

研究报告

高表达 Snail 蛋白诱导黑色素瘤 EMT 细胞模型的构建及鉴定*

方瑞 郭强 杜军**

(中山大学药学院 广州 510006)

摘要 目的:构建稳定表达 Snail 蛋白的可用于肿瘤上皮-间质化研究的肿瘤细胞模型。方法:采用亚克隆方法从质粒 pCMV6-mSnail 中 PCR 扩增小鼠 *Snail* 基因,连接至表达质粒 pL-tdTomato-Neo,筛选重组质粒并经双酶切及测序鉴定。构建成功的重组质粒 pL-tdTomato-mSnail 转染小鼠黑色素瘤 B16 细胞, G418 筛选稳定细胞株。采用荧光定量 PCR 和 Western blot 技术检测胞内 Snail 及上皮/间质标志物的变化。建立裸小鼠皮下移植瘤模型,活体成像系统观测移植瘤。结果:重组质粒 pL-tdTomato-mSnail 成功构建,其稳定转染株 B16/dT-mSN 胞体发出强烈红色荧光。胞内 Snail 水平显著上调, E-钙粘蛋白下调,波形蛋白表达上调,呈现典型的上皮-间质化表型。结论:成功获得稳定高表达小鼠 Snail 蛋白的 EMT 细胞模型,且可用于体内外荧光成像观测,为研究 Snail 蛋白在介导肿瘤 EMT 过程中的生物作用提供了重要的实验工具。

关键词 稳定细胞株 Snail 黑色素瘤 上皮-间质转化 荧光成像

中图分类号 Q343

肿瘤发生浸润转移往往是临床治疗失败的最重要原因,临床上 90% 的肿瘤患者死于肿瘤转移恶性。肿瘤转移涉及原发肿瘤细胞浸润、迁移、转移灶的形成等多个步骤。其中,癌巢部位的肿瘤细胞发生上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),向局部组织浸润被认为是肿瘤转移的关键过程。

在肿瘤转移起始阶段,肿瘤细胞借由 EMT 过程发生形态学和基因型的改变,并获得移行能力。具体包括:(1)细胞表面黏附力较强的 E-钙粘蛋白(E-cadherin)下调,胞间连接疏松,细胞分散并向外浸润性生长^[1];(2)立方上皮细胞的细胞角蛋白结构改变,外形演变为纺锤形纤维细胞;(3)细胞骨架结构蛋白转化为以波形蛋白(vimentin)为主,细胞的运动能力增

强^[2-3]。现已发现有多转录因子参与 EMT 相关靶基因的表达调控,其中锌指结构转录因子 Snail 被认为是 EMT 过程最经典和最重要的转录因子^[4]。Snail 主要通过与其 E-cadherin 基因中含有 5'-CAGGTG-3'核心碱基序列的 E-box 作用元件结合,从而抑制其表达。此外,Snail 几乎可以上调所有间质标志物和迁移侵袭相关基因的转录水平,并调控影响细胞增殖、凋亡基因的表达^[5]。可见,Snail 在肿瘤 EMT 过程中启动了多种基因和多条信号通路,针对 Snail 的相关研究也一直是肿瘤 EMT 及肿瘤转移研究领域的热点。

为了研究 Snail 在介导黑色素瘤 EMT 过程中的生物学作用,我们拟构建 Snail 稳定表达的肿瘤细胞株。同时,由于肿瘤细胞在 EMT 过程中出现形态改变、移动性增加等特点,为了实现对细胞的实时无创监测,我们拟在 Snail 表达载体中引入荧光标签,实现多个基因的联合表达,建立体内外可视化的工具细胞。考虑到 Snail 是一小分子核转录因子,主要通过核转位对多种

收稿日期:2013-03-25 修回日期:2013-04-15

* 国家“973”计划(2011CB935800)、国家自然科学基金(81272311, 81071712)资助项目

**通讯作者,电子信箱:dujun_tg@163.com

靶基因发挥转录调控作用,当多个基因串联表达时可能会影响 Snail 蛋白的正确折叠和生物活性。虽然采用上下游基因之间引入内部核糖体进入位点(IRES)是实现多基因独立表达的常用手段,但此类载体因结构较大、上下游基因存在表达不平衡等问题在应用上极受限制。

