

# 大鼠CB1基因真核表达载体的构建及初步鉴定<sup>△</sup>

刘佳<sup>1\*</sup>,李晶<sup>2</sup>,严磊<sup>3</sup>,赵婷婷<sup>3</sup>,王慧娟<sup>3</sup>,赖国旗<sup>3</sup>,龙明<sup>2#</sup>(1.重庆三峡中心医院药学部,重庆 404000; 2.重庆三峡医药高等专科学校第一附属医院神经外科,重庆 404120; 3.重庆医科大学实验动物中心,重庆 400016)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)16-2184-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.16.08

**摘要** 目的:构建大鼠I型大麻素受体(CB1)真核基因表达载体,并检测其在细胞中的表达情况。方法:从大鼠海马组织中提取总RNA,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)扩增出CB1基因片段,产物连接到pMD18-T载体上。阳性实验筛选出阳性克隆,经EcoR I、BamH I双酶切及测序鉴定后,将其连接到载体pcDNA 3.1(+)中,构建质粒载体pcDNA3.1(+)-CB1,脂质体转染原代人胚肾293细胞(HEK293细胞)。用Western blot实验鉴定细胞中CB1蛋白的表达,用免疫荧光细胞染色联合激光扫描共聚焦法检测其在细胞中表达的部位。结果:采用RT-PCR成功获得大鼠CB1基因,PCR扩增得到1 500 bp左右的CB1基因片段,双酶切鉴定及DNA测序证实质粒载体pcDNA3.1(+)-CB1构建成功。Western blot实验、免疫荧光细胞染色联合激光扫描共聚焦法证实载体pcDNA3.1(+)-CB1能在HEK293细胞中表达,且表达产物主要分布在细胞膜表面和细胞质中。结论:构建的pcDNA3.1(+)-CB1表达载体能成功转入真核HEK293细胞,并在细胞膜表面和细胞质中表达CB1蛋白。

**关键词** I型大麻素受体;逆转录-聚合酶链反应;质粒载体

## Construction and Preliminary Identification of the Eukaryotic Expression Vector of CB1 Gene in Rats

LIU Jia<sup>1</sup>, LI Jing<sup>2</sup>, YAN Lei<sup>3</sup>, ZHAO Ting-ting<sup>3</sup>, WANG Hui-juan<sup>3</sup>, LAI Guo-qi<sup>3</sup>, LONG Ming<sup>2</sup>(1.Dept. of Pharmacy, Chongqing Three Gorges Central Hospital, Chongqing 404000, China; 2.Dept. of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China; 3.Laboratory Animal Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To construct the eukaryotic expression vector of cannabinoid receptor 1 (CB1) in rats and test its expression in cells. METHODS: The total RNA was extracted from the hippocampus tissues in rats, and subjected to reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) to produce CB1 gene segments by amplification. The product was connected to pMD18-T, and after identified by double enzyme digestion with EcoR I and BamH I and sequencing following the screening by the positive test, it was cloned in the carrier pcDNA 3.1(+) to construct plasmid carrier pcDNA3.1(+)-CB1 which was transfected into HEK293 cells (primary human embryo kidney 293 cells) by liposome. Western blot was adopted to determine the protein expression of CB1 in the cells. Immunofluorescent cytochemical staining combined with confocal laser scanning was employed to determine the position of CB1 protein in the transfected cells. RESULTS: CB1 was successfully obtained in the RT-PCR. About 1 500 bp CB1 segments were produced by amplification in the PCR. The plasmid vector pcDNA3.1(+)-CB1, after the determination by double enzyme digestion and DNA sequencing, was confirmed to be successfully constructed. According to the identification by western blot and immunofluorescent cytochemical staining combined with confocal laser scanning, the carrier pcDNA 3.1(+)-CB1 can be expressed in HEK293 cells, and the expression products were mainly distributed in the cell membrane surface and matrix. CONCLUSIONS: CB1 protein can be expressed on the surface of the membrane and in the cytosol of HEK293 cells into which recombinant plasmid pcDNA3.1(+)-CB1 is transfected.

