

携带人 *PPAR* γ 1 受体基因高效真核表达载体的构建及其意义

章涛¹, 李苙清¹, 杨俊卿¹, 万敬员¹, 蒋建新², 周岐新¹ Δ

(1. 重庆医科大学药理学教研室, 重庆 400016; 2. 第三军医大学创伤烧伤与复合伤国家重点实验室)

[摘要] 目的: 构建高效表达人过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 1(hPPAR γ 1)的真核表达载体, 为 hPPAR γ 1 受体功能和基于 hPPAR γ 1 受体靶点的药物筛选提供分子研究平台。方法: 采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)从 HepG2 细胞总 RNA 克隆 hPPAR γ 1 全长基因, 与经 *Xho* I、*Sma* I 相同双酶切的 pIRES2-EGFP 载体连接, 构建重组质粒 phPPAR γ 1-IRES2-EGFP, 经酶切及测序鉴定重组质粒中 hPPAR γ 1 基因的完整性和忠实性; 荧光显微镜观察重组质粒转染的 293 细胞 GFP 报告基因表达强度, 并对转染细胞 hPPAR γ 1 的表达进行荧光定量 PCR 及免疫细胞化学检测。结果: 经酶切和测序证实重组质粒构建正确, 并在转染的 293 细胞中获得 hPPAR γ 1 的高效表达。结论: 成功构建 phPPAR γ 1-IRES2-EGFP 重组质粒, 为基于 hPPAR γ 1 受体靶点的药物筛选平台的建立及受体功能研究提供了高效表达载体。

[关键词] 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 1; 基因克隆; 真核表达

[中图分类号] R34;R966 [文献标识码] A [文章编号] 0258-4646(2007)02-0125-03

Construction of highly efficient eukaryotic expression vector carrying human *PPAR* γ 1 gene and its significance

ZHANG Tao¹, LI Chang-qing¹, YANG Jun-qing¹, WAN Jing-yuan¹, JIANG Jian-xin², ZHOU Qi-xin¹ Δ

(1. Department of Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, The Third Military Medical University, Chongqing)

[Abstract] **Objective:** To construct a highly efficient eukaryotic expression vector carrying human peroxisome proliferator-activated receptor γ 1 (hPPAR γ 1) gene in order to provide an ideal molecular platform for screening natural ligands of hPPAR γ . **Methods:** hPPAR γ 1 gene, cloned from total RNA of HepG2 cells by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and pIRES2-EGFP plasmid were excised by *Xho* I and *Sma* I double endonucleases and ligated with each other. The correct recombinant plasmid was transfected into 293 cells, and the hPPAR γ 1 expression level was determined by real-time quantitative PCR and immunocytochemistry assay. **Results:** hPPAR γ 1 gene sequence contained in phPPAR γ 1-IRES2-EGFP recombinant plasmid was verified correctly by enzyme digestion as well as sequence analysis. After being transfected into 293 cells, highly efficient expression of hPPAR γ 1 gene contained in phPPAR γ 1-IRES2-EGFP plasmid were detected at both mRNA and protein levels. **Conclusion:** phPPAR γ 1-IRES2-EGFP recombinant plasmid has been constructed successfully with highly efficient expression in transfected 293 cells, which provides a useful tool in analyzing the function of hPPAR γ gene and establishing molecular platform by which the candidates of unknown hPPAR γ ligands or activators can be found.

[Key words] peroxisome proliferator-activated receptor γ 1; gene cloning; eukaryotic expression

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptor γ , PPAR γ)除在脂肪细胞分化成熟过程中起关键作用外, 还在脂质代谢、胰岛素增敏、抗炎和抗肿瘤等方面发挥积极作用, 使 PPAR γ 极有希望成为治疗糖尿病、动脉粥样硬化、高血压及肿瘤等疾病新的药物靶标^[1-3]。构建含人 PPAR γ 1 的真核表达载体可为基于 hPPAR γ 的配体或激动剂筛选提供分子平台, 本实验构建了 phPPAR γ 1-IRES2-EGFP 高效真核表达载体, 为上述研究的开展打下良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pIRES2-EGFP 由重庆医科大学超声医学研究所惠赠; HepG2 细胞由重庆医科大学肝病研究所提供; 293 细胞购自于南京凯基生物 (源自 ATCC)。 *Xho* I 和 *Sma* I 限制性内切酶、T4 连接酶、高保真 PrimeStar HS DNA 聚合酶、荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR ExScriptTM RT-PCR Kit 及 pMD19-T 载体为 TaKaRa 公司产品; 质粒小抽试剂盒、RNA 抽提试剂盒、胶回收试剂盒、Access RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司; Lipofectamine 2000 为 Invitrogen 公司产品; RPMI-1640 培养基、胎牛血清购自 HyClone 公司; PPAR γ 多克隆抗体为 Cayman 产品; 免疫组化

