·代谢调节及肠黏膜维护·

胰高血糖素样多肽 2 受体上调表达的 Caco2 细胞株克隆转染与筛选鉴定

赵云　王凤君　王裴　戚华兵　汪仕良

【摘要】 **目的** 建立胰高血糖素样多肽 2 受体(glucagon like peptide-2 receptor, GLP-2R)上调表达的 Caco2 细胞株,为研究 GLP-2 肠道保护机制构建体外模型。 **方法** 常规扩增抽提 GLP-2R/pcDNA 3.1 质粒,经酶切、测序鉴定正确后,用脂质体转染法将其转染至 Caco2 细胞。G418 抗性筛选,挑选耐药细胞克隆培养获得稳定细胞株。以 HER293 细胞、VE 细胞、正常 Caco2 细胞及正常人小肠组织为对照,采用逆转录聚合酶链反应与蛋白质印迹法检测稳定转染细胞中 mRNA 及其蛋白的表达。 **结果** 扩增抽提 GLP-2R/pcDNA 3.1 质粒后经酶切、测序结果正确。GLP-2R mRNA 及其蛋白在 HER293 细胞及 VE 细胞中无表达,在正常 Caco2 细胞中表达微弱,在人小肠组织中有较强表达;转染 GLP-2R 后,Caco2/GLP-2R(+)细胞中 GLP-2R mRNA 及其蛋白表达明显增强。 **结论** GLP-2R 分布具有相对特异性,正常 Caco2 细胞中 GLP-2R 表达较弱;构建的 Caco2/GLP-2R(+)细胞模型成立,为深入研究 GLP-2 的作用机制奠定了良好基础。

【关键词】 真核细胞; 转染; 克隆细胞; 基因; 胰高血糖素样多肽 2 受体

Transfection and identification of the cloned strain that stably expressing glucagon like peptide-2 receptor in Caco2 cell lines

ZHAO Yun, WANG Feng-jun, WANG Pei, QI Hua-bing, WANG Shi-liang. Institute of Burn Research, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China

【Abstract】 **Objective** To establish Caco2 cell line with stable expression of glucagon like peptide-2 receptor(GLP-2R), in order to establish an in vitro model for the study of protective mechanism of GLP-2 of the intestinal tract. **Methods** The GLP-2R/pcDNA3.1(+) plasmid was verified by restriction endonuclease and sequencing, and then it was transfected into Caco2 cells with lipofectamine. After G418 selection, the clones with stable expression of GLP-2R were obtained by limited dilution cloning and expanding. The mRNA and protein expression of GLP-2R in normal human intestine, Caco2 cells, HER293, VE cells, as well as in transfected Caco2 cells were determined with RT-PCR and Western blot. **Results** The sequence of GLP-2R/pcDNA 3.1 plasmid was correct. No expression of GLP-2R mRNA and protein was found in HER293 and VE cells, but weak expression were found in Caco2 cells, and strong expression was found in normal human intestines. The expression of GLP-2R mRNA and protein expression in Caco2/GLP-2R(+) cells were obviously increased after transfection. **Conclusion** GLP-2R has special distribution. The expression of GLP-2R is weak in normal Caco2 cells. The establishment of Caco2/GLP-2R(+) cellular model is beneficial for the further research of the mechanism of action of GLP-2.

【Key words】 Eukaryotic cells; Transfection; Clone cells; Genes; Glucagon like peptide-2 receptor

严重烧伤后肠道是缺血缺氧最严重的内脏器官之一,不仅导致营养代谢紊乱,也是引发多器官功能障碍的中心器官。如何促进烧伤后受损肠道的修复与功能恢复,已成为影响临床综合救治水平的重要因素[1]。最近,小分子胃肠肽——胰高血糖素样多肽 2(glucagon like peptide-2, GLP-2)对受损肠道的特异性保护作用正引起人们重视,本课题组以往的研究也证实其对烧伤后大鼠肠黏膜具有抑制凋亡、促进肠黏膜增殖、保护肠道屏障的作用[2,3]。目前认为 GLP-2 的生物学作用是通过 GLP-2 受体(glucagon like peptide-2 receptor, GLP-2R)介导的。但 GLP-2R 是否在肠上皮细胞表达尚有争议,主要是缺乏符合条件的体外实验模型。本研究拟利用基因转染技术获得 GLP-2R 稳定表达的 Caco2 细胞株,建立体外模型,并为今后对其进行调控奠定基础。

