

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.32.005

人内脂酶 584C→T 变异型真核稳定表达载体的构建及其对人脐静脉内皮细胞生长的影响 *

陈 锦 曾毅丹 林琼霞 石 禹 唐夏泓 张 莹

(福建医科大学公共卫生学院 福建 福州 350108)

摘要 目的:构建人内脂酶(endothelial lipase, EL)野生型和 584C→T 变异型真核稳定表达载体及相应的转染细胞模型,为研究 584C→T 变异对内脂酶功能的影响奠定基础。**方法:**从 pMIG/hEL 及 pMIG/hEL584C→T 中双酶切分离出目标片段,与 pCMV-N-his 载体连接,凝胶电泳、双酶切电泳及测序鉴定构建的野生型和 584C→T 变异型内脂酶载体,而后以 Lipofectamine LTX & PLUS 为转染试剂,将其转入人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC), G418 筛选出稳定表达细胞,荧光定量 PCR 法检测转染细胞的 EL 表达,同时观察细胞形态,并用 CCK-8 法检测转染对细胞生长及细胞倍增时间的影响。**结果:**凝胶电泳及双酶切电泳结果显示条带位置与预期符合,测序结果表明其序列与 GenBank 上序列一致。荧光定量 PCR 法及 mRNA 电泳均显示:野生型和 584C→T 变异型转染细胞的 EL 表达显著高于空载体转染细胞。进一步研究 584C→T 变异对 HUVEC 细胞生长的影响,结果表明空载体、野生型 EL 和 584C→T 变异型 EL 转染 HUVEC 细胞与正常细胞的形态基本一致,且生长曲线和细胞倍增时间也无显著差异。**结论:**本实验成功构建了人内脂酶野生型和 584C→T 变异型真核稳定表达载体及相应的转染内皮细胞模型。EL 584C→T 变异对 HUVEC 细胞生长无明显影响。

关键词:内脂酶;584C→T 变异;真核表达载体;细胞生长

中图分类号:Q75;Q78;Q591;Q813 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)32-6220-05

Construction of the Stable Eukaryotic Expression Vector of Human Endothelial Lipase 584C→T Variation and Its Effect on the Growth of HUVECs*

CHEN Jin, ZENG Yi-dan, LIN Qiong-xia, SHI Yu, TANG Xia-hong, ZHANG Xuan

(Public Health School, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian, 350108, China)

ABSTRACT Objective: To construct the stable eukaryotic expression vectors and the transfected cell models of wild type and 584C→T variation of human endothelial lipase (EL). **Methods:** The wild and mutational EL fragment were isolated by double digestion from pMIG/hEL and pMIG/hEL584C→T were ligated with the digested pCMV-N-his vector. Restriction and sequencing were used to identify the constructional vectors of wild type and 584C→T variation. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were transfected by the wild EL and 584C→T mutational EL with Lipofectamine LTX & PLUS transfection reagent were screened by G418 to obtain the stable expression cells. Furthermore, EL expression level in the transfected cells were measured by fluorescence quantitative PCR, and the cell morphology was observed. Finally, CCK-8 was used to detect the effect of 584C→T variation on the cell growth of HUVECs and cell doubling time was calculated. **Results:** The bands positions of gel electrophoresis and restriction were in line with expectations. The sequence determined was identical with it in GenBank. EL expression in transfected cells of the wild type EL and 584C→T mutation type EL, detected by fluorescence quantitative PCR and mRNA electrophoresis, were significantly higher than that of empty vector. Cell morphology of the transfected cells of empty vector, wild-type EL and 584C→T EL mutant and normal HUVEC were basically the same. In accordance with it, the growth curve and cell doubling time among them were no difference. **Conclusion:** Stable eukaryotic expressing vector of the wild type and 584C→T variation of human endothelial lipase were successfully constructed, and the transfected cell models were established. The variation of EL had no obvious effect on the growth of HUVECs.

