

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00110

TGFβ₁ 基因 codon10(Leu>Pro) 变异对肝脏细胞功能的影响

Influence of TGFβ₁ codon10(Leu>Pro) mutation on function of hepatocytes

季鑫[△], 赵美芸[△], 顾星, 房萌, 赵云鹏, 高春芳*

第二军医大学东方肝胆外科医院实验诊断科, 上海 200438

[摘要] **目的** 观察 TGFβ₁ 基因 codon10(Leu>Pro)的单核苷酸多态性(SNP)对肝脏细胞功能的影响。**方法** 构建含 codon10(Leu>Pro)的 TGFβ₁ (LAP+成熟态单体)真核表达重组体 CMV-Leu、CMV-Pro。在 HepG2、LX-2 细胞中转染 pcDNA3.1 空载体、CMV-Leu、CMV-Pro, 培养 24 h 后, ELISA 检测细胞培养上清液中 TGFβ₁ 的分泌量。MTT 实验观察 HepG2 细胞转染后的增殖情况, 流式细胞术检测 LX-2 细胞转染后 CD83 的表达。**结果** 转染 CMV-Leu 和 CMV-Pro 能增加 HepG2、LX-2 细胞的 TGFβ₁ 分泌量, 且转染 CMV-Pro 的细胞 TGFβ₁ 分泌量比转染 CMV-Leu 的细胞高 ($P < 0.05$)。转染 CMV-Pro 能明显增高 HepG2 细胞的增殖活性 ($P < 0.01$), 而转染 CMV-Leu 能明显增加 LX-2 细胞 CD83 的表达率 ($P < 0.01$)。**结论** TGFβ₁ 基因 codon10(Leu>Pro)的 SNP 对肝脏细胞 TGFβ₁ 的分泌、细胞增殖活性及 CD83 的表达具有明显影响。

[关键词] 转化生长因子 β₁; 单核苷酸多态性; 重组体; 细胞增殖; CD83

[中图分类号] Q 78 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2010)01-0110-03

转化生长因子 β₁ (transforming growth factor β₁, TGFβ₁) 是一种具有多种功能的细胞因子, 在肝脏肿瘤及肝纤维化的发生发展过程中具有重要作用^[1-2]。TGFβ₁ 至少存在 8 个以上的单核苷酸多态性(SNP)位点。Codon10(Leu>Pro)存在于 TGFβ₁ 前体分子信号肽中, 其密码子为 CCG 时编码亮氨酸(Leu), 而为 CTG 时则编码脯氨酸(Pro)。理论上, 信号肽中氨基酸序列的改变可能影响相应蛋白质的分泌, 进而影响细胞的功能。本研究构建了含 TGFβ₁ codon10 (Leu>Pro)变异的真核表达重组体并将其转染人肝癌细胞株 HepG2 和人肝星形细胞株 LX-2, 观察 codon10 (Leu>Pro)变异对肝细胞 TGFβ₁ 分泌及相关功能的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞培养 HepG2 细胞购自中国科学院细胞库, LX-2 细胞由美国 Scott L. Friedman 教授惠赠, 本实验室传代培养。培养液为含体积分数 10% 胎牛血清(PAA)的 DMEM 高糖培养液, 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.2 构建重组质粒 以特定的 codon10(Leu>Pro)基因型患者的 DNA 为模板, 使用 KOD-Plus-DNA 多聚酶(Toyobo)以 PCR 方法扩增得到 codon10 两个基因型的潜活肽段(latent associated peptide, LAP)和成熟态单体段, 相应的引物序列见表 1。进行 LAP 段 PCR 扩增时, Leu 型上、下游引物分别为 Leu LAP-up 和 LAP-down, Pro 型则为 Pro LAP-up 和 LAP-down, 扩增条件: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 65℃ 退火 30 s, 68℃ 延伸 1 min, 共进行 35 个循环。扩增成

