

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.16.003

文章编号: 1005-8982(2017)16-0012-06

小鼠 11β -HSD1 基因真核表达载体的构建及应用

辛婧¹, 叶磊², 杨可¹, 沈亚非¹, 邓飞¹

[1.河南省漯河市中心医院(漯河市医学高等专科学校第一附属医院)内分泌科,河南漯河 462000;2.河南省漯河市召陵区人民医院 神经内科,河南漯河 462000]

摘要:目的 构建小鼠 11β -羟类固醇脱氢酶(11β -HSD1)基因的慢病毒真核表达载体 PLJM1- 11β -HSD1-GFP,建立小鼠前体脂肪细胞(3T3-L1)高表达 11β -HSD1 基因的稳定感染细胞株,为 11β -HSD1 基因的功能研究奠定基础。**方法** 利用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)从小鼠肝脏 cDNA 中扩增 11β -HSD1 开放阅读框 ORF,构建针对 11β -HSD1 基因的真核表达载体,转化感受态 DH5 α 菌株,抽提质粒并进行测序鉴定。用测序成功的质粒和慢病毒包装质粒共同转染 293T 细胞,产生慢病毒并转染 3T3-L1 细胞。根据绿色荧光效率挑取单克隆细胞团筛选出稳定细胞株,通过 Western blot 鉴定 PLJM1- 11β -HSD1-GFP 转染成功。**结果** 经酶切、PCR 及测序验证,PLJM1- 11β -HSD1-GFP 真核表达载体构建成功,并包装慢病毒,绿色荧光效率 90%以上,并利用其慢病毒悬液成功感染 3T3-L1 细胞,筛选出的稳定感染细胞株的 3T3-L1 细胞成功高表达 11β -HSD1 蛋白。**结论** 成功构建了 11β -HSD1 基因的真核表达载体,并建立高表达 11β -HSD1 的稳定感染细胞株 PLJM1- 11β -HSD1-GFP-3T3-L1,为进一步研究 11β -HSD1 基因的功能,特别是在肥胖中的研究奠定了基础。

关键词: 11β -HSD1 基因;真核表达载体;前体脂肪细胞;肥胖

中图分类号: Q782

文献标识码: A

Construction and role of mouse PLJM1- 11β -HSD1-GFP plasmid

Jing Xin¹, Lei Ye², Ke Yang¹, Ya-fei Shen¹, Fei Deng¹

(1. Department of Endocrinology, Luohe Central Hospital, Luohe, Henan 462000, China;

2. Department of Neurology, the People's Hospital of Shaoling District, Luohe, Henan 462000, China)

Abstract: Objective To construct a lentiviral vector of PLJM1- 11β -HSD1-GFP and establish a stable cell line of 3T3-L1 with high expression of mouse 11β -HSD1 gene, and lay the foundation for the research of 11β -HSD1 gene. **Methods** Open reading frame (ORF) fragment of mouse 11β -HSD1 gene was amplified from mouse liver tissues by RT-PCR, then inserted into the PLJM1-NRG1-GFP vector and transformed into competent DH5 α strain of *Escherichia coli*. The plasmid was extracted and used for sequencing. The successfully -sequenced plasmid PLJM1- 11β -HSD1-GFP and the packaging plasmid were transfected to 293T cell line to produce recombinant lentivirus. 3T3-L1 cell line was transfected by recombinant virus and the stable cell line was isolated by selecting the single clone with GFP, and high expression of 11β -HSD1 was identified by Western blot. **Results** The eukaryotic expression vector of PLJM1- 11β -HSD1-GFP was constructed and confirmed by DNA sequencing. The lentivirus vector of 11β -HSD1 named PLJM1- 11β -HSD1-GFP was successfully constructed and the virus was packaged in 293T cells. 3T3-L1 cells were transfected by recombinant virus and the stable cell line was selected by green fluorescence efficiency, which showed that the lentivirus vector transfection rate was over 90%. A dramatically elevated protein level of 11β -HSD1 was expressed in the positive clones of 3T3-L1 cells compared with the control group. **Conclusions** Mouse PLJM1- 11β -HSD1-GFP plasmid has been successfully constructed. The 3T3-L1 cells

transfected by PLJM1-11 β -HSD1-GFP could effectively elevate the expression of 11 β -HSD1 gene, and can be used in the functional researches of mouse 11 β -HSD1 gene, especially those related to obesity.

