

## 稳定表达小鼠 PNPLA7 的 Huh7 细胞系的构建

鞠 境,冯娇娇,李 仲\*

(南京医科大学生物化学与分子生物学系,江苏省功能基因组学重点实验室,江苏 南京 211166)

**[摘 要]** 目的:构建稳定表达小鼠 PNPLA7-Flag 蛋白的人类肝癌细胞 Huh7 细胞系,观察小鼠 PNPLA7 在 Huh7 细胞中的过表达以及对 Huh7 细胞脂质含量的影响。方法:构建 pCMV6 -PNPLA7-Flag 真核表达载体,应用脂质体转染技术将该质粒导入 Huh7 细胞,随后通过 G418 筛选稳定表达的细胞系,运用 Western blot 方法检测 PNPLA7 蛋白表达;并通过油酸处理及油红染色观察过表达 PNPLA7 蛋白对 Huh7 细胞中脂质含量的影响。结果:成功获得 2 株稳定过表达 PNPLA7-Flag 的 Huh7 细胞系;Huh7 细胞中过表达 PNPLA7 蛋白,在油酸处理后细胞内脂滴含量减少。结论:稳定表达小鼠 PNPLA7 的 Huh7 细胞系构建成功;小鼠 PNPLA7 在 Huh7 细胞中的表达会引起细胞中脂质含量减少,从而为后续研究 PNPLA7 蛋白在脂代谢通路的功能及机制提供可靠的细胞模型。

**[关键词]** PNPLA7;稳定表达;脂滴;脂代谢

**[中图分类号]** R589.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)07-863-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20160721

## Establishment of Huh7 cell line stably expressing murine PNPLA7 protein

Ju Jing, Fen Jiaojiao, Li John Zhong\*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Key Laboratory of Human Functional Genomics of Jiangsu Province NJMU, Nanjing 211166, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a stable PNPLA7-expressed human hepatoma cell line (Huh7) and observe the effect of stable overexpression of PNPLA7 on the lipid contents in the cell line. **Methods:** pCMV6-PNPLA7-Flag plasmid was constructed and transfected into Huh7 cells with lipofectamine 2000 reagent. After G418 selection, mRNA and protein expression levels of PNPLA7 were examined by Western blot in these stable cell lines. Treated cells with oleic acid and the lipid contents in these cell lines were observed by oil red O staining. **Results:** Two lines stably expressing PNPLA7 were gained, and showed high expression level of PNPLA7 by Western blot analysis. The decreased lipid contents were observed in these cell lines after oleic acid treatment by oil red O staining. **Conclusion:** Huh7 cell lines stably expressing PNPLA7-Flag were established successfully. Stable overexpression of PNPLA7 may lead to the decreased lipid content in Huh7 cells after oleic acid treatment. It can be a reliable cell model for the study of functions and mechanisms of PNPLA7 in lipid metabolic pathways.

**[Key words]** PNPLA7; stable expression; lipid droplet; lipid metabolism

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(07):863-867]

脂肪组织主要用于储存能量,在全身脂肪稳态中发挥关键作用。研究已经发现,脂肪组织也是重要的内分泌器官,可以分泌多种脂肪因子来调节机体能量代谢平衡,如瘦素、脂联素、抵抗素等<sup>[1]</sup>。

哺乳动物体内存在两种脂肪组织:白色脂肪组织(white adipocyte tissue, WAT)和棕色脂肪组织

(brown adipocyte tissue, BAT)。白色脂肪组织的主要功能是以甘油三酯(TG)的形式储存体内过剩的能量,棕色脂肪组织含有大量线粒体,是适应性产热的主要部位<sup>[2]</sup>。众所周知,脂肪细胞能够在能量供给充足的情况下合成和贮存 TG,并且在禁食情况下水解 TG,释放游离脂肪酸(FFAs)和甘油<sup>[3]</sup>。细胞中的脂滴由中性脂(TG 和胆固醇酯)、磷脂和未酯化的胆固醇等组成。此外,也存在数目众多的脂滴相关蛋白,他们包括结构蛋白、脂类修饰的酶和调节酶活

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(31271268, 81471079)

