

周飞飞, 杨南飞, 余文, 等. *Nrf2* 过表达与敲减 Hep1-6 稳转细胞株的建立[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(6): 1251-1255.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.06.009

Nrf2 过表达与敲减 Hep1-6 稳转细胞株的建立

周飞飞, 杨南飞, 余文, 张冬梅, 丰秀静

(南京大学生命科学院医药生物技术国家重点实验室, 江苏 南京 210046)

摘要: 核因子 NF-E2 相关因子 2 (Nrf2) 是治疗非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 的一个重要靶点分子。为了从体外研究小分子通过靶向 Nrf2 改善 NAFLD 的分子机制, 首先 PCR 克隆鼠源 *Nrf2* 基因至 pLenti6/V5-D-TOPO[®] 空载体得到重组载体 pLenti6/V5-*Nrf2*, 通过测序、酶切鉴定正确后, 扩提质粒, 制备慢病毒并将其感染 Hep1-6 肝癌细胞, 用稻瘟醇毒素筛选、鉴定获得稳定表达 *Nrf2* 的细胞株。同时, 用 *Nrf2* 干扰质粒构建慢病毒感染 Hep1-6 肝癌细胞, 通过嘌呤霉素筛选、鉴定 *Nrf2* 敲减的细胞株。Q-PCR 检测结果显示, 过表达稳转株 (pLenti6/V5-*Nrf2*) 中 *Nrf2* 基因的表达量为对照组 (pLenti6/V5-*LacZ*) 的 4 倍, 敲减稳转株中 *Nrf2* 基因的表达量大幅度降低。Western blotting 显示过表达稳转株的 *Nrf2* 表达量明显高于对照组, 敲减稳转株的 *Nrf2* 表达量明显低于对照稳转株, 此结果与 Q-PCR 结果一致。所克隆的 *Nrf2* 基因和敲减基因在 Hep1-6 小鼠肝癌细胞中得到了正确转录和翻译, 稳转细胞株构建成功。

关键词: 核因子 NF-E2 相关因子 2 (Nrf2); Hep1-6 细胞; *Nrf2* 过表达稳转株; *Nrf2* 敲减稳转株; Western blotting; 定量 PCR

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2016)06-1251-05

Establishment of *Nrf2* over-expression and knock down Hep1-6 cell lines

ZHOU Fei-fei, YANG Nan-fei, YU Wen, ZHANG Dong-mei, FENG Xiu-jing

(State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210046, China)

Abstract: Nuclear factor NF-E2 related factor 2 (Nrf2) is an important target molecule in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). To study the role of small molecules that targets Nrf2 *in vitro*, mice *Nrf2* gene cloned by PCR was cloned into pLenti6/V5-D-TOPO[®] empty carrier, building a pLenti6/V5-*Nrf2* reorganization plasmid which was identified via sequencing and restriction enzyme digestion. The plasmid was packed into lentivirus and used to infect Hep1-6 liver cancer cells. Meanwhile, the shRNA-*Nrf2* plasmid was packed into lentivirus and used to infect Hep1-6 liver cancer cells as well. The cells were screened with blasticidin or puromycin for about 1 month. The qPCR results showed that the expression of *Nrf2* was four times than that of control in *Nrf2* over-expression cells while it was significantly reduced in *Nrf2* knock down cells. Consistently, the level of protein in the two cell lines detected by Western blotting was obviously increased in *Nrf2* over-expression cells or reduced in *Nrf2* knock down cells. The results suggest that the *Nrf2* over expression and knock down Hep1-6 cell lines have been successfully built and it supplies a useful tool to study the role of drug targeting *Nrf2* *in vitro*.

Key words: nuclear factor NF-E2 related factor 2 (Nrf2); Hep1-6 cell; *Nrf2* over expression cell line; *Nrf2* knock down cell line; Western blotting; qPCR

收稿日期: 2016-04-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81503082)

作者简介: 周飞飞 (1987-), 河南新乡人, 硕士, 主要从事化合物药效学评价。(Tel) 15751865756; (E-mail) 15751865756@163.cn

通讯作者: 丰秀静, (Tel) 025-89682995; (E-mail) fengxj@nju.edu.cn

非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 是一类无过量饮酒史由其他多种诱因引起的临床病理综合征, 它的主要特征为肝细胞脂肪变性和脂质蓄积, 按病程进展

