

真核表达载体 GV394-*Nurr1* 的构建及鉴定

樊秀双, 郭军堂, 陈安琪*

(潍坊医学院临床学院, 山东 潍坊 261053)

【摘要】 目的 构建含人源性 *Nurr1* 基因真核表达载体 GV394-*Nurr1*, 检测其瞬时表达对细胞内活性氧类物质(ROS)水平的影响。**方法** PCR 扩增人 *Nurr1* 基因, 克隆至 T 载体, 测序正确后与真核载体 GV394 一起, 经 BamHI 和 XhoI 双酶切, T4 DNA 连接酶连接, 构建 GV394-*Nurr1*; 采用脂质体将 GV394-*Nurr1* 瞬时转染神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞, RT-PCR 检测 *Nurr1* 基因 mRNA 水平, 通过 DCFH-DA 染色检测 *Nurr1* 对细胞内 ROS 水平的影响。**结果** PCR 及测序证实人 *Nurr1* 基因正确克隆至真核表达载体 GV394; RT-PCR 显示 *Nurr1* 基因 mRNA 水平在瞬时转染的细胞中明显增高; DCFH-DA 染色显示瞬时转染 *Nurr1* 的神经母细胞瘤细胞的细胞内的 ROS 水平峰值较对照组明显左移。**结论** 成功构建人源性 *Nurr1* 真核载体, 可在 SH-SY5Y 细胞中表达并减少细胞内 ROS 水平, 为进一步在体外研究 *Nurr1* 的功能及其与多巴胺能神经元的保护作用的关系提供了基础。

【关键词】 *Nurr1*; 真核表达载体; 帕金森氏病; 细胞活性氧;

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)07-0031-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.07.005

The construction and identification of eukaryotic expression vector GV394-*Nurr1*

FAN Xiu-shuang, GUO Jun-tang, CHEN An-qi*

(Clinical College, Weifang Medical University, Weifang 261053, China)

【Abstract】 Objective To construct the eukaryotic expression vector GV394-*Nurr1* containing human *Nurr1* gene and to study the effects of transient transfection of *Nurr1* on intracellular reactive oxygen species level. **Methods** The full-length of human *Nurr1* gene amplified by PCR was subcloned into T vector and sequenced. GV394-*Nurr1* vector was constructed by BamHI and XhoI double digestion and then T4 DNA ligase conjunction. GV394-*Nurr1* was transfected into SH-SY5Y cells by liposome transfection technique; The mRNA of *Nurr1* was detected by RT-PCR; The effect of *Nurr1* expression on intracellular reactive oxygen species (ROS) was detected by (DCFH-DA) staining. **Results** PCR and sequencing confirmed that the *Nurr1* gene was correctly cloned into eukaryotic expression vector GV394. The RT-PCR results showed that the *Nurr1* mRNA expression in the neuroblastoma SH-SY5Y cells transiently transfected *Nurr1* was higher than that in the control group. DCFH-DA staining showed that the level of reactive oxygen peak in neuroblastoma cells transiently transfected *Nurr1* obviously shifted to the left compared to the control group. **Conclusions** The human *Nurr1* gene eukaryotic expression vector was successfully established and its high expression in the neuroblastoma SH-SY5Y cell line significantly decreased the ROS level. This provide the basis for further study on the function of *Nurr1* in vitro and its relationship with the protective effect of dopaminergic neurons.

【Key words】 *Nurr1*; Eukaryotic expression vector; Parkinson disease; Reactive oxygen species

【基金项目】 山东省自然科学基金(ZR2011HM014)。

【作者简介】 樊秀双(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 帕金森病发病机制的研究。Email: Fanxiushuang0314@163.com。