Key words: Endothelial lipase; 584C→T variation; Eukaryotic expression vector; Cell growth

Chinese Library Classification: Q75; Q78; Q591; Q813 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)32-6220-05

前言

内脂酶(endothelial lipase, EL)是 1999 年发现的甘油三

酯脂肪酶基因家族的新成员^[1,2]。与脂蛋白脂酶、肝脂酶等其它家族成员不同,EL 以磷脂酶活性为主,甘油三酯脂酶活性较弱,其主要作用底物是高密度脂蛋白(high density lipoprotein,

* 基金项目:福建省自然科学基金项目(2010J01168)

作者简介:陈锦(1971-),女,硕士,讲师,主要研究方向:生化及分子医学,电话:0591-22862582, E-mail:1716002380@qq.com

(收稿日期:2014-05-23 接受日期:2014-06-18)

HDL)。大量研究^[3-5]显示 EL 与脂蛋白代谢、炎症反应、动脉硬化等均密切相关。人的 EL 基因定位于 18q21.1,长约 75 kb,由 11 个外显子和 10 个内含子构成,存在较多的多态性位点,其中 584C→T 在人群中的发生频率较高,584C→T 的变异导致 EL 第 111 位氨基酸从苏氨酸变为异亮氨酸,而此改变对 EL 功能是否有影响目前还不清楚。本研究拟构建野生型及 584C→T 变异型 EL 真核稳定表达载体及转染细胞模型,并进一步探讨 EL 584C→T 变异对 HUVECs 生长的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 pMIG/hEL 及 pMIG/hEL584C→T 为本实验室保存的含内脂酶编码序列的野生型及 584C→T 变异型载体;人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC),南京凯基生物研究所提供;限制性内切酶 *Bam*HI、*Eco*RI、*Bgl*II (TAKARA 公司);高效感受态细胞制备试剂盒、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海生工生物工程公司);快速 DNA 连接试剂盒、CCK-8 试剂盒、pCMV-N-his、DH5 α 菌种(碧云天生物技术公司);质粒 DNA 中量无内毒素提取试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司),转染试剂 Lipofectamine LTX & PLUS (invitrogen);PCR 引物由上海生工生物工程公司合成;荧光定量 RT 及 PCR 试剂盒分别为 TAKARA 公司的 PrimeScriptTM RT reagent Kit (Perfect Real Time) 和 SYBR[®] Premix Ex TaqTM (Tli RNaseH Plus)试剂盒。

1.1.2 主要仪器 电泳仪(Bio-Rad 公司),凝胶成像系统(基因有限公司),Roche LightCycler480 实时荧光定量 PCR 系统(Roche 公司),ND-1000 型核酸蛋白测定仪(美国 NANODROP)。

1.2 方法

1.2.1 野生型(pCMV-N-his/hEL)及变异型(pCMV-N-his/hEL584C→T)EL 真核稳定表达载体构建 目的基因片段获得:在含 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中接种 pMIG/hEL、pMIG/hEL584C→T,在含 50 μ g/ml 卡那霉素的 LB 培养基板上接种 pCMV-N-his,37℃ 恒温培养 16-24 小时,挑取单个菌落于相应抗生素的 LB 培养液中,置于 HZ-9210K 台式冷冻摇床中,转速 280rpm,恒温 37℃ 培养 12-16 小时,严格按 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒说明书操作提取质粒 DNA,而后用限制性内切酶 *Bgl* II、*Eco*RI 酶切 pMIG/hEL、pMIG/hEL584C→T,用限制性内切酶 *Bam*HI、*Eco*RI 酶切载体 pCMV-N-his,37℃ 过夜,酶切产物经琼脂糖凝胶电泳,在紫外透射仪下分别切取含 hEL、hEL584C→T 及 pCMV-N-his 线性载体 DNA 条带的胶块,按 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒说明书操作进行凝胶 DNA 片段回收。

野生型及变异型载体构建:应用快速 DNA 连接试剂盒,将上述凝胶回收的 hEL、hEL584C→T 分别与 pCMV-N-his 片段连接,取连接液 5 μ L,转化入预先用高效感受态细胞制备试剂盒制备好的 100 μ L DH5 α 超级感受态细菌中,取适量菌液涂布至于含卡那霉素的 LB 平板中,37℃ 培养箱中倒置培养 16 小时,观察菌落生长状况。

重组的野生型及变异型 EL 载体的鉴定:分别随机挑取上述培养皿中单个菌落于含卡那霉素的 LB 培养液中,37℃ 280 rpm 摇菌 12-16 小时,提取质粒 DNA,进行琼脂糖凝胶电泳分析,条带正确者再经 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切鉴定,并经测序证实。

