论著

文章编号:1000-5404(2005)01-0050-03

人糖皮质激素受体变异体 cDNA 序列克隆和表达及其活性研究

张 方,钱桂生,吴学玲,谢永宏,王兴友,陈维中 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

提 要: 目的 构建人糖皮质激素受体变异体表达载体,研究其表达和功能。**方法** 运用 RT- nested PCR 扩增糖皮质激素受体不含有编码 LBD(ligand binding domain)的 cDNA 序列,将 PCR 产物定向克隆至 pEGFP-N2 质粒载体,测序筛选重组质粒;荧光显微镜观察重组质粒转染表达情况;相对荧光素酶法检测 GR 转录激活活性。**结果** 扩增出长 1 601 bp 的 cDNA 序列,测序证实:克隆片段与 Genbank 该基因序列同源性为 100%;重组质粒表达产物定位于细胞核;转染组细胞转录激活活性增强。**结论** 成功构建糖皮质激素受体变异体的表达载体,该变异体具有不依赖激素的转录激活活性。

关键词: 糖皮质激素受体;LBD;转录激活活性

中图法分类号: R392.11; R394-33; R394.2 **文献标识码**: A

cDNA cloning and expression of human glucocorticoid receptor variant

ZHANG Fang, QIAN Gui-sheng, WU Xue-ling, XIE Yong-hong, WANG Xing-you, CHEN Wei-zhong (Institute of Respiration Diseases of PLA, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To construct the expression vector of human glucocorticoid receptor variant and investigate its expression and function. **Methods** cDNA sequence of human glucocorticoid receptor variant without LBD was amplificated by RT-nested PCR, directionally cloned to pEGFP-N2 plasmid vector, and screened through sequencing. The expressions of recombinant plasmids were observed through fluorescence microscope. The transcriptional activation activity of variant was evaluated by the relative activity of luciferase. **Results** The cDNA of 1 601 bp was obtained, and the sequencing confirmed the cloned cDNA sequence was completely coincident with that of glucocorticoid receptor in GenBank. Expression products of recombinant plasmid mainly located in nucleus. The transcriptional activation activity increased after recombinant plasmid transfection. **Conclusion** Expression vector of glucocorticoid receptor variant was constructed successfully, which has transcriptional activation activity independent of glucocorticoid.

Key words: glucocorticoid receptor; ligand binding domain; transcriptional activation activity

糖皮质激素(glucocorticosteroid, GC)的生物学效应的发挥取决于靶细胞上的糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)的介导。GR 是激素核受体家族中的一个主要成员,也是一种重要的核转录因子人 GR 的 C 端为配体结合区(ligand binding domain, LBD)。LBD 不但是 GC 结合区,同时也参与了 GR 核移位以及与相关核转录因子的相互作用。生理状态下,无 GC 结合的 LBD 抑制 GR 活性的发挥[1]。本实验运用分子生物学技术克隆缺失编码 LBD 的 GR 基因,构建其真核表达载体。所表达的 GR 变异体(命名为 GR527)保留人 GR 蛋白 N 端 527 个氨基酸,切除整个 LBD。通过在人血管内皮细胞株 ECV304 转染表达 GR527,来研究其表达和功能,为探索 GR527 功能替代 GR 转录激活 活性具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RNA LA PCR ™试剂盒、T_4 连接酶(TaKaRa 公司);限制性内切酶 *Xho* Ⅰ, *Bam*H Ⅰ (NEB 公司);E. Z. N. A 凝胶回收试剂盒(Omega 公司);GRE-TK-Luc 报告质粒由瑞典乌拉姆大学

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970329)
Supported by the National Nature Science Foundation of China (39970329)

作者简介:张 方(1972-),男,安徽省庐江县人,博士研究生,主治医师,主要从事急性肺损伤病理生理机制方面的研究。电话:(023)65230729, E-mail: zhangfanglab@yahoo.com.cn

通讯作者:钱桂生,电话:(023)68755320

收稿日期:2004-09-02;**修回日期**:2005-01-20

Annika Wallberge 教授惠赠;pEGFP-N2 质粒、β-半乳糖苷酶表达质粒 pCMV-β-Gal(Clotech 公司);荧光素酶及 β-Gal 活性检测试剂盒(Promega 公司)。

1.2　细胞培养

人血管内皮细胞株 ECV304 购自 ATCC 公司。用含 10 % 的胎牛血清的 M199 培养基,在 37 ℃、5% CO_2 的条件下培养,待细胞 70% 融合时用于实验。

1.3　巢式 PCR 引物

通过 RNAstructure 4.1 软件(http://rna.urmc.rochester.edu)在线分析 GR527 基因,发现模板末端可能形成很复杂的二级结构,影响引物的退火与基因的扩增,因此在扩增基因编码区的内侧引物外侧又设计了 1 对引物,运用巢式 PCR 对 RT 产物进行扩增,以避开了复杂的二级结构。巢式 PCR 引物根据 Primer Premier 5 软件自行设计,外侧引物:5′-TTGTTTATCTCG-GCTGCG-3 和 5′-TGGGACCACAGTGACAAC-3′。内侧引物:上游引物为 5′-GGCTCGAGTG ATG GACTCCAAAGAAT-3′,上游引物中包含启动子 ATG,并在 5′端引入 *Xho* Ⅰ限制性内切酶位点(下划线表示);下游引物为 5′ -TTTGGATCCTGTTGTGGTA-ACGTTGCAG- 3′,并在 5′端引入 *Bam*H Ⅰ限制性内切酶位点(下划线表示)。引物由上海基康生物工程有限公司合成。