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30572353)

[作者简介] 章涛(1969 -), 男, 博士。

Δ Corresponding Author's E-mail: cqzhouqx@yahoo.com.cn

试剂盒购自晶美公司。

1.2 引物设计与合成

采用 Primer Premier 5 软件设计引物, 交 TaKaRa 公司合成。hPPAR γ 1 上游引物 5' AG-GAGCAGAGCAAAGAGG 3', 下游引物 5' AG-GACTCAGGTTGGTTC 3', 产物大小为 474 bp; hGAPDH 上游引物 5' CCCCTTCATTGACCTCAAC-TACAT3', 下游引物 5' CATGAGTCCTCCACGAT-ACCAA 3', 扩增片段 421 bp。分别含 *Xho* I 和 *Sma* I 酶切位点的 hPPAR γ 1 基因克隆引物: P1 5' CCGCTCGAGTGACCAT GGTTGACACAGAGA 3', P2 5' TCCCCCGGAAATGTTGGCAGTGGCT 3'。

1.3 重组质粒 p\gamma 1-IRES2-EGFP 的构建

1.3.1 hPPAR γ 1 全长基因克隆: 用 ThermoScript RTase 逆转录酶从 HepG2 细胞总 RNA 合成 hPPAR γ 1 cDNA 第一链。采用 hPPAR γ 1 基因全长克隆引物克隆 hPPAR γ 1 全长基因, 反应体系 50 μ l, 其中含模板 cDNA 1 μ l (50 ng), dNTPs 4 μ l (200 μ mol/L), 5 \times PrimerStar buffer (含 Mg^{2+}) 10 μ l, P1 1 μ l (0.4 μ mol/L), P2 1 μ l (0.4 μ mol/L), PrimerStar HS Taq (2.5 U/ μ l) 0.5 μ l, ddH₂O 32.50 μ l; 反应条件为: 98 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 98 $^{\circ}$ C 15 s, 68 $^{\circ}$ C 90 s 循环 35 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 随后经电泳、胶回收预期条带。

1.3.2 重组质粒构建、转化筛选、酶切及测序鉴定: *Xho* I 和 *Sma* I 双酶切 pIRES2-EGFP 和 hPPAR γ 1 全长基因 PCR 回收产物, 连接后转化 DH5 γ 感受态菌, 用含卡那的 LB 平板筛选阳性克隆, 分别挑取数个菌落摇菌过夜, 次日抽提质粒, 经 *Xho* I 和 *Sma* I 双酶切和测序鉴定重组质粒的完整性和忠实性, 从中确定并获得序列正确的重组质粒 p\gamma 1-IRES2-EGFP。

1.4 重组质粒转染 293 细胞

采用 24 孔板, 按 1×10^5 个细胞 / 孔接种 293 细胞(培养条件及添加物同 HepG2), 待细胞生长汇集至 85% 时参照 Lipofectamine 2000 转染试剂说明进行转染, 每孔加质粒 0.8 μ g, 脂质体 2 μ l。转染 36 h 时荧光显微镜下观察转染质粒 GFP 表达强度和转染效率, 转染效率按 3 个高倍视野 ($\times 200$) 下表达 GFP 阳性细胞的百分率的均值为计。实验同时设置空载体转染作为对照。

1.5 荧光定量 PCR 检测转染 293 细胞 hPPAR γ 1 mRNA 表达

1.5.1 标准品 T 载体的构建: RT-PCR 从 HepG2 细

胞总 RNA 中获得 hPPAR γ 1 (474 bp) 和 hGAPDH (421 bp) 基因片段, 胶回收相应的条带后, 分别与 T 载体连接, 经转化和克隆挑选后获得相应的 T 载体菌液, 取菌液进行 PCR 验证。从筛选出的菌液抽提 pMD19-hPPAR γ 1-T、pMD19-hGAPDH-T 载体, 分析其纯度和浓度, 按下列公式计算每 μ l T 载体中目的基因的拷贝数: 拷贝数 = mol 数 $\times 6.02 \times 10^{23}$ [mol 数 = 每 μ l 质粒含量(g) / 质粒长度(bp) / 324.5]。

