

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)19-1729-04

人 p65 和 I κ B α 基因真核表达载体的构建及在永生化滑膜细胞中的表达

程欣, 王立峰, 张健, 刘娜, 苏金, 于江天, 刘新平

(第四军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室 陕西 西安 710033)

Construction and expressions of eukaryotic expression vectors of human p65 and I κ B α gene in MH7a cells

CHENG Xin, WANG Li-Feng, ZHANG Jian, LIU Na, SU Jin, YU Jiang-Tian, LIU Xin-Ping

Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To construct the eukaryotic expression vectors of human p65 and I κ B α gene and to testify their expressions in human immortalized rheumatoid arthritis synoviocytes-MH7a cells. **METHODS:** Human p65 and I κ B α gene coding sequences were amplified from HEK293 mRNA by RT-PCR. The PCR products were cloned into pMD18T vectors, sequenced, then subcloned into eukaryotic expression vector pcDNA3.1myc/His(-)A. After restriction enzyme digestion, these recombinant plasmids were transiently transfected into MH7a cells subsequently with lipofectin to detect the expressions of p65 and I κ B α by Western Blot. **RESULTS:** Sequencing showed that the eukaryotic expression vectors of p65 and I κ B α were successfully constructed. Their expressions in MH7a cells were confirmed. **CONCLUSION:** The eukaryotic expression vectors containing p65 and I κ B α are constructed and they can express p65 and I κ B α in human immortalized rheumatoid arthritis synoviocytes-MH7a cells.

【Keywords】 NF- κ B; transcription factor RelA; I- κ B proteins; arthritis rheumatoid; reverse transcriptase polymerase chain reaction

【摘要】 目的: 构建人 p65 和 I κ B α 基因的真核表达载体并检测其在人永生化滑膜细胞 MH7a 中的表达。方法: 应用 RT-PCR 方法从体外培养的 HEK293 细胞 mRNA 中扩增出 p65 和 I κ B α 基因的编码区, 克隆至 pMD18T 载体并测序, 然后

收稿日期 2006-05-08; 接受日期 2006-05-18

基金项目 国家重点基础研究和开发计划(2002CB513007); 国家自然科学基金(30300319)

通讯作者: 刘新平。Tel (029)84774516 Ext. 20 Email xinpingleu@fmmu.edu.cn

作者简介: 程欣, 硕士生(导师刘新平)。Tel (029)84774516

Email zhengxin@fmmu.edu.cn

亚克隆至真核表达载体 pcDNA3.1myc/His(-)A, 酶切鉴定正确后以脂质体法瞬时转染 MH7a 细胞, Western Blot 检测 p65 和 I κ B α 的表达。结果: 测序证实 PCR 扩增得到的 p65 和 I κ B α 基因编码区序列正确; 脂质体法转染 MH7a 细胞后检测到预期目的蛋白的表达。结论: 成功构建了 p65 和 I κ B α 的真核表达载体并使其在人永生化滑膜细胞中表达。

