

## 构建及鉴定表达胃泌酸调节素的乳酸乳球菌

向荣,林艳,李晓曦,张欣,巩思嘉,赵子建\*

(南京医科大学代谢病研究中心,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:构建食品级表达胃泌酸调节素(oxyntomodulin, OXM)的乳酸乳球菌,鉴定其在体外、体内的表达水平。方法:构建重组质粒 pNZ8149-OXM 电转至乳酸乳球菌中,用 Western blot 检测重组乳酸乳球菌 OXM 表达水平。给小鼠喂食表达 OXM 的乳酸乳球菌后,用液质联用质谱检测小鼠血清 OXM 的含量。结果:重组质粒经测序鉴定正确,制备的重组乳酸乳球菌在 nisin 诱导 5 h 后 OXM 表达量最高,食用后小鼠血清 OXM 含量是对照组的 2.5 倍左右。结论:成功构建了表达胃泌酸调节素的乳酸乳球菌,为进一步探讨其减肥降脂效应提供了基础。

**[关键词]** 乳酸乳球菌;胃泌酸调节素;食品级;表达

**[中图分类号]** R589.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)07-924-04

doi:10.7655/NYDXBNS20150705

## Construction and identification of recombinant *Lactococcus lactis* expressing oxyntomodulin

Xiang Rong, Lin Yan, Li Xiaoxi, Zhang Xin, Gong Sijia, Zhao AZ\*

(Center of Metabolic Disease Research, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To deliver oxyntomodulin (OXM) to the food-grade strains of *Lactococcus Lactis* (*L.lactis*), and identify its expression level *in vivo* and *in vitro*. **Methods:** *L.lactis* was transformed with recombinant plasmid pNZ8149-OXM by electroporation, and oxyntomodulin expression was detected by Western blot. Then, pNZ8149-OXM-transformed *L.lactis* was administered orally to mice, and OXM were detected by HPLC-MS from serum samples. **Results:** The expression of recombinant OXM from the pNZ8149-OXM-transformed *L.lactis* reached a maximum at 5 h after induction with nisin. The level of OXM in the serum of mice fed with pNZ8149-OXM-transformed *L.lactis* was 2.5 times higher than that in the control group. **Conclusion:** The recombinant *L.lactis* expressing oxyntomodulin is successfully constructed and expressed. It provides the basis for further study on the effect of reducing weight and lipid.

**[Key words]** *Lactococcus lactis*; oxyntomodulin; food-grade; expression

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(07):924-927]

肥胖是当今世界倍受关注的一个健康问题,不仅影响行动和生活质量,而且会导致很多重大疾病,如糖尿病、高血压、心血管疾病及癌症等<sup>[1]</sup>。目前,治疗肥胖症的主要方法有节食运动法、药物治疗以及手术治疗等。单纯依靠节食及增加运动量并不能达到很好的减肥效果,而且不长期坚持就很容易反复;对于手术治疗而言一般人很难接受,创口大风险高。因此,绝大多数肥胖患者更愿意选择痛苦相对较小且较轻松能达到效果的药物疗法。药物治疗虽然方便,但由于

作用机制复杂,往往会带来很多不可避免的不良反应,如精神疾病、体温异常、腹泻、血压异常等。因此,亟待开发一种新型药物用于治疗肥胖。

人胃泌酸调节素(oxyntomodulin, OXM)含37个氨基酸,是一种由肠上皮细胞分泌的多肽激素<sup>[2]</sup>,具有抑制食欲和食物吸收、动员脂肪的作用<sup>[3-5]</sup>。研究报告,给肥胖患者注射 OXM,可以有效抑制食欲、减轻体重,是治疗肥胖的一种潜在药物<sup>[6]</sup>。但是目前肽类主要是通过化学合成或生物工程生产,产品多为粉针剂,通过注射途径给药。这种生产和给药方式存在生产成本低、体内半衰期短和用药不便的缺点,不易被肥胖患者接受。

乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)是一种“公认

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81170780);教育部博士学科点基金(20113234110005);江苏省科技支撑计划(BE2012756)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: azzhao@njmu.edu.cn