熟态单体段时, 上、下游引物为 Active-up 和 Active-down, 扩增条件: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 68℃ 延伸 40 s, 共进行 35 个循环。PCR 产物用 PCR Cleanup Kit (Axygen) 清洁回收后, 用 DNA A-tailing Kit (TaKaRa) 在两端加 A 尾后克隆入 pMD18 T 载体 (TaKaRa) 得到 pMD18-Leu-LAP、pMD18-Pro-LAP 和 pMD18-active。

在 LAP 段扩增产物下端和成熟态单体段的扩增产物上端有 18 个碱基是相同的, 可以通过 PCR 法将 LAP 段和成熟态单体段进行连接构建 TGFβ₁ (LAP+成熟态单体)。Leu 型以 pMD18-active 和 pMD18-Leu-LAP 质粒为 DNA 模板, 上、下游引物分别为 LeuLAP-up 和 Active-down; Pro 型以 pMD18-active 和 pMD18-Pro-LAP 为模板, 上、下游引物分别为 ProLAP-up 和 Active-down。扩增条件: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 68℃ 延伸 90 s, 共进行 35 个循环。PCR 产物清洁回收后加 A 尾, 克隆进 pMD18 T 载体得到 pMD18-Leu、pMD18-Pro。pMD18-Leu 和 pMD18-Pro 中的 TGFβ₁ 基因片段经 EcoR I 和 Hind III 双酶切后克隆进 pcDNA3.1 (Invitrogen) 得到含 codon10(Leu>Pro)的 TGFβ₁ (LAP+成熟态单体)真核表达重组体 CMV-Leu 和 CMV-Pro。构建好的重组体质粒转化至感受态大肠杆菌 JM109 并筛选, 少量酶切, 经测序 (Invitrogen) 鉴定正确后, 大量扩增阳性克隆、抽提、纯化质粒重组体 (plasmid midi-prep kit, Qiagen), 紫外分光光度计测得率、纯度。

1.3 细胞转染 HepG2 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化后制成细胞悬液接种于 6 孔板, 细胞生长 1 d 密度达到 80% 时用

[收稿日期] 2009-10-15 **[接受日期]** 2009-12-15

[基金项目] 国家自然科学基金(30770994)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30770994)。

[作者简介] 季鑫, 硕士生。E-mail: xiaolivia2@sina.com; 赵美芸。E-mail: zmy525@163.com

[△]共同第一作者 (Co-first authors)。

* 通讯作者 (Corresponding author)。Tel: 021-81875131, E-mail: gaocf1115@163.com

Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 脂质体转染 pcDNA3.1、CMV-Pro 和 CMV-Leu 3 种质粒, 每孔用质粒 2 μg, 脂质体与质粒比为 3 : 1。LX-2 细胞分别电转 pcDNA3.1、CMV-Pro 和 CMV-Leu 3 种质粒。

表 1 构建重组体所用的引物序列

引物名称	引物序列
LeuLAP-up	5'-CATGCCGCCCTCCGGGCTGCGGCTGCTGCTGCTG-3'
ProLAP-up	5'-CATGCCGCCCTCCGGGCTGCGGCTGCTGCCGCTG-3'
LAP-down	5'-GCGGTGCCGGAGCTCTGCAGATG-3'
Active-up	5'-CAGCATCTGCAGAGCTCCCGG-3'
Active-down	5'-ACCTCAGTGCACCTGCAGGA-3'

1.4 细胞 TGFβ₁ 分泌情况检测 HepG2、LX-2 细胞进行 3 种质粒转染, 换液后培养 24 h, 取培养上清液用人 TGFβ₁ ELISA 试剂盒(上海明睿生物技术有限公司)按相应步骤进行 TGFβ₁ 的 ELISA 检测。

1.5 HepG2 细胞增殖情况检测 HepG2 细胞经胰酶消化后制成细胞悬液接种于 24 孔板, 转染 pcDNA3.1、CMV-Pro 和 CMV-Leu 3 种质粒 4 h 后换相应的完全培养液, 每组设 3

复孔。在转染 12、24、36、48 h 时采用 MTT 法检测细胞增殖情况。上述实验重复 3 次。

1.6 LX-2 细胞 CD83 分子表达情况检测 LX-2 细胞分别电转 pcDNA3.1、CMV-Pro 和 CMV-Leu 3 种质粒, 待细胞贴壁后进行分孔孵育 24 h 后, 胰酶消化细胞, 用 CD83-PC5 荧光标记抗体(Beckman Coulter)进行避光孵育, 流式细胞仪检测 CD83 分子的表达, 结果以阳性细胞百分率表示。

