

人促甲状腺激素受体 HEK 293T 细胞稳定表达株的构建*

唐恭顺

四川大学华西医院 核医学科(成都 610041)

【摘要】 目的 构建人促甲状腺激素受体(hTSHR)稳定表达株,用于研究抗甲状腺新药。方法 *Age I/Nhe I* 双酶切载体 GV266 和 *hTSHR* 基因, *T4* 连接酶连接构建 GV266-*hTSHR* 表达质粒。转染 GV266-*hTSHR* 到 293T 细胞后, Western blot 证明 hTSHR 表达。用 Opti-MEM、Lipofectamine 2000、辅助质粒在 293T 细胞构建 GV266 包装质粒。qPCR 测定包装病毒滴度。用 GV266 包装质粒、GV266-*hTSHR* 表达质粒共转染 293T 细胞获得 GV266-*hTSHR*-293T 稳定表达株。绿色荧光蛋白(GFP)荧光鉴定稳定表达株。结果 GV266-*hTSHR* 构建物阳性大肠杆菌克隆的 DNA 测序结果与 *hTSHR* 序列比对 100%吻合。Western blot 显示,过表达 hTSHR 的 HEK 293T 细胞出现相对分子质量为 62×10^3 的目的条带。qPCR 测定包装质粒滴度达到了 2×10^8 TU/mL。GV266-*hTSHR*-293T 细胞稳定表达株表达 GFP 荧光。结论 构建了 GV266-*hTSHR* 表达质粒,获得了 GV266-*hTSHR*-HEK 293T 稳定表达株,为研究抗甲状腺多肽提供了必要的实验材料。

【关键词】 人促甲状腺激素受体 慢病毒 HEK 293 细胞 Graves 甲亢

Stable Expression of Human Thyrotropin Receptor in HEK 293T Cells TANG Gong-shun. Department of Nuclear Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

【Abstract】 Objective To establish a strain of eukaryotic cells with overexpressed human thyrotropin receptor (hTSHR) for the development of anti-thyroid drugs. **Methods** GV266 vector and *hTSHR* gene were digested by *Age I/Nhe I*. Plasmids expressing GV266-*hTSHR* were constructed using *T4* ligase and then transfected into 293T cells. The expression of hTSHR was determined by Western blot. Packaging plasmids were built in the 293T cells with Opti-MEM, Lipofectamine 2000 and helper plasmid. The titer of the packaging plasmids was determined with qPCR. The packaging plasmids and the plasmids expressing GV266-*hTSHR* were co-transfected into 293T cells to obtain a strain of cells (GV266-*hTSHR*-293T) with stable expression of hTSHR. The GV266-*hTSHR*-293T stain was detected by green fluorescent protein (GFP) fluorescence. **Results** The DNA sequence of GV266-*hTSHR* matched that of hTSHR. The Western blot showed a 62×10^3 target band. The titer of packaging plasmids reached 2×10^8 TU/mL. The GV266-*hTSHR*-293T cells were visible under GFP fluorescence. **Conclusion** HEK 293T cells with stable expression of hTSHR was established.

【Key words】 Human thyrotropin receptor Lentiviral vector HEK 293T cell Graves disease

目前治疗 Graves 甲亢可选择抗甲状腺药物、放射性¹³¹I 和外科手术。抗甲状腺药物可引起严重的血小板降低、白细胞降低、肝功能损害和黄疸^[1-3]。放射性¹³¹I 可能引起甲状腺功能低下。外科手术是有创手段,可能出现喉返神经损伤等并发症。因此,寻找抗甲状腺新药是必然选择。

Graves 甲亢的病因是体内的甲状腺刺激性抗体(TSAb)作用于甲状腺滤泡细胞表面的人促甲状腺激素受体(hTSHR),使细胞内 cAMP 增加,合成 T4 增加。T4 及其代谢产物 T3 导致全身体代谢症状。TSAb 作用于球后脂肪细胞、眼外肌细胞上引起突眼。结构生物学研究阐明了血液中 TSAb(M22)的重链与甲状腺滤泡细胞膜上 hTSHR 的 α 亚基相

