

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.07.001

文章编号: 1005-8982(2020)07-0001-04

基础研究·论著

小鼠激素敏感性脂肪酶基因启动子 报告质粒的构建*

李彦琦¹, 左卓², 高天畅², 王贞缔², 侯永永²

(1. 中国医科大学附属第四医院 第一肿瘤内科, 辽宁 沈阳 110032; 2 中国医科大学
公共卫生学院, 辽宁 沈阳 110122)

摘要: **目的** 拟构建激素敏感性脂肪酶(HSL)基因启动子报告质粒。**方法** 将以 C57BL/6 小鼠基因组 DNA 为模板扩增的小鼠 HSL 基因启动子序列, 插入 pGL4.10-basic 荧光素酶报告质粒多克隆位点区域, 再经 PCR、限制性酶切和测序分析筛选出目标质粒 pGL4.10-basic-HSL, 采用荧光素酶活性分析评价质粒的转录活性。**结果** 启动子插入片段长度正确, 序列与数据库一致; 目标报告质粒转入 293T 细胞后, 在过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 作用下具有转录活性, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 成功构建 HSL 基因启动子报告质粒。

关键词: 激素敏感性脂肪酶; 脂肪分解; 启动子; 荧光素酶; 报告基因; 构建

中图分类号: R589.2; R-331

文献标识码: A

Construction of promoter reporter for mouse HSL Gene*

Yan-qi Li¹, Zhuo Zuo², Tian-chang Gao², Zhen-di Wang², Yong-yong Hou²

(1. The First Department of Oncology, The Forth Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110032, China; 2. School of Public Health, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110122, China)

Abstract: Objective To explore the transcriptional regulation of lipolytic genes, a luciferase reporter gene, pGL4.10-basic-HSL, and to construct mouse hormone sensitive lipase (HSL) gene promoter. **Methods** pGL4.10-basic-HSL construction with transcriptional activity was produced by inserting HSL promoter fragment amplified from mouse genomic DNA into the multiple cloning site of empty pGL4.10-basic plasmid and screened by PCR amplification, restrictive enzyme digestion and DNA sequencing respectively. **Results** The results showed the insert of HSL promoter fragment had correct length and sequence by comparing with DNA database; the pGL4.10-basic-HSL construction displayed a significant increase of luciferase activity by comparing with control vector in 293T cells, co-transfected with Peroxisome Proliferators-Activated Receptor γ (PPAR γ) plasmid. **Conclusions** The present study constructs an effective reporter gene successfully, which will be a useful molecular tool for the exploration of lipid metabolism regulation.

Keywords: hormone sensitive lipase; lipolysis; promoter regions, genetic; luciferase; gene, reporter; construction

脂代谢是指脂质, 如甘油三脂、胆固醇和磷脂等在体内消化、吸收、转运、合成、储存和分解等生理

过程。脂质代谢紊乱与多种疾病的发生、发展密切相关, 如糖尿病、动脉粥样硬化和肿瘤等^[1-3]。脂肪的合

收稿日期: 2019-10-13

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81402661)

[通信作者] 侯永永, E-mail: yyhou@cmu.edu.cn

成与分解是调控能量代谢的核心机制之一。当机体处于能量过剩状态时,脂肪合成增多;当机体处于饥饿或交感神经兴奋时,肾上腺素、去甲肾上腺素和胰高血糖素等分泌增加,促进脂肪动员。脂肪动员需要多种酶和蛋白参与,如围脂滴蛋白 1 (Perilipin-1)、脂肪甘油三酯脂肪酶 (adipose triglyceride lipase, ATGL)、激素敏感性脂肪酶 (hormone sensitive lipase, HSL) 和甘油一酯脂肪酶 (monoglyceride lipase, MGL) 等^[4-5]。HSL 除在胰腺和睾丸等组织中表达外,主要由脂肪细胞生成,其催化甘油二酯生成甘油一酯和脂肪酸,是脂肪分解的关键酶之一^[4-6]。

HSL 的活化与转录调控是研究脂肪分解的关键,早期的报道显示过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) 能与 HSL 基因启动子区域结合调控 HSL 的转录,是已确认的转录调控因子^[7]。考虑 HSL 在脂肪分解过程中的关键调控作用,寻找能够调控 HSL 转录调控的临床药物、小分子化合物、上游转录调控因子和环境应激物等,将有助于探索脂代谢相关疾病的机制及治疗研究。本研究拟构建 HSL 报告基因系统,并在 293T 细胞中验证能否被已知上游转录调控因子 PPAR γ 激活。

