

梅花鹿 S100A4 基因的克隆及融合蛋白的表达

王大涛^{1 2} 赵海平² 褚文辉² 杨福合² 邢秀梅² 王桂武² 李春义^{2*}

(1 江苏科技大学生物与环境工程学院, 镇江 212018) (2 中国农业科学院特产研究所, 吉林 132109)

摘要: 为了研究梅花鹿 S100A4 (S100 calcium binding protein A4) 基因在鹿茸生长过程中的作用。用 RT-PCR 法从生茸骨髓膜细胞总 RNA 中克隆了梅花鹿 S100A4 基因, 在 NCBI 中对基因序列进行比对; 将完整的基因序列与逆转录病毒表达载体 pLEGFP-C1 重组, 获得了重组质粒 pLEGFP-S100; 用脂质体法将 pLEGFP-S100 与 pVSV-G (被膜载体) 共转染包装细胞 GP2-293, 获得重组病毒上清液, 感染角柄骨髓膜细胞后逆转录病毒携带的基因进入宿主细胞。结果显示: S100A4 基因是一个相对保守的基因, 与多个物种的匹配度达到 90%; 重组逆转录病毒载体 pLEGFP-S100 可以形成重组逆转录病毒粒子, 将 S100A4 基因导入靶细胞, 并表达 S100A4 与 GFP (Green fluorescent protein) 的融合蛋白。

关键词: S100A4 基因; 肿瘤; 鹿茸; 逆转录病毒载体; 融合蛋白

中图分类号: Q344.13 文献标识码: A 文章编号: 1000-1050 (2011) 01-0103-05

Cloning and fusion protein expression of the S100A4 gene in sika deer

WANG Datao^{1 2}, ZHAO Haiping², CHU Wenhui², YANG Fuhe², XING Xiumei², WANG Guiwu², LI Chunyi²

(1 Biotechnology and Environmental Engineering, Jiangsu University of Science and Technology School, Zhenjiang 212018, China)

(2 Institute of Special Wild Economic Animal and Plant Science, the Chinese Academy of Agricultural Sciences, Jilin 132019, China)

Abstract: In order to better understand the function of S100 calcium binding protein A4 in antler development of sika deer (*Cervus nippon*), we cloned S100A4 genes from total RNA of cultured antlerogenic periosteum cells using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), S100A4 gene sequences were compared with closely related animal species in NCBI. Full lengths of S100A4 genes were inserted into a vector plasmid pLEGFP-C1 (retroviral express vector). The recombinant plasmid pLEGFP-S100 and pVSV-G (envelope vector) were co-transfected into GP2-293 cells (packaging cell line) using lipofectimin 2000, and the resultant viral supernatants were collected. The cultured pedicle periosteum cells were then infected with virus in the supernatants. Results showed that S100A4 gene was a relatively conserved gene, and had about 90% homology with several species. Recombinant retroviral vector pLEGFP-S100 could effectively deliver a gene into target cell line, and express a fusion GFP (green fluorescent protein) protein.

Key words: Antler; Fusion protein; Retroviral vector; S100A4 gene; Tumor

S100 蛋白家族是一类用途广泛的钙调蛋白, 参与细胞周期活动、细胞分化、肿瘤生长以及细胞外基质分泌活动等, 人的 S100A4 基因包括 4 个外显子, 2 种剪切体, 可以编码有 101 个氨基酸组成的多肽 (Garrett *et al.*, 2006)。S100A4 蛋白由于与肿瘤的形成密切相关而备受人们关注 (Taylor *et al.*, 2002)。S100A4 蛋白在正常肺、肾脏、乳腺、甲状腺、胰腺及结肠的组织细胞中均不表达, 在乳腺癌、结直肠癌、胃肿瘤、食管鳞癌、骨肉瘤等肿瘤中高度表达, 恶性肿瘤中比良性肿瘤中表