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

性的相关蛋白<sup>[4]</sup>。研究至今,虽然很多蛋白因子的生理学功能依旧未知,但是脂滴是一个高度动态的细胞器,能提供膜组分、能量底物和信号分子<sup>[5]</sup>。目前,在脂肪组织和非脂肪组织中,已经有3种主要的脂解酶功能被探究清楚,分别为脂肪甘油三酯脂酶(ATGL)、激素敏感的脂酶(HSL)和单酰基甘油脂酶(MGL)<sup>[6]</sup>。其中在脂肪组织中催化甘油三酯水解第一步的重要脂酶 ATGL 就属于 PNPLA (patatin-like phospholipase domain containing protein) 蛋白家族,该蛋白家族都含有一个保留的 Patatin 样磷脂酶结构域。在人类基因组中共发现9个含有该结构域的蛋白 (PNPLA1~9)<sup>[7]</sup>。最近研究发现该家族的 PNPLA3 蛋白在人类非酒精性脂肪肝的发生以及肝脏脂类新陈代谢调控中发挥着重要作用<sup>[8-9]</sup>。由于 PNPLA 家族蛋白在不同组织和不同种类脂肪酸代谢中起着重要作用,现在 PNPLA 家族蛋白已经日益成为脂肪代谢研究中的热点。

小鼠 PNPLA7 蛋白全长为 1 352 个氨基酸,主要在骨骼肌、心脏、尤其是在白色脂肪组织和棕色脂肪组织等胰岛素靶组织中表达,同时 PNPLA7 在睾丸中也有高表达<sup>[10]</sup>。人类 PNPLA7 蛋白主要在骨骼肌、白色脂肪组织和前列腺中表达。在小鼠 3T3-L1 脂肪前体细胞中 PNPLA7 的 mRNA 水平可以受胰岛素负调控<sup>[10]</sup>。体外实验结果表明,PNPLA7 具有很高的溶血磷脂酶底物水解活性,可以水解溶血磷脂<sup>[11]</sup>。而溶血磷脂是脂滴表面磷脂层的重要成分,对脂滴的形成和脂肪代谢有重要作用,这些研究结果提示在脂肪组织中高表达的 PNPLA7 蛋白在体内可能通过参与脂肪代谢,从而对全身的能量稳态起到一定的调节作用。但是到目前为止,尚不清楚 PNPLA7 蛋白在生物体内的功能以及该蛋白是如何参与脂肪代谢过程的。本文通过构建稳定表达小鼠 PNPLA7 的 Huh7 细胞系,为深入研究 PNPLA7 蛋白在脂肪代谢过程中的功能及其分子机制提供可靠的细胞模型。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

DMEM 细胞培养液(Gibco 公司,美国);小牛血清(南京天为生物科技有限公司);TRIzol、RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 及转染试剂 Lipofectamine 2000(ThermoFisher 公司,美国);质粒抽提试剂盒(QIAGEN 公司,德国);抗 Calnexin 抗体(Stressgen 公司,比利时),抗 PNPLA7 抗体由本实验

室自制;油红 O 等试剂 (Sigma 公司,美国);G418 (Life 公司,美国);细胞甘油三酯酶法测定试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司);Huh7 细胞株由清华大学李蓬老师实验室惠赠。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 Huh7 细胞培养以及油酸(oleic acid, OA)的处理

Huh7 细胞株置于含 10% 小牛血清、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素的高糖 DMEM 全培养液中,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。未用 OA 处理 (-OA),或用含 400  $\mu$ mol/L OA 处理细胞 16 h (+OA),用于促进 TG 合成,诱导大脂滴的形成。

#### 1.2.2 PNPLA7 稳定表达细胞系的构建

本研究使用的质粒中,小鼠 PNPLA7 cDNA 被插入到 pCMV6-Flag 的 *Nhe* I 和 *Xho* I 限制性内切酶酶切位点之间。构建了 pCMV6-PNPLA7-Flag 和 pCMV6-Flag 两个真核表达载体。

Huh7 用 Lipofectamine2000 转染 pCMV6-Flag (阴性对照组)和 pCMV6-PNPLA7-Flag 质粒(PNPLA7 组)。转染 3 d 后,传代至低密度,用含有 1 mg/mL G418 的完全培养基培养。每 2 d 换 1 次液。G418 完全培养基培养 7 d 后,制备细胞悬液,细胞计数,用培养基稀释细胞至 100 个/mL,96 孔板中以每孔 2 个细胞的密度种板,G418 完全培养基培养 3 d 左右,挑选单克隆。放大培养后,收取蛋白和 RNA 样,验证目的基因表达。

