

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.07.006

稳定表达大鼠 GCLC 启动子及荧光素酶报告基因 细胞株的建立*

黄楚琴 周问渠 蔡磊 洪玮 付欣 李冰[△]

(广州医科大学实验医学研究中心 广东 广州 510182)

摘要 目的:建立稳定表达大鼠谷氨酰半胱氨酸合成酶催化亚单位(GCLC)启动子及荧光素酶报告基因的大鼠肺泡上皮细胞株。**方法:**克隆大鼠 GCLC 上游 5.9kb 的启动子序列并构建重组报道载体 PGL4.19-GCLC-LUC, 转染到大鼠 II 型肺泡上皮细胞 L2, 经 G418 筛选以获得单细胞抗性克隆并在传代过程中能稳定表达荧光素酶活性;检测细胞荧光素酶表达与细胞数量相关性;PCR 检测稳定细胞株基因组已整合的插入片段;刺激因子刺激 6h, 检测稳定细胞株的反应性。**结果:**成功构建 PGL4.19-GCLC-LUC;构建的稳定细胞株能稳定地表达荧光素酶, 且与细胞数量正相关;PCR 检测稳定细胞株目的片段稳定整合基因组;TNF- α 刺激后, 能使荧光素酶活性上升, 差异有统计学意义($P<0.05$);Rapamycin, GSH-EE 刺激后, 荧光素酶活性显著下降($P<0.05$)。**结论:**成功构建稳定表达大鼠 GCLC 启动子及荧光素酶报告基因的细胞株, 将为高通量药物筛选以及进一步研究 GCLC 基因的转录调控提供重要的细胞研究手段。

关键词:谷氨酰半胱氨酸合成酶催化亚单位(GCLC);启动子;荧光素酶报告基因;稳定细胞株

中图分类号:Q95-3, Q78, R322.35 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)07-1225-04

Establishment of Rat Lung Alveolar Epithelial Cell Lines Stably Expressing of GCLC Promoter and Luciferase Reporter Gene*

HUANG Chu-qin, ZHOU Wen-qu, CAI Lei, HONG Wei, FU Xin, LI Bing[△]

(Experimental Medical Research Center, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510182, China)

ABSTRACT Objective: To construct a rat type II alveolar epithelial cells L2 with stable expression of GCLC promoter and luciferase reporter gene. **Methods:** The luciferase reporter vector PGL4.19 including rat GCLC 5.9 kb proximal regulatory sequence was constructed. Then the GCLC-LUC plasmid was transferred into L2 cells, and the GCLC-LUC cell clones were obtained by screening with G418. The positive clones stably expressing firefly luciferase were identified by detecting the luciferase activity. The stable GCLC-LUC cells were stimulated by various factors for 6h, and then detected the luciferase activity. **Results:** The GCLC-LUC plasmid was successfully constructed, and the L2 cell with stable expression of luciferase was successfully established. The luciferase activity increased significantly after treating with TNF- α ($P<0.05$), and decreased after treating with Rapamycin, GSH-EE ($P<0.05$). **Conclusion:** The L2 cells with stable expression of luciferase may be a good method for drug screening in further reeach.

Key words: GCLC (Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit); Promoter; Luciferase reporter gene; Stable cell line

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, Q78, R322.35 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)07-1225-04

前言

氧化应激(Oxidative Stress)是指机体受到有害刺激时,活性氧的生成速率大于清除速率,形成氧化和抗氧化的失衡,并引起一系列生物反应的过程。在生物体中,肺部是最容易受到氧化应激的器官之一^[1],长期吸入香烟烟雾以及一些有害气体会造成氧化损伤^[2]。谷胱甘肽(GSH, glutathione)是肺内重要的抗氧化剂和自由基清除剂,在正常氧化还原状态的维持中扮演着重要角色^[3-4],而 γ -谷氨酰半胱氨酸的形成,是体内生物合成 GSH 的关键步骤之一,主要由限速酶谷氨酰半胱氨酸连接酶

