

人血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 双顺反子表达载体的构建及其在 293T 细胞中的表达

于田田, 李敬达, 刘庆平, 王仁军, 乔辉, 陈玉华, 李明英, 于柯楠, 迟彦

(大连大学生命科学与技术学院 糖脂代谢重点实验室, 辽宁省大连市 116622)

[关键词] 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1; 氧化型低密度脂蛋白; 动脉粥样硬化; 双顺反子真核表达载体

[摘要] **目的** 尝试构建人血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1(LOX-1)基因双顺反子表达载体并检测其在 293T 细胞中的表达情况和生物学活性,为深入探讨 LOX-1 在动脉粥样硬化中的作用和以 LOX-1 为靶点建立干预机制治疗动脉粥样硬化奠定基础。**方法** 首先根据 Primer5.0 软件设计引物,采用聚合酶链反应法以 LOX-1 cDNA 片段为模板扩增 LOX-1 基因完整编码区,克隆至 T 载体,经测序成功后亚克隆到双顺反子真核表达载体 pIRES2-AcGFP1-Nuc。利用脂质体转染法将双顺反子重组表达质粒转染至 293T 细胞,倒置荧光显微镜检测质粒转染情况。采用逆转录聚合酶链反应和免疫印迹法鉴定 LOX-1 基因在核酸和蛋白水平的表达,采用激光共聚焦检测 LOX-1 基因在 293T 细胞膜上的表达,激光共聚焦和流式细胞术检测表达在 293T 细胞膜上的 LOX-1 结合氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)的生物学活性。**结果** 成功构建 pIRES2-LOX-1 双顺反子重组表达载体,将其转染 293T 细胞后,观察到绿色荧光蛋白基因的表达,初步表明 LOX-1 基因转染至 293T 细胞。进一步分子水平鉴定结果表明 LOX-1 基因在 293T 细胞核酸和蛋白水平均得到表达,激光共聚焦结果证明 LOX-1 基因在 293T 细胞膜上表达。最后激光共聚焦和流式细胞术结果证实表达在 293T 细胞膜上的人 LOX-1 基因可以结合氧化型低密度脂蛋白。**结论** 成功构建人 LOX-1 基因双顺反子表达载体,在此基础上证明其在 293T 细胞膜上得到表达,并且具有结合 ox-LDL 的生物学活性,为后续体外研究其在动脉粥样硬化中的作用以及以此为靶点建立干预机制奠定了基础。

[中图分类号] Q81

[文献标识码] A

Establishment of human lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 bicistronic expression vector and its expression in 293T cells

YU Tian-Tian, LI Jing-Da, LIU Qing-Ping, WANG Ren-Jun, QIAO Hui, CHEN Yu-Hua, LI Ming-Ying, YU Ke-Nan, CHI Yan

(College of Life Science and Technology, Dalian University & Key Laboratory of Carbohydrate and Lipid Metabolism Research, Dalian, Liaoning 116622, China)

[KEY WORDS] Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1; Oxidized low density lipoprotein; Atherosclerosis; Bicistronic eukaryotic expression vector

[ABSTRACT] **Aim** Trying to establish a lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) bicistronic gene expression vector and detect its expression and function in 293T cell, to explore the role of LOX-1 in atherosclerosis and lay a foundation for establishing intervention mechanism of LOX-1 targets. **Methods** First human LOX-1 gene was obtained from human cDNA by PCR and cloned into T plasmid. After sequencing, recombinant T plasmid was subcloned into bicistronic eukaryotic expression plasmid pIRES2 AcGFP1-Nuc. Next the bicistronic recombinant expression plasmid was transfected into 293T cells by liposome. Plasmid transfection efficiency was detected by inverted fluorescence microscope. Then the expression of exogenous human LOX-1 gene and protein in 293T cells was detected by RT-PCR and

[收稿日期] 2016-03-17

[修回日期] 2016-04-23

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81202536);辽宁省大学生创新训练项目(201511258040)

[作者简介] 于田田,硕士研究生,研究方向为重组蛋白 beta2-GPI DV 通过抑制 ox-LDL 与 LOX-1 结合治疗动脉粥样硬化及继发血栓疾病,E-mail 为 yixin2008wenxin@163.com。李敬达与于田田对本文有相同贡献。通讯作者迟彦,博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向为动脉粥样硬化及继发血栓形成的细胞分子生物学研究,E-mail 为 chi_yan@126.com。

Western blot. The expression of human LOX-1 in 293T cells membrane was detected by confocal laser. Finally LOX-1 functions of binding with ox-LDL in 293T cell membrane was detected by confocal laser and flow cytometry. **Results**

The pIRES2-LOX-1 bicistronic recombinant plasmid was constructed successfully. After transfection, green fluorescent protein was detected and the abundant LOX-1 mRNA and protein were expressed in the transfected cells, moreover human LOX-1 were expressed in the 293T cells membrane and could bind with ox-LDL. **Conclusion** We have successfully

established a LOX-1 gene bicistronic expression vector and on the basis we testified human LOX-1 expressed in 293T cells membrane and could bind with ox-LDL, which layed a foundation for further study of its effect in atherosclerosis and establishing intervention mechanism of LOX-1 targets.

