论著

文章编号:1000-5404(2007)23-2240-03

人真核表达质粒载体 pcDNA3.1-hOPG 的构建及体外表达

唐 华,宫 苹,谭 震,廖大鹏 (四川大学华西口腔医学院种植中心,成都 610044)

提 要:目的 构建表达人骨保护素基因(hOPG)的真核表达质粒 pcDNA3.1-hOPG,并检测其在体外的表达,为治疗破骨细胞功能异常引起的骨吸收提供实验基础。**方法** 从 MGC:29565 上获得 hOPG 基因片段并用 PCR 方法扩增,将其连接于真核表达质粒 pcDNA3.1(-),测定序列后,用脂质体包裹转染 C_2C_{12} 细胞,采用免疫组化和骨吸收抑制实验检测 OPG 的表达及功能。**结果** 经酶切和测序鉴定证实本实验构建的重组表达质粒正确,该质粒在体外转染 C_2C_{12} 细胞后可表达功能性 OPG 蛋白。**结论** 成功构建的 pcDNA3.1-hOPG 重组质粒能在体外表达 OPG 蛋白。

关键词:骨保护素;真核表达质粒

中图法分类号:R394-33;R394.2 **文献标识码**:A

Construction of eukaryotic expression bicistron plasmid vector pcDNA3.1-hOPG and its expression *in vitro*

TANG Hua, GONG Ping, TAN Zhen, LIAO Da-peng (Dental Implant Center, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610044, China)

Abstract: Objective To construct eukaryotic expression bicistron plasmid vector pcDNA3.1-hOPG, and to detect the expression of the plasmid *in vitro*. **Methods** hOPG cDNA fragment was extracted from plasmid MGC:29565, amplified by PCR, and inserted into pcDNA3.1(-) vector, then identified by restriction endonuclease digestion and nucleotide sequencing. C_2C_{12} cells were transfected with the plasmid using Lipofectamine 2000. The expression of OPG protein was detected by immunohistochemistry techniques and bone wafer pit assay. **Results** The constructed recombinant plasmid contained the sequence of hOPG gene. After transfection with the plasmid, active OPG protein could be expressed in C_2C_{12} cells. **Conclusion** The constructed eukaryotic expression bicistron plasmid vector pcDNA3.1-hOPG can express OPG *in vitro*, which is the basis for further study on the treatment of bone absorption caused by abnormal activity of osteoclasts.

Key words: osteoprotegerin; eukaryotic expression plasmid

骨保护素(osteoprotegerin, OPG)为肿瘤坏死因子受体超家族成员 11B,又称为破骨细胞形成抑制因子(OCIF),是近年来发现的具有抑制破骨细胞分化及骨吸收活性的分泌型糖蛋白。它与护骨素配基(osteoprotegerin ligand, OPGL)之间的竞争性结合是调控破骨细胞分化、增殖、凋亡及发挥生理作用过程中最重要的途径,在骨吸收与骨重建中起关键作用,在因破骨细胞活性增强导致骨吸收、骨破坏疾病的发病和治疗中起重要作用,已成为骨代谢研究中的热点[1-3]。

为此,我们将 hOPG cDNA 片段连接到 pcDNA3.1(-)双顺反子载体上,拟构建真核表达的双顺反子质粒载体 pcDNA3.1-hOPG,为探讨 OPG 在骨代谢异常中的生物学行为及其基因治疗打下实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

克隆宿主菌 *E. coli* DH5α(Sup E、lacU169、hsdR17、recA1、endA1、Thi1、gyrA96)和克隆载体质粒 pcDNA3.1(-)(卡那霉素抗性)购自 Invitrogen 公司;MGC:29565 为目的基因所在载体(氯霉素抗性),购自 NIH 公司。*Xho* Ⅰ、*BamH* Ⅰ内切酶,*Pfu* 酶、*Taq* 酶购自 Fermentas 公司;T_4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;DNA 胶回收试剂盒购自天为时代公司;tryptone、yeast extract 购自英国 OXOID 公司;DNA 纯化试剂盒购自中科开瑞公司;鼠

基金项目:四川省计委课题(2002-221)
Supported by the Project of Sichuan State Development Planning Commission (2002-221)

作者简介:唐 华(1979-),男,重庆市荣昌县人,博士研究生,主治医师,主要从事牙种植体生物工程方面的研究。电话:(028)85503579
通讯作者:宫 苹,电话:(028)85503579

