维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2007)05-0459-05

重组质粒 phPPARγ1-IRES2-EGFP 高效体外转染表达体系的建立

章 涛[1],万敬员[1],杨俊卿[1],刘颖菊[1],周元国[2],周岐新[1]

(1.重庆医科大学基础医学院药理学教研室,重庆 400016;2.第三军医大学野战外科研究所分子生物学中心,重庆 400042)

【摘 要】目的:建立含人 PPARγ1 受体基因 phPPARγ1-IRES2-EGFP 重组质粒高效体外转染表达体系。方法:采用阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 将 phPPARγ1-IRES2-EGFP 转染入 293 细胞,荧光显微镜观察转染细胞绿色荧光蛋白(GFP)报告基因表达强度及其转染效率,并对转染细胞 hPPARγ1 表达进行荧光定量 PCR 和 Western Blot 分析。结果:荧光显微镜下可见转染 phPPARγ1-IRES2-EGFP 质粒的 293 细胞 GFP 报告基因高表达,转染效率为(83±11)%;荧光定量 PCR 和 Western Blot 检测结果表明,转染细胞 hPPARγ1 表达水平高于空载体对照组 3 个数量级,说明导入的重组质粒能够高效表达 hPPARγ1。结论:成功建立 phPPARγ1-IRES2-EGFP 重组质粒高效体外转染表达体系,为 hPPARγ1 受体功能研究和基于 hPPARγ1 为靶标的药物筛选平台建立打下了良好的基础。

【关键词】过氧化物酶体增殖物激活受体 γ1;转染效率;真核表达;293 细胞

【中国图书分类法分类号】R34;R966 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-11-07

Establishment of high efficient tranfection and expression system for phPPARγ1-IRES2-EGFP recombinant plasmid *in vitro*

ZHANG Tao, et al

(*Department of Pharmacology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish high efficient transfection and expression system *in vitro* for phPPARγ1-IRES2-EGFP recombinant plasmid carrying human peroxisome proliferator-activated receptorγ1 (hPPARγ1)gene. *Methods*: Cationic lipid transfection reagent lipofectamine 2000 was used to transfect phPPARγ1-IRES2-EGFP recombinant plasmid and control pIRES2-EGFP plasmid to 293 cells. The profiles of GFP expression and transfection efficiency were measured by fluorescence microscopy. Expression of PPARγ1 in transfected 293 cells were determined by werstern blot and real time quantitative polymerase chain reaction. *Results*: GFP expression level was high in transfeced 293 cells, the transfection efficiency of phPPARγ1-IRES2-EGFP was (83±11)%. In transfected 293 cells, high efficient expression of hPPARγ1 gene were detected both at mRNA and protein levels by real-time PCR and western blot analyses. *Conclusion*: High efficient transfection and expression system for phPPARγ1-IRES2-EGFP recombinant plasmid *in vitro* is successfully established, which provide a useful tool in investigating hPPARγ gene function as well as establishing molecular platform by which the candidates of unknown hPPARγ ligands or activators can be found.

【Key words】Peroxisome proliferator-activated receptorγ1; Transfection efficiency; Eukaryotic expression; 293cells

过氧化物酶体增殖物激活受体(Peroxisome proliferator-activated receptor,PPAR)属于核受体超家族成员,为配体激活的转录因子,包括 PPARγ、PPARδ/β 和 PPARγ3 种受体亚型。现有的研究表明,PPARγ 除在脂肪细胞分化成熟过程中起关键作用外,还在脂质代谢、胰岛素增敏、抗炎和抗肿瘤等方面发挥积极作用,这使得 PPARγ 极有希望成为治疗糖尿病、动脉粥样硬化、高血压及肿瘤等疾病新的药物靶标[1,2]。在成功构建含人 PPARγ1 基因真核表达载体 phPPARγ1-IRES2-EGFP 的基础上,本实验试图摸索出其体外转染和表达的理想体系,以便为 hPPARγ 受体功能的研究和基于 hPPARγ 的配

作者介绍:章 涛(1969-),男,博士,主要研究方向:肿瘤分子药理学。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30572353);重庆医科大学博士启动基金(2004)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

