论著

文章编号:1000-5404(2007)17-1650-04

修饰GLP2分泌性表达载体的构建及促增殖活性测定的实验研究

谭 虎[1],杨天德[2],粟永萍[1],艾国平[1],黄 岚[3],陶 军[2],刘晓宏[1],楼淑芬[1] (第三军医大学:[1]军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038,[2]新桥医院麻醉科,[3]新桥医院全军心血管病研究所,重庆 400037)

提 要:目的 对胰高血糖素样肽-2(glucagon-like peptid-2, GLP-2)进行基因修饰,观察其促细胞增殖活性。**方法** 通过RT-PCR方法获得含GLP2编码序列的高血糖素原cDNA片段;通过PCR重叠延伸技术得到GLP2信号肽及成熟肽的嵌合分子,并将编码GLP2成熟肽N-末端第二位丙氨酸的序列(GCT)突变为编码甘氨酸的序列(GGT);将其插入真核表达质粒pVITRO3,转染至肠上皮细胞(Caco-2),观察其对细胞增殖活性的影响。**结果** 克隆的修饰GLP2基因与国外报道的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列完全一致,并成功拼接GLP2的信号肽及成熟肽;且加入pVITRO3-GLP2-Caco-2培养上清的细胞生长明显快于对照组。**结论** PCR重叠延伸技术适用于分泌性载体构建。构建的修饰GLP2表达系统所表达的蛋白具有促进肠上皮细胞增殖的作用。

关键词: 胰高血糖素样肽-2;基因克隆;PCR重叠延伸技术;肠上皮;细胞增殖
中图法分类号: R329.25; R394-33; R394.2 **文献标识码:** A

Construction of secretary expression vector of mutation chimeric GLP2 and detection of its proliferation-promoting activity

TAN Hu[1], YANG Tian-de[2], SU Yong-ping[1], AI Guo-ping[1], HUANG Lan[3], TAO Jun[2], LIU Xiao-hong[1], LOU Shu-fen[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Chongqing 400038, [2]Department of Anesthesiology, [3]Department of Cardiovascular Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To construct the secretary expression vector of mutation chimeric GLP2 by clone technology and detect its effect on cell proliferation. **Methods** The proglucagon cDNA was generated by the reverse transcription. The PCR product of signal and mature peptides of GLP2 was linked by SOE (splicing by overlap extension) and the gene, which coded the second amino acid in the N-terminal of GLP2, was mutated from GCT to GGT by PCR. Then the chimeric GLP2 cDNA was cloned into pVITRO3 vector and the recombinant plasmid was transfected to Caco-2. The cell proliferation was detected by MTT. **Results** The sequences of signal peptide and mature peptide of GLP2 were connected successfully and the mature peptide sequence was mutated. MTT and ^{3}H-TdR showed that rGLP2 could accelerate the proliferation of Caco-2 cell significantly. **Conclusion** SOE is appropriate in establishing secretion type of expression vector and the secretary expression vector of mutation chimeric GLP2 has accelerating effect on cell proliferation.

Key words: glucagon-like peptid-2; gene clone; splicing by overlap extension; intestine epithelium; cell proliferation

胰高血糖素样肽2(glucagon-like peptid-2,GLP2)为肠内分泌激素,具有促进肠上皮增殖[1-3]和功能分化[4]的作用,且受体特异分布于肠道[5],适用于肠上皮细胞生长的特异性调节[6],是治疗肠源性感染等多种疾病较理想的多肽生长因子[7,8]。但其易被二酰肽肽酶(dipeptidyl peptidase Ⅳ,DPP-Ⅳ)酶解[9],若将其第2位丙氨酸突变为甘氨酸,则能抵抗DPP-Ⅳ的酶解,并增强其生物学活性[10]。本研究旨在利用PCR重叠延伸技术构建GLP2分泌性表达载体,并对其第2

