文章编号:1000-5404(2005)17-1725-04

论著

小鼠24p3基因真核表达载体的构建及其在NIH3T3细胞中的表达

安江宏,周建新,陈 彬 (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24p3基因真核表达载体并观察其稳定转染的NIH3T3细胞中24p3/SIP24蛋白的表达情况,初步鉴定24p3/SIP24蛋白介导铁向细胞内转运的生物学功能。**方法** RT-PCR自小鼠肺组织中克隆24p3 cDNA。用基因重组技术构建24p3-pcDNA3.0真核表达载体并行酶切和测序鉴定。脂质体DOTAP方法转染NIH3T3细胞,48 h后用G418筛选阳性克隆并培养扩增至21 d。对阳性克隆的培养基上清中24p3/SIP24蛋白的表达用ELISA和Westernblot分析,进一步用原子吸收分光光谱观察其介导铁向NIH3T3细胞内转运的生物学功能。**结果** 成功克隆24p3cDNA并构建24p3-pcDNA3.0真核表达载体,筛选出稳定表达24p3/SIP24蛋白的NIH3T3细胞株,24p3/SIP24蛋白在NIH3T3细胞上清中获得表达,并能介导铁向NIH3T3细胞内转运。**结论** 24p3基因在NIH3T3细胞中获得表达,有良好的生物学活性,为进一步研究24p3/SIP24蛋白介导铁转运的生物学功能及作用机制奠定了基础。

关键词:24p3/SIP24;稳定转染;小鼠NIH3T3细胞
中图法分类号:R394-33;R394.2 **文献标识码**:A

Construction of the eukaryotic expression vector of mouse 24p3 gene and its expression in NIH3T3 cell lines

AN Jiang-hong, ZHOU Jian-xin, CHEN Bin (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct the eukaryotic expression vector of mouse 24p3 gene and express it in NIH3T3 fibroblast cell line and verify its biological function of delivering iron into cells. **Methods** 24p3cDNA was cloned by RT-PCR and the eukaryotic expression vector of mouse 24p3 gene was constructed by gene recombination technique and the recombinant plasmid was verified by restriction enzyme digestion analysis and sequenceing, then transfected into NIH3T3 cells using DOTAP transfection reagent. Then the positive clones were selected and amplified. The expression of 24p3 gene in the culture supernatant of positive clones was analyzed by ELISA and Western blotting and its biological activity of delivering iron into cells was tested by atomic absorption spectrometer. **Results** The eukaryotic expression vector was constructed successfully. The NIH3T3 cells that stably expressed 24p3 were screened out. 24p3/SIP24 protein could express in the culture supernatant of positive clones and deliver iron into NIH3T3 cells. **Conclusion** The 24p3 gene was expressed successfully in the transfected NIH3T3 cells with good biological activity, which laid the foundation for further studying its biological function and mechanism involved in the iron metabolism.

Key words: mouse 24p3 gene; stable transfection; NIH3T3 cell

小鼠24p3/SIP24蛋白是由24p3基因编码的大小约24×10^3的分泌蛋白,在小鼠的肝脏、肺等多种组织中有不同程度的表达,有广泛的生物学功能[1]。2002年Kaplan等[2~4]报道24p3/SIP24蛋白能介导铁向多种细胞内转运,调节铁反应蛋白基因的表达。24p3/SIP2蛋白转铁途径与转铁蛋白(transferrin, Tf)类似但有自身的特点,提示其可能是生物体内独立于转铁蛋白-转铁蛋白受体(transferrin receptor, Tf-R)途径的新的转铁系统。为进一步研究24p3/SIP24蛋白参与介导铁转运的生物学功能和作用机制,以及24p3/SIP24转铁途径与Tf的不同,本研究用脂质体转染的方法筛选并建立了稳定表达有生物活性的目的蛋白的小鼠NIH3T3细胞系。

作者简介:安江宏(1974-),男,贵州省印江县人,硕士,医师,主要从事铁代谢相关分子机制方面的研究。电话:(023)68752263, E-mail: anjh931@yahoo.com.cn
通讯作者:周建新,电话:(023)68752263
收稿日期:2005-02-28;修回日期:2005-07-05