作者单位:400038　重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

材料与方法

一、主要材料与试剂来源

含人全长 GLP-2R 序列的 GLP-2R/pcDNA 3.1 质粒购于美国 cDNA 资源中心。GLP-2R 随机引物利用 VNTI 9.0 生物分析软件设计后由美国 Invitro-

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

gen 公司合成，序列为：正义链：5′-TCCTGGG-GAAGTGTTCCAA-3′ 反义链：5′-TCACTCTCTTCCA-GAATCTCCTC-3′，扩增产物片段为 250 bp。质粒抽提试剂盒（美国 Omega 公司）、HER293 细胞（本研究组保存）、VE 细胞（南京凯基生物科技发展有限公司）、Caco2 细胞株（中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所细胞库）。细胞培养试剂：高糖 DMEM 培养基（美国 Gibco 公司），小牛血清（美国 Hyclone 公司），Trizol、G418、脂质体转染试剂盒 Lipofectamine 2000（美国 Invitrogen 公司）。Clonedisc（美国 Sigma 公司），人小肠组织 cDNA（上海博大泰克生物基因技术有限责任公司）。蛋白质印迹（Western blot）法试剂：聚偏（二）氟乙烯（PVDF）膜（美国 Milipore 公司）、GLP-2R 一抗（美国 ADI 公司）、HRP 抗兔二抗（美国 Sigma 公司）。显色液（美国 Pierce 公司），*EcoR* Ⅰ、*Xho* Ⅰ内切酶、逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）试剂盒（大连宝生物工程有限公司）。蛋白电泳采用美国 Bio-Rad 公司生产的电泳系统，通过该公司的凝胶成像系统 Quantity One 软件进行分析。

二、建立细胞模型

1. GLP-2R/pcDNA 3.1 质粒的测序鉴定及扩增：利用 *EcoR* Ⅰ与 *Xho* Ⅰ双酶切，测序鉴定 GLP-2R/pcDNA 3.1 质粒，结果正确后行质粒扩增，抽提方法按试剂说明书进行，测定质粒浓度后 -20 ℃保存。

2. 细胞培养与质粒转染：Caco2 细胞按常规方法培养，待细胞生长至 80% 融合时，将培养液 DMEM 换成 12 ml Opti-MEM。将 24 μg 质粒（40 μl）加至 1.5 ml Opti-MEM 中静置 5 min，另将 60 μl Lipofectamine 2000 加入 1.5 ml Opti-MEM 中静置 5 min，两者混合后，室温孵育 20 min。把 3 ml 含有质粒的 Opti-MEM 培养液加入培养皿中，常规培养过夜。将培养介质换成 DMEM 培养 24 h，经 25 g/L 胰蛋白酶消化后，细胞分至 3 个培养皿，改换培养液为含 500 mg/L G418 的 DMEM。

3. 细胞的克隆与筛选：Caco2 细胞在 G418 筛选压力下生长，约 50 d 后形成单克隆。使用 Clonedisc 将单克隆细胞挑至 48 孔培养板培养并逐渐转至培养瓶中，此过程始终保持 G418 抗生素筛选压力。

三、鉴定指标

1. RT-PCR 鉴定细胞克隆：以人小肠组织 cDNA 为模板扩增 GLP-2R，利用 Trizol 提取正常 Caco2 细胞、HER293 细胞、VE 细胞及转染细胞的总 RNA，行 RT-PCR 检测，扩增片段为 250 bp。PCR 条件：95 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s，35 个循环。

2. Western blot 鉴定细胞克隆：利用细胞蛋白裂解液收集细胞蛋白，通过 4,4′-二羧酸-2,2′-二喹啉（BCA）法定量后取 10 μg 总蛋白行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）、PVDF 转膜、封闭，一抗孵育过夜。洗膜后二抗孵育 1 h，再次洗膜并用 Pierce 显色液系统在凝胶成像仪中显色检测。

3. 细胞保存：筛选鉴定阳性的细胞以含 G418 与二甲基亚砜（DMSO）的 DMEM 培养液常规保存于液氮中，细胞命名为 Caco2/GLP-2R（+）。

结　果

1. GLP-2R/pcDNA3.1 质粒鉴定：经双酶切后，酶切片段为 1 600 bp，与 GLP-2R 全长片段大小一致（图 1）；扩增后质粒中所含 GLP-2R 测序结果与文献报道的 GLP-2R 序列（GeneBank 序列号：004246）一致（图 2）。