体或激动剂筛选分子平台的建立打下良好的基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

RPMI-1640 培养基、胎牛血清购自 HyClone 公司；质粒小抽试剂盒、RNA 抽提试剂盒、胶回收试剂盒、Access RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司；Lipofectamine2000 为 Invitrogen 公司产品；逆转录－荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR ExScript™ RT-PCR Kit 及 pMD19-T 载体为 TaKaRa 公司产品；兔源 PPAR(多克隆抗体为 Cayman 产品；HRP 标记的羊抗兔二抗购自中杉金桥；化学发光检测试剂为 PIERCE 公司产品；其它试剂均为分析纯。

1.2 质粒和细胞株

含人 hPPARγ1 受体基因重组质粒 phPPARγ1-IRES2-EGFP 为本课题组构建，经酶切和测序鉴定与 Gene Bank 数据库相应序列完全吻合，资料另作报道。质粒 pIRES2-EGFP 由重庆医科大学超声医学研究所惠赠；HepG2 细胞由重庆医科大学肝病研究所提供；293 细胞购自南京凯基生物(源自 ATCC)。

1.3 细胞培养

采用 24 孔板，每孔接种 1×10^5 个 HepG2 或 293 细胞，用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基于 37℃、5%CO_2 全湿环境下培养，常规添加青霉素 100U/ml、链霉素 100μg/ml。

1.4 质粒扩增

按 1∶500 体积比将 phPPARγ1-IRES2-EGFP 质粒菌液加入到含卡那霉素 30μg/ml 的 LB 培养基中，于 37℃、200r/min 振荡培养 12h。取培养菌液 16ml，按质粒小抽试剂盒说明提取质粒，核酸定量仪检测质粒的纯度和浓度，并取样进行琼脂糖凝胶电泳。

1.5 质粒转染 293 细胞

待 293 细胞生长汇集 85%时，参照 Lipofectamine 2000 转染试剂说明进行转染，每孔加质粒 0.8μg，脂质体 2μl。转染 36h 时荧光显微镜下观察转染细胞 GFP 表达强度和转染效率，转染效率按 3 个高倍视野(×200)下表达 GFP 阳性细胞的百分率的均值为计，实验以空载体 pIRES2-EGFP 转染作为对照。

1.6 转染 293 细胞 hPPARγ1 mRNA 表达的荧光定量 PCR 检测

1.6.1 引物设计与合成　采用 Primer Premier 5 软件，根据 hPPARγ1 和内参 hGAPDH cDNA 序列设计引物，交 TaKaRa 公司合成。hPPARγ1 上游引物 5'AGGAGCAGAG-CAAAGAGG 3'，下游引物 5'AGGACTCAGGGTGGTTCA 3'，产物大小为 474bp；hGAPDH 上游引物 5'CCCCTTCATTGAC-CTCAACTACAT3'，下游引物为 5'CATGAGTCCTTCCAC-GATACCAA 3'，扩增片段为 421bp。

1.6.2 标准品 T 载体的构建　按照 RNA 抽提试剂盒说明提取 $HepG_2$ 细胞 RNA，琼脂糖凝胶电泳判断 RNA 完整性，并检测其纯度和浓度。用 Access RT-PCR 试剂盒从 $HepG_2$ 细胞总 RNA 中获得 hPPARγ1(474bp)和 hGAPDH(421bp)基因片段，胶回收相应的条带后，分别与 T 载体连接，经转化和克隆挑选后获得相应的 T 载体菌液，并取菌液进行 PCR 验证。从筛选出的菌液抽提 pMD19-hPPARγ-T、pMD19-hGAPDH-T 载体，分析其纯度和浓度，按下列公式计算每 μl T 载体中目的基因的拷贝数：拷贝数 =mol 数 $\times 6.02\times10^{23}$ [mol 数 = 每 μl 质粒含量(g)/ 质粒长度(bp)/324.5]。按 10 倍梯度稀释 T 载体，获得每 μl 含 10^1~10^8 拷贝数的 T 载体作为标准品。

1.6.3 荧光定量 PCR 检测转染的 293 细胞 hPPARγ1 表达　转染 36h 后，分别提取重组质粒和空载体转染组各 6 个孔的 293 细胞 RNA，检测提取的 RNA 纯度和浓度。逆转录生成 cDNA，反应体系为 10μl，其中 RNA 100ng，5×ExScript Buffer2 μl，dTNP Mixture(各 10μmol/L)0.5μl，Oligo dT Primer (50μmol/L)0.5μl，ExScript RTase (200U/μl)0.25μl，RNase Inhibitor(40U/μl)0.25μl；反应条件：42℃15min，95℃ 2min。荧光定量 PCR 反应体系 25μl，其中含 SYBR Permix Ex Taq 12.5μl，hPPARγ1 或 hGAPDH 上下游引物(10μmol/L)各 0.5μl，T 载体标准品或转染 293 细胞的 cDNA 模板 0.5μl，水 11μl；反应条件：95℃预变性 2.5 min，95℃10 s，55℃30 s，72℃30s，循环 43 次。

