

## 筛选高表达CPE $\Delta$ N的H1299肺癌细胞株

孙静 张桂荣 王虹月 申慧

**【摘要】**背景与目的 N端截短的羧肽酶E (N-terminal truncated carboxypeptidase E, CPE $\Delta$ N) 是一个新的肿瘤转移相关蛋白。本研究旨在筛选高表达CPE $\Delta$ N的H1299肺癌细胞株, 为完成小鼠活体成像实验创造条件。方法 构建CPE $\Delta$ N的慢病毒表达载体。分别用CPE $\Delta$ N慢病毒表达载体或对照慢病毒空载体转染H1299细胞, 2  $\mu$ g/mL的嘌呤霉素加压筛选。Western blot分析CPE $\Delta$ N蛋白的表达, 荧光素酶报告基因实验分析荧光素酶对底物的分解作用。结果 当感染倍数 (multiple of infection, MOI) 是20时, 慢病毒对H1299细胞的转染效率可以达到80%。CPE $\Delta$ N高表达H1299细胞株 (H1299-CPE $\Delta$ N) 和对照慢病毒载体表达H1299细胞株 (H1299-control) 中CPE $\Delta$ N蛋白的表达量为4:1。H1299-CPE $\Delta$ N和H1299-control均能够有效分解荧光素酶底物, 可以满足活体成像实验的需求。结论 筛选出高表达CPE $\Delta$ N的H1299肺癌细胞株, 为活体成像实验的开展创造了条件, 也为进一步解释CPE $\Delta$ N促进肿瘤转移的分子机制奠定了基础。

**【关键词】** 肺肿瘤; 羧肽酶E N端截短体; 慢病毒载体

### Screening of Highly Expressed CPE $\Delta$ N Lung Cancer H1299 Cells

Jing SUN, Guirong ZHANG, Hongyue WANG, Hui SHEN

Biotherapy Research Center, Liaoning Cancer Hospital and Institute, Shenyang 110042, China

Corresponding author: Guirong ZHANG, E-mail: zhang.lth@163.com

**【Abstract】** **Background and objective** The N-terminal truncated carboxypeptidase E (CPE $\Delta$ N) protein is a novel biomarker of tumor metastasis. This study screened the H1299 cell line with a highly expressed CPE $\Delta$ N gene for *in vivo* imaging experiment. **Methods** Human CPE $\Delta$ N gene was cloned into the luciferase lentiviral vector. H1299 cells transduced with CPE $\Delta$ N or control lentiviral vectors were selected with 2  $\mu$ g/mL puromycin. The expression of CPE $\Delta$ N was identified through Western blot analysis, and luciferase activity was measured using luciferase reporters. **Results** The human CPE $\Delta$ N lentiviral expression vector was successfully constructed. The transfection rate of H1299 cells by the lentivirus achieved 80%, with an infection multiplicity of 20. The H1299 cell line with high CPE $\Delta$ N (H1299-CPE $\Delta$ N) expression was established, with an increase in CPE $\Delta$ N expression by four times compared with the control lentivirus-transfected H1299 cell line (H1299-control). As H1299-CPE $\Delta$ N and H1299-control can effectively decompose luciferase substrates, they can be applied in *in vivo* imaging. **Conclusion** H1299-CPE $\Delta$ N and H1299-control can be used in *in vivo* imaging experiment for further research on molecular mechanisms and signal transduction to elucidate the role of CPE $\Delta$ N in lung cancer metastasis.

**【Key words】** Lung neoplasms; N-terminal truncated carboxypeptidase E; Lentiviral vector

The study was supported by the grants from National Natural Science Foundation of China (No.81372287), Liaoning Province Science and Technology Key Project (No.2012225016) and Shenyang City Science And Technology Key Project (No. F12-193-9-15)(All to Jing SUN).