互作用^[4]。阻断 TSAb 与 hTSHR α 相互作用是研究抗甲状腺药物的新手段。

研究 hTSHR 小分子阻断剂时,有人构建了 *hTSHR*-pSVL 载体和 *hTSHR*-pcDNA3.1,并表达在 HEK 293T 细胞(人肾上皮细胞)、COS-7 细胞上^[4-7]。本研究试图将 hTSHR 构建、组装到慢病毒载体 GV266 上(GV266-*hTSHR*),并在 HEK 293T 细胞上稳定表达。构建 *hTSHR*/HEK 293T 稳定表达株的目的是研究抗甲状腺多肽。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

主要试剂: 1 kb DNA ladder Marker, Fermentas 公司。250 bp DNA ladder Marker,捷瑞公司。琼脂糖,赛百盛公司。In-FusionTM PCR

* 国家自然科学基金(No. 30970859)资助

Cloning Kit, clontech. *Taq* polymerase, SinoBio. dNTP, TaKaRa. 引物, 捷瑞生物。限制性内切酶, NEB. 质粒抽提试剂盒, Promega. GV266 载体, *Age* I / *Nhe* I 内切酶, 购自上海吉凯基因化学技术有限公司。胎牛血清 FBS, GIBCO. DMSO, 上海生物试剂厂。DMEM, GIBCO. 胰酶, 上海化学试剂公司。Opti-MEM, Invitrogen. BCA Protein Assay Kit, HyClone-Pierce. Prestained protein marker, 中晶公司。ECL-PLUS/Kit, Amersham 公司。医用 X 射线光片, Kodak. X 线胶片显影粉、定影粉, 上海冠龙照相材料厂。

主要设备: PCR 仪, Applied Biosystems 公司。positive clone 测序, 美季生物技术。稳压 DNA 电泳仪, BioRad 公司。细菌摇床, 华利达实验设备公司。细菌培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司。Gilson 移液器, 吉尔森公司。高速离心机, 日立公司。一次性平皿, 湖南长沙天地人生物科技有限公司。1 L 烧瓶, 金坛市晶玻实验仪器厂。50 mL 聚丙烯管, 上海吴化化工有限公司。荧光显微镜, 奥林巴斯。CO₂ 培养箱, 日本三洋。生物安全柜, 上海振样创空气净化设备公司。稳压电源(电泳用)、SDS-PAGE 蛋白电泳仪、凝胶成像仪、蛋白转膜仪, 上海天能公司。5417R 台式冷冻高速离心机, Eppendorf 公司。

1.2 构建 GV266-*hTSHR* 表达质粒

1.2.1 载体酶切 慢病毒载体 GV266 元件顺序为 Ubi-MCS-IRES-puromycin。多克隆位点包含 *Age* I / *Nhe* I 酶切位点。载体图谱和序列可从吉凯基因公司网站 <http://www.genechem.com.cn> 查阅。*Age* I 单酶切 GV266 获得线性化载体, 预测长度大于 10 kb。

1.2.2 获取 *hTSHR* 基因片段 分别设计 *hTSHR* 前向引物和反向引物。前向引物: 5'-GGGTA CCGGT CGCCA CCATG AGGCC GGCGG ACTTG-3', 其中 ACCGGT 是 *Age* I 的酶切位点; 3'端部分序列是 *hTSHR* 序列, 用于钓取目的基因。反向引物 5'-AGTCG CTAGC TTACA AAACC GTTTG CATAT ACTC-3', 其中 GCTAGC 是 *Nhe* I 酶切位点。载体双酶切、RT-PCR 扩增获得 *hTSHR* 基因片段, 琼脂糖凝胶电泳鉴定片段大小。*Age* I / *Nhe* I 间 *hTSHR* 片段大小应为 2 320 bp。

