

本文引文格式:陈丽萍,肖婷,邓懋清,等.基于H9C2细胞株的ADRB1基因多态性稳定过表达模型的构建[J].右江民族医学院学报,2022,44(2):180-183,194.

【论著与临床报道】

基于H9C2细胞株的ADRB1基因多态性稳定过表达模型的构建

陈丽萍,肖婷,邓懋清,谢珊珊,吴定昌

(福建省龙岩市第一医院,福建医科大学附属龙岩第一医院检验科,福建 龙岩 364000)

摘要:目的 构建 β_1 肾上腺素能受体(ADRB1,1165 G>C)基因多态性稳定过表达的心肌细胞模型,为其在高血压、心力衰竭及不良心血管事件中的功能及机制研究奠定了实验基础。方法 将ADRB1 cDNA克隆片段和PMT399载体连接后获得pSE4077和pSE4078重组质粒,再与慢病毒包装质粒共转染293T细胞,收集上清液感染H9C2细胞,利用定量聚合酶链式反应(QPCR)方法筛选稳转细胞株。结果 pSE4077和pSE4078组的ADRB1蛋白表达水平显著高于未转染的细胞对照组和转染空病毒的对照组,且pSE4078组也高于pSE4077组。结论 基于H9C2细胞株的ADRB1基因多态性稳定过表达模型构建成功。

关键词:高血压;ADRB1;H9C2细胞株;慢病毒载体;基因多态性

中图分类号:R544.1

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2022)02-0180-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2022.02.008

Establishment of stable over-expression model of ADRB1 gene polymorphism based on H9C2 cell line

Chen Liping, Xiao Ting, Deng Maoqing, Xie Shanshan, Wu Dingchang

(Department of Clinical Laboratory, Longyan First Hospital, Longyan First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Longyan 364000, Fujian, China)

Abstract: **Objective** To establish a cardiomyocyte model with stable over-expression of β_1 adrenergic receptor (ADRB1, 1165 G>C) gene polymorphism, so as to lay an experimental foundation for the study of its function and mechanism in hypertension, heart failure and other adverse cardiovascular events. **Methods** After the ligation of ADRB1 cDNA clone fragments and PMT399 vector, the recombinant plasmids pSE4077 and pSE4078 were co-transfected with lentivirus package plasmid into 293T cells. The supernatant was collected to infect H9C2 cells. Stably transfected cells were screened by quantitative polymerase chain reaction (QPCR).

Results The expressions of ADRB1 in pSE4077 and pSE4078 groups were significantly higher than those in the control group of untransfected cells and those in the control group transfected with empty virus. And those of the pSE4078 group was also higher than those of the pSE4077 group. **Conclusion** The stable over-expression models of ADRB1 gene polymorphism have been successfully constructed based on H9C2 cell line.

Key words: hypertension; ADRB1; H9C2 cell line; lentiviral vector; gene polymorphism

高血压作为世界最普遍的心血管疾病之一,是心力衰竭发展中最强大、可改变的危险因素,影响全球20%的人口^[1-2],在顽固性高血压人群中,血压更难以

有效控制^[3]。家族遗传研究表明,30%~50%的个体间血压差异由遗传因素决定^[1]。 β_1 肾上腺素能受体(ADRB1)作为重要的心血管调节因子和治疗靶点^[4],

基金项目:福建省自然科学基金项目(2018J01403);福建省医学创新课题(2016-CX-49)

