

巨噬细胞特异性表达载体的构建及鉴定

李晓缘 尹洪超

摘要 **目的** 构建巨噬细胞特异性白喉毒素受体过表达载体并检测其在巨噬细胞中的表达情况。**方法** 将白喉毒素受体基因 Hbegf 克隆入 pcDNA3.1 载体中扩增 Hbegf 与 BGHpolyA 尾片段,与克隆入 pUCm-T 载体中的巨噬细胞特异性启动子相连接,分别转染巨噬细胞与其他细胞,通过荧光定量 PCR 鉴定其表达情况。**结果** 特异性表达载体通过测序以及酶切鉴定构建成功,在巨噬细胞中的表达高于未转染的巨噬细胞以及转染的非巨噬细胞。**结论** 构建了巨噬细胞特异性表达人白喉毒素受体载体,瞬时转染后可在巨噬细胞中特异性表达白喉毒素受体,为动脉粥样硬化易损性斑块的建立以及斑块内与凋亡相关的其他研究提供了一定依据。

关键词 pUCm-T 载体 pcDNA3.1 载体 人白喉毒素受体 细胞凋亡 动脉粥样硬化

中图分类号 Q782 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.11.008

Construction and Identification of Macrophage-specific Expression Vector. Li Xiaoyuan, Yin Hongchao. Department of Pathology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100710, China

Abstract **Objective** To construct a macrophage-specific diphtheria toxin receptor overexpression vector and detect its expression in macrophages. **Methods** Diphtheria toxin receptor gene Hbegf was digested and inserted into pcDNA3.1 vector to amplify the Hbegf and BGHpolyA. Hbegf and BGHpolyA was inserted into pUCm-T vector ligated with macrophage-specific promoter zone to transfect macrophages and other cells. The expression of macrophage-specific human diphtheria toxin receptor expression vector was detected by using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). **Results** Macrophage-specific human diphtheria toxin receptor expression vector was identified by sequencing and restriction enzyme digestion, and its expression in macrophages was higher than non-transfected macrophages and transfected non-macrophages. **Conclusion** Macrophage-specific human diphtheria toxin receptor expression vector was successfully constructed. It can specifically express diphtheria toxin receptor in macrophages after transient transfection. It is an important method to establish atherosclerotic vulnerable plaque, and lays a foundation for Other research related to apoptosis.

Key words pUCm-T vector; pcDNA3.1 vector; Human diphtheria toxin receptor; Cell apoptosis; Atherosclerosis

白喉毒素(DT)是白喉杆菌产生的细菌外毒素,由 535 个氨基酸组成,相对分子质量为 62000^[1,2]。它通过阻止延长因子 2 在核糖体内促进多肽链延长而抑制蛋白质合成造成细胞死亡,具有极强的细胞毒性^[2]。白喉毒素受体广泛分布于哺乳动物细胞表面,但是只有人类与少数灵长类动物体内的白喉毒素受体才对白喉毒素具有敏感度,有研究证明,白喉毒素无法对小鼠细胞产生作用^[3]。所以可以通过将人类的白喉毒素转移到小鼠细胞表面,实现白喉毒素诱导小鼠细胞凋亡的目的。

清道夫受体(scavenger receptor, SR)是一类主要位于巨噬细胞表面的糖蛋白,至少存在 5 种不同类型

即 SR-A、CD36、SR-C、CD68 和 LOX-1。其中 SR-A 能与氧化型低密度脂蛋白(OX-LDL)结合,并介导其内移,使巨噬细胞转变成泡沫细胞,因而与动脉粥样硬化(As)的关系极为密切^[4]。有研究表明,SR-A 在巨噬细胞泡沫化的过程中表达量明显升高^[5]。通过将 SR-A 启动子区域的增强子片段,启动子核心区片段,与目的基因相连接构建过表达载体,可实现目的蛋白在巨噬细胞以及巨噬细胞源的泡沫细胞中特异性表达^[5-7]。

本研究将人类白喉毒素受体与清道夫受体 SR-A 启动子区构建过表达载体,通过白喉毒素作用实现巨噬细胞的特异性凋亡,为动脉粥样硬化的研究奠定了基础。

材料与方法

1. 主要试剂和仪器:高保真聚合酶(日本 TaKaRa 公司),DL1000 marker,DL10000 marker,胶回收试剂

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81670430)

