

人 CD147 的克隆表达及其对成纤维细胞 基质金属蛋白酶表达的影响

封青川 陈思娇¹ 宋今丹*

(中国医科大学基础医学院细胞生物学教研室, 沈阳 110001;

¹中国医科大学附属第一医院老年病教研室, 沈阳 110001)

摘要 CD147可以促进基质金属蛋白酶(MMPs)的表达,与肿瘤的生长和浸润有关。为了研究CD147在大肠癌中的作用,利用RT-PCR从一健康人克隆了cd147基因,测序发现该基因存在两个碱基突变,其中C634T造成了CD147跨膜区212位氨基酸由L突变为F。分别构建CD147的原核(pGEX-5x-147)和真核(pEGFP-147)表达系统,在宿主菌BL21和CCL229细胞中均获得了稳定表达。Western印迹显示原核表达产物比真核CD147分子量小,说明原核CD147缺乏糖基化。荧光显微镜显示真核CD147表达定位于CCL229细胞膜,表明突变L212F不影响CD147的膜定位。用明胶电泳检测表达的CD147对MMPs表达的影响,结果显示原核产物不能诱导MMPs表达上调,而真核产物能够明显诱导MMPs表达上调,说明糖基化对于CD147活性是必需的,真核系统能够表达具有生物功能的CD147,并且突变L212F不会影响蛋白质的活性。

关键词 CD147; 基质金属蛋白酶; 基因克隆; 基因表达

CD147,又名细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(extracellular matrix metalloproteinases inducer, EMMPRIN),属于免疫超家族。CD147可以刺激成纤维细胞分泌基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs),降解细胞外基底膜和间质成分。在肿瘤浸润过程中,CD147刺激宿主基质细胞产生MMPs,介导了癌细胞与宿主基质细胞间的相互作用,增加了癌细胞的侵袭、转移能力^[1,2],因此,也成为近年来肿瘤研究中的热点。然而,CD147在大肠癌的侵袭中的作用研究却比较少,我们发现大肠癌细胞系CCL229中CD147的表达量较低,因此,我们克隆了人的cd147基因,分别构建了原核和真核表达载体,并用CCL229进行了表达。结果发现,CCL229的表达产物具有促进MMPs表达的活性,而原核细胞缺乏活性。

1 材料与方法

1.1 材料

CCL-229结肠癌细胞株、*E.coli* DH5 α 和BL-21菌株为本室提供,表达载体pGEX-5x-3、pEGFP-c1质粒购自Amersham公司;限制性内切酶、T4连接酶等工具酶均购自TaKaRa公司;G-418购自

Sanland公司;DMEM培养基、Lipfectinamine2000脂质体转染试剂盒购自Gibco公司;兔抗人CD147多抗及辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗购自Santa Cruz公司;其余试剂至少为分析纯以上级别。

1.2 人cd147基因的扩增

抽取正常人的血液,用Invitrogen公司的Tripure RNA提取试剂盒,按照试剂盒说明提取细胞总RNA,用紫外分光光度计测定RNA含量。根据文献报道的人cd147基因序列,分别设计了两对引物(表1)用于扩增cd147基因的完整编码序列,其中第一对引物P1和P2的扩增产物用于构建

原核表达载体,第二对引物P1和P3的扩增产物用于构建真核表达载体。在每个引物的5'端分别引入了相应的限制性核酸内切酶位点(斜体下划线,表1),便于克隆。RT反应采用纽英伦(New England Biolabs)公司的逆转录酶进行。PCR反应用TaKaRa公司试剂进行,PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定条带大小正确后,进行产物纯化和克隆。