#### 1.2.3 Western blot 检测细胞 PNPLA7 的表达

用冰 PBS 洗涤细胞培养皿 3 次,并将残余液体吸净;3.5 cm 培养皿每孔加 0.1 mL 细胞裂解液。冰上 20 min;刮下细胞,移入离心管中;4℃ 12 000g 离心 20 min,取上清分装后 -80℃ 保存备用。使用 TECAN 公司的酶标仪在 750 nm 波长读取吸光值,根据 BCA 方法计算各蛋白样品浓度,将含有上样缓冲液的蛋白样品煮沸 5 min 使其变性。配制 5% 的浓缩胶和 8% 的分离胶。取处理后的蛋白样品于 100 V 恒压电压下进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,100 V 恒压转膜 1 h 至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,抗 PNPLA7 多克隆抗体(1:500)或抗 Calnexin 抗体(1:3 000),4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜,室温孵育 1 h,TBST 洗膜,ECL 化学法发光底物进行显影。

#### 1.2.4 细胞内 TG 含量的检测

胰酶消化、离心收集细胞,每  $1 \times 10^6$  个细胞加入 0.1 mL 的裂解液,混匀后室温静置 10 min。转移适

量上清至 1.5 mL 离心管中,剩余裂解液用 BCA 法测定蛋白浓度。70℃加热上清液 10 min,2 000 r/min 室温离心 5 min,上层清液用酶法测定在 550 nm 下的吸光值,通过标准曲线计算样品中 TG 的浓度。

### 1.2.5 油红染色

3.5 cm 培养皿中的单层细胞用 PBS(pH 7.4)洗涤 3 次,然后用 10%中性福尔马林固定 5 min;0.5%油红贮存液(溶于异丙醇)用水按 3:2 稀释,0.45  $\mu$ m 滤膜过滤;固定后的细胞用油红稀释液室温孵育 1 h 后,蒸馏水漂洗细胞 3 次,拍照观察。

### 1.3 统计学方法

使用 GraphPad 软件进行统计学分析。计量数据采用均数和标准误( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ )表示,采用成对 *t* 检验对不同组数据进行比较, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 质粒表达载体的构建

以鼠肝脏组织 cDNA 文库为模板,合成第 1 链 cDNA,PCR 扩增得到了大小为 4 059 bp 的 PNPLA7 cDNA 片段,与预期的基因条带大小一致,特异性好(图 1A)。利用 *Nhe* I 与 *Xho* I 限制性酶切位点,将 PNPLA7 cDNA 片段连入 pCMV6-Flag 真核表达载体中,得到的连接产物经 *Hind* III 酶切鉴定正确(图 1B)后,送测序检查序列的正确性。

### 2.2 稳定转染细胞的筛选

使用脂质体介导的方法转染 Huh7 细胞。转染后 48 h,进行 G418 的抗性筛选,加入 G418 后的第 2 天,细胞形态明显变化,大部分变小变圆,胞质皱缩,培养液中出现漂浮的死细胞;加入 G418 后的第

6 天,细胞开始出现大量死亡;2 周后转染组形成散在的细胞克隆,而未转染组细胞已经全部死亡。将存活的细胞消化至 48 孔板中,保证每孔 1 个细胞;加入 G418 后的第 21 天,单克隆细胞长至细胞集落,并呈现岛状;继续培养 1 周,待细胞长满整个培养孔,将部分稳定转染 PNPLA7-Flag 的 Huh7 细胞及时冻存保种。

### 2.3 稳定表达细胞系的蛋白质检测

待细胞培养皿中的细胞生长汇合时,提取细胞总蛋白,运用 Western blot 检测特异蛋白质的表达。结果显示 PNPLA7 组有 PNPLA7-Flag 融合蛋白质的表达,而阴性对照组则未见同样蛋白表达(图 2),通过灰度扫描分析,稳定表达细胞系中的 PNPLA7 蛋白相对含量最高。

