

# hGR 小基因真核表达载体的构建及其在 HeLa 细胞中的表达

唐辰虹<sup>1</sup>, 喻志强<sup>2</sup>, 刘荣玉<sup>1△</sup>

(<sup>1</sup> 安徽医科大学第一附属医院干部呼吸内科, 安徽 合肥 230032;

<sup>2</sup> 中国科学技术大学生命科学院实验中心, 安徽 合肥 230026)

**[摘要]** 目的: 构建用于体内剪接分析的人糖皮质激素受体(hGR)小基因真核表达载体。方法: 以人基因组 DNA 为模板, 设计特定的引物进行 PCR 扩增获得 3.892 kb 长的 hGR 小基因片段, 并将其连入 pMD18-T Simple 载体中, 限制性内切酶酶切鉴定后, 再亚克隆到 PcDNA<sub>3</sub> 载体中, 获得 hGR 小基因真核表达质粒 PcDNA<sub>3</sub>-hGR 并测序验证。Lipofectamine 法转染 PcDNA<sub>3</sub>-hGR 至 HeLa 细胞, RT-PCR 检测 hGR 小基因剪接异构体 hGR $\alpha$  and hGR $\beta$  mRNA 的表达。结果: 限制性内切酶酶切和 DNA 测序分析证实克隆片段序列与 GenBank 目标序列一致; PcDNA<sub>3</sub>-hGR 在 HeLa 细胞内成功表达剪接异构体 hGR $\alpha$  和 hGR $\beta$ 。结论: hGR 小基因真核表达载体构建成功, 为进一步研究糖皮质激素受体基因外显子 9 的选择性剪接提供了细胞分子模型。

**[关键词]** 受体, 糖皮质激素; 基因; HeLa 细胞; 真核表达

**[KEY WORDS]** Receptors, glucocorticoid; Genes; HeLa cells; Eukaryotic expression

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

人糖皮质激素受体 (human glucocorticoid receptor, hGR), 是糖皮质激素效应发挥的关键环节, 它在体内分布广泛, 涉及广泛的生理及病理机制。人糖皮质激素受体主要分为  $\alpha$  和  $\beta$  两种亚型, 它们是由糖皮质激素受体基因 (NR3C1) 初级转录产物经过的不同剪接途径 (组成性剪接和选择性剪接) 而生成。在它的选择性剪接中, 外显子 9 $\alpha$  被跨越, 外显子 9 $\beta$  直接与外显子 8 的 3' 末端相连, 这使得 9 $\beta$  编码的选择性 C 端被保留在了成熟的 mRNA 中。由于外显子 9 $\alpha$  编码的 C 端包含了配体结合区, 而由 9 $\beta$  编码的 C 端不能形成完整的配体结合区而不能与糖皮质激素结合, 皮质激素的生理作用主要由组成性剪接产物 hGR $\alpha$  介导, 而对于选择性剪接产物 hGR $\beta$  人们以往对它研究甚少。近年来研究发现 hGR $\beta$  的过度表达与激素抵抗密切相关, hGR $\beta$  不具有转录激活作用, 它可与 hGR $\alpha$  形成异源二聚体竞争性结合 GRE, 呈浓度依赖性地抑制 hGR $\alpha$  的转录激活作用, 被认为是 hGR $\alpha$  的内源性拮抗因子<sup>[1]</sup>。为深入研究糖皮质激素受体的选择性剪接的调控机制, 找到影响其选择性剪接的关键因素, 以研究构建 hGR 小基因模型, 为后续的研究提供技术平台。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

**1.1 细胞及载体** 大肠杆菌 XL-1 由本实验室保存, pMD18-T Simple Vector 购自 TaKaRa 公司 PcDNA<sub>3</sub> 表达质粒购自 Invitrogen 公司; HeLa 细胞来源于 ATCC。

**1.2 工具酶及主要试剂** T4 连接酶、限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、LA Taq 酶、EXTaq 酶购自 TaKaRa 公司; 质粒抽提试剂盒、MLV-逆转录酶以及 RNA 酶抑制剂为 Promega 公司