羧肽酶E (carboxypeptidase E, CPE) 是一个金属离子依赖的肽链端解酶, 它的生物学功能非常多元化。按照亚细胞定位的差异, CPE的功能可以被分为外肽酶功能和非酶功能两类<sup>[1]</sup>。第一部分CPE是以分泌形式表

达的, 这部分CPE主要分布在内分泌及神经内分泌细胞中, 他们可以将激素原或神经多肽裂解为成熟的激素或神经肽, 进而调节内分泌及神经信号的传导<sup>[2-8]</sup>。第二部分CPE是以非分泌性形式存在的, 他们或者结合在细胞质膜上参与高尔基体的转运过程<sup>[9]</sup>; 或者定位在细胞质、细胞核中参与细胞信号传导、转录调控。这部分CPE蛋白的功能是多元的, 也是目前最受关注的。

近年研究者采用信使RNA (messenger RNA, mRNA) 芯片技术分析CPE在不同肿瘤细胞中的表达, 结果显

本研究受国家自然科学基金面上项目 (No.81372287)、辽宁省科技攻关项目 (No.2012225016) 和沈阳市科技攻关项目 (No.F12-193-9-15) 资助

作者单位: 110042 沈阳, 辽宁省肿瘤医院生物治疗研究中心, 辽宁省肿瘤研究所 (通讯作者: 张桂荣, E-mail: zhang.lth@163.com)

示在神经内分泌起源的肿瘤组织如成神经细胞瘤、胶质瘤中CPE的高表达预示肿瘤具有较好的预后<sup>[10-12]</sup>,而在一些非内分泌的肿瘤如乳腺癌、肾细胞癌、宫颈癌中<sup>[13-17]</sup>,CPE的高表达常常预示着患者的生存期短、预后差。在不同起源的肿瘤组织中CPE的功能是矛盾的且不明朗。2011年香港大学Lee的一项研究给我们带来了新的启示,他们在肝细胞癌中发现一种截短形式的CPE蛋白即CPE $\Delta$ N,他可以作为一个独立性指标,预测肝癌和嗜铬细胞瘤的转移和复发<sup>[18,19]</sup>。CPE $\Delta$ N能够与组蛋白去乙酰化酶1和组蛋白去乙酰化酶2结合进而抑制转移相关蛋白NEDD9的表达。

2013年周坤等<sup>[20,21]</sup>在结直肠癌中也发现了CPE $\Delta$ N的表达,并且证实在肿瘤组织中只有截短形式的CPE $\Delta$ N表达,CPE $\Delta$ N高表达的病例复发、转移率高于CPE $\Delta$ N低表达病例。肝细胞癌、嗜铬细胞瘤、结肠癌是起源不同的三种肿瘤类型,CPE $\Delta$ N高表达可以预测三者的复发,提示CPE $\Delta$ N很可能是一个广谱的肿瘤预测分子。

在本研究室的前期工作中,我们在9个肺癌细胞株中检测到CPE $\Delta$ N的表达,并且证实CPE $\Delta$ N的表达可以加速肺癌细胞浸润转移。为进一步明确CPE $\Delta$ N促进肺癌转移的易发部位,并揭示其可能分子机制,本研究选取CPE $\Delta$ N蛋白表达量最少的肺癌细胞株H1299作为母细胞,筛选得到了共表达荧光素酶和CPE $\Delta$ N的H1299肺癌细胞株,并证实CPE $\Delta$ N高表达细胞株和对照细胞株均可以有效分解荧光素酶底物,可以用于后期的小鼠活体成像实验,现将结果报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 慢病毒载体pCMV-GFP-LV、pLenti-CMV-MCS-HA-3Flag-P2A-LUC-T2A-Puro和慢病毒包装试剂盒购自上海禾元生物;高保真酶、胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自天根生物;限制性内切酶、T4连接酶来自美国NEB公司;SYBR Premix EX Taq试剂盒购自TaKaRa,感受态细胞DH5 $\alpha$ 购自TaKaRa;H1299细胞购自上海细胞库;DMEM培养基、胎牛血清和青、链霉素购自天根生物;转染试剂脂质体2000购自Invitrogen,嘌呤霉素(Puromycin)购自翊圣公司,双荧光报告基因检测试剂盒购自Promega。

### 1.2 方法

**1.2.1 确定慢病毒载体对H1299细胞的转染效率** 将H1299细胞接种到24孔板中,细胞数为 $1 \times 10^4$ /孔。约16 h后,

用带荧光标记的慢病毒载体pCMV-GFP-LV转染H1299。病毒量按如下公式计算:细胞数 $\times$ 感染倍数(multiple of infection, MOI)值/病毒原液滴度 $\times 10^3$ =病毒加药量。本研究的MOI值共设计了5个梯度,分别是MOI 10、MOI 20、MOI 40、MOI 80和MOI 100。完成转染后加入puromycin,使其终浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,20 h后更换为新鲜培养基。72 h后荧光显微镜拍照,确定最佳感染条件。