Keywords: 11 β -HSD1 gene; eukaryotic expression vector; 3T3-L1 cell; obesity

11 β -羟类固醇脱氢酶(11 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 11 β -HSD1)在体内广泛分布,表达于脂肪、肝脏、肌肉、性腺及中枢神经系统等,以脂肪组织和肝脏中的含量最高^[1]。它是糖皮质激素的代谢酶,有重要的生物学活性,有还原酶与氧化酶的双重作用,但以还原酶作用为主,需要烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADP⁺)参与,有活化糖皮质激素的作用,可以使人体无活性的可的松(动物的皮质酮)转化为有活性的氢化可的松(皮质醇)^[2]。资料显示,11 β -HSD1的转基因小鼠显示内脏脂肪组织肥厚;在代谢综合征患者脂肪库中细胞内11 β -HSD1的活性是普遍增加的^[3]。这可能与糖皮质激素能增加脂肪细胞内合成代谢有关,而11 β -HSD1主要使糖皮质激素活化,提示其可能与向心性肥胖、胰岛素抵抗及糖尿病有关^[4]。本研究拟构建11 β -HSD1基因的真核表达载体,并建立高表达该基因的稳定感染细胞株,以进一步研究该基因与肥胖、胰岛素抵抗及糖脂代谢相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

PolyAtract_Series9600™ mRNA Isolation System 试剂盒、末端转移酶(TdT)、逆转录酶(AMV)及 Taq DNA 聚合酶均购自美国 Promega 公司,焦碳酸二乙酯(DEPC)及 Expand™ Template PCR System 购自日本 TaKaRa 公司,DH5 α 菌株及 PLJM1-NRG1-GFP 载体由南京医科大学分子遗传研究室李建民教授馈赠,Lipofectamine 2000 细胞转染试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,3T3-L1 前体脂肪细胞株、293T 细胞购自上海细胞生物研究所,DMEM 培养液、10%胎牛血清购自南京生兴公司,3-异丁基-1-甲基磺嘌呤(MIX)、胰岛素及地塞米松购自美国 Sigma 公司,11 β -HSD1 兔源抗体购自美国 Research Genetics 公司,二抗羊抗兔 IgG-辣根过氧化物酶及 β -actin 抗体购自武汉生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 登录号 NM_008288 mRNA 序列设计引物,由上海华大基因科技有限公司合成。正向引物:GGGGCTAGCGGATCCGCCACC

ATGGCAGTTATGAAAATTACC;反向引物:GGGG AATCCTCGAGCCTAGTTACTTACAAACATGTCC。

正向引物酶切位点为 *NheI*, 反向引物酶切位点为 *EcoRI*。扩增目的片段大小 881 bp。

1.2.2 小鼠肝脏总 RNA 的抽提 用 PolyAtract_Series9600™ mRNA Isolation System 试剂盒提取 BABL/C 8 周的小鼠肝脏组织总 RNA,提取 2 μ l 经琼脂糖凝胶电泳观察总 RNA 完整性,并用紫外分光光度计分别测定 260 nm、280 nm 波长下的光密度(OD)值,并检测总 RNA 的纯度,其余 RNA 于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻保存。

1.2.3 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)扩增目的基因 取 2 μ g mRNA 加入 PrimeScript™ RT reagent Kit 逆转录反应体系中,42 $^{\circ}$ C 孵育 90 min,逆转录合成 cDNA,结束后加入 RNAase H 内切酶,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,降解 RNA。以上述小鼠的 cDNA 为模板扩增目的片段。PCR 的反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,54 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C 2 min,获取小鼠基因全长开放阅读框 ORF。