1 材料与方法

1.1 材料

Universal Genomic DNA 提取试剂盒与 Enzymatic Lysis Buffer 购自北京康为世纪生物科技有限公司, LA Taq DNA 聚合酶、Taq Mix、感受态细菌 TRANS5 α 、琼脂糖、EasyPure HiPure Plasmid Mini Prep Kit 试剂盒、EasyPure Quick Gel Extraction Kit 试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司, *Kpn* I、*Eco* R V 限制性内切酶、T4 连接酶和 DL 2000 DNA Marker 购自日本 TaKaRa 公司, PCR 引物和 LB Broth 购自生工生物工程(上海)股份有限公司, Luciferin 和荧光素酶报告基因 pGL4.10-basic 购自美国 Promega 公司, 293T 细胞购自美国 ATCC 公司, Lipofectamine 3000 试剂购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠基因组 DNA 提取 野生型 C57BL/6 小鼠来自中国医科大学实验动物部。分离野生型 C57BL/6 小鼠棕色脂肪组织,后称取 10 mg,按基因组 DNA 快速提取试剂盒 (Universal Genomic DNA kit) 说明书步骤提取小鼠基因组 DNA。应用 Nanodrop 核酸分析仪

和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度及 DNA 纯度与完整性。基因组 DNA 用于 PCR 复制模板或置于 -80°C 冰箱冷冻保存备用。

1.2.2 引物设计与合成 以小鼠 *HSL* 基因 (NC_000073.6) 及正向序列为目标序列,应用 Primer Blast 在线服务程序设计引物: P1 (含 *Kpn* I 位点) 正向 5'-TGACGCGGTACCTCAGACTCATGGACGGGCAGGCAT-3'; P2 (含 *Kpn* I 位点) 正向 5'-TGACGCGGTA CCGCCACCCTCTCCCTTCATCAA-3'; 共用 P3 (含 *Eco* R V 位点) 反向 5'-GCTCTAGATATCTGGCACAGCAGG TCTGTGGCTACT-3'; 扩增片段产物长度为 3 086 (P1 与 P3) 和 1 046 bp (P2 与 P3)。上述引物由美国 Life Technology 公司合成。

1.2.3 目的片段扩增 以小鼠基因组 DNA 为模板,应用 P1 和 P3 引物,扩增 *HSL* 基因启动子 (-3 071 ~ + 15 bp) DNA 序列;应用 P2 和 P3 引物,扩增 *HSL* 基因启动子 (-1 031 ~ +15 bp) DNA 序列。反应体系: 45 μl Mix+1 μl primer (10 $\mu\text{mol/L}$) +4 μl DNA (300 ng); 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 120 s; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s; 65 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s; 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min; 循环 25 次; 68 $^{\circ}\text{C}$ 维持 10 min。取 10 μl PCR 产物用于 1% 琼脂糖凝胶电泳 (电压 100 V),紫外灯下观察产物片段位置。从琼脂糖凝胶中切出长度正确的 PCR 产物片段,回收、纯化和保存 PCR 产物。

1.2.4 *HSL* 基因启动子报告质粒的构建及鉴定 应用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Eco* R V 分别酶切 PCR 扩增产物和空载体 pGL4.10-basic 质粒,琼脂糖凝胶电泳分离酶切产物,回收和纯化目的 DNA 片段。应用 T4 DNA 连接酶连接带有黏性末端的线性 pGL4.10-basic DNA 和 *HSL* 基因启动子片段,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,将反应产物转化至 TRANS5 α 感受态细菌中,于含氨苄霉素的 LB 培养皿中筛选。16 h 后取单个阳性克隆菌落扩增,用于酶切和测序验证。测序由苏州金唯智生物科技有限公司完成。命名重组载体为 pGL4.10-basic-HSL。

1.2.5 pGL4.10-basic-HSL 转录活性检测 将 293T 细胞接种于 96 孔板内,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳 CO_2 条件下增殖至 60% ~ 80% 时,应用 Lipofectamine 3000 试剂盒 DNA 转染,48 h 后按照荧光素酶检测系统方法处理转染细胞,并通过 Sunergy H1/H1 MD 系统测定荧光值。实验组每孔转染 40 ng pGL4.10-basic-HSL 和 120 ng PPAR γ 质粒,对照组每孔转染 40 ng pGL4.10-basic-HSL 和 120 ng Empty Vector 质粒。实