1.2.3 构建 GV266-*hTSHR* 重组质粒 将 *Age* I / *Nhe* I 双酶切 *hTSHR* 基因、GV266 载体的双酶

切产物用 T4 连接酶连接获得慢病毒表达载体 GV266-*hTSHR*。阳性对照用 *GAPDH* 经 *Age* I / *Nhe* I 双酶切后与 GV266 构建的 GV266-*GAPDH* 载体。空白自联载体只连接 GV266 线性载体, 不加入外源基因。连接产物转化感受态细胞, 液体 LB 摇菌后涂板, 观察克隆生长情况。

挑取若干 GV266-*hTSHR* 克隆, 用适当 *hTSHR* 引物 PCR 扩增。同时挑取数个 *GAPDH* 阳性对照克隆、空白自联载体克隆, 合成适当引物进行 PCR 扩增。观察目的条带。出现目的条带的 GV266-*hTSHR* 阳性克隆做质粒小抽, 提取 DNA 测序。比对测序结果, 证明构建 GV266-*hTSHR* 是否成功。

1.2.4 Western blot 选择不表达 *hTSHR* 的 293T 细胞、Jurkat 细胞做阴性对照, 表达 *hTSHR* 的 A375 黑色素瘤细胞作为阳性对照, 抗 *TSHR*_α 抗体做一抗, 用 Western blot 法检测 *hTSHR*-293T 细胞稳定表达株是否表达相对分子质量应是 62×10^3 的 *hTSHR* 蛋白^[8,9]。HEK 293T 细胞由上海吉凯基因公司提供。经复苏、传代, 将处于对数生长期的 HEK 293T 细胞用胰酶消化, 制成细胞悬液(细胞数约为 4×10^5), 接种于 24 孔培养板中培养至细胞融合度达到约 80%。按照每孔 1 μg 质粒 : 2 μL Lipofectamine 2000 比例, 分别溶解 GV266-*hTSHR* 质粒和 Lipofectamine 2000 于 opti-MEM 中, 混匀。将 GV266-*hTSHR* 质粒、Lipofectamine 2000 混合液加入到 HEK 293T 细胞中培养。

转染 36 h 后收集细胞进行 Western blot 检测。超声破碎细胞、离心提取上清中蛋白, 测定蛋白浓度后调整蛋白浓度为 2 μg/μL。制胶、上样、SDS-PAGE 电泳。将胶中蛋白电转到 PVDF 膜上, 牛奶封闭。顺序孵育一抗、二抗。然后用 ECL+plusTM Western blot system 试剂盒显色。

1.3 包装质粒

1.3.1 包装 取对数生长期的 HEK 293T 细胞 1.2×10^7 / 20 mL 接种于 15 mL 培养皿, 培养 24 h 后细胞密度达到 70%~80%。取 GV266 20 μg、辅助质粒 10 μg 与 2.5 mL Opti-MEM 混匀。取 100 μL Lipofectamine 2000 与 2.4 mL Opti-MEM 混匀。将质粒、Lipofectamine 2000 混合液移入 HEK 293T 细胞, 转染 48 h 后完成病毒包装。