血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 (lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1) 是近年来新发现的巨噬细胞表面主要的氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 受体^[1-2], 属于 C 型植物凝集素样 II 型跨膜蛋白^[3]。ox-LDL 是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的关键致病因子^[4], 可通过多种途径诱发疾病的发生^[5]。其中, 巨噬细胞表面清道夫受体识别并内吞 ox-LDL 进而导致单核巨噬细胞转变为泡沫细胞, 是 As 疾病发生的关键事件^[1,6]。有研究表明 LOX-1 能特异性地结合并摄取 ox-LDL, 通过介导由 ox-LDL 诱导的一系列病理变化, 如巨噬泡沫细胞的形成、内皮细胞活化和紊乱、平滑肌细胞的迁徙和增殖等途径诱发 As 的发生发展^[2-3]。阻断或者封闭 ox-LDL 与巨噬细胞表面 LOX-1 的结合, 进而阻断由 ox-LDL 引发的一系列病理反应, 对于 As 的防治提供了新的方向和思路^[7]。但由于巨噬细胞表面除 LOX-1 外, 还有其他结合和吞噬 ox-LDL 的清道夫受体, 如 CD36、SR-B I 等, 这些受体在 LOX-1 基因被沉默后会代偿性的吞噬 ox-LDL^[8], 这为单独研究 ox-LDL 与 LOX-1 的相互作用以及建立干预二者结合的策略从而治疗 As 带来了挑战。因此建立表达 LOX-1 的细胞模型, 为体外单独研究 ox-LDL 与 LOX-1 的作用及后续的干预机制提供了保障。鉴于 293T 细胞本身并没有 LOX-1 基因的表达, 因此本实验拟构建人 LOX-1 基因的双顺反子表达载体, 在此基础上将其转染至 293T 细胞, 实现在 293T 细胞膜上的表达, 为在体外单独研究 ox-LDL 与 LOX-1 的相互作用及后续的干预机制提供保障。

1 材料和方法

1.1 主要材料

人源 LOX-1 基因片段购自于 Sino Biological Inc; 293T 细胞株购自 ATCC 库 (Manassas, VA, USA); pIRES2-AcGFP1-Nuc 载体购于 Clontech Cor-

poration; 抗 LOX-1 单克隆抗体 (ab-81709) 购于 Abcam 生物技术公司 (Abcam, CA, USA); opti-MEM I Reduced Serum Medium (无血清) 培养基、脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 购于 Invitrogen 公司; DL2000、DL5000 Marker、限制性内切酶 EcoR I、Nhe I 及 T 载体 (PMD19-T simple vector) 均购自 TaKaRa 公司; 胎牛血清购自 Hyclone 公司; DiI-ox-LDL 购自北京协生生物科技有限公司; 抗生素均购自生化生物工程有限公司。引物由上海生工有限公司合成。

1.2 LOX-1 基因的扩增

根据 GeneBank 中 LOX-1 序列比对, 以软件 Primer 5.0 设计扩增引物。LOX-1 引物设计: 上游引物 (引物 1): 5'-CTAGCTAGCATGACTTTTIGATGACCTAAAG-3', 下游引物 (引物 2): 5'-TTGGAATFCTCACTGTGCTCTTAGGTTTGC-3'。其中引物 1 中 5' 端含有保护碱基、Nhe I 酶切位点 (单划线) 以及 LOX-1 5' 端部分氨基酸编码基因序列; 引物 2 中 5' 端含有保护碱基、EcoR I 酶切位点 (单划线) 以及 LOX-1 3' 端部分氨基酸编码基因的互补序列以及终止密码子。以购买得到的 LOX-1 cDNA 为模板, 以引物 1、2 进行 PCR。PCR 反应条件为: 95°C 预变性 10 min; 95°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72°C 终延伸 10 min。取 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 凝胶回收试剂盒回收目的基因, 并连接至 pMD19-T simple vector。将连接产物转化 DH5 α 感受态菌, Ampicillin (50 mg/L) 抗性筛选后进行 PCR 鉴定, 并挑选阳性克隆扩大培养后提取质粒, 送至 TaKaRa 公司测序。测序结果与 GeneBank 中的人 LOX-1 序列比对, 鉴定序列正确后将重组质粒命名为 LOX-1-T。

