论著

文章编号:1000-5404(2005)09-0834-03

HEPC1和HEPC2真核表达载体的构建及其在NIH3T3细胞中的表达

王元忠,周建新,钟小林,廖荣霞 (第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 构建小鼠HEPC1和HEPC2基因的真核表达载体,并观察其分别稳定转染NIH3T3细胞后的表达情况。**方法** 从小鼠肝组织中分离总RNA,采用RT-PCR获得小鼠HEPC1和HEPC2基因全长cDNA,分别将其克隆至真核表达载体pcDNA3上,酶切和测序鉴定后,用脂质体将重组子分别转染至NIH3T3细胞中,G418进行长期筛选,然后用RT-PCR和dot-ELISA检测HEPC1和HEPC2的表达。**结果** RT-PCR获得预期大小的片段,重组子pcDNA3-HEPC1和pcDNA3-HEPC2酶切正确,测序表明HEPC1有1个碱基与GenBank中报告的不同,但其位于密码子的第3位在此不改变编码的氨基酸,HEPC2则完全与GenBank中报道的一致,经RT-PCR和dot-ELISA检测HEPC1和HEPC2在其稳定转染的NIH3T3细胞中均有表达。**结论** 成功构建了小鼠HEPC1和HEPC2基因的真核表达载体,HEPC1和HEPC2在其稳定转染的NIH3T3细胞中获得了表达,为下一步探讨HEPC1和HEPC2的功能及作用机制奠定了基础。

关键词: hepcidin;pcDNA3;NIH3T3细胞;转染;小鼠

中图法分类号: R341.6; R394-33; R394.2 **文献标识码**: A

Construction of eukaryotic expression vectors of mouse HEPC1 and HEPC2 genes and expression in NIH3T3 cells

WANG Yuan-zhong, ZHOU Jian-xin, ZHONG Xiao-lin, LIAO Rong-xia (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct the eukaryotic vectors of mouse HEPC1 and HEPC2 genes and observe their expressions in NIH3T3 cells lines. **Methods** To obtain HEPC1 and HEPC2 complete cDNAs, the total RNA was isolated from liver of mouse and cDNAs were synthesized by RT-PCR. The specific amplification products were cloned into pcDNA3 and then were identified by restriction enzymes digestion and sequencing analysis. The recombinant plasmids pcDNA3-HEPC1 and pcDNA3-HEPC2 were respectively transfected into NIH3T3 cells by lipofectin. The positive clones of the transfected cells were obtained by G418 screening, and their expressions were analyzed by RT-PCR and dot-ELISA. **Results** The expected gene fragments were obtained by RT-PCR. The recombinant plasmids were identified to contain target fragments by restriction enzyme digestion analysis. DNA sequencing showed the sequence of HEPC2 gene had no difference with the GenBank reports while the sequence of HEPC1 gene had a base difference from the GenBank reports, but it did not affect the coded amino acid. The HEPC1 and HEPC2 were successfully expressed in transfected NIH3T3 cells. **Conclusion** Eukaryotic expression vectors pcDNA3-HEPC1 and pcDNA3-HEPC2 were constructed successfully. HEPC1 and HEPC2 were successfully expressed in the transfected NIH3T3 cells, which laid the foundation for further studies on the biological functions of HEPC1 and HEPC2 and their mechanisms.

Key words: hepcidin; pcDNA3; NIH3T3 cell line; transfection; mouse

Hepcidin是近年来发现的由肝细胞分泌的小分子多肽,具有广谱抗菌活性,但后来研究表明其参与铁代谢,是调节铁代谢的重要分子,目前它被认为是调节维持铁稳态极其重要的负激素[1]。实验表明hepcidin具有抑制小肠对铁的吸收和可能促进铁在网状内皮系统中滞留等作用,但其机制都不清楚,到目前为止也还未找到hepcidin的受体。目前越来越多的研究资料表明,其参与或介导血色素沉着病、慢性病贫血等多种铁代谢紊乱性疾病,因此,对hepcidin的功能及其作用机制的研究有重要的理论意义和实用价值。Hepcidin在人和其它动物只有1个基因拷贝,但小鼠7号染色体上有2个拷贝,分别称为HEPC1和HEPC2,它们高度相似,但转基因小鼠实验表明,它们在调节铁代谢功能上有较大差异[2,3]。

作者简介:王元忠(1978-),男,江西省乐平市人,硕士研究生,医师,主要从事铁代谢基础方面的研究。电话:(023)68752263, E-mail: wangyuanzhong@tom.com