目前,一种名为自剪切 2A 肽的短肽被广泛用于多基因载体的构建^[6]。该 2A 肽由 18-22 个氨基酸组成,C 端高度保守,多为 Asp-Val/Ile-Glu-XAsn-Pro-Gly-Pro 序列。其自剪切的主要原理是:当翻译过程行进至 2A 肽链 C 端 Gly-Pro 位置时,由于“核糖体跳跃”机制,Gly-Pro 之间无肽键形成,导致肽链上下游蛋白在此位置自行断开,从而实现不同目的蛋白的分离。利用这种自剪切 2A 肽不仅能实现同一载体中多基因共表达的平衡性,而且可实现多基因的非融合表达,对于保证目的蛋白的胞内定位和活性至关重要。

研究将小鼠 *Snail* 基因全长序列克隆进入携带自剪切 2A 肽基因的表达载体 pL-tdTomato-Neo(简称 pTd-N)中,构建重组表达载体 pl-tdTomato-mSnail。该载体中,*mSnail* 基因通过两个 2A 肽片段分别与上游的 Tdtomato 红色荧光蛋白基因及下游的新霉素(Neomycin)/氨苄青霉素(Ampicillin)抗性基因相连接。通过将重组质粒转染进入小鼠黑色素瘤 B16 细胞,构建一种稳定的肿瘤细胞 EMT 模型,并建立小鼠移植瘤,结合活体成像技术观察其可视性,为研究 Snail 蛋白在介导肿瘤 EMT 过程中的生物作用和实现肿瘤细胞的体内外动态监测提供重要而便利的实验工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与载体 小鼠黑色素瘤细胞株 B16 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。*E.*

coli DH5 α 感受态购自天根生化科技有限公司。真核表达载体 pLdT-N 由暨南大学药理实验室惠赠。质粒 pCMV6-mSnail 购自 ORIGENE。

1.1.2 主要试剂 RPMI 1640 培养基、胎牛血清购自 Hyclone 公司。DNA Marker、质粒小提试剂盒、DNA 纯化试剂盒、凝胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司。限制性核酸内切酶、dNTP、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、荧光定量 PCR 检测试剂盒均购自 TaKaRa。核酸分子量标准 D2000 和 1 Kb DNA ladder 购自天根生化科技有限公司。转染试剂 LipofectinTM 2000 购自 Life Technologies;细胞培养皿及多孔培养板购自 Nest。G418 购自广州威佳生物科技有限公司。小鼠抗 Snail 单克隆抗体购自 CST 公司;小鼠抗 E-cadherin、小鼠抗 Vimentin、小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体均购自 Santa Cruz 公司。辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠单克隆抗体购自广州鼎国生物技术有限公司。蛋白预染 marker 购自 Fermentas 公司。PVDF 膜购自 Bio-Rad 公司。化学发光试剂盒购自 PERCE 公司,其余试剂为国产分析纯。构建用引物由上海生物工程公司合成,用于 qPCR 的检测引物由 TaKaRa 设计合成,基因测序由上海英潍捷基公司完成。

1.1.3 实验动物 SPF 级雌性裸小鼠,7~8 周龄,体重 18 \pm 2g,购自中山大学实验动物中心,许可证号:SCXK(粤)2011-0029。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 根据 NCBI GenBank 公布的小鼠 *Snail* 基因序列(NM_011427.2),运用 Primer Premier 5.0 软件设计引物。上游引物:5'-TCCCCCGG GCCTTCTATGCCGCGCT-3'(下划线处为 *Sma* I 酶切位点);下游引物:5'-CGCGGATCCGCGAGGGCCTCC-3'(下划线处为 *Bam*H I 酶切位点)。用于 qPCR 的检测引物如表 1 所示。