达量更高 (陈永峰和张令达, 2006)。研究发现在肿瘤细胞增殖过程中, S100A4 可与肿瘤抑制蛋白 p53 结合从而促进细胞的增殖。在肿瘤发生的早期阶段可加速野生型 p53 功能的丧失 (Sherbet and Lakshmi, 1998)。Keirsebilck 等 (1998) 报道 S100A4 基因转染小鼠乳腺细胞后, 钙黏着蛋白表达量明显下降, 使其不能正常介导细胞间的黏附力而导致肿瘤细胞易于脱落转移。鹿茸是一种良好的生物医学模型, 其每年可以进行周期性再生。在生长旺盛的夏季, 鹿茸的生长速度可以到达 1 ~

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (309771664)

作者简介: 王大涛 (1984 -), 男, 硕士研究生, 主要从事鹿茸生物学研究. E-mail: fpp175@yahoo.cn

收稿日期: 2010-05-19; 修回日期: 2010-08-26

* 通讯作者, Corresponding author, E-mail: teslichunyi@126.com

2 cm/d，如此迅速的细胞增殖过程却没有任何癌变的迹象，这就为我们提供了一个难得的模型来研究快速生长与癌变的关系（Li，2003）。角柄（鹿茸再生的发起点）和鹿茸都来自生茸区骨膜（Antler periosteum，AP）细胞（Li and Suttie，2001），AP组织和细胞中均有S100A4蛋白的表达，可是作为鹿茸每年快速生长基础的角柄骨膜（Pedicel periosteum，PP）组织及PP细胞均不表达S100A4基因，也未检测到S100A4蛋白（未发表），这就意味着鹿茸发育过程主要是角柄形成过程中，S100A4蛋白经历了一个从有到无的转变，这与正常的组织发生癌变后，S100A4蛋白从无到有的过程恰好相反（Gribenko *et al.*，2001；Maz-zucheli *et al.*，2002）。本文正是以此为切入点，克隆了梅花鹿S100A4基因，利用逆转录病毒表达系统将其导入PP细胞中表达。为研究S100A4在鹿茸生长过程中的作用及器官的快速生长与癌变的关系打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 载体与包装细胞

载体：pLEGFP-C1，pVSV-G（clontech，美国），pLEGFP-C1含CMV启动子可以表达EGFP基因及插入序列；pVSV-G表达病毒蛋白外壳。包装细胞GP2-293：稳定表达包装蛋白及包装信号蛋白，由大连医科大学仲良伟惠赠。菌株DH5α，本实验室保藏。

1.1.2 试剂

RNA提取试剂盒，反转录试剂盒（宝生物，中国）；质粒提取试剂盒（Transgen，中国）；限制性内切酶Hand III、BamH1，T4DNA连接酶（宝生物，中国）；琼脂糖凝胶回收试剂盒，PCR产物克隆载体（宝生物，中国）；100 bp DNA Marker（中科瑞泰，中国）；DMEM、标准胎牛血清、胰酶、转染试剂（Invitrogen，美国）。

1.2 方法

1.2.1 从AP细胞中克隆梅花鹿S100A4基因

采集梅花鹿AP组织进行AP细胞原代培养，含10%标准胎牛血清的DMEM培养基15 mL，经过两次传代后（孙红梅等，2007），用总RNA提取试剂盒提取培养的AP细胞（约10⁶）总RNA，反转录成cDNA。根据牛s100A4的cDNA序列（Gen-Bank NM_174595）设计扩增引物序列如下：

上游：5'-gttaactcctgactgctgccatgg-3'

下游：5'-acccacacctgaggagcctt-3'

用于扩增S100A4基因全长cDNA，根据其他物种的S100A4基因序列长度和所设计的引物位置，推测目的片段大小在350 bp左右，电泳后切胶回收350 bp左右的目的片段。回收产物与克隆载体pMD19-T连接，连接产物转化感受态大肠杆菌DH5α，通过PCR进行初步鉴定筛选，对阳性克隆质粒进行测序鉴定。

1.2.2 分析鉴定S100A4基因

用NCBI/Blast工具分析获得的梅花鹿S100A4基因序列，用DNAStar软件将S100A4的基因序列翻译成氨基酸序列，并进行氨基酸序列分析。

1.2.3 构建重组质粒pLEGFP-S100

根据测序结果，选择连接正确的质粒，用Hand III、BamH1双酶切回收350 bp左右的目的片段，与经过同样处理的载体质粒pLEGFP-C1连接，连接产物转化感受态大肠杆菌DH5α。用鉴定引物筛选阳性质粒并测序鉴定。