**KEYWORDS** Cannabinoid receptor 1; Reverse transcription polymerase chain reaction; Plasmid carrier

大麻素是从印度大麻(Cannabis sativa)里发现的一组萜酚类化合物,通过与大麻素受体(Cannabinoid receptor, CB)作用而发挥生物作用。大麻素受体主要存在于哺乳动物神经和免疫系统中<sup>[1]</sup>,现今已发现两个亚型: I型CB(CB1)和II型CB

(CB2)。CB1主要分布于脑、脊髓与外周神经系统,故又称为中枢型CB,而脑内的CB1主要分布于基底神经节(包括黑质、苍白球和外侧纹状体)、海马癌症(CA)锥体细胞层、小脑和大脑皮质<sup>[2]</sup>。通过激活CB1可以调节多种神经递质的释放,如多

2010, 75(2): 173.

△ 基金项目:重庆市基础与前沿研究计划项目(No.cstc2014jcyjA10049);重庆市卫生局医学科研项目(No.2012-1-096);重庆市高等学校青年骨干教师资助计划

\* 学士。研究方向:药房管理、药学研究。E-mail:6772868@qq.com

# 通信作者:主任医师。研究方向:神经外科。E-mail:mybestdorothy@hotmail.com

[9] 张鑫.雷公藤制剂毒副作用及减毒方法研究进展[J].中国药学杂志,2013,48(22):1 897.

[10] 熊璐琪.糖尿病大鼠皮肤的组织学改变对不同脂溶性的地塞米松经皮渗透与吸收的影响[D].广州:南方医科大学,2011.

(收稿日期:2015-02-05 修回日期:2015-03-05)

(编辑:张静)

巴胺和 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)等,这一作用参与了记忆、认知和运动等活动的控制<sup>[9]</sup>。

目前,随着CB及其作用逐渐被人们所熟知,大麻素类药物的研发在世界范围内也成为了一个热点。基于人类与小鼠的CB蛋白的氨基酸序列存在极高的同源性(98%),笔者拟建立能在哺乳动物细胞中稳定表达的鼠源CB1基因真核表达载体,为进一步研究大麻素类药物作用的药理机制和大麻素类新药筛选提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Centrifuge 5804R 高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);S1000 聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Bio-Rad公司);FV1200 激光扫描共聚焦显微镜(日本Olympus公司)。

### 1.2 试剂

总RNA提取试剂盒(美国Promega公司,批号:Z3100);逆转录(RT)-PCR试剂盒、T载体连接试剂盒、T4DNA连接酶试剂盒、DL2000 DNA Marker、DL5000 DNA Marker、DL1000 DNA Marker、Taq DNA 多聚酶、凝胶回收试剂盒(日本Takara公司,批号分别为:DDR024A、D101A、D2011A、YY10745、I111042、D526A、CK1201CA、D2500-01);限制性内切酶EcoR I、BamH I(美国NEB公司);质粒提取试剂盒(德国Qiagen公司,批号:12143);Lipofectamine™2000 转染试剂(美国Invitrogen公司);CB1抗体(北京博研科创生物技术公司);HRP(辣根过氧化物酶)标记的羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)(北京中杉金桥生物技术有限公司);荧光标记的羊抗兔IgG(美国Abbkine公司);抗荧光淬灭封片液(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P0126);pcDNA3.1(+)真核表达载体由重庆医科大学实验动物中心实验室提供。

### 1.3 细胞、菌株与动物

清洁级SD大鼠[♀,体质量(200±50)g,生产许可证号:SCXK(渝)20020001],DH5 $\alpha$ 感受态细菌及原代人胚肾细胞(HEK293细胞)均由重庆医科大学实验动物中心实验室提供。

### 1.4 引物设计

根据Gen Bank数据库中大鼠CB1基因NM\_012784.4序列设计引物。上游引物:5'-CGGGATCCGCCACCATGAAGTCGATCCTAGATG-3',下游引物:5'-GGAATTCCTTTTCTGTGCAGC CACAA-3',并在上游引物的5'端加上EcoR I酶切位点、下游引物的5'端加上BamH I酶切位点。引物由上海Invitrogen公司合成。