(GCL, Glutamate cysteine ligase)催化, GCL 由催化亚基(GCLC)及调节亚基(GCLM)组成,其中, GCLC 是合成 GSH 的首要的限速步骤^[5-6]。对 GCLC 表达调控机制的研究,有助于了解生物体 GSH 表达水平变化的机制,对进一步阐明机体抗氧化失衡的机制有重要意义。目前,荧光素酶报告基因分析系统广泛应用于基因的转录调控研究,其检测快速、简便、灵敏度高、实验数据可靠而且重复性好^[7]。由于启动子在基因的表达中起着极其重要的调控作用,因此,本实验通过克隆大鼠 GCLC 基因上游 5892bp 的调控序列,构建稳定表达大鼠 GCLC 基因启动子及荧光素酶的细胞株,以进一步探讨大鼠 GCLC 基因的表达调

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30971166)

作者简介:黄楚琴(1987-),女,硕士研究生,主要从事分子生物学方面的研究, E-mail: hcq396@163.com

[△] 通讯作者:李冰(1963-),男,博士生导师,教授,研究方向:基因的表达调控, E-mail: libing@gzhmc.edu.cn

(收稿日期:2013-07-05 接受日期:2013-07-28)

控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

PCR 试剂购自 TOYOBO 公司;限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司;质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司;双荧光素酶活性分析试剂盒购自 Promega 公司;PCR 引物和 LipofectamineTM2000 购自 Invitrogen 公司;G418 购自 Merck 公司;GSH-EE、Rapamycin、TPA、TNF- α 、Nicotine 购自 Sigma 公司;胎牛血清购自 Hyclone 公司;F12K 培养基购自杭州吉诺公司;大鼠 II 型肺泡上皮细胞 L2、PGL4.19 载体由广州医学院实验医学研究中心提供。

1.2 大鼠 GCLC 基因上游调控序列的克隆与荧光素酶报道载体的构建

设计上游引物 5'-ATTGTCGACGGAGCAGTGGCCACAGGCCCTC-3' 和下游引物 5'-ATTAAGCTTCGCCGCGTCCTCCTCTGGCC-3',从大鼠肝脏组织提取基因组 DNA 为模板,进行 PCR 反应,扩增大鼠 GCLC 基因上游 5892bp 的调控序列基因。PCR 条件为 94℃ 预变性 2 min,经 98℃ 10 s、68~61℃ 30 s (每个循环依次降 1℃),7 个循环后,再 98℃ 10 s、61℃ 30 s、68℃ 6 min 30 个循环后,68℃ 延伸 10 min。经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物,胶回收 PCR 产物后,用 *Sal*I 单酶切,再用 *Hind*III 酶切,再连接到经 *Xho*I/ *Hind*III 双酶切的 pGL4.19 线性化载体上,转化 TOP 10 感受态细胞,挑选阳性重组克隆经 *Hind*III/ *Xho*I 双酶切鉴定正确后,送公司测序。

1.3 GCLC-LUC 稳定克隆细胞的筛选及建立

L2 细胞在含有 10% 的胎牛血清的 F12K 培养基,在 37℃, 5%CO₂,饱和湿度的细胞培养箱内培养。于转染前一天,以 6×10^5 个细胞 / 孔接种于 6 孔板培养,待细胞汇合度达 80~90%,按照 Lipofectamine2000 操作说明转染 PGL4.19-GCLC-LUC。于转染 24 h 后用 0.25% 的胰酶消化细胞,按 5×10^3 个细胞 / 孔接种到 12 孔板,培养基中含 G418 浓度为 600 μ g/mL。每 2~3 天更换培养基并维持 G418 筛选直到单细胞抗性克隆出现。挑取单细胞克隆并扩大培养,每传几代检测一次荧光素酶活性以淘汰不能稳定表达荧光素酶的细胞克隆。传至 30 代,能稳定表达荧光素酶的克隆即为 GCLC-LUC 的稳定克隆细胞。

1.4 GCLC-LUC 稳定克隆细胞荧光素酶表达相关性检测

取已筛选的稳定克隆细胞,依次按细胞数 5×10^4 、 2.5×10^4 、 1.25×10^4 、 6.25×10^3 、 3.125×10^3 接种于 48 孔板,每个密度设三个复孔。置培养箱培养 24 小时后,用 PBS 洗细胞 2~3 次,吸净余液,加入 $1 \times$ Passive lysis buffer 65 μ L / 孔,在脱色摇床上摇动 15 min,按荧光素酶分析系统试剂盒说明书操作,检测各孔细胞荧光素酶活性。