作者单位:81670430 中国医学科学院/北京协和医学院基础医学研究所病理系

通讯作者:尹洪超,电子信箱:yinhongchao@ibms.cams.cn

盒(日本 TaKaRa 公司),pUCm-T 载体,大肠杆菌菌株 *E. coli*. DH5 α , T4DNA 连接酶(日本 TaKaRa 公司),DNA 纯化试剂盒(日本 TaKaRa 公司),pcDNA3.1 载体,限制性内切酶 BamH I、EcoR V、SaL I、Hind III (NEB 公司),质粒提取试剂盒(日本 TaKaRa 公司),内毒素清除剂,质粒大提试剂盒(中国天根公司),质粒转染试剂(美国 Origen 公司),1640 培养基,胎牛血清,双抗,总 RNA 提取试剂盒(中国天根公司),反转录酶(日本 TaKaRa 公司),SYBY-green MIX(日本 TaKaRa 公司),普通 PCR MIX(康为世纪)。PCR 扩增仪,荧光实时定量 PCR 仪,电泳仪,化学发光成像仪,二氧化碳培养箱,台式高速冷冻离心机。

2. 实验方法:(1)从 GenBank 及 UCSC 中查到 SR-A 增强子与启动子区域,向其两端延伸得到一段 4700bp 的序列,根据该序列设计引物,上游引物:5'-CCCCTAGGCTGACATTCCATC-3',下游引物:5'-GGAAATGACACATTCCTGCGT-3'。以实验室已构建带有 SR-A 沉默子,增强子,启动子区域质粒 PJC13-SR 为模板进行普通 PCR 扩增,反应条件为:94℃ 预变性 1min,98℃ 变性 10s,68℃ 退火/延伸反应 6min,共 30 个循环。2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物并对产物进行 DNA 测序。(2)pUCm-T-SR-A 载体的构建:将 SR-A 增强子与启动子区域的 PCR 产物进行纯化,加尾:将纯化产物与 Taq 酶 mix 等量混匀,72℃ 反应 40min,将加尾产物再次纯化,通过 T₄ 连接酶与 pUCm-T 载体连接,转化大肠杆菌 *E. coli*. DH5 α ,37℃ 培养 16h,挑取蓝斑过夜摇菌后提取质粒,PCR 鉴定及测序分析,成功构建 pUCm-T-SR-A 载体。(3)从 GenBank 中查到人类白喉毒素受体基因(Hbegf)CDS 序列,设计引物:上游引物:5'-CGGGATCCATGAAGCTGCTGCCGTCGG-3',下游引物:5'-CGGATATC TCAGTGGAATTAGTCATGCC-3'。该基因的上下游引物分别加了 BamH I 与 EcoRV 酶切位点,以人 CDNA 为模板进行普通 PCR 扩增,反应条件为:94℃ 预变性 1min,98℃ 变性 10s,68℃ 退火/延伸反应 45s,共 30 个循环。2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物并对产物进行 DNA 测序。(4)pcDNA3.1-Hbegf 载体的构建:将 Hbegf 的 PCR 产物纯化后用 BamH I 与 EcoR V 进行酶切再纯化,将质粒 pcDNA3.1-Hbegf 用 BamH I 与 EcoR V 也进行双酶切线性化,T₄ 连接酶连接双酶切后的基因 Hbegf 和线性化载体 pcDNA3.1-Hbegf,转化大肠杆菌