1.2.4 真核表达质粒 PLJM1-11 β -HSD1-GFP 制备 以上述小鼠 3T3-L1 细胞的 cDNA 为模板,相应引物扩增 11 β -HSD1 全长 ORF,用 TaKaRa DNA Fragment Purification Kit 纯化靶 DNA 片段。将纯化后的 PCR 产物行 *EcoRI* 和 *NheI* 双酶切。对酶切后产物用 1%琼脂糖凝胶行电泳检测。并在切胶仪上切下目的片段。用 Ultra-Sep Gel Extraction Kit (OMEGA)纯化切胶产物。将酶切纯化后的目的片段 11 β -HSD1 连接至 PLJM1-NRG1(*NheI*/*EcoRI*)载体(10 μ l 体系:目的片段 2 μ l,载体 1 μ l,2 \times Ligase buffer 5 μ l,T4 连接酶 1 μ l,ddH₂O 1 μ l;条件 22 $^{\circ}$ C 1 h)。用连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 菌株,在氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)抗性的 LB 固体平板上生长过夜(37 $^{\circ}$ 孵箱 16~18 h)。在过夜后的固体平板上挑取 5 个单克隆,分别加至 Amp 抗性的 5 ml LB 培养基里摇菌过夜并做好标记,次日以菌液为模板,以 11 β -HSD1-F/R 为引物作 PCR 并行 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。对获取的阳性克隆进行保种,同时经碱裂解法提取质粒 DNA,以 CMV-F 和 11 β -HSD1-R

为测序引物并送上海华大基因科技有限公司进行测序。

1.2.5 序列分析 应用 NCBI 网站 BLAST 分析软件, 对上述测序结果进行序列比对, 鉴定 PLJM1-11 β -HSD1-GFP 载体多克隆位点区表达序列的可靠性和准确性。

1.2.6 PLJM1-11 β -HSD1-GFP-3T3-L1 慢病毒细胞株的构建 用中抽试剂盒抽取质粒 PLJM1-11 β -HSD1-GFP 及空载对照质粒 PLJM.1, 保证 OD 值 1.8~1.9, 浓度在 1 000 μ g/ml 以上。转染前 24 h 将处于对数生长期的 293T 细胞铺 6 cm 培养皿, $2 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ 个/皿。转染体系如下: 质粒 PLJM1-11 β -HSD1-GFP(或空载对照质粒 PLJM.1) 4 μ g, 包装质粒 PVSVG 2 μ g, delta 8.91 3 μ g, 与 Lipofectamine 2000 20 μ l 混合共同孵育形成复合物, 然后转染 293T 细胞。转染后 24 h 换液 3 ml, 并用荧光显微镜观察拍照。转染后 48 和 72 h 收集包装产生的病毒上清, 经 0.45 μ m 滤膜过滤后加入 polybrene(Millipore), 使终浓度为 10 μ g/ml。感染前 24 h 将 3T3-L1 细胞接种至 6 cm 培养皿, 使感染前细胞密度为 10%~20%。24 h 后弃去培养液, 用上述病毒上清 3 ml 感染靶细胞, 37 $^{\circ}$ C 培养 6 h 后换液加入 3 ml 完全培养液 DMEM。感染 48 h 后观察荧光表达情况。根据荧光效率挑单克隆筛选稳定转染株, 并进行冷冻保存。