1.2.2 细胞转染与鉴定 质粒 DNA 的提取:扩增含 pCMV-N-his(空载体)和野生型 EL 及变异型 EL 质粒的 DH5 α 菌,用康为世纪无内毒素质粒中提试剂盒抽提质粒 DNA,测定其浓度和纯度,用于后续细胞转染试验。

细胞转染及筛选:依次往 200 μ L 管中加入 RPMI 1640 25 μ L,质粒 DNA 500ng,PLUS 0.5 μ L,随后将此混合液轻轻加入含 25 μ L RPMI 1640 及 2 μ L Lipofectamine LTX 的 200 μ L 管中,室温孵育 5 分钟,将其滴入已换新鲜培养基的密度为 70% 的 HUVEC 中,三天后,以 400 ng/ μ L G418 筛选,14 天后未转染细胞全部死亡,此时挑出转染细胞中阳性克隆扩大培养,G418 浓度则改为维持浓度即筛选浓度的一半,此筛选后扩增的细胞即为转染细胞。

转染细胞中 EL 的表达:采用荧光定量 PCR 法。把上述经筛选后扩大培养的转染细胞接种于六孔板中,待细胞长满,移去培养液,加入 1 mL Trizol,提取转染细胞的总 RNA,逆转录成 cDNA 后,在 Roche LightCycler480 上进行荧光定量 PCR 分析。扩增条件为:95℃ 30 秒;95℃ 5 秒,60℃ 34 秒,45 个循环。EL 引物上游为 5'-gaggtcaaaccatctgtgagg-3',下游为 5'-tg-gcgtcttctctctgtgt-3'。内参 β -actin 引物上游为 5'-gggaaatcgt-gcgtgacattaag-3';下游为 5'-tgtgttgccgtacaggtctttg-3'。扩增产物经凝胶电泳分析验证。

1.2.3 野生型及 584C→T 变异型 EL 转染对 HUVECs 细胞生长的影响 转染对细胞形态的影响:将上述经筛选后稳定表达内脂酶的转染细胞培养在六孔板中,待细胞近融合,倒置显微镜下观察细胞形态并拍照。

转染细胞生长曲线:将生长状态良好的转染细胞,制成细胞悬液,稀释后均匀接种于 96 孔板中,每孔培养液量为 100 μ L。每天取 3 孔,测定前 4 小时加入 10 μ L CCK 8 溶液,在酶标仪上 450 nm 处读取吸光度值,总共测定 5 天。以培养时间为横坐标,吸光度为纵坐标绘制细胞生长曲线。

转染对细胞倍增时间的影响:首先把待检细胞制成细胞悬液,以一定细胞密度梯度,分别接种于 96 孔板,每孔 100 μ L,重复 3 孔。采用 CCK-8 法测量吸光度值,以细胞数为横坐标,吸光度为纵坐标绘制细胞数标准曲线。而后按公式计算细胞倍增时间,其中 t 为培养时间,N t 为培养 t 时间后细胞数,N0 为初种细胞数。

1.3 数据统计分析

所得数据在 excel 上建立数据库,采用 SPSS19.0 软件统计分析,数据先经方差齐性检验,而后分别用重复度量方差分析和单因素方差分析等,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 野生型及 584C→T 变异型 EL 真核稳定表达载体的构建

如图 1 所示,pMIG/hEL、pMIG/hEL584C→T 及 pCMV-N-his 经双酶切后的电泳条带,hEL 与 hEL584C→T 条带为

1503bp, pCMV-N-his 条带为 4297bp。图 2 所示为重组构建成功的野生型和变异型 EL 载体的电泳图, 目标条带位置与理论值相符。图 3 所示为重组的 pCMV-N-his/hEL 及 pCMV-

N-his/hEL584C→T 载体又经 *Bam* H I 和 *Eco* R I 双酶切后电泳, 其中大于 4000bp 的条带为 pCMV-N-his, 小于 1000bp 的条带分别为 hEL 和 hEL584C→T 的片段。