【通讯作者】 陈安琪(1981-), 女, 医学硕士, 研究方向: 帕金森病发病机制。Email: chen安琪_1981@163.com。

帕金森氏病(Parkinson disease, PD)是与年龄相关的中枢神经系统退行性疾病,临床上主要表现为静止性震颤、肌强直、动作徐缓、姿态异常等运动功能障碍和自主神经功能障碍。多巴胺代谢异常是 PD 发病的核心机制,几乎每一种有关调控多巴胺代谢基因的多态及突变都能影响多巴胺代谢酶的含量,共同最终导致多巴胺神经元的应激损伤,多巴胺能神经元数目上相应的减少^[1]。孤核受体 *Nurr1* 广泛表达于胚胎和成体中脑黑质腹侧被盖区,作为转录调控蛋白在多巴胺能神经元发育和存活过程中起到了重要的作用^[2]。基因敲除 *Nurr1*^(-/-) 的小鼠细胞免疫荧光显示 DA 神经元前体细胞凋亡,最终导致中脑多巴胺能神经元发育不全^[3]。本研究通过构建 *Nurr1* 真核表达载体,研究其过表达细胞内的 ROS 水平的影响,为研究 *Nurr1* 参与 PD 神经元变性的保护作用关系奠定基础,为临床指导 *Nurr1* 有可能作为帕金森病基因治疗提供了实验理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

大肠杆菌 DH5 α 为本实验保存;质粒 GV394、限制性内切酶,人脑 cDNA 文库购自上海吉凯基因有限公司;Liptap 脂质体、小量质粒抽提试剂盒购自碧云天公司;PCR 引物、平端 DNA 加 A 试剂盒、T 载体均自上海生工;Trizol 试剂、PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、PrimeSTAR HS DNA polymerase 试剂盒均购自宝生物工程大连有限公司;DCFH-DA 染色试剂盒购自于 Sigma 公司;其余化学试剂为进口或国产化学分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 真核表达载体 GV394-*Nurr1* 的构建与鉴定

依据 NCBI NM_006186.3 NR4A2 基因信息设计引物,5'-TTGGTACCGAGCTCGGATCCCCGCCACC ATGCCTTGTGTTCAGGCGCAG-3',下游引物 5'-ACGGGCCCTCTAGACTCGAGTTAGAAAGGTAAG TGTCCA GG-3'。以人脑 cDNA 文库为模板,进行 PCR:98℃ 预变性 5 min,98℃ 变性 10 s,57℃ 退火 10 s,72℃ 延伸 90 s,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 8 min。胶回收后的 PCR 产物利用平端 DNA 加 A 试剂盒进行加“A”后与 pUCm- T 载体连接并转化 DH5 α 感受态细菌。小量提取质粒 DNA 进行 PCR 及 BamHI 和 XhoI 双酶切鉴定并送上海生工进行测

序,正确克隆命名为体 pCUM-T- *Nurr1*。BamHI 和 XhoI 双酶切载体 GV394 质粒及 pCUM-T- *Nurr1*,将纯化回收的 1541bp 大小的目的片段与酶切后线性化的 GV394 质粒用 T4DNA 连接酶进行连接并转化 DH5 α 感受态细胞,PCR 反应鉴定挑选正确的克隆,命名为 GV394-*Nurr1*。

1.2.2 瞬时转染

培养神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 密度达到 80% 左右时,胰酶消化细胞,使每孔细胞密度达到 $2-6 \times 10^5$,均匀接种到 6 孔板中,置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养,确保第二天细胞密度能达到 70-80%。按照脂质体转染试剂说明书,将 GV394-*Nurr1* 转染 SH-SY5Y 细胞,同时设空载 GV394 为对照组。转染 24 h 后,用 Trizol RNA 提取试剂盒抽提总 RNA,通过 RT-PCR 检测 *Nurr1* mRNA 的表达。*Nurr1* 的 PCR 条件同 1.2.1。内参 β -actin 引物:上游引物:5'-GACCCAGATCATGTTTGAGA 3'下游引物:5'-GCTTGCTGATCCACATCTGC3',PCR 循环:98℃ 预变性 5 min,98℃ 变性 10 s,55℃ 退火 10 s,72℃ 延伸 60 s,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 8 min。

1.2.3 DCFH-DA 染色法检测 *Nurr1* 对细胞内 ROS 水平影响

胰酶消化实验组及对照组细胞,吹打成细胞悬液,1000 rpm 离心 5 min,离心 2 次,500 μ L 的 PBS 轻轻重悬沉淀,加入工作液 10 μ mol/L 的 DCFH-DA 荧光染料 1 μ L,室温避光孵育 15 min,流式细胞仪上机检测,用激发波长 488 nm,发射波长为 525 nm 来检测荧光强度。每组设置三个复孔,重复三次独立实验。