1.2.7 Western blot 检测 分别提取正常 3T3-L1 细胞、高表达 11 β -HSD1 的 3T3-L1 及转入空载质粒的 3T3-L1 细胞的总蛋白质, 用考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度, 制备 14.7% 分离胶和 5% 浓缩胶, 60 V 稳压电泳; 半干转膜, 封闭, 按 Western blot 检测试剂盒说明书进行操作。一抗为 11 β -HSD1 多克隆抗体(抗体浓度为 1:200), 二抗为羊抗兔 IgG-辣根过氧化物酶, (抗体浓度为 1:800), 用免疫印迹增强化学发光法分别检测 3 组细胞株的 11 β -HSD1 蛋白表达水平。实验所得的 Western blot 条带经 Photoshop 软件处理, 在 Bandscan 分析软件中测得各自总度值, 采用自身 β -actin 灰度值校正并进行定量分析。实验数据输入 Excel 数据库用 Excel 软件进行作图。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 14.0 统计学软件对本研究中的数据进行分析和处理, 计量资料应用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠 11 β -HSD1 ORF 片段扩增及载体克隆

以小鼠肝脏 cDNA 为模板, 用正向引物和反向引物进行 PCR 扩增, 得到小鼠 11 β -HSD1 ORF 片段, 目的片段为 881 bp(见图 1)。

2.2 PLJM1-11 β -HSD1-GFP 重组载体的鉴定

以正向引物与反向引物进行 PCR 扩增, 用 Promega PCR 纯化试剂盒进行纯化, 酶切产物(见图 2)行切胶纯化, 将纯化后产物连接至 PLJM1-NRG1-GFP 载体。随机选取 5 个阳性克隆, 行 PCR 鉴定(见图 3), 获取的阳性克隆经碱裂解法提取质粒 DNA 测序(见图 4), 测序结果经序列比对分析确认无任何突变、插入等异常, 慢病毒载体 PLJM1-11 β -HSD1-GFP 构建成功(见图 5)。