可分为单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎、肝纤维化和肝硬化 3 种类型。关于非酒精性脂肪肝的发病机制,大家普遍认可的是“二次打击”^[1]学说,即第一次打击是以胰岛素抵抗和脂质代谢异常造成的肝脏脂质堆积,随后的二次打击指的是氧化应激的增加和脂质过氧化的开始,但其明确的发病机制尚不完全清楚。

核因子 NF-E2 相关因子 2 (Nrf2) 广泛存在于机体细胞中,是调节抗氧化应激反应的重要转录因子,也是调控脂质代谢的主要调控因子。通过诱导一系列抗氧化酶的编码,如谷胱甘肽 (GSH) 抗氧化系统酶 [γ -谷氨酰转移酶 1 (GGT1)^[2]、谷氧还原酶 1 (GRX1)^[3]、谷胱甘肽 (GLS)^[4]等]和硫氧还蛋白 TNX 抗氧化系统酶[过氧化物还原酶 1 (PRDX1)^[5]、过氧化物还原酶 6 (PRDX6)^[6]、硫氧还蛋白 1 (SRXN1)^[7]、硫氧还蛋白还原酶 1 (TXNRD1)^[8]]等调节细胞内的氧化还原环境。通过诱导一系列脂质代谢相关酶的编码,如:乙酰辅酶 A7/8 (ACOT7/8)^[9]、乙酰辅酶 A 氧化酶 1/2 (ACOX1/2)^[9]、羧酸脂酶 1G/H (CES1G/H)^[7]等脂肪代谢相关因子,调控脂质代谢。近年来发现 Nrf2 是治疗 NAFLD 的一个重要的分子靶点^[10]。目前用于治疗 NAFLD 的药物存在多种副作用而在临床上受到限制,开发以 Nrf2 为靶点的新的、副作用小的天然药源分子迫在眉睫。芹菜素是一种来源于蔬菜水果中的黄酮类化合物,我们前期的研究发现芹菜素对高脂饮食诱发的非酒精性脂肪肝具有很好的改善作用,并且可以上调 Nrf2 的活性。因此,为了进一步研究 Nrf2 的作用,我们需要构建 Nrf2 基因的过表达和敲减细胞株,以便在体外研究芹菜素对非酒精性脂肪肝的改善机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

OPTI-MEM 培养基、脂质体 Lipofectamine™ 2000、Blasticidin、PEG-it™ Virus Precipitation Solution (5×) 购于 Invitrogen 公司,抗生素 (100 μg/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin 混合液)、Polybrene 购于 Sigma 公司,胎牛血清购自美国 Hyclone 公司,限制性内切酶 Xho I、Spe I、T4 DNA ligase、标准分子量 DNA ladder 购自 TaKaRa 公司,琼脂糖凝胶回收试剂盒 (Gel Extraction Kit)、普通质粒小提试剂盒 (Plasmid Mini Kit I) 购自 OMEGA 公司,辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG 和 Nrf2 抗体为 Santa Cruz 公司产品,小

鼠肝细胞癌细胞株 Hep1-6、人肾细胞株 293T 购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库,Nrf2 敲减质粒购自吉凯基因公司。对照序列为:5'-TTCTC-CGAACGTGTCACGT-3';干扰 shRNA1 序列为正向:5'-CCGGGCTTACTCTCCCAGTGAATACTCGAGTATTCACTGGGAGAGTAAGGTTTTTG-3',反向:5'-AATTCAAA AAGCCTTACTCTCCCAGTGAATACTCGAGTATTCAGTGGGAGAGTAAGGC-3'; shRNA2 序列为正向:5'-CCGGGCTCGCATTGATCCGAGATATCTCGAGATATCTCGGATCAATGCGAGCTTTTTG-3',反向:5'-AATTCAA AAAGCTCGCATTGATCCGAGATATCTCGAGATATCTCGGATCAATGCGAGC-3'; shRNA3 序列为正向:5'-CCGGGAAGGCACAATGGAATTCAATCTCGAGATTGAATTCCATTGTGCCTTCTTTTTG-3',反向 5'-AATTCAA AAAGAAGGCACAATGGAATTCAATCTCGAGATTGAA TTCCATTGTGCCTTC-3'。