通讯作者:周建新,E-mail: turbo40038@yahoo.com

收稿日期:2004-09-27;修回日期:2005-03-22

本研究通过构建 HEPC1 和 HEPC2 真核表达载体，然后用脂质体介导转染到小鼠成纤维细胞系 NIH3T3 中，并实现其表达，为探讨 hepcidin 的功能及作用机制奠定了实验基础。

1　材料与方法

1.1　材料

2 个月龄昆明小鼠（本校实验动物中心），Tripure RNA 分离试剂（Roche 公司），AMV、PCR Taq 酶（Promega 公司），*Eco*R Ⅰ（FBI 公司），*Bam*H Ⅰ、T4 DNA 连接酶（大连宝生物公司），胶回收试剂盒（Omega 公司），Lipofectin（Invitrogen 公司），G418（华美公司），IMDM（Hyclone 公司），兔抗鼠 HEPC 多抗（ADI 公司），HRP-羊抗兔 IgG、DAB 显色剂（北京中山公司）、真核表达载体 pcDNA3、大肠杆菌 DH5α（本教研室保存），NIH3T3 细胞（分子遗传教研室杨晓亚硕士惠赠）。

1.2　方法

1.2.1　引物的设计与合成　　根据 GenBank 中 HEPC1 和 HEPC2 基因序列信息，设计并合成引物 P1（5′-GT GGATCCTGATGGCACTCAGCACTCGGAC-3′）、P2（5′-GC GAATTCTGGCTCTAGGCTATGTTTTGC-3′）和 P3（5′-GC GAATTCAGGCTCTCTATTCTTCACAAC-3′）。P1、P2 用于扩增 HEPC1 全长 cDNA，P1、P3 用于扩增 HEPC2 全长 cDNA（画线部分为 *Bam*H Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ酶切位）。参考文献[2]合成检测 HEPC1 表达的特异引物 P4（5′-CCTATCTCCATCAACAGATG-3′）、P5（5′-AACAGATACCACACTGGGAA-3′）和检测 HEPC2 表达的特异引物 P6（5′-CCTATCTCCAGCAACAGATG-3′）、P7（5′-AACAGA TACC-ACAGGAGGGT-3′）。

1.2.2　总 RNA 的提取　　根据 Tripure 试剂说明书提取小鼠肝组织总 RNA，用紫外分光光度计测 A_{260} 值和 A_{260}/A_{280} 比值，按文献[4]方法进行 RNA 电泳观察提取 RNA 的质量。

1.2.3　RT-PCR 扩增 HEPC1 和 HEPC2 全长 cDNA　　逆转录方法按 AMV 说明书进行，PCR 扩增参数如下：94 ℃，5 min；94 ℃，45 s→55 ℃，45 s→72 ℃，45 s，30 个循环；72 ℃，5 min。

1.2.4　目的片段与载体的基因重组　　将 PCR 产物进行电泳，胶回收试剂盒回收目的片段，回收产物用 *Bam*H Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ双酶切，然后再电泳回收目的片段。载体 pcDNA3 用相同的方法进行双酶切和胶回收。取目的片段和载体按约 5∶1（摩尔比）混合，于 4 ℃过夜连接，分别取 5 μl 连接产物转化大肠杆菌 DH5α，用 Amp^+ 选择培养基培养 12～16 h。

1.2.5　阳性重组子的筛选鉴定和 DNA 测序　　从转化 HEPC1 和 HEPC2 两平板上各挑几个单菌落转入含 Amp^+ 的 LB 培养基管中进行扩增，然后分别取少量菌液进行 PCR 初步筛选阳性克隆。菌落 PCR 阳性的菌液再分别用碱裂解法小量提取质粒 DNA 进行酶切鉴定，并送上海 Sangon 公司测序。

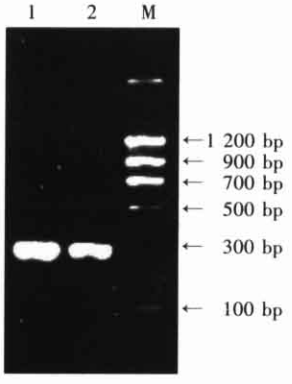
1.2.6　NIH3T3 细胞的稳定转染　　用碱裂解法大量提取重组质粒 DNA，并用 PEG 法进行纯化。转染前 1 天，将对数生长期的 NIH3T3 细胞以 5×10^4/孔接种于 6 孔板，于 24 h 内细胞融合达 40%～70%时进行转染，方法参照 Lipofectin 试剂说明书，每孔分别加 2 μg 质粒与 10 μl Lipofectin，转染 10～12 h 后弃去转染液，加完全培养液继续培养 48 h 至接近融合，按 1∶3 传代并同时给 G418（其终浓度为 500 mg/L）进行筛选，以空载体及不加质粒转染为对照。约 14 d 后可见有阳性克隆形成，继续扩增培养。