**1.2.2 构建CPE $\Delta$ N慢病毒表达载体** CPE $\Delta$ N正向引物为CGAGCTCAAGCTTCGAATTCGCCACCATGAGGCGGCGCCGGCG(含同源重组序列、kozak序列、EcoRI酶切位点和目的基因5'端配对序列);反向引物为:TCATCCTTG TAGTCGGATCCAAAATTTAAAGTTTCTGACATCAT(含同源重组序列、BamHI酶切位点,目的基因3'端配对序列)。扩增CPE $\Delta$ N基因后,用EcoRI和BamHI酶切处理,之后与相同酶切处理的pLenti-CMV-MCS-HA-3Flag-P2A-LUC-T2A-Puro载体进行同源重组,转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞。菌落PCR筛选阳性克隆,之后酶切鉴定并验证表达。

**1.2.3 筛选H1299-CPE $\Delta$ N和H1299-control细胞株** 将H1299细胞接种到24孔板中,细胞数为 $1 \times 10^4$ /孔,细胞汇合度约30%;16 h后分别转染CPE $\Delta$ N慢病毒表达载体或慢病毒空载体,MOI值取20,Puromycin终浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,24 h后换液,弃去培养基每孔加入 $500 \mu\text{L}$ 的新鲜培养基。72 h以后,加入含 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$  puromycin的新鲜培养基。每隔2-3天换液1次,药物筛选约14 d。获得高表达CPE $\Delta$ N和对照慢病毒载体的H1299肺癌细胞系(分别命名为H1299-CPE $\Delta$ N和H1299-control)。通过Real-time PCR和Western blot分析CPE $\Delta$ N的表达,并冻存H1299-CPE $\Delta$ N和H1299-control细胞株。

**1.2.4 荧光素酶报告基因检测** 按照荧光素酶报告基因检测试剂盒说明,裂解H1299-CPE $\Delta$ N和H1299-control细胞株,检测二者分解荧光素酶底物的活性。

## 2 结果

**2.1 慢病毒载体可以高效感染H1299肺癌细胞** 为了分析慢病毒载体对H1299细胞的感染效率、优化感染条件,本研究选择了一个带绿色荧光蛋白,并且转染效率和pLenti-CMV-MCS-HA-3Flag-P2A-LUC-T2A-Puro相同的慢病毒载体pCMV-GFP-LV作为研究对象。设计了MOI 10、MOI 20、MOI 40、MOI 80、MOI 100共5个病毒转染梯度,结果显示当MOI 20、MOI 40、MOI 60、MOI 80、

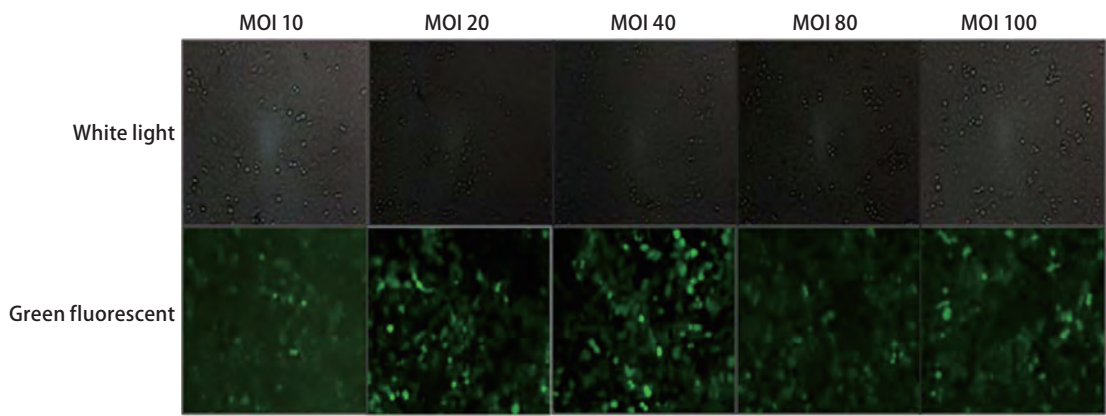


图 1 分析不同MOI条件下, 慢病毒载体对H1299细胞的转染效率  
Fig 1 The transfection efficiency of lentiviral vector in H1299 cells at different multiple of infection (MOI)

