

鉴定活性维生素 D 细胞模型的构建

程佳, 王永吉

(陕西理工大学维生素 D 生理与应用研究所, 陕西汉中 723000)

摘要: 本文构建了维生素 D 受体 (Vitamin D receptor, VDR) 融合蛋白的真核表达载体, 并获得稳定表达 VDR 融合蛋白的细胞体系, 为含有活性维生素 D 食品及药物的鉴定建立成熟的细胞模型。设计并合成特异性引物扩增 VDR 基因, 将扩增产物克隆至 pcDNA 3.1/His 真核表达载体上, 将其转染 HEK293 细胞。采用免疫沉淀 (IP) 技术鉴定 VDR 融合蛋白的表达效率。在构建 pcDNA 3.1/VDR-His 成功的基础上, 用活性 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 处理转染的细胞, 收集总蛋白和 mRNA, 分别利用免疫印迹 (Western blot, WB) 和实时定量 PCR (qRT-PCR) 技术, 检测 VDR 融合蛋白以及其下游基因 CYP24A1 基因的表达。IP 结果证实 VDR 融合蛋白具有转录活性。WB 和 qRT-PCR 结果显示, 1 nmol/L 浓度的活性 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 处理转染细胞能有效激活 VDR 蛋白的表达, 以及显著增强 CYP24A1 的 mRNA 表达 ($p < 0.01$)。利用该细胞模型检测维生素 D 类药物的活性, 结果显示不同药物中维生素 D 的活性与药物种类有关。pcDNA 3.1/VDR-His 融合表达载体构建成功, 并以此构建了鉴定活性维生素 D 的细胞模型。

关键词: 维生素 D 受体; 融合蛋白; 细胞模型

文章编号: 1673-9078(2017)8-36-40

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.8.007

Construction of a Cell Model for the Identification of Active Vitamin D

CHENG Jia, WANG Yong-ji

(Shaanxi University of Technology, Vitamin D Research Institute, Hanzhong 723000, China)

Abstract: A eukaryotic expression vector containing a vitamin D receptor (VDR) fusion protein was constructed, enabling the creation of a cell system that could stably express VDR fusion protein, and a mature cell model for the identification of food and drugs containing active vitamin D was established. Specific primers were designed and synthesized to amplify the VDR gene, the gene amplification products were cloned into a pcDNA 3.1/His eukaryotic expression vector, and the vector was then transfected into HEK293 cells. Immunoprecipitation (IP) was used to identify the expression efficiency of the fusion protein. Using the successfully constructed pcDNA 3.1/VDR-His vector, the transfected HEK293 cells were treated with an active form of vitamin D, $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 , and then total protein and mRNA were quantified. Western blot (WB) analysis and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) were used to detect the expression of the VDR fusion protein and its target gene, CYP24A1, respectively. The IP results showed that the VDR fusion protein had transcription activity. WB and qRT-PCR results showed that 1 nmol/L $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 could effectively activate VDR fusion protein expression in the transfected cell system and significantly increase CYP24A1 mRNA expression ($p < 0.01$). This cell model was used to determine the activity of vitamin D drugs, and the results suggested that the vitamin D activity of different drugs was related to drug type. The pcDNA 3.1/VDR-His fusion-protein expression vector system was successfully constructed, and a cell model to identify active vitamin D in food and drugs was successfully established using the working vector.

Key words: vitamin D receptor; fusion protein; cell model

维生素 D 是一种具有广泛生理活性的脂溶性甾醇化合物, 是调节机体钙、磷代谢的前体激素 (prohormone), 与人类健康关系十分密切。当食物摄

收稿日期: 2016-12-29

基金项目: 陕西省教育厅专项科研项目 (12JS029); 陕西省科技创新团队项目 (2012KCT-29)

作者简介: 程佳 (1983-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 维生素 D 受体的组织细胞学效应