收稿日期:2007-01-30;修回日期:2007-09-07

抗人 OPG 单克隆抗体购于 R&D 公司；小鼠胚胎肌细胞株 C_2C_{12} 细胞由四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室干细胞与组织工程研究室惠赠；Gibco 胎牛血清购自 Gidco 公司。其余试剂均购自 Sigma。

1.2　方法

1.2.1　重组载体的构建　　根据 GenBank 上 OPG cDNA 序列，由生工生物技术有限公司设计合成 2 条引物：P1：5′-GCGCCTCGAGATGAACAACTTGCTGTGCTGC-3′，P2：5′-TGTTG-GATCCGTGAGGAAACAGCTCAATGG-3′。在引物中分别加入 *Xho* Ⅰ和 *Bam*HⅠ酶切位点。取 0.5 μl MGC:29565 为模板，以 P1/P2 引物进行 PCR 扩增，反应程序：94 ℃预变性 1 min，94 ℃变性1 min，58 ℃退火 45 s，72 ℃延伸 1.5 min，30 个循环。PCR 产物用天为时代的 PCR 纯化试剂盒进行回收纯化。

用 *Xho* Ⅰ和 *Bam*HⅠ双酶切 PCR 纯化回收产物及载体 pcDNA3.1(－)。在 0.5 ml 离心管内依次加入 T_4 DNA 连接酶缓冲液 1 μl、T_4 DNA 连接酶(10 U/μl) 0.5 μl、载体(酶切纯化产物) 100 ng、目的基因(PCR 酶切纯化产物) 10 ng、加入 ddH_2O 使得总体积 10 μl，室温连接 2 h，构建 pcDNA3.1-hOPG。参照分子克隆方法，转化 DH5α 大肠埃希菌，筛选 3～5 个阳性克隆、扩增。抽提阳性克隆的重组质粒，进行 *Xho* Ⅰ和 *Bam*HⅠ双酶切，以琼脂糖凝胶电泳鉴定。用 PCR 筛选阳性转化子。重组子插入片段的序列测定由上海英骏公司协助完成。

1.2.2　pcDNA 3.1-hOPG 体外表达　　将呈对数生长期的 C_2C_{12} 细胞以 5×10^5/孔浓度接种于 6 孔板爬片，待细胞融合达 90% 时，按脂质体转染常规步骤进行基因转染。转染后 24～48 h将细胞爬片行 OPG 免疫组化染色，观察 OPG 质粒转染后在细胞内蛋白的表达情况。

1.2.3　体外骨吸收抑制实验　　将新生牛股骨皮质骨骨片经超声清洗，75% 酒精浸泡后置于含 10% FBS 的 α-MEM 中。取 2 周龄 SD 大鼠股骨，切碎两端，将骨髓冲洗入上述培养基中，细胞计数后等量种板于骨片上(每组 4 片)，采用全骨髓共培养法在骨片上诱导培养破骨细胞。实验组以 C_2C_{12} 转染 pcDNA3.1-hOPG 后第 3 天时收集的培养液上清和 10^{-8} mmol/L 维生素 D_3 培养；对照组用含 10% FBS 的 α-MEM 以及 10^{-8} mmol/L 维生素 D_3 诱导培养[4]。每组 3 d 换液 1 次，连续培养 10 d。10 d 后，将骨片做扫描电镜(KYKY-2800，中国)观测，在骨片上选取 5 个视野，测量骨吸收陷窝总面积，比较组间差异，观察转染后分泌的 OPG 蛋白对破骨细胞分化、活化的抑制作用。

1.3　统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件行单因素方差分析。

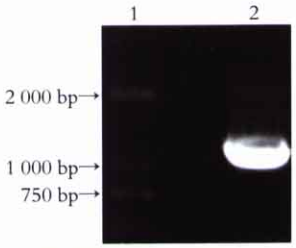
2　结果

2.1　基因扩增结果

以 MGC:29565 为模板，以 P1/P2 为引物进行 PCR，扩增得到约 1 200 kb 的片段(图 1)。DNA 序列测定表明扩增片段的核苷酸序列与 GenBank 上的 OPG 编码区基因完全一致。