1.3 统计学处理

所有实验数据采用统计软件 SPSS17.0 分析,均采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 全长人 *Nurr1* 的 PCR 扩增

如图 1A 所示,PCR 扩增出与预期产物大小一致的 1541 bp 人 *Nurr1* DNA 片段。

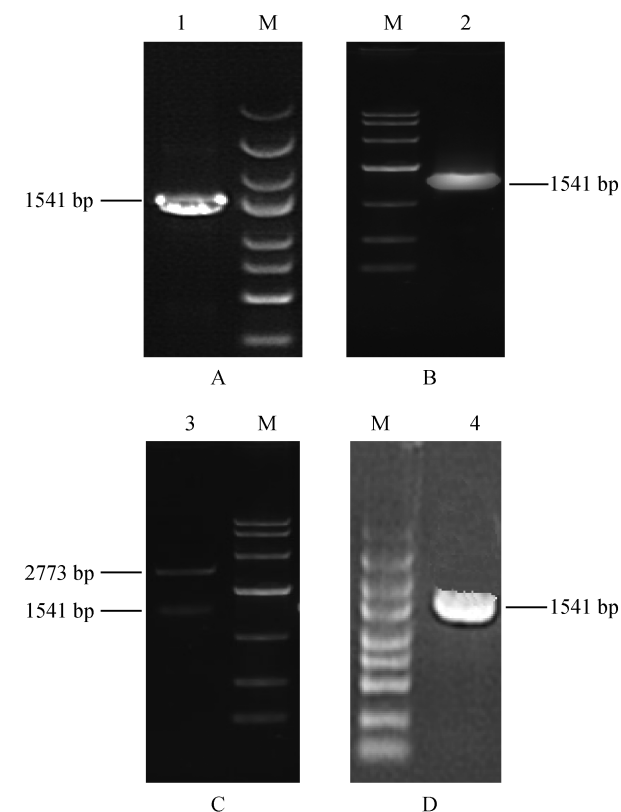
2.2 pCUM-T- *Nurr1* 的鉴定

如图 1B 所示,小量提取质粒后,PCR 扩增后得到一条 1541 bp 左右的条带,与预期大小一致。如图 1C 所示,质粒经 BamHI 和 XhoI 限制性内切酶酶切得到一条 1500 bp 左右的目的条带和 2700 bp 左

右大 pCUM-T 载体条带,与预期大小一致。对 PCR 和酶切鉴定成功的 pCUM-T- Nurr1 克隆送上海生工进行测序,测序结果与 Genebank 碱基序列完全一致。

2.3 GV394-Nurr1 的鉴定

重组质粒 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果,如图 1D 所示,在 1.5 kb 左右呈现与 Nurr1 分子量大小相符 DNA 条带,结果证实人 Nurr1 基因成功插入真核 GV394 载体中。



注:(M) DNA Marker;(1) Nurr1 PCR 产物;

(2) pCUM-T-Nurr1 PCR 产物;

(3) pCUM-T-Nurr1 经 BamHI 和 XhoI 酶切产物;

(4) GV394-Nurr1 PCR 产物。

图 1 琼脂糖凝胶电泳鉴定

Note. (M) DNA Marker;(1) Nurr1 PCR products;

(2) pCUM-T-Nurr1 PCR products;(3) pCUM-T-Nurr1

by I BamHI and hoi X enzyme digestion products;

(4) GV394-Nurr1 PCR products.

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis

2.4 RT-PCR 检测 Nurr1 mRNA 表达

逆转录聚合酶链式 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果,如图 2A 所示,实验组与对照组均见特异性条带,大小为 1541 bp,实验组较对照组条带亮些,图像经 IPP 图像系统分析,如图 2B 在内参灰度值大致相同的情况下,实验组 Nurr1/内参的灰度值之比

(0.754 ± 0.02)较对照组 Nurr1/内参的灰度值之比(0.347 ± 0.03)明显增高,两组差异比较有统计学意义($t = 19.55$, $P < 0.01$),提示表达载体 GV394-Nurr1 在 SHSY5Y 细胞中能够瞬时表达。