通讯作者: 王永吉 (1965-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 维生素 D 药物研发

取维生素 D 不足或身体接受阳光照射不足时, 会造成维生素 D 缺乏症, 严重时会引起儿童佝偻病、成人软骨症及老年人骨质疏松症等疾病。近几年的研究表明, 维生素 D 缺乏还与内分泌系统^[1]、免疫疾病^[2]、肿瘤^[3,4]、慢性肾病^[5]和糖尿病^[6]等疾病的发生和发展密切相关。

目前, 在维生素 D 类的医药产品中, 一类是维生素 D 的保健制品, 这类产品多含有维生素 D_2 或 D_3 , 通常用来改善钙吸收和维持维生素 D 的健康水平。另一类是维生素 D 类药物, 包括高剂量维生素 D 制剂、

活性维生素 D 类化合物、活性维生素 D 化合物的前体以及维生素 D 拮抗剂等。随着我国都市化进程的加快以及生活方式的改变,维生素 D 缺乏的状况变得日益严峻。因此,我国对维生素 D 生物医药产品的需求巨大,对维生素 D 类药物的研发有助于提高国民健康水平、生活质量及平均寿命。

鉴定活性维生素 D 细胞模型的构建为发现新型药物,从食品和天然药物中大规模快速筛选具有类维生素 D 的活性成分,提供了高效的技术方法,并对维生素 D 类药物作用机制的研究具有重要意义。本研究拟建立的细胞模型可用于活性维生素 D 的快速鉴定,并能够对其效果进行定量判断。为研发新型维生素 D 类药物及其先导化合物提供了有力工具,也有助于食品和天然药物成分中类维生素 D 活性作用的发现及其相关产品的开发。

1 材料与方法

1.1 材料

HEK293 细胞(西北农林科技大学动物科学院提供);大肠杆菌 DH5 α (北京鼎国),质粒 pcDNA3.1/His (Invitrogen); *Eco*R I, *Hind* III 和 T4 连接酶(NEB);质粒提取试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒(Axygen);胎牛血清(Gibco);DMEM 培养基(Gibco);转染试剂(Nenofect);细胞裂解液、His 抗体和 protein A+G(碧云天);VDR 和 β -actin 抗体(Santa Cruz);活性 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 和 Trizol (Sigma);反转录试剂盒(TaKaRa);CYP24A1 荧光探针(ABI);其它试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 pcDNA3.1/VDR-His 融合表达载体构建

设计特异性引物扩增获得 VDR 基因序列,上游引物:(带有 *Hind* III 酶切位点) 5'-CGATG CAAGCTTCGCCACCATGGAGTGGAGGAATAAGAAAGGAG-3',下游引物:(带有 *Eco*R I 单酶切位点) 5'-ATATTAGAATTCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCC TCCTCCTCCTCCTCCGGAGATCTCATTGCCAAAC ACTTC-3',产物长度为 1480 bp。PCR 扩增程序为:95 °C 预变性 10 min,95 °C 变性 30 s,60 °C 退火 60 s,55 °C 延伸 2 min,循环 30 次,72 °C 延伸 10 min,16 °C 保存。*Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切并胶回收 pcDNA 3.1/His 载体以及 VDR 的 PCR 产物,连接并转化 DH5 α 感受态,转化的菌液均匀涂布于含 100 mg/L 氨苄霉素的 LB 平板上进行筛选,挑取单克隆,经菌液 PCR 及质粒双酶

切鉴定后,委托 Invitrogen 公司测序。保存序列比对一致的菌液和质粒,以备使用。

1.2.2 转染细胞及活性 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 处理

用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基培养 HEK293 细胞。将细胞接种于 60 mm 的培养皿中,待细胞密度达到 80% 时,按照转染试剂说明书进行转染。以 pcDNA3.1/His 载体为对照组,同时转染 pcDNA3.1/VDR-His 融合蛋白表达载体,48 h 后收集总蛋白。

用不同浓度(0、0.01、0.1、1、10 和 20 nmol/L)的活性 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 分别处理稳定表达 VDR 融合蛋白的细胞体系,12 h 后收集蛋白和 mRNA,分别检测 VDR 融合蛋白及其下游基因 CYP24A1 的表达情况。

1.2.3 免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP)