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30230360);国家自然科学基金面上项目(30470527);创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室开放课题(2003)
Supported the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (30230360), the General Program of the National Natural Science Foundation of China (30470527) and the Open Projects of State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury (2003)
作者简介: 谭 虎(1975-),男,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事战创伤机制及防治方面的研究,现在第三军医大学新桥医院麻醉科。电话:(023)68774682, E-mail:tigertmmu@yahoo.com.cn
通讯作者: 艾国平,电话:(023)68753660,E-mail:aigping@yahoo.com.cn
收稿日期: 2007-01-08;**修回日期:** 2007-05-18

位氨基酸进行突变,初步观察其促细胞增殖活性,为进一步研究其用于肠道疾病治疗打下理论和实验基础。

1　材料与方法

1.1　质粒、菌株和细胞株

PUC18-T 载体购自大连宝生物公司,pVITRO3 购自 Invivogen 公司(带有潮霉素 B 抗性),工程菌 JM109 为本所保存,Caco-2 细胞株购自上海中科院细胞库。

1.2　主要试剂

DEPC 购自 Sigma 公司, RNA 提取纯化试剂、小量胶回收试剂盒、脂质体及潮霉素 B 购自 Roche 公司,RT-PCR 试剂盒(两步法)、PCR 试剂盒(含 Pyrobest 高保真酶)、限制性内切酶 Xba Ⅰ、*Stu* Ⅰ、*Cla* Ⅰ、*Sal* Ⅰ、T_4 DNA 连接酶购自大连宝生物公司,小量质粒纯化试剂盒购自 Promega 公司;MTT 试剂购于北京原平皓生物技术公司;^{3}H-TdR 购自中科院原子核研究所。

1.3　引物

参照 GenBank 提供的高血糖素原(proglucagon, PG)及 GLP2 cDNA 序列,设计 3 对引物。引物 P_1、P_2 扩增 PG cDNA,带有酶切位点 *Xba* Ⅰ、*Sal* Ⅰ;引物 P_3、P_4 扩增 GLP2 信号肽,带有酶切位点 *Stu* Ⅰ;引物 P_5、P_6 增 GLP2 成熟肽,带有酶切位点 *Cla* Ⅰ;其中 P_4 有部分序列(下划线部分)与 P_5/P_6 扩增产物互补,P_5 有部分序列(下划线部分)与 P_3/P_4 扩增产物互补;同时,我们还将 GLP2 成熟肽第 2 位氨基酸编码序列突变为 GGT(见 P_4、P_5 划框部分)。引物由北京赛百盛公司合成:

P_1:5′-CGCTCTAGAGGCCTCACATCAAAAGTTCCCAAA-3′;

P_2:5′-CGTGTCGACAACATTTCAAACATCCCAC-3′;

P_3:5′-CGCAGGCCTATGAAAAGCATTTACTTTGT-3′;

P_4:5′-ACCATC ACC ATGTTGCCAGCTGCCTTGTA-3′;

P_5:5′-CAGCTGGCAACAT GGT GATGGTTCTTTCT-3′;

P_6:5′-CGCATCGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAA-GTTATTCAGTCAGTGATTTTGGTCTGAAT-3′。

1.4　RT-PCR

获取高血糖素原 cDNA 取癫痫患者切除的脑组织,按照总 RNA 提取试剂盒操作说明抽提总 RNA。以提取的总 RNA 为模板,先用 Oligo dT 进行反转录合成 cDNA,反转录条件为 30 ℃ 10 min, 50 ℃ 30 min, 99 ℃ 5 min。再以设计的引物 P_1、P_2 进行 PCR 扩增,循环条件为 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min 30 s,共 31 个循环。