## 2 方法

### 2.1 SD大鼠脑组织cDNA文库构建

按总RNA提取试剂盒说明书操作,提取1日龄SD大鼠海马组织总RNA,按RT-PCR试剂盒说明书,逆转录为SD大鼠脑组织cDNA文库。总RNA于-80℃保存,cDNA于-20℃保存。

### 2.2 PCR扩增及产物纯化

以SD大鼠脑组织cDNA为模板,PCR扩增CB1基因。反应体系:5×PrimeScript™缓冲液4  $\mu$ l,PrimeScript™TMRT Enzyme Mix 1 逆转录酶1  $\mu$ l,Oligo dT Primer引物(50  $\mu$ mol/L)1  $\mu$ l,Random 6 mers引物(100  $\mu$ mol/L)1  $\mu$ l,总RNA 13  $\mu$ l,总反应体积为20  $\mu$ l。反应条件:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,56℃退火30 s,74℃延伸45 s,循环30次;74℃延伸7 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳后,按凝胶回收试剂盒说明书进行回收、纯化。

### 2.3 PCR产物克隆及鉴定

PCR回收纯化产物按T载体连接试剂盒说明书连接到pMD-18T载体上,16℃过夜,连接产物转化DH5 $\alpha$ 感受态细菌。用含5-溴-4-氯-3-吡啶- $\beta$ -D-半乳糖苷(X-gal)、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)和一磷酸腺苷(AMP)的LB板筛选阳性克隆。挑取阳性克隆于LB液体培养基中,摇菌过夜,按质粒提取试剂盒说明书提取质粒,酶切鉴定后,送上海Invitrogen公司测序。

### 2.4 pcDNA3.1(+)-CB1真核表达载体构建及鉴定

用限制性内切酶EcoR I、BamH I双酶切质粒pMD-18T-CB1和pcDNA3.1(+),酶切产物经电泳后,按凝胶回收试剂盒说明书进行回收、纯化。按T4DNA连接酶试剂盒将含CB1基因片段的回收纯化产物连接到pcDNA3.1(+)酶切片段上,构建质粒pcDNA3.1(+)-CB1载体,产物转化DH5 $\alpha$ 感受态细菌,用含Amp的LB平板筛选阳性克隆于含Amp的LB液体培养基中,摇菌过夜。菌液按质粒提取试剂盒说明书提取质粒,经酶切鉴定后,送上海Invitrogen公司测序。

### 2.5 pcDNA3.1(+)-CB1转染HEK293细胞

将HEK293细胞接种于35 mm含10%胎牛血清RPMI 1640培养基的培养皿中,37℃、5% CO<sub>2</sub>环境下培养,待细胞的汇合率在50%~70%时,按Lipofectamine™2000转染说明书操作转染HEK293细胞。以转染后细胞为实验组,未转染的细胞为空白对照组。

### 2.6 CB1基因在HEK293细胞的表达

采用Western blot法。取转染48 h后的HEK293细胞,裂解,提取蛋白。蛋白样品在100℃变性10 min,取5  $\mu$ l变性后蛋白上样,10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后转膜,在含5%脱脂牛奶的TBST缓冲液中封闭2 h后,与兔源Anti-CB1抗体(1:300)于4℃孵育过夜,与HRP标记的羊抗兔IgG室温孵育2 h,化学发光检测CB1基因在HEK293细胞的表达。本实验以GAPDH为内参。

### 2.7 CB1表达蛋白在HEK293细胞的分布

采用细胞免疫荧光激光扫描共聚焦法。取转染48 h后的细胞爬片,冰甲醇处理15 min,加3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理20 min,5%胎牛血清封片处理1 h,兔源Anti-CB1抗体(1:100)4℃孵育过夜,与荧光标记的羊抗兔IgG(1:50)于37℃孵育2 h,以4,6-二脒基-2-苯基吡啶二盐酸盐(DAPI)染色5 min,抗荧光淬灭剂封片,激光扫描,检测CB1表达蛋白在HEK293细胞的分布情况。

## 3 结果

### 3.1 PCR扩增结果

PCR扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示条带大小在1500 bp左右,与预期结果一致。基因测序结果与Gen Bank中公布的大鼠CB1基因NM\_012784.4序列一致。