2.3 慢病毒载体转染 293T 细胞

慢病毒载体 PLJM1-11 β -HSD1-GFP 转染 293T

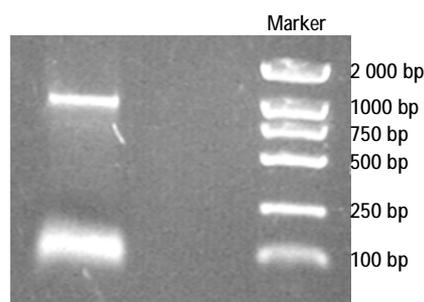


图 1 小鼠 11 β -HSD1 基因 ORF 扩增片段

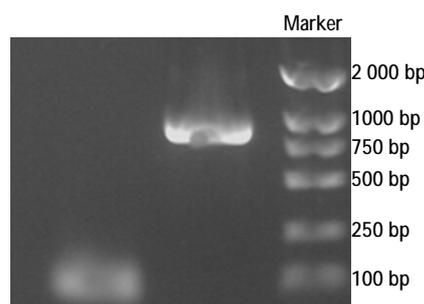


图 2 小鼠 11 β -HSD1 基因 PCR 酶切产物

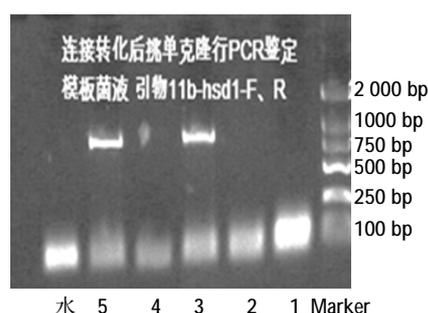


图 3 小鼠 11 β -HSD1 基因 ORF 片段单克隆 PCR 结果

细胞 24 h 后荧光显微镜拍照见图 6, 绿色荧光效率 90%以上。

2.4 收取病毒上清感染 3T3-L1 细胞

收取 293T 细胞病毒上清感染 3T3-L1 细胞,

48 h 后荧光显微镜拍照结果见图 7。

2.5 3T3-L1 单克隆细胞株绿色荧光蛋白的表达

根据荧光情况挑单克隆并筛选稳定感染细胞株,

3T3-L1 单克隆细胞株绿色荧光蛋白的表达见图 8。

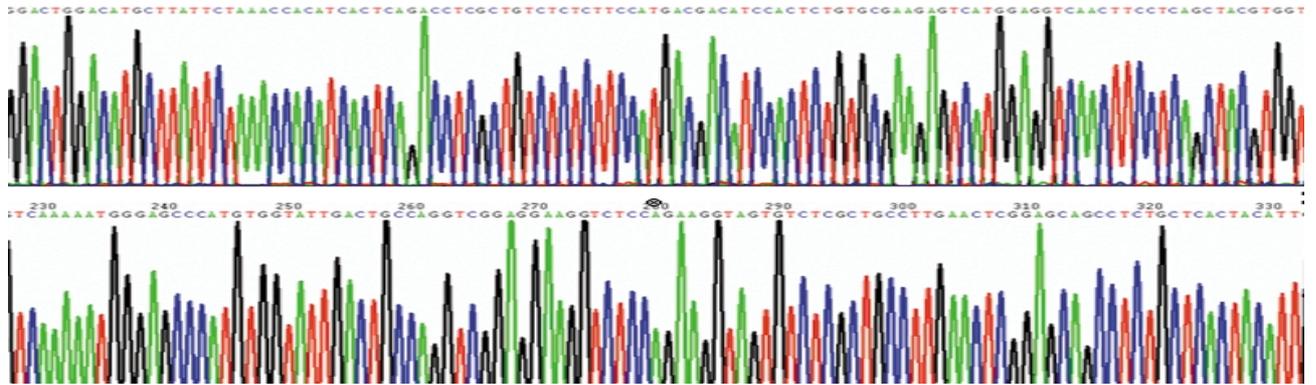


图 4 PLJM1-11β-HSD1-GFP 质粒测序图

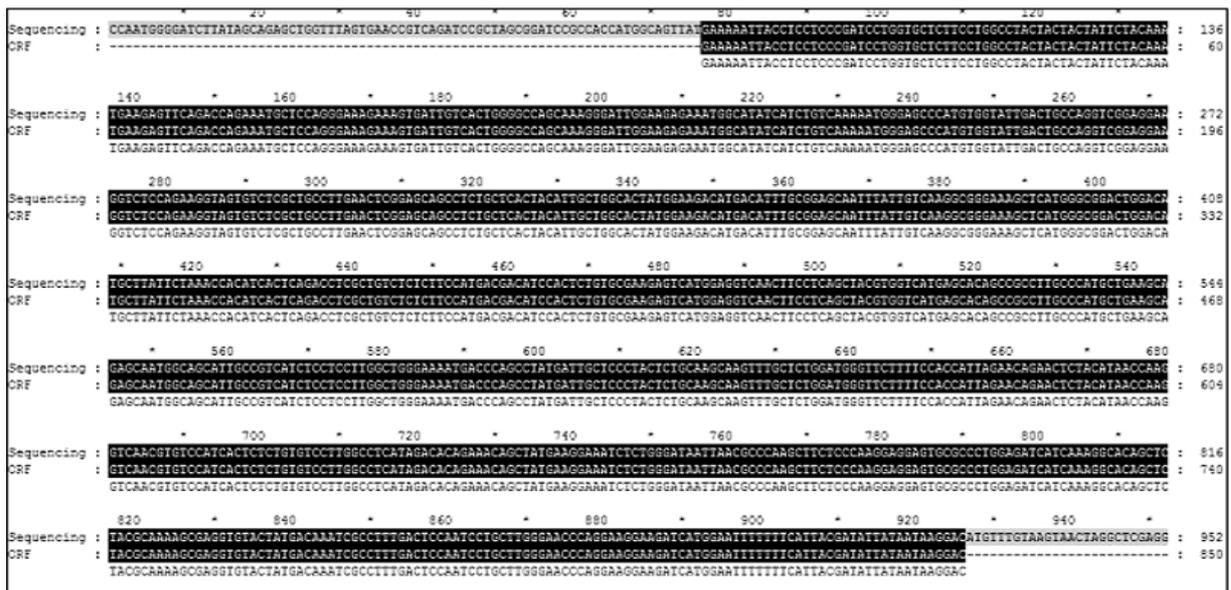
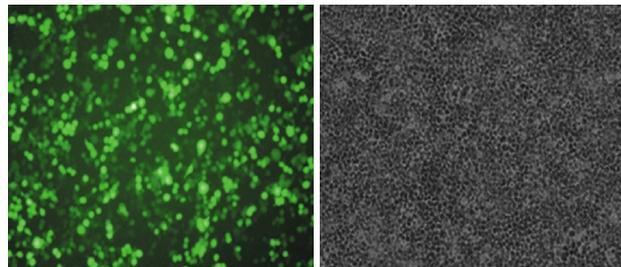
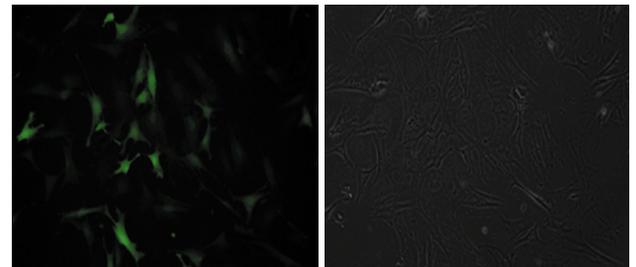