1.4　RT-nested PCR 克隆 GR 变异体 cDNA 序列

Tripure 试剂(Roch 公司)提取人血管内皮细胞株 ECV304 总 RNA,取 2 μg RNA,用 AMV 逆转录酶制备 20 μl 体系的 cDNA,取 3 μl cDNA 进行第 1 轮 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μl,第 1 轮扩增条件为:95 ℃,4 min,然后 94 ℃,1 min → 55 ℃,1 min→72 ℃,2 min;35 个循环→72 ℃,8 min。第 1 轮 PCR 结束后,取 3 μl 的 PCR 产物用于第 2 轮 PCR。第 2 轮扩增将退火温度改为 61 ℃,其他条件同第 1 轮。PCR 结束后,取扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察并照相。将含目的条带的凝胶切下,按 E. Z. N. A 凝胶回收试剂盒说明书进行 PCR 产物回收。

1.5　PCR 产物定向亚克隆及重组子鉴定

PCR 产物、pEGFP-N2 质粒载体经过 *Xho* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ双酶切后,用 E. Z. N. A 凝胶回收试剂盒回收酶切产物。将 pEGFP-N2 载体酶切产物、PCR 酶切产物经 T_4 连接酶连接后,采用 $CaCl_2$ 化学法转化 DH5α 感受态细菌。在含卡那霉素的 LB 平板上筛选阳性克隆,扩增转化子,并将阳性克隆送至上海博亚生物公司测序,测序结果与 GeneBank 内人 GR 基因进行比对,筛选出插入序列正确的重组质粒 pEGFP-GR527。

1.6　重组质粒 pEGFP-GR527 转染人血管内皮细胞株 ECV304

转染方法按 FuGene 6 试剂盒(Biochem 公司)的操作说明书进行。取纯化的重组质粒 4 μg,FuGene 6 试剂 8 μl 加入 2 ml 无血清培养基中,混匀后滴加在经无血清培养基洗涤的人血管内皮细胞株 ECV304 表面。于培养箱中培养 24 h 后,荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白(GFP)的表达定位情况。同时设立 pEGFP-N2 转染组作对照。

1.7　相对荧光素酶法检测 GR 转录激活活性

报告质粒 GRE-tk-luc 和内参照质粒 pCMV-β-Gal 各 1.0、0.1 μg 与构建成功的重组质粒 4.0 μg 共转染人血管内皮细胞株 ECV304(采用 FuGene 6 试剂转染,方法同 1.6),同时设立正常对照组和 pEGFP-N2 转染组。将转染 24 h 的细胞,加入含浓度为 10^{-5} mol/L 地塞米松(dexamethasone,Dex)的无血清培养基,培养 6 h 后收集细胞;另设无 Dex 处理组。按照荧光素酶及 β-Gal 活性检测试剂盒说明书检测二者活性,二者比值为相对荧光强度(relative activity of luciferase,RAL),代表 GR 转录激活活性。

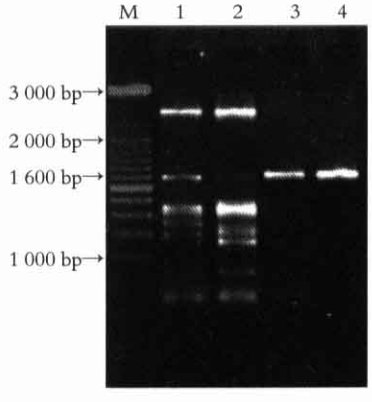
1.8　统计学处理

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件行 t 检验。

2　结果

2.1　巢式 PCR 产物电泳鉴定

通过巢式 PCR 扩增出长约 1 600 bp cDNA 序列,与预计长度相符(图 1)。



M:PCR 标准;1,2:第 1 轮 PCR 产物;3,4:第 2 轮 PCR 产物

图 1　巢式 PCR 产物鉴定

2.2　测序结果

所送测序的 3 个菌种中,测序结果经过比对,有 2 个序列均有碱基的缺失和突变,有 1 个序列与 GenBank 中该基因的序列同源性为 100%,且 ORF 阅读框正确。该重组质粒命名为 pEGFP-GR527。