1.7 转染 293 细胞 hPPARγ1 表达的 Western Blot 分析

采用 6 孔板，每孔接种 5×10^5 个 293 细胞，转染 36h 后，消化收集重组质粒和空载体转染各 3 个孔共 6 个样品的 293 细胞。用冰预冷 PBS 洗涤细胞 1 次，细胞沉淀用 RIPA 裂解液悬浮，超声助以细胞裂解，4℃下 12000g 离心 10min，取上清，Bradford 法定量样品蛋白浓度。用 10%SDS-PAGE 分离蛋白样品(蛋白上样量为 50μg/ 孔)，半干转至 PVDF(Roche 公司产品)膜，用 TBST 配制的 3%BSA 作为封闭液于常温下封闭 2h，TBST 洗 3 次，每次 15min，加一抗(1∶300)常温下孵育 2h，TBST 振荡洗涤 3 次，每次 15min，加 HRP 标记二抗(1∶5000)常温下孵育 1h，再用 TBST 洗涤 3 次，加入化学发光试剂后置胶片暴光，常规显影、定影。

1.8 统计学分析

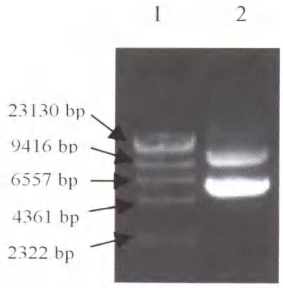
实验结果以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示，采用 SPSS 13 软件包对实验数据进行 t 检验。

2 结　果

2.1 phPPARγ1-IRES2-EGFP 质粒的纯度和浓度

扩增后提取的 phPPARγ1-IRES2-EGFP 质粒其 A_{260}/A_{280} 比值为 1.87，浓度为 800μg/ml，质粒电泳后超螺旋和松弛型的 2 种构象条带清晰可见，无线性质粒条带出现(图 1)，说明提取的质粒纯度高，质量好。

维普资讯 http://www.cqvip.com



1: λ-*Hind* Ⅲ digest marker; 2: phPPAR γ 1-IRES2-EGFP recombinant plasmid

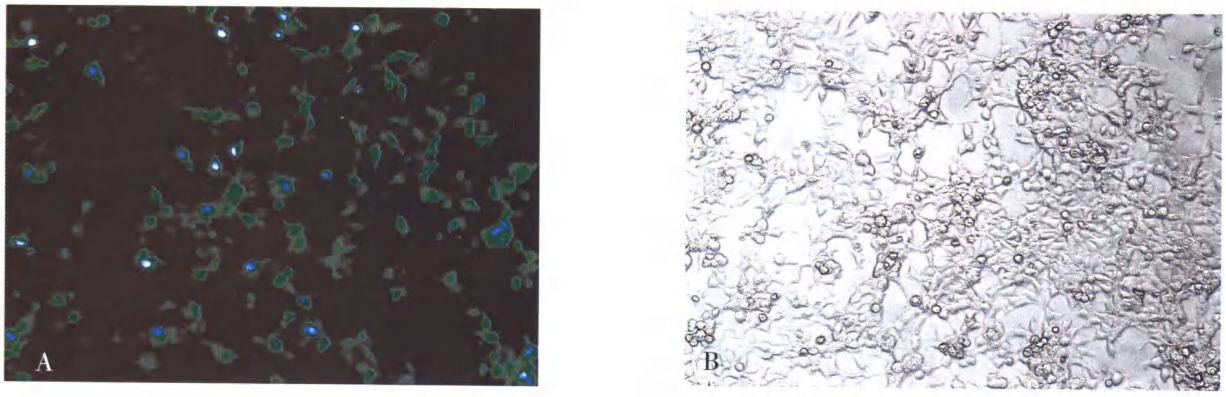
图 1 扩增 phPPARγ1-IRES2-EGFP 质粒电泳条带

2.2 重组质粒 phPPARγ1-IRES2-EGFP 转染效率

结果如图 2 所示，转染 phPPARγ1-IRES2-EGFP 质粒的 293 细胞 GFP 表达强度高，phPPARγ1-IRES2-EGFP 转染效率达(83±11)%。