1.2.4 重组病毒的包装

转染前一天将10⁶GP2-293细胞接种于10 cm细胞培养皿中，加入含10%标准胎牛血清的DMEM培养基15 mL（不含抗生素），37℃，5%（体积分数，ψ）的CO₂培养箱中培养。细胞达到80%融合后进行转染。分别用1.5 mL无血清DMEM稀释24 μg DNA（M_{pLEGFP-S100}：M_{pVSV-G} = 1：0.9）和60 μL转染试剂Lipofectamine 2000，室温孵育5 min。混合两种稀释液，室温下静置20 min，将混合液加入培养的GP2-293细胞中，轻轻混匀后放入培养箱。6 h后用完全培养基换液。24 h后用倒置荧光显微镜检测荧光的表达，确定转染效果。48 h后收集培养液，1 000 g离心5 min，收集上清，用0.45 μm的滤膜过滤后分装，-20℃保存（不超过2周）。

1.2.5 病毒滴度测定

取110 μL病毒上清液，用PBS倍比稀释（从原液到10⁻⁶）。用24孔板每孔接种约5 × 10⁴个GP2-293细胞，加入100 μL病毒稀释液后终体积为500 μL，混匀后放入培养箱。48 h后去掉培养液，用500 μL新培养液悬浮细胞，在细胞计数板上计算荧光细胞数（Gustavo and Oded，2006）。

1.2.6 重组病毒感染PP细胞及筛选

含10%胎牛血清的DMEM培养基培养的PP细胞（第5代）融合度在50%左右时，加入冻存的

病毒液,同时加入终浓度为8 μg/mL聚凝胺混匀后放入培养箱(Abe *et al.* ,1998)。24 h后 ,荧光倒置显微镜下检测感染效果 ,用含 G418(150 μg/mL) 的培养基换液。每天用含 G418(150 μg/mL) 的培养基换液 ,同时检测荧光表达情况。

2 结果

2.1 S100A4 基因克隆

电泳结果显示,有350 bp左右条带出现,与预期的片段长度345 bp相吻合(图1)。经过 T 载体后,将4 份阳性质粒测序,3 份质粒插入序列完全一致,1 份质粒相差一个碱基,推测为扩增过程中碱基突变。

2.2 基因序列分析

S100A4 是一个非常保守的基因,与几个物种的基因序列匹配度超过 90%,氨基酸序列比碱基序列更加保守(表1)。

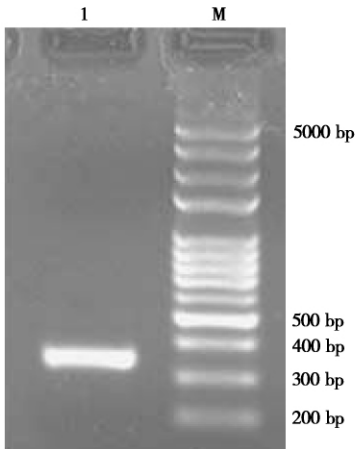


图1 扩增引物扩增 cDNA 结果. M: DNA 分子量标准(100 bp) ; 1: S100A4 基因 cDNA 扩增结果

Fig.1 Rresult of amplification cDNA by amplification primer. M: DNA maker(100 bp) ; 1: Amplification cDNA of S100A4 gene

表1 梅花鹿与几个常见物种的 S100A4 基因及氨基酸序列比对结果

Table 1 Results of Blast for S100A4 gene and amino acid sequenceof sika between deer and some usual species

物种 Species	碱基序列比对结果 Blast of base sequence	预测氨基酸序列比对结果 Blast of predicted amino acid
牛 <i>Bos taurus</i>	98% (301/306)	99 (100/101)
野猪 <i>Sus scrofa</i>	95% (290/306)	98 (99/101)
人 <i>Homo sapiens</i>	91% (279/306)	97 (98/101)
鼠 <i>Mouse</i>	89% (271/306)	91 (92/101)

梅花鹿的碱基和氨基酸的序列未共享,如果需要可联系作者
The sequence of deer S100A4 gene and amino acid haven't been share ,connect with the author if need.