1.3.2 浓缩病毒 收集以上 HEK 293T 细胞上清液, 离心除去碎片后用 0.45 μm 滤器过滤。病毒不能被过滤而留在滤器上方, 培养基滤入到下方收集

瓶。弃去收集瓶中大部分培养基,再将滤器倒置离心将病毒抛入培养基中,病毒得以浓缩。

1.3.3 qPCR 测定浓缩病毒滴度 向 96 孔板中每孔加入 $100 \mu\text{L}/4 \times 10^4$ 的 HEK 293T 细胞,共加 7~10 孔,预培养 24 h 后细胞贴壁。取 1.3.2 中制备的病毒浓缩液 $10 \mu\text{L}$,用培养基 1:10 连续稀释 7~10 次。弃去培养基,每个稀释度的病毒稀释液取 $10 \mu\text{L}$ 加入到一孔 HEK 293T 细胞中,培养 4 d。观察表达 GFP 荧光的 HEK 293T 细胞数量。病毒滴度($\text{TU}/\mu\text{L}$)=($100 \times$ 视野中细胞个数)/稀释度。本研究采用 qPCR 法测定病毒滴度,即提取各稀释孔总 RNA,RT-PCR 绘制熔解曲线以读取 Ct 值(取 2 孔平均值)。WRPE 基因是 GV266 的一个元件,WRPE 基因熔解曲线可用于病毒 qPCR 定量。选择 GV266 中的 WRPE 基因、 β -actin 基因设计引物做 qPCR。WRPE 基因的前向引物是 5'-CCGTG GTGTT GTCG-3',反向引物是 5'-AAGTC CGCTG GATTG AG-3', β -actin 基因的前向引物是 5'-GTGGA CATCC GCAA GAC-3',反向引物是 5'-AAAGG GTGTA ACGCA ACTA-3'。以稀释孔 Ct 值小于对照孔 Ct 值 2 以上作为稀释孔有病毒的标志。病毒滴度($\text{TU}/\mu\text{L}$) $>1 \times 20$ /稀释度。再以 β -actin 基因、WRPE 基因熔解曲线是否呈单峰判断计算结果的可靠性。

1.4 构建 *hTSHR* 稳定表达株

取对数生长期 HEK 293T 细胞 1.2×10^7 接种于 15 mL 培养皿中,培养 24 h 后细胞密度达到 70%~80%。包装质粒、表达质粒(GV266-*hTSHR*) $20 \mu\text{g}$ 分别与 2.5 mL Opti-MEM 混匀。取 $100 \mu\text{L}$ Lipofectamine 2000 与 2.4 mL Opti-MEM 混匀。用 Lipofectamine 2000 混合液将包装质粒、表达质粒共转染 HEK 293T 细胞 48 h 即获得 *hTSHR* 稳定表达株。*hTSHR*-HEK 293T 稳定表达株可以连续传代,各代细胞株均表达 *hTSHR*。通过荧光显微镜观测 GFP 荧光证明传代的稳定表达株稳定表达。

2 结果

2.1 GV266 载体质量鉴定

Age I / *Nhe* I 酶切 GV266 载体,琼脂糖凝胶电泳(图 1)可见 2 道为线性化质粒 GV266 的单一一条带,大小与预测大小一致($>10 \text{ kb}$)。3 道是从细菌提取的未酶切 GV266 质粒因为超螺旋、开环、线性等不同的构象,在 10 kb 附近呈现多个条带。

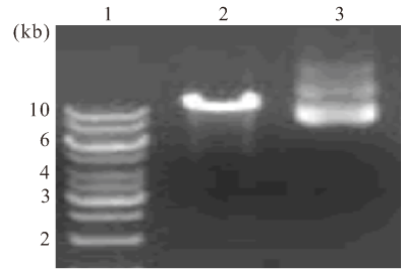


图 1 GV266 酶切琼脂糖凝胶电泳图

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of digested vector GV266

1: Marker; 2: Digested vector; 3: Undigested vector

2.2 获取 *hTSHR* 基因片段

Age I / *Nhe* I 双酶切 *hTSHR* 基因载体,PCR 产物琼脂糖凝胶电泳后出现单一一条带,大小与预测大小 2 320 bp 符合,证明获得了目的基因片段 *hTSHR*(图 2)。