图 5 PLJM1-11β-HSD1-GFP 质粒序列比对图



A: 明视野下; B: 暗视野下

图 6 重组质粒转染 293T 细胞后绿色荧光蛋白的表达 (荧光显微镜 × 100)



A: 明视野下; B: 暗视野下

图 7 重组质粒转染 3T3-L1 细胞后绿色荧光蛋白的表达 (荧光显微镜 × 100)

2.6 PLJM1-11 β -HSD1-GFP 质粒转染 3T3-L1 细胞蛋白水平验证

分别提取 3T3-L1、PLJM1-3T3-L1 及 PLJM1-11 β -HSD1-GFP-3T3-L1 细胞组蛋白进行 Western blot 检测,结果提示 PLJM1-11 β -HSD1-GFP 质粒转染成功,PLJM1-11 β -HSD1-GFP-3T3-L1 组 11 β -HSD1 蛋白表达水平明显升高,见图 9。

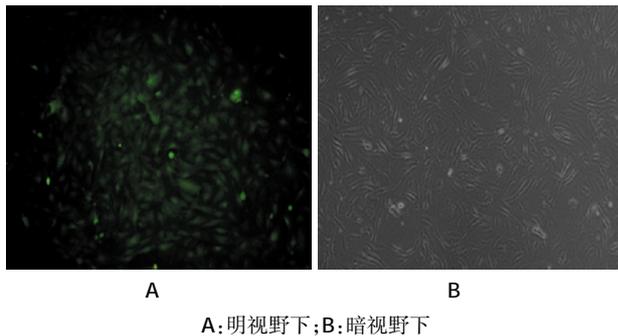


图 8 3T3-L1 单克隆细胞株绿色荧光蛋白的表达 (荧光显微镜 $\times 100$)

