

· 基础研究 ·

DUSP9 真核表达载体的构建及其在 Hepa1-6 肝细胞中的表达*

杨艳¹, 向加林¹, 欧阳旭红^{1△}, 尹玲¹, 于国辉²

(1. 遵义医学院附属医院医学检验科, 贵州遵义 563000;

2. 遵义医学院医学检验系 2006 级本科, 贵州遵义 563003)

摘要:目的 构建小鼠 DUSP9 基因真核表达载体, 并在小鼠 Hepa1-6 肝细胞中表达 DUSP9 蛋白。方法 采用 RT-PCR 方法, 从小鼠肝组织获取 DUSP9 cDNA 片断, 经双酶切、连接重组至真核表达载体 pEGFP-N1, 构建 pEGFP-DUSP9 重组质粒, 双酶切及 DNA 测序对该重组质粒进行鉴定。脂质体介导 pEGFP-DUSP9 转染 Hepa1-6 肝细胞, 实时荧光定量 PCR、Western blot 检测 DUSP9 mRNA 及蛋白表达水平的变化。结果 pEGFP-DUSP9 重组质粒经双酶切及测序鉴定证明构建完全正确, 成功转染 Hepa1-6 肝细胞并高效表达, 检测到明显上调的 DUSP9 mRNA 和蛋白表达水平。结论 成功构建真核表达载体 pEGFP-DUSP9, 并在 Hepa1-6 肝细胞中表达了 DUSP9 蛋白, 可为研究 DUSP9 的生理功能及了解其在糖、脂代谢、胰岛素抵抗进程中的作用奠定坚实的基础。

关键词:真核表达载体; Hepa1-6 肝细胞; 实时荧光定量 PCR; DUSP9 基因

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.13.017

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)13-1490-03

Construction of pEGFP-DUSP9 recombinant plasmids and its expression in mouse Hepa1-6 hepatocytes*

Yang Yan¹, Xiang Jialin¹, Ouyang Xuhong^{1△}, Yin Ling¹, Yu Guohui²

(1. Department of Medical Laboratory, Affiliated Hospital, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China;

2. Department of Medical Laboratory, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China)

Abstract: Objective To construct the eukaryotic expression vector of mouse DUSP9 gene and to express DUSP9 protein in mouse Hepa1-6 hepatocytes. Methods The cDNA fragment of mouse DUSP9 containing two restriction sites (ECORI, AgeI) was obtained from mouse fat tissue by using reversal transcript-polymerase chain reaction (RT-PCR). Then, it cloned into the pEGFP-N1 vector by ECORI/ AgeI double digestion and ligation. The recombinant plasmid was identified by enzyme digest and DNA sequence analysis. The recombinant plasmids were transfected into Hepa1-6 hepatocytes by lipofectamine 2000. The expression of DUSP9 mRNA and protein was measured by real-time quantitative PCR (SYBR Green I) and Western blot, respectively. Results Both restriction analysis and sequencing proved that the recombinant plasmid pEGFP-DUSP9 was constructed correctly. The plasmids pEGFP-DUSP9 were successfully transfected and significantly expressed in Hepa1-6 hepatocytes, the levels of mRNA and protein were obviously up-regulated. Conclusion The eukaryotic expression plasmid pEGFP-DUSP9 has been successfully constructed, and DUSP9 protein is expressed in Hepa1-6 hepatocytes. It will help further studies on the physiological function of DUSP9 gene and its effect on glucose, lipid metabolism and development of insulin resistance.