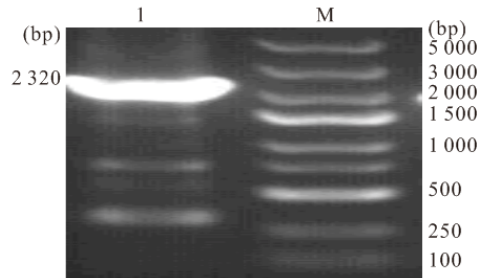


图 2 *hTSHR* 基因酶切电泳图

Fig 2 Gel electrophoresis of *hTSHR* gene

2.3 GV266-*hTSHR* 测序前电泳

依据 *hTSHR* 阳性转化子、内参 *GADPH* 转化子的 DNA 序列,分别设计 *hTSHR* 引物、*GADPH* 引物。PCR 扩增后一同电泳,条带与预测大小相同(图 3)。

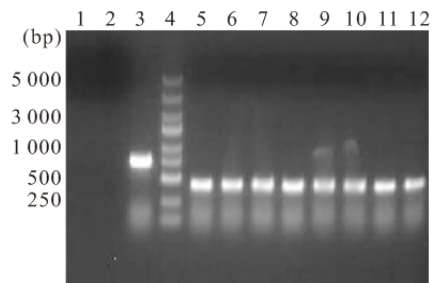


图 3 GV266-*hTSHR* 酶切片段 PCR 产物电泳图

Fig 3 Gel electrophoresis of PCR products of GV266-*hTSHR*

1: Negative control (ddH₂O); 2: Negative control (empty vector); 3: Positive control (*GADPH*); 4: DNA marker; 5-12: Transformant 1 to 8 of *hTSHR*

2.4 阳性克隆测序结果和序列比对

阳性克隆测序结果为: 5'-GGGTACCGGT

CGCCACC-(hTSHR)-GCTAGCTAAGTC-3'。ACCGGT 是前向导引物的酶切片段, GCTAGC 是反向引物的酶切片段, 中间的序列用 hTSHR 表示。包括两端引物的序列长度 2 314 bp。与已知的 hTSHR 基因序列比对, 阳性克隆序列与已知序列相同(100%)。

2.5 表达质粒的检测

图 4 可见, 对照的 HEK 293T 细胞、Jurkat 细胞未见 hTSHR 条带(相对分子质量为 62×10^3), 过表达 hTSHR 的 HEK 293T 细胞、hTSHR 阳性对照细胞(A375)出现明显的相对分子质量为 62×10^3 的条带。

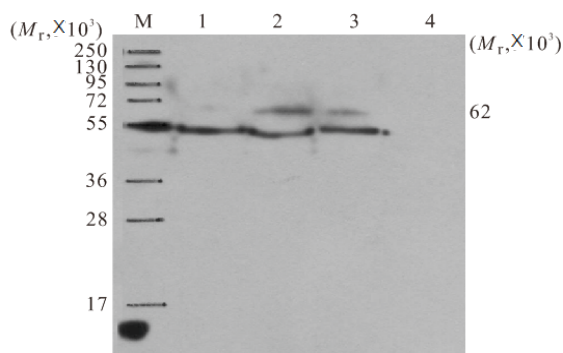


图 4 Western blot 检测 hTSHR-293T 细胞的 hTSHR 目的条带

Fig 4 Western blot analysis of expression plasmid GV266-hTSHR in 293T cells showed the target band of hTSHR

1: HEK 293T; 2: hTSHR-293T cells; 3: A375 cells(hTSHR positive control); 4: Jurkat cells(hTSHR negative control)

2.6 包装病毒 qPCR 定量

qPCR 曲线显示(图 5), 2 个 10^{-5} 稀释度孔的平均 Ct 值为 30.985, 2 个 10^{-4} 稀释度孔的平均 Ct 值为 30.3, 差异很小, 以 10^{-4} 稀释度孔作为最低滴度有病毒孔。对照孔 Ct 值为 35.95, 与 10^{-4} 稀释度孔差值大于 2。因此, 浓缩病毒储存液换算出来的病毒滴度为大于 2×10^8 TU/mL。WRPE 基因熔解、 β -actin 熔解曲线均为单峰(数据未给出), 证明病毒中没有污染、引物二聚体、非特异性扩增, 计算的病毒滴度可靠。