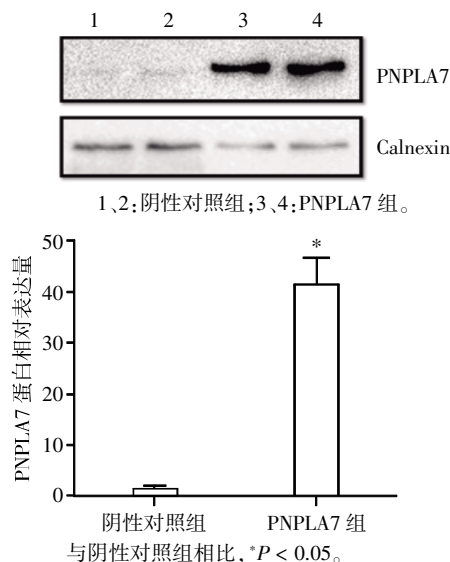
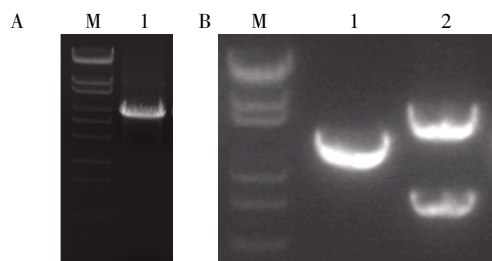


图 2 Western blot 检测转染细胞中的蛋白表达

Figure 2 Protein expression in transfected Huh7 cells by Western blot

### 2.4 油酸处理细胞后脂滴的形成以及 TG 水平的检测

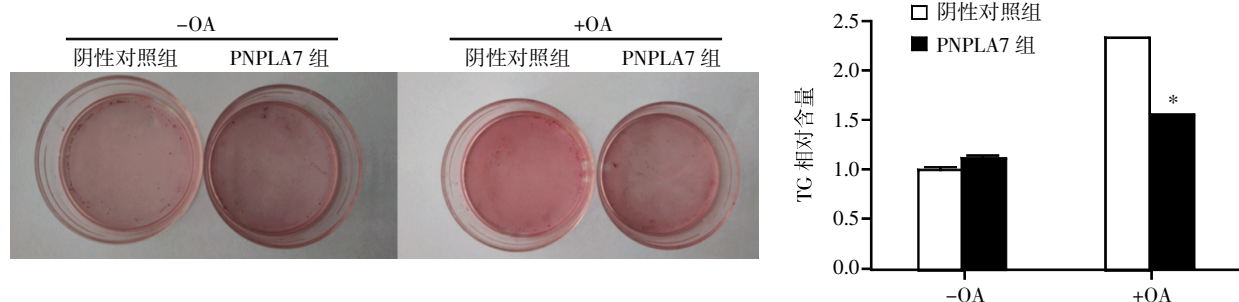
将细胞用油酸处理 16 h 后,通过油红染色,拍照观察,结果如图所示:油酸处理后的稳定表达 PNPLA7 的 Huh7 细胞内脂质含量相对较少(图 3),用异丙醇洗脱培养皿后,检测在 500 nm 下的光密度,可以发现油酸处理后细胞内的脂质含量明显减少(图 3);利用细胞甘油三酯酶法测定试剂盒检测细胞内 TG 含量,可以得出稳定表达 PNPLA7 的细胞内 TG 含量在用油酸处理后显著降低,而未用油酸处理时,两组细胞内脂质含量无明显差异(图 4)。以上结果说明在脂质堆积的情况下,Huh7 细胞稳定过表达 PNPLA7 后会引起细胞中脂质含量减少。



A:PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳,M:EcoT14 I digest DNA Marker(从上到下依次为 19 329、7 743、6 223、4 254、3 472、2 690、1 882、1 489 bp);1:PCR 产物;B:真核表达载体酶切鉴定,M:EcoT14 I digest DNA Marker;1:pCMV6-PNPLA7-Flag;2:*Hind* III 酶切产物。

图 1 质粒表达载体的构建

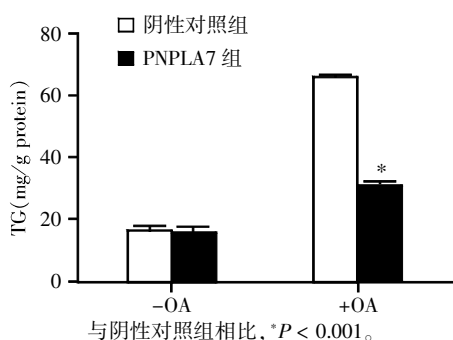
Figure 1 Constructing of plasmid vectors to express exogenous genes