【关键词】 NF- κ B; p65; I κ B α ; 类风湿性关节炎; 逆转录聚合酶链反应

【中图分类号】R34

【文献标识码】A

0 引言

NF- κ B 是一个作用广泛的转录因子, 可以调控多个下游靶基因的表达, 因而广泛参与细胞各种功能的调节。当细胞受到细胞因子和炎症介质等因素刺激后, NF- κ B 进入细胞核并结合于启动子区域的 κ B 序列, 进而发挥转录因子的功能, 上调靶基因的转录水平^[1]。NF- κ B 是由 P65 和 P50 构成的异源二聚体, 过表达 P65 或 I κ B α 可以激活或者抑制 NF- κ B 通路^[2]。NF- κ B 在类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA) 的发生发展进程中发挥了重要作用^[3], 但是其影响 RA 病程的具体机制尚未阐明。我们旨在构建 p65 和 I κ B α 基因编码区的真核表达载体 pcDNA3.1myc/His(-)A-p65 和 pcDNA3.1myc/His(-)A-I κ B α , 并使其在人永生化滑膜细胞系 MH7a 中表达, 为进一步研究 NF- κ B 在 RA 中发挥作用的分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌菌株 XL-10、真核表达载体 pcDNA3.1myc/His(-)A 和永生化滑膜细胞 MH7a, HEK293 细胞(本室保存); dNTP, dATP 和 ExTaq 高保真聚合酶、各种限制性内切酶、T4 连接酶、pMD18T 载体及 DL2000 DNA Marker(TaKaRa 公司); PCR 反应引物(上海基康生物技术有限公司); 质粒提取和 DNA 回收试剂盒(杭州维特洁公司); RPMI 1640 培养基(Gibico 公司); Lipo-fectamine 2000(Invitrogen 公司); 抗 P65 和抗 I κ B α 抗体(Cell Signaling 公司); 抗 Myc 抗体(第四军医大学免疫学教研室); 抗 Actin 抗体, HRP 标记的羊抗兔第二抗体及 HRP 标记的羊

抗小鼠第二抗体(博士德公司); Western Blot 发光底物(Pierce 公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 p65 编码区上游引物序列: 5'-GGATCCTGGCTCGTCTGTAGTGCACGC-3', 其中 GGATCC 为 *Bam*H I 酶切位点, p65 编码区下游引物序列: 5'-TTCGAAGGAGCTGATCTGACTCAGCAG-3', 其中 TTCGAA 为 *Hind* III 酶切位点。I κ B α 编码区上游引物序列: 5'-GGATCCTCGTCCGCGCCATGTTCCAGG-3', 其中 GGATCC 为 *Bam*H I 酶切位点, I κ B α 编码区下游引物序列: 5'-TTCGAATAACGTCAGACGCTGGCCTCC-3', 其中 TTCGAA 为 *Hind* III 酶切位点。

1.2.2 总 RNA 的提取和反转录 体外培养的 HEK293 细胞在 1 mL Trizol 裂解液中充分裂解, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 g 离心 15 min, 向上清中加入 0.2 mL 氯仿, 震荡混匀后 4 $^{\circ}$ C, 12 000 g 离心 15 min, 取上清 0.5 mL 异丙醇沉淀, 静置 10 min 后 4 $^{\circ}$ C, 12 000 g 离心 10 min, 沉淀用 750 mL/L 乙醇洗涤, 晾干后溶于 10 μ L DEPC 水中。制得的总 RNA 定量后取 2 μ g 进行反转录。反转录采用 Superscript II RNase H-反转录酶系统。在 20 μ L 反应体系中加入 Oligo dT (500 g/L) 1 μ L, 2 μ g 总 RNA, 加入 ddH $_2$ O 至 10 μ L, 70 $^{\circ}$ C, 10 min, 冰上冷却, 加入 5 \times 反应缓冲液 4 μ L, 0.1 mol/L DTT 2 μ L, 10 mmol/L dNTP 4 μ L, 混匀, 42 $^{\circ}$ C 温育 50 min 后置于 70 $^{\circ}$ C, 15 min 后终止反应, 加入 2 U RNase H 1 μ L, 37 $^{\circ}$ C 温育 20 min。

1.2.3 PCR 扩增 p65 和 I κ B α 基因编码区 在 25 μ L 反应体系中加入 2.5 μ L 10 \times 反应缓冲液, 2.0 μ L dNTP 模板(cDNA) 1.0 μ L, 上下游引物各 1.0 μ L, ExTaq 酶 0.25 μ L, 补加 H $_2$ O 至 25 μ L。扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 45 s, 62 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环。扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行分离, 回收后溶于 40 μ L 去离子水中。

1.2.4 PCR 产物克隆及序列测定 PCR 产物回收片段克隆至 pMD-18T 载体, 转化大肠杆菌 XL-10 感受态细胞, 挑出阳性克隆进行酶切鉴定及测序。

1.2.5 pcDNA3.1myc/His(-)A-p65 和 pcDNA 3.1 myc/His(-)A-I κ B α 真核表达载体的构建 提取重组的 pMD18T-p65 和 pMD18T-I κ B α 载体质粒, 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切出目的片段, 亚克隆至 pcDNA3.1myc/His(-)A 真核表达载体中, 构建出重组表达载体 pcDNA3.1myc/His(-)A-p65 和 pcDNA3.1myc/His(-)A-I κ B α 。