产品; Oligo(dT)18 购自上海生工生物工程有限公司; Trizol 和细胞转染用 Lipofectamine 试剂盒购自 Invitrogen 公司; 胎牛血清为 Gibco-BRL 公司的产品; PCR 引物由 TaKaRa 公司合成。

### 2 方法

**2.1 hGR 小基因质粒的构建** hGR 小基因引物对: 正向 (GRF - *Bam*H I): 5' - CCGGATCC AGGACGGTCT-GAAGAGCCAAGAGCTATTTG - 3'; 反向 (GRR - *Xho* I): 5' - CCGCTCGAG CCCAGAGCTCATCCCATGCTAATATATCCAG - 3' (下划线标出部分为所提示的酶切位点)。

以人外周血基因组 DNA 为模板, 用高保真性 LAtaq 酶以上述引物进行 PCR 扩增, 反应条件为: 95 °C 变性 5 min 后, 94 °C 1 min, 66 °C 1 min, 72 °C 5 min, 42 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min, 扩增出 3.892 kb 的 hGR 小基因序列, 所扩增的糖皮质激素基因组 DNA 片段含外显子 8 (152 bp) 的 3' 序列, 内含子 H (526 bp) 外显子 9 $\alpha$  (2 481 bp), 内含子 J (155 bp) 以及外显子 9 $\beta$  的 5' 序列 (578 bp)。经电泳回收, 纯化后与 pMD18-T Simple Vector 连接, 阳性克隆经 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切验证后命名为 pMD18-T-hGR。*Bam*H I、*Xho* I 双酶切 pMD18-T-hGR, 经电泳分离回收 3.8 kb 片段, 纯化后经 T4 连接酶连接到真核表达载体 PcDNA<sub>3</sub> 的相应酶切位点之间, 获得 hGR 小基因真核表达质粒, 经 TaKaRa 公司测序验证后命名为 PcDNA<sub>3</sub>-hGR, (图 3A、3B)。

### 2.2 hGR 小基因的剪接分析

① 细胞培养 HeLa 细胞, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养。

② 细胞的短暂共转染 以 5 × 10<sup>5</sup> cells/well 的密度接种 HeLa

[收稿日期] 2005-12-16 [修回日期] 2006-04-11

△通讯作者 Tel: 0551-2922218; E-mail: anhuigi@mail.hf.ah.cn

细胞至 6 孔板,培养 24 h 至细胞融合度达 90% - 95% 时,利用脂质体转染试剂 lipofectamine,将 pcDNA<sub>3</sub> - hGR (1.5 μg) 和 pcDNA<sub>3</sub> (1.5 μg) 分别在 100 μL Opti - MEM 培养基中混匀,转染 HeLa 细胞,补充无血清培养基至 1 mL/well,混匀,培养 6 h,加入 1 mL 含 10% 小牛血清的 DMEM,培养 24 h。

③ 逆转录多聚酶链反应 (RT - PCR) 的方法测定剪接结果 收获细胞,用 Trizol 提取 HeLa 细胞的总 RNA,定量后用 DNaseI 处理,进行逆转录反应。细胞外源性小基因剪接产物 cDNA 的 PCR 扩增:取逆转录产物 1 μL 为模板,载体上的 T7 primer 作为正向引物 (T7 5' - AATACGACTCACTATAGG - GAGACC - 3'),以外显子 9α 和 9β 上的非同源序列作为 hGRα、hGRβ 各自的反向引物 (9αR 5' - GATGACGACT - CACTGCTTCTG - 3', 9βR 5' - TTGTCGATGAGCATCACT - TGAC - 3') 通过 PCR 扩增细胞外源性剪接异构体 hGRα、hGRβ。以 β - actin (正向: 5' - GACAGGATGCAGAAG - GAGATCACT - 3', 反向 5' - TGATCCACATCTGCTGGAAGCT - 3') 为内对照,反应条件为 95 °C 变性 5 min 后, 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 20 s, 30 个循环,最后 72 °C 延伸 7 min,扩增出的产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,在凝胶成像仪上扫描成像。

④ DNA 序列测定 将上述 RT - PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳回收,纯化后送至 TaKaRa 公司测序。