1.5　PCR 重叠延伸(splicing by overlap extension, SOE)扩增 GLP2 分泌性嵌合分子

胶回收上述 PCR 产物,以此为模板,采用 P_3、P_4 扩增 GLP2 信号肽为模板 1,采用 P_5、P_6 扩增修饰 GLP2 成熟肽为模板 2;循环条件为 94 ℃30 s,55.4 ℃(P_3/P_4)或 58.1 ℃(P_5/P_6) 30 s, 72 ℃ 1 min,共 31 个循环;胶回收后,等摩尔比混合模板 1、模板 2 成为模板 3;以模板 3 为模板,P_3、P_6 为引物,扩增 GLP2 修饰成熟肽与信号肽的嵌合分子;SOE 反应条件为 94 ℃30 s, 55.4 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,共 31 个循环。

1.6　表达载体 pVITRO3-GLP2 构建和序列分析

胶回收 PCR 产物,克隆入 PUC18-T 载体,即 PUC18-T-GLP2。送上海生工生物工程公司进行测序鉴定。*Stu* Ⅰ 和 *Cla* Ⅰ 双酶切 PUC18-T-GLP2 和真核表达载体 pVITRO3,将酶切产物在 T_4 DNA 连接酶作用下进行连接并转化大肠杆菌 JM109 感受态细菌,铺在加潮霉素 B 的 LB 平板上,37 ℃生长过夜。挑取阳性克隆扩增培养,收集菌体,按照常规方法小量抽提质粒,重组质粒以 *Stu* Ⅰ 和 *Cla* Ⅰ 双酶切鉴定。

1.7　细胞培养、重组质粒转染及培养上清收集

Caco-2 细胞的培养基:1640 + 10% 新生牛血清,100 IU/ml 青霉素,100 μg/ml 链霉素。采用脂质体转染法转染细胞。取对数生长期的 Caco-2 细胞,经胰酶消化制备分散的单个细胞悬液,取 2×10^5 个 Caco-2 细胞重悬于 2 ml 完全培养基,转种至 6 孔板;48 h 后弃细胞培养液;取 2 μg 质粒按操作说明配制质粒脂质体混合物,置室温 15 min;加入 1.8 ml 无血清培养基,混匀后滴加至 Caco-2 细胞上;12 h 后加入 2.0 ml 含 10% 新生牛血清、200 μg/ml 潮霉素 B 的 1640 培养液进行筛选;适时换液,至细胞克隆产生,命名为 Caco-2-pVITRO3-GLP2。同时以 pVITRO3 空质粒为对照,命名为 Caco-2-pVITRO3。挑取细胞克隆,加入含 50 μg/ml 潮霉素 B、不含青霉素和链霉素的 1640 培养液继续培养至细胞汇片,收集培养上清。

1.8　培养上清促增殖活性检测

分别采用 MTT 法和 ^{3}H-TdR 掺入法。将 1×10^2 个 Caco-2-pVITRO3 接种于 96 孔板,加入含 50 μg/ml 潮霉素 B,待细胞贴壁后(12 h)换用收集的培养上清,处理组为 Caco-2- pVITRO3-GLP2 培养上清,对照组为 Caco-2- pVITRO3 培养上清;12 h 后采用 MTT 法测定其细胞存活率或 ^{3}H-TdR 掺入法测定 DNA 合成。此后每 24 小时测定 1 次,并用 MTT 法测定的细胞存活率绘制细胞生长曲线。