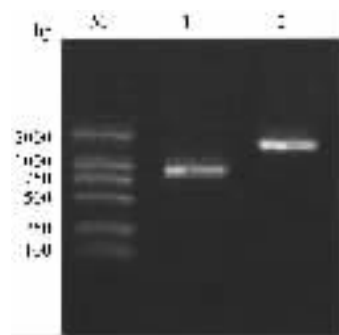
1.2.6 基因转染 MH7a 细胞于 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO $_2$ 条件下, 在含 100 mL/L 新生小牛血清的 RPMI

1640 培养基中培养。细胞密度达到 80% 时按照 Lipofectamine 2000 说明书转染对照质粒和重组表达载体。

1.2.7 Western Blot 检测转染基因的表达 转染后 48 h 收细胞并裂解, 取 30 μ g 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳并电转移至 NC 膜, 5 g/L 脱脂奶粉封闭 1 h, 分别与按一定比例稀释的抗 P65 抗体、抗 I κ B α 抗体、抗 Myc 抗体和抗 Actin 抗体在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜, 然后分别与 1:3000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔第二抗体及 HRP 标记的羊抗小鼠第二抗体孵育 1 h, TBST 洗膜后加入发光底物孵育 2 min, 在暗室中用 X 光片曝光, 显影, 定影。

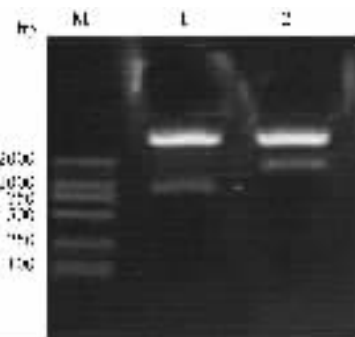
2 结果

2.1 人 p65 和 I κ B α 基因编码区 PCR 扩增、克隆和序列鉴定 琼脂糖凝胶电泳显示, PCR 产物分别为 1719 bp 和 962 bp 的特异性片段, 将这两条区带分别回收后与 pMD18T 载体连接。酶切鉴定后对其中 2 个阳性克隆进行测序, 并将测序结果与 GenBank 中的序列进行比对, 结果显示序列全部正确(图 1, 2)。



M: marker; 1: I κ B α ; 2: p65。

图 1 人 p65 和 I κ B α 基因编码区 PCR 扩增产物的鉴定

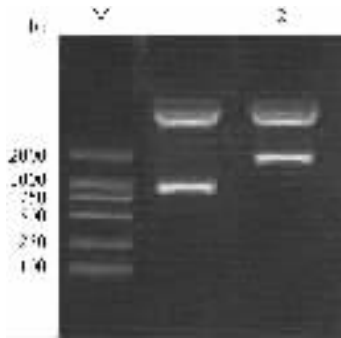


M: marker; 1: pMD18T-I κ B α 质粒经 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切; 2: pMD18T-p65 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切。

图 2 pMD18T-p65 和 pMD18T-I κ B α 重组质粒酶切鉴定

2.2 pcDNA3.1myc/His(-)A-p65 和 pcDNA 3.1 myc/His(-)A-I κ B α 真核表达载体的构建 真核表

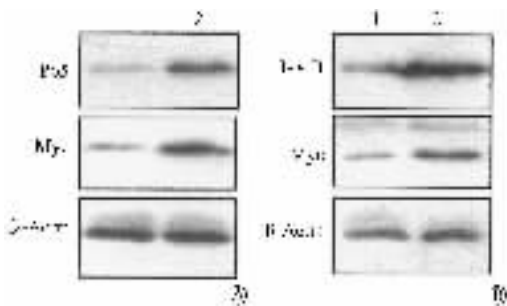
达载体 pcDNA3.1myc/His(-)A-p65 和 pcDNA3.1myc/His(-)A-I κ B α 用 BamH I 和 Hind III 酶切鉴定,结果显示酶切片段长度符合预期设计(图3)。