收稿日期:2006-03-27 接受日期:2006-06-29

辽宁省教育厅(No.051949)和辽宁省自然科学基金(No.20062102)资助项目

*通讯作者。Tel: 024-23256087, Fax: 024-23256087, E-mail: fengqingchuan@yahoo.com

Table 1 Primers used in this study

| Primer | Sequence of the primer(5'-3') | Restriction site | Plasmid |
|--------|--|------------------|---------|
| P1 | <i>TTGG</i> AATTCCCGGCGAGGAATAGGA | <i>EcoRI</i> | pGEX-5x |
| P2 | <i>TAACCG</i> CTCGAGCTGCCTCAGGAAGAGTTC | <i>XhoI</i> | |
| P1 | <i>TTGG</i> AATTCCCGGCGAGGAATAGGA | <i>EcoRI</i> | pEGFP |
| P3 | <i>CCGGCT</i> CTAGAGGAGCAGGGAGCGTC | <i>XbaI</i> | |

1.3 原核和真核表达载体的构建、酶切鉴定及序列测定

cd147 PCR 扩增产物及相应的载体(原核表达载体 pGEX-5x 和真核表达载体 pEGFP)分别用 *EcoRI*/*XhoI* 或 *EcoRI*/*XbaI* 进行双酶切后(表 1), 通过琼脂糖凝胶电泳回收后, 用 T4 DNA 连接酶构建连接反应。12 °C 温育过夜后, 用原核和真核的连接反应产物转化感受态细菌 DH5 α , 含氨苄青霉素培养基的平皿上 37 °C 培养过夜, 随机挑选氨苄抗性的转化克隆, 挑取单菌落接种于 3 ml 含氨苄青霉素的培养基中 37 °C 振荡过夜。之后, 收集菌体, 用碱裂解法提取质粒, 并用相应的限制性内切酶进行双酶切鉴定。将酶切鉴定正确的克隆, 寄送北京三博远志生物技术有限责任公司用通用引物进行双向(正反)序列测定。

1.4 重组载体的表达

测定的序列与人 cd147 基因序列比较鉴定后, 将原核表达克隆 pGEX-5x-147 转化进 BL-21 菌株中(BL-21/147), 37 °C 用 0.1 mmol/L IPTG 诱导表达 4h, 收集菌体; 将真核表达克隆 pEGFP-147 用 Lipfectinamine2000 脂质体转染试剂转染 CCL229 细胞, 用 G418 筛选阳性细胞(CCL229/147), 并挑选单克隆, 形成能够稳定表达 CD147 的细胞株 CCL229/147。

1.5 重组 CD147 的分离纯化及鉴定

将诱导表达的菌体收集, 破碎后, 用 GST 螯合磁珠(beads)提纯(方法参照说明书)。将 CCL229/147 细胞株扩大培养, 收集细胞并匀浆破碎, 离心去除细胞残渣后, 上清液分别过 G200 和 DEAE Sephrose Fast Flow 层析柱, 收集 CD147 阳性组分用于后面分析。为了检测 CCL229/147 细胞的培养上清液中是否存在 CD147, 将培养上清液进行盐析(饱和硫酸铵沉淀, 4 °C, 8 h, 15 000 g, 30 min 收集沉淀), 获得蛋白质沉淀, 之后, 对沉淀置于 10 mmol/L 的 Tris-HCl(pH 7.5)中进行透析脱盐。分别将获得的样品进行 SDS-PAGE, 之后用兔抗人 CD147 多抗及辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗对纯化的 CD147 进行 Western 印迹鉴定。

1.6 表达 CD147 对成纤维细胞 MMPs 表达的影响

将从原核、CCL229/147 细胞株纯化的 CD147, 以及 CCL229/147 培养上清液中纯化的蛋白质加入人原代成纤维细胞培养体系中, 经 48h 以后, 收集细胞, 低温(冰育)匀浆后, 离心取上清液, 与 3 × 加样缓冲液(30% 甘油, 10 mmol/L Tris-HCl, 9% SDS, pH 6.8)混和后用明胶电泳检测 MMP2 和 MMP9 的酶活性。明胶电泳按照文献[3]的方法进行, 其简单步骤如下: 制备含 0.1% 的明胶的浓缩胶, 加样后于 4 °C 电泳。电泳完毕后用洗涤液(50 mmol/L Tris-HCl, 5% Triton X-100, pH 6.5)洗 3 次, 每次 10 min, 之后置于温育液(100 mmol/L Gly, 5 mmol/L CaCl₂, pH 7.0)中在 37 °C 过夜。凝胶固定后, 用考马斯亮蓝 R250 染色 30 min, 经脱色后, 有 MMP2 和 MMP9 酶的地方, 可以降解明胶, 在蓝色背景下显示负染亮带。