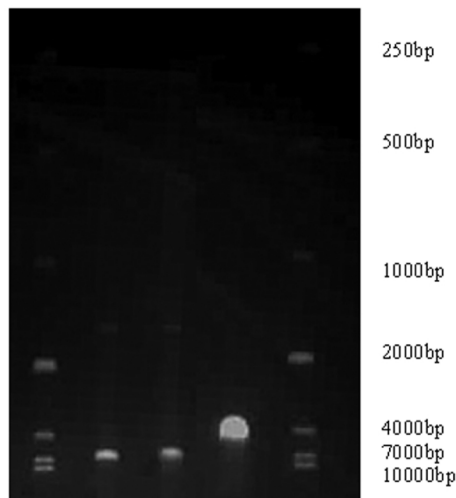


图 1 pMIG/hEL、pMIG/hEL584C→T 及 pCMV-N-his 双酶切凝胶电泳

Fig.1 Gel electrophoresis of pMIG/hEL, pMIG/hEL584C→T and pCMV-N-his lane1: pMIG/hEL/hEL584C→T; lane2: pMIG/hEL; lane3: pCMV-N-his

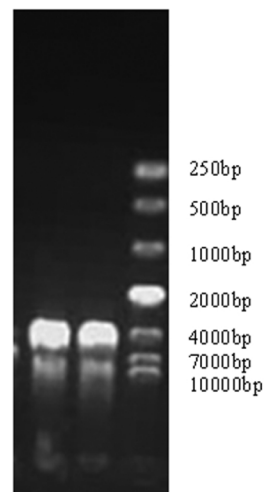


图 2 重组的野生型及变异型内皮脂酶载体 Fig.2 Recombinant vector of wild EL and variant EL

lane1: wild EL, lane2: variant EL

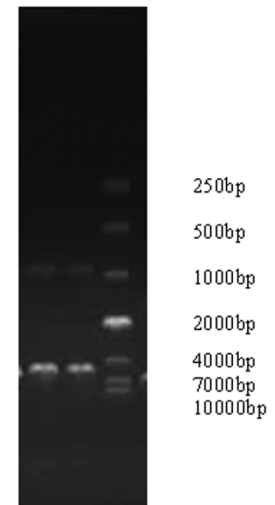


图 3 重组的内皮脂酶载体双酶切电泳 Fig.3 Electrophorogram of double digesting recombinant vectot

lane1: wild EL, lane2: variant EL by double digestion

2.2 转染 HUVECs 细胞中 EL 的表达

荧光定量 PCR 分析显示: 与空载体转染的细胞相比, 野生型和变异型转染细胞的 EL 表达均显著提高, 差异均有统计学

意义 ($P < 0.05$), 见表 1。mRNA 凝胶电泳分析也显示一致的结果 (图 4)。

表 1 荧光定量 PCR 测定转染 HUVECs 细胞中 EL 的 mRNA 表达

Table 1 EL mRNA expression in transfected HUVECs cells measured by fluorescence quantitative PCR

Cell group	R	P
Wild type	268.356± 26.317	0.007
Variation	59.614± 1.746	0.001
Empty vector	1.006± 0.136	

Note: as inequal variance, Dunnett T3 test was used when comparing between two groups, P value: compared with group of empty vector.

2.3 转染野生型及 584C→T 变异型 EL 对 HUVECs 细胞生长的影响

2.3.1 对细胞形态的影响 将生长状态良好的正常 HUVEC 细胞及空载体、野生型 EL 和 584C→T 变异型 EL 转染的 HUVEC 细胞置于倒置显微镜下观察, 结果如图 4: 四者的细胞形态基本一致, 细胞呈单层贴壁生长, 形态不规则, 铺路石样排列, 边界清楚, 核仁、核膜清晰可见。

2.3.2 对细胞生长曲线的影响 表 2 为转染细胞生长曲线试验测得的吸光度值, 经重复度量方差分析, 空载体、野生型 EL 和 584C→T 变异型 EL 转染细胞与正常的 HUVEC 细胞比较无显著差别 (均 $P > 0.05$)。如图 6 所示, 各组细胞生长呈近 S 型曲线, 在第二天时进入快速生长期。