将细胞用适量细胞裂解缓冲液(含蛋白酶抑制剂),冰上裂解 30 min,4 °C 离心后取上清;在裂解液中加入 1 μ g 相应的抗体,4 °C 孵育过夜;将预处理过的 10 μ L protein A+G 琼脂糖珠加入到和抗体孵育过夜的细胞裂解液中,4 °C 孵育 4 h,使抗体与 protein A+G 琼脂糖珠偶连;反应后,4 °C 以 4000 r/min 离心 3 min;吸去上清,用 1 mL 裂解缓冲液清洗琼脂糖珠 3 次;最后加入 15 μ L 的 2 \times SDS 上样缓冲液,沸水煮 10 min;10% SDS-PAGE 胶进行 WB 分析。

1.2.4 Western blot (WB)

用蛋白裂解液提取对照组和转染 pcDNA3.1/VDR-His 表达载体的 HEK293 细胞的总蛋白。采用 BCA 法测定蛋白浓度,用 2 \times SDS 上样缓冲液将蛋白浓度调整一致后,煮沸 15 min,用 10% SDS-PAGE 胶电泳,将目的条带转移到 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,一抗孵育 2 h,二抗孵育 1 h,最后胶片曝光检测目的蛋白。

1.2.5 qRT-PCR

用 Trizol 提取不同处理组细胞总 RNA,定量后按照 TaKaRa 反转录试剂盒操作说明进行反转录,合成 cDNA。以此作为模板,采用 ABI 实时定量 PCR 系统检测基因表达情况,具体操作按照说明书条件进行。每个基因均以相同条件进行扩增,设 3 次重复,以 β -actin 作为内参基因。

2 结果与讨论

2.1 结果

2.1.1 pcDNA 3.1/VDR-His 融合蛋白表达载体的构建及鉴定

将构建好的 pcDNA3.1/VDR-His 融合蛋白表达载

体,用特异性引物进行菌液 PCR 检测,获得与预期一致的片段(图 1a),约 1500 bp。提取的质粒经 *Hind* III 和 *EcoR* I 双酶切电泳后出现大、小 2 条片段,其中小片段为 VDR 基因(图 1b)。阳性克隆的测序结果显示,氨基酸序列 100%配对,证明 pcDNA3.1/His 中插入的 VDR 基因序列正确。

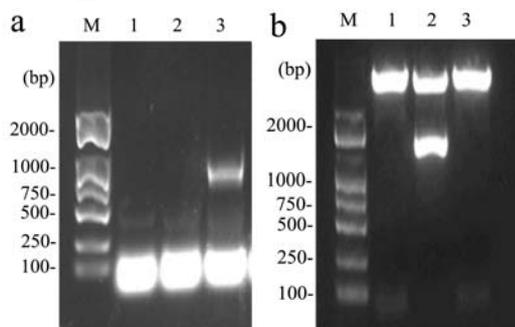


图 1 pcDNA3.1/VDR-His 表达载体的鉴定

Fig.1 Identification of the pcDNA3.1/VDR-His expression vector

注:图 a 表示菌液 PCR 鉴定结果(M: DL2000; 1 和 2 是阴性克隆;3 为阳性克隆);图 b 表示载体双酶切鉴定结果(M: DL2000; 1 为 *Hind* III 单酶切; 2 为 *Hind* III 和 *EcoR* I 双酶切; 3 为 *EcoR* I 单酶切)。

2.1.2 VDR-His 融合蛋白的表达

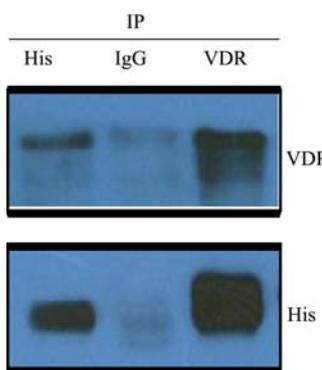


图 2 VDR 融合蛋白表达效率

Fig.2 Expression efficiency of VDR protein

在转染质粒 48 h 后收集 HEK293 的总蛋白,采用 IP 技术验证 VDR 融合蛋白的表达效率。结果显示,在 His 和 VDR 抗体下拉组中可分别检测出 VDR 和 His 蛋白的表达(图 2)。同时,在 pcDNA3.1/VDR-His 转染组中 VDR 蛋白表达明显增多。因此,pcDNA3.1/VDR-His 融合蛋白表达载体构建成功。