2.3 重组载体质粒 pLEGFP - S100 鉴定结果

PCR 结果显示,阴性对照,扩增片段为 235 bp,阳性克隆介于500 bp与600 bp,与预期结果580 bp吻合,说明目的基因已经插入载体质粒中(图2)。测序结果证实插入序列符合表达融合蛋白的要求,成功构建了 pLEGFP - S100 重组载体。

2.4 重组病毒包装及滴度测定

pLEGFP - S100 与 pVSV-G 共转染包装细胞 GP2 - 293 细胞24 h后,可见光下 GP2 - 293 细胞呈菱形、排列紧密(图3a)。倒置荧光显微镜下,可见大量绿色荧光(图3b),依稀可以辨别出细胞形态。图3a与图3b对比显示,转染效率较高。经测定,培养液上清中的病毒滴度高达 10⁸TU/L。

2.5 重组病毒感染 PP 的情况

病毒感染 PP 细胞30 h后 ,倒置显微镜可见光下细胞呈梭形 生长正常(图4a)。荧光显微镜下 ,可以看到大量表达荧光蛋白的细胞,这些细胞呈梭形,排列不紧密。从荧光表达效果可以得出感染效果好,

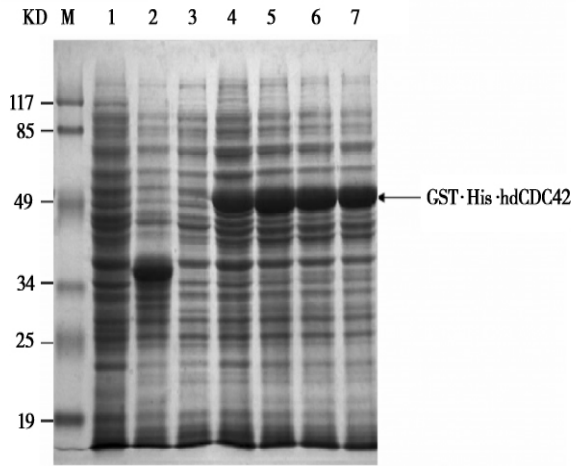


图2 重组质粒 pLEGFP-S100 PCR 鉴定结果. M: DNA Maker (100 bp) ; 1: 空白质粒阴性对照; 2: 重组质粒 pLEGFP-S100

Fig.2 Result of idention for pLEGFP-S100 by PCR. M: DNA Maker(100 bp) ; 1: Thenegative control of blank vectors; 2: Recombinant plasmid pLEGFP-S100

被感染细胞已经开始表达融合蛋白(图4b)。

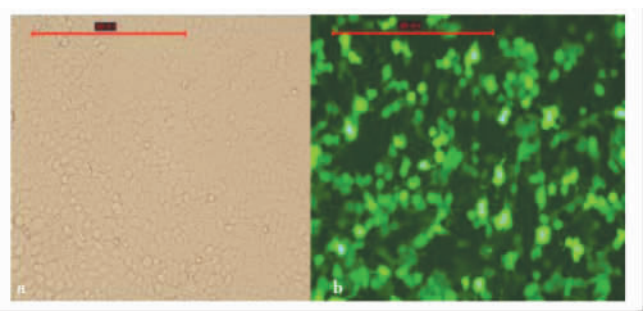


图3 pEGFP-S100 与 pVSV-G 共转染 24 h 后的 GP2 - 293 细胞(a: 倒置相差显微镜下细胞形态; b: 倒置荧光显微镜下荧光表达情况)
Fig. 3 GP2 - 293 cells 24 h after co-transfection with pEGFP-S100 and pVSV-G (a: cells under inverted phase contrast microscope; fluorescence was observed under inverted fluorescence microscope)