表 1 荧光定量 PCR 用引物

Table 1 Oligonucleotide primers used in quantitative RT-PCR

基因	引物序列	产物大小	GenBank No.
<i>Snail</i>	F: 5'-TCTGAAGATGCACATCCGAAGC-3' R: 5'-TTGCACTGGGAGCAG GAGAAT-3'	138 bp	NM_011427.2
<i>E-cadherin</i>	F: 5'-CGTCCTGCCAATCCTGATGA-3' R: 5'-ACCACTGCCCTCGTAATCGAAC-3'	120 bp	NM_009864.2
<i>Vimentin</i>	F: 5'-AAAGCGTGGCTGCCAAGAAC-3' R: 5'-GTGACTGCACCTGTCTCCGGTA-3'	147 bp	NM_011701.4
<i>Gapdh</i>	F: 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3' R: 5'-TTGCTGTTGAAGTCGACGAG-3'	150 bp	NM_013611.4

1.2.2 目的基因 *mSnail* 的 PCR 扩增 取 5 ng 质粒 pCMV6-*mSnail* 为模版,用上述引物进行 PCR 扩增 *Snail* 目的基因。反应条件为:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 sec,58℃ 退火 30 sec,72℃ 延伸 45 min (30 个循环);72℃ 延伸 10 min,16℃ 结束反应。取少量扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,剩余于 -20℃ 保存。

1.2.3 重组质粒 pL-tdTomato-*mSnail* 的构建与鉴定 分别对表达载体 pLdT-N 和纯化回收的 *mSnail* 基因片段进行 *Sma* I 和 *Bam* H I 双酶切,使用凝胶回收试剂盒纯化回收酶切产物。*mSnail* 片段和线性化载体按照摩尔比 5:1 的比例,使用 T4 DNA 连接酶于 16℃ 连接过夜。连接产物氯化钙法转化感受态 DH5 α ,接种于含 100 μ g/ml 氨苄西林的 LB 平板,37℃ 培养过夜后挑取单个菌落接种于含 100 μ g/ml 氨苄西林的 LB 培养基 5 ml 中以 37℃、200 r/min 的条件振荡培养,同时进行菌液 PCR 鉴定。经鉴定阳性的菌液继续扩大培养,提取重组质粒 pL-tdTomato-*mSnail* (以下简称 pLdT-*mSN*)。经 *Not* I、*Bam* H I 双酶切鉴定为阳性的质粒,进一步测序鉴定。

1.2.4 G418 筛选浓度的确定 5 g G418 溶于 10 ml 1 mol/L HEPES (pH7.3) 溶液中,使终浓度为 500 mg/ml, -20℃ 保存。将对数生长期的 B16 细胞接种至 24 孔板 (2×10^4 /孔) 培养过夜后加入 G418 溶液,使筛选浓度为 0 ~ 1 200 μ g/ml,每 100 μ g/ml 为一个浓度梯度。隔天将培养孔中培养基吸除,PBS 洗涤一次,继续加入不同浓度的筛选培养基,如此重复数次持续培养 10 ~ 14 d,孔中细胞以全部死亡的最低浓度 (700 μ g/ml) 为 G418 筛选用浓度。

1.2.5 *Snail* 稳定表达细胞株 B16/dT-*mSN* 的筛选 B16 细胞培养至对数生长期,按照 2×10^5 /孔的密度接种于六孔细胞培养板,培养过夜待汇合度达 90%,更换为无血清培养基,用 Lipofectin™ 2000 转染纯化后的 pLdT-*mSN* 质粒,并设 pLdT-N 转染对照组,转染 6 h 后替换为完全培养基。转染 24 h 后,加入含 700 μ g/ml G418 培养基进行筛选。每 3 d 观察一次并更换新鲜的筛选培养基。连续筛选 10 ~ 14 d 直至细胞克隆长出后,将筛选压力减半,并提高血清浓度至 15%,继续培养 2 ~ 3 d。待克隆中细胞数达到 100 左右,套环法挑取荧光强度较强的细胞群,制备单细胞悬液,并调整细胞密度为 10 个/ml,接种于 96 孔板中,尽量保证每孔含 1 个细胞,继续培养待其增殖。挑选荧光强度高,生长状态良好的细胞继续扩大培养并冻存。由此筛选获得的