M: Marker; 1: pcDNA3.1 myc/His(-)A-I κ B α 质粒经 BamH I 和 Hind III 酶切; 2: pcDNA3.1 myc/His(-)A-p65 质粒经 BamH I 和 Hind III 酶切。

图3 pcDNA3.1 myc/His(-)A-p65 和 pcDNA3.1 myc/His(-)A-I κ B α 重组质粒的酶切鉴定

2.3 真核表达载体 pcDNA3.1myc/His(-)A-p65 和 pcDNA3.1myc/His(-)A-I κ B α 在 MH7a 细胞中的表达 用构建成功的 pcDNA3.1myc/His(-)A-p65 和 pcDNA3.1myc/His(-)A-I κ B α 以及对对照空载体 pcDNA3.1myc/His(-)A 分别瞬时转染 MH7a 细胞,转染后 48 h 用抗 P65 抗体、抗 I κ B α 抗体及抗 Myc 抗体检测到 P65 和 I κ B α 在蛋白水平的表达,与转染 pcDNA3.1myc/His(-)A 空载体的对照组相比存在显著差异(图4),表明构建的真核表达载体 pcDNA3.1myc/His(-)A-p65 和 pcDNA3.1myc/His(-)A-I κ B α 可以在 MH7a 细胞中正确表达。



A 1: 转染 pcDNA3.1 myc/His(-)A 空载体(对照); 2: 转染 pcDNA3.1 myc/His(-)A-p65 质粒的 MH7a 细胞在 48 h 后细胞中 P65 蛋白质水平。B 1: 转染 pcDNA3.1 myc/His(-)A 空载体(对照); 2: 转染 pcDNA3.1 myc/His(-)A-I κ B α 质粒的 MH7a 细胞在 48 h 后细胞中 I κ B α 蛋白质水平。

图4 p65 及 I κ B α 在 MH7a 细胞中的表达

3 讨论

NF- κ B 是真核细胞转录因子 Rel 家族成员之一,广泛存在于哺乳动物细胞中。NF- κ B/Rel 蛋白结合

形成同源或异源二聚体,目前发现有异源二聚体 P65/P50, P50/c-Rel, P65/c-Rel 和同源二聚体 P65/P65, P50/P50, P52/P52 等。P65/P50 是最早分离鉴定出的 NF- κ B 二聚体,而且在多数细胞中表达,所以习惯上 NF- κ B 指 P65/P50。P65 又名 Rel A,可与 DNA 上的 κ B 序列特异性结合,进而发挥转录因子的作用^[4]。P50 主要负责与 I κ B 结合。I κ B 对 NF- κ B 的活化起抑制作用,成员包括 I κ B α , I κ B β , I κ B γ /P105, I κ B δ /P100 和 Bcl-3。其中 I κ B α 在体内发挥主要的生理功能^[5]。未活化状态下, NF- κ B 与 I κ B 结合,滞留于细胞质中,不能进入细胞核内发挥作用。当细胞受到 TNF α , TGF β , IL-1, LPS, PMA 及植物血凝素等细胞外信号刺激时, I κ B 发生磷酸化而降解,使 NF- κ B 游离出来并迅速从细胞质移位至细胞核,与下游靶基因的 κ B 位点结合,上调相关基因的转录^[6]。

NF- κ B 的主要生理功能在于调控机体免疫反应和调节细胞的生长分化。研究显示, NF- κ B 在 RA 的发生发展进程中发挥着重要的作用^[7-8]。首先, NF- κ B 控制许多细胞因子、细胞黏附分子、趋化因子及急性反应蛋白的转录。当 NF- κ B 过度活化时,会诱导上述基因的过度表达,最终导致许多免疫相关的疾病发生, RA 正是这类疾病之一。在 RA 病变部位, NF- κ B 活化后可提高 RA 滑膜细胞中 IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8, 黏附分子, GM-CSF 及 COX2 等基因的转录,同时 TNF α , IL-1 β 等炎症因子又可以活化 NF- κ B。两者形成正反馈,导致了 RA 炎症反应的持续进行^[9-10]。其次, NF- κ B 还可以上调凋亡抑制蛋白 FLIP (FLICE-inhibitory-protein) 的表达,对 RA 滑膜细胞的凋亡有间接的抑制作用^[11]。异常增生的滑膜细胞可以侵蚀关节软骨、韧带、肌腱等组织,最终造成关节结构不可逆的破坏^[12]。