1.2 Nrf2 基因序列的 PCR 克隆

扩增 Nrf2 基因序列的引物,正向:5'-CGTAC-TAGTATGATGGACTTGGAGTT-3', 反向:5'-CG-GCTCGAGCTAGTTTTTCTTTGTAT-3'。25.00 μl Nrf2 目的基因扩增体系:扩增 Nrf2 基因序列的左右引物各 0.50 μl, 5×Buffer 5.00 μl, dNTP 2.00 μl, Primer STAR 0.25 μl, 用于扩增的模板 200 ng,加水补充到 25.00 μl。Nrf2 基因序列的 PCR 克隆程序:95 °C 10 min;98 °C 10 s,66 °C 30 s,72 °C 2 min,共 30 个循环;72 °C 5 min。PCR 程序执行完毕后,全部产物在 100 V、30 min 的条件下于 1% 琼脂糖凝胶孔中电泳,最后在凝胶扫描仪下观察是否有 1 800 bp 左右的条带。

1.3 含有 Nrf2 基因重组表达载体的构建

用琼脂糖凝胶回收试剂盒 (OMEGA) 回收并纯化 Nrf2 核酸产物,取 2 μg 与 2 μg pLenti6/V5-D-TOPO® 载体质粒,采用酶切体系:pLenti6/V5 载体质粒/Nrf2 目的基因 PCR 产物 (2 μg) 2.00 μl;10× Buffer H 2.00 μl;Spe I 内切酶和 Xho I 内切酶各 1.00 μl,加水补足到 25.00 μl,37 °C 恒温水浴 2 h。

1.4 pLenti6/V5-Nrf2 载体构建

把分别经过限制性内切酶 Spe I 和 Xho I 酶切的 pLenti6/V5-D-TOPO® 回收产物和 Nrf2 进行连接,构建重组 Nrf2 表达载体 pLenti6/V5-Nrf2。连接体系如下:T4 ligase 1.00 μl, 10×T4 ligase buffer 2.00 μl,酶切过的 Nrf2 目的基因和 pLenti6/V5 载体各 2 μg,ddH₂O 补加到 20.00 μl。16 °C 恒温体系

中连接过夜。将连接产物加入含 100.00 μ l Stable3 感受态细胞的菌液中,轻轻混匀后再冰浴处理 30 min。将冰浴后的连接产物在 42 $^{\circ}$ C 下热应激 90 s 后轻轻放置冰水混合物中 5 min。在转化体系中加入 900.00 μ l 的 SOC 培养基,170 r/min、37 $^{\circ}$ C 培养 50 min。取 200.00 μ l 转化菌液均匀涂布于含有 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 SOC 琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h 后,在涂有转化菌液的平板上挑取 3 个大小适中,形态饱满的菌落至含 3 ml 液体 SOC 培养基(含 50 μ g/ml 氨苄青霉素)的试管中,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。使用普通质粒小提试剂盒(OMEGA)提取质粒进行酶切、测序鉴定。

1.5 慢病毒包装

在转染前 2 d,按每个培养皿 $1.3 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ 细胞数接种 Hep1-6 细胞,达到 70%~80% 的密度时将 60.00 μ l lipo2000 稀释到 1.00 μ l Opti-MEM 中,放置 5 min 后,加入慢病毒构建质粒和目的质粒,按 p13:p14:p15:目的质粒=1:4:2:2 的比例孵育 20 min,然后将上述混合物直接加入培养皿,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 孵箱中孵育 6 h 后换液,经 48 h 转染,收集含慢病毒的培养液,1 000 r/min 离心 5 min 去除细胞碎片,用 0.45 μ m 孔径的滤器过滤 HEK293T 细胞上清液,加入 5 \times 病毒浓缩液放置过夜,2 000 r/min 离心 30 min 得到过表达病毒浓缩液,分装小管放置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.6 病毒感染细胞及稳转细胞株的筛选

细胞铺于 6 孔板中,细胞融合度达到 80% 左右,加入适量病毒液及 Polybrene(终浓度为 5~10 μ g/ml),置于培养箱中培养过夜。更换含有筛选药物 Blasticidin/Puromycin 的培养基筛选稳转株。每 3~4 d 更换一次培养基,直到出现抗性克隆为止。挑取至少 5 个抗性克隆,扩大培养并鉴定目的基因和蛋白表达。对照设置为空载体。