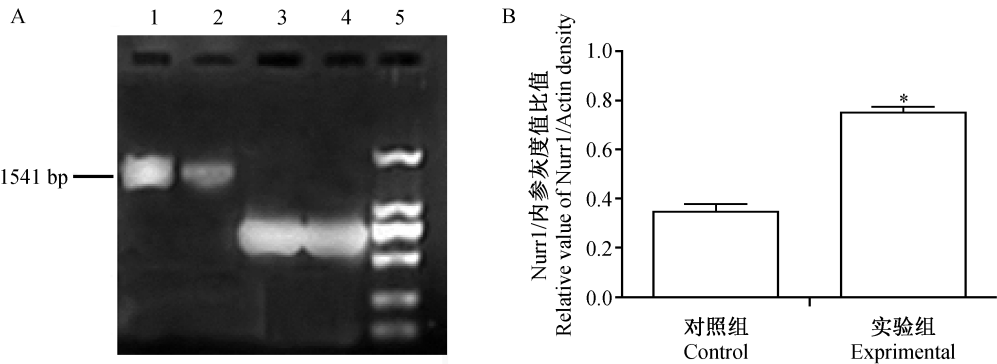
2.5 DCFH-DA 染色法检测瞬时表达 Nurr1 对细胞内 ROS 水平影响

本实验采用 DCFH-DA 染色,通过流式细胞仪检测 ROS 峰值的变化精确反应细胞内活性氧含量变化,ROS 峰值左移提示抑制细胞内 ROS 表达,如图 3 所示,瞬时表达 Nurr1 的细胞内的 ROS 峰值较对照组明显左移,表明过表达 Nurr1 抑制了 SH-SY5Y 细胞内活性氧的产生。

3 讨论

PD 是常见的一种中老年人常见的中枢神经锥体外系统疾病,其主要病理学特征是中脑黑质多巴胺能神经元选择性丧失和路易氏小体(Lewy Body)的形成^[4]。迄今为止,对选择性多巴胺神经元缺失的确切病因和发病机制尚未完全阐明。研究认为,众多因素都参与了 PD 的发病机制,但其最终的结局是中脑神经内多巴胺含量减少,使多巴胺能神经元应激性损伤敏感性增加。因此,对中脑多巴胺能神经发育分化基因调节机制的研究有助于了解帕金森氏疾病的发病机制。

Nurr1 又称孤核受体因子,定位于染色体 2q22-q23^[5],由 598 个氨基酸组成,分子量大约为 66KD,主要分布于中脑黑质和腹侧被盖区,作为转录蛋白因子对多巴胺的发育和存活有着重要的作用。Nurr1 作为配体诱导转录因子包含 DNA 结合区域(DBD),配体结合区域(LBD),N 端可变区,在外界环境的刺激激活 MAPK 通路,调控下游基因的表达^[6]。Kaoru 等^[7]发现在小神经胶质细胞和星型胶质细胞中 Nurr1 能够募集 Co REST([co] repressor for element-1-silencing transcription factor)复合物形成反式通路对神经毒素物质致炎效应表现出较强的防御反应,同时通过实验性研究证实在中枢神经系统中 Nurr1 可以保护多巴胺神经元免受 LPS 和 A30P α -Synuclein 产生的毒害反应。实时定量 PCR 显示在过表达 α -Synuclein 大鼠中 Nurr1 基因表达量减少,给予体外帕金森病动物模型 Nurr1 及类视黄醇 X 受体配体的刺激后结果显示 α -Synuclein 表达下降^[8]。因此,可以推测 Nurr1 蛋白表达抑制了 α -Synuclein 对多巴胺能神经元的毒性作用。体外研



注:(A) RT-PCR 图;(B) 灰度扫描分析图(1)实验组 *Nurr1*; (2)对照组 *Nurr1*; (3)实验组 β -actin;(4)对照组 β -actin;(5) DNA Marker。与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 2 *Nurr1* mRNA 表达

Note. (A) RT-PCR image; (B) The result of gray scale analysis; (1) Experimental group; (2) Control group; (3) Experimental group (β -actin); (4) Control group (β -actin); (5) DNA Marker. * $P < 0.05$, Compared with control group.

