

人骨保护素在 CHO 细胞内初步稳定表达

孟凡星¹ 李瑞香¹ 臧晓怡^{2*}

1. 河北省承德医学院病理生理学教研室, 河北承德 067000
2. 天津医科大学内分泌研究所, 天津 300070

中图分类号: R34 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2014) 06-0611-04

摘要: **目的** 构建人 OPG 的稳定表达载体,并在 DHFR⁻型 CHO 细胞内稳定表达。**方法** 用 RT-PCR 的方法获得人全长 OPG 的编码基因,并将其克隆入载体 pcDNA3.1-DHFR/CT-GFP,鉴定无误后,转染 DHFR⁻型 CHO 细胞,经 MTX 筛选获得阳性表达 OPG 的细胞株。**结果** 成功构建人 OPG 的稳定表达载体,并获得阳性表达 OPG 的细胞株。**结论** 全长人 OPG 基因可以在 CHO 细胞内成功稳定表达,这为 OPG 的功能研究及临床应用奠定物质基础。

关键词: 骨保护素;二氢叶酸还原酶;中国仓鼠卵巢细胞;MTX

Preliminary stable expression of human OPG in the CHO cell

MENG Fanxing¹, LI Ruixiang¹, ZANG Xiaoyi²

1. Department of Pathophysiology, Chengde Medical College, Chengde 067000
 2. Institute of Endocrine, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China
- Corresponding author: ZANG Xiaoyi, Email: zangxy@tjmu.edu.cn

Abstract: Objective To construct the stable expression vector of the human OPG, and to detect its stable expression in DHFR⁻ type CHO cells. **Methods** The full-length human OPG gene was obtained using RT-PCR method. The gene was cloned into the vector pcDNA3.1-DHFR/CT-GFP. After identification, the vector was transfected into DHFR⁻ type CHO cells. The CHO cells with positive expression of OPG were selected using MTX screening. **Results** The stable expression vector of the human OPG was successfully constructed, and the CHO cells with positive expression of OPG were also obtained. **Conclusion** The full-length human OPG gene can be stably expressed in the CHO cells, which provides a foundation for the functional research and clinical application of OPG.

Key words: OPG, DHFR, CHO, MTX

骨保护素(osteoprotegerin, OPG)是在破骨细胞的分化和发育过程中具有重要作用的细胞因子。它可抑制破骨细胞分化和发育,抑制骨质疏松的发生^[1,2]。体外表达具有天然结构及活性的 OPG,对 OPG 的基础和临床的应用研究具有十分重要的意义。

为了获得大量具有天然生物活性的 OPG,本研究利用中华仓鼠卵巢细胞(CHO)系统初步表达了 OPG,同时用 MTX 加压,筛选,初步得到了稳定表达 OPG 的细胞株,为将来大规模生产具有天然结构和功能活性的 OPG 奠定了基础。

基金项目:天津市自然科学基金重点项目(013803511);河北省教育厅课题项目(Z2010110)

* 通讯作者:臧晓怡,Email: zangxy@tjmu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 生物材料:大肠杆菌 TOP10 购自 Invitrogen 公司,质粒载体 pcDNA3.1-DHFR/CT-GFP 为在 Invitrogen 公司产品 pcDNA3.1/CT-GFP 的基础上用鼠源二氢叶酸还原酶基因构建。二氢叶酸还原酶缺陷型中国仓鼠卵巢细胞(CHO-dhfr⁻)购自 ATCC。人新鲜肾组织来自临床肾全切手术病人的肾皮质,冻存于液氮中。

1.1.2 试剂与仪器:AMV 逆转录酶试剂盒购自 Promega 公司,限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker DL2000、dNTP Mixture 购自大连 TaKaRa Biotech 公司。pfu DNA 聚合酶购自上海生工生物公司。Trizol 试剂、脂质转染试剂盒

LipofectAMINETM2000 Reagent 购自 Invitrogen 公司。OPG-ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司。

1.2 方法

1.2.1 获取人肾组织的全长 OPG 表达序列: 根据 GeneBank 中人 OPG 的 mRNA 序列 (Accession: U94332), 用软件 Gene Runner 设计合成一对引物: 上游: PR1: 5'-ACG GAA TTC GAC CAC AAT GAA CAA GTT GCT G-3', 下游: PR2: 5' ATC CTA TCA GGC CAT TTC CAG TTA TAA GCA G-3'。上游 5'端引物含有 EcoR I 酶切位点 (GAATTC) 和保护性碱基 ACG 以及 kozak 序列 (ACAATGA), 下游 5'端含有半个 EcoR V 酶切位点 (ATC) 和 2 个终止码 (CTA TCA)。以合成的 cDNA 为模板用 pfu DNA 聚合酶进行 PCR 扩增: PR1 和 PR2 各 0.3 μ L, 10 $\times$ pfu Buffer, pfu DNA 聚合酶 1U, 加 ddH₂O 至 25 μ L。反应参数为: 95 $^{\circ}$ C 3 min 充分变性; 以后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 68 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 10 min 完成延伸, 取 5 μ L 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