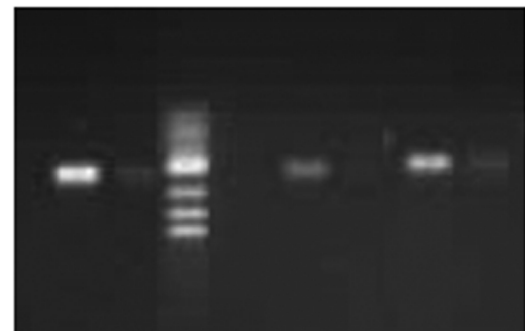


图 4 转染 HUVECs 细胞中 EL 的 mRNA 凝胶电泳

Fig.4 Gel electrophoresis of EL mRNA in transfected HUVECs cells M: DNA marker, down to up: 500bp, 400bp, 300bp, 200bp(lightest), 150bp, 100bp 和 50bp;

lane 1 and lane 2: β -actin and EL of variation; lane 3 and lane 4: β -actin and EL of empty vector; lane 5 and lane 6: β -actin and EL of wild type.

2.3.3 对细胞倍增时间的影响 根据公式计算各组转染细胞的倍增时间, 结果见表 3, 空载体、野生型 EL 和 584C→T 变异型 EL 转染细胞的倍增时间与正常的 HUVEC 细胞比较均无显著差别 (均 $P > 0.05$)。

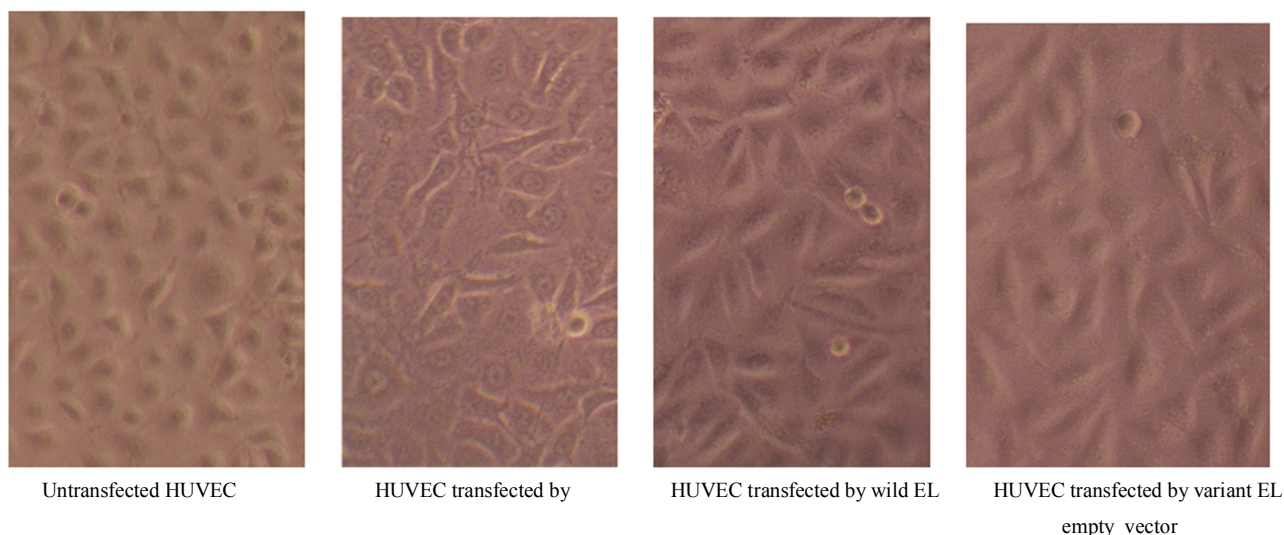


图 5 转染野生型及 584C→T 变异型 EL 载体对 HUVECs 细胞形态的影响(200×)

Fig. 5 Effect of transfection by pCMV-N-his/hEL and pCMV-N-his/hEL584C→T on the morphology of HUVECs

表 2 转染野生型及 584C→T 变异型 EL 载体对 HUVECs 生长曲线的影响

Table 2 Effect of transfection by pCMV-N-his/hEL and pCMV-N-his/hEL584C→T on the growth curve of HUVECs