1 材料与方法

1.1 动物、细胞株、菌株及质粒

BALB/c 小鼠由本校实验动物中心提供。DH5α 菌株和小鼠 NIH3T3 成纤维细胞由本教研室保存，pcDNA3.0 质粒由本教研室周度金教授惠赠。

1.2 主要试剂

RNA 提取试剂（Tripure，Invitrogen），AMV 逆转录酶（Promega）；Taq DNA 合成酶、限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ、*Bam*H Ⅰ和 T_4 DNA 连接酶（宝生物大连生物工程公司）；DNA 纯化回收试剂盒（Qiagen）；质粒提取试剂盒（上海博泰生物公司）；DMEM（Hyclone）；新生小牛血清（成都哈里生物技术公司）；DOTAP 脂质体（Roche）；G418（Invitrogen）。抗 SIP24 抗血清（美国爱荷华州州立大学分子生物学系 Marit Nilsen-Hamilton 教授惠赠），酶联免疫吸附（ELISA）检测试剂盒（武汉博士德公司）。其他试剂为国产分析纯试剂。

1.3 RT-PCR 扩增小鼠 24p3cDNA

根据 GenBank 的序列（NM 008491）合成引物（上海生工）。引物 1：5′-GT GGATCC AC ATG GCCCTGAGTGTCATGTG-3′；引物 2：5′-GG GAATTC TCA GTTGTCAATGCATTGGTCG- 3′，引物的 5′端分别引入 *Bam*H Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ酶切位点（带下划线部分分别为 *Bam*H Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ酶切位点，阴影部分为保护碱基，带方框部分分别为起始密码和终止密码）。扩增产物包含了整个编码区，为 614 bp。按 Tripure 说明书自小鼠肺组织中提取总 RNA，紫外分光光度计定量。取 2 μg 总 RNA 按 Promega AMV 逆转录酶说明书提供的方法合成 cDNA。PCR 反应参数：94 ℃ 2 min；94 ℃ 30 s，60 ℃ 30 s，72 ℃ 45 s，共 35 个循环；72 ℃ 5 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳，紫外线透射仪下观察并照象。胶回收法纯化、回收目的片段。

1.4 24p3-pcDNA3.0 重组质粒的构建与鉴定

抽提并纯化 pcDNA3.0 质粒。*Bam*H Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ双酶切 PCR 扩增片段和 pcDNA3.0 质粒，胶回收法纯化、回收后用 T_4 DNA 连接酶进行粘端连接。转化 DH5α 感受态细胞，挑取单菌落，提取质粒 DNA，用 *Bam*H Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ双酶切鉴定后测序。

1.5 细胞培养

NIH3T3 细胞用 DMEM 培养基于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养，DMEM 培养基含 10% 新生小牛血清，青霉素和链霉素浓度皆为 100 U/ml。

1.6 脂质体法转染 NIH3T3 细胞及阳性克隆的筛选

采用 Roche 公司的脂质体转染技术（参见试剂说明书）。NIH3T3 细胞培养至对数生长期后接种 6 孔板，2×10^5/孔，继续培养至 60% ~80% 满底。质粒表达组取纯化的 24p3-pcDNA3.0 重组质粒 5 μg 溶于适量的 HBS buffer 中，得到 A 液 25 μl。取 15 μl DOTAP 脂质体加于 35 μl 无血清培养基中，得到 B 液 50 μl。将 A、B 液混匀，室温放置 15 min 后加入 1 ml 完全培养基，轻轻混匀，滴入 6 孔板中培养 5 h。弃液，加 2 ml 完全培养液继续培养。待细胞生长至接近融合时，并按 1∶3 的密度传代。继续培养细胞至密度达 50% ~70%。弃培养液，更换含 600 μg/L G418 的培养液进行筛选，每 3 天换液 1 次。设空载体组（转染 pcDNA3.0 空载体）和未转染组（未转染质粒的正常细胞）作为对照。14 d 后，表达质粒组和空载体组可见有阳性克隆形成，阴性细胞组全部死亡，继续培养筛选扩增至 21 d 挑取阳性克隆并扩大培养、冻存。

1.7 24p3 基因表达产物的鉴定

1.7.1 RT-PCR 检测 NIH3T3 细胞中 24p3 mRNA 的表达

分别取质粒表达组、空载体组和未转染组各 1×10^7 细胞用 RT-PCR 检测 24p3 mRNA 的表达，方法、试剂及引物同前。

1.7.2 NIH3T3 细胞培养液上清中表达产物的酶联免疫吸附试验（ELISA）分析

收集质粒表达组、空载体组及未转染组细胞的培养液上清，按 1∶1 与包被液混匀后取 100 μl/孔加样，每组 12 孔。4 ℃过夜包被酶标板后 PBST 洗板 3 次。按下列顺序加样并用相同的条件孵育、洗板（37 ℃孵育 1 h，PBST 洗板 3 次）：满孔的 2% ~4% 脱脂奶粉封闭；兔抗鼠 SIP24 抗血清 100 μl/孔，稀释度为 1∶2 000；生物素化的山羊抗兔 IgG 100 μl/孔，稀释度为 1∶2 000；链霉亲和素-HRP 100 μl/孔，稀释度为 1∶2 000；最后用底物邻苯二胺（OPD）—柠檬酸盐缓冲液避光显色 10 min，加入 2 mol/L H_2SO_4 100 μl/孔，终止反应，490 nm 处酶标仪检测 D(490)。设空白对照，各组减去空白对照后取均值进行分析。