1.3 双顺反子重组表达载体的构建及鉴定

将 LOX-1-T 重组质粒置于大肠杆菌 DH5 α 中扩增, 提取 LOX-1-T 重组质粒和双顺反子 pIRES2-AcGFP1-Nuc 载体质粒, 分别用 Nhe I、EcoR I 进行双酶切。回收酶切产物 LOX-1 片段和 pIRES2-AcG-

FP1-Nuc 载体片段, TaKaRa 连接试剂盒 22℃ 连接 1 h。将连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 涂布到 Kana (50 mg/L) 抗性固体培养基, 37℃ 过夜培养后挑选阳性菌落进行菌落 PCR, 并扩大培养后提取质粒, 进行 Nhe I、EcoR I 双酶切鉴定, 获得双顺反子重组表达载体 pIRES2-LOX-1。

1.4 pIRES2-LOX-1 双顺反子表达载体转染 293T 细胞

人 293T 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基中培养至对数生长期, 转染前 24 h, 细胞经 0.25% 胰酶-EDTA 消化, 按每孔接种 5×10^5 个细胞量接种于 6 孔板培养, 次日细胞约 70% 融合。细胞随机分为 3 组, 未转染的 293T 细胞为对照组, 转染空载体 pIRES2-AcGFP1-Nuc 的 293T 细胞为空载体组, 转染重组质粒 pIRES2-LOX-1 的 293T 细胞为重组质粒组。将 4.0 μ g DNA 质粒和 10 μ L 脂质体 Lipofectamine 2000 分别加入 250 μ L opti-MEM I Reduced Serum Medium (无血清) 培养基中, 室温静置 5 min, 再将含质粒的无血清培养基和含脂质体的无血清培养基混合摇匀, 室温静置 20 min 后加至 6 孔板中, 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。6 h 后, 去除转染液, 加入 DMEM 完全培养基, 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养。转染后每隔 12 h 观察空载体组和重组质粒组荧光强度, 并拍照记录。

1.5 逆转录聚合酶链反应检测 LOX-1 在基因水平上的表达情况

用 Trizol 抽提法提取上述三组细胞总 RNA, 采用 RT-PCR 方法, 利用 LOX-1 基因内侧引物定性检测 LOX-1 mRNA 的转录情况。LOX-1 内侧引物分别是: 5'-GGTGCTGGGCATGCAATTAT-3' 和 5'-CATTCCTTGAGTTCGTTTTCTGA-3', 扩增产物为 156 bp。反应条件: 95℃ 预变性 10 min; 然后 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物用含溴化乙啶的 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 紫外凝胶成像系统拍照检测 LOX-1 基因表达情况。

1.6 Western blot 检测 LOX-1 在蛋白水平上的表达情况

分别提取三组细胞的总蛋白质, 用 12% 的胶进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳后将蛋白转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 抗 LOX-1 抗体 4℃ 缓慢孵育过夜, 含 2.5% 脱脂奶粉的 TBST 洗膜 2 次, 每次 5 min。HRP 标记山羊抗兔的二抗室温缓慢孵育 1 h, 清洗同上。ECL 显色, 化学发光成像系统分析检测结果。

1.7 激光共聚焦检测 LOX-1 在 293T 细胞膜上的表达情况

转染前 24 h, 取对数生长期的 293T 细胞按每皿 5×10^5 个细胞接种于 2 个激光共聚焦小皿中, 次日待细胞融合度达到 70% 左右时, 转染空载体 pIRES2-AcGFP1-Nuc 的 293T 细胞记为空载体组, 转染重组质粒 pIRES2-LOX-1 的 293T 细胞为重组质粒组。转染共 48 h 后, 弃去培养基, 用 PBS 清洗。然后依次加入 4% 多聚甲醛固定 15 min, 用 1% BSA 37℃ 封闭 1 h, 0.1% TritonX-100 通透 15 min。之后加入抗 LOX-1 抗体, 37℃ 孵育 2 h 后用罗丹明标记抗鼠二抗孵育 1 h, PBS 清洗, 上机检测。

1.8 激光共聚焦检测 293T 细胞膜上表达的 LOX-1 的生物学活性

利用上述构建的表达人 LOX-1 基因的 293T 细胞, 采用激光共聚焦检测 293T 细胞膜上表达的 LOX-1 是否具有结合 DiI-ox-LDL 的生物学活性。同上, 待细胞融合度达到 70% 左右时, 转染重组质粒 pIRES2-LOX-1。转染 48 h, 弃去培养基, 在小皿中央各加入 100 μ L 20 mg/L 的 DiI-ox-LDL, 分别于 37℃ 继续培养 0 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h。之后, 用 PBS 清洗 3 次, 上机检测。

