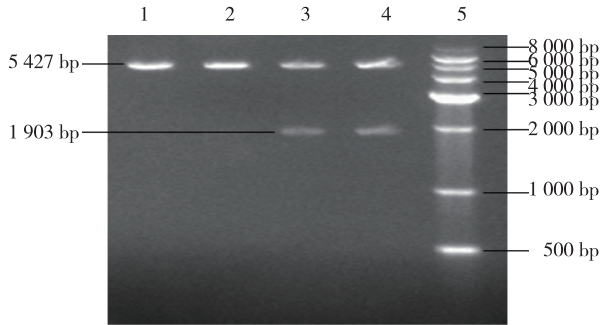
(1)PCR 扩增 LncRNA-GHET1 全长后双酶切,同时 pcDNA3. 1(-)质粒双酶切后,两者经琼脂糖电泳,结果如图 1,其中第 1 泳道为 Marker,第 2、3 泳道为质粒酶切产物,第 4 ~ 7 泳道为 PCR 酶切产物。(2)构建好的重组真核表达载体 pcDNA3. 1-GHET1 经双酶切验证,结果如图 2 所示,其中泳道 1、2 由于未连接目的片段仅有 5 427 bp 大小的一个片段,鉴定为空质粒;而重组质粒(泳道 3、4)经双酶切后可以见到大约 1 903 bp 和 5 427 bp 大小的 2 个片段,片段大小与理论上目的重组质粒酶切后相匹配,表明重组质粒构建成功,泳道 5 为 Marker。



注:第 1 泳道为 Marker,第 2、3 泳道为质粒酶切产物,第 4 ~ 7 泳道为 PCR 酶切产物

图 1 真核表达载体 pcDNA3. 1 与 PCR 产物双酶切结果

Fig. 1 Restriction enzyme results of pcDNA3. 1 vector and PCR products



注:泳道 1、2 为空质粒,泳道 3、4 为重组质粒酶切后泳产物,道 5 为 Marker

图 2 重组真核表达载体 pcDNA3. 1-GHET1 双酶切结果

Fig. 2 Restriction enzyme digestion results of recombinant plasmid pcDNA3. 1-GHET1

2.2 重组质粒测序

为鉴定插入的序列是否正确,将重组质粒送公司测序,结果如图 3,此质粒所携带的目的基因测序结果与 NCBI 收录的序列 100% 匹配,可用于下一步转染细胞。

2.3 转染效率验证及稳定转染细胞株内 LncRNA-GHET1 的表达水平

转染效率如图 4 所示,可见转染效率达 95% 以上,以此条件继续后续实验。转染后 LncRNA-GHET1 的表达水平如图 5 所示,C 组 LncRNA-GHET1 的相对表达量为 1.03 ± 0.147 (相对于 NC 组, $P > 0.05$);过表达组为 990.99 ± 131.36 (对于 NC 组, $P < 0.01$),表明筛选的细胞株为稳定过表达 LncRNA-GHET1 的胃癌细胞株 MGC803。