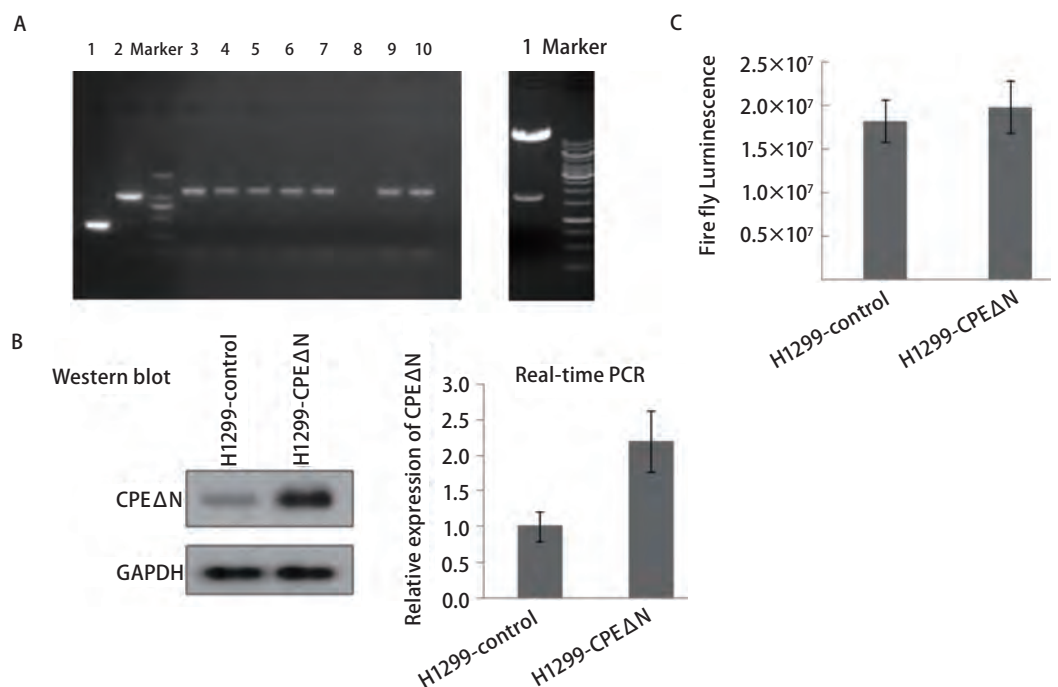


图 2 CPEΔN表达载体的构建及鉴定。A: 左图: 菌落PCR鉴定重组CPEΔN表达载体。阴性对照(第1道), 阳性对照(第2道), 挑取8个菌落克隆进行菌落PCR鉴定(3道-10道); 右图: 酶切鉴定重组CPEΔN表达载体; B: Western blot和Real-time PCR分析CPEΔN蛋白在CPEΔN高过表达细胞系和对照H1299细胞系中的表达; C: 报告基因检测分析H1299-CPEΔN和H1299-control细胞株中荧光素酶活性。

Fig 2 Construction and identification of human CPEΔN expression vector. A: Left picture, Identification of recombinant CPEΔN expression vectors using colony PCR. Negative control (lane 1), positive control (lane 2), 8 colonies picked for colony-PCR identification (lanes 3-10). Right picture, identification of recombinant CPEΔN expression vectors by restriction enzyme; B: Analysis of CPEΔN expression by Western blot and real-time PCR in H1299-CPEΔN cells and H1299-control cells; C: Luciferase reporter gene assay in H1299-CPEΔN cells and H1299-control cells.

MOI 100时感染效率都达到80%以上(图1)。本着高效、低毒的原则, 选择MOI 20作为后续病毒感染的最佳条件。

**2.2 分析CPEΔN蛋白的表达并确定其对荧光素酶底物的分解活性** 通过菌落PCR和酶切鉴定, 证实pLenti-CMV-MCS-HA-3Flag-P2A-LUC-T2A-Puro-CPEΔN慢病毒表达

载体构建成功(图2A)。加入嘌呤霉素加压筛选14 d后, 获得了H1299-CPEΔN和H1299-control细胞株。通过Western blot和Real-time PCR检测两个细胞株中CPEΔN的表达。结果如图2B所示, 二个细胞系中CPEΔN蛋白表达量约为4:1(凝胶灰度扫描结果), CPEΔN mRNA的比值约为2:1。