1.7 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件用两独立样本 *t* 检验进行统计分析。

2 结果

2.1 重组体构建鉴定 构建含 codon10(Leu>Pro)的 TGFβ₁(LAP+成熟态单体)真核表达重组体 CMV-Leu、CMV-Pro 过程中, PCR 扩增得到的两种基因型 LAP 段为 832 bp, 成熟态单体段为 372 bp(图 1A), LAP 和成熟态单体的全长 DNA 片段为 1 177 bp(图 1B)。全长 DNA 片段经酶切后电泳初步鉴定正确(图 1C), 进一步测序验证插入片段分别含有 codon10(Leu>Pro)变异的 TGFβ₁ 基因片段, 与 GenBank 相应序列一致。

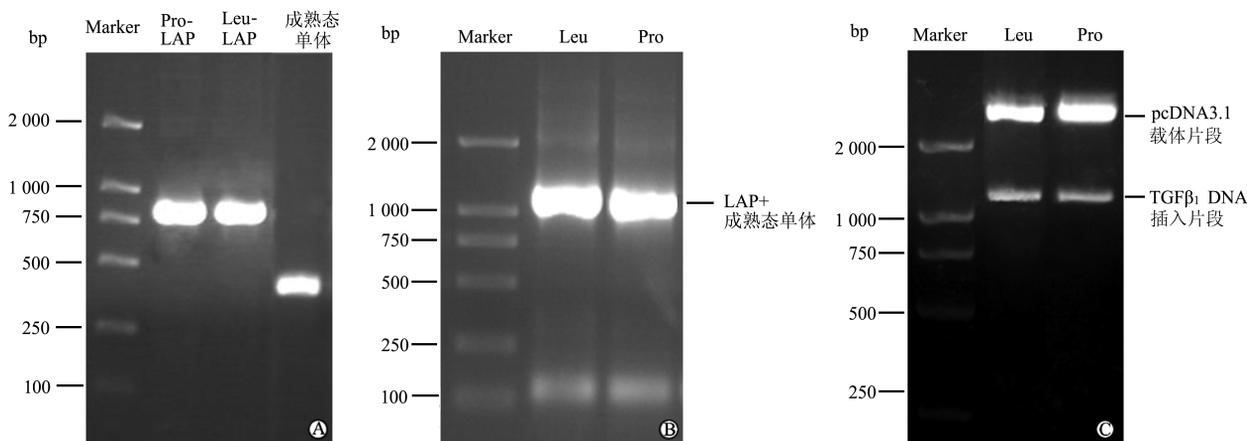


图 1 重组体构建鉴定结果

A: TGFβ₁ 基因 LAP 及成熟态单体段 PCR 结果; B: TGFβ₁ 基因 LAP+成熟态单体全长 PCR 结果; C: 含 codon10(Leu>Pro)的 TGFβ₁(LAP+成熟态单体)真核表达重组体酶切鉴定结果

2.2 细胞转染后 TGFβ₁ 分泌情况 ELISA 结果(表 2)显示, 两种细胞转染 CMV-Pro、CMV-Leu 组的 TGFβ₁ 分泌量均高于 pcDNA3.1 空载体组 ($P < 0.05$), 说明 CMV-Pro、CMV-Leu 能成功转染进细胞并能产生、分泌 TGFβ₁。LX-2 转染 CMV-Pro 的 LX-2 细胞的 TGFβ₁ 分泌量比转染 CMV-Leu 组高, 且有统计学差异 ($P < 0.01$); HepG2 细胞的 CMV-Pro 组有高于 CMV-Leu 组的趋势, 但无统计学差异。说明 TGFβ₁ 基因 codon10 Pro 型比 Leu 型更能增强细胞的 TGFβ₁ 的分泌活性。