安全”的益生菌,广泛存在于肠道内,并能够调节机体胃肠道正常菌群生态平衡。目前,已有众多文献报道利用乳酸乳球菌作为载体,表达外源基因进行疾病的防治<sup>[7-8]</sup>。本研究选取食品级的 NICE(nisin-controlled expression)表达系统,构建表达人胃泌酸调节素的重组乳酸乳球菌,为进一步研究其减肥降脂效应,并作为将来研发肥胖、糖尿病等相关疾病的新型药物提供实验基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

表达质粒 pNZ8149 以及乳酸乳球菌菌株 NZ3900(MoBiTec GmbH 公司,德国);高保真 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶(New England Biolabs 公司,美国);DL2000 Marker(Vazyme 公司,美国);溶菌酶(BIO SHARP 公司,美国);M17 培养基(Oxoid 公司,英国);DNA 纯化试剂盒(Sigma 公司,美国);Rabbit Anti-Human OXM Ig G(Alpha Diagnostic International 公司,美国);引物、测序、基因合成委托南京金斯瑞公司。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 重组质粒 pNZ8149-OXM 的构建

根据人 OXM 核酸编码序列,并在其 5' 端添加 USP45 蛋白信号肽的核酸序列,人工化学合成 USP45-OXM 核苷酸片段连接于质粒 pUC57。然后与载体质粒 pNZ8149 分别以 *Nco* I 和 *Kpn* I 双酶切,经割胶纯化后将目的片段 USP45-OXM 和 pNZ8149 按 4:1(摩尔数)进行连接,室温连接 2 h。

#### 1.2.2 电转化乳酸乳球菌 NZ3900

吸取 40  $\mu$ L 感受态细菌至预冷的电转杯中,再加入 10  $\mu$ L 上述连接产物或空载体质粒,分别命名为 NZ3900-V、NZ3900-OXM。电转条件:电压 2 000 V,电容 25  $\mu$ F,电阻 200  $\Omega$ 。接着加入 1 mL 培养基,置于冰上 5 min,然后 30 $^{\circ}$ C 孵育 1.0~1.5 h。最后将菌液涂于平板,30 $^{\circ}$ C 过夜培养。次日,挑取 8~10 个中等大小的菌落,培养并小提质粒,用 *Nco* I 与 *Kpn* I 双酶切鉴定阳性菌,鉴定正确的阳性菌质粒送测序。

#### 1.2.3 OXM 在乳酸乳球菌中的诱导表达

挑取单个菌落用 GM17 培养基(M17 培养基+0.5%葡萄糖),30 $^{\circ}$ C 静止培养过夜。次日以 1:20 接种于 10 mL 新鲜培养基进行放大培养,当 *D*(600 nm)达到 0.4~0.5,在培养基中加入终浓度 5 ng/mL 诱导剂 nisin,30 $^{\circ}$ C 继续培养。离心收集诱导前和诱导 3、5、7、9 h、过夜的乳酸乳球菌进行 Western blot 检测。

根据筛选出的最佳诱导时间培养乳酸乳球菌后,用生理盐水重悬菌体,用于后期动物实验。

#### 1.2.4 Western blot 检测乳酸乳球菌中 OXM 的表达

菌体加入 100  $\mu$ L 缓冲液(50 mmol/L 葡萄糖、10 mmol/L EDTA、25 mmol/L Tris-HCl)重悬菌体沉淀,加入溶菌酶 20 mg/mL,于 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min 以破裂菌壁,再加入 100  $\mu$ L RIPA 裂解液超声破碎(60 Hz/min),冰上静置 10 min,12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,取上清进行 Western blot。将总蛋白变性后,进行 18% SDS-PAGE 凝胶电泳与转膜,兔源性抗 OXM 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗室温结合 1 h,再经 ECL 液显影检测 OXM 表达。