### 3.2 PCR产物克隆及鉴定结果

用EcoR I、BamH I双酶切pMD-18T-CB1重组质粒,切出约1600 bp左右的CB1片段带和约3000 bp左右载体带2个片段,条带大小与预期一致,双酶切鉴定结果见图1。

### 3.3 pcDNA3.1(+)-CB1真核表达载体的构建及鉴定结果

用EcoR I、BamH I双酶切pcDNA3.1(+)质粒,获得约5400 bp左右的载体带(见图2)。用EcoR I、BamH I双酶切pcDNA 3.1(+)-CB1重组质粒,切出约1600 bp左右的CB1片段带和约5400 bp左右的载体带(见图3)。2个表达质粒的测序与设计完全一致,且读码框也与预期一致。

### 3.4 Western blot实验结果

pcDNA3.1(+)-CB1转染HEK293细胞48 h后,提取细胞

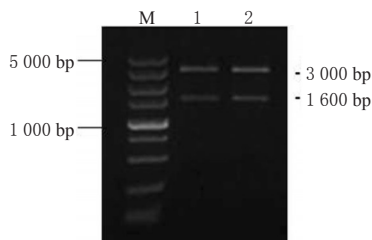


图1 pMD-18T-CB1 双酶切鉴定结果

M. DL5000 DNA Marker; 1, 2. pMD-18T-CB1 BamH I、EcoR I 双酶切产物

Fig 1 Results of determination by double enzyme digestion for pMD-18T-CB1

M. DL5000 DNA Marker; 1, 2. the products of pMD-18T-CB1 by double enzyme digestion with BamH I and EcoR I

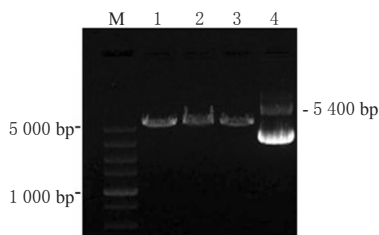


图2 pcDNA3.1(+) 双酶切结果

M. DL5000 DNA Marker; 1. pcDNA3.1(+) BamH I、EcoR I 双酶切产物; 2. pcDNA3.1(+) EcoR I 酶切产物; 3. pcDNA3.1(+) BamH I 酶切产物; 4. pcDNA3.1(+) 质粒

Fig 2 Results of determination by double enzyme digestion for pcDNA3.1(+)

M. DL5000 DNA Marker; 1. the products of pcDNA3.1(+) by double enzyme digestion with BamH I and EcoR I; 2. the products of pcDNA3.1(+) by EcoR I enzyme digestion; 3. the products of pcDNA3.1(+) by BamH I enzyme digestion; 4. plasmid of pcDNA3.1(+)

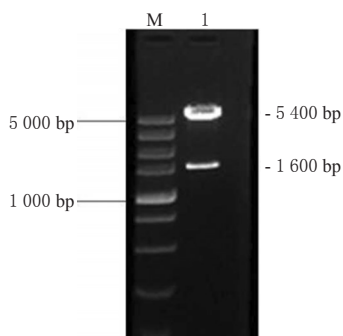


图3 pcDNA3.1(+)-CB1 双酶切鉴定结果

M. DL5000 DNA Marker; 1. pcDNA3.1(+)-CB1 BamH I、EcoR I 双酶切产物

Fig 3 The results of determination by double enzyme digestion for pcDNA3.1(+)-CB1

M. DL5000 DNA Marker; 1. the products of pcDNA3.1(+)-CB1 by double enzyme digestion with BamH I and EcoR I

总蛋白, Western blot 检测 CB1 蛋白的表达。实验组细胞在 50 kD 处明显出现 1 条蛋白带, 而对照组细胞无, 结果见图 4。与预期蛋白条带位置吻合, 说明质粒转染 HEK293 成功, 而未转染组细胞则无条带, 实验结果与预期一致。