细胞命名为 B16/dT-*mSN*,对照组为 B16/dT。

1.2.6 荧光定量 PCR 检测胞内 *Snail* 及 EMT 标志物基因水平 收集对数生长期的阳性克隆细胞 B16/dT-*mSN* 及 B16/dT,按照荧光定量 PCR (Quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 检测试剂盒说明书提取细胞总 RNA,完成逆转录反应及 PCR 扩增。逆转录反应条件为:37℃,15 min (逆转录反应) \rightarrow 85℃,5 s; qPCR 反应条件与程序如下:Cycle 1 (预变性):95℃、30 s; Cycle 2 (PCR 反应):95℃、5 s,60℃、30 s (Real Time),循环数为 40; Cycle 3 (解离):95℃、15 s,60℃、60 s; Cycle 4 (溶解曲线):65℃、30 s。

1.2.7 Western blot 检测胞内 *Snail* 及 EMT 标志物表达 收集对数生长期的阳性克隆细胞 B16/dT-*mSN* 及 B16/dT,提取细胞总蛋白,经 BCA 法定量后,进行 SDS-PAGE 电泳分离并转印至 PVDF 膜。经 5% 脱脂奶粉/PBS 室温封闭 90 min 后,分别孵育抗 *Snail*、E-cadherin 和 Vimentin 单抗 (1:1 000),4℃ 过夜。次日用 PBS-T 洗膜 3 次,室温下孵育二抗 (1:5 000) 90 min。PBS-T 洗膜 3 次后,采用 ECL 化学发光试剂盒进行检测,X 光片显影、定影。曝光后的 PVDF 膜在 PBS-T 中漂洗 3 次去除残留的发光液,浸泡于 Stripping Buffer 中于 50℃ 振荡孵育 30 min 以解离结合的抗体。继而用 PBS-T 洗涤 3 次,重复封闭、孵育一抗 (抗 GAPDH 抗体)、二抗的过程,分析 *Snail* 蛋白以及上皮/间质标志物的表达情况。

1.2.8 小鼠皮下移植瘤模型的建立 收集对数生长期的 B16 或 B16/dT-*mSN* 细胞,制备单细胞悬液,PBS 洗涤 2 次后用无血清培养基调整细胞密度为 5×10^6 个/ml,分别取 100 μ l 悬液接种于裸小鼠左侧肩背部皮下。20 d 后利用小动物活体成像系统检测肿瘤的可视性。

1.2.9 统计学分析 实验数据以三次独立实验的平均值 \pm 标准差 ($\bar{X} \pm s$) 表示。采用 *T* 检验比较两组间差异的显著性,用 SPSS14.0 软件进行统计分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PCR 扩增 *mSnail* 目的基因

PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,显示扩增条带大小略高于 750 bp 位置,与目的基因理论大小 810 bp 相符,提示小鼠 *Snail* 基因已扩增成功,见图 1。

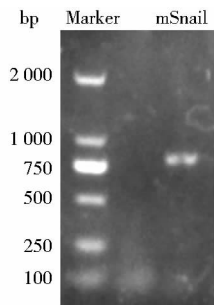


图1 小鼠 *Snail* 基因 PCR 产物凝胶电泳

Fig. 1 Gel electrophoresis of mouse *Snail* gene PCR products

2.2 重组质粒构建与鉴定

过夜连接产物转化感受态 DH5 α , 次日挑取 3 个单克隆, 扩大培养后提取质粒, 标记为 1~3 号。由于质粒自身携带 *Not* I 酶切位点, 而 *Bam*H I 酶切位点在插入 *mSnail* 片段后发生约 800 bp 的位移, 故采用上述两种酶进行双酶切鉴定, 理论条带大小应为 4 649 bp 及 5 971 bp (见图 2)。酶切结果显示 2 号重组质粒酶切后的条带位置与理论值大小相符, 初步判定其为阳性克隆, 见图 3。进一步测序结果与 Genbank 中 *Snail* 基因序列进行 BLAST 比对后完全一致, 证明小鼠 *Snail* 真核表达质粒 pLdT-mSN 构建成功。