我们通过 RT-PCR 的方法获得 p65 和 I κ B α 编码区序列,并构建了它们的真核表达载体 pcDNA3.1 myc/His(-)A-p65 和 pcDNA3.1 myc/His(-)A-I κ B α 并成功地人在永生滑膜细胞 MH7a 中表达了这两个载体。上述工作为我们进一步研究 NF- κ B 对 RA 中滑膜细胞机能的影响以及 NF- κ B 对 RA 滑膜细胞增生凋亡的调控奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Tak PP, Firestein GS. NF- κ B: A key role in inflammatory disease [J]. J Clin Invest, 2001, 107(1): 7-11.
- [2] Meng FY, Liu L, Chin PC. Akt is a downstream target of NF- κ B [J]. J Biol Chem, 2002, 277(33): 29674-29680.
- [3] Makarov SS. NF- κ B in rheumatoid arthritis: A pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction [J]. Arthritis

Res, 2001, 3: 200-206.

- [4] Mercurio F, Manning AM. Multiple signals converging on NF- κ B [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1999, 11(2): 226-232.
- [5] Yamamoto Y, Gaynor RB. I κ B kinases: key regulators of the NF- κ B pathway [J]. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29(2): 72-79.
- [6] Ozes ON, Donner DB. NF- κ B activation by tumor necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase [J]. *Nature*, 1999, 401: 82-85.
- [7] Feldmann M, Foxwell BMJ. Is NF- κ B a useful therapeutic target in rheumatoid arthritis [J]? *Ann Rheum Dis*, 2002, 61(Suppl II): ii13-ii18.
- [8] Aupperle KR, Firestein GS. NF- κ B regulation by I κ B kinase in primary fibroblast-like synoviocytes [J]. *J Immunol*, 1999, 163:

427-433.

- [9] Miagkov AV, Makarov SS. NF- κ B activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 13859-13864.
- [10] 成胜权, 马真胜. 类风湿关节炎患者 B19 病毒感染及细胞因子变化 [J]. *第四军医大学学报*, 2001, 22(16): 1518-1521.
- [11] Barket M, Gilmore TD. Control of apoptosis by Rel/ NF- κ B transcription factors [J]. *Oncogene*, 1999, 18: 6910-6924.
- [12] Tak PP, Bresnihan B. The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis [J]. *Arth Rheum*, 2000, 43(12): 2619-2633.

编辑 王 睿

· 研究简报 · 文章编号 1000-2790(2006)19-1732-01

任务难度调控面孔认知的早期阶段

高 蕾¹ 赵 仑^{2,3} (¹南京师范大学教育科学学院学前教育系, 江苏 南京 210097, ²江苏省语言科学与神经认知工程重点实验室, 江苏 徐州 221116, ³Department of Psychology, Hebrew University of Jerusalem, Israel)

【关键词】任务难度 面孔识别 表情分类 N170

【中图分类号】Q427 【文献标识码】B

0 引言 近年来, 有研究认为颞枕区分布的面孔特异性成分 N170 不受分类任务(如性别、熟悉度)的调控^[1-2], 但也有研究发现分类任务中的特异性空间等级特征会影响面孔的结构编码过程^[3]. 本研究我们采用表情特征突出的卡通面孔, 对面孔识别和表情分类两种任务的 N170 成分进行了研究.

1 对象和方法

1.1 对象 14 名被试正常大学生(男、女各半), 右利手, 年龄 19~24 岁.