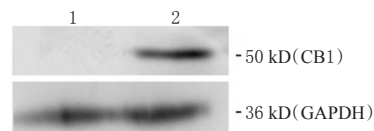


图4 CB1 western blot 结果

1. 空白对照组; 2. 实验组

Fig 4 Results of determination by western blot for CB1

1. blank control group; 2. experience group

### 3.5 细胞免疫荧光激光扫描共聚焦结果

用脂质体将重组质粒 pcDNA3.1(+)-CB1 转染 HEK293 细胞 48 h 后, 利用细胞免疫荧光联合激光扫描共聚焦仪, 在 549 nm 波段进行扫描。结果显示, 所构建的 pcDNA3.1(+)-CB1 载体表达蛋白在 HEK293 细胞质与细胞膜上均有分布, 表达效率约 60%, 实验结果达到预期设计目标, 结果见图 5。

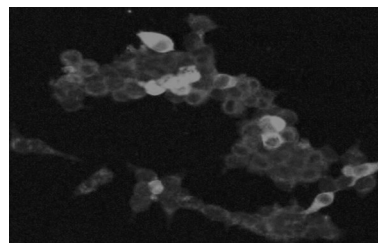


图5 pcDNA3.1(+)-CB1 转染 HEK293 细胞免疫荧光联合激光扫描共聚焦结果

Fig 5 Results of detection by immunofluorescent cytochemical staining combined with confocal laser scanning for HEK293 cells subjected to pcDNA3.1(+)-CB1 transfection

## 4 讨论

20 世纪 90 年代初, 人类分别克隆了 CB1 和 CB2, 并对其结构进行研究发现, CB1 由 473 个氨基酸、7 个跨膜结构域构成, CB2 受体蛋白由 360 个氨基酸、7 个跨膜结构域构成, 两者均属于 G 蛋白偶联受体。CB1 主要来源于神经细胞, CB2 主要来源于免疫细胞, CB1 和 CB2 与配体结合能力非常相似, 几乎能与所有大麻素类物质结合, 均能调节化学递质的释放。本试验首先分离、提取, 然后扩增大鼠 CB1 基因。T 载体连接过程中由于 T 载体两端也带有酶切位点, 双酶切时会从 T 载体上切出 T 载体上的部分片段, 所以双酶切后目的片段比原扩增片段大, 片段长度在 1 600 bp 左右。在此基础上, 对 CB1 基因和 pcDNA3.1(+)-CB1 双酶切片段进行连接, 构建 pcDNA3.1(+)-CB1 真核表达载体。

大麻素成分主要为  $\Delta^9$ -四氢大麻酚<sup>[4]</sup>, 近几年的研究发现, 大麻素对神经系统疾病、镇痛、精神性疾病、心血管疾病、胃肠道系统等具有治疗或调节作用<sup>[5-6]</sup>。研究还发现, 大麻素在发挥镇痛作用时中枢系统内 CB 介导镇痛作用的主要部位为中脑导水管周围灰质 (Periaqueductal gray, PAG)。在大鼠 PAG 中, 大麻素类药物通过与 CB1 作用来抑制突触前 GABA 和谷氨酸神经递质的转运。CB1 蛋白与  $\text{Ca}^{2+}$  依赖型离子通道偶联, 活化 CB1 使突触前神经递质释放减少, 调节突触后膜产生兴奋性或抑制性作用<sup>[7]</sup>。以大麻素为母环进行衍生化、结构优化获得镇痛类药物也是目前新型镇痛药物研发的一个方向。这些研究结果为大麻素类新药研发提供了实验基础。探讨 CB1 的生物学活性及药物与其作用机制对辅助研发治疗多种疾病的

# 合成罗哌卡因中间体S型N-(2,6-二甲苯基)-2-哌啶甲酰胺拆分工艺改进

严波<sup>1\*</sup>, 符义刚<sup>1</sup>, 李莉娥<sup>1,2</sup> (1.宜昌人福药业有限责任公司, 湖北宜昌 443005; 2.人福医药集团医药研究院, 武汉 430074)

中图分类号 R914.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)13-2187-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.16.09