2.1.3 药物筛选细胞模型的建立

用不同浓度的活性 1,25(OH)₂D₃ 处理稳定表达 VDR 融合蛋白的细胞体系,连续孵育 12 h 后收集总蛋白和 mRNA,进行 WB 和 qRT-PCR 分析。由检测结果可知,活性 1,25(OH)₂D₃ 能有效激活 VDR 蛋白的表达(图 3a)。随着处理浓度的增加,VDR 蛋白的表

达逐步升高,其中 1 nmol/L 的处理效果最明显。随后,qRT-PCR 的结果也显示,1 nmol/L 的活性 1,25(OH)₂D₃ 能显著增加 VDR 下游基因 CYP24A1 基因的表达式量($p < 0.01$,图 3b)。以上结果说明,该细胞模型能够有效应答活性 1,25(OH)₂D₃ 的处理。

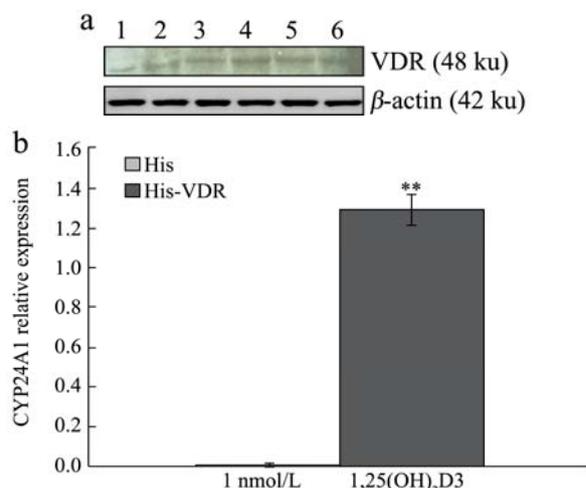


图 3 活性 1,25(OH)₂D₃ 激活转染细胞 VDR 蛋白及 CYP24A1 基因的表达

Fig.3 Expression of the VDR protein and CYP24A1 gene in transfected cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D₃

注:图 a 为活性 1,25(OH)₂D₃ 增加了 VDR 蛋白的表达(1~6 的浓度分别为 0、0.01、0.1、1、10 和 20 nmol/L);图 b 为 1 nmol/L 的活性 1,25(OH)₂D₃ 显著增加 CYP24A1 基因的 mRNA 表达($p < 0.01$)。

2.1.4 检测维生素 D 类药物的活性

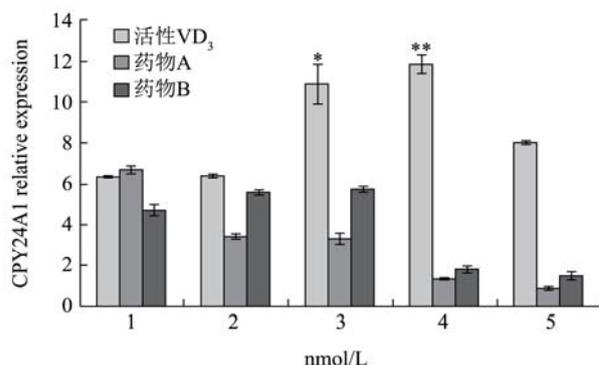


图 4 利用细胞模型测定维生素 D 类药物的活性

Fig.4 Measurement of the activity of vitamin D drugs with the cell model

注:1~5 的药物浓度分别为 0、0.01、0.1、1 和 10 nmol/L; ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