E. coli. DH5 α ,37℃ 培养 16h,挑取单个菌落,过夜摇菌后提取质粒,PCR 鉴定以及测序分析,成功构建 pcDNA3.1-Hbegf。(5)根据 pcDNA3.1-Hbegf 序列设计引物:扩增加有 BGHpolyA 尾基因 Hbegf,上游引物:5'-ACGCGTCGACATGAAGCTGCTGCCGTCGG-3',下游引物:5'-CCCAAGCTTTGTTCTTTCCGCCT-3'。该基因的上下游引物分别加了 SaL I 与 Hind III 酶切位点,以构建好的 pcDNA3.1-Hbegf 为模板进行普通 PCR 扩增,反应条件为:94℃ 预变性 1min,98℃ 变性 10s,68℃ 退火/延伸反应 1min,共 30 个循环。2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物并对产物进行 DNA 测序。(6)pUCm-T-SR-A-Hbegf-BGHpolyA 载体的构建:将 Hbegf-BGHpolyA 的 PCR 产物纯化后用 SaL I 与 Hind III 进行酶切再纯化,将质粒 pUCm-T-SR-A 也进行双酶切线性化,T₄ 连接酶连接双酶切后的基因 Hbegf-BGHpolyA 和线性化载体 pUCm-T-SR-A,转化大肠杆菌 *E. coli*. DH5 α ,37℃ 培养 16h,挑取单个菌落,过夜摇菌后提取质粒,PCR 鉴定以及测序分析,成功构建 pUCm-T-SR-A-Hbegf-BGHpolyA。(7)使用转染试剂,根据一定比例,将质粒分别转染巨噬细胞 RAW264.7 与肥大细胞 RBL-2H3,提取总 RNA,反转录为 cDNA,采用 SYBY-green 荧光染料定量 PCR 法对样品中基因 Hbegf 的表达水平进行测定和比较分析。上游引物:5'-CCTATGACCACACAACCATCC-3',下游引物:5'-CATGCCCAACTTCACTTTCTC-3'。反应体系为 25 μ l:SYBY-green Mix 12.5 μ l,cDNA 模板 1 μ l,上下游引物(10mmol/L)各 1 μ l,灭菌双蒸水 9.5 μ l。扩增参数:95℃ 预变性 30s,95℃ 变性 5s,60℃ 退火/延伸 30s,39 个循环。计算出各样本 cDNA 的基因 Hbegf 以及内参基因 β -actin 的 Ct 值,将基因 Hbegf 扩增 Ct 值与相对应的 β -actin 的 Ct 值相减得到 Δ Ct,在根据公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算得到基因 Hbegf 的相对表达水平。(8)将质粒分别转染巨噬细胞 RAW264.7 与肥大细胞 RBL-2H3,提取总蛋白,通过 Western blot 法做 Hbegf 蛋白表达鉴定。

3. 统计学方法:应用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$),组间比较应用方差分析,两两比较采用 *Student-Newman-Keuls* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. pUCm-T-SR 的构建:以已构建带有 SR-A 沉默子、增强子、启动子区域质粒 PJC13-SR 为模板

高保真 PCR 扩增 SR - A 增强子与启动子,2% 琼脂糖凝胶电泳在 3000bp 左右的位置出现与预期结果一致的目的条带(图 1A),将其回收纯化加尾后再纯化克隆入 pUCm - T 载体中,构建 pUCm - T - SR - A 载体,测序验证构建成功(图 1B)。

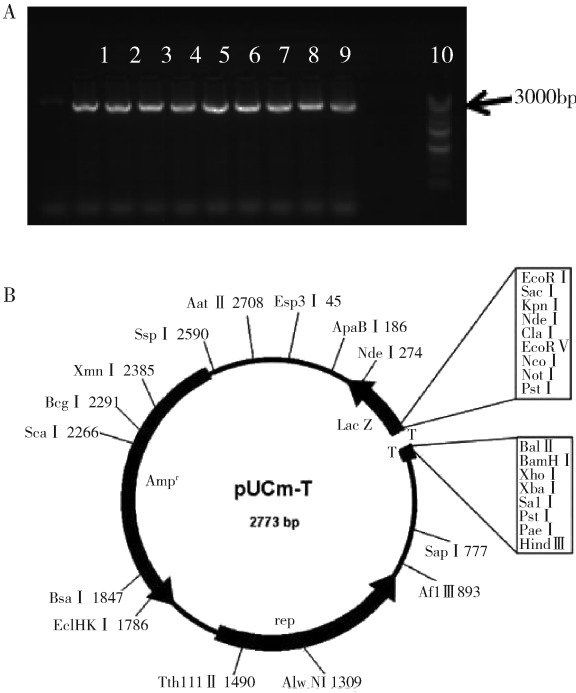


图 1 SR - A 启动子区的扩增结果

A. per 扩增 SR - A 增强子与启动子,1 ~ 9 为扩增条带,10 为 DL10000;
B. pUCm - T 载体图谱,箭头处为启动子区插入位点

2. pcDNA3.1 - Hbegf 载体的构建:以人基因组为模板扩增 Hbegf 基因,2% 琼脂糖凝胶电泳在 650bp 左右的位置出现与预期结果一致的目的条带(图 2A),将其纯化回收进行酶切,克隆入载体 pcDNA3.1 中(图 2B),测序验证构建成功后以该质粒为模板扩增 Hbegf 与 BGHPolyA 片段,电泳在 900bp 左右位置出现与预期结果一致的条带(图 2C)。

3. pUCm - T - SR - A - Hbegf - BGHPolyA 载体的构建:将 Hbegf 与 BGHPolyA 基因片段纯化后与 pUCm - T - SR - A 质粒分别酶切再连接,用限制性内切酶 EcoR I 与 Hind III 酶切后,2% 琼脂糖凝胶电泳在 3000bp 与 4000bp 处出现预期条带,证明质粒构建成功,通过测序再次验证连接成功(图 3)。