1.5.2 转染的 293 细胞总 RNA 提取及 cDNA 的制备: 转染 36 h 后, 消化收集重组质粒和空载体转染对照组各 6 个孔的 293 细胞, 分别提取 12 个样品的 RNA 并检测其纯度及浓度。cDNA 合成反应体系 10 μ l, 其中 RNA 100 ng, 5X ExScript Buffer 2 μ l, dTNP Mixture (各 10 μ mol/L) 0.5 μ l, Oligo dT Primer (50 μ mol/L) 0.5 μ l, ExScript RTase (200 U/ μ l) 0.25 μ l, RNase Inhibitor (40 U/ μ l) 0.25 μ l; 反应条件: 42 $^{\circ}$ C 15 min, 95 $^{\circ}$ C 2 min。

1.5.3 荧光定量 PCR 检测转染 293 细胞 hPPAR γ 1 的表达: 按 1 : 10 梯度稀释 pMD19-hPPAR γ 1-T、pMD19-hGAPDH-T 载体, 获得每 μ l 含 $10^1 \sim 10^8$ 拷贝数的 T 载体作为标准品。荧光定量 PCR 反应体系 25 μ l, 其中含 SYBR Permex Ex Taq 12.5 μ l, hPPAR γ 1 或 hGAPDH 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ l, T 载体标准品或转染 293 细胞的 cDNA 模板 0.5 μ l, 水 11 μ l。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2.5 min, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s 循环 43 次, 并对产物的特异性进行电泳验证。

1.6 免疫细胞化学染色观察 hPPAR γ 1 蛋白在 293 细胞中的表达

转染 48 h 时取空载体与重组质粒转染组各 3 个孔, 75% 乙醇固定细胞 30 min, PBS 洗 3 次, 每次 3 min, 0.3% H₂O₂-甲醇 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, PBS 漂洗 3 次, 加山羊血清 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 吸弃封闭血清, 加入 1 : 125 稀释的 PPAR γ 一抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 按免疫组化试剂盒 (SP 法) 说明进行生物素标记的二抗 (山羊来源) 孵育和 DAB 显色, 苏木素复染后镜下观察。

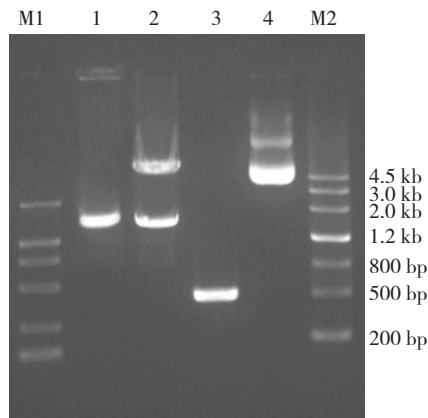
1.7 统计学分析

hPPAR γ 1 拷贝数的定量 PCR 实验数据经内参 hGAPDH 拷贝数均一化后, 以比值 (hPPAR γ 1 拷贝数 / hGAPDH 拷贝数) 表示, 用 SPSS13 软件包对比值进行秩和检验。

2 结果

2.1 重组质粒酶切及测序鉴定

Xho I 和 *Sma* I 双酶切重组质粒得到 5.3 kb 的载体片段和 1476 bp 的 hPPAR γ 1 全长基因片段(图 1);质粒送经上海鼎安生物科技有限公司测序鉴定,无突变,与 Gene 数据库相应序列完全吻合。



M1:DL2000 Marker; 1:HepG2 总 RNA 克隆的 hPPAR γ 1 基因 RT-PCR 产物; 2:phPPAR γ 1-IRES2-EGFP 和 *Xho* I 和 *Sma* I 重组质粒; 3:phPPAR γ 1-IRES2-EGFP 克隆的 hPPAR γ 1 基因 PCR 产物; 4:phPPAR γ 1-IRES2-EGFP 重组质粒; M2:DNA Marker III

图 1 重组质粒 phPPAR γ 1-IRES2-EGFP 酶切鉴定

Fig.1 Restriction analysis of recombinant plasmid phPPAR γ 1-IRES2-EGFP

2.2 重组质粒转染效率及 GFP 报告基因的表达

转染 293 细胞 36 h 后荧光显微镜下观察 GFP 报告基因表达强度高,重组质粒 phPPAR γ 1-IRES2-EGFP 和空载体 pIRES2-EGFP 转染效率分别达 $(83 \pm 11)\%$ 和 $(79 \pm 8)\%$ 。