Fig. 2 The expression of *Nurr1* mRNA

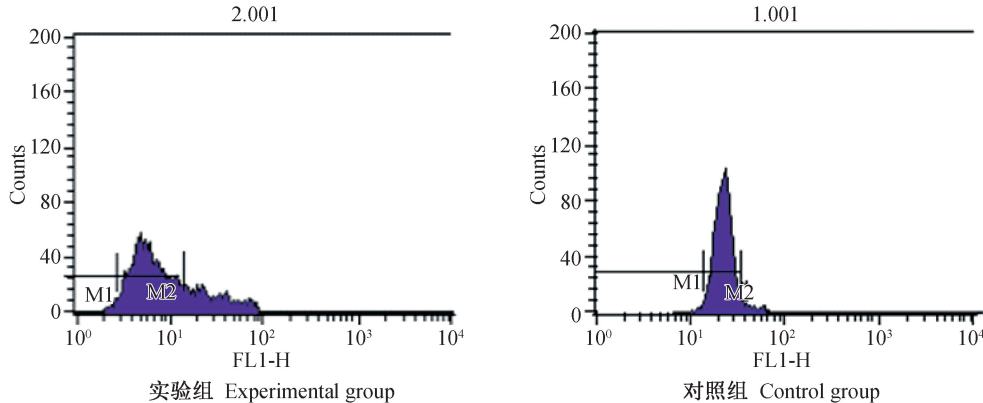


图 3 流氏细胞仪检测瞬时表达 *Nurr1* 对细胞内 ROS 水平的影响

Fig. 3 Flow cytometry detection the effect of transient expression of *Nurr1* on the intracellular

究证明, *Nurr1* 在转录因子 *Lmx1b* (LIM homeobox transcription factor 1 beta) 和 *EN* (*Engrailed*) 蛋白的共同参与下, 通过 *Lmx1b* 驱动 *Pitx3* (paired-like homeodomain transcription factor 3) 介导调控多巴胺神经元的发育、存活^[9, 10]。通过基因敲除技术, 缺失 *Nurr1* 基因表达的小鼠实时定量 PCR 结果显示, 其体内酪氨酸羟化酶 (TH) 的表达含量下降, 活性水平降低, 多巴胺含量减少, 多巴胺能神经元数量减少, 小鼠表现出对 MPTP 毒素的敏感性增加, 表明降低 *Nurr1* 表达及其活性, 失去了对多巴胺能神经元的保护作用^[11, 12]。 *Nurr1* 表达促进多巴胺能神经元发育、存活、成熟方面起到了重要的作用, 但是 *Nurr1* 如何参与调控尚存在争议。

本研究以人脑 cDNA 文库为模板, 成功扩增出人全长 *Nurr1* 基因, 并构建了真核细胞表达载体

GV394-*Nurr1*, 利用阳离子脂质体转染技术将其转染到 SH-SY5Y 细胞内, 发现该基因能够在 SH-SY5Y 细胞内表达, 且能够降低了细胞内的 ROS 水平, 这为进一步研究 *Nurr1* 对多巴胺能神经元的分化、成熟的机制提供了基础。

参考文献:

[1] Wise RA. Dopamine, learning and motivation [J]. Nat Rev Neurosci, 2004, 5(6) :483 - 494.
[2] Simon HH, Bhatt L, Gherbassi D, et al. Midbrain dopaminergic neurons; determination of their developmental fate by transcription factors [J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 991:36 - 47.
[3] 张振. *Nurr1* 基因激活剂在帕金森病模型中的神经保护机制研究 [D]. 博士. 山东大学; 2012.
[4] Kosaka K. Latest concept of Lewy body disease [J]. Psychiatry Clin Neurosci, 2014, 68(6) :391 - 394. (下转第 63 页)