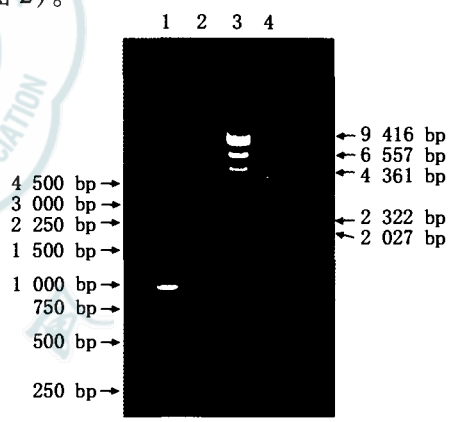

图 1　GLP-2R/pcDNA3.1 质粒酶切图。1. Wide Range DNA marker；2、4. GLP-2R/pcDNA3.1 质粒酶切；3. λ-*Hind* Ⅲ marker

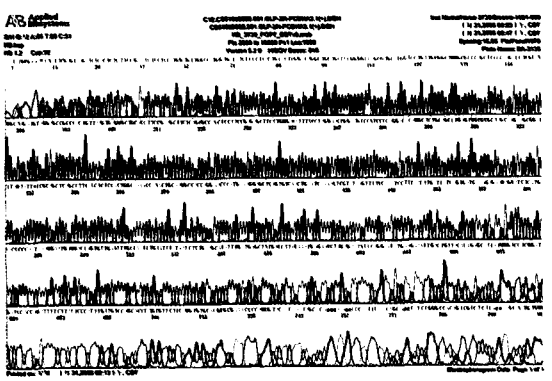

图 2　GLP-2R/pcDNA3.1 质粒测序结果

2. RT-PCR 检测结果：在人小肠组织中 GLP-2R mRNA表达较强，而在VE、HER293细胞中无法检出

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

GLP-2R mRNA(图 3)。正常 Caco2 细胞 GLP-2R mRNA 表达较弱,转染 GLP-2R 之后细胞 mRNA 表达增强(图 4)。

图 3　人小肠组织及两种细胞株中 GLP-2R mRNA 的表达情况。1. Wide Range DNA marker(100 ~ 6 000 bp);2. HER293 细胞;3. VE 细胞;4. 小肠组织

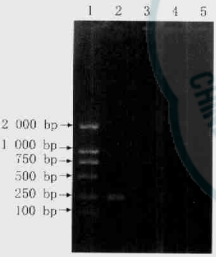

图 4　不同细胞中 GLP-2R mRNA 的表达情况。1. DL2000 marker;2. Caco2 细胞转染后;3. VE 细胞;4. 正常 Caco2 细胞;5. HER293 细胞

3. Western blot 检测结果:正常 VE 细胞与 HER293 细胞中未检测到 GLP-2R 蛋白表达,正常 Caco2 细胞中 GLP-2R 表达较弱,而转染了 GLP-2R/pcDNA3.1 的 Caco2 细胞中 GLP-2R 表达明显增强(图 5)。

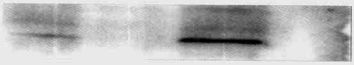

图 5　几种细胞中 GLP-2R 蛋白的表达情况。1. 正常 Caco2 细胞;2. VE 细胞;3. Caco2 细胞转染 GLP-2R/pcDNA 3.1(+)后;4. HER293 细胞

讨　论

GLP-2 为胰高血糖素原基因表达的产物之一,属于胰高血糖素原衍生肽类超家族成员之一,该家族包括了糖依赖性胰岛素释放肽、垂体腺苷酸环化酶激活肽、肠血管活性肽、GLP-1 及 GLP-2 等,在肠道的生理功能中起着十分重要的作用。其中 GLP-2 由肠道 L 细胞合成分泌,是 33 个氨基酸残基组成的小分子多肽,具有高度种属保守性。之所以能引起人们的兴趣,在于它对肠道特殊的保护作用。在胰高血糖素原衍生肽中,只有 GLP-2 具有促进肠黏膜细胞增殖但不影响其他组织器官细胞增殖及组织形态学变化的作用[4]。