分析两个细胞系对荧光素酶底物的分解作用, 每组取 $1 \times 10^4$ 个细胞, CPE $\Delta$ N高表达细胞株的luciferase均值为19,891,000, 对照慢病毒载体细胞株的luciferase均值为18,281,000 (图2C), 二者分解荧光素酶底物的能力没有显著差异。提示筛选到的H1299-CPE $\Delta$ N细胞株在表达CPE $\Delta$ N的同时, 能够有效地分解荧光素酶底物可以用于后续的活体成像实验。

### 3 讨论

CPE $\Delta$ N是2011年被鉴定出来的肿瘤转移相关蛋白。Lee等<sup>[18]</sup>证实所有肝癌病例只表达CPE $\Delta$ N。当癌和癌旁正常组织CPE $\Delta$ N RNA比值 $>2$ , 术后2年复发率高达92.8%, 中位生存时间为8.6个月; 而癌和癌旁CPE $\Delta$ N RNA比值 $<2$ 的病例, 术后2年复发率只有25.2%, 中位生存时间超过90个月, 组间差异具有统计学意义。2013年Zhou等<sup>[20]</sup>再次证实CPE $\Delta$ N的高表达可以作为独立性指标预测结肠癌的预后不良。在这些文献的提示下, 本课题组分析了CPE $\Delta$ N表达与肺腺癌预后的相关性也得到相似结论结果将在另外文章发表。

为了探索CPE $\Delta$ N过表达, 是否像我们预测的那样可以加速肿瘤细胞向脑、肝脏或骨组织这些代谢、增殖旺盛的区域转移, 本课题设计了小鼠活体成像实验。为了尽可能地追踪肿瘤细胞去向, 去除动物本底干扰, 我们选择了一个经过改造的慢病毒表达载体。选择用这个表达载体主要基于3个考虑: ①慢病毒载体的转染效率可以达到80%-90%, 并且这种基因整合可以随着细胞分裂被传递到子代; ②这个载体将目的基因和荧光素酶基因偶联在同一个启动子上, 可以实现一个细胞同时表达两种蛋白, 不必同时转染两种质粒再用两种抗生素加压筛选, 方法学上简单、易行; ③小鼠体内不表达荧光素酶, 这样可以最大程度的去除本底。通过腹腔内注入荧光素酶底物, 在30 min能够清晰显示肿瘤细胞在小鼠体内的分布情况。据报道通过荧光检测技术可以追踪到腹腔种植少量的肿瘤细胞, 这个方法很适合观察微小转移灶。

在本研究中, 我们没有选取单克隆而是选择了多克隆CPE $\Delta$ N高表达细胞株。作者认为这种方式可以更直接的体现CPE $\Delta$ N蛋白过表达赋予细胞的功能改变, 而不是某一株单克隆细胞系的个性化行为, 并且这种筛选方式可以节约成本, 节省时间<sup>[22,23]</sup>。分析荧光素酶报告基因

检测结果, 可以看到H1299-CPE $\Delta$ N和H1299-control两个细胞株降解荧光素酶底物的能力没有差异。这个工作的完成将为进一步确证CPE $\Delta$ N促进肺癌转移提供动物水平佐证。CPE $\Delta$ N蛋白有望成为新的肺癌转移预测分子, 用于肿瘤的个性化诊断和治疗。

