

· 论著 ·

ZNF24 基因过表达慢病毒载体的构建及其在人结直肠癌 HCT116 细胞中的表达

田 硕, 厉建中 (海军军医大学药系生化药理学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 通过构建 ZNF24 基因过表达慢病毒载体, 建立 ZNF24 基因过表达的人结直肠癌 HCT116 细胞株, 为开展后续研究提供物质基础。方法 通过 PCR 扩增 ZNF24 基因序列片段和 3FLAG 标签序列片段, 并将两产物通过同源重组克隆至慢病毒载体 pMT406 中, 构建成重组表达 ZNF24 慢病毒质粒 pMT-ZNF24。将重组质粒 pMT-ZNF24 与辅助包装载体质粒 pCMV-dR8.9 和 pCMV-VSV-G 一起共转染 293T 细胞并收集慢病毒。应用孔稀释法检测病毒滴度, 用 qRT-PCR 和蛋白印迹法检测慢病毒转染 HCT116 细胞后 ZNF24 的表达水平。结果 成功构建了重组载体 pMT-ZNF24, 并获得相应的病毒, 病毒滴度为 3.25×10^9 TU/ml。转染重组 ZNF24 慢病毒的 HCT116 细胞中 ZNF24 表达水平显著高于空白组和阴性对照组细胞。结论 构建了 ZNF24 基因过表达慢病毒载体, 并获得相应的病毒和稳定表达 ZNF24 的 HCT116 细胞株。

[关键词] ZNF24; 结直肠癌; 慢病毒载体

[文章编号] 2097-2024(2023)04-0222-05

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202204040

Construction and expression of lentiviral vector overexpressing ZNF24 gene in human colorectal cancer HCT116 cell

TIAN Shuo, LI Jianzhong (Department of Biochemistry, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433 China)

[Abstract] **Objective** To establish the human colorectal cancer cell line HCT116 with ZNF24 gene overexpression by constructing lentiviral vector of ZNF24 gene overexpression, and provide material basis for subsequent research. **Methods** The recombinant expression ZNF24 lentiviral plasmid pMT-ZNF24 was constructed by the homologous recombination of ZNF24 gene and 3FLAG tag sequence fragments which was amplified by PCR into lentiviral vector pMT-406. The recombinant plasmid pMT-ZNF24 and the auxiliary packaging vector plasmids pCMV-dR8.9 and pCMV-VSV-G were co-transfected into 293T cells, after which the lentivirus were collected. The virus titer was determined with well dilution method. The lentivirus was transfected into HCT116 cells, and the expression levels of ZNF24 were detected by qRT-PCR and Western blot. **Results** The recombinant vector pMT-ZNF24 was successfully constructed, and the corresponding virus was obtained. The virus titer was 3.25×10^9 TU/ml. The expression levels of ZNF24 in cells transfected with recombinant ZNF24 lentivirus were significantly higher than those in blank and negative control. **Conclusion** The ZNF24 gene overexpression lentiviral vector had been constructed, and the corresponding virus and the HCT116 cell line expressing ZNF24 had been obtained.

[Key words] ZNF24 gene; colorectal cancer; lentiviral vector

转录因子 ZNF24 (也称 KOX17 或 ZNF191) 是类 Krüppel 锌指转录因子家族的成员, N 端有一 SCAN 结构域 (也称 LeR 结构域), 该区域不仅含有亮氨酸^[1], 还有选择性的异型或同型寡聚物^[2]; C 端有四个连续的锌指模体且都是典型的类 Krüppel 样^[2]。我们通过小鼠胚胎干细胞基因打靶, 获得了 ZF-12^{+/+} (又称 Zfp191, 与 ZNF24 同源) ES 细胞, 并将细胞注射入小鼠的囊胚腔, 得到了正常发育的

ZF-12^{+/+} 小鼠, 然而得到的 ZF-12^{-/-} 小鼠胚胎发育缓慢且在 7.5 d 左右胚胎致死^[2]。最近研究表明, ZNF24 通过调控微血管内皮细胞的增殖、迁移和侵袭, 在内皮细胞的血管生成中起重要作用^[3]。我们前期研究发现 ZNF24 作为一个因子拥有多种功能, 比如参与激酶转录活性调控、血管增殖、大脑发育以及 DNA 损伤应答等^[4]。