1.9 流式细胞术检测 293T 细胞膜上表达的 LOX-1 的生物学活性

取对数生长期的 293T 细胞按每孔 5×10^5 个细胞接种于 6 孔板中, 共接种两孔。待细胞融合度达到 70% 左右时, 分别转染空载体 pIRES2-AcGFP1-Nuc 和重组质粒 pIRES2-LOX-1, 并分别标记为空载体组和重组质粒组。6 h 后弃除转染试剂, 换上 DMEM 完全培养基, 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养到 48 h, 弃去培养基, 每孔加入 1 mL 20 mg/L 的 DiI-ox-LDL, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养 1 h 后, PBS 清洗 3 次, 细胞刮刀刮下细胞上流式细胞仪检测。

2 结果

2.1 LOX-1 基因的扩增

LOX-1 基因的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分析, 条带大小 840 bp, 与预期一致 (图 1)。回收 LOX-1 基因产物, 将其连接至 pMD19-T simple vector, 经 TaKaRa 公司测序, Bioedit 软件比对分析, 目的片段无突变, 获得 LOX-1-T 重组质粒。

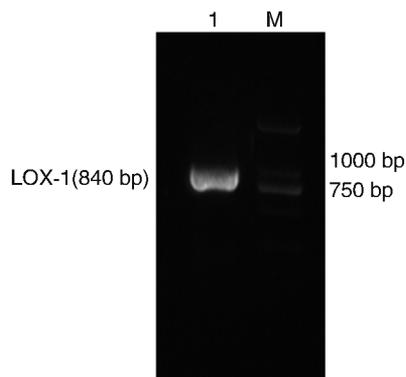


图 1. LOX-1 聚合酶链反应扩增结果琼脂糖凝胶电泳分析
M 为 DL2000 DNA Marker, 1 为 LOX-1 基因的 PCR 扩增结果。

Figure 1. Identification of polymerase chain reaction products of LOX-1 by agarose gel electrophoresis

2.2 双顺反子重组表达载体的构建及鉴定

将 LOX-1-T 载体质粒 Nhe I、EcoR I 双酶切获得目的基因片段, 连接至同样经过酶切的 pIRES2-AcGFP1-Nuc 双顺反子表达载体, 连接产物转化 DH5 α 宿主菌, 在 Kana 抗性平板上挑选阳性克隆进行培养。提取重组质粒进行 Nhe I、EcoR I 双酶切, 经琼脂糖凝胶电泳分析, 酶切出 840 bp 的 LOX-1 基因片段, 表明 LOX-1 基因连接至双顺反子表达载体 pIRES2-AcGFP1-Nuc 上 (图 2), 获得重组质粒 pIRES2-LOX-1。

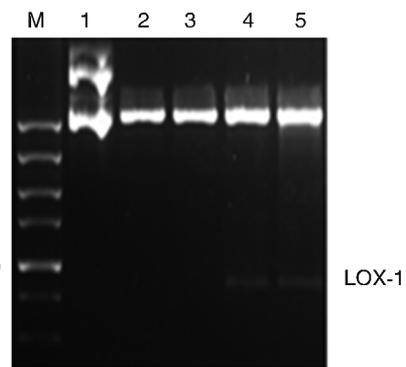


图 2. 双顺反子表达载体双酶切分析 M 为 DL2000 DNA Marker, 1 为未酶切的 pIRES2-LOX-1 载体, 2~5 为用 Nhe I 和 EcoR I 双酶切 pIRES2-LOX-1 载体; 2、3 为阴性酶切产物; 4、5 为阳性酶切产物。

Figure 2. Analysis of bicistronic expression vectors by restriction enzyme digestion

2.3 293T 细胞转染

293T 细胞转染双顺反子空载体 pIRES2-AcGFP1-Nuc 和双顺反子重组表达载体 pIRES2-LOX-1, 利用倒置荧光显微镜每隔 12 h 观察绿色荧光的强度变化, 结果显示, 转染重组质粒组细胞随着时间增加, 绿色荧光强度逐渐增强, 与之相比较, 空载体组细胞相应时间点的荧光强度均较弱, 结果表明 pIRES2-LOX-1 双顺反子表达载体成功转染至 293T 细胞 (图 3)。

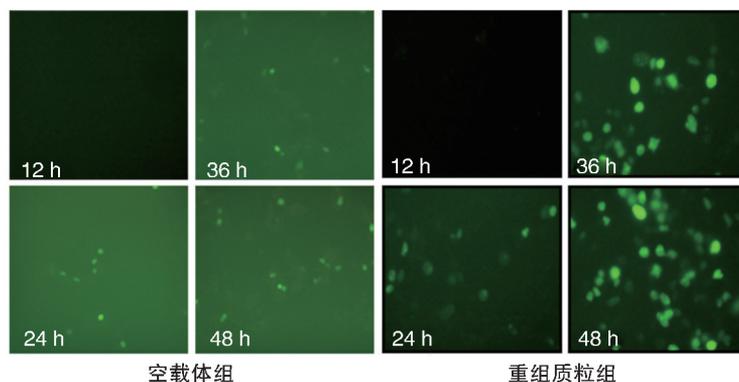


图 3. 293T 细胞转染结果图 (100 \times)