1.7.3 NIH3T3 细胞及培养液上清中表达产物的 Western blotting 鉴定

分别收集质粒表达组、空载体组及未转染组 NIH3T3 细胞培养液上清。并用真空冷冻干燥浓缩至 1/3 体积，用紫外分光光度计定量后取 60 μg 总蛋白用 15% 的分离胶和 5% 的浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳，完毕后电转印（15 V，1 mA，50 min）至硝酸纤维素膜，加封闭液（5% 脱脂奶粉，0.05% Tween-20，TBS 溶解）封闭 4 h，加封闭液 1∶500 稀释的抗 SIP24 抗血清37 ℃孵育 1 h，4 ℃过夜后，用含 0.05% Tween-20 的 TBS 洗膜 3 min×5 min；加稀释 1∶1 000 的生物素化山羊抗兔 IgG 37 ℃孵育 2 h，用含 0.05% Tween-20 的 TBS 洗膜 3 min×5 min；加稀释 1∶1 000 的链霉亲和素-HRP 37 ℃孵育 2 h，用含 0.05% Tween-20 的 TBS 洗膜 3 min×5 min，再用 TBS 洗膜 5 min，最后用 DAB 显色直至洗出清晰条带，结果扫描存盘。

1.8 铁盐的选择

选用柠檬酸铁（Fe-cit）作为铁离子供给剂，以正常小鼠血清铁[5]（20 μmol/L）为准，分别增加培养基中铁离子浓度为正常血清铁浓度的 5、10 和 100 倍（分别为 100、200、2 000 μmol/L），建立不同铁浓度的细胞培养环境，以排除不同铁浓度对细胞内铁含量的影响[6]。

1.9 表达产物生物学活性的鉴定

将表达质粒组、空载体组及未转染组 NIH3T3 细胞接种于 50 ml 培养瓶中（5×10^5/瓶）。24 h 后，弃培养液，加入含不同浓度的柠檬酸铁的新的培养基培养。48 h 后，收集各组细胞 PBS 洗涤后细胞沉淀中加入冰冷的细胞裂解液 500 μl，振荡混匀，冰浴 10 min；4 ℃ 10 000 r/min 离心 20 min。收集上清，用原子吸收分光光谱检测铁含量（本校西南医院检验科）。各组细胞均平行做 3 份，每份 5×10^6 细胞，重复 3 次。

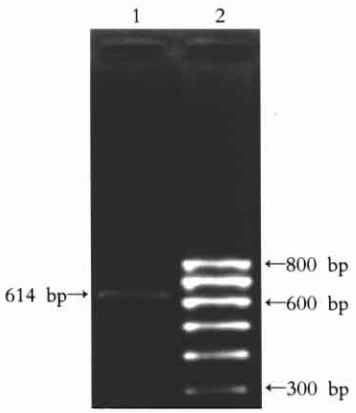
1.10 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 SPSS 12.0 程序包进行双因素方差分析。

2　结果

2.1　24p3 基因 PCR 扩增结果

PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳显示大小约为 614 bp 的特异性扩增条带，同预期结果相符（图 1）。



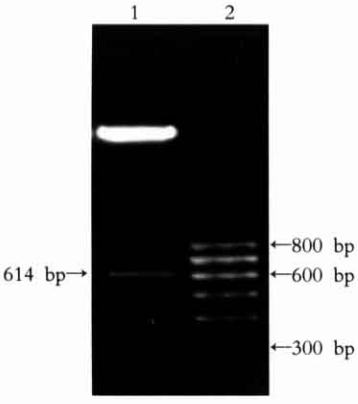
1：PCR product；2：SD003 DNA marker

图 1　PCR 扩增结果

Fig 1　Analysis of PCR product

2.2　24p3-pcDNA3.0 重组质粒的双酶切鉴定

用 *Eco*R Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切鉴定阳性克隆质粒结果如图，可见到 614 bp 左右的条带（图 2）。BGH 和 T7 测序引物进行双向测序（上海基康公司），测序结果与 GenBank 序列（NM 008491）完全一致。