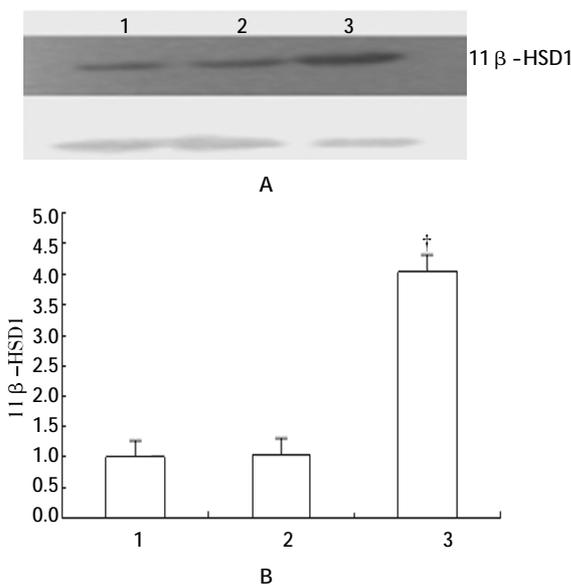


图 9 A:3 组细胞高表达 11 β -HSD1 蛋白水平;B:以 11 β -HSD1/tubulin 相应灰度值行定量分析。[†]与 1 和 2 比较, $P < 0.05$;1:3T3-L1 组;2: PLJM1-3T3-L1 组;3:PLJM1-11 β -HSD1-3T3-L1 组

图 9 各组细胞 11 β -HSD1 蛋白表达情况

3 讨论

11 β -HSD1 作为一种微线粒体酶,主要负责有活性与无活性的糖皮质激素之间的互相转化,通过控制底物即糖皮质激素的利用率,从而调控组织特异性糖皮质激素受体的活性^[5-6]。11 β -HSD 有 2 种

同工酶。其中 11 β -HSD2 是辅酶 I (NAD)依赖性脱氢酶,主要使活性的可的松变为无活性的氢化可的松。主要作用于盐皮质激素敏感的靶组织如肾脏,结肠,唾液腺,胎盘等^[7]。11 β -HSD1 直到最近才发现并认为是重要的生物酶,是还原型辅酶 II (NADPH)依赖性的还原酶,与 11 β -HSD2 作用相反,主要负责将无活性的氢化可的松转化为有活性的可的松^[8]。它广泛分布于各组织,主要分布于肝脏、脂肪、性腺、脑、脉管系统等,这些组织则以糖皮质激素受体占优势。研究表明,11 β -HSD1 调节糖皮质激素受体与配体的结合,参与了库欣综合征相似的疾病的发生发展,如向心性肥胖、糖尿病、多囊卵巢综合征以及痴呆^[9-10]。

慢病毒(Lentivirus)载体是以人类免疫缺陷病毒-1(HIV-1)为基础发展起来的基因治疗载体^[11]。携带有目的基因的慢病毒载体在慢病毒包装质粒及细胞系的辅助下,经过病毒包装成为有感染力的病毒颗粒,通过感染细胞或组织,实现目的基因在宿主细胞中得到长期而稳定的表达^[12]。经过改建后的慢病毒载体能够容纳约 10 kb 左右的外源基因,因此大多数的 cDNA 都能够被克隆入慢病毒载体。293T 细胞由 293 细胞派生,属人肾上皮细胞系,作为包装细胞,在包装后产生了高滴度的病毒颗粒,同时表达目的基因。

本文利用慢病毒载体技术成功构建了带有 GFP 目的基因 HSD1 的慢病毒载体 PLJM1-HSD1-GFP,同时建立了 3T3-L1 稳定感染细胞株 PLJM1-HSD1-GFP-3T3-L1,为进一步研究 HSD1 的生物学功能奠定了必要的基础。

参 考 文 献:

- [1] CHAPMAN K E, COUTINHO A E, ZHANG Z, et al. Changing glucocorticoid action: 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in acute and chronic inflammation[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2013, 137(100): 82-92.
- [2] LIU J, KONG X, WANG L, et al. Essential roles of 11 β -HSD1 in regulating brown adipocyte function [J]. J Mol Endocrinol, 2013, 50(1): 103-113.
- [3] HONG S P, NAM K Y, SHIN Y J, et al. Discovery of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2015, 25(17): 3501-3506.
- [4] MORGAN S A, GATHERCOLE L L, SIMONET C, et al. Regulation of lipid metabolism by glucocorticoids and 11 β -HSD1 in skeletal muscle[J]. Endocrinology, 2013, 154(7): 2374-2384.
- [5] DUBE S, SLAMA M Q, BASU A, et al. Glucocorticoid excess