Figure 3. Result of transfection of 293T cell (100 \times)

2.4 LOX-1 的基因表达水平

人 293T 细胞分别转染不同质粒 48 h 后, 采用 RT-PCR 检测 LOX-1 mRNA 表达情况, 结果显示, 未转染的 293T 细胞和转染空载体的 293T 细胞均未出现 LOX-1 条带, 而转染双顺反子重组表达载体的 293T 细胞出现 LOX-1 条带, 表明在 293T 细胞中 LOX-1 在基因水平上获得表达 (图 4)。

2.5 LOX-1 的蛋白表达水平

人 293T 细胞分别转染空质粒和重组质粒 48 h 后, 采用 Western blot 检测 LOX-1 蛋白表达情况, 结果显示, 未转染的 293T 细胞和转染空载体的 293T 细胞均未出现 LOX-1 条带, 而转染双顺反子重组表达载体的 293T 细胞出现 LOX-1 条带, 表明在 293T 细胞中 LOX-1 在蛋白水平获得表达 (图 5)。

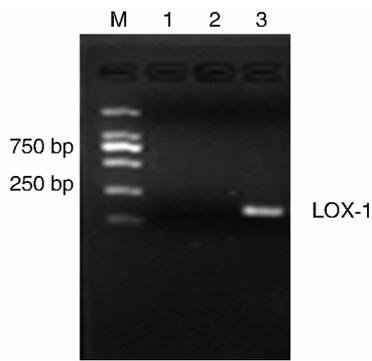


图 4. 逆转录聚合酶链反应检测 LOX-1 表达 M 为 DL2000 DNA Marker, 1 为未转染的细胞, 2 为转染空载体的细胞, 3 为转染重组质粒 pIRES2-LOX-1 的细胞。

Figure 4. Identification of LOX-1 mRNA expression by reverse transcription-polymerase chain reaction

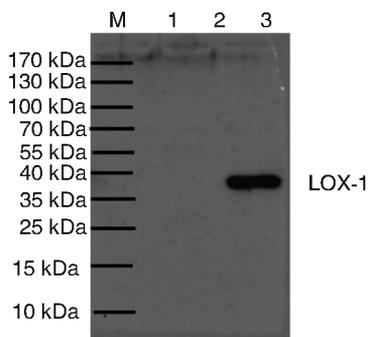


图 5. Western blot 检测 LOX-1 表达 M 为蛋白 Marker, 1 为未转染的细胞, 2 为转染空载体的细胞, 3 为转染重组质粒 pIRES2-LOX-1 的细胞。

Figure 5. Identification of LOX-1 protein expression by Western blot

2.6 激光共聚焦检测 LOX-1 在 293T 细胞膜上的表达情况

人 293T 细胞分别转染空质粒和重组质粒 48 h

后,采用激光共聚焦检测 LOX-1 在 293T 细胞膜上表达情况。结果发现,与空载体组比较,转染重组质粒 pIRES2-LOX-1 的 293T 细胞明显能看到细胞膜有一圈红色(293T 细胞膜上表达的 LOX-1 会与 LOX-1 抗体结合并进一步与罗丹明标记的抗鼠二抗结合,呈现红色荧光),说明人 LOX-1 基因双顺反子表达载体构建成功,并且 LOX-1 在 293T 细胞膜上也表达成功(图 6)。

2.7 激光共聚焦检测 293T 细胞膜上表达的 LOX-1 的生物学活性

293T 细胞转染重组质粒 pIRES2-LOX-1 48 h 后,分别于 37°C 用 DiI-ox-LDL(20 mg/L) 继续孵育 0 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h,激光共聚焦 549 nm 波长下激发并分别观察 DiI-ox-LDL 红色荧光(结合上 DiI-ox-LDL 细胞膜会有一圈明显的红色)。结果发现,细胞出现红色荧光,且随着时间的增加(0 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h),表达在 293T 细胞膜上的 LOX-1 结合 ox-LDL 的量也在逐渐增加,4 h 也出现少部分非特异性的结合(图 7)。

2.8 流式细胞术检测 293T 细胞膜上表达的 LOX-1 的生物学活性

分别转染空质粒 pIRES2-AcGFP1-Nuc 和重组质粒 pIR ES2-LOX-1 48 h 后,293T 细胞继续于 37°C、5%CO₂ 培养箱中用 DiI-ox-LDL(20 mg/L) 孵育 1 h,流式细胞仪分析 DiI-ox-LDL 荧光强度,FL1-H 通道阳性说明 293T 细胞转染上重组质粒,有 GFP 荧光信号,FL2-H 通道阳性说明 293T 细胞结合上 DiI-ox-LDL,有 DiI 荧光信号,第二象限的 293T 既有 GFP 荧光信号又有 DiI 荧光信号。结果如图 8 所示,重组质粒组第二象限 293T 细胞明显多于空载体组,进一步证明表达在 293T 细胞上的 LOX-1 具有结合 ox-LDL 的生物学活性。