进一步研究表明,GLP-2 能促进肠黏膜上皮细胞增殖并分化成熟,抑制肠黏膜细胞凋亡,加快肠黏膜葡萄糖的转运,促进肠道运动及肠黏膜血流量,加速受损肠黏膜上皮屏障的修复。我们的实验也证实,GLP-2 可以促进细胞增殖,抑制细胞凋亡,起到保护严重创(烧)伤后肠道缺血缺氧引起的肠黏膜屏障损伤的作用[5,6]。

临床上在短肠综合征患者中应用 GLP-2,可明显增加小肠绒毛高度、隐窝深度及细胞分裂指数,增加对营养物质的吸收[7]。因此,GLP-2 具有确定的特异性肠道保护作用,对短肠综合征、溃疡性结肠炎、肠黏膜屏障功能降低及肠道损伤有着值得期待的治疗作用。

1999 年,Munroe 等[8]克隆鉴定了 GLP-2R,指出 GLP-2 的生物学效应是通过 GLP-2R 信号通路介导的。人 GLP-2R 核酸序列编码区为 1 662 bp,编码 553 个氨基酸,是 G 蛋白偶联受体(G protein coulping receptor, GPCR)超家族成员。GLP-2R 位于染色体 17p13.3 上,仅对 GLP-2 有激动反应,具有高度种属同源性,主要表达于胃肠道及下丘脑,其作用机制尚未阐明[9],原因是缺乏理想的体外研究模型。

GLP-2R 在肠道的具体定位尚不清楚,免疫组织化学、免疫荧光及 RT-PCR 结果提示,GLP-2R 主要沿隐窝-绒毛轴分布,越靠近基底部表达越强,在内分泌细胞及基底神经结也有表达,相反在肠上皮表达较弱[10]。因此有人提出,GLP-2 对肠上皮屏障的保护作用可能有直接与间接两种途径,除了直接作用于肠上皮细胞外,还可能通过刺激内分泌细胞或肠内神经细胞,释放其他递质如肠血管激活肽(VIP)、野生型一氧化氮合酶(eNOS)等,进而完成对肠上皮屏障的保护作用[11]。无论直接或间接作用,都是通过 GLP-2R 介导细胞内信号途径产生第二信使调控激酶的级联放大效应实现的。这种信号过程几乎涉及 GPCR 的所有通路,GLP-2 促进 Caco2

中華醫學會雜誌社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究

肠黏膜上皮细胞增殖，伴有磷酸化型细胞外信号调节激酶（ERK）蛋白水平的增加，而且 GLP-2 的促肠黏膜上皮细胞作用能分别被特异性的酪氨酸蛋白激酶、三磷酸肌醇激酶、丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）抑制剂所阻断[12]。在转染 GLP-2R 的 BHK 细胞中，GLP-2 呈剂量依赖性增加环腺苷一磷酸（cAMP）含量的同时，激活 cAMP 反应元件依赖性及激活蛋白 1（AP-1）依赖性的转录活性，并诱导一些早期应答基因如 c-fos、c-jun 等表达[13]。同时 GLP-2 能通过糖原合酶激酶 3（GSK3，Ser21/Ser9）磷酸化抑制 GSK3 活性，降低 β 连环蛋白分解，抑制细胞的凋亡。

最近的研究还表明，Ras/MAPK 途径参与了 GLP-2 抑制细胞凋亡的作用[14]。各条通路又存在“信号的串话”，因此 GLP-2R 在细胞内的信号网络复杂而繁芜。要深入研究 GLP-2 的作用机制，必须要有一个合适的体外细胞模型。目前研究 GLP-2R 作用机制，是以 BHK 细胞、Hela 细胞等制作 GLP-2R 上调表达模型，一方面是因为阴性对照比较确切（BHK 等细胞无 GLP-2R 基因表达），另一方面是因为肠上皮细胞的 GLP-2R 表达不确切。若能证实肠上皮细胞 GLP-2R 的基因与蛋白表达情况，将此作为研究 GLP-2R 作用机制的体外模型，则更能反映生理条件下 GLP-2 的作用。