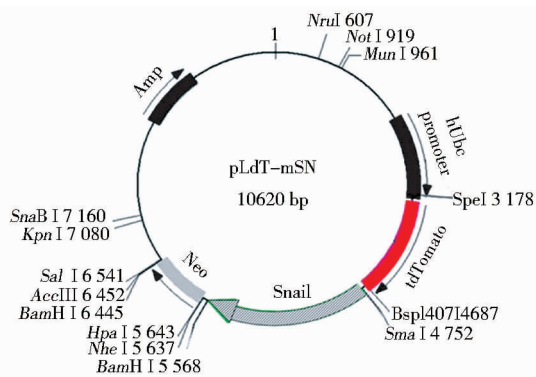


图2 重组质粒 pLdT-mSN 图谱

Fig. 2 Map of the recombinant plasmid pLdT-mSN

2.3 细胞株 B16/dT-mSN 的筛选及培养

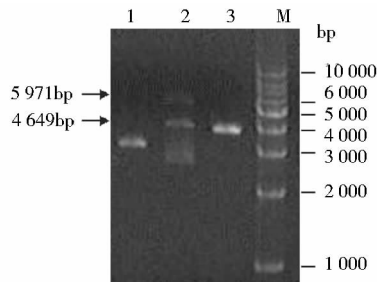
空载质粒 pLdT-N 及重组质粒 pLdT-mSN 分别转染 B16 细胞, G418 筛选 2~3 周后挑取单克隆, 扩大培养并连续传代。因重组质粒中 TdTomato 红色荧光蛋白基因、*mSnail* 基因以及 Neomycin 抗性基因串联表达, 若胞内可见红色荧光并能够在 G418 筛选压力下生长, 则说明 *mSnail* 基因也能够正确表达。结果如图 4 所示, 荧

图3 重组质粒的双酶切鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant colonies by double enzyme digestion

1-3: Double enzyme digestion of the recombinant plasmids;

M: 1 Kb DNA ladder Marker



光显微镜下可见细胞群明亮的红色荧光, 荧光率接近 100%。相对于排列紧密, 多边形的对照组细胞 B16/dT, B16/dT-mSN 细胞分布疏松, 胞体更为狭长, 呈现纺锤样的细胞形态。

2.4 B16/dT-mSN 细胞中 *Snail* 的表达及 EMT 表型鉴定

本试验采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法检测 *Snail* 及上皮/间质标志物的基因水平和表达情况。结果如图 5 所示, B16/dT 细胞中 *Snail* 呈现本底表达, 上皮标志物 E-cadherin 高表达, 间质标志物 Vimentin 呈低水平表达。而在 B16/dT-mSN 细胞中, *Snail* mRNA 水平上调 630 倍之多, E-cadherin 下调, Vimentin 上调。经 T 检验分析, 上述两种细胞中这三个基因的 mRNA 水平具有显著性差异 ($P < 0.005$) (图 a)。相应的蛋白水平的变化也十分明显, 出现典型的间质化表型 (图 b)。由此说明, 高表达 *Snail* 蛋白诱导肿瘤 EMT 的细胞模型已经成功构建。

2.5 小鼠皮下移植瘤模型的建立

每只小鼠左肩皮下接种 5×10^5 个 B16 或 B16/dT-mSN 细胞, 待成瘤 20d 后利用小动物成像系统观察皮下移植瘤, 见图 6。其中图 6a 为接种前微量离心管中肿瘤细胞悬液的成像结果, 可见红色荧光蛋白在 B16/dT-mSN 中稳定表达, 荧光强烈、稳定、直观, B16 细胞悬液未见任何荧光。同样, 相对于 B16 移植瘤小鼠, B16/dT-mSN 荷瘤小鼠皮下可见明显且集中的荧光信号, 且生物体自身干扰背景很弱 (图 6b)。处死小鼠后剥离肿瘤置于成像系统中观察, 仍可见 B16/dT-mSN 瘤体呈现强烈荧光, 而 B16/dT 瘤体无荧光信号 (图 6c)。