2.3 HepG2 细胞转染后细胞增殖情况 MTT 结果(图 2)显示, HepG2 细胞转染后 24 h, CMV-Pro 组和 CMV-Leu 组的增殖活性均明显高于 pcDNA3.1 组 ($P < 0.01$), 但 CMV-Pro 组的增殖活性与 CMV-Leu 组无明显差别。转染后 36、48 h, CMV-Pro 组的增殖活性明显高于 CMV-Leu 组和 pcDNA3.1 组 ($P < 0.01$), CMV-Leu 组的增殖活性有高于

pcDNA3.1 组的趋势, 但无统计学差异。HepG2 细胞的 CMV-Pro 和 CMV-Leu 组的细胞生长曲线斜率高于 pcDNA3.1 组, 而 CMV-Pro 组曲线斜率又明显高于 CMV-Leu 组。说明 TGFβ₁ codon10 Pro 型比 codon10 Leu 型更能促进 HepG2 细胞的增殖。

表 2 两种细胞转染含 codon10(Leu>Pro)的 TGFβ₁ 真核表达重组体后 TGFβ₁ 的分泌量

($n=3, \bar{x} \pm s, \rho_B / \text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$)

细胞株	pcDNA3.1	CMV-Leu	CMV-Pro
HepG2	0.73 ± 0.06	2.15 ± 0.09**	2.22 ± 0.11**
LX-2	0.31 ± 0.02	0.37 ± 0.03*	0.48 ± 0.02**△△

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与转染 pcDNA3.1 空载体组比较; △△ $P < 0.01$ 与转染 CMV-Leu 组比较

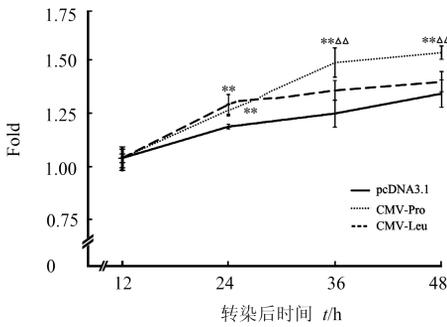


图2 HepG2细胞转染含codon10(Leu>Pro)的TGFβ₁真核表达重组体后细胞增殖情况

** P<0.01 与转染 pcDNA3.1 空载体组比较;△△ P<0.01 与转染 CMV-Leu 组比较。n=3, $\bar{x} \pm s$

2.4 LX-2 细胞 CD83 分子表达情况 流式细胞术检测结果显示,转染 CMV-Leu 的 LX-2 细胞 CD83 分子的阳性表达率 [(34.03±6.8)%] 明显高于转染 CMV-Pro 组 [(13.23±1.27)%] 和 pcDNA3.1 组 [(19.43±4.14)%], P<0.01, CMV-Pro 组和 pcDNA3.1 组 CD83 分子的表达无明显差异。提示 CMV-Leu 型较 CMV-Pro 型能显著增加 LX-2 细胞 CD83 的表达。

3 讨论

TGFβ₁ 具有广泛的功能,在肿瘤性、纤维硬化性、免疫性及神经性疾病^[3-6] 等的发生发展中具有重要意义,提示该分子在多种病理过程中具有重要作用。

SNP 是目前发现的第 3 代遗传标志,在人类基因组中平均每 1 000 个碱基对就会有一个 SNP。在个体基因组 DNA 中,少数甚至个别碱基的多态性,可能会导致特定基因相关病理过程的发生。因此 SNPs 对于研究相关疾病发病机制、临床早期诊断、个体化治疗及预后都具有重要意义^[7]。目前确认 TGFβ₁ 基因至少存在 10 个多态性位点,它们在 TGFβ₁ 基因上的位置分别是:-988(C>A)、-800(G>A)、-509(C>T)、+72(insC)、codon10(Leu>Pro)、codon25(Arg>Pro)、codon47(Gly>Glu)、codon263(Thr>Ile)、codon327(Thr>Pro)、713-8delC。