1.2.7　RT-PCR 和 dot-ELISA 检测 HEPC1 和 HEPC2 的表达　　收集稳定转染 HEPC1、HEPC2 和空载体的 NIH3T3 细胞的培养上清，及提取细胞总 RNA 行 RT-PCR，PCR 用引物 P4、P5、P6 和 P7，扩增参数同前；采用 dot-ELISA 检测分泌到培养上清中 hepc1 和 hepc2，方法如下：将收集到培养上清真空冷冻干燥，体积浓缩 20 倍，在硝酸纤维膜上点样，用脱脂奶粉进行封闭，加兔抗小鼠 HEPC 多抗过夜反应，然后加二抗 HRP-羊抗兔 IgG 反应 2 h，用 DAB 进行显色。

2　结果

2.1　RT-PCR 扩增结果

RT-PCR 扩增产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳，均可见 1 条特异 DNA 条带，与 HEPC1 和 HEPC2 预期值 280 bp 和 277 bp 大小吻合，见图 1。



M：SD004 marker；1：Complete cDNA of HEPC1；2：Complete cDNA of HEPC2

图 1　RT-PCR 扩增小鼠肝组织 HEPC1 和 HEPC2 基因全长 cDNA

Fig 1　RT-PCR products for HEPC1 and HEPC2 genes

2.2　重组表达质粒的构建及酶切鉴定

所挑取的单菌落培养扩增后，分别取少量的菌液行 PCR，结果均扩出预期大小目的条带。从这些菌落 PCR 鉴定阳性的菌液中各挑 3 管用碱裂解法小量提取质粒 DNA，用 *Bam*H Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ双酶切进行鉴定，结果能切出大小相符的目的片段。

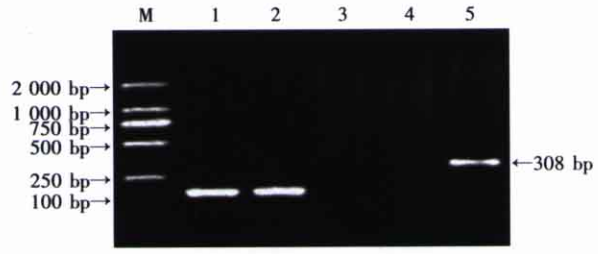
2.3　重组子的序列测定

重组质粒测序结果表明：HEPC1 有 1 个碱基与 GenBank 中报道的不同（测的结果为 C，GenBank 中为 T，其与起始密码子中 A 相隔 49 个碱基），由于正好位于密码子的第 3 位在此并不改变编码的氨基酸，HEPC2 则完全与 GenBank 中报告的一致，序列略。

2.4　稳定转染细胞系表达产物的鉴定

提取稳定转染 HEPC1、HEPC2 和空载体的 NIH3T3 细胞总 RNA，行 RT-PCR，结果显示转染 HEPC1、HEPC2 的 NIH3T3 细胞系均能扩出与预期大小 171 bp 相符的目的片段，而转染空载体的 NIH3T3 细胞则不能扩出，见图 2。

用浓缩的细胞培养上清做 dot-ELISA，结果显示转染重组表达质粒的 NIH3T3 细胞上清中斑点形成比转染空质粒的 NIH3T3 细胞明显（图 3）。上述鉴定结果说明稳定转染重组表达质粒的 NIH3T3 细胞表达 hepc1 和 hepc2 并将其分泌到细胞培养上清中。



M: DL2000; 1: HEPC1 expression in pcDNA3-HEPC1 transfected cells; 2: HEPC2 expression in pcDNA3-HEPC2 transfected cells; 3: HEPC1 expression in pcDNA3 transfected cells; 4: HEPC2 expression in pcDNA3 transfected cells; 5: β-actin expression in pcDNA 3 transfected cells

图2 RT-PCR检测转染细胞中HEPC1和HEPC2基因的表达

Fig 2 RT-PCR analysis of HEPC1 and HEPC2 expressions in transfected cells



1: Culture media of NIH3T3 cells transfected with pcDNA3; 2: NIH3T3 cells transfected with pcDNA3-HEPC1; 3: NIH3T3 cells transfected with pcDNA3-HEPC2

图3 dot-ELISA检测转染细胞培养上清中的hepc1和hepc2

Fig 3 dot-ELISA analysis of hepc1 and hepc2 in the transfected cell culture media