1.2.2 重组表达质粒的构建: 用 EcoRI 消化 PCR 产物, 用 EcoRI 和 EcoR V 消化质粒 pcDNA3.1-DHFR/CT-GFP, 分别纯化后, 以 T4 DNA 连接酶连接 PCR 产物和消化后的质粒载体。过夜后转化 TOP10。挑取菌落小规模培养。提取质粒后用 EcoRI 和 EcoR V 酶切鉴定阳性菌落。同时将质粒送测序公司测序以鉴定 OPG 序列的正确性。

1.2.3 转染 CHO 细胞: 大量提取测序正确的质粒, 使用内切酶 Cfr10 I 将其线性化, 纯化回收后, 按 Lipofect AMINETM 2000 Reagent 说明书, 将线性化的载体转染 CHO-dhfr 细胞。

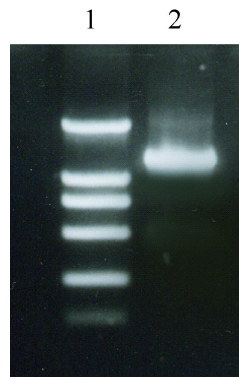
1.2.4 OPG 的基因组 DNA 整合和 mRNA 转录鉴定: 将转染的细胞培养于 HT⁻ 的培养基, 筛选阳性转染了目的基因的细胞株, 并进行单克隆培养。加入 1.5×10^{-8} mol/L 的 MTX, 加压筛选, 3d 后, 收取细胞。离心后, 提取基因组 DNA 和 mRNA, 分别用 PCR 和 RT-PCR 鉴定 OPG 的基因表达。上清液用 ELISA 方法, 鉴定 OPG 的表达。

2 结果

2.1 RT-PCR 方法扩增人 OPG cDNA 及重组质粒的鉴定

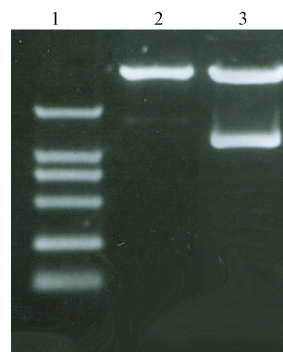
用 RT-PCR 的方法, 扩增人肾组织 OPG cDNA 后琼脂糖凝胶电泳, 得到 1243bp 的片段 (图 1)。将

OPG 与载体 pcDNA3.1-DHFR/CT-GFP 连接后, 用 EcoR I 和 EcoR V 双酶切重组载体和对照载体后电泳可见, 重组载体带有目的基因 (图 2)。将重组载体送测序, 结果与 Genebank 比对完全正确 (测序图未显示)。



1. DL2000 Marker: 2000bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 250bp, 100bp;
2. OPG cDNA 扩增序列 (1243bp)

图 1 RT-PCR 方法扩增人 OPG cDNA
Fig. 1 Amplification of the OPG cDNA using RT-PCR



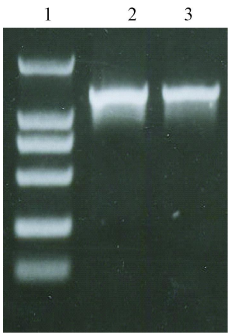
1. DL2000 Marker: 2000bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 250bp, 100bp; 2. 空白质粒双酶切结果; 3. OPG 与载体连接后双酶切产物

图 2 OPG 表达载体的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of the OPG expression vector using restriction endonuclease

2.2 转染 CHO-DHFR 细胞后的 OPG 的基因组 DNA 整合和 mRNA 转录鉴定

分别用 PCR 扩增基因组 DNA, RT-PCR 扩增 mRNA 后, 可见 DHFR 和 OPG 的编码基因都已经整合于基因组 DNA 并且有 mRNA 的转录 (图 3, 4)。收集上清液, 用 ELISA 鉴定 OPG 的表达, 在 450 nm 波长, 阳性组吸光度为 0.273, 阴性对照为 0.07, 证明有 OPG 的表达。



