

# 人 *STRA6* 基因克隆及其在肝癌细胞中的表达定位

何建\*, 王金丽\*, 余畅, 陈相屹, 陈帅, 严辉, 石静#, 孙达权#

贵州医科大学基础医学院, 贵州 贵阳

Email: #529230752@qq.com, #sundq04@126.com

收稿日期: 2021年1月30日; 录用日期: 2021年2月18日; 发布日期: 2021年2月26日

## 摘要

克隆人 *STRA6* 基因蛋白编码区, 构建 *STRA6* 基因真核表达载体并表达于肝癌细胞, 分析其在肝癌细胞中的定位。用 TRIzol 法从人肝细胞 QSG-7701 中抽提获得总 RNA, 经 RT-PCR 和高保真 PCR 获得人 *STRA6* 基因蛋白编码区, 并进行测序鉴定; 用基因工程技术构建真核表达载体 pDsRed1-*STRA6*, 用脂质体法转染人肝癌细胞 Hep 3B; 蛋白免疫印迹检测肝癌细胞中 *STRA6* 蛋白的表达情况, 激光共聚焦显微镜分析 *STRA6* 在肝癌细胞中的分布。成功克隆人 *STRA6* 基因的蛋白编码区, 构建真核表达载体 pDsRed1-*STRA6* 并使其表达于肝癌细胞中, 发现 *STRA6* 在肝癌细胞中表达后集中于细胞表面一个区域。本研究成功克隆 *STRA6* 基因并证明其在肝癌细胞表面分布具有区域性。

## 关键词

人 *STRA6* 基因, 基因克隆, 肝癌细胞, 蛋白定位

# Human *STRA6* Gene Cloning and Its Expression and Localization at Hepatoma Cells

Jian He\*, Jinli Wang\*, Chang Yu, Xiangyi Chen, Shuai Chen, Hui Yan, Jing Shi#, Daquan Sun#

College of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang Guizhou

Email: #529230752@qq.com, #sundq04@126.com

Received: Jan. 30<sup>th</sup>, 2021; accepted: Feb. 18<sup>th</sup>, 2021; published: Feb. 26<sup>th</sup>, 2021

\*共第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 何建, 王金丽, 余畅, 陈相屹, 陈帅, 严辉, 石静, 孙达权. 人 *STRA6* 基因克隆及其在肝癌细胞中的表达定位[J]. 生物物理学, 2021, 9(1): 22-28. DOI: 10.12677/biphy.2021.91003

## Abstract

To clone human *STRA6* gene and construct its eukaryotic expressional vector to express target gene and to investigate its localization in hepatocellular carcinoma cells (HCCs). Total RNA was extracted from human liver cells QSG-7701 by TRIzol method, and the coding region of human *STRA6* gene, identified by DNA sequencing, was obtained by RT-PCR and high fidelity PCR. Then, the eukaryotic expressional vector pDsRed1-*STRA6* was constructed by genetic engineering technology and transfected into human hepatoma cell Hep 3B by liposome method. The expression of *STRA6* protein in HCC cells was detected by Western blot, and the distribution of *STRA6* in HCC cells was analyzed by laser scanning confocal microscopy. The coding region of human *STRA6* gene was cloned successfully, and the eukaryotic expressional vector pDsRed1-*STRA6* was constructed and expressed in HCC cells. It was found that the expressed *STRA6* in HCC cells concentrated in one region on the cell surface. The *STRA6* gene was successfully cloned and its protein distributed regionally on the surface of hepatoma cells.