第一作者简介:陈丽萍(1988-),女,硕士,主管检验师,研究方向:高血压靶向治疗及细菌耐药性研究,E-mail:clpg106@163.com

通讯作者简介:吴定昌(1972-),男,硕士,主任技师,研究方向:感染性疾病机制研究,E-mail:2658720712@qq.com

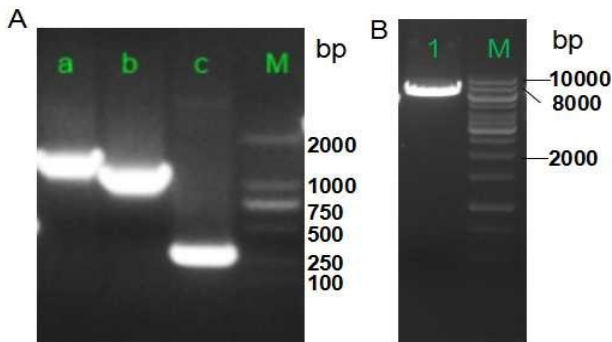
其基因多态性在高血压、心力衰竭等许多疾病中广泛研究^[5-6],但研究结果不一致。Chen LP 等^[7]研究显示 Arg389Gly Gly/Gly 是原发性高血压的独立风险因素,但 Varakantham V 等^[8]通过研究外周血单个核细胞 mRNA 发现 ADRB1 多态性与原发性高血压的遗传风险无关。本研究通过构建 ADRB1 单核苷酸多态性慢病毒载体,并转染进 H9C2 心肌细胞,从而构建 ADRB1 稳定过表达的心肌细胞模型,为进一步研究 ADRB1 基因多态性在高血压、心力衰竭等心血管疾病发病及 β 受体阻滞剂药效学的机制及功能奠定了实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 PrimeSTAR 酶、Taq 酶、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 FQ,均为 Takara 公司。DMEM(高糖)培养基、胎牛血清(FBS)、谷氨酰胺、青霉素-链霉素、胰酶-EDTA(0.25%)、无钙镁的磷酸盐缓冲液、Hanks' 平衡盐溶液,均为 GIBCO BRL 公司。BamHI-HF; NEB 公司。质粒小抽试剂盒: Promega 公司。质粒大抽试剂盒: Qiagen 公司。无缝克隆试剂盒和 SunBioTM Trans-EZ 常见细胞系转染试剂购自上海生博生物医药科技有限公司。胰酶: Invitrogen 公司。聚凝胺: Sigma 公司。PMT399 质粒载体购自世翱(上海)生物医药科技有限公司。慢病毒包装质粒 pCMV-dR8.9 和 pCMV-VSV-G 购自 Addgene 公司。H9C2 细胞株、293T 细胞株购自美国 ATCC 细胞库。

表 1 用于 PCR 钓取目的基因 ADRB1(1165 G>C)序列引物

ADRB1(1165C)	产物 a	上游引物	5'-GATCCAGCCTCCGGATCCGGCCACCATGGGCGCGGGGGCGCTC-3'
		下游引物	5'-CTCGCCCTTGCTCACCATCACCTTGGACTCGGAGGAGA-3'
ADRB1(1165G)	产物 b	上游引物	5'-GATCCAGCCTCCGGATCCGGCCACCATGGGCGCGGGGGCGCTC-3'
		下游引物	5'-CAAAGCAGGCCCTGGAAAGCCTTGCG-3'
	产物 c	上游引物	5'-GGCTTTCCAGGGCCTGCTTTGCTGCG-3'
		下游引物	5'-CTCGCCCTTGCTCACCATCACCTTGGACTCGGAGGAGA-3'



注: A. ADRB1(1165 G>C) 基因多态性 PCR 扩增产物。a、b、c 分别为 PCR 产物 a、b、c 对应条带, M 为 DL2, 000 DNA Marker; B. PMT399 载体酶切后产物, M 为 10kb DNA ladder Marker。

图 1 ADRB1 基因扩增和 PMT399 载体酶切产物

1.2 仪器 DNA 电泳槽和稳压电泳仪: 北京六一仪器厂; 凝胶成像仪: 上海天能科技有限公司; 恒温培养箱: 上海精宏实验设备有限公司; 恒温摇床: 太仓市实验设备厂; PCR 仪(Applied Biosystems); 冷冻高速离心机: Thermo Scientific 公司; CO₂ 培养箱: ESCO 公司; IX71 型荧光显微镜: Olympus 公司; ABI PRISM 7500 实时定量 PCR 仪。采用 E. coli DH5 α 作为感受态细胞。