ZNF24 基因最初由上海交通大学医学院的陈竺院士科研团队与复旦大学的余龙教授科研团队合作从造血细胞中克隆获得, 定位于 18q12.1^[5]。该区域的缺失与人类多种肿瘤相关, 如浸润性乳腺癌^[6]、结直肠癌^[7]等。余龙教授科研团队报道了 ZNF24

[基金项目] 国家自然科学基金 (81570557, 30871353)

[作者简介] 田 硕, 硕士研究生, Email: 605204304@qq.com

[通信作者] 厉建中, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 药物靶点与功能基因研究, Email: 466186272@qq.com

在肝癌中的不同作用: 其在肝癌组织中表达上调, 可通过与 β -连环蛋白基因的启动子结合, 激活 β -连环蛋白基因转录, 进而激活其下游靶基因如细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1) 基因, 促进肝癌细胞的增殖^[8]; 也可直接与 DNA 甲基转移酶 1 (DNMT1) 启动子结合, 激活 DNMT1 基因转录, 引起肝癌细胞 DNA 甲基化改变, 进而激活 PI3K-AKT 途径促进肝癌细胞增殖^[9], 提示 ZNF24 在肝癌中是癌基因。而在转移肝癌组织中 ZNF24 表达下调, ZNF24 通过与 DGL1 (Discs Large 1) 启动子结合, 激活 DGL1 基因转录, 通过 Yes 相关蛋白 (Yes-associated protein, YAP) 信号通路抑制肝癌细胞的转移, 提示 ZNF24 在肝癌转移中是抑癌基因^[10]。此外, 前列腺癌中 ZNF24 表达上调, 通过调控 Twist1 促进肿瘤细胞上皮间质转换 (EMT)、增殖、侵袭和转移, 提示 ZNF24 在前列腺癌中是癌基因^[11]。但是, ZNF24 在甲状腺癌中表达下调, 通过竞争性结合 β -连环蛋白, 抑制它与辅助因子 LEF1/TCF1 形成功能性复合物, 从而抑制 Wnt 信号通路, 进而抑制肿瘤增生与转移^[12], 提示 ZNF24 在甲状腺癌中是抑癌基因。令人感兴趣的是, 研究 miRNA-940 (microRNA-940) 在肿瘤中的作用, 发现 ZNF24 是其调控的靶基因, 在三阴乳腺癌 (TNBC) 中 miRNA-940 靶向下调 ZNF24, 抑制三阴乳腺癌 (TNBC) 细胞的增殖和转移^[13], 提示 ZNF24 促进 TNBC 细胞的增殖和转移是癌基因。但是, 在人胃癌组织中 miRNA-940 通过靶向抑制 ZNF24 表达, 促进癌细胞的侵袭和转移^[14], 提示 ZNF24 抑制胃癌细胞的侵袭和转移是抑癌基因。这些结果表明, ZNF24 通过调控不同的靶基因, 在多种不同肿瘤的发生发展、侵袭和转移中起着重要复杂的两面性作用 (促进或抑制)。

结直肠癌是一种常见的恶性肿瘤, 在我国拥有较高的发病率和较低的生存率^[15]。目前, 结直肠癌与 ZNF24 的关系仍不明确。因此, 我们构建 ZNF24 基因过表达的慢病毒载体, 包装成病毒并转染结直肠癌细胞 HCT116, 获得了 ZNF24 基因过表达的 HCT116 细胞株, 为后续研究的开展提供物质基础。

1 实验材料

1.1 细胞及载体

293T 细胞、人结直肠癌 HCT116 细胞、大肠杆菌感受态 DH5 α 均来自本实验室, 质粒 pMT406、包装质粒 pCMV-dR8.9、pCMV-VSV-G 均购自上海 Sangon Biotech 公司。