1.5 GCLC 调控序列及荧光素酶编码基因的检测

稳定克隆细胞接种至 6 孔板,待细胞汇合度达 95% 以上,提取基因组 DNA。于 GCLC 上游调控序列设上游引物 5'-CTGGTCCTCGCCACTCGTC-3',于 luciferase 编码基因设计下游引物 5'-GGAGGGAAGCCGTGGCTGTT-3',进行 PCR,扩增含 GCLC 上游调控序列及荧光素酶编码基因的 6883bp 片段。反应条件为 94℃ 预变性 2 min 后,循环程序为 98℃ 10 s、

68~58℃ 30 s (每个循环依次下降 1℃),共 10 个循环,再 98℃ 10 s、58℃ 30 s、68℃ 7 min 28 个循环后再 68℃ 延伸 10 min。

1.6 刺激因子反应性检测

取生长对数期的 GCLC-LUC 稳定克隆细胞,按 5×10^4 个细胞 / 孔接种于 48 孔板培养,待细胞汇合度达 80% 以上,分别加入 GSH-EE (0.5 mg/mL), TPA (100 ng/mL), Nicotine (10 μ mol/L), TNF- α (100 ng/mL), Rapamycin (50 ng/mL), 各设三个复孔。加入刺激因子后,置培养箱继续培养 6 h 后,检测荧光素酶活性。

1.7 统计学处理

数据处理采用 SPSS16.0 统计软件进行分析,所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示有统计学差异, $P > 0.05$ 为尚不能认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 GCLC 基因上游调控序列克隆与 PGL4.19-GCLC-LUC 的构建符合预期

1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物大小与实验设计的 5892bp 片段一致,且特异性较好,经 *Hind*III / *Xho*I 双酶切鉴定重组载体后,预期产生长度为 9497bp 和 2147bp,鉴定结果亦符合预期(图 1)。测序结果用 NCBI 中的 BLAST 软件分析,结果插入序列与预期序列一致。这说明所克隆的序列已正确插入重组载体,成功构建 PGL4.19-GCLC-LUC 重组质粒。

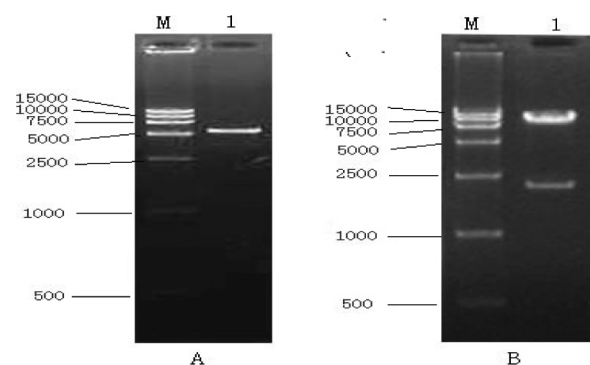


图 1 大鼠 GCLC 上游调控序列的扩增与 GCLC-LUC 重组载体的鉴定:A:扩增得到 GCLC 启动子区域;B: PGL4.19-GCLC-LUC 重组载体经 *Hind*III/ *Xho*I 双酶切鉴定

Fig.1 Amplification of 5' flanking region of rat GCLC and identification of PGL4.19-GCLC-LUC plasmid: A: The GCLC promoter region was amplified; B: The PGL4.19-GCLC-LUC recombinant plasmid was identified by *Hind*III/ *Xho*I digestion

2.2 GCLC-LUC 稳定克隆细胞株的成功建立

经过 600 μ g/mL 的 G418 维持筛选约两周后,长出了阳性单细胞克隆(图 2)。挑取了 12 个阳性克隆,传代培养并逐渐淘汰荧光素酶活性值较低的克隆,传至 30 代,保留了荧光素酶活性值最稳定的克隆。成功获得的稳定表达 GCLC 启动子及荧光素酶的细胞株,随着细胞数量的减少,所测得荧光素酶活性呈现出相关性减少, $R^2 = 0.9928$ (图 3)。提取该细胞基因组 DNA,进行 PCR 鉴定,能扩增出符合预期 6883bp 的条带(图 4)。这说明 GCLC 启动子及荧光素酶表达基因已稳定整合至 L2 细胞