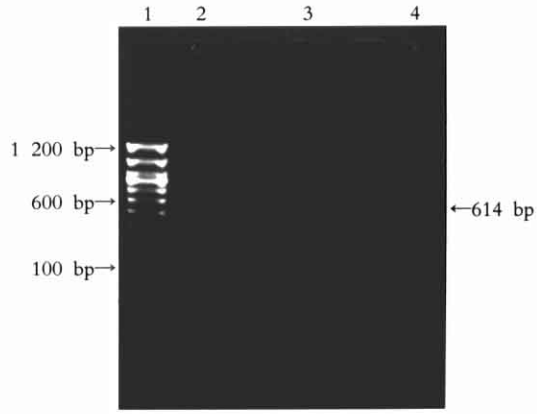
1：24p3-pcDNA3.0 digested with *Bam*H Ⅰ and *Eco*R Ⅰ；2：SD003 DNA marker

图 2　重组质粒 24p3-pcDNA3.0 的双酶切鉴定

Fig 2　Restriction enzyme digestion analysis of recombinant plasmid 24p3-pcDNA3.0

2.3　24p3 基因表达产物的鉴定

2.3.1　24p3 基因表达产物的 RT-PCR 分析结果　　扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中显示，质粒表达组扩增出约 614 bp 的 DNA 带，而对照组和空质粒组未扩增出 DNA 带，结果见图 3。



1：DNA marker；2：plasmid；3：blank vector；4：untransfected

图 3　RT-PCR 检测质粒表达组、空载体组和未转染组细胞中 24p3 mRNA 的表达

Fig 3　Analysis of PCR product in plasmid-expressed group and vector group and untransfected group

2.3.2　24p3 基因表达产物的 ELISA 分析结果　　质粒表达组细胞培养上清其 *D*(490) 均值为 (0.487 ± 0.007)，空载体组及未转染组 *D*490 分别为 (0.057 ± 0.003) 和 (0.042 ± 0.005)。质粒表达组与对照间有明显差异 (P/N > 2)。

2.3.3　24p3 基因表达产物的 Western blotting 分析结果　　质粒表达组 NIH3T3 细胞裂解物和细胞培养上清液经 Western blotting 分析，发现有一分子质量约为 24×10^3 大小的特异性条带，而空载体组及未转染组 NIH3T3 细胞裂解物和细胞培养上清液中，未见相应条带（图 4）。



1：plasmid；2：blank vector；3：untransfected

图 4　Westernblot 检测质粒表达组、空载体组和未转染组 NIH3T3 细胞上清中 24p3 蛋白的表达

Fig 4　Analysis of 24p3 protein in NIH3T3 cell of plasmid-expressed group and vector group and untransfected group

2.4　原子吸收分光光谱检测 NIH3T3 细胞内铁含量的变化及统计学分析

采用 SPSS 程序包双因素方差分析，在铁负荷过重情况下

(100 μmol/L 铁剂组、200 μmol/L 铁剂组、2 000 μmol/L 铁剂组),细胞内铁含比正常铁剂组(20 μmol/L 铁剂组)增加了 1.2~2.5 倍,但增加量除 2 000 μmol/L 铁剂组外无显著性差异($P>0.05$)。除 20 μmol/L 铁剂外,不同铁剂浓度下的表达质粒组与未转染组、空载体组间有显著差异,而未转染组与空载体组间无显著性差异($P>0.05$),见表 1。

表 1 不同浓度的铁剂环境下各组细胞内铁含量的变化($n=9$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of cytosolic iron content in different groups cultured with different iron concentration ($n=9$, $\bar{x}\pm s$)

Iron	Cytosolic iron content(μg/10^6 cell)		
	Untransfected group	Blank vector group	Plasmid transfected Group
20 μmol/L	0.45 ± 0.04	0.38 ± 0.06	0.60 ± 0.08
100 μmol/L	0.55 ± 0.06	0.60 ± 0.03	0.81 ± 0.02 **
200 μmol/L	0.65 ± 0.07	0.70 ± 0.02	1.09 ± 0.06 *
2 000 μmol/L	0.73 ± 0.01 △	0.78 ± 0.06 △	1.56 ± 0.04 **△

△: $P<0.05$, *vs* 20 μmol/L iron group; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* untransfected group and blank vector group