与阴性对照组相比, \* $P < 0.001$ 。

图3 油红染色观察 Huh7 中的脂质含量

Figure 3 Lipid content in the transfected Huh7 cells by oil red O staining



与阴性对照组相比, \* $P < 0.001$ 。

图4 Huh7 细胞中 TG 的含量

Figure 4 TG content in the transfected Huh7 cells

### 3 讨论

尽管十几年来脂滴的研究已经取得了显著进步,但是关于脂滴的形成、融合以及动态调节过程还有诸多问题有待进一步探究。现有研究结果显示 PNPLA 家族蛋白和脂肪代谢、肥胖、脂肪肝以及胰岛素敏感性密切相关。如 PNPLA2(ATGL)在脂水解途径发挥重要作用,是控制脂肪组织基础脂水解速率的主要因子<sup>[12]</sup>;PNPLA3 的突变与人类非酒精性脂肪肝以及肝炎、肝硬化密切相关,肝脏中过表达 PNPLA3 突变体可以导致 TG 在肝脏细胞的堆积<sup>[13]</sup>。而 PNPLA7 是在肝脏、脂肪组织和肌肉中高表达的蛋白,目前对其功能和机制的研究有限。尚不清楚 PNPLA7 在细胞中以及能量代谢调节中的作用,尤其是在肝细胞中脂类物质代谢的调控、脂滴的动态变化中的功能及其分子机制。同时脂滴是一个处于动态变化的细胞器。几乎所有的哺乳动物细胞在脂肪酸的刺激下,均能形成脂滴;当细胞在能量缺乏的情况下,存储于脂滴中的 TG 在脂酶的作用下水解,释放游离脂肪酸与甘油,为机体提供能量<sup>[14]</sup>。但是这两者之间是否存在关联,PNPLA7 能否调控脂滴的形成和水解,目前还缺乏实验证明。

本研究以人肝癌细胞系 Huh7 为细胞模型,为

了构建出稳定转染细胞系,使用脂质体转染以及 G418 作为稳定转染的抗性筛选试剂<sup>[15]</sup>,然而其缺点是目的基因转入细胞后,整合到细胞染色体上形成稳定基因组的效率较低,并且对靶细胞的组织特异性差,不利于特定组织细胞的基因转导,优点是对转染细胞相对无害,重复性好<sup>[16]</sup>。利用 Western blot 检测蛋白的表达,结果证明筛选得到的细胞成功表达出 PNPLA7 蛋白,PNPLA7 稳定表达的 Huh7 细胞系构建成功。用筛选得到的 PNPLA7 稳定细胞系进行实验,发现用油酸处理促进细胞形成大脂滴时,细胞中能被油红染色的脂类减少,同时细胞内 TG 的含量显著降低 ( $P < 0.001$ ),这表明过表达 PNPLA7 后可以有效减少细胞中的脂含量。而最新报道,在肝脏中 PNPLA3 的突变会导致没有催化活性的 PNPLA3 积聚在脂滴表面,同时改变肝脏中脂类物质的构成<sup>[17]</sup>,并引起严重的非酒精性脂肪肝病<sup>[18]</sup>。此外脂肪组织 ATGL 转基因小鼠,在高脂饮食处理后,体脂降低,脂肪组织中 TG 含量明显下降<sup>[19]</sup>,因此在脂类物质代谢中 PNPLA7 的功能非常关键。与此同时根据其组织表达分布和亚细胞结构定位,PNPLA7 在白色和棕色脂肪组织以及肝脏中可能对脂滴代谢和融合过程发挥着系统性调控作用,所以对其功能与机制的研究将为肥胖、非酒精性脂肪肝病、肝炎以及代谢综合征提供新思路。PNPLA7 稳定细胞系的构建将对后续的功能实验和机制研究奠定重要基础,有利于探究 PNPLA 家族蛋白在脂肪代谢合成的具体作用,也为进一步深入研究脂滴代谢及代谢性疾病的发病机制提供了有利的细胞模型。

### 【参考文献】

- [1] Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis[J]. Nature, 2006, 444(7121):847-853
- [2] Shabalina IG, Backlund EC, Bar-Tana J, et al. Within