由于 VDR 靶基因 CYP24A1 的相对表达式量可以反映出维生素 D 药物的生物活性,因此含有 VDR-His 融合蛋白的细胞模型能够用于检测维生素 D 类药物的活性成分,可用于维生素 D 药物的筛选和鉴别工作。结果如图 4 所示,含有真核表达载体 pcDNA3.1/

VDR-His 的细胞模型能够响应活性 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的药物处理。并且在一定的药物浓度范围内 ($0\sim 1\text{ nmol/L}$), CYP24A1 的表达呈上升趋势。此外,为了验证该细胞模型检测其他维生素 D 类药物中活性成分的有效性,利用该模型对另外两种维生素 D 药物进行了分析。结果表明,其他两种维生素 D 药物的处理与活性 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的阳性对照略有差异。药物 A 和药物 B 的处理浓度存在上限,且随着药物处理浓度的增加,CYP24A1 的表达有所降低,但数据分析显示无统计意义,说明不同药物中维生素 D 活性与药物种类有关。

2.2 讨论

近几年,由于我国对维生素 D 类药物产品需求与维生素 D 类药物研发迟缓之间的矛盾,有关鉴定活性维生素 D 的细胞模型已成为必要的研究工具之一。同时,由于 VDR 在维生素 D 体系中的关键作用,因此 VDR 体外细胞模型在维生素 D 类药物研发过程中具有重要应用价值。此外,由于多聚组氨酸 (His) 亲和标签的分子量相对较小且带有电荷,几乎不影响目的蛋白的活性,其纯化产物可直接用于蛋白功能的研究^[7],因此在目的蛋白一端融合组氨酸纯化标签已成为获得表达重组蛋白的常用方法之一^[7,8]。

尤其是在药物研发过程中,需要对候选药物的药代动力学、药效学以及毒理学特征等进行确认,但传统研发体系缺乏能够在早期准确高效分析药物代谢作用、毒性反应的体外模型。由于细胞模型,相比单纯的生化或细胞器模型,更能体现机体生理活动的结构基础和功能;而较组织器官代谢模型,在技术应用上具有更大的可行性^[9]。因此,以细胞为基本功能单位的分析模型(cell-based assay, CBA)在现代药物研发技术中被广泛使用^[10-12]。

一般情况下,当 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 结合在 VDR 的配体结构域上,会引起 VDR 构象改变,使其与视黄酸受体 (retinoid X receptor, RXR) 形成异源二聚体, VDR-RXR 复合物作用于靶基因的转录起始位点上,从而调控靶基因的转录^[13,14]。因此,检测 VDR 下游基因 CYP24A1 表达的结果能反推 VDR 融合蛋白具有转录活性。同时,说明 pcDNA3.1/VDR-His 融合表达载体构建成功,以此建立的细胞模型能有效应答 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的处理。但其作用效果存在上限,即当活性 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的浓度达到 1 nmol/L 以上时,一方面 VDR 融合蛋白的表达不再增加,另一方面 VDR 下游基因 CYP24A1 的 mRNA 水平有所下降。

另外,利用该细胞模型对维生素 D 类药物的活性检测,结果显示不同药物中维生素 D 的活性与药物种

类有关。而维生素 D 类药物的生产工艺、制剂类型和储藏方式等因素是否会对维生素 D 的活性产生影响,还有待进一步研究。此外,食品及药物中活性维生素 D 的鉴定还必须通过适当的检测方法反复验证。在今后的研究中有必要增加光学分析、色谱分析、质谱和核磁共振等检测技术在活性成分鉴定方面的应用^[15]。

3 结论

综上所述,成功构建了 pcDNA3.1/VDR-His 融合表达载体以及鉴定活性维生素 D 细胞模型,为筛选具有生物活性的维生素 D 食品及药物研发提供了一个新平台。