Codon10(Leu>Pro)的变异存在于 TGFβ₁ 前体分子的信号肽中,而信号肽中氨基酸序列的改变理论上可影响相应蛋白质的分泌。本实验选用肝癌细胞株 HepG2 细胞和肝星形细胞株 LX-2 细胞作为研究细胞,针对 TGFβ₁ codon10(Leu>Pro)的变异,设计并构建了含 codon10(Leu>Pro)的 TGFβ₁ (LAP+成熟态单体)真核表达重组体 CMV-Leu、CMV-Pro,并将其转染进 HepG2 和 LX-2 细胞中,结果显示 TGFβ₁ 基因 codon10 Pro 型比 codon10 Leu 型更能增强细胞的 TGFβ₁ 的分泌活性。这说明 TGFβ₁ 基因 codon10 的变异在没有其他位点 SNP 的协助下即可对细胞 TGFβ₁ 的分泌产生重要的影响。本实验还证实转染 CMV-Leu、CMV-Pro 后

HepG2 细胞的增殖活性也受到影响,CMV-Leu、CMV-Pro 可促进 HepG2 细胞的增殖,而且 Pro 型比 Leu 型的促增殖作用更强。

研究发现肝星形细胞具有重要的抗原提呈活性^[8]。我们检测了 LX-2 细胞上重要的抗原提呈细胞表现标志物 CD83 分子^[9] 的表达,结果显示 CMV-Leu 能明显增加 CD83 的表达,而 CMV-Pro 对 CD83 的表达无明显影响。提示 TGFβ₁ 基因 codon10 Leu 型可能比 codon10 Pro 型增强了 LX-2 细胞的抗原提呈活性,从而影响外来抗原的清除,但仍需进一步的实验加以证实。

本研究有助于我们进一步深入认识 TGFβ₁ 基因的 SNP 对 TGFβ₁ 分泌及 TGFβ₁ 功能的影响,为进一步研究 TGFβ₁ 基因 SNP 对肝炎、肝纤维化、肝癌的影响及肝病的诊断和治疗提供了新的视角和思路。

[参考文献]

- [1] 高春芳,陆伦根.纤维化性疾病的基础和临床[M].上海:上海科学技术出版社,2004:90-99.
- [2] Gressner A M, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets[J]. J Cell Mol Med, 2006, 10: 76-99.
- [3] Colakogullari M, Ulukaya E, Yilmaztepe Oral A, Aymak F, Bas-turk B, Ursavas A, et al. The involvement of IL-10, IL-6, IFN-gamma, TNF-alpha and TGF-beta gene polymorphisms among Turkish lung cancer patients[J]. Cell Biochem Funct, 2008, 26: 283-290.
- [4] Gewaltig J, Mangasser-Stephan K, Gartung C, Biesterfeld S, Gressner A M. Association of polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene with the rate of progression of HCV-induced liver fibrosis[J]. Clin Chim Acta, 2002, 316 (1-2): 83-94.
- [5] Li H, Romieu I, Wu H, Sienra-Monge J J, Ramirez-Aguilar M, del Rio-Navarro B E, et al. Genetic polymorphisms in transforming growth factor beta-1 (TGFB1) and childhood asthma and atopy[J]. Hum Genet, 2007, 121: 529-538.
- [6] Okada K, Hashimoto K, Iwata Y, Nakamura K, Tsujii M, Tsuchiya K J, et al. Decreased serum levels of transforming growth factor-beta1 in patients with autism[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2007, 31: 187-190.
- [7] Shah R, Rahaman B, Hurley C K, Posch P E. Allelic diversity in the TGFB1 regulatory region: characterization of novel functional single nucleotide polymorphisms[J]. Hum Genet, 2006, 119(1-2): 61-74.
- [8] Viñas O, Bataller R, Sancho-Bru P, Ginès P, Berenguer C, En-rich C, et al. Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation[J]. Hepatology, 2003, 38: 919-929.
- [9] Prechtel A T, Steinkasserer A. CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells[J]. Arch Dermatol Res, 2007, 299: 59-69.