- increases hepatic 11 β -HSD-1 activity in humans: implications in steroid-induced diabetes[J]. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 2015, 100(11): 4155-4162.
- [6] PAUL P, FREDIRK R, DAVID E, et al. Saturated fatty acids in human visceral adipose tissue are associated with increased 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression[J]. *Lipids in health Disease*, 2015, 14(1): 1-5.
- [7] KOH E H, KIM A R, KIM H, et al. 11 β -HSD1 reduces metabolic efficacy and adiponectin synthesis in hypertrophic adipocytes[J]. *J Endocrinol*, 2015, 225(3): 147-158.
- [8] WOODS C, TOMLINSON J W. The dehydrogenase hypothesis[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2015, 872: 353-380.
- [9] LAVERY G G, ZIELINSKA A E, GATHERCOLE L L, et al. Lack of significant metabolic abnormalities in mice with liver-specific disruption of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1[J]. *Endocrinology*, 2012, 153(7): 3236-3248.
- [10] ABRAHAMS L, SEMJONOUS N M, GUEST P, et al. Biomarkers of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in mice lacking 11 β -HSD1 and H6PDH [J]. *J Endocrinol*, 2012, 214(3): 367-372.
- [11] WANG N, RAJASEKARAN N, HOU T, et al. Comparison of transduction efficiency among various lentiviruses containing GFP reporter in bone marrow hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Experimental Hematology*, 2013, 41(11): 934-943.
- [12] GENG X, DOITSH G, YANG Z, et al. Efficient delivery of lentiviral vectors into resting human CD4 T cells[J]. *Gene Therapy*, 2014, 21(4): 444-449.

(张蕾 编辑)

欢迎订阅《中国现代医学杂志》

《中国现代医学杂志》创刊于 1991 年,是一本医学综合性学术期刊。由中华人民共和国教育部主管,中南大学湘雅医院承办。创刊以来始终坚持以服务广大医药卫生科技人员、促进国内外医学学术交流和医学事业发展为宗旨,密切关注世界医学发展的新趋势,积极推广国内医药卫生领域的新技术、新成果,及时交流广大医药卫生人员的医学科学理论和业务技术水平,成为国内外医学学术交流的重要园地,已进入国内外多个重要检索系统和大型数据库。如:中文核心期刊(中文核心期刊要目总览 2008、2011 和 2014 版)、中国科技论文与引文数据库即中国科技论文统计源期刊(CSTPCD)、俄罗斯文摘(AJ)、中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊网全文数据库(CNKI)、中文科技期刊数据库、中文生物医学期刊文献数据库(CMCC)、超星“域出版”及中国生物医学期刊光盘版等。

《中国现代医学杂志》辟有基础研究·论著、临床研究·论著、综述、新进展研究·论著、临床报道、学术报告、病例报告等栏目。主要刊登国内外临床医学、基础医学、预防医学以及医学相关学科的新理论、新技术、新成果,以及医院医疗、教学、科研、管理最新信息、动态等内容。主要读者为广大医药卫生科技人员。

《中国现代医学杂志》为旬刊(2017 年 7 月开始),国际标准开本(A4 幅面),全刊为彩色印刷,无线胶装。内芯采用 90 g 芬欧汇川雅光纸(880 \times 1230 mm),封面采用 200 g 紫鑫特规双面铜版纸(635 \times 965 mm)印刷,每个月 10、20、30 日出版。定价 35 元/册,全年 840 元。公开发行,国内统一刊号:CN 43-1225/R;国际标准刊号:ISSN 1005-8982;国内邮发代号:42-143。欢迎新老用户向当地邮局(所)订阅,漏订或需增订者也可直接与本刊发行部联系订阅。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路 87 号《中国现代医学杂志》发行部,邮编:410008

电话:0731-84327938;传真:0731-89753837;E-mail:xdyx99@126.com

唯一官网网址:www.zgxdyx.com

《中国现代医学杂志》编辑部