Key words: eukaryotic expression vector; Hepa1-6 hepatocytes; real-time quantitative PCR; DUSP9 gene

DUSP9 基因是近年研究发现具有双重专一性的磷酸酶家族 (Dual specificity protein phosphatases, DUSPs) 成员之一。DUSPs 可逆转应激通路中丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 的活性, 因此, 也称作 MAPK 磷酸酶家族 (mitogen-activated protein kinase phosphatases, MKPs)。该家族属于酪氨酸蛋白磷酸酶超家族, 可通过去磷酸化、钝化 MAPK 关键的酪氨酸和苏氨酸残基, 调控 MAPK 的功能^[1-2]。其家族成员因对 MAPKs 家族表现出独特的底物特异性, 故分为 DUSP1 (又名 MKP1)、DUSP4 (又名 MKP2)、DUSP6 (又名 MKP3)、DUSP9 (又名 MKP4)、DUSP10 (又名 MKP5)。研究发现, 人源与小鼠 DUSP9 同源率为 83%, 在胎盘、肝、肾脏中高表达, 且在发育进程中是可调型表达^[3-4], 对胰岛素作用存在争议^[2,5], 但其在胰岛素抵抗进程中的作用机制及分子靶点尚未清楚。本研究通过构建 DUSP9 真核表达载体, 并在小鼠 Hepa1-6 肝细胞中过表达 DUSP9, 为进一步研究

DUSP9 生理功能及其在糖脂代谢、胰岛素抵抗进程中的作用奠定坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 材料 Hepa1-6 肝细胞购自中科院上海细胞库; pEGFP-N1 载体购于 GENE CHEM 公司; DH5 α 购于大连宝生物公司。主要试剂: DMEM 高糖培养基、胎牛血清、Opti-MEM 培养基购自 GIBICO 公司; LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司; RNA 提取试剂、DNA 聚合酶 PrimeSTARTM HS DNA Polymerase、dNTP Mixture、SYBR Premix Ex TaqTM II、PrimeScriptTM RT reagent、引物、限制性内切酶、T4 DNA ligase 等购自 TAKARA 公司; 去内毒素质粒小抽试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒均购自 OMEGA 公司; 兔抗小鼠 β -actin 一抗、HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗购自北京中杉金桥公司; 兔抗鼠 DUSP9 购自 Abnova 公司。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的获取及扩增 以健康 C57 小鼠肝组织总 RNA 为模板,进行逆转录反应,反应条件为:37 °C 15 min,85 °C 5 s,将得到的 cDNA 溶液应用于 PCR 扩增。根据 pubmed-GenBank 中 NM_029352 DUSP9 mRNA 序列,扩增小鼠 DUSP9 基因全编码区 cDNA 片段,所用引物即上游:5'-CCG GAA TTC TAT GGA GAG TCT GAG TCG G-3'(含 ECORI 酶切位点);下游:5'-CGG GTA CCG GTA GTG TGG GGT CCA GCT CAA AG-3'(含 AgeI 酶切位点),PCR 扩增反应条件:98 °C 预变性 4 min;98 °C 变性 12 s,64 °C 退火 17 s,72 °C 延伸 1 min,共 35 个循环;72 °C 加长延伸 6 min,并纯化 PCR 产物。

1.2.2 重组真核表达载体的构建 分别用 ECORI 和 AgeI 双酶切 pEGFP-N1 载体及目的基因片段并胶回收,T4 DNA ligase 16 °C 连接过夜,第 2 天取 10 uL 连接产物转化感受态细胞 DH5 α 并将其涂布于含 kanr 的 LB 选择性平板进行筛选,挑取阳性单克隆,置于含 kanr 的 LB 液体培养基中,37 °C 振荡培养过夜,质粒抽提,双酶切鉴定并送大连宝生物公司测序。

1.2.3 Hepal-6 肝细胞的培养及转染 (1)细胞培养:将 Hepal-6 肝细胞接种于 6 孔板,细胞密度确保第 2 天每孔能汇合 80%,DMEM+10%FBS 培养(无双抗),CO₂ 细胞培养箱(5% CO₂,37 °C)孵育细胞。(2)细胞分组及转染:将 Hepal-6 肝细胞分为 3 组,即阴性对照组(仅加入相对量应的脂质体和 PBS 的细胞,negative control group,NC 组)、空载体组(转染空载体 pEGFP-N1 的细胞,blank control group,BC 组)、转染组(转染 pEGFP-DUSP9 的细胞,transfection group,TG 组),每组设平行实验复孔(3 孔),重复实验 2 次。将质粒和脂质体按 1:2.5 与 Opti-MEM 混合进行转染,转染方法按 Lipofectamine™ 2000 说明书。