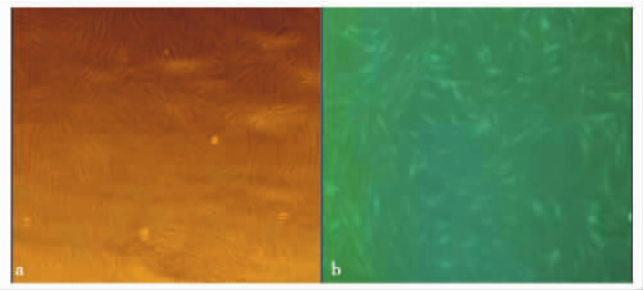


图4 重组病毒感染的 PP 细胞(30 h) (a: 倒置相差显微镜下细胞形态; b: 倒置荧光显微镜下荧光表达情况)
Fig. 4 PP cells infected by recombinant virus under inverted fluorescence microscope(30 h) (a: cells under inverted phase contrast microscope; fluorescence was observed under inverted fluorescence microscope)

3 讨论

S100A4 基因是一个非常保守的基因，以鹿茸作为模型，研究 S100A4 在鹿茸生长发育中的作用及调控机制，为我们研究肿瘤发生的机理提供了新思路，也为肿瘤的预防、治疗另辟蹊径。鹿茸发育过程中 S100A4 基因之所以差异表达，很可能存在调控 S100A4 基因从表达到沉默的机制。但是，目前 S100A4 基因的研究还很少涉及到鹿茸中。因此，有克隆梅花鹿 S100A4 基因的需要。本实验克隆了东北梅花鹿的 S100A4 基因，通过 Blast 工具发现，该基因在鹿茸中非常保守，与牛、猪、甚至人的 S100A4 基因具有非常高的重合度。因此，以鹿茸为模型研究 S100A4 基因的作用，可以从一个全新角度揭示器官快速生长与癌变的关系，对肿瘤的预防和治疗有着重要的意义。

鹿茸是一种奇特的哺乳动物器官，其每年快速生长时能到达 1 ~ 2 cm/d。这种速度是其他器官所

不能比的，除非肿瘤。现有的研究表明，S100A4 蛋白与肿瘤的形成及转移密切相关。大量的报道显示 S100A4 蛋白通过改变细胞的黏着性，协助肿瘤细胞的转移 (Keirsebilck *et al.* , 1998; Ikoma *et al.* , 2005; Gao *et al.* , 2005)。也有报道称 S100A4 蛋白可能通过刺激血管生成而促进肿瘤的形成 (Ambartsumian *et al.* , 2001)。鹿茸初次生长基础是 AP 组织，而再生的基础为 PP 组织。对扁角鹿 (*Damadama*) 和赤鹿 (*Cervus elaphus*) 的移植实验证实，移植 AP 组织，可以在移植部位形成异位角柄和鹿茸的形成 (Li and Suttie , 2001; Goss and Powel , 1985)，与此同时对 PP 组织的移植却没有取得成功。PP 组织是鹿茸再生的发起点，存在于 PP 组织中的部分骨髓干细胞的激活，完成了鹿茸的再生，但是移植 PP 组织不能够诱导异位生茸 (Li and Suttie , 2001; Li *et al.* , 2009)。与此对应的是 S100A4 蛋白在 AP 细胞及组织中均有表达，而 PP 细胞及组织中却没有 (未发表)。是否正是这一蛋白的缺失调控了鹿茸组织的快速生成却不癌变，是个非常值得研究的命题。S100A4 表达差异与相应的组织功能的差异之间是否存在着因果关系是下一步研究的重点。在鹿茸生长过程特别是角柄形成过程中，AP 细胞快速增殖的时候，大量表达的 S100A4 蛋白是否与细胞转移或血管形成有关还有待证实。角柄形成以后，PP 细胞快速增殖形成鹿茸的时候，同样需要大量的细胞转移和形成大量的血管，S100A4 并没有出现在这个快速生长的组织中。无论 S100A4 蛋白在角柄形成过程中扮演什么角色，它在角柄形成前后表达差异原因都是一个让人期待的迷。

本研究利用逆转录病毒表达系统将 S100A4 基因导入 PP 细胞，研究 S100A4 的功能，提供了一种研究基因功能的有效方法。通过重组逆转录病毒载体，很方便地将目标基因导入目的细胞，通过筛选获得稳定表达的细胞系，分析转基因前后，细胞功能上的差异，确定基因的功能。

参考文献:

Abe A , Miyanochara A , Friedmann T. 1998. Polybrene increases the efficiency of gene transfer by lipofection. *Gene Ther* , **5** (5) : 708 - 711.