1.2 主要试剂

限制性内切酶 BamHI (R6021)、限制性内切

酶 XhoI (RK21100)、DNA 胶回收试剂盒 (AK1001)、逆转录试剂盒 (RR037A)、荧光定量 PCR 试剂盒 (RR420L) (Takara 公司, 日本); 质粒小提试剂盒 (PD1211, Promega 公司, 美国); 无缝克隆试剂盒 (C5891)、AxyPrep 总 RNA 小量提取试剂盒 (AP-MN-MS-RNA-250G)、兔抗 ZNF24 多克隆抗体 (D324009)、兔抗 GAPDH 多克隆抗体 (D110016)、山羊抗兔 IgG (D111018) (Sangon Biotech 公司, 中国); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (P0012A)、胰酶 (C0202) (碧云天生物科技公司, 中国); DMEM 细胞培养基 (SH30022, 赛默飞世尔生物科技公司, 美国); 胎牛血清 (6170-078, Ausbian 公司, 澳大利亚)。

2 实验方法

2.1 ZNF24 基因过表达慢病毒载体的构建

2.1.1 目的片段获取

ZNF24 基因、3FLAG 和相关引物均由上海 Sangon Biotech 公司合成。Primer 1 和 Primer 2 用于 PCR 扩增 ZNF24, 产物大小为 1 128 bp; Primer 3 和 Primer 4 用于 PCR 扩增 3FLAG, 产物大小为 111 bp; Primer 5 和 Primer 6 用于菌落 PCR 鉴定, 阳性产物大小为 1 438 bp。引物序列见表 1。

表 1 ZNF24 基因、3FLAG 的特异性引物序列
以及相关引物序列

片段名称	序列
Primer 1	TGGCAAAGAATTGGATCCGCC ACCATGTCTGCACAGTCAGTGAAG
Primer 2	AACTTTCACAACATTCAGAAGTTT
Primer 3	CTGAATGTTGTGAAAGTTGACTACAAGGATGA
Primer 4	CATAATACTAGTCTCGAGTTATTTGTCGTCATCATC
Primer 5	CGGCTCTAGACCTCTGCTA
Primer 6	CGTGAGTCAAACCGCTATCCAC

ZNF24 (或 3FLAG) 的 PCR 反应条件: 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min (或 10 s), 共 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

2.1.2 载体线性化、重组质粒的构建与鉴定

用限制性内切酶 BamHI 和 XhoI 酶切 pMT406, 胶回收线性化载体 (大小约 8 537 bp)。线性化的载体、PCR 扩增的 ZNF24 与 3FLAG 产物, 通过同源重组 (无缝克隆) 反应, 将 10 μl 反应产物转化至 DH5 α 。平皿培养过夜, 挑取单克隆进行菌落 PCR 鉴定, 阳性克隆产物预期为 1 438 bp。PCR 阳性的克隆进一步测序鉴定, 测序正确的重组质粒命名

为 pMT-ZNF24。

2.2 慢病毒载体包装、滴度测定

转染前 24 h, 胰酶消化并重悬 293T 细胞, 取 10 个 10 cm 的培养皿, 以 1×10^7 个/皿的细胞密度铺板。细胞贴壁后将原有培养基更换为 Opti-MEM® 培养基, 体积为 9 ml。取 100 μ g pMT-ZNF24(或 pMT406)、65 μ g pCMV-dR8.9、35 μ g pCMV-VSV-G 和适量 Opti-MEM® 培养基加入至 15 ml 无菌离心管中混匀, 总体积为 5 ml。再取 500 μ l 细胞转染液和 4.5 ml Opti-MEM® 培养基混匀后滴加至上述离心管中, 轻柔摇晃至均匀, 室温孵育 20 min。孵育完成后, 将混合液分装到 293T 细胞中, 每皿 1 ml, 轻轻摇晃混匀后放回培养箱。细胞培养 6 h 后弃上清液, 加入 10 ml DMEM 培养基继续培养, 2 d 后收集细胞上清液。用 60 ml 0.22 μ m PVDF 过滤装置过滤上清液, 4 $^{\circ}$ C, 25 000 r/min 离心 2 h, 然后分装保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。采用孔稀释法测定病毒滴度: 准备 5 个 EP 管, 各加入 90 μ l 含 10%FBS 的高糖 DMEM。EP 管 1 中添加 10 μ l 的待测病毒原液, EP 管 2 中添加 EP 管 1 混合液 10 μ l, 依次操作至 EP 管 5。293T 细胞接种到 96 孔板的 5 个孔中, 每孔约 5×10^4 个细胞, 待细胞贴壁后去掉原液, 依次加入 EP 管中的病毒液继续培养, 24 h 后换液, 观察并记录 3 d 后稀释率最大孔中的荧光细胞数量。病毒滴度=荧光细胞数/病毒原液量。