3 讨论

转铁蛋白(transferrin, Tf)是许多细胞获取可利用铁的主要来源,并通过介导铁的转运间接调节铁反应基因的表达,参与生物体内广泛的生理过程。但基础研究和临床观察提示生物体内可能存在另一转铁途径。24p3/SIP24 蛋白是一种大小约 24×10^3 的分泌蛋白,有多样的生物学功能,如 24p3/SIP24 蛋白能特异地介导白细胞的凋亡[7]。NGAL(neutrophil gelatinase-associated lipocalin)蛋白最先发现于人的中性粒细胞[8],与小鼠 24p3/SIP24 蛋白有很高的同源性,都是 Lipocalin 的成员,有相似的生物学功能。2002 年 Kaplan 等[2~4]报道 24p3/NGAL 在多种细胞系中能介导铁向细胞内转运,并调节铁反应蛋白基因的表达,24p3/NGAL 转铁途径与 Tf 类似但有自身的特点,为不同发育时期的生物体所必需,提示其为生物体内独立于 Tf 的铁转运途径。

为进一步研究 24p3 基因介导铁转运的生物学功能,本实验筛选并建立了稳定表达 SIP24/24p3 蛋白的 NIH3T3 细胞系。首先成功地自小鼠肺组织克隆了 24p3 cDNA 并构建含该基因全编码序列的 24p3-pcDNA3.0 真核表达载体,经测序证实其与 GenBank 序列完全一致。用脂质体转染的方法介导 24p3-pcDNA3.0 载体转染 NIH3T3 细胞并用 G418 筛选阳性克隆。RT-PCR 检测结果表明 NIH3T3 细胞中有 24p3 mRNA 的转录,ELISA 和 Western blotting 分析结果表明 SIP24/24p3 蛋白在阳性克隆的培养基上清中获得表达并分泌入细胞上清中。在去除不同浓度的铁剂对细胞内铁含量的影响后,原子吸收分光光度计检测表明质粒表达组与未转染组、空载体组间细胞内铁的含量有显著的差异,初步鉴定 SIP24/24p3 蛋白介导铁转运的生物学活性,为深入研究其介导铁转运、参与铁稳态调节的生物学功能和作用机制及其与转铁蛋白途径的异同奠定了基础。

24p3 在小鼠肝、肺等多种组织中有不同程度的表达,其表达也与不同的发育时期有关[9]。肝脏是铁的贮存和调节铁稳态的主要脏器,又是铁代谢紊乱相关疾病受累的主要脏器。为此,我们推测 SIP24/24p3 蛋白可能参与了小鼠肝细胞内铁稳态的调节,但目前相关文献报道较少。此外,深入研究小鼠 24p3/SIP24 蛋白介导铁的转运的生物学功能可为临床铁代谢相关疾病的发生机制的研究提供线索。慢性病贫血(anemia of chronic disease, ACD)是继发于细菌感染、肿瘤等疾病的贫血,表现为血清铁明显降低,血清铁结合力下降,Tf-R 水平下降,而铁蛋白明显增加。共同的发病机制除了慢性失血、骨髓反应性降低、红细胞破坏增多外,血清铁剧降致红细胞生成障碍 ACD 发生、发展的主要机制。是否 24p3/NGAL 可能通过干扰 Tf 转铁途径参与了 ACD 及其它铁代谢相关疾病的发生发展是我们关注的重点。

参考文献:

[1] Liu Q, Nilsen Hamilton M. Identification of a new acute phase protein [J]. J Biol Chem, 1995, 270(38): 22565-22570.

[2] Kaplan J. Mechanisms of cellular iron acquisition: another iron in the fire [J]. Cell, 2002, 111(5): 603-606.

[3] Yang J, Goetz D, Li J Y, *et al*. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin [J]. Mol Cell, 2002, 10(5): 1045-1056.

[4] Goetz D H, Holmes M A, Borregaard N, *et al*. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition[J]. Mol Cell, 2002, 10(5): 1033-1043.

[5] Landschulz W, Thesleff I, Ekblom P. A lipophilic iron chelator can replace transferrin as a stimulator of cell proliferation and differentiation [J]. J Cell Biol, 1984, 98(2): 596-601.

[6] 官 军, 杨家驹. 铁负荷过重对淋巴细胞转铁蛋白受体表达的影响[J]. 营养学报, 1996, 18(3): 313-316.

[7] Devireddy L R, Teodoro J G, Richard F A, *et al*. Induction of apoptosis by a secreted lipocalin that is transcriptionally regulated by IL-3 deprivation [J]. Science, 2001, 293(5531): 829-834.

[8] Kjeldsen L, Johnsen A H, Sengelov H, *et al*. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase [J]. J Biol Chem, 1993, 268(14): 10425-10432.

[9] Garay Rojas E, Harper M, Hraba Renevey S, *et al*. An apparent autocrine mechanism amplifies the dexamethasone- and retinoic acid-induced expression of mouse lipocalin-encoding gene 24p3 [J]. Gene, 1996, 170(2): 173-180.

(编辑 陈聪连)