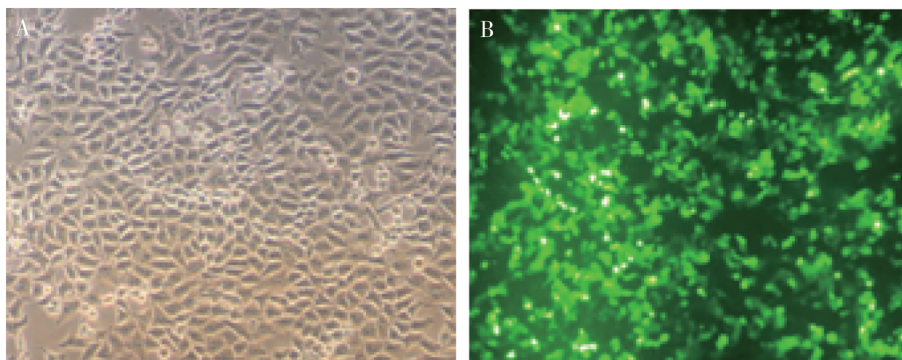
3 讨论

随着对 LncRNA 的研究不断深入,其作用机制也在不断的发现并完善。LncRNA 可能通过对信号通路调节、与 microRNA 的相互作用以及调节上皮 - 间质转化等参与胃癌的发生发展^[14]。LncRNA 在肿瘤的发生中既可作为致癌基因也可作为抑癌基因,其中 GHET1 已经被证明可作为致癌基因参与肿瘤的发生和发展。杨芳等^[15]研究表明提高 GHET1 的表达能促进胃癌细胞株 AGS 和 MKN5 的增殖,沉默 GHET1 胃癌细胞增殖受到抑制, GHET1 可能通过增加 c-Myc mRNA 的稳定性促进胃癌细胞的增殖。Liu H 等^[16]研究表明 LncRNA GHET1 可能通过诱导 EMT 促进食管鳞状细胞



图3 重组真核表达载体 pcDNA3.1-GHET1 测序结果

Fig.3 Sequence of recombinant eukaryotic expression vector pcDNA3.1-GHET1



光镜

荧光显微镜

图4 胃癌细胞株 MGC803 转染 pcDNA3.1-GHET1 效率验证 (100 ×)

Fig.4 Gastric cancer cell line MGC803 transfected pcDNA3.1-GHET1 verification

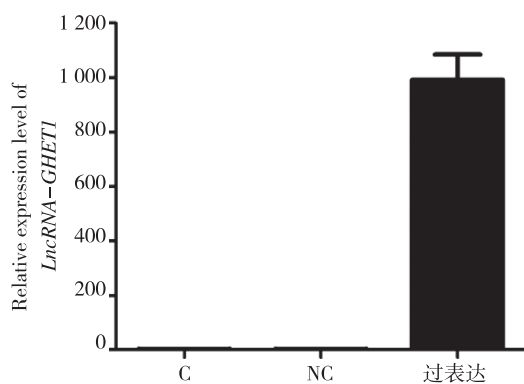


图5 转染 pcDNA3.1-GHET1 胃癌细胞株 MGC803 中 *LncRNA-GHET1* 的相对表达量

Fig.5 Relative expression of *LncRNA-GHET1* in gastric cancer cell line MGC803 transfected by pcDNA3.1-GHET1

(ESCC)增殖和侵袭,在 ESCC 中起着癌基因的作用,可能是 ESCC 患者治疗的新靶点。以上研究表明 *LncRNA-GHET1* 与肿瘤的发生发展密切相关,获得 *LncRNA-GHET1* 的全长序列以及构建 *LncRNA-GHET1* 过表达的细胞株是研究某基因生物学功能的基础,也是本研究进一步研究 *LncRNA-GHET1* 在胃癌中的作用机制不可或缺的一部分。

肿瘤的发生发展是复杂的,多基因、信号通路参与调控的过程,研究参与调控肿瘤发生的基因是目前肿瘤治疗的热点与难点。为了研究基因对肿瘤细胞生物学性状的影响,常常需要将基因转入细胞中,载体的构建是肿瘤学研究最基本的技术^[16],其中构建重组质粒通过脂质体的方法将研究基因转入细胞是经典、经济、简便的常用方法之一^[17-20]。本实验通过查阅 NCBI 中 *LncRNA-GHET1* 的信息

扩增出目的基因全长,通过将目的基因与质粒 pcDNA3.1(-) 进行连接,构建真核表达载体 pcDNA3.1-GHET1,用脂质体法将其导入胃癌 MGC803 细胞中。本实验通过 RT-qPCR 法对转染后的细胞进行鉴定,结果表明 LncRNA-GHET1 目的基因在胃癌 MGC803 细胞中成功过表达。

综上所述,本实验成功构建了 LncRNA-GHET1 过表达胃癌细胞株 MGC803,为进一步研究 LncRNA-GHET1 基因过表达对胃癌细胞增殖、侵袭及转移等行为学的影响奠定重要基础。