2 结果

2.1 cd147 基因原核和真核表达重组体的构建及酶切鉴定

从转化的平皿上随机挑去阳性菌落, 进行小规模培养后, 收集菌体提取质粒, 进行双酶切鉴定是否含有 cd147 基因序列。原核表达重组体 pGEX-5x-147 由 *EcoRI*/*XhoI* 进行双酶切, 真核表达重组体 pEGFP-147 由 *EcoRI*/*XbaI* 进行双酶切。结果如图 1 所示。从图中可见, 原核和真核表达重组体经双酶切后, 均出现两条带, 分子量较小的条带约为

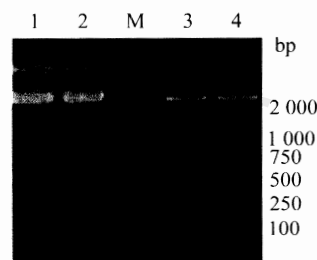


Fig.1 Characterization of pGEX-5x-147 and pEGFP-147
1: GEX-5x-147; 2: pEGFP-147; 3: pGEX-5x-147 digested with *EcoRI*/*XhoI*; 4: pEGFP-147 digested with *EcoRI*/*XbaI*; M: DNA marker DL2000.

1 000 bp, 与扩增的 cd147 基因分子量吻合, 说明表达载体包括人 cd147 基因。

2.2 人 cd147 基因序列分析

我们从原核和真核阳性克隆中, 随机选取了 4 个(真核和原核各 2 个)进行双向序列测定, 对测序结果进行比对后, 发现 4 个克隆的序列完全一致。因此, 我们选取其中一个与已经发表的人 cd147 基因序列(GenBank 序列号: AB085790)进行了比对, 结果如图 2 所示。由图可见, 我们获得的人 cd147 基因序列发生了 2 个位点的核酸突变, 其中一个为无意突变, 而另外一个为有意突变, 造成了 CD147 分子 212 为氨基酸由 Leu(L)突变为 Phe(F)。

2.3 人 cd147 基因在原核和真核中表达产物的鉴定

为了鉴定原核和真核表达重组体是否有效表达 CD147, 我们分别从原核表达菌体、真核表达细胞 CCL229/147 以及 CCL229/147 细胞的培养上清液提取 CD147, 并以 CCL229 提取的 CD147 作为对照进行 Western 印迹鉴定(图 3)。从图可见, 原核和真