2.3 慢病毒转染 HCT116 细胞

胰酶消化 HCT116 细胞, 重悬后接种于 24 孔板中, 每孔细胞约为 3×10^5 个, 待细胞融合达 30% 时以细胞感染指数(MOI)=10 计算病毒浓缩液体积并转染细胞。将 HCT116 细胞分为 3 组: 空白对照组(HCT116 细胞不转染病毒)、阴性对照组(HCT116 细胞转染不含 ZNF24 的空载体慢病毒)和 ZNF24 组(HCT116 细胞转染 ZNF24 过表达慢病毒)。转染 72 h 后, 在 ZNF24 组和阴性对照组中加入 4 μ g/ml 嘌呤霉素, 继续培养 72 h 后得到稳定表达细胞株。

2.4 实时荧光定量 PCR 检测 ZNF24 mRNA 的表达

慢病毒转染 HCT116 细胞, TRIzol 法裂解细胞并提取 RNA, mRNA 反转录成 cDNA 后扩增 ZNF24。ZNF24 引物序列上游为 CATTCCTAAGGCACTGTGAT, 下游为 TTGAGGAACACCCATACTGAGA; GAPDH 引物序列上游为 TGACTTCAACAGC GACACCCA, 下游为 CACCCTGTTGCTGTAGCCAA。2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法分析 ZNF24 mRNA 的表达量。

2.5 蛋白印迹法检测 ZNF24 蛋白的表达

慢病毒转染 HCT116 细胞, 裂解液(含蛋白酶

抑制剂)裂解细胞, 提取总蛋白并测定浓度。SDS-PAGE 电泳后转膜, 脱脂牛奶封闭 1 h, 室温一抗孵育 3 h, 室温荧光素标记二抗孵育 2 h, Odyssey 双色红外激光成像系统检测荧光信号。

2.6 统计学分析

实验数据以 3 个独立试验的($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 GraphPad Prism 5.0 软件中单因素方差分析或 *t* 检验进行分析。

3 结果

3.1 PCR 扩增及电泳结果

电泳结果显示, 分别获得了大小约 1 128 bp 的 ZNF24 扩增产物与大小约 111 bp 的 3FLAG 扩增产物(图 1)。

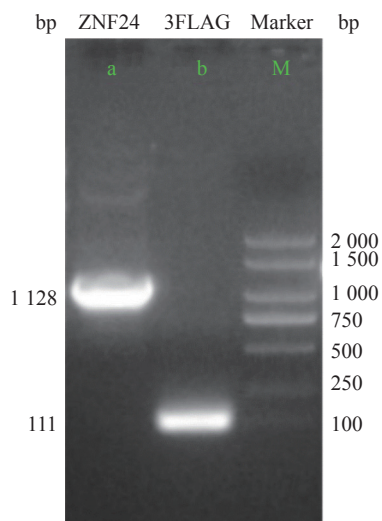


图 1 目的基因 PCR 扩增产物电泳结果
a. PCR 扩增产物 ZNF24; b. PCR 扩增产物 3FLAG;
M. DNA Marker

3.2 载体 pMT406 线性化

电泳结果显示, 得到大小约 8 537 bp 线性化载体条带(图 2)。

3.3 重组慢病毒载体 pMT-ZNF24 菌落 PCR 与测序鉴定

重组质粒经 PCR 扩增, 电泳结果显示, 获得约 1 438 bp 大小的阳性克隆 PCR 产物条带(图 3)。对 PCR 产物进行测序比对分析, 结果与目标序列完全一致。