1.7 稳转细胞株中 *Nrf2* 基因的 q-PCR 分析

收获 Hep1-6 稳转细胞株,离心去除培养液加入 Trizol,室温 5 min,吹打细胞使之充分裂解。加入 CHCl_3 (按 0.2 ml CHCl_3 /1.0 ml Trizol 的比例加入),剧烈振荡,室温放置 10 min。4 $^{\circ}$ C、12 000 g 离心 15 min,取上层水相转移至另一新的 EP 管中。加入异丙醇混匀,室温静置 5~10 min。4 $^{\circ}$ C、12 000 g 离心 10 min,弃上清,75% 乙醇重悬 RNA 沉淀。4 $^{\circ}$ C、7 500 g 离心 5 min,弃上清,管壁上的液滴用枪头吸出,然后

室温放置 10 min 左右以使残留的液体挥发干净(可看到 RNA 由白色变为半透明)。加入 10~20 μ l DEPC 水溶解 RNA,立即使用或 -80 $^{\circ}$ C 保存。按照 Abm 公司 5 \times All-In-One RT MasterMix 试剂盒说明书进行反转录。采用 *Nrf2* 引物,正向:5'-CAGCACATC-CAGTCAGAAACC-3';反向 5'-AGCCGAAGAAACCT-CATTGTC-3'进行实时定量 PCR 检测。

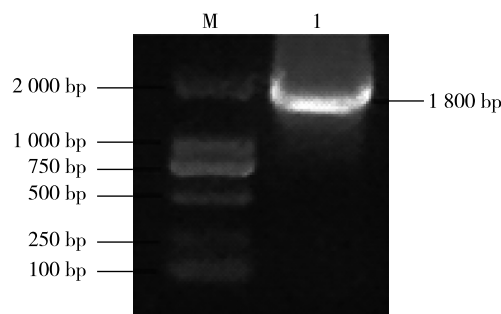
1.8 稳转细胞株中 *Nrf2* 蛋白的 Western Blot 鉴定

收获 Hep1-6 稳转细胞株,离心去除培养液,加入细胞裂解液裂解后提取蛋白并测浓度,取 50 μ g 蛋白与 5 \times Loading buffer 混合煮沸 5 min,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,结束后采用半干转印的方法将蛋白质转印至 PVDF 膜上,用含 1% BSA 的 TBST 封闭 1 h,加入 1 000 \times 稀释的 *Nrf2* 抗体室温孵育 4 h, TBST 洗涤 5 次,加入 3 000 \times 稀释的 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 5 次,用 DAB 显色试剂盒显色。

2 结果与分析

2.1 *Nrf2* 基因的克隆鉴定

提取 Hep1-6 细胞的 RNA 逆转录为 cDNA,以鼠源 *Nrf2* 引物扩增 *Nrf2* 目的基因,所得产物经 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳,得到 1 800 bp 目的条带(图 1)。



M: Marker; 1: *Nrf2* 基因。

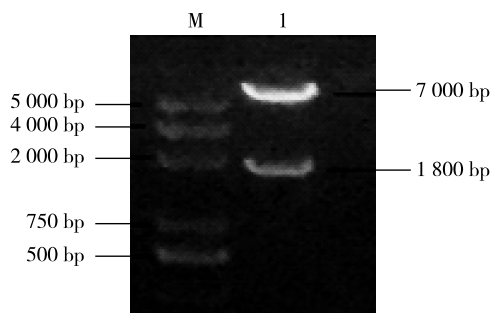
图 1 *Nrf2* 基因的扩增

Fig. 1 Amplification of *Nrf2* by PCR

2.2 重组表达质粒的构建及鉴定

用限制性内切酶 *Spe* I 和 *Xho* I 切割 pLenti6/V5 和 *Nrf2* 目的基因,回收产物,用 T4 DNA 连接酶连接后转化到 stable3 感受态细胞,涂平板,挑选 3 个单克隆,培养 18 h 后提取质粒进行鉴定。以 *Spe* I 和 *Xho* I 限制性内切酶切割重组质粒后经 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳分析得到约 7 000 bp 和

1 800 bp 的条带,1 条符合载体 pLenti6/V5 的大小,1 条符合 *Nrf2* 目的条带的大小(图 2),表明重组表达质粒构建成功。将质粒送与南京金斯瑞公司进行进一步测序鉴定,结果显示目的基因序列正确。



M: Marker; 1: pLenti6/V5-*Nrf2*。

图 2 重组表达质粒的双酶切鉴定

Fig. 2 The enzymatic identification of recombinant expression plasmid pLenti6/V5-*Nrf2*