核表达重组体均能够在相应的宿主细胞中表达 CD147, 但是原核表达的 CD147 的分子量较小, 可能因为原核细胞缺乏相应的蛋白质翻译后的加工过程, 缺少了相应的蛋白质修饰或糖基化。在 CCL229 细胞中, 我们也检测到了少量 CD147 的表达, 当细胞被真核表达重组体转染后, CD147 的表达量明显增加。另外, 在宿主细胞的培养上清液中, 不能检测到 CD147, 说明 CD147 不能进行分泌表达。因为 CD147 是免疫超家族成员, 属于膜蛋白, 因此, 在荧光显微镜(奥林巴斯 U-LH100HGAP0)下观察了空载体 pEGFP 与 pEGFP-147 在宿主细胞中的表达情况, 结果如图 4。因为真核载体包括有绿色荧光蛋白(GFP)报告基因, 在宿主细胞中均能够观察到很强的荧光信号(图 4A), 而在 pEGFP-147 转染的细胞中, 荧光信号主要集中在细胞膜周围(图 4B)。为了排除本底荧光干扰, 我们取相同的正常 CCL229 细胞的视野, 分别进行荧光显微镜和光学显微镜(奥林巴斯 U-LH100HGAP0)的观察(图 4C 和

```

h-cd147  ATGGCGGCTGCGCTGTTCGTGCTGCTGGGATTCGCGCTGCTGGGCACCCACGGAGCCTCC
gene clone .....
GGGGCTGCCGGCACAGTCTTCACTACCGTAGAAGACCTGGCTCCAAGATACTCCTCACC
.....
TGCTCCTGAATGACAGCGCCACAGAGGTCACAGGGCACCCTGGCTGAAGGGGGCGTG
.....
GTGCTGAAGGAGGACGCGCTGCCCGCCAGAAAACGGAGTTCAAGGTGGACTCCGACGAC
.....
CAGTGGGGAGAGTACTCCTGCGTCTTCTCCCGAGCCCATGGGCACGGCCAACATCCAG
.....
CTCCACGGGCTCCAGAGTGAAGGCTGTGAAGTCGTCAGAACACATCAACGAGGGGGAG
.....
ACGGCCATGCTGGTCTGCAAGTCAGAGTGCGTGCCACCTGTCACTGACTGGGCCTGGTAC
.....
AAGATCACTGACTCTGAGGACAAGGCCCTCATGAACGGTCCGAGAGCAGGTTCTTCGTG
.....
AGTTCCTCGAGGGCCGGTCAGAGCTACACATTGAGAACCTGAACATGGAGGCCGACCCC
.....
GGCCAGTACCGGTCAACGGCACCAGCTCCAAGGGCTCCGACCAGGCCATCATCACGCTC
.....
                                  (Leu)
CGCGTGCGCAGCCACCTGGCCGCCCTCTGGCCCCTCTGGGCATCGTGGCTGAGGTGCTG
.....
                                  T.
                                  (Phe)
GTGCTGGTCAACATCATCTTCATCTACGAGAAGCGCCGAAGCCCGAGGACGTCCTGGAT
.....
GATGACGAGCCGGCTCTGCACCCTGAAGAGCAGCGGGCAGCACCAGAATGACAAAGGC
.....
AAGAACGTCCGCCAGAGGAACTTCTCTGA
.....

```

Fig.2 The sequence comparison of cloned cd147 gene with hcd147gene (AB085790)

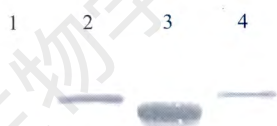


Fig.3 Western blot analysis of purified CD147

1: the supernatant of CCL229/147 cells; 2: CCL229/147 cells; 3: BL-21/147; 4: CCL229 cells.

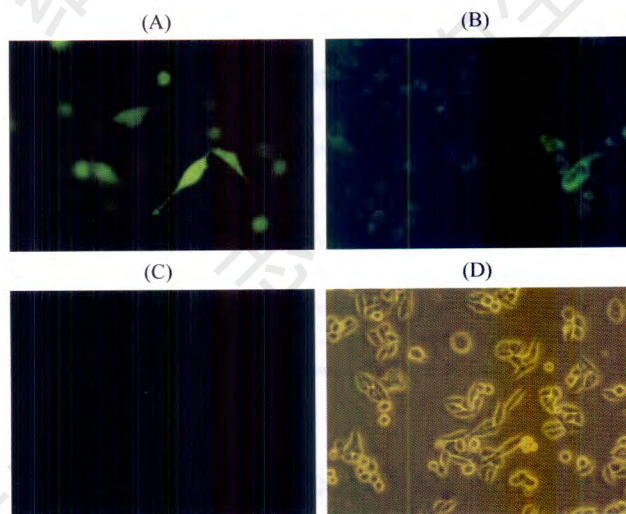


Fig.4 The expression of pEGFP-147 in CCL229 cells

A: CCL229 with pEGFP; B: CCL229 with pEGFP-147; C: CCL229 under fluorescence microscope; D: CCL229 under light microscope. The map of CLL229 cells in C and D were obtained using the same scope

图 4D), 发现未导入外源 DNA 的 CCL229 细胞基本没有任何荧光信号产生(图 4C)。这些结果说明 pEGFP-147 转染细胞后, CD147 分子表达在宿主细胞膜上。