Ambartsumian N , Klingelhofer J , Grigorian M , Christensen C , Kriaevska M , Tulchinsky E , Georgiev G , Berezin V , Bock E , Rygaard J , Cao R , Cao Y , Lukanidin E. 2001. Themetastasis-associated Mts1 (S100A4) protein could act as an angiogenic factor. *Oncogene* , **20**

- (34): 4685–4695.
- Chen Y F, Zhang L D. 2006. Calcium binding protein S100A4 and cancer. *Journal of Oncology*, **12** (3): 248–250. (in Chinese)
- Li C Y. 2003. Development of deer antler model for biomedical research. *Recent Adv and Res Updates*, **4** (2): 255–274.
- Li C Y, Yang F H, Allan Sheppard. 2009. Adult stem cells and mammalian epimorphic regeneration insights from studying annual renewal of deer antlers. *Current Stem Cell Research and Therapy*, **4** (3): 237–251.
- Li C Y, Suttie J M. 2001. Deer antlerogenic periosteum: a piece of post-natally retained embryonic tissue? *Anatomy and Embryology*, **204** (5): 375–388.
- Gao X N, Tang S Q, Zhang X F. 2005. S100A4 antisense oligodeoxynucleotide suppresses invasive potential of neuroblastoma cells. *J Pediatr Surg*, **40** (4): 648–652.
- Garrett S C, Varney K M, Weber D J, Bresnick A R. 2006. S100A4, a mediator of metastasis. *J Biol Chem*, **281** (2): 677–680.
- Goss R J, Powel R S. 1985. Induction of deer antlers by transplanted periosteum I. Graft size and shape. *J Exp Zool*, **235** (3): 359–373.
- Gribenko A V, Hopper J E, Makhatazde G I. 2001. Molecular characterization and tissue distribution of a novel member of the S100 family of EF-hand proteins. *Biochemistry*, **40** (51): 15538–15548.
- Gustavo T, Oded S. 2006. Production and purification of lentiviral vectors. *Nature*, **27**: 241–245.
- Ikoma N, Yamazaki H, Abe Y, Oida Y, Ohnishi Y, Suemizu H, Matsumoto H, Matsuyama T, Ohta Y, Ozawa A, Ueyama Y, Nakamura M. 2005. S100A4 expression with reduced E-cadherin expression predicts distant metastasis of human malignant melanoma cell lines in the NOD / SCID / gammaCnull (NOG) mouse model. *Oncol Rep*, **14** (3): 633–637.
- Keirsebilck A, Bonne S, Bruyneel E. 1998. E-cadherin and metastasin (S100A4) expression levels are inversely regulated in two tumor cell families. *Cancer Res*, **58** (20): 4587–4591.
- Mazzucheli L. 2002. Protein S100A4: too long overlooked by pathologists? *Am J Pathol*, **160** (1): 7–13.
- Sherbet G V, Lakshmi M S. 1998. S100A4 (MTS1) calcium binding protein in cancer growth, invasion and metastasis. *Anticancer Res*, **18** (4A): 2415–2421.
- Sun H M, Xing X M, Cong B, Li C Y, Yang F H. 2007. Cultural technique of deer antler stem cell in vitro. *Journal of Economic Animal*, **11** (1): 7–9. (in Chinese)
- Taylor S, Herrington S, Prime W, Rudland P S, Barraclough R. 2002. S100A4 (p9Ka) protein in colon carcinoma and liver metastases: association with carcinoma cells and T-lymphocytes. *Br J Cancer*, **86** (3): 409–416.
- 孙红梅, 邢秀梅, 丛波, 李春义, 杨福合. 2007. 鹿茸干细胞体外培养技术的研究. *经济动物学报*, **11** (1): 7–9.
- 陈永锋, 张令达. 2006. 钙结合蛋白 S100A4 与肿瘤. *肿瘤学杂志*, **12** (3): 248–250.