## 结 果

1 用 *Xho* I、*Bam*H I 双酶切人糖皮质激素受体小基因真核表达质粒 PcDNA<sub>3</sub> - hGR 及中间质粒 pMD18 - T - hGR, 分别得到 5.4 kb 和 2.692 kb 的载体片段及 3.892 kb 的小基因片段,结果与理论上预期的相符 (图 1)。经测序后证明克隆片段序列与 GenBank 目标片段一致 (图 2)。

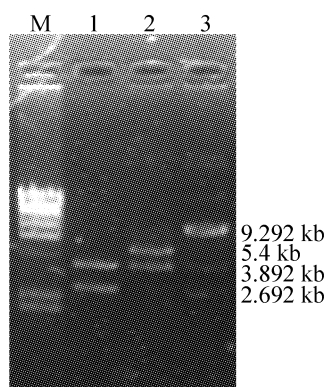


Fig 1 Identification of the recombinant plasmid pMD18 - T - hGR and PcDNA<sub>3</sub> - hGR by endonuclease digestion. M: λDNA *Hind* III marker; 1: pMD18 - T - hGR digested with *Xho* I, *Bam*H I; 2: PcDNA<sub>3</sub> - hGR digested with *Xho* I, *Bam*H I; 3: PcDNA<sub>3</sub> - hGR primary plasmid.

图 1 pMD18 - T - hGR 和 pcDNA<sub>3</sub> - hGR 重组质粒酶切鉴定图

2 分别将 hGR 小基因重组质粒 pcDNA<sub>3</sub> - hGR (1.5 μg) 以及载体 pcDNA<sub>3</sub> (1.5 μg)

在 Opti - MEM 培养基中混匀后,转染 HeLa 细胞,RT - PCR 结果显示:在 HeLa 细胞里,hGR 小基因转录后被剪接加

工,用特异性引物经 RT - PCR 扩增出了表达量丰富的 hGRα (547 bp) 和表达量很少的 hGRβ (353 bp) 两种的外源性剪接异构体,而载体 DNA 转染组用同样的引物无法扩增出 hGRα/hGRβ 剪接异构体 (图 3C)。经测序后证明 PCR 产物序列与 GenBank 目标片段一致 (图 4)。

## 讨 论

选择性剪接是真核生物基因表达调控的一种重要机制,它决定了基因的哪些序列可以表达、如何表达,极大地增加了蛋白质的多样性和基因表达的复杂程度。根据 ESTs 分析,约 40% - 60% 的人类基因存在选择性剪接的机制<sup>[2]</sup>。由于选择性剪接可以控制蛋白异构体形成,调节细胞功能,因此剪接异常也可以导致人类疾病。在导致人类疾病的点突变中,至少 15% 是由剪接位点的突变引起<sup>[3]</sup>。这些基因异常剪接所致的疾病几乎涵盖人体的各个系统,如遗传、代谢、肿瘤、心血管、精神病及神经退行性疾病。这使得对剪接调控的研究成为分子遗传学的前沿和热点。

在对前体 mRNA 选择性剪接的研究方法中,小基因模型是一种建立在细胞水平上的体内剪接分析方法。所谓小基因是指某一基因中的一个片段,因其片段短而得名。就选择性剪接研究而言,利用长 PCR (Long - range PCR) 技术,获取某一基因选择性表达的外显子及其侧翼的组成性表达的外显子和外显子之间的内含子序列,克隆到真核表达载体,就获得小基因重组质粒。通过转染技术,使小基因在培养细胞内转录和剪接。由于以活细胞为载体,剪接条件更接近生物体的真实情况,因而利用基于小基因模型的体内剪接分析方法不仅能研究不同剪接调节因子对选择性剪接的影响,而且还可以把选择性剪接的研究与细胞的功能和状态紧密结合起来:例如可以在不同组织来源的细胞及细胞的不同状态对某一基因的剪接调控进行分析<sup>[4]</sup>;或者通过改变细胞的培养条件或施以某种外源性刺激,研究信号转导对选择性剪接的调控<sup>[5]</sup>。同时,通过构建序列缺失或者突变的小基因模型,可以筛选出存在于外显子或内含子内可能的剪接调控元件,因而使小基因模型成为非常有效的研究方法<sup>[6]</sup>。