2.4 原核和真核表达的 CD147 对成纤维细胞 MMPs 表达的影响

从图 3 可以看出, 构建的原核和真核表达载体都能够有效的表达 CD147, 并且原核 CD147 的表达量大于真核。但是, 从表达产物的分子量看, 原核产物的分子量要小于真核产物, 说明原核的表达产物可能缺乏蛋白质合成后的加工。为了验证原核和真核表达产物是否影响 CD147 促进成纤维细胞 MMPs 表达的活性, 我们将提纯后的原核和真核表达产物加入人成纤维培养体系, 之后通过明胶电泳检测 MMPs(MMP2 和 MMP9)的表达量。图 5 显示了表达的 CD147 对成纤维细胞 MMP2 和 MMP9 表达的影响。从图中可见, 原核表达的 CD147 对 MMP9 和 MMP2 表达都没有刺激作用, 说明原核表达的 CD147 丧失了刺激 MMPs 表达的活性。从 CCL229

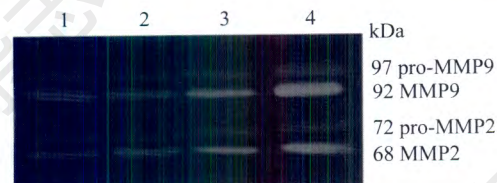


Fig.5 The effect of purified CD147 on MMP2 and MMP9 expression of fibroblast

1: without purified CD147; 2: with CD147 purified from BL-21/147; 3: with CD147 purified from CCL229; 4: with CD147 purified from CCL229/147.

细胞中纯化的 CD147 对 MMP2 和 MMP9 的表达均有促进作用, 但是促进作用较弱。而从 CCL229/147 纯化的 CD147 具有明显高于从 CCL229 纯化的 CD147 促进 MMP2 和 MMP9 表达的活性。另外, MMP2 和 MMP9 前体的表达在从 CCL229 纯化的 CD147 刺激后也有微弱的提高。

3 讨论

CD147 参与了癌细胞-癌细胞或癌细胞-基质细胞之间的黏附, 在体内可促进肿瘤的生长和浸润。有实验表明表达在肺癌细胞系 LX-1 表面的该分子可刺激人成纤维细胞分泌 MMPs, 从而有助于癌细胞的浸润扩散^[4]。肿瘤细胞可以通过自分泌和旁分泌的方式促进自身或者肿瘤细胞周围的间质细胞 MMPs 的合成, 水解肿瘤细胞表面的黏附成分而有助于癌细胞的迁移, 促进肿瘤细胞的浸润^[5,6]。

为了研究 CD147 在大肠癌中的作用, 我们从一个健康人体内克隆了 cd147 基因, 构建了它的原核和真核表达系统。通过双酶切鉴定, 构建的重组分子均包含 cd147 基因。通过对克隆序列的测定, 发现克隆的序列存在 2 个位点的碱基突变(图 2), 其中一个造成了 CD147 跨膜区(氨基酸 206~229)第 212 位氨基酸由 L 突变为 F。CD147 跨膜区包括 3 个亮氨酸(206、213、220)和 1 个苯丙氨酸(227)组成的典型的亮氨酸拉链结构。212 位 L → F 的突变没有影响到亮氨酸拉链的关键氨基酸。将构建的表达载体分别导入原核和真核的大肠癌细胞系 CCL229 后, 均获得了有效表达。通过 Western 印迹鉴定, 发现原核表达产生的 CD147 在分子量上明显小于正常的 CD147, 而真核表达产生的 CD147 分子量与正常 CD147 吻合(图 3)。这是因为 CD147 是高度糖基化的蛋白质, 而原核细胞缺乏相应的糖基化功能, 因此原核表达产生的 CD147 分子量明显小于正常 CD147。CD147 是单次跨膜蛋白, 为了确定真核表

达载体产生的 CD147 是否能够表达与细胞膜上, 我们用荧光显微镜检测真核表达细胞, 发现在阳性细胞的细胞膜附近有明显的绿色荧光信号, 而转染空载体的整个细胞均有荧光信号(图 4), 说明我们构建的真核表达载体 pEGFP-147 能够有效表达膜蛋白 CD147, 同时也说明尽管我们克隆的 CD147 存在跨膜区第 212 氨基酸由 L 到 F 的突变, 但是该突变并不影响 CD147 的膜定位功能。