1.3 含 ADRB1(1165 G>C) 基因多态性的慢病毒质粒载体构建 根据美国国立生物技术信息中心(NCBI)中 ADRB1 基因编码区序列, 设计 3 对引物用于 PCR 钓取目的基因 ADRB1(1165 G>C) 多态性序列(见表 1), 引物送上海捷瑞生物工程有限公司进行引物合成。PCR 扩增获得 ADRB1 基因多态性片段(见图 1A); 用 BamHI-HF 对 PMT399 载体进行酶切, 回收 8385bp 载体片段(见图 1B)。将目的 DNA 片段和线性化载体以摩尔比 2 : 1 加到试管中进行重组反应, 混匀后在 42 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 然后转移到冰上。放置 2 ~ 3 min 后取 10 μ l 反应液体转化到 E. coli DH5 α 感受态细胞中, 取恰当量的转化菌液涂布于 LB 琼脂平板上(含表达载体相应的抗生素), 倒置平皿, 于恒温培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养 16 h。挑取平板上长出的转化子重悬于 10 μ l LB 培养液中, 从中取 1 μ l 做模板进行菌落 PCR 鉴定。接种阳性克隆, 保种并分装 100 μ l 送上海美吉生物医药科技有限公司测序。测序没有问题的, 再接种抽提质粒。

1.4 慢病毒包装纯化及滴度测定 pCMV-dR8.9 和 pCMV-VSV-G 为慢病毒包装质粒, 所转染质粒带有绿色荧光蛋白(GFP), 有利于鉴定。选择 293T 细胞株作为病毒包装细胞, 用含 10% FBS、1% 谷氨酰胺和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养液培养。按照 SunBioTM Trans-EZ 常见细胞系转染试剂说明书, 将目的载体、pCMV-dR8.9 和 pCMV-VSV-G 质粒转染 293T 细胞。48 h 后收集细胞上清液, 浓缩纯化病毒。采用定量聚合酶链式反应(QPCR)法测定病毒滴度。

1.5 慢病毒感染 H9C2 细胞株及 ADRB1 表达验证 H9C2 细胞采用含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养, 细胞计数后铺 6 孔板, 每孔 20 万个细胞; 12 h 后按照

MOI=50 使用慢病毒进行侵染;侵染后 8 h 换液,侵染后 48 h 加嘌呤霉素(puro)进行筛选,浓度为 $2 \mu\text{g/ml}$;持续筛选 2 周,获得稳定株。采用 QPCR 方法验证 ADRB1 过表达效果。

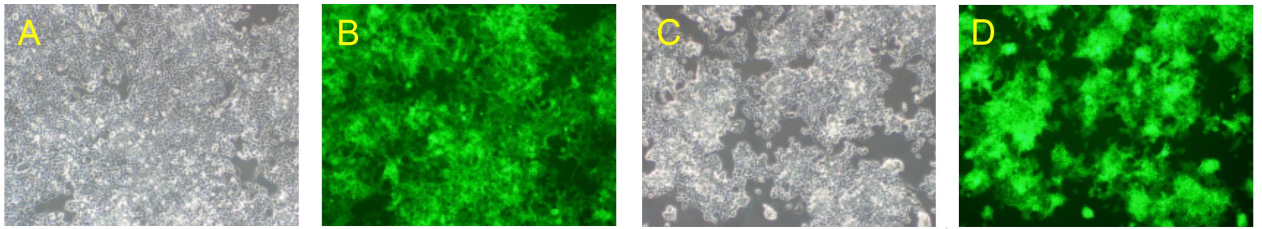
1.6 统计学方法 应用 SPSS 19.0 软件进行 *t* 检验,比较 ADRB1 基因多态性过表达组、Blank 组(未转染的细胞对照组)和 Mock 组(转染空病毒的对照组)间的 ADRB1 表达水平。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建 pSE4077 和 pSE4078 质粒 阳性克隆送测序,经 BLAST 比对证明与人源 ADRB1 编码基因