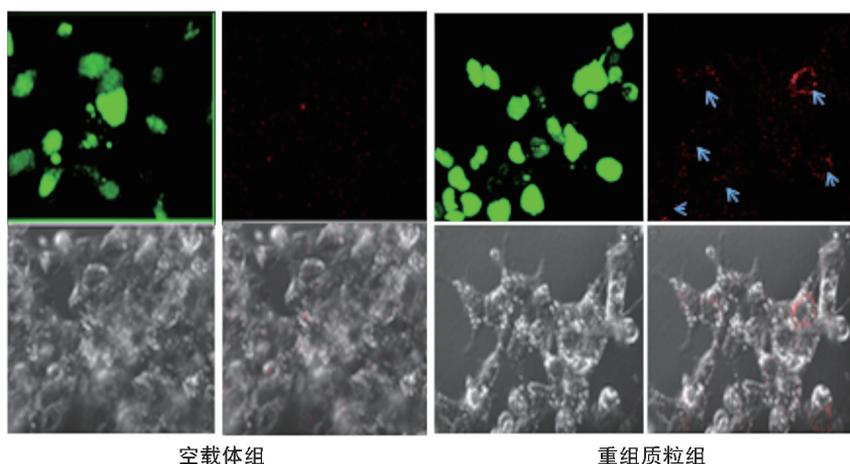


图 6. 激光共聚焦检测 LOX-1 在 293T 细胞膜上表达

Figure 6. Identification of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 expression in 293T cell membrane by confocal laser

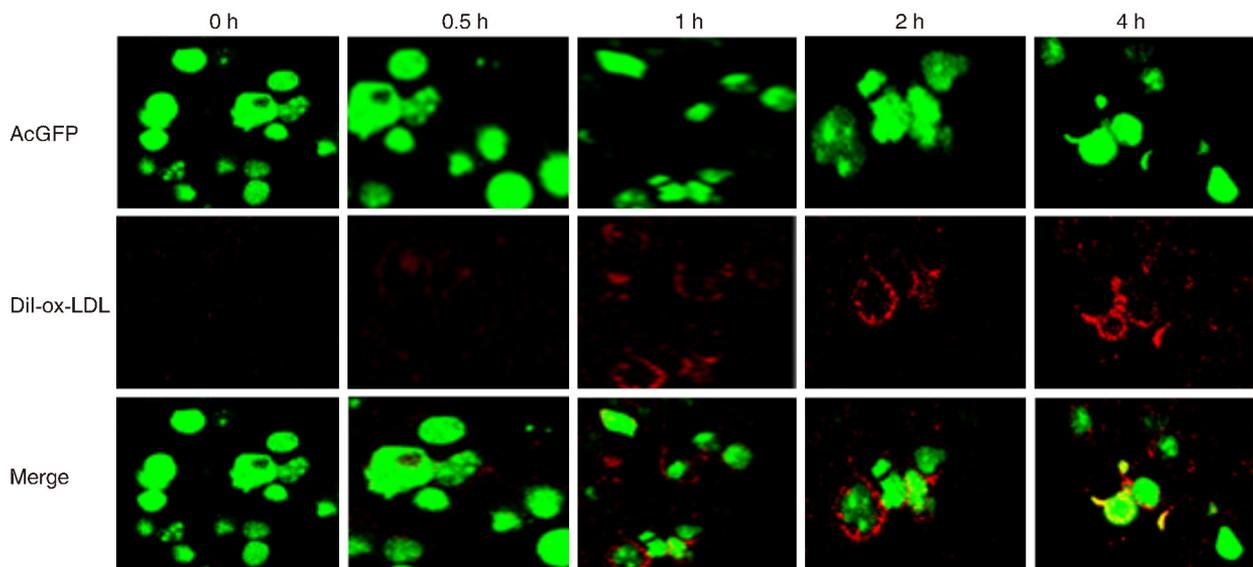


图 7. 激光共聚焦检测 293T 细胞膜上表达的 LOX-1 的生物学活性

Figure 7. Identification of the functions of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in 293T cell membrane by confocal laser