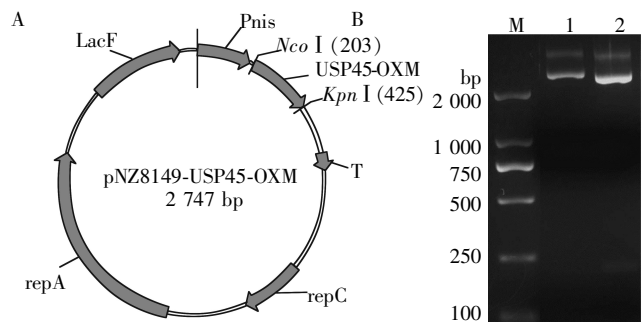
#### 1.2.5 液质联用质谱法检测小鼠血清 OXM 含量

选取 8 周龄 B6 雌鼠(南京大学模式动物研究所)24 只,均予自由饮食饮水,室温 21~23 $^{\circ}$ C,12 h 光照。将小鼠随机分为 3 组,每组 8 只。对照组灌胃给予 0.2 mL 生理盐水,NZ3900-V 组灌胃给予 0.2 mL  $5 \times 10^9$  CFU *L.lactis* NZ3900-V,NZ3900-OXM 组灌胃给予 0.2 mL  $5 \times 10^9$  CFU *L.lactis* NZ3900-OXM。5 h 后取小鼠血清,用液质联用质谱(三重四级杆质谱仪安捷伦 6410)检测血清中 OXM 含量。

## 2 结 果

### 2.1 质粒 pNZ8149-OXM 转化乳酸乳球菌

如图 1A 所示,构建了质粒 pNZ8149-OXM,其中 OXM 的 N 端携带乳酸乳球菌 USP45 蛋白的分泌信号肽,上游的启动子 *Pnis* 能够被 nisin 激活诱导下游基因表达。将得到的重组质粒 pNZ8149-OXM 用 *Nco* I 和 *Kpn* I 双酶切,应该产生 2550 bp 和 226 bp 的 2 个片段。如图 1B 所示,经 2% 琼脂糖凝胶电泳观察到约 2 000 bp 和 250 bp 的目的条带,与预期大小一致,表明目的片段 USP45-OXM 已经克隆到质粒



A 质粒图谱;B 重组质粒的酶切鉴定;M:marker;1:pNZ8149;2:pNZ8149-OXM。

图 1 重组质粒 pNZ8149-OXM 构建及鉴定

Figure 1 Construction and identification of pNZ8149-OXM

pNZ8149 上。阳性质粒通过测序验证,序列完全正确。

### 2.2 OXM 在乳酸乳球菌中的表达

*L.lactis* NZ3900-V 与 *L.lactis* NZ3900-OXM 经过诱导剂 nisin 诱导之后,用 Western blot 检测菌内 OXM 的表达量。如图 2 所示,*L.lactis* NZ3900-V 菌体中并没有 OXM 的表达,而 *L.lactis* NZ3900-OXM 菌体中 OXM 的表达量随时间呈现先递增后递减的趋势,在诱导 5 h 左右表达量达到高峰,随后呈现下降趋势。因此,在扩大培养 *L.lactis* NZ3900-OXM 时,选用 nisin 诱导 5 h 后收菌用于后续实验。

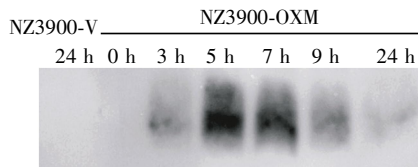


图 2 Western blot 检测不同诱导时间下 OXM 的表达水平  
Figure 2 Western blot analysis of OXM expression at different induction time

### 2.3 重组乳酸乳球菌在小鼠体内表达和分泌 OXM

为了检测 *L.lactis* NZ3900-OXM 菌株进入小鼠体内是否能分泌表达 OXM,分别给小鼠喂食了 *L.lactis* NZ3900-V 和 *L.lactis* NZ3900-OXM,然后采用质谱法检测各组小鼠血清中 OXM 的含量。结果如图 3 所示,对照组、NZ3900-V 组和 NZ3900-OXM 组小鼠血清中 OXM 的含量分别为(193.70 ± 58.63)、(195.33 ± 39.84)和(497.30 ± 55.48) ng/mL。NZ3900-OXM 组 OXM 含量是对照组及 NZ3900-V 组的 2.5 倍左右( $P < 0.001$ ),而 NZ3900-V 组与对照组相比没有差异( $P > 0.05$ )。这一结果说明了重组乳酸乳球菌进入小鼠体内仍然能够表达分泌 OXM,有可能通过血液循环到达相应靶位,发挥其生物学功能。