## Keywords

Human *STRA6* Gene, Gene Cloning, Liver Cancer Cell, Protein Localization

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

维甲酸诱导基因 6 (stimulated by retinoic acid 6, *STRA6*)也称 *MCOPS9*、*MCOPCB8*、*PP14296* 基因, 是 Bouillt 等人通过全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)诱导和差异筛选获得的[1]。该基因定位于染色体 15q24.1 中, 包含有 20 个外显子和 19 个内含子, 编码 667 个氨基酸, 其产物是一种 9 次跨膜蛋白, 能通过结合细胞外视黄醇结合蛋白 RBP4 而捕获全反式视黄醇, 促进视黄醇穿梭细胞膜, 并将视黄醇转移到胞质视黄醇结合蛋白 RBP1 上[2] [3]。*STRA6* 不仅具有转运视黄醇的作用, 还与肿瘤的发生发展具有密切的联系。有报道称, *STRA6* 在结直肠癌、乳腺癌、肾癌、黑色素瘤、卵巢癌和子宫内膜癌中的表达均有不同程度的上调, 暗示 *STRA6* 可能还是一个癌基因[4] [5]。为研究其在肝癌中的作用, 本组首先克隆了 *STRA6* 基因的蛋白编码区, 然后构建其真核表达载体 pDsRed1-*STRA6* 并通过脂质体法表达于肝癌细胞中, 为研究其在肝癌中的作用奠定前期基础。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 材料

细胞 Hep 3B 购自中科院上海细胞库; 细胞 QSG-7701 购自上海赛百慷生物; 细胞培养基 DMEM 和 RPMI-1640 购自 GIBCO; 胎牛血清购自 Gemini; 长链高保真 G × L TaqDNA polymerase、反转录试剂盒、*EcoR* I、*Xho* I、*Hind* III、T4 DNA Ligase、凝胶 DNA 回收试剂盒、平末端加“A”试剂盒和克隆载体 pMD18-T vector 购自 TaKaRa 公司; 小量质粒抽提试剂盒购自天根生物公司; 引物合成及测序由上海生工生物完成; TRIzol、Lipofectamine™2000 购自 Invitrogen 公司; BCA 定量试剂购自 Pierce 公司; *STRA6* 多克隆抗体购自 Affibotech; 红色荧光蛋白标签抗体和 HRP 标记的羊抗兔抗体购于 Biogot; 真核表达载体 pDsRed1-N1 保存于本实验室。

## 2.2. 设计引物

根据 GeneBank 中 *STRA6* 的基因序列(NM\_022369)设计引物, 并在 5'末端和 3'末端分别加入 *Xho* I 和 *Eco*R I 酶切位点。引物序列如表 1 所示。

**Table 1.** PCR primers for the coding region of human *STRA6* gene

**表 1.** 人 *STRA6* 基因蛋白编码区 PCR 引物

引物名称	引物序列(5'-3')
<i>STRA6</i> 上游引物	<u>CTCGAGCCACCATGTCGTC</u> CCAGCCAGCAGGGAACCAGACC (下划线为 <i>Xho</i> I 酶切位点)
<i>STRA6</i> 下游引物	GAATTC <u>CGGGCTGGGCACCATTGGC</u> ACCCAACAGGGC (下划线为 <i>Eco</i> R I 酶切位点)

## 2.3. 细胞培养

QSG-7701 细胞用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养, Hep 3B 用含 10%胎牛血清的 MEM 培养, 培养条件为 37°C、5.0% CO<sub>2</sub>。

## 2.4. RNA 抽提和目的基因获取

用 TRIzol 法提取细胞 QSG-7701 中的总 RNA, 用反转录试剂盒合成 cDNAs, 并以表 1 中引物经高保真 PCR 扩增 *STRA6* 目的基因片段。琼脂糖凝胶电泳鉴定后回收并纯化 *STRA6* 目的基因。

## 2.5. 构建真核表达载体 pDsRed1-*STRA6*

将回收的 *STRA6* 基因片段末端加“A”后与克隆载体 pMD18-T vector 在 4°C 过夜连接, 产物转化感受态 DH5 $\alpha$ , 经含有青霉素的 LB 固体培养板筛选培养后, 挑取单菌落与含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中 37°C 摇菌 12 h, 抽提质粒并酶切鉴定, 菌液送至上海生工生物测序。

测序正确的质粒和真核表达载体 pDsRed1-N1 分别用 *Eco*R I/*Xho* I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳分离目的片段并纯化回收, 用 T4 连接酶 16°C 连接 2 h, 产物转化感受态细菌 DH5 $\alpha$ , 用卡那霉素 LB 固体培养板培养, 挑取单菌落扩大培养, 经抽提质粒、酶切鉴定和 DNA 测序, 重组正确质粒命名 pDsRed1-*STRA6*。