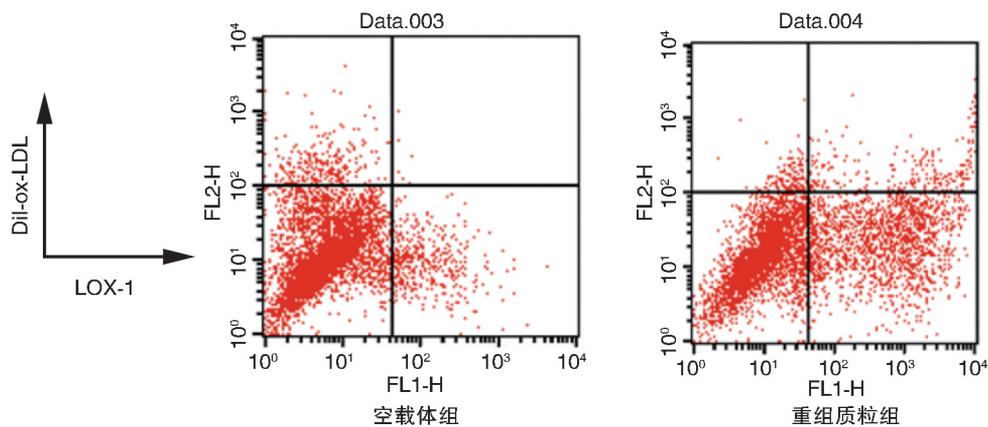


图 8. 流式细胞术检测 293T 细胞膜上表达的 LOX-1 的生物学活性

Figure 8. Identification of the functions of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in 293T cell membrane by flow cytometry

3 讨论

LOX-1 是一个 II 型单链跨膜糖蛋白^[9], 在结构上属于 C 型植物凝集素样 II 型跨膜蛋白^[10]。近年来发现该受体存在于巨噬细胞表面, 特异性地结合并摄取 ox-LDL, 介导由 ox-LDL 诱导的一系列病理变化, 如巨噬泡沫细胞的形成、内皮细胞活化和紊乱的产生、平滑肌细胞的迁徙和增殖等^[1]。其中, LOX-1 识别并内吞 ox-LDL 进而导致单核巨噬细胞转变为泡沫细胞, 是 As 疾病发生的关键事件^[11]。因此, 研究 ox-LDL 与 LOX-1 的相互作用分子机制, 在此基础上建立干预二者结合的策略, 是防治 As 疾

病的重要途径, 而在体外单独表达 LOX-1 是研究 ox-LDL 与其结合并建立干预机制的有效手段。

双顺反子表达载体是近年来新发展起来的一种表达载体^[12-13], 含有内部核糖体进入位点 (internal ribosome entry sites, IRES) 序列^[14], 可招募核糖体而启动非帽依赖性翻译 (图 9), 加之载体本身由常规 kozak 序列介导的帽依赖性翻译, 可实现两个基因协同在同一载体中共表达^[15]。

本研究利用双顺反子表达载体 pIRES2-AcGFP1-Nuc, 将人源 LOX-1 基因克隆至 IRES 序列前面的多克隆位点 (multiple cloning site, MCS) 处, 获得重组质粒 pIRES2-LOX-1, 进一步将其转染至

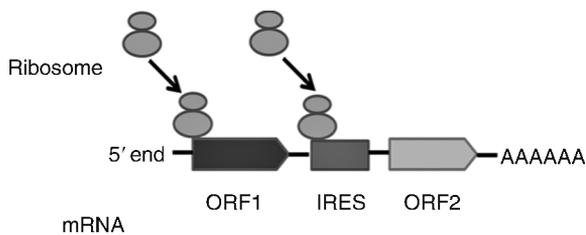


图 9. 双顺反子的表达

Figure 9. Expression of bicistronic

293T 细胞。由于 IRES 可启动 AcGFP 的表达,因此可以通过观察绿色荧光示踪重组质粒的转染情况。我们利用荧光显微镜观察到了绿色荧光,并且随着时间增长,荧光强度越强,表明重组质粒成功转染至 293T 细胞。在实验中,我们发现转染重组质粒组细胞绿色荧光强度较转染空载体组细胞强度要强,同是由 IRES 序列介导的翻译,为何重组质粒中 AcGFP 基因表达量要高于空质粒? 在本研究中,我们利用此载体构建了另一膜蛋白受体基因的重组表达载体,将其转染至细胞后,尽管观察到了绿色荧光,然而空质粒质组和重组质粒组的绿色荧光强度在不同时间点均较弱,并且后续的分子水平并没有检测到该基因的表达,相较于经证实已表达的 LOX-1 基因我们观察到的重组质粒质组和空质粒组绿色荧光强度的不同,我们认为,可能是外源基因的表达更有利将核糖体招募到 IRES 处,启动下游 AcGFP 基因的表达,然而其具体的分子机制还有待于进一步分析。但不管如何,这个现象提示我们,通过比较重组质粒组和空质粒组绿色荧光强度的不同,可以间接显示外源基因表达情况。在此基础上,我们利用 RT-PCR 和 Western blot 证明了 LOX-1 基因在 293T 中得到表达,激光共聚焦证明 LOX-1 基因的表达定位在细胞膜上。将转染重组质粒组细胞于 37°C 用 DiI-ox-LDL 孵育 0 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h,激光共聚焦检测结合情况,结果显示,随着时间的增加,表达在 293T 细胞膜上的 LOX-1 结合 ox-LDL 的量也在逐渐增加,从 1 h 开始 LOX-1 就可以与 DiI-ox-LDL 有比较特异的结合,到 4 h 出现少部分非特异性的结合,因此后续流式实验我们采用 37°C 孵育 1 h 进一步检测结合活性。从激光共聚焦和流式结果可以证明表达在 293T 细胞膜上的人 LOX-1 基因具有结合 ox-LDL 的生物学活性。本实验室也做了巨噬细胞用 DiI-ox-LDL 孵育不同时间的实验,结果显示巨噬细胞 J774A.1 用 DiI-ox-LDL 孵育 4 h 就能够看到比较明显的 ox-LDL 吸收。对比我们的 293T 实验结果,我们推测,尽管我们构建