3.4 病毒滴度检测结果及荧光显微镜下绿色荧光表达

ZNF24 过表达慢病毒的滴度为 3.25×10^9 TU/ml, ZNF24-NC 慢病毒的滴度为 6.19×10^9 TU/ml。以 MOI=10 计算病毒体积并转染 HCT116 细胞, 4 μ g/ml

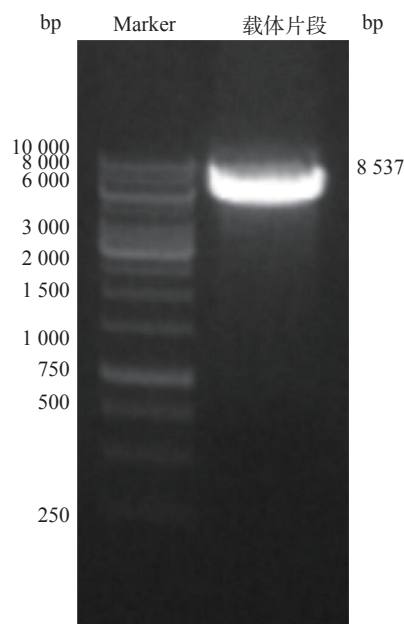


图 2 载体 pMT406 线性化

载体片段:载体 pMT406 经 BamHI 和 XhoI 双酶切产物; Marker:DNA Marker

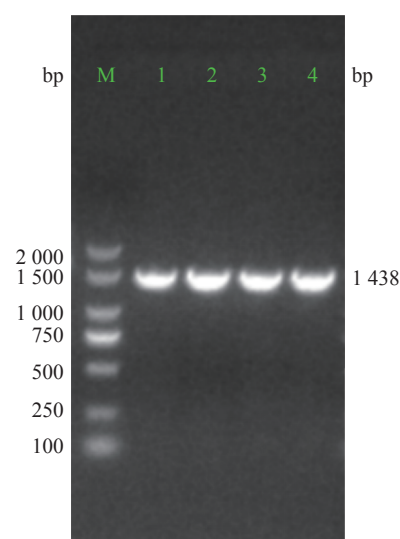


图 3 重组慢病毒载体 pMT-ZNF24 菌落 PCR 鉴定

1~4.重组慢病毒载体 pMT-ZNF24 阳性克隆 PCR 产物条带; M:DNA Marker

嘌呤霉素筛选,荧光显微镜下约 85% 的细胞呈现绿色荧光蛋白(GFP)表达(图 4)。

3.5 HCT116 细胞中 ZNF24 mRNA 相对表达量比较
qRT-PCR 结果表明,转染 ZNF24 过表达慢病毒的细胞组中 ZNF24 的 mRNA 表达显著高于阴性对照组和空白对照组(图 5)。

3.6 HCT116 细胞中 ZNF24 蛋白相对表达量比较
蛋白印迹检测结果显示,转染 ZNF24 过表达慢病毒的细胞组中 ZNF24 表达水平明显高于阴性对照组和空白对照组(图 6)。

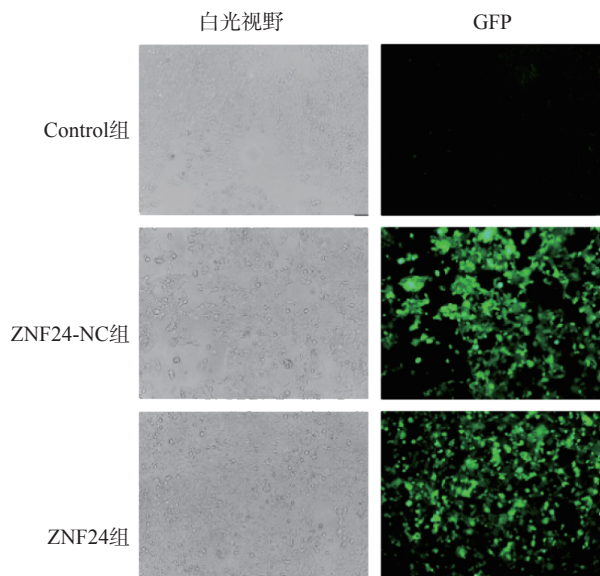


图 4 荧光显微镜下观察转染 ZNF24、ZNF24-NC 慢病毒的 HCT116 细胞 ×100

GFP 荧光检测各组细胞;白光视野.明场观察各组细胞

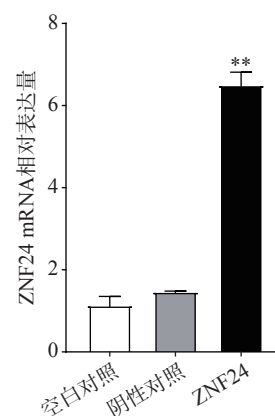