为了深入研究糖皮质激素受体的剪接调控,寻找影响 hGRβ 剪接的关键因素,我们构建了 hGR 小基因模型真核表达载体。从糖皮质激素受体基因外显子 8 的第 7 个碱基开始截取了外显子 8、内含子 H、外显子 9α、内含子 J 以及外显子 9β5' 端 578 bp 的序列共约 3.892 kb 的基因组 DNA 片段并克隆到 pcDNA<sub>3</sub> 真核表达载体里,然后将 hGR 小基因重组质粒转染 HeLa 细胞,RT - PCR 结果显示:hGR 小基因在 HeLa 细胞中被成功转录并剪接为 hGRα 和 hGRβ 两种异构体,为以后研究糖皮质激素受体选择性剪接机制提供了技术平台。

我们的下一步工作是利用 hGR 小基因模型,研究不同剪接因子对 hGR 小基因选择性剪接的影响,为激素抵抗的临床治疗寻找可能的靶点。

## [参 考 文 献]

- [1] Oakley RH, Jewell CM, Yudit MR, et al. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action [J]. J Biol Chem, 1999, 274(39): 27857 - 27866.

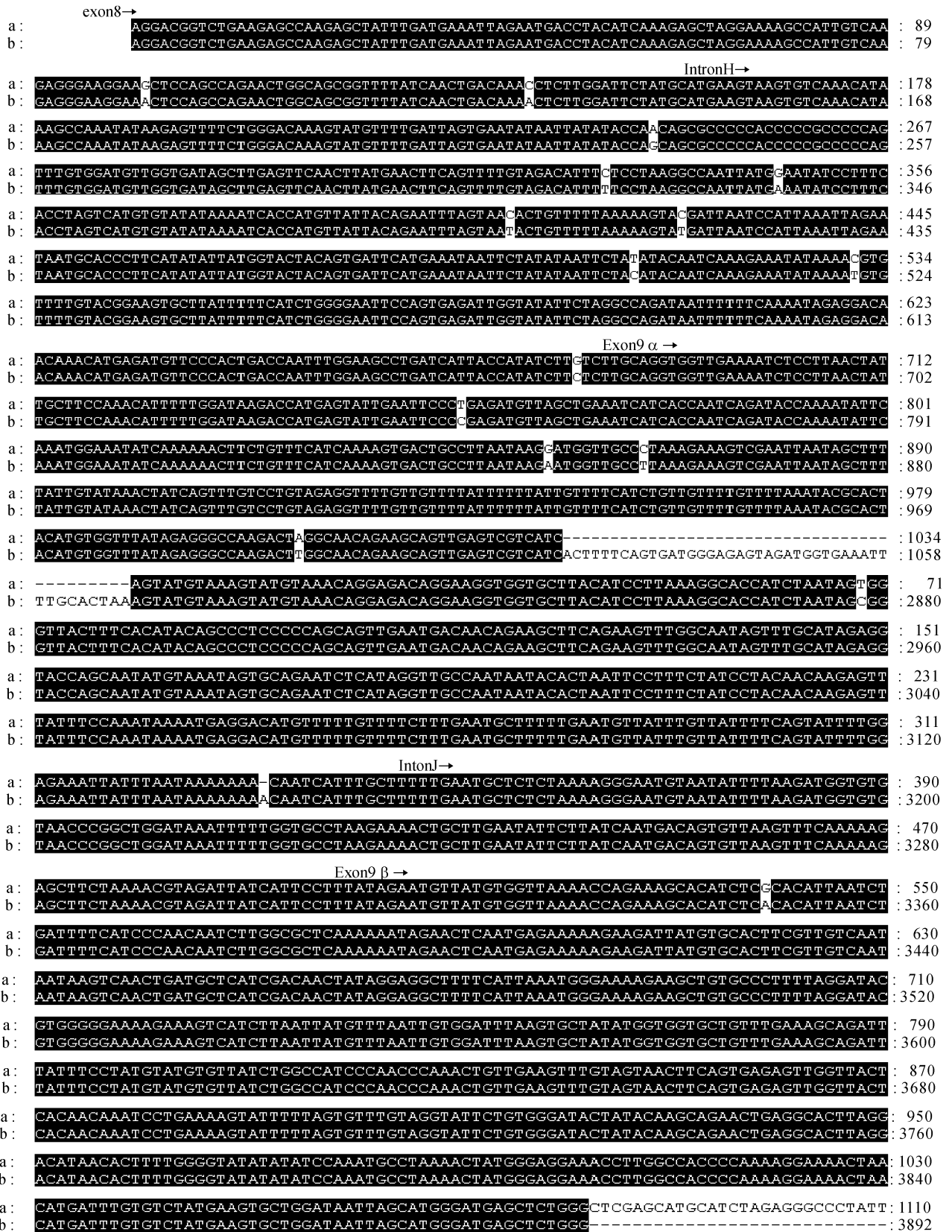
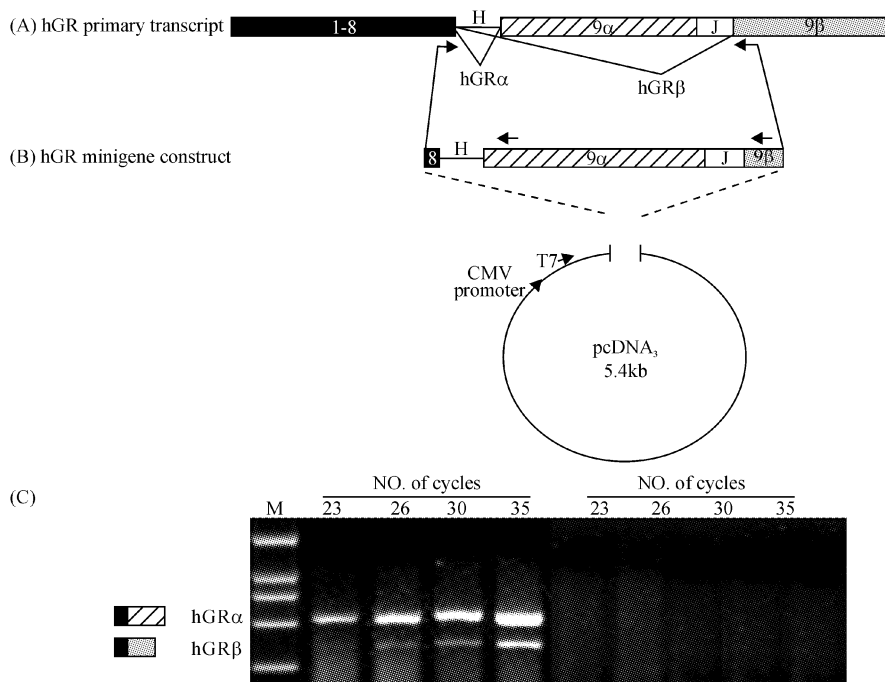