## 2.6. 细胞转染

转染前 12 h, 将消化的细胞按 30%的融合率铺于 12 孔板中, 按 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 说明书转染空载体 pDsRed1-N1 和含有目的基因的重组质粒 pDsRed1-*STRA6*, 转染 6 h 后更换培养基继续培养, 转染后 72 h 在倒置荧光显微镜下观察转染结果。

## 2.7. 蛋白免疫印记

消化目的细胞并收集, 用 RIPA 强效裂解液裂解细胞后对蛋白浓度用 BCA 法定量。用 SDS 上样缓冲液制备样品后进行 SDS-PAGE, 然后用电转移的方法将蛋白转印至 PVDF 膜上, 再用 5% BSA 封闭 30 min, 一抗 4°C 孵育过夜, 二抗室温孵育 4 h, ECL 显色。

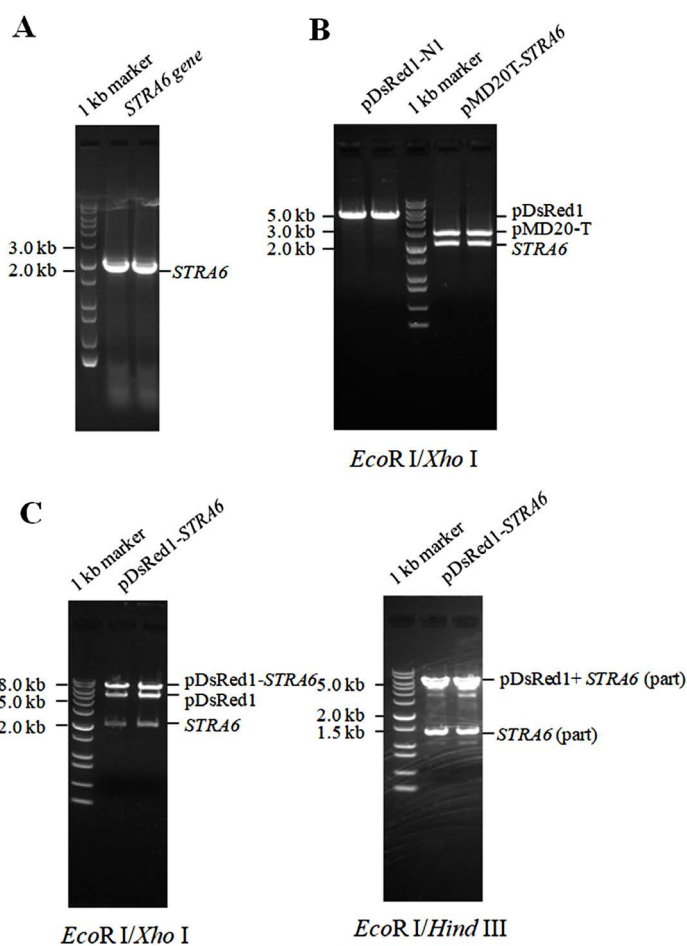
## 2.8. 蛋白定位分析

对转染外源质粒 72 h 后的细胞在荧光显微镜下进行观察, 分析细胞是否出现红色荧光。荧光细胞用胰酶消化后重新铺板于盖玻片上, 并继续培养细胞 24 h 以上, 用 4%的多聚甲醛室温固定细胞 30 min, 并用含有 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂封片, 用激光扫描共聚焦显微镜分析 *STRA6* 蛋白定位。