Cell group	DAY1	DAY2	DAY3	DAY4	DAY5
Wild type	0.108± 0.011	0.197± 0.046	0.457± 0.022	0.573± 0.035	0.672± 0.047
Variation	0.105± 0.017	0.205± 0.028	0.460± 0.027	0.584± 0.029	0.659± 0.040
Empty vector	0.097± 0.020	0.194± 0.019	0.447± 0.024	0.592± 0.026	0.688± 0.025
Untransfected HUVEC	0.091± 0.014	0.184± 0.020	0.474± 0.036	0.601± 0.030	0.694± 0.039

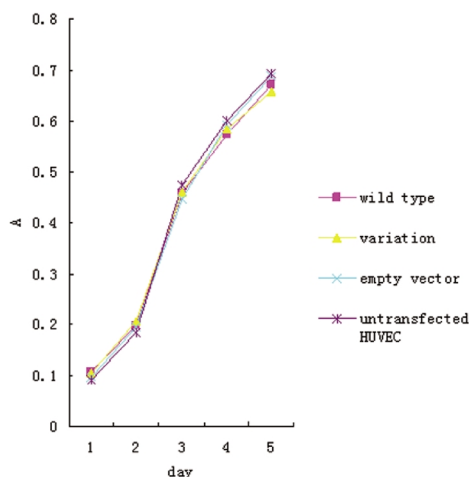
Note: Mauchly sphericity test $W=0.227$ $P=0.407$.

图 6 转染对细胞生长曲线的影响

Fig. 6 Effect of transfection by pCMV-N-his/hEL and pCMV-N-his/hEL584C→T on the growth curve of HUVECs

表 3 转染野生型及 584C→T 变异型 EL 载体对 HUVECs 倍增时间的影响

Table 3 Effect of transfection by pCMV-N-his/hEL and pCMV-N-his/hEL584C→T on the cell doubling time of HUVECs

Cell group	Cell doubling time(Hours)
Wild type	23.097± 2.076
Variation	22.651± 3.095
Empty vector	21.718± 2.381
Untransfected HUVEC	20.281± 2.318

低 HDL 水平外,还参与了载脂蛋白 B 代谢和胆固醇的逆向转运。Ishida 等^[9]的实验揭示 EL 基因敲除小鼠的动脉粥样硬化面积减少 70%,这表明 EL 在动脉硬化的发生中具有一定的作用。因此,EL 将可能成为冠心病、动脉粥样硬化等疾病研究的新方向。

一直以来,EL 的基因多态性对脂质特别是 HDL-C 水平是否有影响是研究的热点问题。2002 年,deLemos 等^[9]首次发现 EL 基因的 17 个基因变异,其中 584C→T 变异较常见,且在不同种族和国家间其突变率存在明显差异,但关于此多态性位点与血脂代谢的关系,目前报道结果不一致。Durlach 等^[10]和 Liu^[11]等的资料均表明 EL584C→T 与体内 HDL 水平有关。Cai^[12]等收集了所有 EL 584C→T 与 HDL-C 及冠心病的研究报道,进行 meta 分析,结果显示白族人中 EL584 位点有 T 等位基因者其 HDL-C 的水平较高。但也有研究未显示出二者的关联^[13-15]。因此,该位点的多态性是否影响 EL 的表达及功能,仍需进一步

3 讨论

近年来,HDL 在冠心病中的作用日益受重视,资料表明至少 50%的高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)变异是遗传决定的,但其机制至今尚未完全阐明。EL 主要作用于 HDL,促使 HDL 分解,HDL-C 减少,是体内 HDL 水平的主要决定因素^[6]。Tanaka^[7]等用基因敲除和腺病毒介导过表达来调控体内 EL 水平,发现小鼠 HDL-C 与 EL 的表达呈负相关。EL 作为唯一由内皮细胞分泌的脂酶,除了主要降