(NM_000684.3)序列吻合,证明表达质粒 pSE4077(野生型)和 pSE4078(突变型)连接成功。

2.2 慢病毒载体混合质粒转染 293T 效率 利用慢病毒感染 293T 细胞 48 h 后,用倒置荧光显微镜观察 GFP 荧光表达,图像显示 ADRB1 多态性过表达组细胞均产生 GFP 绿色荧光的阳性表达(见图 2)。证明含有 ADRB1 的慢病毒过表达载体包装成功。pSE4077 和 pSE4078 质粒感染 293T 细胞后,病毒滴度测定结果表明纯化后的载体滴度分别为 1.56×10^9 IU/ml 和 3.04×10^9 IU/ml。

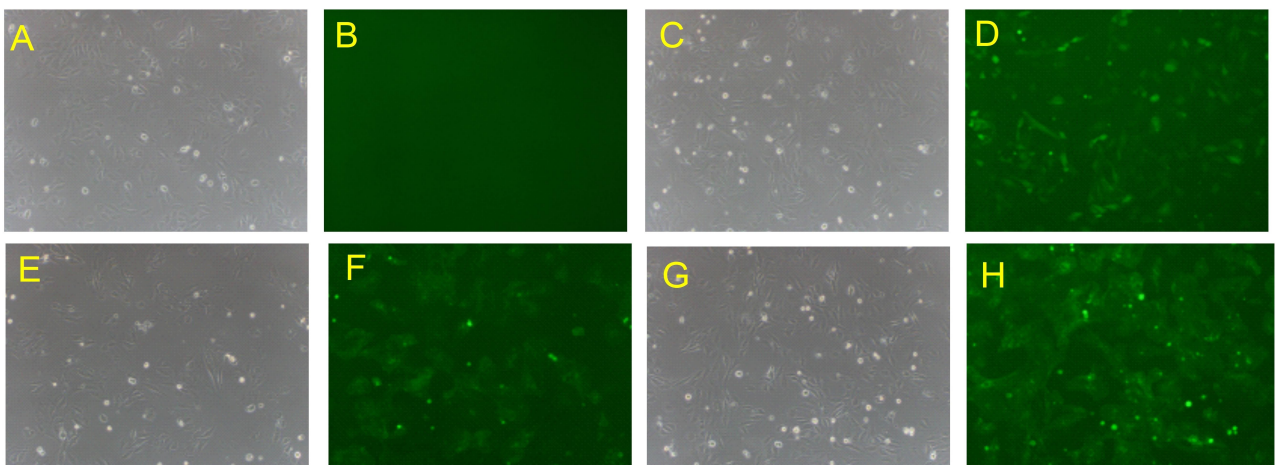


注:A. pSE4077 感染,白光图;B. pSE4077 感染,荧光图;C. pSE4078 感染,白光图;D. pSE4078 感染,荧光图。

图 2 慢病毒感染 293T 细胞 48h 后 GFP 绿色荧光表达

2.3 ADRB1 基因过表达验证 目的病毒 pSE4077、pSE4078 分别感染 H9C2 细胞后,用倒置荧光显微镜观察 GFP 荧光表达,图片显示 ADRB1 基因多态性病毒载体感染细胞均产生 GFP 绿色荧光的阳性表达,见图 3。采用 QPCR 法检测结果显示,pSE4077 和 pSE4078 组的 ADRB1 蛋白表达水平均较 Blank 组和

Mock 组显著提高($P < 0.001$),见图 4,且 pSE4078 组的 ADRB1 蛋白表达水平是 pSE4077 组的 1.6 倍(2523.43 ± 93.74 vs 1537.60 ± 38.42 , $P < 0.001$)。可见,ADRB1 基因有显著过表达效果,ADRB1 基因过表达稳定株构建成功。