1.9　统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件包进行单因素方差分析。

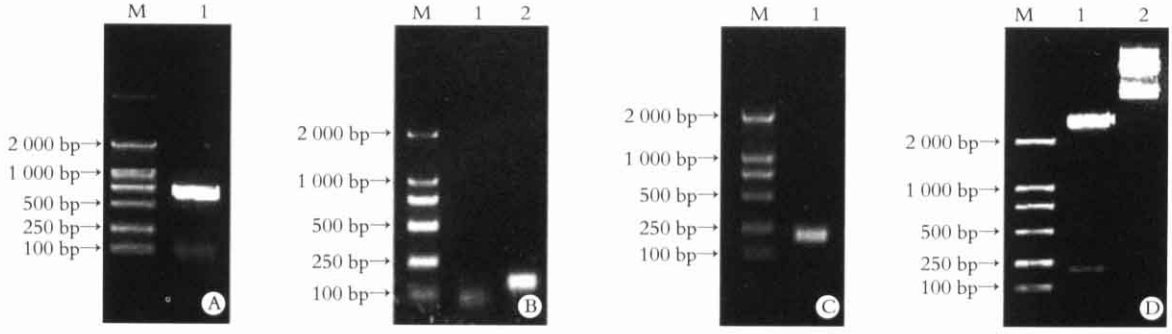
2　结果

2.1　RT-PCR 及 PCR 扩增产物鉴定

电泳鉴定显示高血糖素原 cDNA 扩增产物约为 687 bp,GLP2 信号肽扩增产物约为 81 bp,GLP2 成熟肽扩增产物约为 153 bp,采用 SOE 得到的 GLP2 成熟肽与信号肽的嵌合分子约为 212 bp(图 1)。

2.2　表达载体的构建及酶切鉴定

将长度为 212 bp 的 GLP2 成熟肽与信号肽的嵌合分子与表达载体 pVITRO3 连接,阳性的重组子质粒以 *Stu* Ⅰ 和 *Cla* Ⅰ 双酶切后电泳,切除约 212 bp 条带(图 1),初步证实表达载体构建成功。



A:高血糖素原 RT-PCR 产物 1:高血糖素原 cDNA;M:DNA 标准(DL 2000);B:SOE 第一步 PCR 产物 1:GLP2 信号肽;2:GLP2 成熟肽;C:SOE 第 2 步 PCR 产物 1:GLP2 信号肽与成熟肽连接产物;D:酶切鉴定 1:重组质粒 *Stu* Ⅰ及 *Cla* Ⅰ酶切鉴定;2:重组质粒

图1 RT-PCR、PCR 产物及酶切鉴定电泳图

2.3 序列测定

全自动 DNA 序列分析仪分析鉴定重组质粒,所读序列经测序结果分析软件分析证明,阅读框完整,连接部位正确。且 GLP2 的信号肽与标准序列中编码 GLP2 信号肽的序列完全一致(100%);成熟肽第 2 位氨基酸编码序列由 G C T 突变为 G G T,其余序列与标准序列完全一致(图 2),即成功构建修饰 GLP2 分泌性表达载体。AGGCCT 和ATCGAT 为酶切位点;G 为突变碱基,ATG 为起始密码,TGA 为终止密码。序列如下:

AGGCCT ATG AAAAGCATTTACTTTGTGGCTGGATTATTT-GTAATGCTGGTACAAGGCAGCTGGCAA←信号肽

CATG G TGATGGTTCTTTCTCTGATGAGATGAACACCATT-CTTGATAATCTTGCCGCCAGGGACTTTATAAACTGGTTGATTCA-GACCAAAATCACTGAC TGA ATAACTTCGTATAGCATACAT-TATACGAAGTTATCGAT←成熟肽

2.4 [2]Gly-GLP2 促 Caco2 增殖活性检测

为了观察[2]Gly-GLP2 促肠上皮增殖活性,我们选用 GLP2 有促增殖效应的 Caco-2 细胞,为排除收集培养液中含有的潮霉素 B 对细胞生长的影响,我们选用稳定转染有 pVITRO3 空质粒的 Caco-2- pVITRO3 细胞为待检测细胞。MTT 结果显示,含[2]Gly-GLP2 的 Caco2- pVITRO3-GLP2 培养液能显著 Caco2 存活细胞数。在第 6 天,其细胞数已接近对照组两倍(图 2)。

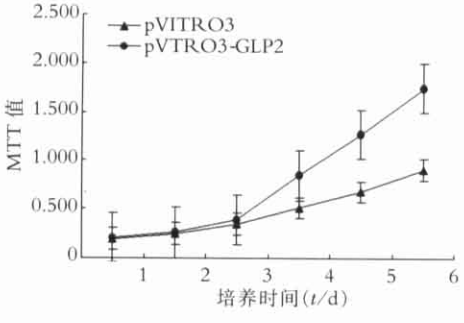


图2 Caco-2 细胞生长曲线

^{3}H-TdR 掺入实验结果(表 1)表明,与对照组相比,含[2]Gly-GLP2 的 Caco2- pVITRO3-GLP2 培养液能显著增加 Caco2 DNA 合成,以第 3、4、5、6 天差异显著($P<0.05$),说明 Caco2 存活细胞数增加是[2]Gly-GLP2 促增殖的结果。