- brown-fat cells,UCP1-mediated fatty acid-induced uncoupling is independent of fatty acid metabolism [J]. *Biochim Biophys Acta*,2008,1777(7/8):642-650
- [3] Kalderon B,Mayorek N,Berry E,et al. Fatty acid cycling in the fasting rat [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*,2000,279(1):E221-E227
- [4] Brasaemle LD. Thematic review series:adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins; stabilization of lipid droplets and control of lipolysis [J]. *J Lipid Res*,2007,48(12):2547-2559
- [5] Martin S,Parton RG. Lipid droplets;a unified view of a dynamic organelle [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*,2006,7(5):373-378
- [6] Schweiger M,Schreiber R,Haemmerle G,et al. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism [J]. *J Biol Chem*,2006,281(52):40236-40241
- [7] Wilson PA,Gardner SD,Lambie NM,et al. Characterization of the human patatin-like phospholipase family [J]. *J Lipid Res*,2006,47(9):1940-1949
- [8] Romeo S,Kozlitina J,Xing C,et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Nat Genet*,2008,40(12):1461-1465
- [9] Li JZ,Huang Y,Karaman R,et al. Chronic overexpression of PNPLA3I148M in mouse liver causes hepatic steatosis [J]. *J Clin Invest*,2012,122(11):4130-4144
- [10] Kienesberger PC,Oberer M,Lass A,et al. Mammalian patatin domain containing proteins;a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions [J]. *J Lipid Res*,2009,50(Suppl):S63-S68
- [11] Cerik IK,Salzburger B,Boeszoermenyi A,et al. A peptide derived from G0/G1 Switch gene 2 acts as noncompetitive inhibitor of adipose triglyceride lipase [J]. *J Biol Chem*,2014,289(47):32559-32570
- [12] Duncan RE,Ahmadian M,Jaworski K,et al. Regulation of lipolysis in adipocytes [J]. *Annu Rev Nutr*,2007,27:79-101
- [13] Dongiovanni P,Donati B,Fares R,et al. PNPLA3 I148M polymorphism and progressive liver disease [J]. *World J Gastroenterol*,2013,19(41):6969-6978
- [14] Fei W,Wang H,Fu X,et al. Conditions of endoplasmic reticulum stress stimulate lipid droplet formation in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biochem J*,2009,424(1):61-67
- [15] Huang Y,He S,Li JZ,et al. A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2010,107(17):7892-7897
- [16] 钟英强,魏 菁,傅玉如,等. 阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 对人胰腺癌 Capan-2 细胞的毒性作用 [J]. *南方医科大学学报(自然科学版)*,2008,28(11):1981-1984
- [17] Peter A,Kovarova M,Nadalin S,et al. PNPLA3 variant I148M is associated with altered hepatic lipid composition in humans [J]. *Diabetologia*,2014,57(10):2103-2107
- [18] Smagris E,Basuray S,Li J,et al. Pnpla3I148M knockin mice accumulate PNPLA3 on lipid droplets and develop hepatic steatosis [J]. *Hepatology*,2015,61(1):108-118
- [19] Ahmadian M,Duncan RE,Varady KA,et al. Adipose overexpression of desnutrin promotes fatty acid use and attenuates diet-induced obesity [J]. *Diabetes*,2009,58(4):855-866

[收稿日期] 2016-04-28

+++++

(上接第 825 页)

- rhythmia [J]. *J Electrocardiol*,2008,41(2):131-137
- [21] Lee G,Kalman JM,Vohra JK,et al. Dissociated pulmonary vein potentials following antral pulmonary vein isolation for atrial fibrillation;impact on long-term outcome [J]. *Heart*,2011,97(7):579-584
- [22] Buiatti A,Ammar S,Reents T,et al. Dissociated pulmonary vein activity after pulmonary vein isolation for paroxysmal atrial fibrillation;a predictor for recurrence? [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*,2015,26(1):7-13
- [23] Satomi K,Tilz R,Takatsuki S,et al. Inducibility of atrial tachyarrhythmias after circumferential pulmonary vein isolation in patients with paroxysmal atrial fibrillation: clinical predictor and outcome during follow-up [J]. *Europace*,2008,10(8):949-954
- [24] Crawford T,Chugh A,Good E,et al. Clinical value of non-inducibility by high-dose isoproterenol versus rapid atrial pacing after catheter ablation of paroxysmal atrial fibrillation [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*,2010,21(1):13-20
- [25] 蒋晨曦,马长生,董建增,等. 阵发性心房颤动肺静脉隔离后诱发房性心律失常的电生理特征分析和长期随访 [J]. *中国介入心脏病学杂志*,2014,22(4):205-209

[收稿日期] 2015-07-17