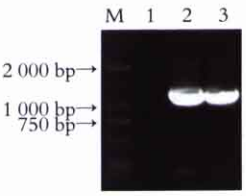
2.2　重组质粒 pcDNA3.1-hOPG 的 PCR 鉴定

提取重组质粒 pcDNA3.1-hOPG，以质粒载体 pcDNA3.1 为阴性对照，扩增 DNA 为阳性对照，PCR 鉴定分析结果为重组质粒能扩增出与阳性对照大小相符的片段(图 2)。



1：DNA 标准(DL 2000)；2：扩增产物(约 1 200 kb)

图 1　基因扩增 PCR 结果



M：DNA 标准(DL 2000)；1：质粒载体 pcDNA3.1(阴性对照)；2：OPG DNA(阳性对照)；3：重组质粒载体 pcDNA3.1-hOPG

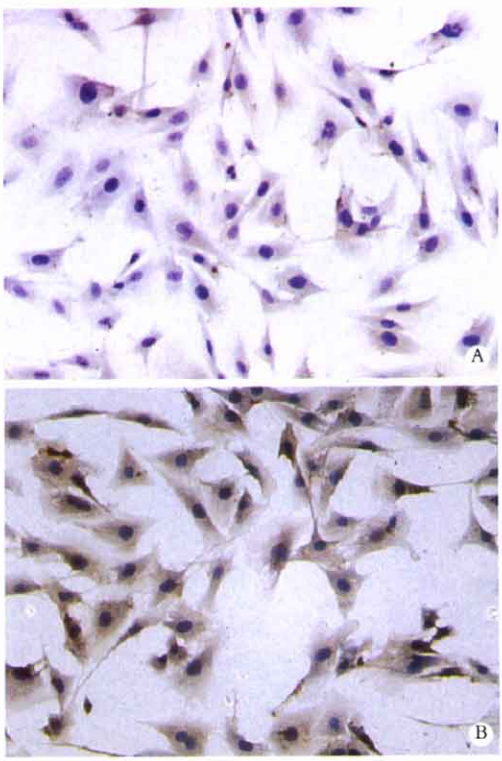
图 2　PCR 鉴定重组质粒 pcDNA3.1-hOPG

2.3　重组质粒 pcDNA3.1-hOPG 的序列测定

重组质粒送上海英骏公司测序，测序结果显示重组质粒 pcDNA3.1-hOPG 中插入的 hOPG 序列与 GenBank 上 OPG 编码区序列完全一致。

2.4　hOPG 在 C_2C_{12} 细胞中的表达

pcDNA3.1-hOPG 在 Lipofectamine 2000 的介导下转染 C_2C_{12} 细胞，将转染后的细胞爬片行免疫组化染色，结果显示，细胞质内呈阳性反应，说明 pcDNA3.1-hOPG 转染 C_2C_{12} 细胞后可表达 hOPG 蛋白。见图 3。

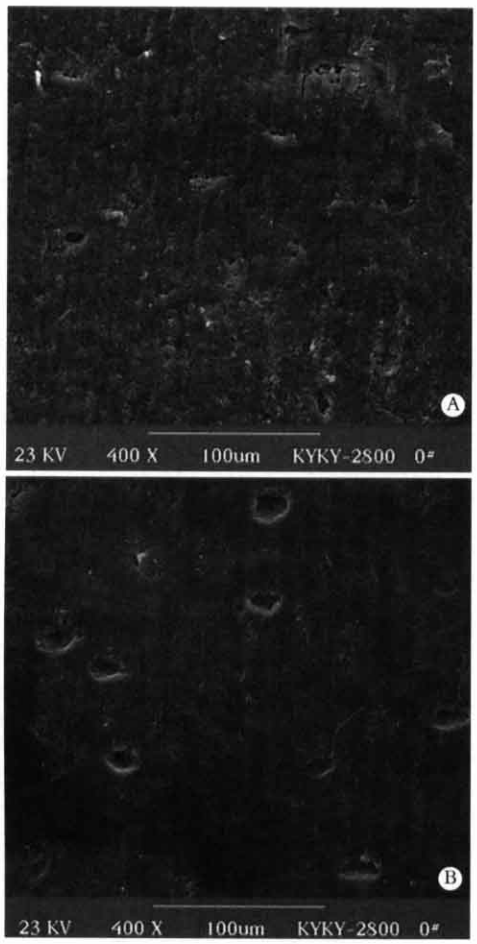


A：对照组；B：pcDNA3.1-h OPG 转染组

图 3　C_2C_{12} 细胞 OPG 免疫组织化学染色结果　(S-P×200)