2.7 GV266/hTSHR/293T 稳定表达株 GFP 荧光染色鉴定

GV266-hTSHR 表达病毒、GV266 包装病毒在 HEK 293T 细胞共表达后, 用 GFP 抗体显色, 荧光显微镜观察 HEK 293T 细胞显示绿色荧光(图 6)。这种稳定表达 hTSHR 的 293T 细胞可以用于下一步实验。

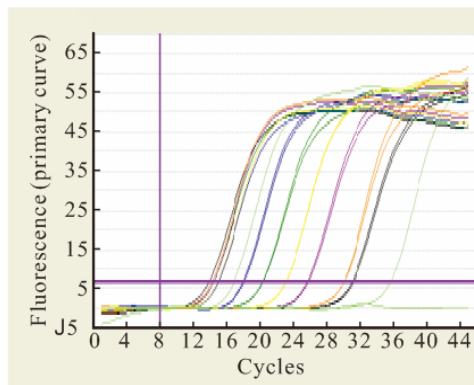


图 5 WRPE 基因的 qPCR 曲线

Fig 5 qPCR curve of WRPE gene

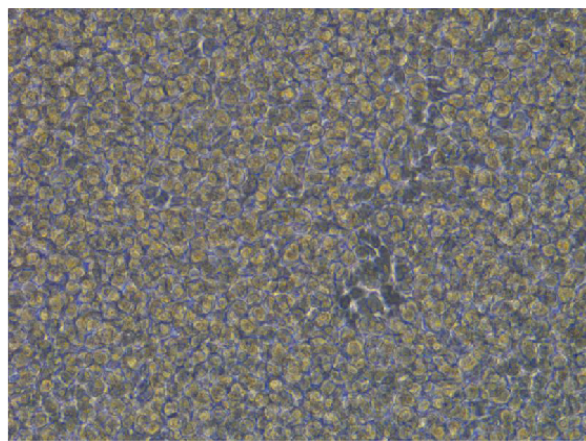


图 6 荧光显微镜观察 HEK 293T 细胞荧光。×400

Fig 6 HEK 293T cells were observed uncler GFP fluorescence microscopy. ×400

3 讨论

hTSHR 基因位于 14q31, mRNA 长 2 294 bp (CDS: 151~2451), 编码 764 氨基酸。1~20 氨基酸信号肽, 21~764 氨基酸是成熟肽。编码后的前体 A317-F366 被剪切掉, 形成 α 、 β 亚单位。 α 亚基 N 端有两个 loop, 中央是亮氨酸富集区(LRR), C 端称为铰链区, 接近细胞膜并与 β 亚基连接。LRR 凹面是 TSHR α 与 TSA β 结合区。 β 亚基的 E404-T682 是 7 跨膜区, K683-L744 是 C 端尾, 具有酪氨酸激酶活性。hTSHR 表达在甲状腺滤泡细胞、皮肤^[10], 肾上腺、肾、胸腺^[11, 12]、眼眶脂肪结缔组织^[10, 13-15]。因此 Graves 甲亢除甲状腺病变外还可能有关眼等甲状腺外表现。

慢病毒包装质粒转染 HEK 293T 细胞的转染效率明显高于骨架质粒, 转染后的 HEK 293T 细胞在传代后可稳定表达 hTSHR 等外源基因。因此本研究用包装病毒构建稳定表达株, 有利于反复进行抗甲状腺多肽的研究, 获得更稳定的实验结果。本

研究成功获取并冻存了 GV266-hTSHR-HEK 293T 细胞稳定表达株,为抗甲状腺新药(多肽)的研究提供了必要的材料。

我们依据 TSAb 与 TSHR α 相互作用的位点,设计并合成了若干有潜力的多肽冻存,这些片段可能是 hTSHR 阻断剂。下一步研究是,在有或无多肽的条件下,比较 bTSH 刺激 hTSHR-HEK 293T 细胞稳定表达株后细胞内 cAMP 变化。