表1 不同处理时间后 Caco-2 细胞^{3}H-TdR 掺入率的变化(cpm, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
pV	510 ± 21	643 ± 33	886 ± 24	1 411 ± 26	1 697 ± 18	2 315 ± 26
pV-G	522 ± 30	654 ± 23	989 ± 29[a]	2 136 ± 17[a]	3 403 ± 32[a]	4 368 ± 28[a]

pV 为 Caco2- pVITRO3 培养上清;pV-G 为 Caco2- pVITRO3-GLP2 培养上清 a:$P<0.05$,与 pV 比较

3 讨论

3.1 GLP2 的定点突变

胰高血糖素样肽 2(GLP2)是多肽生长因子,是肠上皮细胞较为特异的生长因子,但其易于被消化道的二酰肽肽酶(dipeptidyl peptidase Ⅳ,DPP-Ⅳ)从 N-末端第 2 位丙氨酸处酶切形成 31 个氨基酸的 GLP2 而失去生物学活性,31 个氨基酸的 GLP2 还能与 GLP2 受体竞争结合,拮抗 33 个氨基酸 GLP2 生物学功能的发挥。若将 GLP2 第 2 位的丙氨酸突变为甘氨酸,则能抵抗 DPP-Ⅳ的酶解作用,并且还可增强 GLP2 的生物学活性[10]。

由于需突变的位点靠近目的片段 5′,我们采用了 PCR 进行点突变。即在引物设计时将需突变的位点人为地加入引物中,见设计的引物 P_4、P_5(方框标识)。通过 PCR 即可将突变位点带入 PCR 产物中。测序结果显示,本实验已成功地通过 PCR 方法将成熟肽第 2 位氨基酸编码序列突变为 GGT。

3.2 GLP2 分泌肽和成熟肽嵌合分子克隆策略

GLP2 是高血糖素原基因在肠上皮组织中由 L 内分泌细胞表达翻译并进一步处理加工而形成的特异产

物,它位于高血糖素原羧基末端,与其信号肽之间尚有胰高血糖素、胰高血糖素样肽 1(GLP-1)等多肽序列[11],故用于体内基因治疗时尚需切除这部分多肽编码序列,使其信号肽与成熟肽编码序列直接相连,避免基因治疗时产生其它多肽而带来副作用。

我们采用了 PCR 重叠延伸技术,成功拼接了 GLP2 的信号肽和成熟肽。该技术又称重叠延伸剪接术(splicing by overlap extension,SOE),它是基于 PCR 技术,不需要引入酶切位点,而通过 PCR 重叠延伸将不同的 DNA 片段进行连接的一种操作简便、快速、准确的基因重组技术[12]。我们针对 SOE 引物设计的要求,在引物中引入 overlap,不需要在每条引物中都引入 overlap,我们只在引物 4 和引物 5 的 5′端引入了 overlap。首先分别扩增 2 个目的 DNA 片段,然后,第一个片段的上游引物 3 和第 2 个片段的下游引物 6,将 2 段 cDNA 通过 PCR 进行融合为嵌合分子 cDNA,获得了特异性较高、扩增效率亦高的 PCR 产物。本实验采用 pVITRO3 载体,因为嵌合分子的两端引入了 *Stu*I 和 *Cla*I 限制性酶切位点,所以可以将载体和嵌合 cDNA 双酶切回收后进行定向连接,根据载体的潮霉素 B 基因筛选标记,较快地筛选阳性重组子,酶切位点的引入方便了 PCR 产物克隆的酶切鉴定,测序结果与已知序列相比较显示;无论是从引物合成还是扩增产物均正确无误。