图 5 HCT116 细胞中 ZNF24 mRNA 相对表达水平

** $P<0.01$,与空白对照组和阴性对照组比较

4 讨论

结直肠癌是癌症致死的一个主要原因^[16],致死的关键要素是其高水平的复发和转移^[17]。结肠癌的发病机制十分复杂,涉及多种癌基因、抑癌基因的异常表达。因此,研究结直肠癌的发病机制,特别是结直肠癌复发转移的机制极其重要。研究表明,多种转录因子在结直肠癌等肿瘤中异常表达,参与结直肠癌的发病、转移和侵袭,如在肿瘤微环境参与 VEGF 表达调控的 STAT3 转录因子已成为新的抗肿瘤药物的作用靶点^[18]。

体外与乳腺癌细胞肿瘤动物模型的研究表明,ZNF24 通过与血管内皮生长因子(VEGF)启动子上游序列(-144/-134,非(TCAT) n 重复序列)直接结合抑制 VEGF 基因转录,从而抑制血管增生达到抑

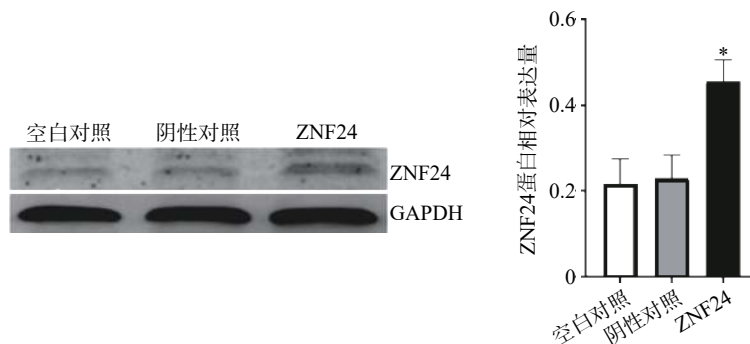


图 6 HCT116 细胞中 ZNF24 蛋白表达水平

* $P < 0.05$, 与空白对照组和阴性对照组比较

制肿瘤生长^[19]。然而, 敲减人微血管内皮细胞中的 ZNF24 导致细胞迁移, 侵袭和增殖减弱, 暗示 ZNF24 具有促进人微血管内皮细胞的血管生成潜力^[3]。多项研究表明 ZNF24 通过调控不同靶基因 (如 Twist1^[11]、 β -连环蛋白^[8] 和 DGL1^[10] 等) 的转录表达以及竞争性结合蛋白因子^[8], 在多种不同肿瘤的发生发展、侵袭和转移中起着重要复杂的两面性作用 (促进或抑制)。

本研究成功构建了 ZNF24 过表达慢病毒载体, 获得相应的病毒。转染 HCT116 细胞, 获得稳定过表达 ZNF24 的 HCT116 细胞株, 为开展后续研究提供了物质基础。