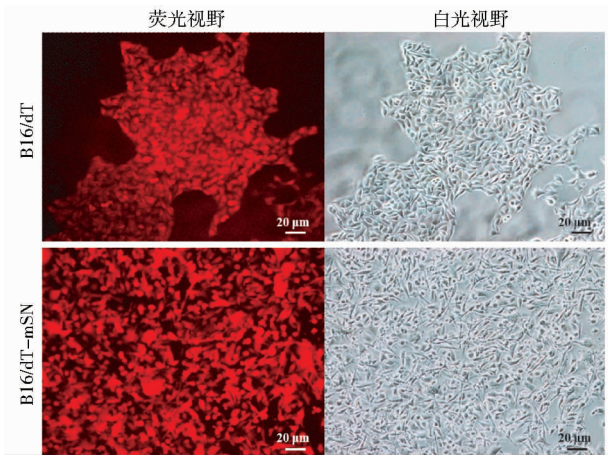


图 4 稳定转染细胞株的荧光显微观察

Fig. 4 Images of stably transfected cells under fluorescence microscopy

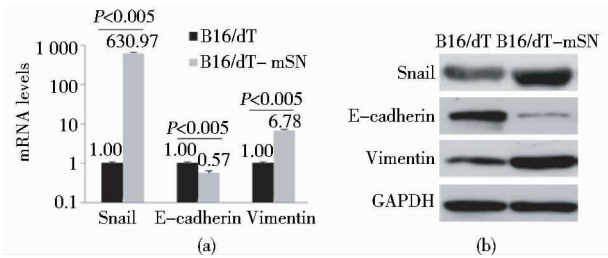


图 5 稳定转染细胞株内 Snail 及 EMT 标志物的基因 (a) 和蛋白 (b) 水平

Fig.5 Identification of gene (a) and protein (b) levels of Snail and EMT markers in stably transfected cells expression by Western blot

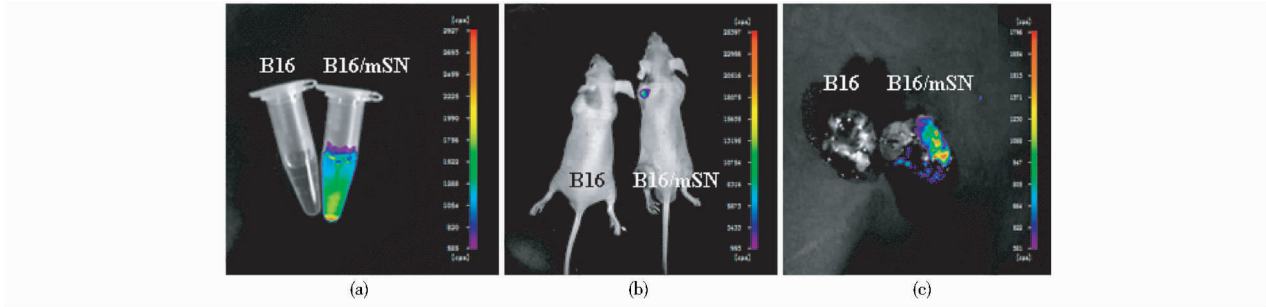


图 6 B16 和 B16/dT-mSN 细胞小鼠移植瘤成像

Fig. 6 Imaging of B16 and B16/dT-mSN cells-implanted mice

(a) Cell suspensions (b) Tumor bearing mice (c) Stripped tumors

3 讨论

近年来 Snail 介导 EMT 及在肿瘤侵袭转移中的作用越来越受到关注,在肝癌^[7]、胃癌^[8-9]、乳腺癌^[10-11]、鳞状细胞癌^[12-13]等多种肿瘤中已检测到 Snail 的高表达并证实其与肿瘤恶性度有关,提示 Snail 很有可能发展成新的肿瘤恶性生物标记物及临床治疗靶点。另有文献报道 Snail 可调节恶性黑色素瘤中多个侵袭、转移相关基因的表达^[14],本课题组的前期研究也表明,Snail 是黑色素瘤 EMT 过程中的关键因子^[15],然而 Snail 在黑色素瘤恶性进程中的作用和分子机制尚需要在有效的实验模型中深入研究。此外,发生 EMT 的肿瘤细胞通过与间质相互作用,降解细胞外基质成分等塑造利于浸润转移的局部微环境。而在大多数模拟肿瘤微环境的研究中,往往需要将肿瘤细胞与间质细胞共培养获得某些刺激信号,通过基因工程手段将荧光标记嵌