2.3　pEGFP-GR527 在细胞中的表达定位

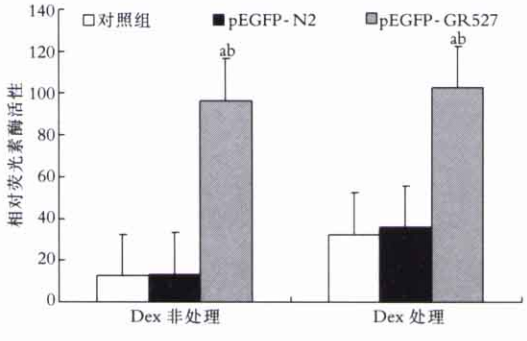
荧光显微镜下观察到空质粒 pEGFP-N2 表达产物 GFP 分布于人血管内皮细胞 ECV304 胞质和胞核中;重组质粒 pEGFP-GR527 表达产物 GR527-GFP 融合蛋白主要定位于胞核内(图 2)。

2.4　细胞 GR 转录激活活性测定

pEGFP-GR527 转染组与对照组、pEGFP-N2 转染组比较,GR 转录激活活性有显著提高($P < 0.01$);地塞米松处理与非处理对 pEGFP-GR527 转染后 GR 转录激活活性无显著影响($P > 0.05$)(图 3)。



图2 质粒 pEGFP-GR527 在血管内皮细胞 ECV304 中的表达
(FM×200)



a: $P<0.01$, 与对照组比较; b: $P<0.01$, 与 pEGFP-N2 转染组比较

图3 转染 pEGFP-GR527 后 GR 转录激活活性的变化

3 讨论

近年来研究表明,严重创伤和炎症可引起机体 GR 的表达和活性下调[2]。GR 转录激活活性降低引起抑炎基因表达减弱,从而促进过度炎症反应并引发全身损害。Siriani 等[3]通过质粒载体在 COS-7 细胞中过度表达野生型人源 GR,但这种非内源性 GR 无免疫调节活性。其主要原因是过量表达的 GR 无法与胞内定量的 HSP70 结合装配成有 GC 结合能力的 GR 功能复合体。所以单纯转染 GR 基因不能发挥 GR 转录激活活性替代作用。本实验首次通过切除人糖皮质激素受体 LBD,形成不能与 GC 结合的 GR 变异体 GR527,以期 GR527 发挥 GR 转录激活活性的替代作用。

血管内皮细胞是炎症反应中重要的靶细胞和效应细胞,可分泌多种炎症介质和细胞因子[4]。本实验以人血管内皮细胞株 ECV304 作为转染细胞,来研究 GR527 表达和功能,为以后进一步研究 GR527 调控血管内皮细胞炎症反应奠定基础。

本实验首先通过RT-nested PCR克隆GR527的cDNA序列。第1轮PCR产物出现多条非特异性条带,通过第2轮PCR并改用较第1轮PCR更高的退火温度后,提高反应的特异性,从而获得条带单一的PCR产物。所得的PCR产物中加入了限制性内切酶位点,以利于PCR产物的定向亚克隆。通过基因测序确保pEGFP-GR527质粒插入序列以及方向正确。

pEGFP-N2是一种变异野生型GFP变异体,该蛋白具有荧光更明亮及在哺乳细胞内表达更高的特点,它要求克隆到pEGFP-N2中的目的基因,应与GFP具有相同的读码框,并无读码框内终止信号,最终产物为目的基因所表达蛋白与绿色荧光蛋白的融合体,一般情况下不会影响目的的基因表达产物的生物活性[5]。通过荧光显微镜观察到pEGFP-N2表达产物分布于胞浆和胞核,而pEGFP-GR527表达产物主要分布于胞核。结果表明:切除LBD后,GR527仍然具有核移位能力,这是GR527发挥转录激活活性的必要条件。

本实验运用体外转录激活报告分析系统对pEGFP-GR527转染后的GR转录激活活性进行了分析。在此系统中,GR与GRE结合可活化报告质粒GRE-tk-luc启动子,导致报告基因luciferase(荧光素酶活性)的表达;pCMV-β-Gal为内参照质粒。通过二者比值,即相对荧光强度来校正荧光素酶活性,以消除转染效率对荧光素酶活性的影响。pEGFP-GR527转染组与对照组、pEGFP-N2转染组比较,GR转录激活活性有显著提高($P<0.01$),且该活性与Dex处理无相关性。综上所述,GR527具有不依赖GC而发挥作用的GR转录激活活性,其功能及活性调节还需进一步研究和阐明。

参考文献:

[1] BLEDSON R K, STEWART E L, Pearce K H. Structure and function of the glucocorticoid receptor ligand binding domain[J]. Vitam Horm, 2004, 68: 49-91.

[2] 钱 频, 张 芳, 钱桂生, 等. 脂多糖作用大鼠肺泡巨噬细胞糖皮质激素受体表达及活性变化[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(22): 2042-2044.

[3] SIRIANI D, MITSIOU D J, ALEXIS M N. Overexpressed glucocorticoid receptor negatively regulates gene expression under conditions that favour accumulation of non-hormone-binding forms of the receptor[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003, 84(2-3): 171-180.

[4] MICHIELS C. Endothelial cell functions[J]. J Cell Physiol, 2003, 196(3): 430-443.

[5] 何琪杨, 张鸿卿, 薛绍白. 活细胞的分子探针——绿色荧光蛋白[J]. 国外医学:分子生物学分册, 1997, 19(6): 279-283.

(编辑 陈聪连)