大量研究表明 MMPs 与多种肿瘤的侵袭转移有关^[7], 其中 MMP2(明胶酶 A)和 MMP9(明胶酶 B) 通过降解基底膜 IV 型胶原在恶性肿瘤早期的侵袭中起重要作用^[8,9]。因为 CD147 可以促进细胞表达 MMPs 的增加, 为了验证表达的 CD147 是否保持该功能, 我们将原核和真核表达的 CD147 进行了纯化, 将纯化后的 CD147 加入成纤维细胞进行共培养。结果发现原核表达的 CD147 不能促进 MMP2 和 MMP9 表达

的增加, 而真核表达的 CD147 能够明显促进 MMP2 和 MMP9 的表达水平(图 5), 这表明原核表达产物不能促进 MMPs 表达增加, 而真核表达系统能够有效表达有功能活性的 CD147。这些结果也说明 CD147 肽链合成后的糖基化和其他修饰对其活性的保持是至关重要, 而 CD147 第 212 位氨基酸由 L 突变为 F 并不影响其功能。

参考文献 (References)

- [1] Miyauchi T *et al.* *J Biochem (Tokyo)*, 1990, **107**: 3163.
- [2] Muramatsu T *et al.* *Histol Histopathol*, 2003, **18**: 981
- [3] Neuhaus-Steinmetz U *et al.* *Mol Pharmacol*, 1994, **45**: 36
- [4] 郭晓楠等. *肿瘤防治研究*, 2000, **27**: 12
- [5] van den Oord JJ *et al.* *Am J Pathol*, 1997, **151**: 665
- [6] Ogata R *et al.* *Hum Pathol*, 1999, **30**: 443
- [7] Nagase H *et al.* *J Biol Chem*, 1999, **274**: 21491
- [8] Stetler-Stevenson WG *et al.* *Semin Cancer Biol*, 1996, **7**: 147
- [9] Tryggvason K *et al.* *Biochem Biophys Acta*, 1987, **907**: 191

Cloning, Expression of Human CD147 and Its Effect on Matrix Metalloproteinases Expression of Fibroblast

Qing-Chuan Feng, Si-Jiao Chen¹, Jin-Dan Song*

(Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, China;

¹Teaching and Research Office for Geriatric Disease of the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract CD147, which stimulates nearby fibroblasts to synthesize matrix metalloproteinases (MMPs), is associated with tumor cell invasion and metastasis. In order to investigate the role of CD147 on large colonic cancer, human cd147 gene was obtained from a normal individual by using RT-PCR, and was sequenced. One synonymic substitution and one nonsynonymic substitution were found in this gene. The nonsynonymic substitution C634T leads to a amino acid change (L212F), which located in the transmembrane region of CD147. The bacterial and mammalian expression vectors of CD147 were constructed and cloned into *E. coli* BL-21 and CCL229 cells to induce expression of CD147, respectively. The results showed that the CD147 from BL-21/147 has a less molecular weight than from CCL229, suggesting the lack of glycosylation in CD147. The expression of CD147 was detected on the surface of CCL229/147 by using fluorescence microscope. The CD147 purified from CCL229/147 appeared to induce the production of MMPs in fibroblasts strongly, but that from BL-21/147 doesn't. Those results suggest that glycosylation may play a key role on the activity of CD147 to stimulate the expression of MMPs, and the mutation L212F does not influence the membrane location and activity of CD147 in CCL229.

Key words CD147; matrix metalloproteinases; gene cloning; gene expression

Received: March 27, 2006 Accepted: June 29, 2006

This work was supported by the Aid-finance Project of Liaoning Provincial Education Department (No.051949) and the Natural Science Foundation of Liaoning Province (No.20062102)

*Corresponding author. Tel: 86-24-23256087, Fax: 86-24-23256087, E-mail: fengqingchuan@yahoo.com