入靶细胞中,能够有效区分共培养体系中的各类细胞,为实验研究提供极大便利。因此,本研究构建了携带 Tdtomato 红色荧光蛋白标记的重组小鼠 Snail 真核表达载体 pLdt-mSN,其优势在于可视化且可通过筛选得到具有稳定 EMT 表型的黑色素瘤细胞,旨在为研究 Snail 蛋白在肿瘤 EMT 中的生物学功能和分子机制提供有效的实验工具。

生物活体成像技术是近几年新兴的利用活体生物发光或荧光成像技术监测活细胞在动物体内的生物学行为及分子事件的有效手段。荧光蛋白因其工程技术成熟,操作便捷,指示清晰,经济成本低等优点成为分子生物学研究中常用的荧光成像指示分子。应用最为广泛的几种荧光蛋白有绿色荧光蛋白 (GFP),黄色荧光蛋白 (YFP)、红色荧光蛋白 (RFP)^[16]。由于红光穿透性较强,并且生物体自身往往会产生蓝绿色荧光背景,对结果产生干扰,因而红光已成为荧光成像中观测

生理指标的最佳选择。实验构建了 Tdtomato-Snail-Neomycin 三基因共表达载体,其中携带的红色荧光蛋白 Tdtomato 被认为是迄今最亮的红色荧光蛋白,其亮度为增强型绿色荧光蛋白(eGFP)的 2.8 倍,在荧光免疫组化及活体成像等研究中已取代 eGFP 成为最合适的细胞标记^[17]。此外,该表达载体中 *Snail* 基因通过自剪切 2A 肽序列与上下游基因相串联,实现多个基因共表达的同时不会影响各蛋白的生物活性及亚细胞定位。研究结果证实,稳定转染 pLdT-mSN 质粒的细胞出现典型的 EMT 变化,提示外源过表达的 Snail 蛋白在胞内能够正确折叠,发挥生物学作用,维持细胞的间质表型。

综上所述,研究成功筛选获得稳定表达重组小鼠 Snail 蛋白细胞株,证实目标蛋白在细胞中表达上调并介导细胞出现 EMT 表型。且所获得的细胞株可用于小鼠移植瘤的活体荧光成像,信号稳定。该细胞株为研究 Snail 蛋白在肿瘤恶性转化中的作用,肿瘤细胞 EMT 的动态过程,及以 Snail 为靶点的抗肿瘤药物的筛选等提供了重要工具。

参考文献

- [1] Yang A D, Camp E R, Fan F, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res*, 2006, 66(1): 46-51.
- [2] Zhang Q, Helfand B T, Jang T L, et al. Nuclear factor-kappaB-mediated transforming growth factor-beta-induced expression of vimentin is an independent predictor of biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(10): 3557-3567.
- [3] Vuoriluoto K, Haugen H, Kiviluoto S, et al. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene*, 2010, 30(12): 1436-1448.
- [4] Nieto M A. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(3): 155-166.
- [5] Barrallo-Gimeno A, Nieto M A. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*, 2005, 132(14): 3151-3161.
- [6] 张欢, 黄思超, 蔡绍晖. 基于 2A 肽策略构建多基因表达载体的研究进展. *中国生物工程杂志*, 2013, 33(1):104-108.

Zhang H, Huang S Ch, Cai Sh H. Development of 2A peptide-based strategies for constructing multicistronic expression vectors. *China Biotechnology*, 2013, 33(1):104-108.