1.2.4 DUSP9 mRNA 表达水平的检测 转染 48 h 后,分别提取各组细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA。采用 SYBR Green I 荧光染料实时定量 PCR 法检测 DUSP9 mRNA 的表达。以 β -actin 基因作为内参,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值表示基因相对表达量。所用引物即 DUSP9 上游:5'-GCT TCA GTG GTC GTG CC G-3',DUSP9 下游 5'-GGA GGG GAT GTG GTG TTC-3';小鼠 β -actin 上游引物:5'-GCT GTC CCT GTA TGC CTC T-3',下游:5'-GAT GTC ACG CAC GAT TTC C-3'。

1.2.5 DUSP9 蛋白表达水平的检测 采用 Western blot 法检测各组细胞 DUSP9 蛋白表达水平。提取各组细胞总蛋白,按每泳道加 80 ug 蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,半干转至聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜)(0.45 μ m),室温封闭 3 h,一抗(内参 β -actin 1:250,DUSP9 1:200 稀释)4 °C 孵育过夜,二抗(1:5 000 稀释)孵育 1 h 并洗脱,将 PVDF 膜置于化学发光板,加入发光试剂,室温反应 2 min 后置化学发光成像系统成像。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 pEGFP-DUSP9 重组真核表达质粒酶切、测序鉴定结果 pEGFP-DUSP9 质粒经 ECOR I、Age I 双酶切,切出约 4 700、1 359 bp 的片段,分别代表质粒 pEGFP-N1 和插入目的片段 DUSP9,与预期结果完全一致,说明 DUSP9 基因已正确克隆到 pEGFP-N1 表达载体。测序结果(部分见图 1)显示与目的基因序列(NM_029352)CDS 区完全一致。

2.2 pEGFP-DUSP9 转染的验证 倒置荧光显微镜下可见重组质粒转染 Hepal-6 细胞发绿色荧光,见图 2。

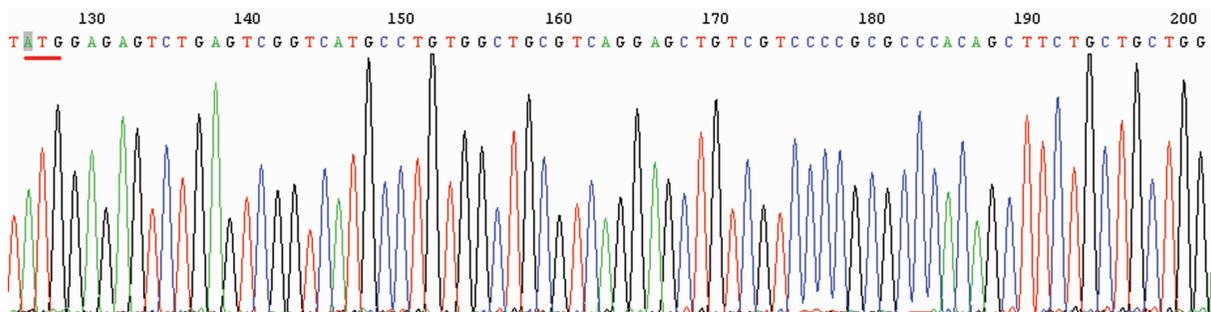
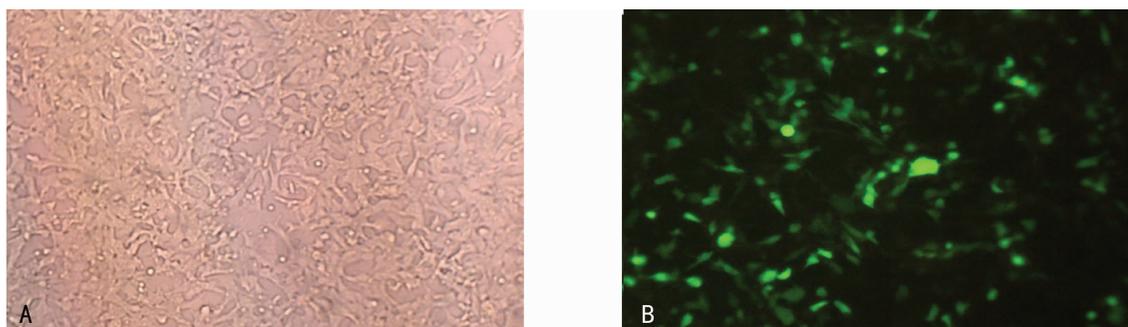