的 293T 细胞表达 LOX-1 清道夫受体基因,但其吞噬 ox-LDL 能力显著弱于巨噬细胞。在今后的实验,应该考虑增加更多孵育时间点的实验,来检测 LOX-1-293T 细胞对于 ox-LDL 吸收能力及吸收时间点的确认。

本实验利用 pIRES2-AcGFP1-Nuc 成功构建了人 LOX-1 基因双顺反子表达载体,并在此基础上转染至 293T 细胞,实现了 LOX-1 基因在 293T 细胞膜上的表达,为后续体外单独研究 LOX-1 在 As 中的作用以及以此为靶点建立干预机制奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Pirillo A, Norata GD, Catapano AL. LOX-1, oxLDL, and atherosclerosis[J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013: 152-786.
- [2] 霍志晓, 于争, 贾克刚, 等. LOX-1/CX3CR1 与冠状动脉狭窄性疾病 PCI 手术前后的关系[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(5): 2505-509.
- [3] Yoshimoto R, Fujita Y, Kakino A, et al. The discovery of LOX-1, its ligands and clinical significance [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2011, 25(5): 379-391.
- [4] Trpkovic A, Resanovic I, Stanimirovic J, et al. Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of cardiovascular diseases[J]. *Critical Rev Clin Lab Sci*, 2015, 52: 70-85.
- [5] Murphy JE, Vohra RS, Dunn S, et al. Oxidised LDL internalisation by the LOX-1 scavenger receptor is dependent on a novel cytoplasmic motif and is regulated by dynamin-2[J]. *J Cell Sci*, 2008, 121: 2136-147.
- [6] 刘华, 付文静, 邓英辉, 等. 氧化低密度脂蛋白促进培养的人肾小球系膜细胞 LOX-1 表达[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(23): 4435-439.
- [7] 孙丽丽, 李文军, 刘洪梅, 等. 不同剂量瑞舒伐他汀对 ACS 患者血清 sLOX-1 水平的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(4): 392-396.
- [8] Schaeffer DF, Riazy M, Parhar KS, et al. LOX-1 augments oxLDL uptake by lysoPC-stimulated murine macrophages but is not required for oxLDL clearance from plasma[J]. *J Lipid Res*, 2009, 50: 1676-684.
- [9] Twigg MW, Freestone K, Homer-Vanniasinkam S, et al. The LOX-1 scavenger receptor and its implications in the treatment of vascular disease[J]. *Cardiol Res Pract*, 2012, 2012: 1-6.
- [10] 冉小丽, 吴芹, 石京山, 等. 凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 在动脉粥样硬化中的作用[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2013, 27(5): 865-871.
- [11] Kang BY, Mehta JL. Rosuvastatin attenuates ang II-mediated cardiomyocyte hypertrophy via inhibition of LOX-1[J]. *J Cardiovasc Pharmacol Therap*, 2009, 14: 283-291.
- [12] Abdul Mutalib NE, Mat Isa N, Alitheen NB, et al. IRES-incorporated lactococcal bicistronic vector for target gene expression in a eukaryotic system[J]. *Plasmid*, 2014, 73: 26-33.
- [13] 张海宁, 黄文明, 杨松, 等. 双顺反子表达技术在神经钙成像中的应用[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2014, 41(5): 515-519.
- [14] Trouet D, Nilius B, Voets T, et al. Use of a bicistronic GFP-expression vector to characterise ion channels after transfection in mammalian cells[J]. *Pflugers Arch*, 1997, 434: 632-638.
- [15] Li D, Wang M. Construction of a bicistronic vector for the co-expression of two genes in *Caenorhabditis elegans* using a newly identified IRES[J]. *Bio-techniques*, 2012, 52: 173-176.

(此文编辑 许雪梅)