### 3. 结果

#### 3.1. 成功克隆 *STRA6* 基因蛋白编码区并构建真核表达载体 pDsRed1-*STRA6*

以人肝细胞 QSG-7701 细胞 cDNAs 为模板, 经高保真 PCR 获得长度约 2 kb 的 *STRA6* 基因片段(图 1(A)), 经测序后发现该 DNA 片段正是所需 DNA 片段, 且未出现任何突变。用 *Xho* I 和 *Eco*R I 对真核骨架载体 pDsRed1-N1 和含有 *STRA6* 目的基因的 T 载体 pMD18T-*STRA6* 进行酶解切割, 用琼脂糖凝胶电泳分离纯化目的 DNA 片段(图 1(B))。目的 DNA 片段经  $T_4$  DNA 连接酶连接、转化、卡那霉素筛选培养、质粒抽提和酶切鉴定, 证明 pDsRed1-*STRA6* 与预期一致(图 1(C)), DNA 测序显示 *STRA6* 基因正确插入到真核表达载体 pDsRed1-N1 中, 证明 pDsRed1-*STRA6* 正是所需重组质粒。



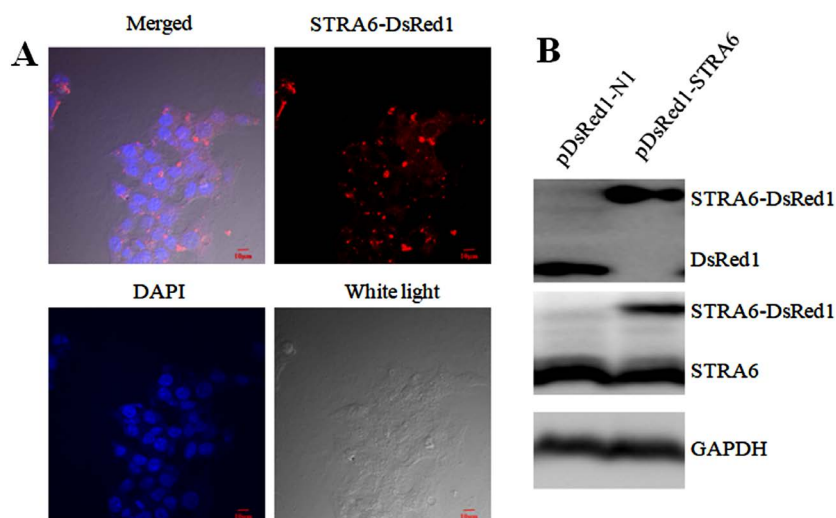
注: (A) PCR 扩增 *STRA6* 基因蛋白编码区。(B) 限制性核酸内切酶 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切真核表达载体 pDsRed1-N1 和 pMD18T-*STRA6*。(C) 限制性核酸内切酶酶切分析重组真核表达质粒 pDsRed1-*STRA6*。

**Figure 1.** Cloning of *STRA6* gene and construction of its eukaryotic expression vector

**图 1.** *STRA6* 基因克隆及其真核表达载体构建

#### 3.2. 外源 *STRA6* 融合蛋白成功表达于肝癌细胞

用脂质体法将重组质粒 pDsRed1-*STRA6* 导入肝癌细胞 Hep 3B 中, 转染后 72 h, 细胞开始出现红色荧光(图 2(A))。消化并收集细胞进行蛋白免疫印记检测, 发现肝癌细胞表达外源 *STRA6* 融合蛋白 (*STRA6*-DsRed1) (图 2(B)), 证明 pDsRed1-*STRA6* 可以在细胞中表达目的蛋白。



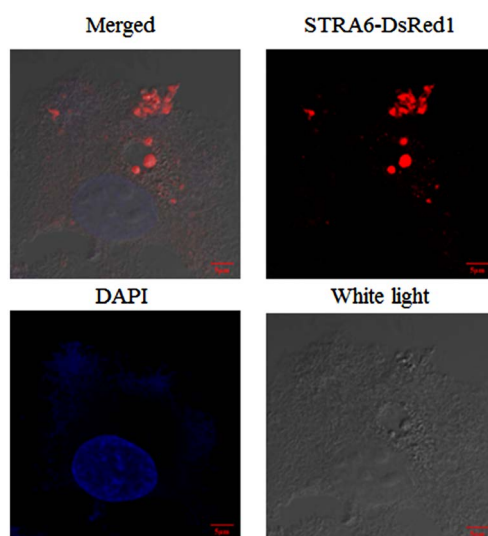
注: (A) 外源融合蛋白 *STRA6* (*STRA6*-DsRed1)在荧光显微镜下呈现红色。(B) 蛋白免疫印记分析外源 *STRA6* 在肝癌细胞中的表达情况。