### 参考文献

- Skalka N, Caspi M, Caspi E, *et al.* Carboxypeptidase E: a negative regulator of the canonical Wnt signaling pathway. *Oncogene*, 2013, 32(23): 2836-2847.
- Cawley NX, Wetsel WC. New roles of carboxypeptidase E in endocrine and neural function and cancer. *Endocr Rev*, 2012, 33(2): 216-253.
- Bachtiary B, Boutros PC, Pintilie M, *et al.* Gene expression profiling in cervical cancer: an exploration of intratumor heterogeneity. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(19): 5632-5640.
- Cawley NX, Rodriguez YM, Maldonado A, *et al.* Trafficking of mutant carboxypeptidase E to secretory granules in a beta-cell line derived from Cpe(fat)/Cpe(fat) mice. *Endocrinology*, 2003, 144(1): 292-298.
- Chen H, Jawahar S, Qian Y, *et al.* Missense polymorphism in the human carboxypeptidase E gene alters enzymatic activity. *Hum Mutat*, 2001, 18(2): 120-131.
- Coleman DL, Eichler EM. Fat (fat) and tubby (tubby), two autosomal recessive mutations causing obesity syndromes in the mouse. *J Hered*, 1990, 81(6): 424-427.
- Cheng Y, Cawley NX, Loh YP. Carboxypeptidase E (NF- $\alpha$ 1): a new trophic factor in neuroprotection. *Neurosci Bull*, 2014, 30(4): 692-696.
- Hong Y, Ho KS, Eu KW, *et al.* A susceptibility gene set for early onset colorectal cancer that integrates diverse signaling pathways: implication for tumorigenesis. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(4): 1107-1114.
- Cool DR, Normant E, Shen F, *et al.* Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor: genetic obliteration leads to endocrine disorders in Cpe(fat) mice. *Cell*, 1997, 88(1): 73-83.
- Fricker LD, Snyder SH. Purification and characterization of enkephalin convertase, an enkephalin-synthesizing carboxypeptidase. *J Biol Chem*, 1983, 258(18): 10950-10955.
- Tang SS, Zhang JH, Liu HX, *et al.* PC2/CPE-mediated pro-protein processing in tumor cells and its differentiated cells or tissues. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 303(1-2): 43-49.
- He P, Varticovski L, Bowman ED, *et al.* Identification of carboxypeptidase E and gamma-glutamyl hydrolase as biomarkers for pulmonary neuroendocrine tumors by cDNA microarray. *Hum Pathol*, 2004, 35(10): 1196-1209.
- Cutcliffe C, Kersey D, Huang CC, *et al.* Clear cell sarcoma of the kidney: up-regulation of neural markers with activation of the sonic hedgehog and Akt pathways. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(22): 7986-7994.
- Walboomers JM, Jacobs MV. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 1999, 189(1): 9-12.
- Kim HJ, Hong J, Yoon HJ, *et al.* Carboxypeptidase E is a novel modulator of

- RANKL-induced osteoclast differentiation. *Mol Cell*, 2014, 37(9): 685-690.
- 16 Murthy SR, Pacak K, Loh YP. Carboxypeptidase E: Elevated expression correlated with tumor growth and metastasis in pheochromocytomas and other cancers. *Cell Mol Neurobiol*, 2010, 30(8): 1377-1381.
- 17 Du J, Keegan BP, North WG. Key peptide processing enzymes are expressed by breast cancer cells. *Cancer Lett*, 2001, 165(2): 211-218.
- 18 Lee TK, Murthy SR, Cawley NX, *et al.* An N-terminal truncated carboxypeptidase E splice isoform induces tumor growth and is a biomarker for predicting future metastasis in human cancers. *J Clin Invest*, 2011, 121(3): 880-892.
- 19 Mitka M. Researchers discover new biomarker that may improve cancer care strategies. *JAMA*, 2011, 305(12): 1184-1185.
- 20 Zhou K, Liang HY, Liu Y, *et al.* Overexpression of CPE-ΔN predicts poor prognosis in colorectal cancer patients. *Tumor Biol*, 2013, 34(6): 3691-3699.
- 21 Liang XH, Li LL, Wu GG, *et al.* Upregulation of CPE promotes cell proliferation and tumorigenicity in colorectal cancer. *BMC Cancer*, 2013, 13: 412.
- 22 Yang SY, Xiao JJ, Zhao DM, *et al.* Construction of lentivirus expression vector of miRNA-491-5p and screening of cell lines for stable expression of miRNA-491-5p. *Nantong Da Xue Xue Bao (Yi Xue Ban)*, 2014, 33(3): 163-166. [杨诗悦, 肖娟娟, 赵敦梅, 等. MiRNA-491-5p慢病毒过表达载体构建及其稳定表达细胞株的筛选. *南通大学学报(医学版)*, 2014, 33(3): 163-166.]
- (收稿: 2015-04-13 修回: 2015-04-29)  
(本文编辑 南娟)



Cite this article as: Sun J, Zhanf GR, Wang HY, *et al.* Screening of Highly Expressed CPEΔN Lung Cancer H1299 Cells. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2015, 18(6): 340-344. [孙静, 张桂荣, 王虹月, 等. 筛选高表达CPEΔN的H1299肺癌细胞株. *中国肺癌杂志*, 2015, 18(6): 340-344.] doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2015.06.03