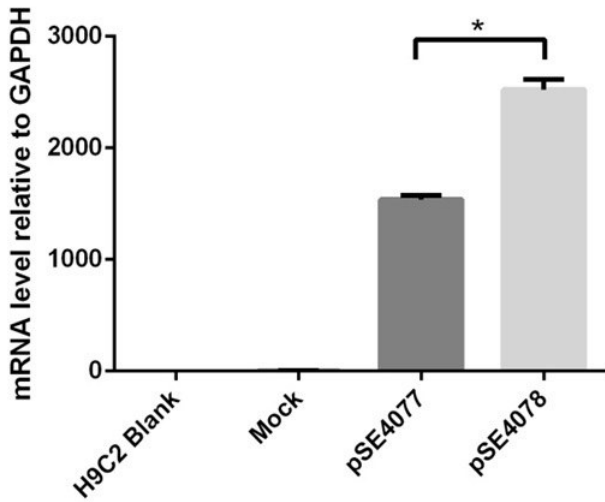
注:A、B 为 H9C2-Blank;C、D 为 H9C2-PMT399;E、F 为 H9C2-pSE4077;G、H 为 H9C2-pSE4078。

图 3 目的病毒转染 H9C2 细胞 24 h 后 GFP 荧光分析

3 讨论

ADRB1 是 G 蛋白偶联受体(GPCR)超家族成员,介导了广泛的心血管生理反应,并对神经内分泌刺激有反应;同时其作为多种儿茶酚胺的受体,可调节心输

出量和心率,在高血压及其相关心血管事件中具有重要的意义^[9]。所有 β 受体阻滞剂的主要蛋白靶点都是 ADRB1^[10]。遗传多态性可能通过参与高血压发病机制的基因来调节药物反应,改变药物作用,因此在阐明



注: * $P < 0.01$ 。

图 4 QPCR 法验证 ADRB1 基因过表达效果

人体对心血管疾病的易感性、临床表现的多样性以及对药物治疗的反应性上起着重要作用^[11]。

ADRB1 基因多态性 Arg389Gly 已被证实影响 β 肾上腺素能受体介导的细胞内信号传导,对 β 阻滞剂的反应有显著影响^[12-13]。我们前期研究发现携带 Arg389Gly Gly/Gly 基因型的受试者对美托洛尔有更好的抗高血压反应^[7]。但 Johnson JA 等^[14] 研究显示 Arg389Gly Arg/Arg 基因型携带者对美托洛尔的降压疗效较 Gly 等位基因携带者好,且窦晓涛^[15] 通过 Meta 分析得到与其一致结果。此外, Kang S 等^[16] 通过对 ADRB1 与收缩性心力衰竭的研究发现:除携带 ADRB1 Gly389Gly 基因型的患者外,虽大多数 ADRB1 基因型均显著降低了收缩性心力衰竭发病风险,但未与其发病风险独立相关。但 Guerra LA 等^[17] 研究表明,ADRB1 389Arg 可能会给更高 β 受体阻滞剂剂量的心力衰竭患者带来更大生存效益。可见,选择性 β_1 -肾上腺素受体阻断作为一种重要的心血管治疗方法,可有效降低不良心血管后果的风险,且选择性 β_1 受体阻滞剂在高血压合并缺血性心脏病或心力衰竭的治疗中仍有强有力的证据基础^[18]。然而,药物相互作用、遗传变异和表观遗传修饰对肾上腺素能受体阐明与心血管疾病相关机制方面有很大影响。为进一步研究其影响机制,首先需要建立不同 ADRB1 基因多态性过表达的细胞模型。

本研究可选用细胞模型有乳鼠原代心肌细胞和心肌细胞株两种。乳鼠原代心肌细胞理论上能较好地表现心肌细胞的特点,更贴近实际,但其在实验过程中受诸多因素影响,因此导致可重复性不高。H9C2 心肌细胞株是一种源于 BD1X 大鼠胚胎心肌组织的亚克隆细胞系,具有同原代心肌细胞类似的电生理、信号转导方面的特点,且特征稳定,更易于传代培养。鉴于此,

H9C2 心肌细胞模型可操作性较高。

H9C2 心肌细胞株已广泛用于各种心血管病的研究^[19-20]。由于直接将目的基因转入细胞株,并进行点突变难度较高。本研究构建了基于 H9C2 心肌细胞株的 ADRB1 基因多态性过表达模型。该模型可用于研究不同单核苷酸多态性(SNP)的 ADRB1 过表达在心血管疾病中的作用。