2.5 骨吸收抑制实验

每张骨片在400倍视野下选取5个测量区域，实验组骨吸收陷窝数量明显减少，平均吸收总面积为0.60 mm^2，对照组平均吸收总面积为2.2 mm^2，经统计学分析，有显著性差异（$P<0.05$），提示实验组破骨细胞功能受到抑制。此结果表明转染后由C_2C_{12}细胞分泌的hOPG是具有生理作用的活性蛋白。见图4。



A：C_2C_{12}细胞转染后3 d上清液诱导培养；B：直接诱导培养

图4 骨片上诱导培养破骨细胞后的扫描电镜观察 （×400）

3 讨论

骨的吸收主要由破骨细胞负责，并受多种细胞因子调控。1997年Simonet等[1]通过分子克隆技术发现了OPG，它是由成骨细胞与骨髓基质细胞产生的一种与肝素结合分泌型糖蛋白，是破骨细胞表面核因子κB受体激动因子（RANK）的诱饵受体，通过与其配体OPGL竞争性结合，阻断OPGL与RANK的结合，使得RANK不能活化，从而达到抑制破骨细胞分化、活化的作用[5,6]。OPG基因敲除鼠成年后表现为严重骨质疏松，去势小鼠注射重组人OPG 2周后，出现明显骨质骨量增加[7]。对OPG的研究将会促进因破骨细胞活性增强导致骨吸收、骨破坏的疾病的病因及其预防治疗得以深入。

基因治疗作为一种对许多疾病的新治疗方法，正在迅速发展[8]。用于治疗的外源性基因真核表达载体分为病毒和非病毒两大类。病毒载体虽转染效率高，表达稳定，但其易整合到靶细胞染色体内，故安全性差[9,10]。非病毒载体大部分为各种质粒，进入靶细胞后，以附加体的形式存在，具有安全性好，容量大的特点。小鼠胚胎肌细胞株C_2C_{12}细胞是OPG低表达细胞，而且生长稳定，本研究中C_2C_{12}细胞转染OPG重组质粒载体后，细胞生长状态良好，可持续稳定表达功能性OPG蛋白，增殖分化未受影响，为OPG基因治疗用于体内研究提供了实验依据。

综上所述，本实验采用分子克隆技术，经PCR鉴定、DNA测序证明已成功构建pcDNA3.1-hOPG真核表达载体；于体外转染小鼠胚胎肌细胞株C_2C_{12}细胞后能分泌表达功能性OPG蛋白，为进一步探索OPG在骨吸收、骨破坏性疾病中的生物学行为及基因治疗打下了实验基础。

参考文献：

[1] Simonet W S, Lacey D L, Cunstan C R, *et al*. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density[J]. Cell, 1997, 89(2): 309-319.

[2] Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, *et al*. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis *in vitro*[J]. Endocrinology, 1998, 139(3): 1329-1337.

[3] Boyle W J, Simonet W S, Lacey D L. Osteoclast differentiation and activation[J]. Nature, 2003, 423(6937): 337-342.

[4] Scheven B A, Visser J W, Nijweide P J. *In vitro* osteoclast generation from different bone marrow fractions, including a highly enriched haematopoietic stem cell population[J]. Nature, 1986, 321(6065): 79-81.

[5] Wong B R, Josien R, Choi Y. TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function[J]. J Leukoc Biol, 1999, 65(6): 715-724.

[6] 徐 琳，谭颖徽，王建华，等. 失神经支配兔下颌骨骨折愈合过程中CGRP对OPG/RANKL表达的影响[J]. 第三军医大学学报，2005，27(10)：988-990.

[7] Mizuno A, Amizuka N, Irie K, *et al*. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 247(3): 610-615.

[8] Alexander D R. Uses and abuses of genetic engineering[J]. Postgrad Med J, 2003, 79(931): 249-251.

[9] 陈 宁，宋世兵，董子明，等. 人组织因子RNA干扰真核表达载体的构建[J]. 郑州大学学报：医学版：2006，41(6)：1128-1120.

[10] 宁寒冰，张 玲，李建生，等. 端粒重复序列结合因子2真核表达载体的构建及表达[J]. 郑州大学学报：医学版，2006，41(3)：439-441.

（编辑 龙 亮）