Fig 2 Comparison of the gene sequence with the cloned fragment and those of GenBank. a;sequencing result of hGR minigene; b; sequence in the GenBank(AY436590).

图 2 克隆片段与 GenBank 中相应基因序列的比对

[2] Johnson JM, Castle J, Garrett – Engele P, et al. Genome wide survey of human alternative pre – mRNA splicing with exon junction microarrays [J]. Science, 2003, 302 (5653) : 2141 – 2144.  
 [3] Nissim – Rafinia M, Kerem B. Splicing regulation as a potential genetic modifier [J]. Trends Genet, 2002, 18(3) :



(1) transfectin with 1.5 μg pcDNA - hGR; (2) transfectin with 1.5 μg pcDNA.

Fig 3 Expression of hGR $\alpha$ /hGR $\beta$  created from alternative splicing of hGR minigene. A; predicted structure of the pre - mRNA region related to hGR $\alpha$ /hGR $\beta$  splicing with arrows indicating the location of primers for amplification of hGR minigene. B; schematic representation of the hGR minigene construct. A segment of 3.892 kb hGR minigene was amplified by PCR and cloned into pcDNA<sub>3</sub>. The arrows indicate the approximate locations of the common forward (T7) primer and reverse (9 $\alpha$ R, 9 $\beta$ R) that were used in RT - PCR in this study. C; RT - PCR result.