4 参考文献

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistic, 2012[J]. *Ca A Cancer Journal for Clinicians*, 2015, 65(2):87-108.
- [2] VILLANUEVA M T. Combination therapy: update on gastric cancer in East Asia. [J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2011, 8(12):690.
- [3] UEDA J, KIKUCHI S, TOTSUKA Y, et al. Comparative epidemiology of gastric cancer between Japan and China [J]. *World Journal of Gastroenterology Wjg*, 2011, 17(39):4421-4428.
- [4] 张立广,许旭,李全福. emaphorin6B 在胃癌中的表达及临床意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2013, 23(34):45-47.
- [5] LI T, MO X, FU L, et al. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs on gastric cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(8):8601-8612.
- [6] MEI, DANYI, WANG, et al. Up-regulation of SUMO1 pseudogene 3 (SUMO1P3) in gastric cancer and its clinical association[J]. *Medical Oncology*, 2013, 30(4):709.
- [7] ZHU S, MAO J, SHAO Y, et al. Reduced expression of the long non-coding RNA AI364715 in gastric cancer and its clinical significance[J]. *Tumor Biology*, 2015, 36(10):8041-8045.
- [8] SHAO Y, CHEN H, JIANG X, et al. Low expression of lncRNA-HMlncRNA717 in human gastric cancer and its clinical significances[J]. *Tumour Biology the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology & Medicine*, 2014, 35(10):9591-9595.
- [9] XU C, SHAO Y, XIA T, et al. lncRNA-AC130710 targeting by miR-129-5p is upregulated in gastric cancer and associates with poor prognosis [J]. *Tumor Biology*, 2014, 35(10):9701-9706.
- [10] LIN X, YANG M, XIA T, et al. Increased expression of long noncoding RNA ABHD11-AS1, in gastric cancer and its clinical significance[J]. *Medical Oncology*, 2014, 31(7):42.
- [11] HUANG H, LIAO W, ZHU X, et al. Knockdown of long noncoding RNA GHET1 inhibits cell activation of gastric cancer[J]. *Biomedicine & pharmacotherapy Biomedecine & pharmacotherapie*, 2017, 92:562.
- [12] ZHANG, BO X, PLIU L, et al. "Overexpression of long non-coding RNA GHET1 promotes the development of multidrug resistance in gastric cancer cells" [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 92: 580-585.
- [13] SHAO Y F, MENG Y M, JIANG X M, et al. Gastric juice long noncoding RNA used as a tumor marker for screening gastric cancer[J]. *Cancer*, 2014, 120(21):3320-3328.
- [14] SUN W, YANG Y, XU C, et al. Roles of long noncoding RNAs in gastric cancer and their clinical applications. [J]. *Journal of Cancer Research & Clinical Oncology*, 2016, 142(11):1-7.
- [15] YANG F, XUE X, ZHENG L, et al. Long non-coding RNA GHET1 promotes gastric carcinoma cell proliferation by increasing c-Myc mRNA stability[J]. *Febs Journal*, 2013, 281(3):802-813.
- [16] LIU, H. ZHEN, Q. FAN, Y, et al. LncRNA GHET1 promotes esophageal squamous cell carcinoma cells proliferation and invasion via induction of EMT[J]. *Int J Biol Markers*, 2017, 32(4):e403-e408
- [17] 吴伟刚,刘妙娜,刘利平,等. CENPK 基因过表达载体的构建及鉴定[J]. *中国肿瘤*, 2015,24(6):505-509.
- [18] 汪涛,刘慧,雷蕾,等. NLRP3 基因过表达载体的建立及鉴定[J]. *基因组学与应用生物学*, 2017(9):3511-3515
- [19] 李超,杨丹,石芳琼,等. MHC-I 类链相关基因 A 真核表达载体的构建及稳定转染舌鳞癌细胞的实验研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2011, 29(4):437-441.
- [20] 周希,黄晓燕,陈长曦,等. Pax-8 基因真核表达载体的构建及其功能的初步研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(3):430-436.

(2018-10-12 收稿,2018-11-25 修回)

中文编辑:周 凌;英文编辑:赵 毅