参考文献

- [1] Slatopolsky E, Finch J L, Brown A J, et al. Effect of 2-methylene-19-nor-(20S)-1 α -hydroxybishomopregnacalciferol (2MbisP), an analog of vitamin D, on secondary hyperparathyroidism [J]. *J. Bone Miner. Res.*, 2007, 22(5): 686-694
- [2] Deluca H F, Plum L A. Vitamin D deficiency diminishes the severity and delays onset of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2011, 513(2): 140-143
- [3] Ross A C, Taylor C L, Yaktine A L, et al. Institute of medicine committee to review dietary reference intakes for vitamin D and calcium. institute of medicine [M]. Washington D C: The National Academies Press, 2011
- [4] Irving A A, Halberg R B, Albrecht D M, et al. Supplementation by vitamin D compounds does not affect colonic tumor development in vitamin D sufficient murine [J]. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2011, 515(1-2): 64-71
- [5] Wang Y, Borchert M L, Deluca H F. Identification of the vitamin D receptor in various cells of the mouse kidney [J]. *Kidney Int*, 2012, 81(10): 993-1001
- [6] Van Belle T L, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D and diabetes: the odd couple [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2013, 24(11): 561-568
- [7] 宿文辉,张杰,张丽雁,等.人睾丸精子结合蛋白-His6 融合蛋白在真核细胞中的表达及亲和纯化[J].*细胞与分子免疫学杂志*,2006,22(5):553-556
- [8] SU Wen-hui, ZHANG Jie, ZHANG Li-yan, et al. Fusion expression and affinity purification of a human novel gene tsbp in eukaryotic cells [J]. *Chin. J. Cell Mol. Immunol.*, 2006, 22(5): 553-556
- [8] 韩雅玲,孙鸣宇,郭亮,等.重组分泌型人 CREG/myc-His 融

- 合糖蛋白的表达及功能分析[J].中国免疫学杂志,2008,24(8):685-688
- HAN Ya-ling, SUN Ming-yu, GUO Liang, et al. Expression of recombinant secreted glycoprotein of human CREG/myc-His and the analysis for its bio-activities [J]. Chinese Journal of Immunology, 2008, 24(8): 685-688
- [9] 陈锋.构建适于药物研发的 CYP3A4 高表达细胞模型的研究[D].广州:南方医科大学,2014
- CHEN Feng. Constructing a cell model with enhanced expression of CYP3A4 for drug testing [D]. Guangzhou: Guangzhou: Southern Medical University, 2014
- [10] 张宁,潘丽,牛国君,等.以 MERS-COV 主蛋白酶为靶点的药物筛选体系的建立及应用[J].中国生物工程杂志,2013,33(12):51-56
- ZHANG Ning, PAN Li, NIU Guo-jun, et al. Establishment and application of a system for drug screening targeting MERS-CoV main proteinase [J]. China Biotechnology, 2013, 33(12): 51-56
- [11] 钮琦,吴方.Notch 信号通路体外和细胞的药物筛选模型的建立和研究[J].药学学报,2014,49(6):837-842
- NIU Qi, WU Fang. Establishment of *in vitro* and cell-based drug screening model for Notch signaling pathway [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2014, 49(6): 837-842
- [12] 马晶晶,张潜,方宁,等.基于人 PPAR α 为靶标的药物筛选细胞模型的建立与应用评价[J].中国药理学杂志,2011,46(23):1798-1804
- MA Jing-jing, ZHANG Qian, FANG Ning, et al. A cell-based screening model for human PPAR α agonist ligands discovery and its applicability [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2011, 46(23): 1798-1804
- [13] Pike J W, Meyer M B. The vitamin D receptor: new paradigms for the regulation of gene expression by 1,25-dihydroxy vitamin D₃ [J]. Rheum. Dis. Clin. North. Am., 2012, 38(1): 13-27
- [14] Ryynanen J, Neme A, Tuomainen T P, et al. Changes in vitamin D target gene expression in adipose tissue monitor the vitamin D response of human individuals [J]. Mol. Nutr. Food Res., 2014, 58(10): 2036-2045
- [15] 许媛媛,陈鹏辉,吴英理.高通量药物筛选模型的研究进展[J].上海交通大学学报(医学版),2013,33(10):1415-1419
- XU Yuan-yuan, CHEN Peng-hui, WU Ying-li. Research progress of high throughput drug screening models [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science), 2013, 33(10): 1415-1419