3 讨论

铁代谢一个显著特点是没有可调节的排泄途径，机体主要根据铁需求量和储存水平来调节小肠铁吸收和体内铁循环再利用而实现铁稳态，不过其机制目前还不是很清楚。人们一直推测体内存在一种体液因子，介导如小肠、肝脏、网状内皮系统和骨髓等这些在空间上相隔较远的参与铁吸收、储存和利用的器官之间铁调节信号的传递，从而维持着铁稳态。而近来的研究显示：主要由肝脏合成分泌入血的激素分子 hepcidin 具有根据体内铁需要和储存水平来调节小肠对铁吸收的作用，且 hepcidin 缺陷能导致循环铁和转铁蛋白饱和度升高、铁在实质器官沉积但网状内皮系统铁减少等血色素沉着病的表型[5~7]，而 hepcidin 过量表达机体又产生严重的缺铁(和)或慢性贫血的表现[8~10]。因此，hepcidin 很可能就是人们一直在寻找的调节维持铁稳态的关键分子。由于 hepcidin 调节小肠铁吸收等的机制不是很清楚以及其在很多铁紊乱性疾病中起着重要作用，hepcidin 的功能和其机制的研究也就成为当前铁代谢及相关疾病研究领域中一热点问题。

Hepcidin 是一保守的富含半胱氨酸阳离子小肽，其前体由 80 几个氨基酸组成，包括 3 部分，从 N 端到 C 端依次为信号肽、prodomain 和成熟肽，分泌出细胞外的成熟肽只含 20 几个氨基酸，如 hepc1 和 hepc2 成熟肽都只有 25 氨基酸，但无论在那种动物，其分子内保守位置上都有 8 个半胱氨酸且形成 4 个链内二硫键。由于以上 hepcidin 分子结构的原因，要获得有活性的蛋白如果采用原核表达方式，则不易复性形成正确的构象；尽管化学合成 hepcidin 不难，成本也不高，但其合成后氧化是在空气中进行的，也很难确保形成正确的二硫键。另外，考虑到小鼠的铁代谢与人极为相似以及小鼠是研究铁代谢及相关疾病最好的动物模型，因此，我们采用真核的表达方式，将小鼠 HEPC1 和 HEPC2 基因构建到高效的真核表达载体 pcDNA3 上，并实现其在 NIH3T3 细胞系中稳定表达。由于 hepc1 和 hepc2 成熟肽分子量都只有 3×10^3 左右，其不易进行 SDS-PAGE 电泳，因此用 Western blot 鉴定比较困难，为此我们将浓缩的待鉴定培养上清直接点到硝酸纤维膜上，采用 dot-ELISA 对其进行鉴定。本实验 hepc1 和 hepc2 在其稳定转染的 NIH3T3 细胞中均成功地获得了表达，其为将来获得有活性的目的蛋白和观察其异位表达效应奠定了实验基础，也利于下一步研究它们的功能和作用机制。

参考文献：

[1] Fleming R E, Sly W S. Hepcidin: a putative iron-regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic disease[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(15): 8160 - 8162.

[2] Ilyin G, Courselaud B, Troadec M B, *et al*. Comparative analysis of mouse hepcidin 1 and 2 genes: evidence for different patterns of expression and co-inducibility during iron overload[J]. FEBS Lett, 2003, 542(1-3): 22 - 26.

[3] Lou D Q, Nicolas G, Lesbordes J C, *et al*. Functional differences between hepcidin 1 and 2 in transgenic mice[J]. Blood, 2004, 103(7): 2816 - 2821.

[4] 曹廷兵，叶治家，巩 燕，等. 一种快速鉴定 RNA 质量的方法[J]. 第三军医大学学报，2002，24(8)：992 - 993.

[5] Nicolas G, Viatte L, Bennoun M, *et al*. Hepcidin, a new iron regulatory peptide[J]. Blood Cells Mol Dis, 2002, 29(3): 327 - 335.

[6] Jacolot S, Gac G, Scotet V, *et al*. HAMP as a modifier gene that increases the phenotypic expression of the HFE pC282Y homozygous genotype[J]. Blood, 2004, 103(7): 2835 - 2840.

[7] Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, *et al*. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis[J]. Nat Genet, 2003, 33(1): 21 - 22.

[8] Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, *et al*. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(7): 4596 - 4601.

[9] Ganz T. The role of hepcidin in iron sequistration during infections and in the pathogenesis of anemia of chronic disease[J]. Isr Med Assoc J, 2002, 4(11): 1043 - 1045.

[10] Polito M, Papanikolaou G. Hepcidin: A key iron regulator involved in the pathogenesis of anaemia of chronic disease[J]. Haema, 2004, 7(2): 165 - 174.

(编辑 陈聪连)