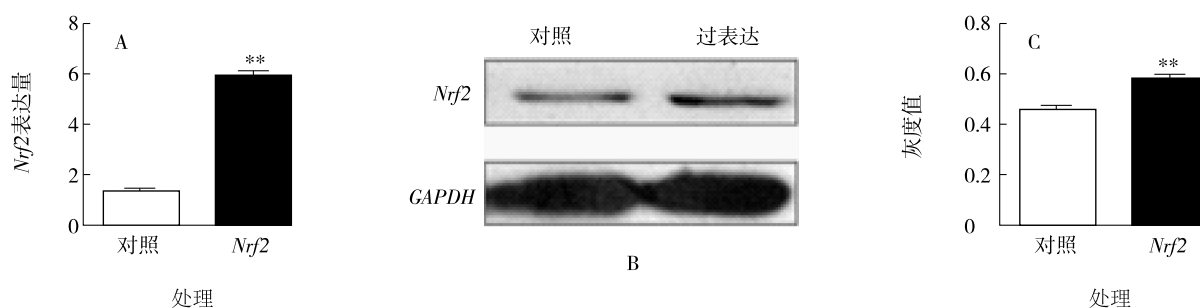
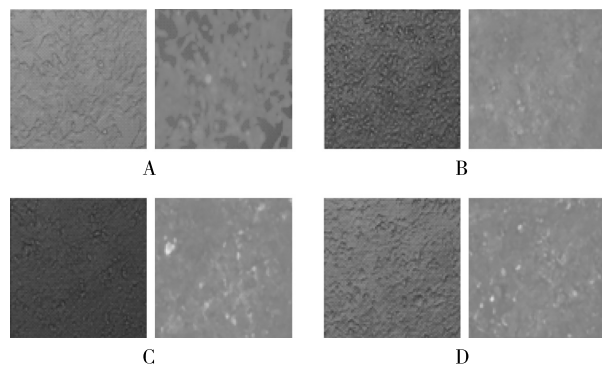


图 3 qPCR 和 Western blotting 检测稳转细胞株中 *Nrf2* 的表达

Fig. 3 The expression of *Nrf2* identified by qPCR and Western blotting



A: shRNA 对照组白光照射(左)与蓝色激发光照射(右); B: shRNA1 稳转株白光照射(左)与蓝色激发光照射(右); C: shRNA2 稳转株白光照射(左)与蓝色激发光照射(右); D: shRNA3 稳转株白光照射(左)与蓝色激发光照射(右)。

图 4 *Nrf2* 敲减稳转株的 EGFP 检测($\times 1\ 000$)

Fig. 4 EGFP detection of *Nrf2*-knock down cells ($\times 1\ 000$)

2.3 *Nrf2* 过表达稳转株的筛选与鉴定

构建装载有 pLenti6/V5-*Nrf2* 质粒的慢病毒并感染 Hep1-6 细胞,经过 blasticidin 筛选 30 d,收集部分细胞进行 qPCR 和 Western blotting 检测。与对照组比较,*Nrf2* mRNA 水平升高了 2 倍(图 3A),蛋白水平也有明显升高(图 3B、3C)。表明 *Nrf2* 过表达 Hep1-6 稳转株构建成功。

2.4 *Nrf2* 敲减稳转株的筛选与鉴定

制备装载有 *Nrf2* 干扰质粒的慢病毒并感染 Hep1-6 细胞,用嘌呤霉素筛选 30 d,荧光显微镜下检测发现,稳转株中均有很强的 EGFP 蛋白表达(图 4)。通过 qPCR 和 Western blotting 检测发现干扰质粒 1(shRNA1)对 *Nrf2* 具有极显著的干扰作用,表明 *Nrf2* 干扰质粒已成功结合到 Hep1-6 基因组中,获得了 *Nrf2* 敲减的 Hep1-6 稳转细胞株(图 5)。

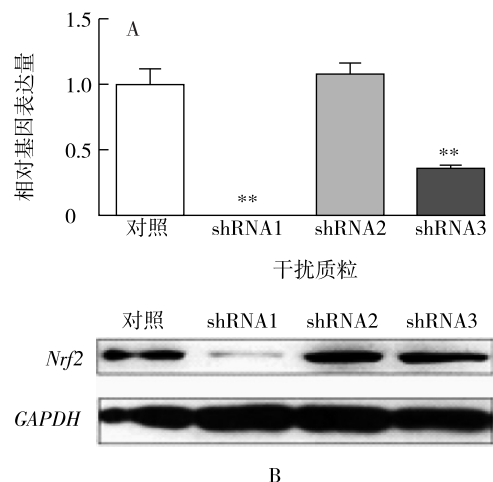


图 5 *Nrf2* 敲减稳转株的 qPCR(A)与 Western blotting(B)检测

Fig. 5 The expression of *Nrf2* in knock down cells detected by qPCR (A) and Western blotting (B)