4. 质粒转染与表达验证:将构建质粒通过转染试剂分别转染细胞 RAW264.7 与 RBL - 2H3,通过 Western blot 法与 QPCR 进行表达鉴定(图 4)。

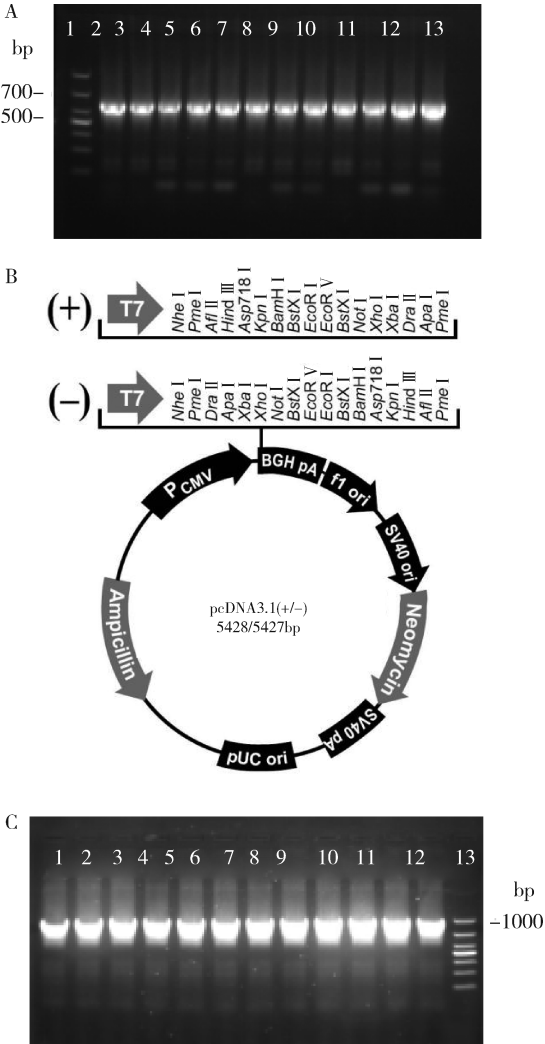


图 2 基因 Hbegf - BGHPolyA 的扩增结果

A. per 扩增目的基因 Hbegf,2 ~ 13 为扩增条带,1 为 DL1000;
B. pcDNA3.1 载体图谱;C. per 扩增带有 BGHPolyA 的基因 Hbegf,1 ~ 12 为扩增条带,13 为 DL1000。

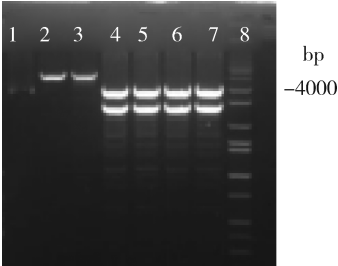


图 3 EcoR/Hind III 酶切鉴定 pUCm - SR - A - Hbegf 结果
限制性内切酶 EcoR I 与 Hind III 酶切构建的 pUCm - T - SR - A - Hbegf - BGHPolyA 载体后电泳结果

讨 论

动脉粥样硬化在世界的发生率逐年增高,严重危害人类的健康。现阶段的很多研究证明,动脉粥样硬

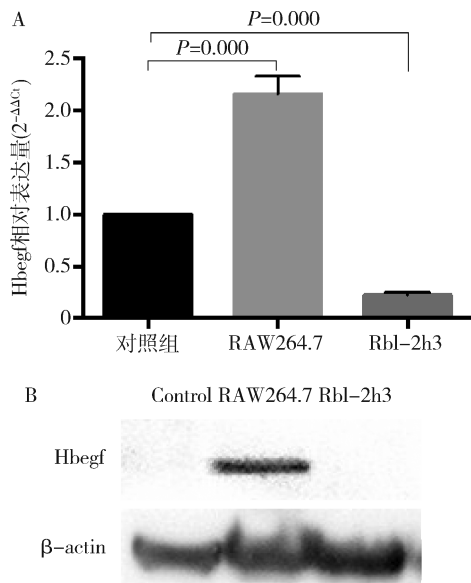


图4 基因Hbegf特异性表达的鉴定结果

A. 通过QPCR验证巨噬细胞RAW264.7转染组白喉毒素受体的表达量明显高于未进行转染的对照组与肥大细胞Rbl-2h3转染组; B. 未进行转染的对照组RAW264.7, 转染组RAW264.7, 转染组肥大细胞Rbl-2h3蛋白表达情况