总之,我们组装了 GV266 包装质粒,建立了 GV266-hTSHR-HEK 293T 细胞的稳定表达株,为下一步研究准备了必要实验材料。

参 考 文 献

- 1 Bjorkholm M, Pisa P, Arver S, *et al.* Haematologic effects of granulocyte-macrophage colony stimulating factor in a patient with thiamazole-induced agranulocytosis. *J Intern Med*,1992; 232(5):443-445.
- 2 Biswas N, Ahn YH, Goldman JM, *et al.* Aplastic anemia associated with antithyroid drugs. *Am J Med Sci*,1991;301(3):190-194.
- 3 Memi E, Karras S, Tzotzas T, *et al.* Propylthiouracil hepatitis: report of a case and extensive review of the literature. *J Pediatr Endocrinol Metab*,2012;25(3-4):331-343.
- 4 Sanders J, Jeffreys J, Depraetere H, *et al.* Characteristics of a human monoclonal autoantibody to the thyrotropin receptor; sequence structure and function. *Thyroid*,2004;14(8):560-570.
- 5 Sanders P, Young S, Sanders J, *et al.* Crystal structure of the TSH receptor (TSHR) bound to a blocking-type TSHR autoantibody. *J Mol Endocrinol*,2011;46(2):81-99.
- 6 Nunez Miguel R, Sanders J, Chirgadzhe DY, *et al.* Thyroid stimulating autoantibody M22 mimics TSH binding to the TSH receptor leucine rich domain; a comparative structural study of protein-protein interactions. *J Mol Endocrinol*,2009;42(5):381-395.
- 7 Neumann S, Kleinau G, Costanzi S, *et al.* A low-molecular-weight antagonist for the human thyrotropin receptor with therapeutic potential for hyperthyroidism. *Endocrinology*,2008;149(12):5945-5950.
- 8 Tsui S, Naik V, Hoa N, *et al.* Evidence for an association between thyroid-stimulating hormone and insulin-like growth factor 1 receptors: a tale of two antigens implicated in Graves' disease. *J Immunol*,2008;181(6):4397-4405.
- 9 Fukushima H, Mizutani M, Imamura K, *et al.* Development of a novel preparation method of recombinant proteoliposomes using baculovirus gene expression systems. *J Biochem*,2008;144(6):763-770.
- 10 Agretti P, Chiovato L, De Marco G, *et al.* Real-time PCR provides evidence for thyrotropin receptor mRNA expression in orbital as well as in extraorbital tissues. *Eur J Endocrinol*,2002;147(6):733-739.
- 11 Dutton CM, Joba W, Spitzweg C, *et al.* Thyrotropin receptor expression in adrenal, kidney, and thymus. *Thyroid*,1997;7(6):879-884.
- 12 Sellitti DF, Akamizu T, Doi SQ, *et al.* Renal expression of two 'thyroid-specific' genes: thyrotropin receptor and thyroglobulin. *Exp Nephrol*,2000;8(4-5):235-243.
- 13 Bahn RS, Dutton CM, Natt N, *et al.* Thyrotropin receptor expression in Graves' orbital adipose/connective tissues: potential autoantigen in Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab*,1998;83(3):998-1002.
- 14 Bhattacharyya KK, Coenen MJ, Bahn RS. Thyroid transcription factor-1 in orbital adipose tissues: potential role in orbital thyrotropin receptor expression. *Thyroid*,2005;15(5):422-426.
- 15 Lu S, Guan Q, Liu Y, *et al.* Role of extrathyroidal TSHR expression in adipocyte differentiation and its association with obesity. *Lipids Health Dis*,2012;11:17.

(2013 - 07 - 11 收稿,2013 - 10 - 21 修回)

编辑 汤 洁