1. DL2000 Marker;2000bp、1000bp、750bp、500bp、250bp、100bp;
2. 转染后 CHO 细胞的 DNA 扩增;3. 转染后 CHO 细胞的 RT-PCR 扩增

图 3 转染 CHO 细胞后 OPG 的基因组整合和 mRNA 转录鉴定

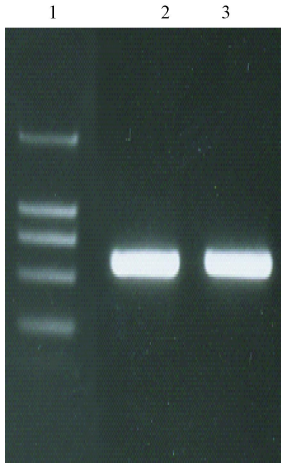
Fig. 3 Identification of the OPG genome integration and mRNA transcription in the transfected CHO cells

3 讨论

如果要获取具有天然结构和功能的真核蛋白,应用哺乳动物细胞表达系统来表达是一种行之有效的方法。因为它可以使真核蛋白进行正确的翻译后修饰,包括二硫键的精确形成、糖基化、磷酸化、寡聚体形成或者被非特异蛋白酶裂解等。而人 OPG 是由 401 个氨基酸构成的分泌型糖蛋白,含有 7 个结构域和 1 个分泌信号肽。因此 OPG 翻译后的正确糖基化和空间构象的正确形成对其功能的实现是必需的。过去关于 OPG 的表达,有在酵母中表达、有在原核中表达,还有表达融合蛋白的^[3-5]。当然要表达具有天然活性的 OPG,哺乳动物细胞表达系统是非常理想的。但是由于哺乳动物细胞比起原核和酵母细胞来,对外源蛋白表达效率较低,因此建立高效而稳定地表达外源蛋白的哺乳动物细胞表达系统为解决问题的关键所在。

在多数情况下,目标基因的表达水平同基因扩增程度成正比,所以基因扩增为提高任何特定基因的表达水平提供了一个方便的方法。当目标基因同一个可扩增的选择标记基因一起转化细胞,接着就可以通过选择扩增的标记基因,去获得含有与标记基因共扩增的目标基因的细胞。二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)是最广泛应用的可扩增的选择标记基因。当把编码目标蛋白的基因同编码选择标记的蛋白基因(DHFR)放于同一载体上,在有选择压力下,可扩增的选择标记基因扩增时,同其相连的目标基因也同时扩增,使目标基因的

表达量增高^[6]。



1. DL2000 Marker; 2000bp、1000bp、750bp、500bp、250bp、100bp;2. 转染后 CHO 细胞的 DNA 扩增;3. 转染后 CHO 细胞的 RT-PCR 扩增

图 4 转染 CHO 细胞后 DHFR 的基因组整合和 mRNA 转录鉴定

Fig. 4 Identification of the DHFR genome integration and mRNA transcription in the transfected CHO cells

在本研究中,为能生产天然活性的人 OPG,应用 RT-PCR 的方法获取了人 OPG 全长编码基因,同时加入了两个终止码 CTA TCA,以确保获取的 OPG 不带有不需要的氨基酸序列,以保证其天然活性。转染 CHO 细胞后,通过基因组 DNA 和 mRNA 的鉴定,证明载体已经整合进基因组 DNA,并开始工作。如果没有被整合入基因组 DNA 的细胞,在 HT 的培养基中不能生存。应用 MTX 加压后,细胞为生存, DHFR 基因必须扩增,生产更多的 DHFR 以对抗环境的改变。同时,OPG 也被扩增并且表达。OPG 是一种分泌蛋白,因此可以用培养的上清液用 ELISA 的方法来检测 OPG 的表达水平和正确性。当然以本研究中 MTX 的浓度还不足以大量生产 OPG。欲获取大量的 OPG,还必须要不断增加 MTX 的浓度,加压筛选以获取更高表达 OPG 的细胞株。

【 参 考 文 献 】

[1] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin; a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell, 1997, 89:309-319.
[2] Tsuda E, Goto M, Mochizuki SI, et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, 234:137-142.

本研究以女性月经初潮,男性窜个年龄为标志,评价青少年性发育早晚,按年龄 ≤ 10 岁,10~13岁,13~16岁人为分成3组,各组间BMD Z值不一致,且差异均有显著性。研究显示,儿童骨骼的生长过程中,BMD是一个逐渐增长的过程,进入青春期,由于性激素的突增,导致BMD的快速增长及骨骼的成熟^[4-7]。本研究中,253例病例的左手桡、尺、掌、指骨骨骺线均闭合,说明骨骼已基本成熟,各组间BMD Z值的差异是性发育早晚不同导致。性发育早晚不同是否会影响以后峰值骨量?是否会对中老年后骨质疏松症发生率及发生早晚有影响?尚需进一步研究。