【参考文献】

- [1] 厉建中, 陈霞, 王永良, 等. 小鼠锌指蛋白基因ZF-12的克隆与基因结构以及5'端启动子活性的分析[J]. 遗传学报, 2003, 30(4): 311-316.
- [2] 赵靖凯, 王聪, 张籍鹏, 等. GST-pulldown验证转录因子 ZNF24与c-Myc的相互作用[J]. 生物技术通讯, 2014, 25(6): 765-769.
- [3] JIA D, HUANG L, BISCHOFF J, et al. The endogenous zinc finger transcription factor, ZNF24, modulates the angiogenic potential of human microvascular endothelial cells[J]. *FASEB J*, 2015, 29(4): 1371-1382.
- [4] 王晓鹏, 李梦文, 厉建中, 等. 转录因子ZNF191腺病毒表达载体的构建及鉴定[J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(10): 1215-1217.
- [5] HAN Z G, ZHANG Q H, YE M, et al. Molecular cloning of six novel Krüppel-like zinc finger genes from hematopoietic cells and identification of a novel transregulatory domain KRNB[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(50): 35741-35748.
- [6] RICHARD F, PACYNA-GENGELBACH M, SCHLÜNS K, et al. Patterns of chromosomal imbalances in invasive breast cancer[J]. *Int J Cancer*, 2000, 89(3): 305-310.
- [7] KERN S E, FEARON E R, TERSMETTE K W, et al. Clinical and pathological associations with allelic loss in colorectal carcinoma[corrected][J]. *JAMA*, 1989, 261(21): 3099-3103.
- [8] LIU G Y, JIANG S M, WANG C J, et al. Zinc finger transcription factor 191, directly binding to β -catenin promoter, promotes cell proliferation of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2012, 55(6): 1830-1839.
- [9] LIU Y F, CHENG H H, CHENG C C, et al. ZNF191 alters DNA methylation and activates the PI3K-AKT pathway in hepatoma cells via transcriptional regulation of DNMT1[J]. *Cancer Med*, 2022, 11(5): 1269-1280.
- [10] WU D, LIU G Y, LIU Y F, et al. Zinc finger protein 191 inhibits hepatocellular carcinoma metastasis through discs large 1-mediated yes-associated protein inactivation[J]. *Hepatology*, 2016, 64(4): 1148-1162.
- [11] HUANG X J, LIU N X, XIONG X. ZNF24 is upregulated in prostate cancer and facilitates the epithelial-to-mesenchymal transition through the regulation of Twist1[J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(5): 3593-3601.
- [12] XIONG J, JIANG P P, ZHONG L, et al. The novel tumor suppressor gene ZNF24 induces THCA cells senescence by regulating Wnt signaling pathway, resulting in inhibition of THCA tumorigenesis and invasion[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 646511.
- [13] HOU L M, CHEN M S, YANG H W, et al. miR-940 inhibited cell growth and migration in triple-negative breast cancer[J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 3666-3672.
- [14] LIU X Y, GE X X, ZHANG Z, et al. microRNA-940 promotes tumor cell invasion and metastasis by downregulating ZNF24 in gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(28): 25418-25428.
- [15] 张子怡, 林泉任, 叶春雨, 等. 结肠癌干细胞标志物和信号通路的研究进展[J]. 生命科学, 2019, 31(8): 802-811.
- [16] MASSAI L, CIRRI D, MARZO T, et al. Auranofin and its analogs as prospective agents for the treatment of colorectal cancer[J]. *Cancer Drug Resist*, 2022, 5(1): 1-14.
- [17] FAKIH M G. Metastatic colorectal cancer: current state and future directions[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(16): 1809-1824.
- [18] MOHASSAB A M, HASSAN H A, ABDELHAMID D, et al. STAT3 transcription factor as target for anti-cancer therapy[J]. *Pharmacol Rep*, 2020, 72(5): 1101-1124.
- [19] JIA D, HASSO S M, CHAN J, et al. Transcriptional repression of VEGF by ZNF24: mechanistic studies and vascular consequences *in vivo*[J]. *Blood*, 2013, 121(4): 707-715.

[收稿日期] 2022-04-10 [修回日期] 2022-09-05

[本文编辑] 李春德