化是一种慢性炎症反应,其发病机制与很多免疫细胞以及炎症因子的调节失衡相关^[8]。巨噬细胞对凋亡细胞的清理功能即胞葬作用与炎症反应相互影响,是当下的一个研究热点^[9,10]。有研究证明,动脉粥样硬化中该清理功能明显受损,但受损机制还不明了^[11,12]。现阶段多用小鼠建立动脉粥样硬化斑块模型,但是这种模型仍然存在很多问题,很难形成易损斑块,这在很大程度上限制了动脉粥样硬化中与凋亡细胞相关的研究^[13,14]。

本研究通过将巨噬细胞特异性表达的清道夫受体启动子区域核心片段与人类白喉毒素受体基因片段相连接,成功构建具有巨噬细胞特异性的载体,通过转染实现了人类白喉毒素在小鼠巨噬细胞中的特异性表达,为动脉粥样硬化发病机制的研究提供了基础^[15~17]。

参考文献

- 1 Fratelli F, Abrahão - Neto J, Caricati AT, *et al.* An alternative method for purifying and detoxifying diphtheria toxin [J]. *Toxin*, 2011, (57): 1093 - 1100
- 2 李泽鸿, 付玉和, 刘莹, 等. 重组白喉毒素活性的研究进展 [J]. *中国兽药杂志*, 2014, 48(6): 65 - 69

- 3 Saito M, Iwawaki J, Taya C, *et al.* Diphtheria toxin receptor - mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(8): 746 - 750
- 4 陈耀宇, 管晓翔, 王晓花, 等. A类清道夫受体N端第1~27位氨基酸胞浆结构域缺失对功能的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, 13(3): 267 - 270
- 5 Horvai A, Palinski W, Moulton KS, *et al.* Scavenger receptor A gene regulatory elements target gene expression to macrophages and to foam cells of atherosclerotic lesions [J]. *Med Sci*, 1995, 92(12): 5391 - 5395
- 6 Moulton KS, Semple K, Wu H, *et al.* Cell - specific expression of the macrophage scavenger receptor gene is dependent on PU.1 and a composite AP - 1/ets motif [J]. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(7): 4408 - 4418
- 7 Katina W, Glenna LF, David AC, *et al.* Macrophage - specific expression of human lipoprotein lipase accelerates atherosclerosis in transgenic apolipoprotein E knockout mice but not in C57BL/6 mice [J]. *NIH Public Access*, 2001, 21(11): 1809 - 1815
- 8 Peter L. Inflammation in atherosclerosis [J]. *Nature*, 2002, 420(6917): 868 - 874
- 9 R Elliott, Kyle M. Efferocytosis signaling in the regulation of macrophage inflammatory responses [J]. *J Immunol*, 2017, 198(4): 1387 - 1394
- 10 林燕, 何秀娟, 赵京霞, 等. 慢性皮肤溃疡巨噬细胞表型转换与胞葬功能的研究进展 [J]. *基础医学与临床*, 2016, 36(9): 1285 - 1289
- 11 Linten MF, Babaev VR, Huang J, *et al.* Macrophage apoptosis and efferocytosis in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Circulat J*, 2016, 80(11): 2259 - 2268
- 12 Yoko K, Irving LW, Nicholas JL. The role of efferocytosis in atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2017, 135(5): 476 - 489
- 13 Paul C, Roberta B, Stefano B, *et al.* Rupture of the atherosclerotic plaque does a good animal model exist? [J]. *Arterioscler Thromb Vase Bol*, 2003, 23(4): 535 - 542
- 14 王凤, 章怡伟, 刘萍. 动脉粥样硬化动物模型的研究进展 [J]. *东南大学学报: 医学版*, 2014, 33(2): 235 - 238
- 15 Wookwang J, Seong JP, B Kim C. N - propyl gallate suppresses lipopolysaccharide - induced inducible nitric oxide synthase activation through protein kinase C δ - mediated upregulation of heme oxygenase - 1 in RAW264.7 macrophages [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 801: 86 - 94
- 16 Justin P, Elizabeth D, Katarina A, *et al.* Efficient, low - Cost nucleofection of passaged chondrocytes [J]. *Cartilage*, 2016, 7(1): 82 - 91
- 17 Xu YY, Liang WL, Qiu YS, *et al.* Incorporation of a nuclear localization signal in pH responsive LAH4 - L1 peptide enhances transfection and nuclear uptake of plasmid DNA [J]. *Mol Pharmaceut*, 2016, 13(9): 3141 - 3152

(收稿日期: 2018 - 01 - 17)

(修回日期: 2018 - 03 - 01)