的基因组,成功建立 GCLC-LUC 稳定细胞株。

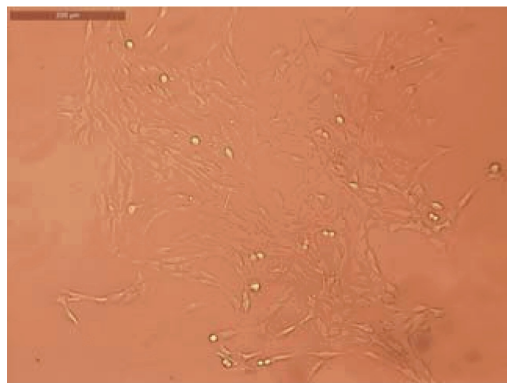


图2 GCLC-LUC 阳性细胞克隆

Fig.2 The GCLC-LUC cell clone

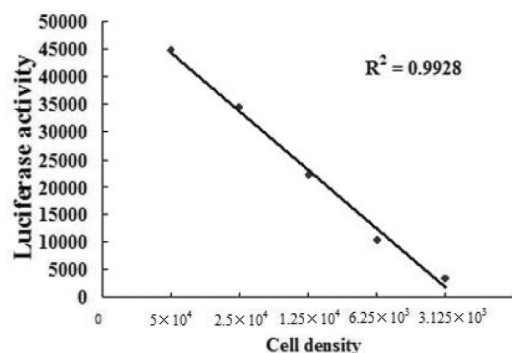


图3 不同数量 GCLC-LUC 阳性克隆细胞荧光素酶活性表达

Fig.3 The luciferase activity of different cell numbers

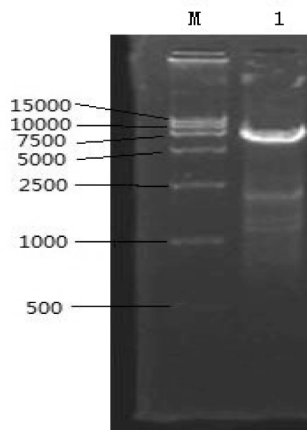


图4 GCLC-LUC 阳性克隆基因组 GCLC 启动子及荧光素酶基因的鉴定

Fig.4 Amplification of 5' flanking region of rat GCLC including luciferase's coding sequences

2.3 刺激因子反应性检测

在加入刺激因子 GSH-EE (0.5 mg/mL), TPA (100 ng/mL), Nicotine (10 μ mol/L), TNF- α (100 ng/mL), Rapamycin (50 ng/mL) 刺激 6 h 后,发现 TNF- α 能明显促进荧光素酶的表达,约为对照组的 2 倍 ($P < 0.05$) (图 5); GSH-EE、Rapamycin 能抑制降低荧光素酶的表达 ($P < 0.05$),而 TPA、Nicotine 为阴性反应 ($P > 0.05$)。

3 讨论

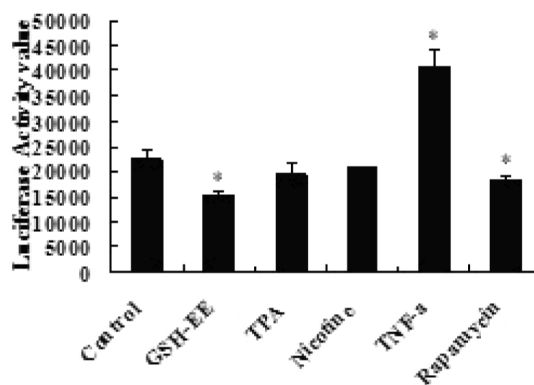


图5 GCLC-LUC 稳定细胞株对不同刺激因子的反应性

Fig.5 The luciferase activity of L2 GCLC-LUC stable cells after stimulations

注:数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, *:代表与对照组相比, $P < 0.05$ 。

Note: Values are means $\pm$ standard deviations for triplicates, *: $P < 0.05$ versus the control group.