2.3 转染 293 细胞 hPPARγ 表达

荧光定量 PCR(表 1、图 3)和 Western Blot(图 4)检测结果表明，phPPARγ1-IRES2-EGFP 转染的 293 细胞其 hPPARγ 表达水平高于 pIRES2-EGFP 空载体转染组 3 个数量级，说明导入的重组质粒能够高效表达 hPPARγ1。



A，B 分别为同一视野荧光和相差显微镜下所见

图 2 质粒 phPPARγ1-IRES2-EGFP 转染 293 细胞的荧光显微镜观察(×200)

表 1 转染 293 细胞 hPPARγ mRNA 表达的荧光定量 PCR 检测

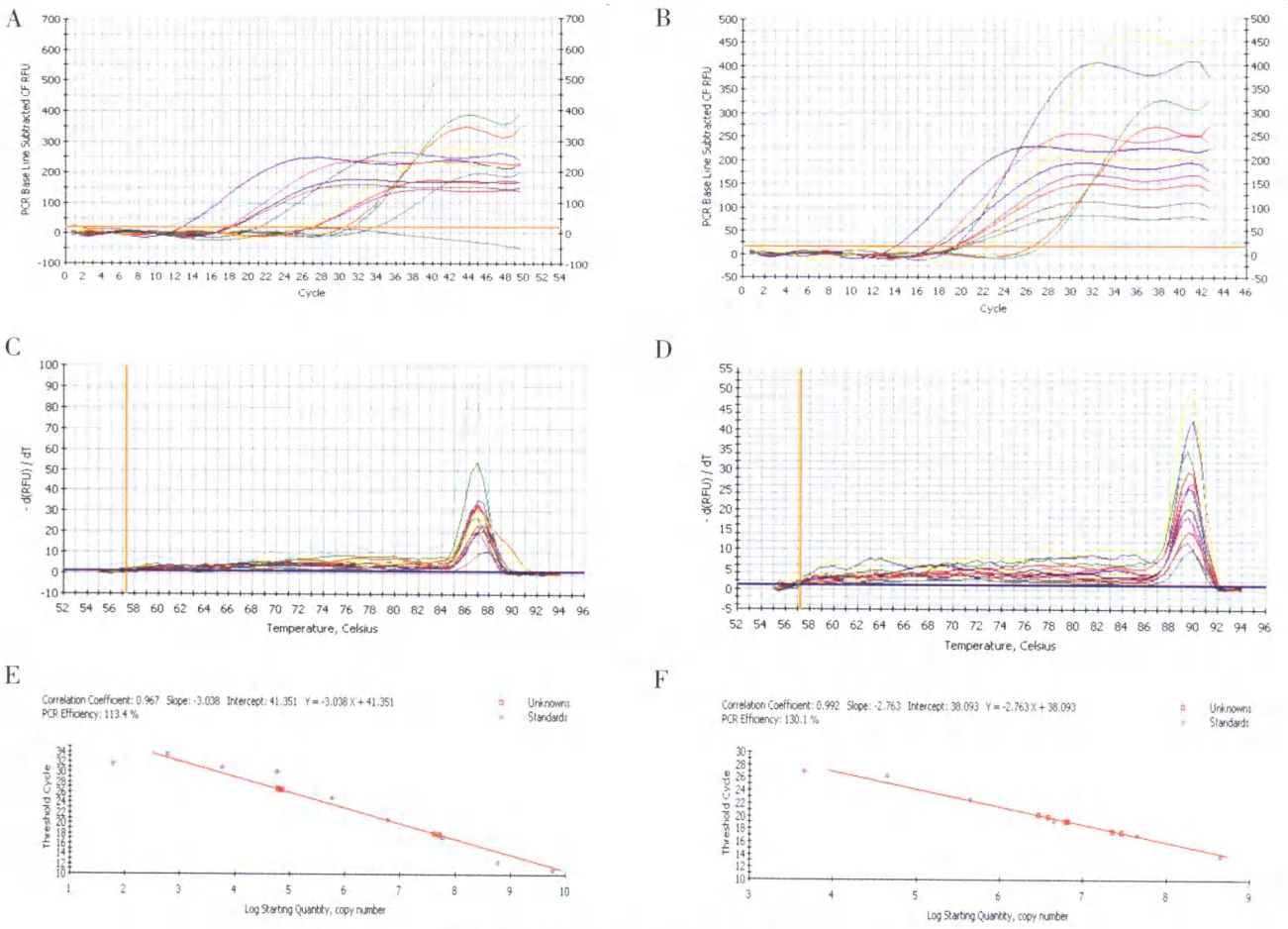
组别	hPPARg1 (拷贝/μl)	hGAPDH (拷贝/μl)	相对每百万看家基因的含量	均数±标准差
pIRES2-EGFP 空载体对照组 (n=6)	6.61E+04	6.66E+06	9.93E+03	(7.72±3.68)E+03
	7.20E+04	2.94E+07	2.45 E+03	
	6.10E+04	6.28E+06	9.71 E+03	
	4.07E+04	9.25E+06	4.40 E+03	
	5.73E+04	7.53E+06	7.61 E+03	
	3.29E+04	2.70E+06	1.22 E+04	
phPPAR γ 1-IRES2-EGFP 重组质粒组 (n=6)	5.17E+07	2.88E+06	1.79 E+07	(9.62±6.06)E+06**
	4.22E+07	2.25E+07	1.88 E+06	
	5.79E+07	3.80E+06	1.52 E+07	
	6.94E+07	7.75E+06	8.95 E+06	
	5.34E+07	1.12E+07	4.77 E+06	
	3.95E+07	4.37E+06	9.04 E+06	