验组、对照组各 6 孔平行样, 并重复 3 次。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 11.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

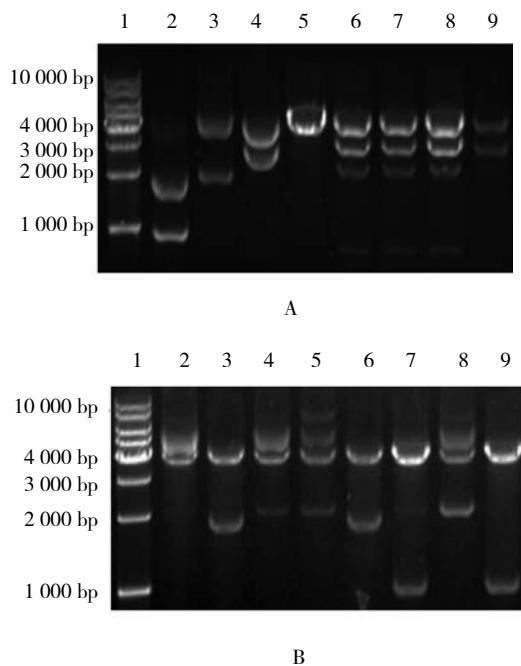
2 结果

2.1 HSL 基因启动子报告质粒构建成功

实验得到 pGL4.10-basic-HSL-3K 和 pGL4.10-basic-HSL-1K 质粒。双酶切两质粒, 结果显示插入片段长度正确(见图 1A, 4 和 9 泳道; 图 1B, 7 和 9 泳道)。进一步测序结果显示, 克隆的小鼠 HSL 基因启动子序列与 GenBank 数据库中信息完全一致, 提示重组载体 pGL4.10-basic-HSL 插入片段序列正确。

2.2 pGL4.10-basic-HSL 具有启动子活性

与共转染 pGL4.10-basic-HSL 和 Empty Vector 比较, 重组载体 pGL4.10-basic-HSL (3 和 1 K) 和 PPAR γ 共转染 293T 细胞后, pGL4.10-basic-HSL 荧光素酶活性升高 [-3 071 bp 为 (24.71 ± 2.80) 倍, $t = 20.700$, $P = 0.000$; -1 031 bp 为 (4.12 ± 0.23) 倍, $t = 32.100$, $P = 0.000$], 提示构建的 pGL4.10-basic-HSL 具有启动子活性(见图 2)。



1: Marker; 2 ~ 9: 酶切产物。A: pGL4.10-basic-HSL-3K 质粒酶切结果; B: pGL4.10-basic-HSL-1K 质粒酶切结果。

图 1 双酶切两质粒结果

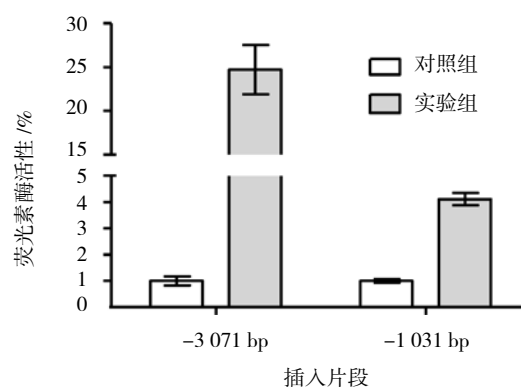


图 2 质粒荧光素酶活性比较

3 讨论

脂肪依据分布、形态与功能, 可分为白色脂肪、棕色脂肪以及米色脂肪。白色脂肪细胞内含单个大脂滴, 多分布于皮下和脏器周围, 是机体的主要储能场所; 棕色脂肪细胞内含多个小脂滴, 以消耗 ATP 产热为主要功能, 多见于婴幼儿, 随年龄增长不断减少^[8-11]。米色脂肪细胞的形态与功能介于白色与棕色脂肪细胞之间, 常见于冷暴露后的脂肪组织中^[8-11]。

白色脂肪是甘油三酯储存和代谢的主要组织。脂肪分解是维持机体能量代谢稳态的核心机制之一。HSL 作为甘油三酯分解的关键酶, 在脂质代谢过程中起到关键的调控作用。报道显示, HSL 的缺失可造成严重的脂质代谢紊乱^[12-14], 因而 HSL 的转录调控研究受到广泛的关注。