- [7] Sugimachi K, Tanaka S, Kameyama T, et al. Transcriptional repressor snail and progression of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(7): 2657-2664.
- [8] Tanishima H, Gui T, Sun Y J, et al. Snail protein expression as a hallmark of gastric carcinoma in biopsy samples. *ISRN Pathology*, 2012, doi:10.5402/2012/132472.
- [9] He H, Chen W, Wang X, et al. Snail is an independent prognostic predictor for progression and patient survival of gastric cancer. *Cancer Sci*. 2012, 103(7):1296-1303.
- [10] Miyoshi A, Kitajima Y, Kido S, et al. Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*, 2005, 92(2):252-258.
- [11] 曾韵洁, 曲少华, 沈溪明, 等. Snail 表达水平预测乳腺癌新辅助化疗效果的临床价值. *中山大学学报(医学科学版)*, 2012, 33(5):655-659.
- Zeng Y J, Qu Sh H, Shen X M, et al. Snail expression predicts clinical response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Sun Yat-Sen Univ (Med Sci)*, 2012, 33(5):655-659.
- [12] Yokoyama K, Kamata N, Fujimoto R, et al. Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas. *Int J Oncol*, 2003, 22(4): 891-898.
- [13] Natsugoe S, Uchikado Y, Okumura H, et al. Snail plays a key role in E-cadherin-preserved esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, 2007, 17(3): 517-523.
- [14] Kuphal S, Palm H G, Poser I, et al. Snail-regulated genes in malignant melanoma. *Melanoma Res*, 2005, 15(4):305-313.
- [15] Fang R, Zhang G, Guo Q, et al. Nodal promotes aggressive phenotype via Snail-mediated epithelial-mesenchymal transition in murine melanoma. *Cancer Lett*, 2013, doi: 10.1016/j.canlet.2013.01.014.
- [16] Wu B, Piatkevich, Lionnet T, et al. Modern fluorescent proteins and imaging technologies to study gene expression, nuclear localization, and dynamics. *Curr Opin Cell Bio*, 2011, 23(3): 310-317.
- [17] Morris L M, Klanke C A, Lang S A, et al. TdTomato and EGFP identification in histological sections: insight and alternatives. *Biotech Histochem*, 2010, 85(6):379-387.

Construction and Verification of an Inducible EMT Model in Mouse Melanoma Stably Overexpressing Snail

FANG Rui GUO Qiang DU Jun

(School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract Objective: To establish an inducible EMT cell model which stably overexpressing recombinant mouse Snail and evaluate its application in fluorescence imaging *in vitro* and *in vivo*. Methods: The mouse *Snail* gene was amplified from pCMV6-mSnail by PCR and cloned into eukaryotic expression plasmid pL-tdTomato-Neo. The recombinant colonies were identified by double enzyme digestion and DNA sequencing. The mouse melanoma B16 cells were transfected with recombinant plasmid pL-tdTomato-mSnail and the stably transfected cells B16/Td-mSN were selected with culture media supplemented with G418. The mRNA and protein levels of Snail as well as EMT markers E-cadherin and Vimentin were examined by qPCR and Western blot. Also, the B16 and B16/Td-mSN cells were inoculated subcutaneously into the nude mice respectively to prepare allografted tumor model and examined by fluorescence imaging system. Results: The recombinant expression plasmid pL-tdTomato-mSnail was constructed correctly, in which the red fluorescence protein tdTomato, mouse Snail and resistance gene were seriesly connected by two 2A peptides. The selected B16/dT-mSN cells express high levels of Snail and red fluorescence protein. Also, the cells display elongated and spindle-like morphology as well as down-regulation of E-cadherin and up-regulation of Vimentin. The allograft mouse model for *in vivo* imaging was successfully established by use of this stable cell line. And the fluorescence signal was stable and strong. Conclusion: An EMT cell model stably expressing recombinant mouse Snail and red fluorescence protein was successfully established. The cell model provides a convenient, intuitive and stable tool for imaging studies of Snail biological function during tumor EMT progress.

Key words Stable cell line Snail Melanoma EMT Fluorescence imaging