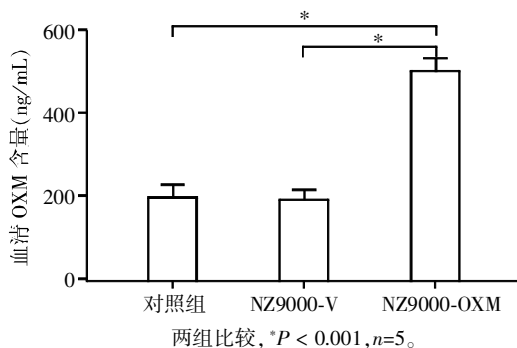


图 3 液质联用质谱法检测 3 组小鼠血清中 OXM 含量  
Figure 3 HPLC-MS analysis of OXM expression in mice serum of the three groups

## 3 讨论

大量研究表明,OXM 能够显著降低体重,提高

能量支出,降低胃酸水平,抑制食欲,极有可能作为肥胖以及肥胖合并 2 型糖尿病的治疗药物。它是胰高血糖素样肽-1 受体 (glucagon-like peptide-1 receptor, GLP1R) 和胰高血糖素受体 (glucagon receptor, GCGR) 的双激动剂<sup>[9-10]</sup>;激活 GLP1R 将发出饱感信号,产生饱腹感,降低进食量;激活 GCGR 会通过 cAMP 信号通路提高小肠葡萄糖吸收,导致血糖水平显著提高。有研究表明 OXM 能够降低体重依赖于 GCGR 和 GLP1R 的共同活化<sup>[11]</sup>。Cohen 等<sup>[5]</sup>通过双盲、安慰剂控制及交叉设计试验分别对 13 位健康受试者进行研究,结果发现静脉注射 OXM 能显著降低自由进食量 [平均降低 (19.3 ± 5.6)%,  $P < 0.01$ ] 以及累计 12 h 卡路里摄入量 [平均降低 (11.3 ± 6.2)%,  $P < 0.05$ ]。Wynne 等<sup>[6]</sup>给超重和肥胖患者每天 3 次皮下注射 OXM (餐前 400 nmol),给药 4 d 后,会增加能量支出并减少能量摄入;当给药超过 4 周时会使得体重显著下降 2~3 kg。这些临床试验充分说明 OXM 会通过抑制进食量和增加能量消耗,引起肥胖患者体重降低。另外,有研究者对小鼠进行葡萄糖耐受试验以及高糖钳夹试验,发现注射 OXM 会增强葡萄糖代谢。而且 OXM 能够以葡萄糖依赖形式降低胰腺分泌水平并刺激胰的内分泌腺分泌胰岛素,因此对于肥胖症的并发症 2 型糖尿病有很好的改善效果。

目前上市的肥胖治疗药物有奥利司他 (orlistat) 和利拉鲁肽。奥利司他虽然避免了其他同类减肥药对糖尿病患者心血管系统产生的不良反应,但是其减肥效果并不理想。有临床研究表明,在持续 4 年对肥胖患者进行跟踪调查后发现,给予奥利司他减肥药的肥胖患者平均只能减去 2.9 kg 体重<sup>[12]</sup>。另一方面,奥利司他的作用机制是通过阻断人体对食物中脂肪的吸收,使体内脂肪减少,从而达到减重的目的,可能会增加腹泻等的胃肠道反应。利拉鲁肽是一种 GLP-1 受体激动剂,自 2010 年开始在美国被用于治疗 2 型糖尿病,后来发现具有显著的减重效果。与用于 2 型糖尿病不同,用于减肥时利拉鲁肽的剂量更高,其长期健康益处尤其是安全性仍有待进一步确定。另外,利拉鲁肽是一种肽类药物,只能通过注射方式给药,用药不便增加患者的痛苦。而 OXM 作用于中枢神经系统,可以抑制进食量以及增加运动性能量消耗,从而更安全有效地达到减肥目的。而且有研究发现,长期给饮食诱导肥胖小鼠注射 OXM 在影响体重的同时还会导致血糖下降,促进糖代谢<sup>[11]</sup>。因此,OXM 作为一种新型治疗肥