与空载体 pIRES2-EGFP 对照组比较：**P<0.01

3 讨 论

hPPARγ 基因定位于 3p25，因启动子选择及可变剪切方式不同可产生 2 种异构体：PPARγ1 和 PPARγ2。PPARγ2 主要表达于脂肪组织；而 PPARγ1 除脂肪组织外，还见于巨噬细胞、肠上皮细胞和内皮细胞，肝脏和骨骼肌也表达低峰度的 PPARγ1[3]。PPARγ 包含 A/B、C、D 和 E/F 4 个结构域，其中 N

维普资讯 http://www.cqvip.com



A、C、E 为 hPPAR γ 基因扩增曲线、溶解曲线和标准曲线；B、D、F 为内参 hGAPDH

图 3 Real-time PCR 分析转染 293 细胞 hPPARγ 表达

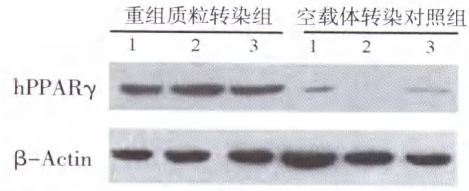


图 4 Western Blot 检测转染的 293 细胞 hPPARγ 表达

端的 A/B 区是非依赖配体激活域；C 区为 DNA 结合域（DNA binding domain，DBD）；D 区为铰链区；E/F 区为配体结合域（Ligand binding domain，LBD）。通常情况下，PPARγ 与维甲酸 X 受体（Retinoid X receptor，RXR）结合成二聚体存在，与配体结合后其活性被激活，遂与靶基因启动子区域过氧化物酶体增殖物反应元件（Peroxisome proliferators response element，PPRE）结合，发挥对靶基因的转录调控作用[4]。由于 hPPARγ2 氨基端比 hPPARγ1 多出 30 个氨基酸残基，故其配体非依赖转录活性高于后者[5]。

PPARγ 在脂肪组织中表达水平最高，脂肪组织的形成依赖于 PPARγ 的表达和活化，基因敲除研究也证实 PPARγ 在脂肪形成中的关键作用[6]。自发现噻唑烷二酮类（Thiazolidinedione，TZD）人工合成抗糖尿病药物是 PPARγ 高亲和性激动剂配体以来，PPARγ 诸方面生物学特性的研究获得了长足进展。研究表明，PPARγ 除了在脂质代谢中起重要的调节作用外，还具有改善胰岛素抵抗[7]，保护血管降低动脉粥样硬化的发生[8,9]，对抗多种肿瘤[10]等有益作用。可以预见，在治疗包括胰岛素抵抗、高血糖、动脉硬化及肿瘤等多种疾病中，以 PPARγ 作为药物靶标的应用前景广阔。