的研究来证实。

本研究所用的 pCMV-N-his 载体含有 CMV 启动子, 可以高效启动目的蛋白在细胞中的表达, 在 N 端有 His tag 标签, 且转染哺乳动物细胞后可用 G418 筛选, 故有利于构建真核稳定表达载体和表达后的检测。本研究结果显示: 与空载体转染细胞比较, 重组的 pCMV-N-his/hEL (野生型) 及 pCMV-N-his/hEL584C→T(变异型)载体转染细胞的 EL 表达水平均显著增高, 表明野生型 EL 和 584C→T 变异型 EL 已转入到 HUVEC 细胞中, 而此转染的细胞又经过了 G418 筛选后扩增培养的, 提示野生型 EL 和 584C→T 变异型 EL 已在 HUVEC 细胞中稳定表达, 故此表明本研究已成功建立了野生型 EL 和 584C→T 变异型 EL 的转染细胞模型。进一步研究转染不同载体对 HUVEC 细胞生长的影响, 结果显示空载体、野生型 EL 和 584C→T 变异型 EL 转染细胞与正常 HUVEC 细胞的形态基本一致, 且生长曲线和细胞倍增时间也无差异。这表明转染不同载体不会对 HUVEC 细胞生长造成损害, 因此, 本试验构建成功的转染细胞模型可用于后续野生型 EL 和 584C→T 变异型 EL 的功能研究。

综上所述, 本研究成功构建了人内脂酶野生型和 584C→T 变异型真核稳定表达载体及相应的转染细胞模型, 为研究 584C→T 变异对内脂酶功能的影响奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Hirata K, Dichek HL, Cioffi JA, et al. Cloning of a unique lipase from endothelial cells extends the lipase gene family [J]. J Biol Chem, 1999, 274(20): 14170-14175
- [2] Jaye M, Lynch KJ, Krawiec J, et al. A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism[J]. Nat Genet, 1999, 21(4): 424-428
- [3] Zhang J, Yu Y, Nakamura K, et al. Endothelial lipase mediates HDL levels in normal and hyperlipidemic rabbits[J]. J Atheroscler Thromb, 2012, 19(3): 213-226
- [4] Riederer M, Lechleitner M, Hrzenjak A, et al. Endothelial lipase (EL) and EL-generated lysophosphatidylcholines promote IL-8 expression in endothelial cells[J]. Atherosclerosis, 2011, 214(2): 338-344
- [5] Sun L, Ishida T, Miyashita K, et al. Plasma activity of endothelial lipase impacts high-density lipoprotein metabolism and coronary risk factors in humans[J]. J Atheroscler Thromb, 2014, 21(4): 313-321
- [6] Cohen JC. Endothelial lipase: direct evidence for a role in HDL metabolism[J]. J Clin Invest, 2003, 111(3): 318-321
- [7] Tanaka H, Ishida T, Johnston TP, et al. Role of endothelial lipase in plasma HDL levels in a murine model of hypertriglyceridemia [J]. J Atheroscler Thromb, 2009, 16(4): 327-338
- [8] Ishida T, Choi SY, Kundu RK, et al. Endothelial lipase modulates susceptibility to atherosclerosis in apolipoprotein-E deficient mice [J]. J Biol Chem, 2004, 279(43): 45085-45092
- [9] DeLemos AS, Wolfe ML, Long CJ, et al. Identification of genetic variants in endothelial lipase in persons with elevated high-density lipoprotein cholesterol[J]. Circulation, 2002, 106(11): 1321-1326
- [10] Durlach V, Durlach A, Movesayan I, et al. Association of endothelial lipase Thr111Ile polymorphism with lipid metabolism and microvascular complications in type 2 diabetic patients [J]. Diabetes Metab, 2011, 37(1): 64-71
- [11] Liu WY, Yin RX, Zhang L, et al. Association of the LIPG 584C > T polymorphism and serum lipid levels in the Guangxi Bai Ku Yao and Han populations[J]. Lipids Health Dis, 2010, 9(1): 110
- [12] Cai G, Huang Z, Zhang B, et al. The associations between endothelial lipase 584C/T polymorphism and HDL-C level and coronary heart disease susceptibility: a meta-analysis[J]. Lipids Health Dis, 2014, 13(1): 85
- [13] Razzaghi H, Tempczyk-Russell A, Haubold K, et al. Genetic and structure-function studies of missense mutations in human endothelial lipase[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e55716
- [14] Jensen MK, Rimm EB, Mukamal KJ, et al. The T111I variant in the endothelial lipase gene and risk of coronary heart disease in three independent populations[J]. Eur Heart J, 2009, 30(13): 1584-1589
- [15] Edmondson AC, Brown RJ, Kathiresan S, et al. Loss-of-function variants in endothelial lipase are a cause of elevated HDL cholesterol in humans [J]. J Clin Invest, 2009, 119(4): 1042-1050