胖的多肽药物,不仅具有更好的减肥效果,而且有望改善肥胖导致的 2 型糖尿病。

本研究采用的食品级 NICE 表达系统安全性高,可以直接用于人体。其中诱导剂 nisin 是乳酸链球菌肽,作为一种天然生物活性抗菌肽,已在全世界约 60 多个国家和地区被许可用于食品生产。而且质粒 pNZ8149 不存在任何抗性基因,是以 LacF 基因作为筛选标记,整个表达系统不涉及抗生素,生物安全性高。虽然有研究将 OXM 转化到双歧杆菌中喂食肥胖小鼠,减肥降脂效果较好<sup>[13]</sup>。但双歧杆菌作为基因工程受体菌存在一定的缺陷,它是一种严格厌氧菌,在体外培养时耗时耗力,不如兼性厌氧的乳酸乳球菌培养方便。另一方面,所使用的质粒载体上含有氨苄抗性基因,存在生物安全问题。

重组乳酸乳球菌已经被用于治疗很多疾病,如炎症性肠炎<sup>[7]</sup>、1 型糖尿病<sup>[14]</sup>等,其中表达白介素-10 的乳酸乳球菌治疗慢性肠炎已经通过了一期临床试验,正在进行二期临床试验<sup>[15]</sup>。由此可见,乳酸乳球菌作为基因工程受体菌有着广泛的应用前景。在本研究中,构建分泌表达 OXM 的乳酸乳球菌,不仅可以省去纯化蛋白的步骤,降低成本,而且可以解决药物注射带来痛苦的问题,为肽类药物开发提供了新的思路。在后续研究中,计划用表达 OXM 的乳酸乳球菌喂食饮食诱导的肥胖小鼠或糖尿病小鼠,观察其减肥降脂的效果。

#### [参考文献]

[1] Ahima RS. Digging deeper into obesity[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(6):2076-2079

[2] Pocai A. Unraveling oxyntomodulin, glp1's enigmatic brother[J]. *J Endocrinol*, 2012, 215(3):335-346

[3] Dakin CL, Gunn I, Small CJ, et al. Oxyntomodulin inhibits food intake in the rat[J]. *Endocrinology*, 2001, 142(10):4244-4250

[4] Wynne K, Park AJ, Small CJ, et al. Oxyntomodulin increases energy expenditure in addition to decreasing energy intake in overweight and obese humans: A randomised controlled trial[J]. *Int J Obes (Lond)*, 2006, 30(12):1729-1736

[5] Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, et al. Oxyntomodulin suppresses appetite and reduces food intake in humans [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(10):4696-4701

[6] Wynne K, Park AJ, Small CJ, et al. Subcutaneous oxyntomodulin reduces body weight in overweight and obese subjects: A double-blind, randomized, controlled trial [J]. *Diabetes*, 2005, 54(8):2390-2395

[7] Motta JP, Bermudez-Humaran LG, Deraison C, et al. Food-grade bacteria expressing elafin protect against inflammation and restore colon homeostasis[J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(158):158ra144

[8] Steidler L, Hans W, Schotte L, et al. Treatment of murine colitis by lactococcus lactis secreting interleukin-10 [J]. *Science*, 2000, 289(5483):1352-1355

[9] Gros L, Thorens B, Bataille D, et al. Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide, oxyntomodulin, and glucagon interact with a common receptor in a somatostatin-secreting cell line[J]. *Endocrinology*, 1993, 133(2):631-638

[10] Jorgensen R, Kubale V, Vrecl M, et al. Oxyntomodulin differentially affects glucagon-like peptide-1 receptor beta-arrestin recruitment and signaling through galpha (s) [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 322(1):148-154

[11] Kosinski JR, Hubert J, Carrington PE, et al. The glucagon receptor is involved in mediating the body weight-lowering effects of oxyntomodulin [J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2012, 20(8):1566-1571

[12] Rucker D, Padwal R, Li SK, et al. Long term pharmacotherapy for obesity and overweight: Updated meta-analysis [J]. *BMJ*, 2007, 335(7631):1194-1199

[13] Long RT, Zeng WS, Chen LY, et al. Bifidobacterium as an oral delivery carrier of oxyntomodulin for obesity therapy: Inhibitory effects on food intake and body weight in overweight mice [J]. *Int J Obes (Lond)*, 2010, 34(4):712-719

[14] Takiishi T, Korf H, Van Belle TL, et al. Reversal of autoimmune diabetes by restoration of antigen-specific tolerance using genetically modified lactococcus lactis in mice [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(5):1717-1725

[15] Braat H, Rottiers P, Hommes DW, et al. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in crohn's disease [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2006, 4(6):754-759

[收稿日期] 2015-03-24