为了构建本研究所需模型,面临选择基因载体和筛选稳转细胞株两个难题。后续的功能学实验和药理学实验需要建立稳定转染模型才能较好地满足实验要求。质粒、腺病毒等常用基因载体只能获得瞬时转染,均无法作为本研究的基因载体。本研究选择的慢病毒,是广泛采用的基因稳转载体,目的基因进入宿主细胞后经过反转录整合到宿主染色体上,得到持久表达。本研究选用 QPCR 方法进行稳转株的筛选可以避免抗性筛选的干扰。

综上所述,本研究成功构建了基于 H9C2 心肌细胞株的 ADRB1 基因单个核苷酸稳定过表达的细胞模型,为进一步研究 ADRB1 基因多态性与 β 受体阻滞剂的机制以及信号转导通路奠定了实验基础。

参考文献:

- [1] Mabhidha SE, Mashatola L, Kaur M, et al. Hypertension in african populations: review and computational insights[J]. *Genes (Basel)*, 2021, 12(4):532.
- [2] Members WG, Mozaffarian D, Benjamin E, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics-2016 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2016, 133(4):447-454.
- [3] Gao QN, Xu L, Cai J. New drug targets for hypertension: A literature review[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2021, 1867(3):166037.
- [4] Potnuri AG, Allakonda L, Appavoo A, et al. Association of histamine with hypertension-induced cardiac remodeling and reduction of hypertrophy with the histamine-2-receptor antagonist famotidine compared with the beta-blocker metoprolol[J]. *Hypertens Res*, 2018, 41(12):1023-1035.
- [5] Simicevic L, Milicic B, Josipovic J, et al. FREQUENCY OF AGT, ACE, AGTR1, ADRB1, UMOD AND ADIPOQ GENETIC POLYMORPHISM IN PREHYPERTENSION[J]. *Journal of Hypertension*, 2019, 37:e214.
- [6] 臧童童, 沈雳. 基因多态性与心力衰竭发生和发展的研究进展[J]. *心血管病学进展*, 2021, 42(6):516-520.
- [7] Chen LP, Xiao T, Chen LL, et al. The Association of ADRB1 and CYP2D6 polymorphisms with antihypertensive effects and analysis of their contribution to hypertension risk[J]. *Am J Med Sci*, 2018, 355(3):235-239.

(下转第 194 页)

- through the modulation of mitochondrial function and intracellular Ca^{2+} signaling. [J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11:3.
- [10] Dadsena S, King LE, García-sáez AJ. Apoptosis regulation at the mitochondria membrane level [J]. *Biochim Biophys Acta Biomemb*, 2021, 1863(12):183716.
- [11] Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS [J]. *Nature*, 2014, 515 (7527): 431-435.
- [12] Jawhar A, Ponelies N, Schild L. Effect of limited ischemia time on the amount and function of mitochondria within human skeletal muscle cells [J]. *Eur J Trauma Emerg Surg*, 2016, 42(6):767-773.
- [13] Yen JH, Huang HS, Chuang CJ, et al. Activation of dynamin-related protein 1-dependent mitochondria fragmentation and suppression of osteosarcoma by cryptotanshinone [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1):42.
- [14] Duan CY, Kuang L, Xiang XM, et al. Drp1 regulates mitochondrial dysfunction and dysregulated metabolism in ischemic injury via Clec16a-, BAX-, and GSH- pathways [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(4):251.
- [15] Zhou K, Yang HY, Tang RY, et al. Mitochondrial division inhibitor 1 protects cortical neurons from excitotoxicity: a mechanistic pathway [J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(9):1552-1560.
- [16] Tian L, Neuber-Hess M, Mewburn J, et al. Ischemia-induced Drp1 and Fis1-mediated mitochondrial fission and right ventricular dysfunction in pulmonary hypertension [J]. *J Mol Med(Berl)*, 2017, 95(4):381-393.
- [17] Wu Q, Luo CL, Tao LY. Dynamin-related protein 1 (Drp1) mediating mitophagy contributes to the pathophysiology of nervous system diseases and brain injury [J]. *Histol Histopathol*, 2017, 32(6):551-559.
- [18] Barsoum MJ, Yuan H, Gerencser AA, et al. Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPase in neurons [J]. *EMBO J*, 2006, 25 (16): 3900-3911.
- [19] Liu J, Du Q, Zhu H, et al. Dexmedetomidine reduces hypoxia/reoxygenation injury by regulating mitochondrial fission in rat hippocampal neurons [J]. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2017, 10: 6861-6868.
- [20] Yang JP, Guo L, Liu RC, et al. Neuroprotective effects of VEGF administration after focal cerebral ischemia/reperfusion: dose response and time window [J]. *Neurochem Int*, 2012, 60(6):592-596.
- [21] 黄清, 梁萍, 欧阳扬, 等. 神经血管单元多靶点抗缺血性脑卒中的相关靶标及通路研究 [J]. *右江民族医学院学报*, 2020, 42(2):167-174.