**Figure 2.** Expression of exogenous fusion protein *STRA6* in HCC cells

**图 2.** 外源 *STRA6* 融合蛋白在肝癌细胞中表达

### 3.3. *STRA6* 集中表达于肝癌细胞的细胞表面

为分析 *STRA6* 在肝癌细胞中的定位, 将表达外源目的蛋白的肝癌细胞铺板于盖玻片上, 经多聚甲醛固定和细胞核染色, 用激光扫描共聚焦显微镜观察发现, *STRA6* 的表达始于胞质囊泡, 后集中定位于细胞膜某一区域(图 3)。



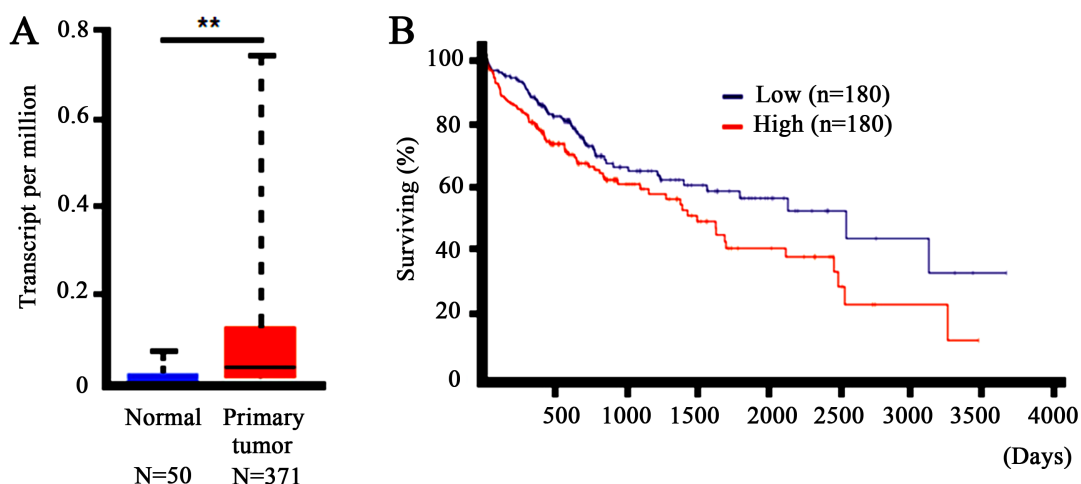
**Figure3.** The expressed *STRA6* was localized in a region of cell surface of hepatoma cell

**图 3.** 表达的 *STRA6* 集中定位于细胞表面某一区域

## 4. 讨论

有研究显示, *STRA6* 参与了多种临床上常见恶性肿瘤的发生和发展过程, 而这些作用背后的分子机制也有所不同。如在结肠癌形成过程中, *STRA6* 会与细胞外分泌型视黄醇结合蛋白 4 (RBP4)结合, 将胞

外 RBP4-维生素 A 复合物中的维生素 A 转运入细胞内, 并传递给胞内 *STRA6* 结合蛋白 RBP1, 激活 JAK-STAT 信号通路, 使下游 STAT3 磷酸化和二聚体化入核, 并结合干细胞基因如 NANOG, SOX2 和 OCT4 等的启动子中的调控元件, 促进这些干性基因表达, 诱导结直肠细胞异常增生, 最终诱导结直肠癌的发生[6] [7]。另外, 在胃癌发生过程中, *STRA6* 因细胞内的 miR-873 表达受到抑制而升高, 激活 Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路, 促进细胞增殖和癌变[8]。这些研究均显示 *STRA6* 是一个典型的癌基因。



注: (A) TCGA 数据库中 *STRA6* 在肝癌和正常肝组织中表达变化。 $**P = 4.743 \times 10^{-7}$ 。(B) *STRA6* 表达高低对肝癌患者存活率的影响。