1.2 方法

1.2.1 刺激 每个刺激序列包含 4 种刺激(微笑和愤怒卡通面孔以及两种非面孔刺激^[4], 每种刺激 20 个)等概率随机排列. 刺激呈现时间 50 ms, 刺激间隔(ISI)在 1500~2000 ms 内随机.

1.2.2 作业任务 ①面孔识别任务(face recognition task)对面孔和非面孔刺激按左、右键, 忽略表情特征; ②面孔表情分类任务(expression classification task)对面孔的表情特征进行分类判断, 愤怒、微笑面孔分别按左、右键. 任务顺序和反应手(键)在被试中交叉平衡设计.

1.2.3 脑电记录和分析 记录 32 导脑电(Neuroscan), 双侧乳突连线作参考, 带宽 0.05~100 Hz, 500 Hz/导. 离线分析 EEG/ERP 数据(Scan 4.3), 对 N170 成分进行 3 ANOVA (Spss10.0): 任务(FR 和 EC)×表情特征(愤怒和微笑)×电极(P7 和 P8), 对行为数据进行 2 ANOVA: 任务×表情特征.

收稿日期 2006-05-08; 接受日期 2006-06-23

基金项目 国家自然科学基金(30300113)

通讯作者 赵 仑. Email: zhaolunlun@yahoo.com.cn

作者简介 高 蕾, 博士生. Tel: 13913031173 Email: gaolanru@sina.com

结果皆经 Greenhouse-Geisser 校正. 采用 LORETA 方法对 N170 进行皮层电流密度溯源分析(Curry 5.0).

2 结果

2.1 行为 两种任务的正确率均 >90%, 无任务和表情特征主效应. 表情分类的反应时(644.09 ms)明显长于面孔识别(427.93 ms) ($P < 0.001$).

2.2 ERP N170 峰值的任务主效应 [$F(1, 13) = 7.035, P = 0.020$] 和任务×电极的交互效应 [$F(1, 13) = 36.699, P = 0.000$] 显著. EC 任务的 N170 在 P7 位置比 FR 任务显著增强 [$F(1, 13) = 9.551, P = 0.009$]. 溯源分析结果显示 EC 任务比 FR 任务产生了更为明显的颞下回和枕区激活.

3 讨论 本研究我们采用的卡通面孔, 诱发出与真实人脸相似的 N170 成分^[4-5]. 认知因素对视觉加工的影响一直是认知科学的核心问题, Goffaux 等^[2]发现只有低空间频率的面孔诱发的 N170 才受分类任务(熟悉度分类和性别分类)的调控, 而 Rossion 等^[3]则发现面孔分类任务仅影响枕区 P1. 本研究中任务的难度等级是清楚的, 面孔识别任务仅要求被试判断是否是面孔, 而表情分类不仅有面孔识别的过程, 还包括表情特征的外显分类. 虽然与 Goffaux 等^[2]采用的任务不同, 但研究结果一致, 都发现作业任务对 N170 的调控发生在左侧颞枕区, 表明任务难度可以显著地调控面孔认知的早期阶段.

【参考文献】

- [1] Carmel D, Bentin S. Domain specificity versus expertise: Factors influencing distinct processing of faces [J]. *Cognition*, 2002, 83: 1-29.
- [2] Goffaux V, Jemel B, Jacques C, et al. ERP evidence for task modulations on face perceptual processing at different spatial scales [J]. *Cogn Sci*, 2003, 27: 313-325.
- [3] Rossion B, Campanella S, Gomez CM, et al. Task modulation of brain activity related to familiar and unfamiliar face processing: An ERP study [J]. *Clin Neurophysiol*, 1999, 110: 449-462.
- [4] 赵 仑, 赵 昆, 刘 昌, 等. EPP: 一个与表情特征加工相关的 ERP 晚期正成分 [J]. *航天医学与医学工程*, 2006, 19(1): 37-40.
- [5] Pourtois G, Grandjean D, Sander D, et al. Electrophysiological correlates of rapid special orienting towards fearful faces [J]. *Cereb Cortex*, 2004, 14: 619-633.

编辑 许福明