总之,DXA测定儿童腰椎或全身BMD具有准确性高、重复性好、辐射低的优点,儿科中,主要用于儿童特发性骨质疏松症的诊断。本研究显示,这种方法用来评价儿童骨骼健康同样具有意义,结果的解读需要结合儿童的发育水平、当地或本族儿童各年龄段的参考值,若Z值 ≤ -2.0 ,且无骨折史者,可以诊断为骨密度低于同龄人范围,本研究中,16~20周岁年龄段患病率达6%,排除特殊的代谢性骨病及影响BMD的慢性疾病外,应考虑血清25-(OH)D₃水平、BMI、饮食习惯、运动锻炼、性发育早晚等影响因素,针对性采取干预措施,以改善其骨骼健康状况。

【 参 考 文 献 】

[1] Bachrach LK, Sills IN. Clinical Report-Bone Densitometry in Children and Adolescents. *Pediatrics*,2011,127:189-194.

[2] Gordon CM, Bachrach LK, Carpenter TO, et al. Dual energy X-ray absorptiomtry interpretation and reporting in children and adolescent; the 2007 ISCD pediatric official positions. *J Clin*

Densitom, 2008,11(1):43-58.

[3] 刘忠厚,郭亦超,马远征,等. 骨质疏松诊断. 北京:中国现代文艺出版社,2011:194-220.

Liu ZH,Guo YC, Ma YZ, et al. *The Diagnosis of Osteoporosis*. Beijing: China Modern Literature and Art Publishing House, 2011:194-220.

[4] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐分会. 原发性骨质疏松证诊治指南[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2011,4:2-18.

Chinese Medical Association of Osteoporosis and Bone Mineral. *Primary Osteoporosis Diagnosis and Treatment Guidelines* [J]. *Chinese Journal of Osteoporosis and Bone Mineral Disease*, 2011, 4:2-18.

[5] 荫士安. 儿童营养与骨骼发育的最新进展. 卫生研究,2004,6(33):768-770.

Ying SA. *Children's Nutrition and Skeletal Development of the Latest Progress*. *Health Research*,2004,6(33):768-770.

[6] Gennari C. Calcium and Vitamin D Nutrition and Bone Disease of the Elderly. *Public Health Nutr*, 2001, 4(2B):547-559.

[7] Kalwarf HJ, Zemel BS, Gilsamz V, et al. The bone mineral density in childhood; bone mineral content and density according to age, sex, and race. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92: 2087-2009.

[8] Bonjour JP. Prptein intake and bone health. *Int J Vtam Nutr Res*,2011,81(2-3):134-142.

[9] Arab Ameri E, Dehhoda MR. Bone mineral density changes after physical training and calcium intake in students with attention deficit and hyper activity disorders. *Res Dev Disabil*, 2012,33(2):594-599.

[10] Blake GM, Naeen M, Boutros M. Comparison of effective dose to children and adults from dual X-ray absorptiometry examination. *Bone*,2006,38(6):935-942.

[11] Tomas SR, Kalkwarf HJ, Buckley DD, et al. Effective dose for dual energy X-ray absorptiometry scans in children as a function of age. *J Clin Densitiom*,2005,8(4):415-422.

(收稿日期:2013-04-26,修回日期:2013-06-27)

(上接第613页)

[3] Liu JZ, Ji ZL, Chen SM, et al. Expression of human OPG-MBP fusion protein in E. coli. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2002,18: 551-553.

[4] Tang H, Gong P, Tan Zh, et al. Construction of eukaryotic expression bicistron plasmid vector pcDNA3.1-hOPG and its expression *in vitro*. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2007,29: 2240-2243.

[5] Liu JL, Liu B, Song SJ, et al. Expression of the rhOPG179-HSA fusion protein in pichia pastoris. *Letters In Biotechnology*, 2011, 22: 15-23.

[6] Chen Y, Jiang L, Yang J, et al. Construction of eukaryotic expression vector of human β -NGF and activity of expressed product. *Chin J Biologicals*,2005,18: 457-460.

(收稿日期:2013-04-10,修回日期:2013-05-20)

人骨保护素在 CHO 细胞内初步稳定表达

作者: [孟凡星](#), [李瑞香](#), [臧晓怡](#), [MENG Fanxing](#), [LI Ruixiang](#), [ZANG Xiaoyi](#)
作者单位: [孟凡星, 李瑞香, MENG Fanxing, LI Ruixiang \(河北省承德医学院病理生理学教研室, 河北承德, 067000\)](#), [臧晓怡, ZANG Xiaoyi \(天津医科大学内分泌研究所, 天津, 300070\)](#)
刊名: [中国骨质疏松杂志](#) 
英文刊名: [Chinese Journal of Osteoporosis](#)
年, 卷(期): 2014(6)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201406005.aspx