**Figure 4.** The expression of *STRA6* in liver hepatocellular carcinoma and its relative surviving rate in TCGA database  
**图 4.** TCGA 数据库中 *STRA6* 在肝癌中的表达及其相关存活率

之前的研究一直认为 *STRA6* 不在肝细胞中表达[9]。因此, 对肝细胞中 *STRA6* 的功能和作用研究较少。但最新发表, 鼠肝来源的肝细胞和人肝癌细胞均有表达 *STRA6* [10]。因此, 现在有必要重新审视 *STRA6* 在肝细胞及肝癌发生中的作用。这一观点得到了 Deng Z 等人的支持[11]。此外, TCGA 数据分析结果同样显示, 与正常的肝组织相比, 肝癌细胞的 *STRA6* 表达显著升高, 其中位表达值由肝细胞中的“0”变为“0.035” (图 4(A)) [12]。对肝癌患者 *STRA6* 表达的高低差异将群体均分成 2 组, 发现 *STRA6* 低表达组的存活率要高于高表达组。这些 TCGA 数据库分析结果显示 *STRA6* 在可能肝癌发生和发展中扮演癌基因的作用(图 4(B)) [13]。因此, 本课题组以人肝细胞 QSG-7701 的总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 克隆并获得了 *STRA6* 基因的蛋白编码区, 并通过基因工程技术构建了真核表达载体 pDsRed1-*STRA6*, 然后将其表达于肝癌细胞 Hep 3B 中, 发现表达的 *STRA6* 在肝癌细胞中出现在囊泡结构中(图 3)。由于 *STRA6* 是一个跨膜蛋白, 而细胞膜蛋白的翻译和组装首先发生在内质网上[14] [15], 因此推断 *STRA6* 所在的囊泡结构可能是细胞器内质网, 表达后集中分布在肝癌细胞某一特定表面, 并非均匀、散在地分布于细胞表面。这一推断有待于进一步实验验证。总之, 本研究构建的 *STRA6* 基因表达载体及在肝癌中表达红色荧光蛋白融合的 *STRA6* 为我们接下来研究 *STRA6* 在肝细胞癌变和肝癌发展中的作用奠定了一定的前期基础。

## 致 谢

感谢贵州医科大学基础医学科学研究中心对本研究提供的技术支持和平台服务。

## 基金项目

本研究由国家自然科学基金(81560390)、2020 年国家级大学生创新创业训练计划项目(项目编号 342)和 2020 年省级大学生创新创业训练计划项目(项目编号 S202010660004)提供资助。