3 讨论

NAFLD 虽然常被认为是一种良性疾病,但部分患者可发展为肝纤维化甚至肝硬化。据文献报道,37% 的 NAFLD 患者最终发展为肝纤维化,10% ~ 15% 非酒精性肝炎(NASH)患者在 10 ~ 20 年内进展为肝硬化,9% ~ 26% NASH 相关肝硬化患者在随访的 4 ~ 10 年内因终末期肝病死亡^[11]。目前 NAFLD 的临床治疗多以对症治疗为主,主要包括 3 类:抗氧化剂如维生素 E,纠正代谢紊乱药物-调脂药,以及保肝护肝类药物等。但这些药物或者是有严重的副作用,或者是作用位点比较单一,不能全方位改善 NAFLD。目前治疗 NAFLD 的特效药物也比较缺乏,这就使研发治疗 NAFLD 的新天然药物变得迫切。

本研究通过分子克隆得到鼠源 *Nrf2* 基因,并将其成功克隆到 pLenti6/V5-D-TOPO[®] 空载体。通过慢病毒包装系统制备了携有 *Nrf2* 基因的病毒,然后将其感染 Hep1-6 细胞,通过 blasticidin 筛选成功获得表达 *Nrf2* 的 Hep1-6 稳转株。与此同时,采用同样的方式得到了 ShRNA-*Nrf2* 的稳转细胞株。*Nrf2* 过表达以及敲减细胞株的成功获得为研究以 *Nrf2* 为靶点和作用途径的药物提供了基础。

参考文献:

- [1] DAY C P, JAMES O F W. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? [J]. *Gastroenterology*, 1998, 114(4): 842-845.
- [2] HIROTSU Y, KATSUOKA F, FUNAYAMA R, et al. *Nrf2*-MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks [J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(20): 10228-10239.

- [3] CHORLEY B N, CAMPBELL M R, WANG X, et al. Identification of novel *NRF2*-regulated genes by ChIP-Seq: influence on retinoid X receptor alpha [J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(15): 7416-7429.
- [4] AGYEMAN A S, CHAERKADY R, SHAW P G, et al. Transcriptomic and proteomic profiling of KEAP1 disrupted and sulforaphane-treated human breast epithelial cells reveals common expression profiles [J]. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2012, 132(1): 175-187.
- [5] MALHOTRA D, PORTALES-CASAMAR E, SINGH A, et al. Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis [J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(17): 5718-5734.
- [6] MACLEOD A K, MCMAHON M, PLUMMER S M, et al. Characterization of the cancer chemopreventive NRF2-dependent gene battery in human keratinocytes: demonstration that the KEAP1-NRF2 pathway, and not the BACH1-NRF2 pathway, controls cytoprotection against electrophiles as well as redox-cycling compounds [J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30(9): 1571-1580.
- [7] PAEK J, LO J Y, NARASIMHAN S D, et al. Mitochondrial SKN-1/Nrf mediates a conserved starvation response [J]. *Cell Metabolism*, 2012, 16(4): 526-537.
- [8] JUNG K A, CHOI B, NAM C W, et al. Identification of aldo-ketoreductases as NRF2-target marker genes in human cells [J]. *Toxicology Letters*, 2013, 218(1): 39-49.
- [9] WU K C, CUI J Y, KLAASSEN C D. Beneficial role of Nrf2 in regulating NADPH generation and consumption [J]. *Toxicological Sciences*, 2011, 123(2): 590-600.
- [10] VALDECANTOS M P, PRIETO-HONTORIA P L, PARDO V, et al. Essential role of Nrf2 in the protective effect of lipoic acid against lipooptosis in hepatocytes [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2015, 84: 263-278.
- [11] BHALA N, IBRAHIM KAMAL JOUNESS R, BUGIANESI E. Epidemiology and natural history of patients with NAFLD [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2013, 19(29): 5169-5176.

(责任编辑:孙 宁)