2.3 重组质粒 hPPAR γ 1 mRNA 表达

phPPAR γ 1-IRES2-EGFP 转染的 293 细胞其 hPPAR γ 1 mRNA 表达水平高于空载体转染组 3 个数量级。通过 real-time PCR 产物的溶解曲线和琼脂糖凝胶电泳证实,产物为 hPPAR γ 1 基因特异性片段。

2.4 重组质粒 hPPAR γ 1 蛋白表达

免疫细胞化学染色结果,phPPAR γ 1-IRES2-EGFP 转染的 293 细胞胞浆中可明显见到阳性棕褐色颗粒,而空载体组未见棕褐色颗粒,提示重组质粒转染的 293 细胞高表达 hPPAR γ 1 蛋白。

3 讨论

PPAR 属于核受体超家族成员,为配体激活的转录因子,包括 PPAR γ 、PPAR δ/β 和 PPAR α 3 种受体亚型。hPPAR γ 基因定位于 3p25,因启动子选择及可变剪切方式不同可产生 2 种异构体:PPAR γ 1 和 PPAR γ 2。由于 hPPAR γ 2 氨基端比

hPPAR γ 1 多出 30 个氨基酸残基,使得前者的配体非依赖转录活性高于后者^[4]。通常,PPAR γ 与维甲酸 X 受体(retinoid X receptor, RXR)结合为二聚体,配体结合后被激活,在释放共抑制蛋白并结合辅激活蛋白后形成包含多亚单位的协同激活物,与靶基因启动子区域过氧化物酶体增殖物反应元件(peroxisome proliferators response element, PPRE)结合,发挥对靶基因的转录调控作用^[5]。

PPAR γ 2 主要表达于脂肪组织;而 PPAR γ 1 除脂肪组织外,还见于巨噬细胞、肠上皮细胞和内皮细胞,肝脏和骨骼肌也表达低峰度的 PPAR γ 1。研究表明,PPAR γ 对脂肪细胞的分化起关键作用^[6],并可调节成熟脂肪细胞的脂质代谢,促进循环中及其他组织中的脂肪酸进入脂肪细胞^[7]。脂肪酸及其衍生物如 15d-PGJ2 是 PPAR γ 的天然配体;合成的 PPAR γ 配体主要是噻唑烷二酮类(thiazolidinedione, TZD)降糖药,一些非甾体抗炎药如吲哚美辛、布洛芬等也可激动 PPAR γ 。

PPAR γ 配体 TZD 可抑制大脂肪细胞分泌胰岛素抵抗分子——TNF γ 和胰岛素抵抗因子(resistin),促进脂肪细胞的分化、增加小脂肪细胞数目,增进胰岛素相关信号传导,加速外周组织甘油三酯的分解,促进脂肪组织中甘油三酯合成,综合的结果使胰岛素敏感性提高^[8];新近的研究表明,活化 PPAR γ 可抑制巨噬细胞 iNOS、TNF- γ 和 MMP-9 等炎性相关蛋白的表达等效应,从而显示出抗动脉硬化作用^[9];此外,研究发现 PPAR γ 配体还在结肠、乳腺和前列腺癌等多种肿瘤中表现出抗肿瘤效应^[10]。可以认为,在治疗包括胰岛素抵抗、高血糖、动脉硬化及肿瘤等多种疾病中,以 PPAR γ 作为靶标极具应用前景。

由于长期使用 TZD 类药物可能伴发浮肿和体质质量增加,个别患者还出现严重的肝毒性等副作用^[11],寻找既保留治疗作用又无毒副作用的选择性 PPAR γ 配体或激动剂显得尤为重要。中药活性成分蕴藏丰富,筛选并研究中药单体中可能的 PPAR γ 配体将为今后开发利用提供实验依据。基于此,本实验建立了含 hPPAR γ 1 的真核表达载体 phPPAR γ 1-IRES2-EGFP,提供下一步药物筛选分子平台建立及受体功能研究所用。我们选择 pIRES2-EGFP 质粒作为重组质粒构建的平台主要基于以下 2 点考虑:首先,pIRES2-EGFP 质粒含有内部核糖体进入位点(IRES),可助 mRNA 与核糖体

(下转第 130 页)