收稿日期:2021-12-01;修回日期:2021-12-30

(上接第 183 页)

- [8] Varakantham V, Kurakula Sailoo AK, Nagalla B, et al. mRNA expression profile in peripheral blood mononuclear cells based on ADRB1 Ser49Gly and Arg389Gly polymorphisms in essential hypertension - a case-control pilot investigation in South Indian population [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2018, 56(8):1230-1237.
- [9] Sun XJ, Zhou ML, Wen GY, et al. Paroxetine attenuates cardiac hypertrophy via blocking GRK2 and ADRB1 interaction in hypertension [J]. *J Am Heart Assoc*, 2021, 10 (1):e016364.
- [10] Oliveira-Paula GH, Pereira SC, Tanus-Santos JE, et al. Pharmacogenomics and Hypertension: Current Insights [J]. *Pharmacogenomics Pers Med*, 2019, 12:341-359.
- [11] Snyder EM, Kelley EF, Sprissler R, et al. The importance and challenges of developing a pharmacogenetics test for hypertension [J]. *Pharmacogenomics*, 2019, 20 (8):563-566.
- [12] Rysz J, Franczyk B, Rysz-Górzyńska M, et al. Pharmacogenomics of hypertension treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(13):4709.
- [13] Huang Y, Liu XL, Wen J, et al. Downregulation of the beta1 adrenergic receptor in the myocardium results in insensitivity to metoprolol and reduces blood pressure in spontaneously hypertensive rats [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(2):703-711.
- [14] Johnson JA, Zineh I, Puckett BJ, et al. Beta 1-adrenergic receptor polymorphisms and antihypertensive response to metoprolol [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2003, 74(1):44-52.
- [15] 窦晓涛. CYP2D6 及 ADRB1 基因多态性对美托洛尔代谢及疗效影响的 Meta 分析 [D]. 泸州:西南医科大学, 2020:1-68.
- [16] Kang S, Hong X, Ruan CW, et al. Effects of GRK5 and ADRB1 polymorphisms influence on systolic heart failure [J]. *J Transl Med*, 2015, 13:44.
- [17] Guerra LA, Lteif C, Arwood MJ, et al. Genetic polymorphisms in ADRB2 and ADRB1 are associated with differential survival in heart failure patients taking β -blockers [J]. *Pharmacogenomics J*, 2021, 22(1):62-68.
- [18] Pathak A, Mrabeti S. β -Blockade for patients with hypertension, ischemic heart disease or heart failure: where are we now? [J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2021, 17: 337-348.
- [19] 姚超. Wnt/ β -catenin 通路对 H9c2 心肌细胞缺血再灌注损伤作用的研究 [D]. 合肥:安徽医科大学, 2020:1-47.
- [20] 唐刚. Klotho 蛋白抑制异丙肾上腺素诱导的 H9C2 心肌细胞肥大的机制研究 [D]. 重庆:陆军军医大学, 2018:1-117.

收稿日期:2021-12-17;修回日期:2021-12-26