- [6] Sayed AS, Xia K, Salma U, *et al.* Diagnosis, prognosis and therapeutic role of circulating miRNAs in cardiovascular diseases [J]. Heart Lung Circ, 2014, 23(6): 503 – 510.
- [7] Fichtlscherer S, Zeiher AM, Dimmeler S. Circulating microRNAs: biomarkers or mediators of cardiovascular diseases? [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(11): 2383 – 2390.
- [8] Long G, Wang F, Duan Q, *et al.* Human circulating microRNA – 1 and microRNA – 126 as potential novel indicators for acute myocardial infarction [J]. Int J Biol Sci, 2012, 8(6): 811 – 818.
- [9] Hsu A, Chen SJ, Chang YS, *et al.* Systemic approach to identify serum microRNAs as potential biomarkers for acute myocardial infarction [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014(1): 418628.
- [10] Huang F, Zhu X, Hu XQ, *et al.* Mesenchymal stem cells modified with miR – 126 release angiogenic factors and activate Notch ligand Delta-like-4, enhancing ischemic angiogenesis and cell survival [J]. Int J Mol Med, 2013, 31(2): 484 – 492.
- [11] 杨东,张红. MicroRNAs-126(miR-126)的生物学功能[J]. 现代生物医学进展,2012,12(14):2773 – 2777.
- [12] Chen TL, Zhu GL, He XL, *et al.* Short-term pretreatment with atorvastatin attenuates left ventricular dysfunction, reduces infarct size and apoptosis in acute myocardial infarction rats [J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(12): 4799 – 4808.
- [13] Wang S, Aurora AB, Johnson BA, *et al.* The endothelial-specific microRNA miR – 126 governs vascular integrity and angiogenesis [J]. Dev Cell, 2008, 15(2): 261 – 271.
- [14] 李国达,刘衍宇,方凌燕,等. miR – 126 及 VEGF 在大鼠心肌梗死交界区表达的动态变化[J]. 心脏杂志,2015,27(6):639 – 644.
- [15] 杨文慧,郭涛,杨莉,等. 体外心脏震波对大鼠心肌梗死后心肌凋亡的影响[J]. 中国老年学杂志,2016,36(2):265 – 267.
- [16] 陈铁龙,祝光礼,赫小龙,等. 冠心合剂减少急性心肌梗死大鼠凋亡及对 Bax、Bcl-2、p-BAD、Caspase – 8、Caspase – 3 蛋白表达的影响 [J]. 中华中医药学刊,2014,32(11):2720 – 2723.

[修回日期]2016-04-06

(上接第 34 页)

- [5] Nolan YM, Sullivan AM, Toulouse A. Parkinson’s disease in the nuclear age of neuroinflammation[J]. Trends Mol Med, 2013, 19(3):187 – 196.
- [6] Nordzell M, Aarnisalo P, Benoit G, *et al.* Defining an N-terminal activation domain of the orphan nuclear receptor Nurr1 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 313(1):205 – 211.
- [7] Saijo K, Winner B, Carson CT, *et al.* A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death[J]. Cell, 2009, 137(1):47 – 59.
- [8] Volakakis N, Tiklova K, Decressac M, *et al.* Nurr1 and Retinoid X Receptor Ligands Stimulate Ret Signaling in Dopamine Neurons and Can Alleviate alpha-Synuclein Disrupted Gene Expression [J]. J Neurosci, 2015, 35(42):14370 – 14385.
- [9] Vergano-Vera E, Diaz-Guerra E, Rodriguez-Traver E, *et al.* Nurr1 blocks the mitogenic effect of FGF – 2 and EGF, inducing olfactory bulb neural stem cells to adopt dopaminergic and dopaminergic-GABAergic neuronal phenotypes[J]. Dev Neurobiol 2015, 75(8):823 – 841.
- [10] Hong S, Chung S, Leung K, *et al.* Functional roles of Nurr1, Pitx3, and Lmx1a in neurogenesis and phenotype specification of dopamine neurons during in vitro differentiation of embryonic stem cells[J]. Stem Cells, 2014, 23(5):477 – 487.
- [11] Alavian KN, Jeddi S, Naghipour SI, *et al.* The lifelong maintenance of mesencephalic dopaminergic neurons by Nurr1 and engrailed[J]. J Biomed Sci, 2014, 21:27.
- [12] 谭雪锋,金国华. PD 模型大鼠黑质中 Nurr1 和 TH 的表达变化及其意义[J]. 神经解剖学杂志,2009. (01): 16 – 20.

[修回日期]2016-03-31