氧化应激与肿瘤^[8]、呼吸系统^[9]、神经系统^[10]和心血管疾病^[11]等密切相关。生理条件下,机体细胞通过氧化还原信号等途径严密调控氧化还原状态,使其处于动态平衡,保证了细胞生命活动的正常进行^[12]。GSH 是体内重要的抗氧化、抗炎物质,对保护组织器官免受氧化损伤有重要作用。GCLC 具有 GCL 酶的催化活性,在合成 GSH 过程中起着至关重要的作用,因此,对 GCLC 表达调控的研究具有重要意义。利用荧光素酶报告系统研究启动子对下游基因的调控,可以最大限度地避免下游基因表达产物对启动子的反馈干扰,能真实地反映外部因素对调控序列的影响^[13]。本实验成功克隆大小为 5892bp 大鼠 GCLC 启动子序列,由于此调控序列较长,它能更准确客观地反映出大鼠 GCLC 基因的转录活性。

研究认为 GCLC 基因 5' 上游的抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)与转录因子 Nrf2 结合是促进 GCLC 基因表达的主要调控方式^[14,15],另外 AP-1 结合序列以及 NF- κ B 结合位点也是调节 GCLC 表达的重要元件^[16,17]。本实验发现 TNF- α 能明显促进荧光素酶的表达 ($P < 0.05$),即明显增强 GCLC 基因的转录活性。有研究表明 TNF- α 能与核转录因子 NF- κ B 的特异性抑制因子 I κ B 结合,促进 NF- κ B 入核,使之能与基因上游 NF- κ B 结合位点结合,通过调节基因启动子活性而对基因的转录进行调节^[18]。通过 Genomatix 元件分析软件分析发现,大鼠 GCLC 基因上游 6kb 的启动子存在多个 NF- κ B 结合位点。在本实验中, TNF- α 可能促使 NF- κ B 与 GCLC 启动子区域的 NF- κ B 结合位点而增强启动子活性,促进 GCLC 的转录,这与 Yang 等的实验结果是吻合的^[19]。GSH-EE 即还原型谷胱甘肽乙酯,具有细胞膜渗透性,能透过细胞膜进入细胞内。细胞内的氧化还原的稳态主要是通过谷胱甘肽自身的氧化还原反应进行抑制,即还原型谷胱甘肽 GSH 与氧化型谷胱甘肽 GSSG 的比值维持稳定^[20]。本实验结果,加入 GSH-EE 刺激后,荧光素酶的表达下降 ($P < 0.05$),即 GCLC 基因的转录活性下调。这可能是细胞内的一种反馈调节机制,细胞内存在过多的 GSH,可能会反馈抑制 GCLC 的转录,从而维持细胞内氧化还原稳态。Rapamycin 是一类新型大环内酯类免疫抑制剂,实验

中发现 Rapamycin 使 GCLC 转录下调, 可能与 mTOR 信号通路受抑制、炎症信号的降低有关。

本实验克隆并构建了含大鼠 GCLC 基因上游 5892bp 启动子的 PGL4.19 荧光素酶报告载体, 并成功建立稳定表达大鼠 GCLC 启动子及荧光素酶报告基因的 L2 细胞株, 且对刺激因子有明显的反应性。这将作为重要的细胞研究手段, 用于高通量药物筛选或进一步研究 GCLC 基因的转录调控, 阐明机体氧化 - 抗氧化失衡的机制。

参考文献(References)