**摘要** 目的:探讨合成罗哌卡因的关键中间体S型N-(2,6-二甲苯基)-2-哌啶甲酰胺(Pipecoloxylidide)的拆分和消旋新方法,以提高S型Pipecoloxylidide收率。方法:新工艺将拆分后从母液里回收的R型和S型Pipecoloxylidide混合物与偶氮二异丁腈(引发剂)、巯基乙酸乙酯在惰性溶剂甲苯中混合,于80℃进行消旋反应,并再次拆分得到S型Pipecoloxylidide以循环利用。结果:S型Pipecoloxylidide的收率由原工艺的30%左右提高到60%左右,经过拆分后的光学纯度值可达100%。结论:改进后的工艺能耗低(反应温度由原工艺的130℃以上降为80℃),条件温和,减少了副反应发生,工艺操作简单,能有效提高产品收率和纯度。

**关键词** 罗哌卡因;S型Pipecoloxylidide;合成;拆分;工艺改进;消旋反应

## Process Improvement for the Separation of Intermediates S-type of N-(2,6-Dimethylphenyl) Piperidine-2-Carboxylic Amide in the Synthesis of Ropivacaine

YAN Bo<sup>1</sup>, FU Yi-gang<sup>1</sup>, LI Li-e<sup>1,2</sup> (1.Yichang Humanwell Pharmaceutical Co., Ltd., Hubei Yichang 443005, China; 2.Institute of Medicine, Humanwell Healthcare Group, Wuhan 430074, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To explore the new method for the separation and racemization of the key intermediates S-type of N-(2,6-dimethylphenyl) piperidine-2-carboxylic amide (S-type of pipecoloxylidide) in the synthesis of ropivacaine to improve the yield of S-type of pipecoloxylidide. METHODS: New process was used to mix the mixture of R-type and S-type of pipecoloxylidide recycled from mother liquor and azobisisobutyronitrile (initiator) and mercaptoacetic ethyl in inert solvent toluene, racemized at 80℃ and separated the S-type of pipecoloxylidide again for recycle. RESULTS: The yield of S-type of pipecoloxylidide was improved from around 30% to around 60% and the optical purity value was reached 100%. CONCLUSIONS: The improved process has low energy consumption (the reaction temperature was decreased from over 130℃ to 80℃), mild conditions and simple operations. It reduces the incidence of side effects and effectively improves the yield and purity.

**KEYWORDS** Ropivacaine; S-type of pipecoloxylidide; Synthesis; Separation; Process improvement; Racemization reaction

新药具有重要的意义。

综上,本研究构建了大鼠CB1基因真核表达载体,以Western blot法验证了其在HEK293细胞中目的蛋白的表达,以细胞免疫荧光联合激光扫描共聚焦证明了目的蛋白在细胞膜表面及细胞质中的表达分布。不足之处在于未能对CB1构建的真核细胞进行功能学方面的研究,有待后续实验验证。

### 参考文献

- [1] Ligresti A, Villano R, Allarà M, et al. Kavalactones and the endocannabinoid system: the plant-derived yangonin is a novel CB-receptor ligand[J]. *Pharmacol Res*, 2012, 66(2):163.
- [2] Katona I. Endocannabinoid receptors: CNS localization of the CB1 cannabinoid receptor[J]. *Curr Top Behav Neurosci*, 2009, 1:65.
- [3] Ramot A, Akirav I. Cannabinoid receptors activation and glucocorticoid receptors deactivation in the amygdala pre-

vent the stress-induced enhancement of a negative learning experience[J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2012, 97(4):39.

- [4] 郭宇姝,冯建林,刘勤,等. GC-MS法测定大麻中 $\Delta^9$ -四氢大麻酚的含量[J]. *中国药房*, 2008, 19(3):201.
- [5] Di Marzo V, Stella N, Zimmer A. Endocannabinoid signalling and the deteriorating brain[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2015, 16(1):30.
- [6] Schneider P, Hannusch C. Adolescent peer-rejection persistently alters pain perception and CB1 receptor expression in female rats[J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2013, 24(2):290.
- [7] Yogeewari P, Sharma M, Samala G, et al. Discovery of novel tetrahydro-pyrazolo [4, 3-c] pyridines for the treatment of neuropathic pain: synthesis and neuropharmacology[J]. *Eur J Med Chem*, 2013, 66:211.

\*工程师, 硕士。研究方向: 新药研发。电话: 0717-6344886。E-mail: yanbo@renfu.com.cn

(收稿日期: 2015-02-03 修回日期: 2015-03-18)

(编辑: 邹丽娟)