图 1 重组质粒 DNA 测序结果部分彩图(红色划线部分表示克隆序列的起始位)



A:普通光镜下转染前 Hepal-6 细胞;B:Hepal-6 细胞 pEGFP-DUSP9 转染荧光图。

图 2 Hepal-6 细胞培养及 pEGFP-DUSP9 转染图

2.3 DUSP9 过表达的验证 RT-QPCR、Western blot 检测结果显示,TG 组肝细胞中,DUSP9mRNA 表达量明显上调,是

NC 组 61.82 倍(ΔCt 值:11.18 \pm 0.35 vs 17.13 \pm 0.22, $P < 0.01$),其蛋白水平也呈高表达,NC、BC 组中 DUSP9 蛋白表达

较低,提示 DUSP9 质粒成功转染 Hepa1-6 肝细胞且高表达,见图 3。

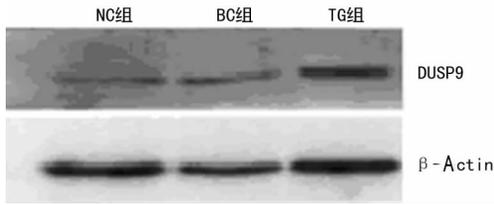


图 3 Western blot 检测各实验组 Hepa1-6 细胞中 DUSP9 的表达

3 讨论

胰岛素抵抗(IR)是 2 型糖尿病(T2DM)发病的一个关键因素,其产生是遗传和环境因素共同作用的结果。近年来随着国内外对 IR 的深入研究,氧化应激学说、炎症病因学说、内质网应激学说相继提出且成为 IR 的研究热点,其相关信号通路的调节子等研究更为深入。

MAPK 及应激活化蛋白激酶(stress-activated protein kinases, SAPK,)在 IR 发展进程中起着重要作用^[6],二者的作用靶点之一为胰岛素传导关键分子-胰岛素受体底物 1(insulin receptor substrate-1, IRS-1),均能使 IRS-1 丝氨酸残基磷酸化^[7],降低 IRS-1 酪氨酸磷酸化水平,进而阻碍了它与胰岛素信号传导系统下游元件的相互作用^[8],导致 IR 的发生。有趣的是 MAPK 及 SAPK 的激活是一个可逆的过程,阻断这些应激激酶可能阻止 IR 的发展。

DUSP9 作为可逆转应激通路中 MAPK 活性的双重专一性磷酸酶家族成员,可钝化细胞外调节蛋白激酶(extracellular-regulated protein kinases, ERK)及 p38MAPK 的活性,但对 SAPK 的作用尚无定论,最新研究发现在恶性肾肿瘤透明细胞下调 DUSP9 的表达与疾病的预后不良有关联^[9]。其在 IR 进程中的作用也尚未明确。有研究认为,在 3T3-F442A 脂肪细胞中过表达 DUSP9,可封闭胰岛素诱导的脂质形成及糖摄取,负向调节胰岛素信号,可能促使了 IR 的发生^[4]。然而,最新研究发现,在 3T3-L1 细胞中过表达 DUSP9,抑制 ERK 及 JNK/SAPK 的磷酸化以及在较小程度上抑制了 p38MAPK 磷酸化^[2]。茴香毒素诱导的 IRS-1 丝氨酸磷酸化被终止,IRS-1 酪氨酸磷酸化的信号路径得以恢复,从而恢复了胰岛素的敏感性,并且能逆转肿瘤坏死因子- α (TNF- α)抑制的胰岛素信号。