本研究在 VE 细胞和 HER293 细胞中均未检测到基因与蛋白水平 GLP-2R 表达，提示其表达有相对特异性。有研究表明：GLP-2 对体外肠上皮细胞有明显的促增殖作用[15,16]，但 Flavio 等[17]利用 RT-PCR 及 Western blot 未检测到 Caco2 细胞中 GLP-2R 的 mRNA 表达。我们在人小肠组织 cDNA 中检测到 GLP-2R mRNA 表达，以往的研究也证实在大鼠肠黏膜组织中可检测到 GLP-2R mRNA[18]。本实验在正常 Caco2 中检测到信号微弱的 GLP-2R mRNA 表达，提示在肠上皮细胞中可能存在少量的 GLP-2R，这与体外实验结果相符，但其保护肠道的作用机制尚有待研究。我们利用真核基因转染技术构建了 Caco2/GLP-2R（+）并鉴定了 GLP-2R mRNA 与蛋白稳定上调表达，可将其作为体外细胞模型进行深入研究，为阐明 GLP-2 对烧伤后肠道的保护机制奠定了基础。

参 考 文 献

1 汪仕良. 拓展肠道营养修复受损肠道. 中华烧伤杂志，2004，20：196－197.

2 赵云，王凤君，王斐，等. 胰高血糖素样肽-2 对大鼠烧伤后肠黏膜上皮细胞凋亡的影响. 第三军医大学学报，2002，24：764－766.

3 赵云，王凤君，王斐，等. 胰高血糖素样肽-2 对烧伤大鼠肠黏膜细胞增殖的影响. 中华烧伤杂志，2003，19：209－212.

4 Drucker DJ, Erlich P, Asa SL, et al. Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2. Proc Natl Acad Sci, 1996, 93: 7911－7916.

5 Chance WT, Sheriff S, McCarter F, et al. Glucagon-like peptide-2 stimulates gut mucosal growth and immune response in burned rats. J Burn Care Rehabil, 2001, 22: 136－143.

6 王凤君，赵云，王斐，等. 胰高血糖素样肽-2 对严重烧伤大鼠肠黏膜屏障功能的影响. 世界华人消化杂志，2002，10：796－799.

7 Jeppesen PB. Glucagon-like peptide-2: update of the recent clinical trials. Gastroenterology, 2006, 130: 127－131.

8 Munroe DG, Gupta AK, Kooshesh F, et al. Prototypic G protein-coupled receptor for the intestinotrophic factor glucagon-like peptide 2. Proc Natl Acad Sci, 1999, 96: 1569－1573.

9 Natalie AW, Bernardo Y, Mark PD, et al. Glucagon-like peptide-2 receptor activation in the rat intestinal mucosa. Endocrinology, 2003, 144: 4385－4392.

10 Guan X, Karpen HE, Stephens J, et al. GLP-2 receptor localizes to enteric neurons and endocrine cells expressing vasoactive peptides and mediates increased blood flow. Gastroenterology, 2006, 130: 150－164.

11 Jennifer LE, Drucker DJ. Tales beyond the crypt: glucagon-like peptide-2 and cytoprotection in the intestinal mucosa. Endocrinology, 2005, 146: 19－21.

12 Jasleen J, Naoshi SE, Robert S, et al. Signaling mechanisms of glucagon-like peptide 2-induced intestinal epithelial cell proliferation1. J Surg Res, 2000, 90: 13－18.

13 Koehler JA, Yusta B, Drucker DJ. The Hela cell glucagon-like peptide-2 receptor is coupled to regulation of apoptosis and ERK1/2 activation through divergent signaling pathways. Mol Endocrinol, 2005, 19: 459－473.

14 Bernardo Y, Jennifer E, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-2 receptor activation engages bad and glycogen synthase kinase-3 in a protein kinase a-dependent manner and prevents apoptosis following inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase. J Biol Chem, 2002, 277: 24896－24906.

15 Jasleen J, Stanley WA, Naoshi S, et al. Glucagon-like peptide 2 stimulates intestinal epithelial proliferation in vitro. Dig Dis Sci, 2002, 47: 1135－1140.

16 Bernardo Y, Robin PB, Drucker DJ. The glucagon-like peptide-2 receptor mediates direct inhibition of cellular apoptosis via a cAMP-dependent protein kinase-independent pathway. J Biol Chem, 2000, 275: 35345－35352.

17 Flavio GR, Shen KR, Jasleen J, et al. Glucagon-like peptide-2: divergent signaling pathways. J Surg Res, 2004, 121: 5－12.

18 赵云，王凤君，王斐，等. 大鼠烧伤后补充胰高血糖素样多肽-2 对其相关基因表达的影响. 第三军医大学学报，2003，25：1741－1744.

（收稿日期：2006－04－20）
（本文编辑：王旭）

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?