为了从中药活性成分中筛选可能存在的 PPARγ 天然配体激动剂，我们构建了含人 PPARγ1 受体基因的 phPPARγ1-IRES2-EGFP 重组质粒（有关的资料已另作报道），以便下一步分子筛选平台建立所用，将 phPPARγ1-IRES2-EGFP 高效导入合

维普资讯 http://www.cqvip.com

适的宿主细胞并获得尽可能高的 PPARγ 基因表达是实现这一目标的前提和关键。现有的 DNA 转染的方法包括:DEAE-葡聚糖法、磷酸钙法、阳离子脂质体法、阳离子聚合物、基因枪和电穿孔等。其中,阳离子脂质体法具有使用方便,可携带大片段 DNA,通用于各种类型的裸露 DNA 或 RNA,能转染各种类型的细胞,没有免疫原性,体外基因转染中有很高的效率的优点而广为使用[11]。Lipofectamine 2000 是 Invitrogen 公司研制开发的新一代阳离子脂质体转染试剂,经检测,其对大部分贴壁和悬浮生长细胞均可获得高转染效率和蛋白表达,当存在血清或用于进行蛋白表达的细胞系如 COS-7、CHO 和 293 时,Lipofectamine 2000 尤为有效,转染效率可超过 90%[12]。本实验表明,人 293 细胞 PPARγ 表达峰度底,其表达量仅相当于内参 GAPDH 基因的 1% 左右,加之 293 细胞又是 Lipofectamine 2000 转染试剂的极佳转染细胞,故本实验选择 293 细胞作为重组质粒 phPPARγ1-IRES2-EGFP 转染和表达的宿主细胞。实验结果表明,phPPARγ1-IRES2-EGFP 转染效率高达(83±11)%,绿色荧光蛋白报告基因的表达清晰且强度高,说明转染效果良好;对转染 293 细胞的 hPPARγ 表达水平的检测结果表明,phPPARγ1-IRES2-EGFP 重组质粒转染的 293 细胞其 hPPARγ 表达是空载体转染对照组的 1000 倍左右,说明本实验建立的体系不但转染效率高,并且转染后可获得高效目的基因的表达,这为进一步建立基于 PPARγ 为靶标的药物筛选分子平台打下了良好的基础。

(通讯作者:周岐新,重庆医科大学药理学教研室,cqzhouqx@yahoo.com.cn)

参 考 文 献

[1] Kepez A,Oto A,Dagdelen S. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma:novel therapeutic target linking adiposity,insulin resistance,and atherosclerosis[J].BioDrugs,2006;20(2):121-135.

[2] Sarafidis PA,Lasaridis AN.Actions of peroxisome proliferator-activated receptors-gamma agonists explaining a possible blood pressure-lowering effect[J].Am J Hypertens,2006;19(6):646-653.

[3] Norris AW,Chen L,Fisher SJ,et al.Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones[J].J Clin Invest,2003;112(4):608-618.

[4] Glass CK,Rosenfeld MG.The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors[J].Genes Dev,2000;14(2):121-141.

[5] Desvergne B,Wahli W.Peroxisome proliferator-activated receptors:nuclear control of metabolism[J].Endocr Rev,1999;20(5):649-688.

[6] Rosen ED,Sarraf P,Troy AE,et al.PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro[J].Mol Cell,1999;4(4):611-617.

[7] Rangwala SM,Lazar MA.Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism[J].Trends Pharmacol Sci,2004;25(6):331-336.

[8] Li AC,Binder CJ,Gutierrez A,et al.Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha,beta/delta,and gamma[J].J Clin Invest,2004;114(11):1564-1576.

[9] Martens FM,Rabelink TJ,Op't Roodt J,et al.TNF-{alpha} induces endothelial dysfunction in diabetic adults, an effect reversible by the PPAR-{gamma} agonist pioglitazone[J]. Eur Heart J,2006;27(13):1605-1609.

[10] Chaffer CL,Thomas DM, Thompson EW,et al.PPARgamma-independent induction of growth arrest and apoptosis in prostate and bladder carcinoma[J].BMC Cancer,2006;6:53.

[11] Gordon SP,Berezhna S,Scherfeld D,et al.Characterization of interaction between cationic lipid-oligonucleotide complexes and cellular membrane lipids using confocal imaging and fluorescence correlation spectroscopy[J]. Biophys J,2005;88(1):305-316.

[12] Dalby B,Cates S,Harris A,et al.Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent:primary neurons,siRNA,and high-throughput applications[J].Methods,2004;33(2):95-103.