此外,有研究发现在小鼠白色脂肪可检测到 DUSP9 的表达;肥胖小鼠体内 DUSP9 在胰岛素敏感组织特异性上调表达;3T3-F442A 前脂肪细胞中 DUSP9 成低表达,在脂肪形成期表达上调^[9],说明 DUSP9 可能参与了促成熟脂肪细胞形成,或与脂质形成相关。但其在代谢组学如对糖脂代谢、脂肪细胞因子的作用尚未见进一步研究报道。

因此,本实验欲通过克隆 DUSP9 真核表达载体,并在胰岛素敏感组织-肝细胞(Hepa1-6)中过表达 DUSP9 蛋白,为进一步探讨 DUSP9 对糖脂代谢、脂肪细胞因子可能的作用及机制奠定研究基础。本实验中,利用 pEGFP-N1 质粒(带绿色荧光蛋白的报告载体)、采取双酶切定向克隆的方式(避免自连和反向连接)构建 DUSP9 重组真核表达载体。pEGFP-N1 包含增强型绿色荧光蛋白基因 EGFP,使得其在哺乳动物细胞中有较高的表达及较强的荧光得到最佳化,并为可应用流式细胞筛选或其他方式对瞬时转染哺乳动物细胞表达 EGFP 及目的蛋白的有效率提供一个依据;含有高效的功能强大的启动子

SV40 和 PCMV,可以使目的基因在增殖的细胞中稳定表达;结构上,该质粒具有很强的复制能力,可以满足随宿主细胞分裂时跟随细胞质遗传给新生的子细胞,这是保证目的基因稳定表达的因素之一;具有新霉素抗性(neo)基因,可以采用 G418 来筛选已成功转染了该载体的靶细胞。此外,采用含 Kanr 的 LB 选择性培养基筛选含 Kanr 转化子的质粒,并经双酶切初步鉴定克隆正确,最后经 DNA 测序分析确定所插入的目的基因片段的正确性。

本实验成功构建重组质粒 pEGFP-DUSP9,并在 Hepa1-6 肝细胞中高效表达 DUSP9 蛋白,有望成为 IR 发生的分子生物学治疗靶点,同时也为 T2DM 的治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] Teng CH, Huang WN, Meng TC. Several dual specificity phosphatases coordinate to control the magnitude and duration of JNK activation in signaling response to oxidative stress[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(39):28395-28407.
- [2] Emanuelli B, Eberlé D, Suzuki R, et al. Overexpression of the dual-specificity phosphatase MKP-4/DUSP-9 protects against stress-induced insulin resistance [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(9):3545-3550.
- [3] Christie GR, Williams DJ, Macisaac F, et al. The dual-specificity protein phosphatase DUSP9/MKP-4 is essential for placental function but is not required for normal embryonic development [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25 (18): 8323-8333.
- [4] Dickinson RJ, Williams DJ, Slack DN, et al. Characterization of a murine gene encoding a developmentally regulated cytoplasmic dual-specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (Pt 1): 145-155.
- [5] Xu H, Dembski M, Yang Q, et al. Dual specificity mitogen-activated protein(MAP) kinase phosphatase-4 plays a potential role in insulin resistance[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(32):30187-30192.
- [6] Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance [J]. *Nature*, 2002, 420(6913):333-336.
- [7] Aguirre V, Uchida T, Yenush L, et al. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307) [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (12): 9047-9054.
- [8] Aguirre V, Werner ED, Giraud J, et al. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(2):1531-1537.
- [9] Wu S, Wang Y, Sun L, et al. Decreased expression of dual-specificity phosphatase 9 is associated with poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11(413):413.