- [1] Bargagli E, Olivieri C, Bennett D, et al. Oxidative stress in the pathogenesis of diffuse lung diseases: a review[J]. *Respir Med*, 2009, 103(9): 1245-1256
- [2] Roberts ES, Richards JH, Jaskot R, et al. Oxidative stress mediates air pollution particle-induced acute lung injury and molecular pathology [J]. *Inhal Toxicol*, 2003, 15(13): 1327-1346
- [3] Neal G, Elysia M, Richard M, et al. Lung glutathione adaptive responses to cigarette smoke exposure[J]. *Respir Res*, 2011, 12(1): 133-1341
- [4] P Ghezzi. Role of glutathione in immunity and inflammation in the lung [J]. *Int J Gen Med*, 2011, 4: 105-113
- [5] Franklin CC, Backos DS, Mohar I, et al. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase[J]. *Mol Aspects Med*, 2009, 30(1-2): 86-98
- [6] Krzywanski DM, Dickinson DA, Iles KE, et al. Variable regulation of glutamate cysteine ligase subunit proteins affects glutathione biosynthesis in response to oxidative stress [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 423(1): 116-125
- [7] Fan F, Wood K V. Bioluminescent assays for high-throughput screening[J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2007, 5(1): 127-136
- [8] Farinati F, Piciocchi M, Lavezzo E, et al. Oxidative stress and inducible nitric oxide synthase induction in carcinogenesis [J]. *Dig Dis*, 2010, 28(4-5): 579-584
- [9] Kinnula V L, Crapo J D. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(12): 1600-1619
- [10] Fernandez-Checa J, Fernandez A, Morales A, et al. Oxidative stress and altered mitochondrial function in neurodegenerative diseases: lessons from mouse models[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2010, 9(4): 439-454
- [11] Rocha M, Apostolova N, Hernandez-Mijares A, et al. Oxidative stress and endothelial dysfunction in cardiovascular disease: mitochondria-targeted therapeutics [J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17(32): 3827-3841
- [12] Thannickal VJ. The paradox of reactive oxygen species: injury, signaling, or both?[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mo Physiol*, 2003, 284(1): L24-L25
- [13] 赵丽珂, 古洁若, 余得恩. HLA-B27 启动子荧光素酶报告基因载体的构建及其在 Hela 细胞的转录调控研究 [J]. *中华风湿病学杂志*, 2007, 11(8): 449-452
- Zhao Li-ke, Gu Jie-ruo, Yu De-en. Molecular cloning of HLA-B27 gene promoter and transcriptional activity detection in Hela cells[J]. *Chin J Rheumatol*, 2007, 11(8): 449-452
- [14] Dickinson DA, Levenon A L, Moellering DR, et al. Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element[J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 37(8): 1152-1159
- [15] Shenvi SV, Smith EJ, Hagen TM. Transcriptional regulation of rat γ -glutamate cysteine ligase catalytic subunit gene is mediated through a distal antioxidant response element[J]. *Pharmacol Res*, 2009, 60(4): 229-236
- [16] Angela C. Wild, Helen R. Moinova, and R, et al. Regulation of gamma-Glutamylcysteine Synthetase Subunit Gene Expression by the Transcription Factor Nrf2 [J]. *J. Biol. Chem*, 1999, 274(47): 33627-33636
- [17] Lu SC. Regulation of glutathione synthesis [J]. *Mol Aspects Med*, 2009, 30(1-2): 42-59
- [18] Garand M, Lin J H H, Hill C E, et al. Regulation of the mouse gene encoding TAFI by TNF α : Role of NF κ B binding site[J]. *Cytokine*, 2012, 57(3): 389-397
- [19] Yang H, Magilnick N, Lee C, et al. Nrf1 and Nrf2 regulate rat glutamate-cysteine ligase catalytic subunit transcription indirectly via NF- κ B and AP-1[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(14): 5933-5946
- [20] Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR. Disulfide relays and phosphorylative cascades: partners in redox-mediated signaling pathways[J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12(12): 1555-1563

(上接第 1253 页)

- [8] 焦东亮, 倪秀石. 丁苯酞对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后 caspase-3 表达的影响[J]. *Chin J clin Neurosci*, 2007, 15(1): 19-23
- Jiao Dong-liang, Ni Xiu-shi. Effect of dl-3n-butylphthalide on the expression of caspase-3 in rats after cerebral ischemia-reperfusion [J]. *Chin J clin Neurosci*, 2007, 15(1): 19-23
- [9] Kubavat JB, A sdaq SM. Role of Sida cordifolia L. leaves on biochemical and antioxidant profile during myocardial injury[J]. *Ethnopharmacol*, 2009, 124(1): 162-165
- [10] 黄荫浩, 吴翔, 陆齐, 等. 红景天对儿茶酚胺损伤大鼠心肌以及对 HIF-1 α 表达的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2009, 9(24): 4636-4643
- Huang Ying-hao, Wu Xiang, Lu Qi, et al. The Effects of Rhodiola on Catecholamine-induced Myocardial Injury Rats and the Expression of HIF-1 α [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2009, 9(24): 4636-4643
- [11] Adameova A, Abdellatif Y, Dhalla NS. Role of the excessive amounts of circulating catecholamines and glucocorticoids in stress-induced heart disease[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2009, 87(7): 493-514
- [12] Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases[J]. *Hypertension*, 2000, 18(6): 655-673
- [13] M Chiong, ZV Wang, Z Pedrozo, et al. Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications [J]. *Cell Death Dis*, 2011, 2(22): 244-254
- [14] Folco G, Rossini G, Buccellati C, et al. Leukotrienes in cardiovascular diseases[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 161(22): 112-116
- [15] Naranjan S, Dhalla, Adel B, et al. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury[J]. *Cardiovascular Research*, 2000, 47(3): 446-456