HSL 基因启动子区域含有多种转录因子的结合位点。应用生物信息学分析技术, 可以发现 HSL 基因上游启动子区域含有多个潜在的转录因子结合位点, 有待未来验证。PPAR γ 是已被确认的能与 HSL 基因启动子区域结合的转录因子^[7]。研究中也证实这一结论: 当启动子区域未能覆盖 PPAR γ 结合位点时(启动子插入片段长度为 1 kb), PPAR γ 的激动效应降低。

翻译后修饰激活 HSL。在脂解激素的作用下, 细胞内第二信使 cAMP 水平迅速升高, 继而激活 cAMP 依赖的蛋白激酶 A, 后者磷酸化和活化 HSL, 最终参与脂解过程^[5]。因此, HSL 的脂解功能取决于其转录调控与磷酸化水平, 可能还涉及其他的翻译后修饰类型或降解水平等。因而, 应该结合多方面因素, 综合分析 HSL 的脂解功能调控。

综上所述, 本研究成功构建 HSL 基因启动子报告质粒, 为筛选诱导 HSL 转录表达的临床用药、小分子化合物、正向反式作用因子及环境应激物提供基础而

高效的研究工具,将有助于深入研究 HSL 的转录调控在代谢性疾病中的作用及潜在机制。

参 考 文 献:

- [1] NELSON A J, ROCHELAU S K, NICHOLLS S J. Managing dyslipidemia in type 2 diabetes[J]. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 2018, 47(1): 153-173.
- [2] ZHONG S S, LI L X, SHEN X, et al. An update on lipid oxidation and inflammation in cardiovascular diseases[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2019, 144: 266-278.
- [3] PAKIET A, KOBIELA J, STEPNOWSKI P, et al. Changes in lipids composition and metabolism in colorectal cancer: a review[J]. *Lipids in Health and Disease*, 2019, 18(1): 29.
- [4] BOLSONI-LOPES A, ALONSO-VALE M I. Lipolysis and lipases in white adipose tissue-an update[J]. *Archives of Endocrinology Metabolism*, 2015, 59(4): 335-342.
- [5] FRÜHBECK G, MÉNDEZ-GIMÉNEZ L, FERNÁNDEZ-FORMOSO J A, et al. Regulation of adipocyte lipolysis[J]. *Nutrition Research Reviews*, 2014, 27(1): 63-93.
- [6] HAEMMERLE G, ZIMMERMANN R, HAYN M, et al. Hormone sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(7): 4806-4815.
- [7] YAJIMA H L, KOBAYASHI Y, KANAYA T, et al. Identification of peroxisome-proliferator responsive element in the mouse HSL gene[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 352(2): 526-531.
- [8] SEBO Z L, RODEHEFFER M S. Assembling the adipose organ: adipocyte lineage segregation and adipogenesis in vivo[J]. *Development*, 2019(146): dev172098.
- [9] CHU D T, GAWRONSKA-KOZAK B. Brown and brite adipocytes: Same function, but different origin and response[J]. *Biochimie*, 2017(138): 102-105.
- [10] 杨帆, 李晓南. 棕色脂肪组织在肥胖与代谢综合征发生发展中的作用及其机制研究 [J]. *发育医学电子杂志*, 2019(1): 75-80.
- [11] 庄俐, 张惠莉, 张瑞霞. 棕色脂肪形成的内分泌及环境影响因素研究 [J]. *医学信息*, 2019, 32(4): 36-38.
- [12] OSUGA J, ISHIBASHI S, OKA T, et al. Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(2): 787-92.
- [13] WANG F, CHEN Z, REN X, et al. Hormone-sensitive lipase deficiency alters gene expression and cholesterol content of mouse testis[J]. *Reproduction*, 2017, 153(2): 175-185.
- [14] XIA B, CAI GH, YANG H, et al. Adipose tissue deficiency of hormone-sensitive lipase causes fatty liver in mice[J]. *PLoS Genetics*, 2017, 13(12): e1007110.

(王荣兵 编辑)

本文引用格式: 李彦琦, 左卓, 高天畅, 等. 小鼠激素敏感性脂肪酶基因启动子报告质粒的构建 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(7): 1-4.