图 3 hGR 小基因选择性剪接产物 hGR $\alpha$ /hGR $\beta$  的表达



Fig 4 Comparison of the cDNA sequence of RT - PCR products and those of GenBank. a;sequencing result of hGR $\alpha$  originated from minigene (the first 49 nt unmatched sequence is the vector sequence); b; sequence in the GenBank (X03225); c; sequencing result of hGR $\beta$  from minigene (the first 49 nt unmatched sequence is the vector sequence); d; sequence in the GenBank (X03348).

图 4 RT - PCR 产物 cDNA 序列与 GenBank 中相应基因序列的比对

123 - 127.

[4] Ladd AN, Nguyen NH, Malhotra K, et al. CELF6, a member of the CELF family of RNA - binding proteins, regulates muscle - specific splicing enhancer - dependent alternative splicing[J]. J Biol Chem, 2004, 279 (17): 17756 - 17764.

[5] Patel NA, Apostolatos HS, Mebert K, et al. Insulin regulates protein kinase C betaII alternative splicing in multiple

target tissues: development of a hormonally responsive heterologous minigene[J]. Mol Endocrinol, 2004, 18 (4): 899 - 911.

[6] Massiello A, Salas A, Pinkerman RL, et al. Identification of two RNA cis - elements that function to regulate the 5' splice site selection of Bel - x pre - mRNA in response to ceramide[J]. J Biol Chem, 2004, 279 (16): 15799 - 15804.

(上接第 1653 页)

表 1 豚鼠严重烫伤后血胃肠激素各时点的变化

Tab 1 Changes of blood gastrointestinal hormone in severe scalded guinea - pigs (ng/L.  $\bar{x} \pm s$ )

Group	n	GAS	MTL	$\beta$ -EP
Sham	10	64.32 ± 35.21	326.45 ± 58.26	70.16 ± 60.43
3 h postburn	15	33.70 ± 11.86 **	175.29 ± 31.68 **	575.58 ± 70.17 **
6 h postburn	15	44.32 ± 21.05 **	167.87 ± 29.43 **	632.48 ± 60.46 **
12 h postburn	15	46.02 ± 17.81 **	141.50 ± 22.45 **	602.84 ± 98.17 **
24 h postburn	15	42.58 ± 12.54 **	176.70 ± 19.76 **	260.47 ± 30.58 **
48 h postburn	15	61.81 ± 22.60 **	187.34 ± 25.42 **	198.77 ± 56.13 **
72 h postburn	10	63.38 ± 19.77	265.47 ± 27.18 *	156.98 ± 28.74 *

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs sham burn group.

表 2 不同程度烫伤血胃肠激素的变化

Tab 2 Changes of blood gastrointestinal hormone in different scalded levels ( $\bar{x} \pm s$ . ng/L)

Group	n	GAS	MTL	$\beta$ -EP
Sham	10	64.32 ± 35.21	326.45 ± 58.26	70.16 ± 60.43
TSA10% (12 h)	15	55.78 ± 26.42 *	249.76 ± 78.36 *	138.94 ± 59.67 *
TSA 20% (12 h)	15	50.96 ± 19.30 **	207.58 ± 30.46 **	165.42 ± 47.86 **
TSA 30% (12 h)	15	46.23 ± 17.82 **	141.50 ± 22.45 **	196.64 ± 70.58 **
TSA 10% (48 h)	15	66.09 ± 12.47 *	307.54 ± 31.56 *	94.28 ± 40.04 *
TSA 20% (48 h)	15	65.38 ± 17.82 *	311.44 ± 42.51 *	85.43 ± 30.01 *
TSA 30% (48 h)	15	61.87 ± 22.60 **	187.53 ± 25.36	158.77 ± 56.13

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs sham burn group. TSA: total scalded area.