3.3　[2]Gly-GLP2 促肠上皮增殖活性检测

目前国内外检测肠上皮组织或循环血液中 GLP2 含量的方法主要是先采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography,HPLC)分离纯化 GLP2,再结合放射免疫分析方法进行测定[13]。直接采用 HPLC 方法检测 GLP2 含量有很大困难,因为循环血液中的 GLP2 含量极低(pg/ml),达不到 HPLC 能检测到的最低极限(ng/ml)。我们以 Caco-2 细胞为靶细胞,应用体外实验方法直接证明了转染[2]Gly-GLP2 基因的 Caco 细胞增殖活性明显增加,提示培养的上清中有[2]Gly-GLP2 蛋白分泌。

参考文献:

[1] Chance W T, Sheriff S, Dayal R, *et al*. The role of polyamines in glucagon-like peptide-2 prevention of TPN-induced gut hypoplasia[J]. Peptides, 2006, 27(4): 883 - 892.

[2] Burrin D G, Stoll B, Guan X, *et al*. Glucagon-like peptide 2 dose-dependently activates intestinal cell survival and proliferation in neonatal piglets[J]. Endocrinology, 2005, 146(1): 22 - 32.

[3] Brubaker P L, Drucker D J. Minireview: Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system[J]. Endocrinology, 2004, 145(6): 2653 - 2659.

[4] Cottrell J J, Stoll B, Buddington R K, *et al*. Glucagon-like peptide-2 protects against TPN-induced intestinal hexose malabsorption in enterally refed piglets[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006, 290(2): G293 - G300.

[5] Guan X, Karpen H E, Stephens J, *et al*. GLP-2 receptor localizes to enteric neurons and endocrine cells expressing vasoactive peptides and mediates increased blood flow[J]. Gastroenterology, 2006, 130(1): 150 - 164.

[6] Perez A, Duxbury M, Rocha F G, *et al*. Glucagon-like peptide 2 is an endogenous mediator of postresection intestinal adaptation[J]. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2005, 29(2): 97 - 101.

[7] Cameron H L, Perdue M H. Stress impairs murine intestinal barrier function: improvement by glucagon-like peptide-2[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 314(1): 214 - 220.

[8] Washizawa N, Gu L H, Gu L, *et al*. Comparative effects of glucagon-like peptide-2 (GLP-2), growth hormone (GH), and keratinocyte growth factor (KGF) on markers of gut adaptation after massive small bowel resection in rats[J]. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2004, 28(6): 399 - 409.

[9] Jeppesen P B, Sanguinetti E L, Buchman A, *et al*. Teduglutide (ALX-0600), a dipeptidyl peptidase IV resistant glucagon-like peptide 2 analogue, improves intestinal function in short bowel syndrome patients[J]. Gut, 2005, 54(9): 1224 - 1231.

[10] Booth C, Booth D, Williamson S, *et al*. Teduglutide ([Gly2]GLP-2) protects small intestinal stem cells from radiation damage[J]. Cell Prolif, 2004, 37(6): 385 - 400.

[11] Drucker D J. Glucagon-like peptides[J]. Diabetes, 1998, 47(2): 159 - 169.

[12] Ho S N, Hunt H D, Horton R M, *et al*. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction[J]. Gene, 1989, 77(1): 51 - 59.

[13] DaCambra M P, Yusta B, Sumner-Smith M, *et al*. Structural determinants for activity of glucagon-like peptide-2[J]. Biochemistry, 2000, 39(30): 8888 - 8894.

(编辑　王　红)

血压计量单位恢复 mmHg 表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]1号关于血压计量单位使用规定的补充通知的精神,血压计量单位恢复使用毫米汞柱(mmHg),但首次使用时应注明 mmHg 与千帕[斯卡](kPa)的换算系数(1 mmHg = 0.133 kPa)。

本刊编辑部