## 参考文献

- [1] Bouillet, P., Oulad-Abdelghani, M., Vicaire, S., Garnier, J.M., Schuhbaur, B., Dollé, P. and Chambon, P. (1995) Efficient Cloning of cDNAs of Retinoic Acid-Responsive Genes in P19 Embryonal Carcinoma Cells and Characterization of a Novel Mouse Gene, *Stral* (Mouse LERK-2/Eplg2). *Developmental Biology*, **170**, 420-433. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1226>
- [2] Chen, Y., Clarke, O.B., Kim, J., Stowe, S., Kim, Y.K., Assur, Z., Cavalier, M., Godoy-Ruiz, R., von Alpen, D.C., Manzini, C., Blaner, W.S., Frank, J., Quadro, L., Weber, D.J., Shapiro, L., Hendrickson, W.A. and Mancina, F. (2016) Structure of the *STR46* Receptor for Retinol Uptake. *Science*, **353**, aad8266. <https://doi.org/10.1126/science.aad8266>
- [3] Sun, H. and Kawaguchi, R. (2011) The Membrane Receptor for Plasma Retinol-Binding Protein, a New Type of Cell-Surface Receptor. *International Review of Cell and Molecular Biology*, **288**, 1-41. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386041-5.00001-7>
- [4] Szeto, W., Jiang, W., Tice, D.A., Rubinfeld, B., Hollingshead, P.G., Fong, S.E., Dugger, D.L., Pham, T., Yansura, D.G., Wong, T.A., Grimaldi, J.C., Corpuz, R.T., Singh, J.S., Frantz, G.D., Devaux, B., Crowley, C.W., Schwall, R.H., Eberhard, D.A., Rastelli, L., Polakis, P. and Pennica, D. (2001) Overexpression of the Retinoic Acid-Responsive Gene *Strat6* in Human Cancers and Its Synergistic Induction by Wnt-1 and Retinoic Acid. *Cancer Research*, **61**, 4197-4205.
- [5] Nakamura, S., Kanda, M., Shimizu, D., Sawaki, K., Tanaka, C., Hattori, N., Hayashi, M., Yamada, S., Nakayama, G., Omae, K., Koike, M. and Kodera, Y. (2020) *STR46* Expression Serves as a Prognostic Biomarker of Gastric Cancer. *Cancer Genomics & Proteomics*, **17**, 509-516. <https://doi.org/10.21873/cgp.20207>
- [6] Berry, D.C., Levi, L. and Noy, N. (2014) Holo-Retinol-Binding Protein and Its Receptor *STR46* Drive Oncogenic Transformation. *Cancer Research*, **74**, 6341-6351. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1052>
- [7] Karunanithi, S., Levi, L., DeVecchio, J., Karagkounis, G., Reizes, O., Lathia, J.D., Kalady, M.F. and Noy, N. (2017) RBP4-*STR46* Pathway Drives Cancer Stem Cell Maintenance and Mediates High-Fat Diet-Induced Colon Carcinogenesis. *Stem Cell Reports*, **9**, 438-450. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.06.002>
- [8] Lin, L., Xiao, J., Shi, L., Chen, W., Ge, Y., Jiang, M., Li, Z., Fan, H., Yang, L. and Xu, Z. (2019) *STR46* Exerts Oncogenic Role in Gastric Tumorigenesis by Acting as a Crucial Target of miR-873. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **38**, 452. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1450-2>
- [9] Alapatt, P., Guo, F., Komanetsky, S.M., Wang, S., Cai, J., Sargsyan, A., Rodríguez Díaz, E., Bacon, B.T., Aryal, P. and Graham, T.E. (2013) Liver Retinol Transporter and Receptor for Serum Retinol-Binding Protein (RBP4). *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 1250-1265. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.369132>
- [10] Hwang, I., Lee, E.J., Park, H., Moon, D. and Kim, H.S. (2021) Retinol from Hepatic Stellate Cells via *STR46* Induces Lipogenesis on Hepatocytes during Fibrosis. *Cell & Bioscience*, **11**, 3. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00509-w>
- [11] Deng, Z., Wang, J., Xu, B., Jin, Z., Wu, G., Zeng, J., Peng, M., Guo, Y. and Wen, Z. (2019) Mining TCGA Database for Tumor Microenvironment-Related Genes of Prognostic Value in Hepatocellular Carcinoma. *BioMed Research International*, **2019**, Article ID: 2408348. <https://doi.org/10.1155/2019/2408348>
- [12] Chandrashekar, D.S., Bashel, B., Balasubramanya, S.A.H., Creighton, C.J., Rodriguez, I.P., Chakravarthi, B.V.S.K. and Varambally, S. (2017) UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia*, **19**, 649-658. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.05.002>
- [13] Anaya, J. (2016) OncoLnc: Linking TCGA Survival Data to mRNAs, miRNAs, and lncRNAs. *PeerJ Computer Science*, **2**, e67. <https://doi.org/10.7717/peerj-cs.67>
- [14] Shao, S. and Hegde, R.S. (2011) Membrane Protein Insertion at the Endoplasmic Reticulum. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **27**, 25-56. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154125>
- [15] Pleiner, T., Tomaleri, G.P., Januszyk, K., Inglis, A.J., Hazu, M. and Voorhees, R.M. (2020) Structural Basis for Membrane Insertion by the Human ER Membrane Protein Complex. *Science*, **369**, 433-436. <https://doi.org/10.1126/science.abb5008>