表 3 烫伤后延迟复苏豚鼠的血胃肠激素的浓度

Tab 3 Changes of blood gastrointestinal hormone in postburn delayed guinea - pigs ( $\bar{x} \pm s$ . n = 15. ng/L)

Group	GAS	MTL	$\beta$ -EP
IR	42.58 ± 12.54	176.70 ± 9.76	156.90 ± 28.74
DR(24 h)	43.85 ± 12.54 *	73.98 ± 26.14 *	312.30 ± 819.48 *
DR(48 h)	43.85 ± 21.42 *	115.58 ± 26.44 *	203.45 ± 19.48 *

\*  $P < 0.01$  vs IR group. IR; immediate resuscitation group; DR: delayed resuscitation group.

## 讨 论

烧伤后机体消化系统存在着—系列动力、功能、结构的变化。尤其在胃肠动力学方面表现非常明显,既往认为是胃肠粘膜缺血缺氧所致。这种观点不全面,即使在烧伤休克达到纠正后,很多病人仍有很长时间的胃肠动力症状,表现纳差,腹胀及易恶心、呕吐等,甚至有些没有发生休克的病人,也

有上述症状,说明烧伤休克后,胃肠道除了有结构上的损害外,尚有胃肠动力学方面的改变,恶心、呕吐甚至可发生在胃肠粘膜损害之前,临床上还发现烧伤病人早期胃胀时间越长,肠鸣音恢复越慢,其病情越重,预后越差,但临床上对胃肠动力学改变评价并无明确的定量指标。因此,研究胃肠激素在烧伤病人早期的动态变化,以期寻找胃肠动力的定量指标显得非常必要。文献<sup>[2]</sup>报道,GAS、MTL及 $\beta$ -EP均以分泌方式作用于靶组织,其血清值或血浆值在正常人相对稳定。GAS是餐后型胃肠运动的促进剂;MTL是消化间期移动性运动复合波(MMC)的启动剂<sup>[3]</sup>,两者对胃肠运动均起促进作用,我们对实验豚鼠血 GAS、MTL 的测定发现,GAS、MTL 在休克期各时点均明显降低,复苏后缓慢回升,但仍低于正常;面积越大,恢复越慢;延迟复苏组下降更加明显。因此,在烧伤病人可通过 GAS、MTL 的监测来评价胃肠动力的改变,判断预后。 $\beta$ -EP 与促进肾上腺皮质激素同源,烧伤面积越大, $\beta$ -EP 越高,其能反映机体的应激状态, $\beta$ -EP 还与胃肠激素一起促进胃酸分泌,控制胃肠蠕动。

胃泌素对胃肠粘膜起营养作用,伤后 3 h 即降至最低,且在 12 h 内一直持续于低水平,说明体内胃泌素储存少,且在应激时消耗快。胃泌素的营养作用是激素对靶细胞的直接作用,杨洪昌等<sup>[4]</sup>认为血胃泌素浓度与烧伤后应激性溃疡无关,我们认为尚需进一步研究,本实验发现休克复苏过后,血胃泌素浓度又缓慢上升,但仍低于正常,可能与烫伤休克胃粘膜 G 细胞受损,胃泌素合成受抑有关。本实验烫伤豚鼠胃动素伤后 3 h 降低,到 12 h 达最低,其后虽缓慢上升但一直低于正常,有学者<sup>[3]</sup>认为胃动素的释放可启动消化间期移动性运动复合波(MMC),而 MMC 是胃肠道的机械“扫帚”。能促进胃、幽门、小肠和胆道运动协调性,可防止细菌过度生长。由此可认为血胃动素浓度与休克期肠源性感染有关,进一步研究休克、胃动素与肠源性感染的内在关系有重要的意义。

## [参 考 文 献]

[1] 王少龙,汪仕良,黎 鳌. 烧伤创伤后的应激与肠道营养支持[J]. 中华整形烧伤外科杂志, 1998, 14(3): 225 - 227.

[2] 陈元方. 胃肠激素与胃肠运动[J]. 国外医学:消化系统疾病分册, 1992, 12(1): 2 - 6.

[3] 周 吕. 消化间期移动性复合运动的重要性及临床意义[J]. 基础医学与临床, 1999, 19(2): 1 - 5.

[4] 杨洪昌,张永生,卢勤勤,等. 烧伤病人胃泌素血清含量变化的观察[J]. 中华整形烧伤外科杂志, 1995, 11(5): 398.