文章编号:1000-5404(2009)22-2237-03

论著

# HMGB1启动子红色荧光蛋白报告基因载体的构建及在机械牵张诱导下的活性检测

丁 宁[1],肖 慧[2],高 巨[3],许立新[1],佘守章[1] (广州市第一人民医院:[1]麻醉科和麻醉学实验室,[2]门诊部,广州 510180;[3]广州中医药大学第二附属医院麻醉科,广州 510120)

**摘 要:目的** 构建高迁移率族蛋白B1(high mobility group box 1 protein, HMGB1)启动子的红色荧光蛋白报告基因载体。**方法** 采用基因重组技术构建含HMGB1启动子区的红色荧光蛋白报告基因载体pDsRed1-1-HMGB1P。经PCR、酶切和DNA测序鉴定后,将重组载体转染HEK293细胞,在荧光显微镜下观察其在细胞内的表达以及对机械牵张刺激的反应。以转染空载体pDsRed1-1的细胞作为对照。**结果** PCR、酶切和DNA测序表明重组载体pDsRed1-1-HMGB1P的构建正确,该表达载体在HEK293细胞静息状态下表达水平较低,经机械牵张刺激后,在荧光显微镜下可看到高亮度的红色荧光。转染空载体pDsRed1-1的细胞未见红色荧光。**结论** 成功构建了HMGB1启动子的红色荧光蛋白报告基因载体,对机械牵张刺激有很好的反应。

**关键词:** 高迁移率族蛋白B1;红色荧光蛋白;基因,报告;机械牵张
**中图法分类号:** R341;R394-33;R394.2 **文献标识码:** A

# Construction of red fluorescent protein reporter gene vector containing HMGB1 promotor and its activity under mechanical stretch

DING Ning[1], XIAO Hui[2], GAO Ju[3], XU Li-xin[1], SHE Shou-zhang[1] ([1]Department of Anesthesiology, [2]Department of Outpatient, First People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510180; [3]Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

**Abstract: Objective** To construct the red fluorescent protein reporter gene vector containing high mobility group box 1 protein (HMGB1) promotor sequence and study the regulation mechanism of the expression of HMGB1 gene under mechanical stretch. **Methods** HMGB1 promotor was subcloned into a red fluorescent protein vector, pDsRed1-1. After identified by PCR, enzyme digestion and DNA sequencing, the recombinant vector pDsRed1-1-HMGB1P was then transfected into HEK293 cells. Blank vector or pDsRed-1 was transfected into 293 cells and served as controls. The expression of red fluorescent protein and its reaction to mechanical stretch were observed under a fluorescent microscope. HEK293 cells transfected with pDsRed1-1 vector served as control. **Results** PCR, double restriction enzyme digestion and DNA sequence analysis showed that the recombinant vector, pDsRed1-1-HMGB1P, was constructed correctly. This vector was lowly expressed in HEK293 cells of resting state. But after stimulated by mechanical stretch, strong red fluorescence was observed. No red fluorescence was observed in the control cells. **Conclusion** A red fluorescent protein reporter gene vector containing HMGB1 promotor sequence has been constructed successfully and expressed highly in mammalian cells. Since it responds to mechanical stretch effectively, it can thus provide a convenient tool to study the regulation mechanism of the expression of HMGB1 gene by mechanical stress.

**Key words:** high mobility group box 1 protein; red fluorescent protein; reporter gene; mechanical stretch

---

**基金项目:** 广州市医药卫生科技一般引导项目(2008-YB-012, 2009-YB-021)和重点项目(2008-ZDi-14);广东省医学科研基金(A2009497);广东省科技计划项目(2007B31509007)
Supported by the Medical Science and Technology Program of Guangzhou (2008-YB-012, 2009-YB-021, 2008-ZDi-14), the Medical Scientific Research Foundation of Guangdong Province (A2009497) and the Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2007B31509007)

**作者简介:** 丁 宁,男,山东省济宁市人,博士,主治医师,主要从事肺损伤的细胞信号转导方面的研究,发表论文10余篇。电话:(020)81048310,E-mail: dingninggy@hotmail.com
**通信作者:** 许立新,电话:(020)81048305,E-mail: gzxulixin@163.com

**收稿日期:** 2009-04-02;**修回日期:** 2009-06-03

高迁移率族蛋白B1(high mobility group box 1 protein, HMGB1)是近年发现的介导脓毒症和急性肺损伤的关键性"晚期"炎症介质[1]。注射HMGB1可引起小鼠的内毒素休克症状,延迟应用HMGB1抑制剂仍可显著降低脓毒症动物的死亡率[2]。这一特点使得HMGB1可能成为一个切实可行的治疗靶点和观测指标,比早期炎性因子更具有潜在的临床应用价值。新近研究表明,HMGB1也参与呼吸机所致肺损伤(ventilator-induced lung injury, VILI)的发病过程[3]。我们在体外细胞牵张模型中证实,牵张应变可诱导HMGB1表达显著增加[4]。研究机械牵张诱导HMGB1表达的调控机制以及相关的信号转导通路具有极其重要的意义,而这有赖于建立一个灵敏、高效的HMGB1报告基因检测系统。红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)作为一种新发现的报告基因在"报道"细胞内与基因表达调控及其相关的信号级联信息方面有其特有的优越性。本实验拟构建含HMGB1启动子的红色荧光蛋白报告基因载体,并在哺乳动物细胞中进行有效表达,以期为研究机械牵张诱导肺内效应细胞HMGB1基因表达的调控机制提供工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及仪器

DMEM培养基、胎牛血清(FBS)(GIBCO-BRL公司),PGL3-basic载体以及检测底物(Promega公司),脂质体转染试剂PolyFect Transfection Reagent(Giagen公司),限制性核酸内切酶*Sac* Ⅰ和*Hind* Ⅲ、$T_4$ DNA连接酶(TaKaRa公司),基因组DNA小量纯化试剂盒(Vitagine公司),半乳糖苷酶检测试剂盒(Clontech公司),Superfect转染试剂(Qiagen公司)。含有HMGB1启动子的载体pGL3-HMGB1P、pDsRed1-1和HEK293细胞由本室保存。凝胶图像分析仪(法国Vilber Lourmat公司),高速离心机(美国Beckman公司),ABI 310全自动DNA测序仪(美国Perkin-Elmer公司),倒置显微镜(日本Olympus公司),显微荧光摄像或照相系统(日本Nikon公司),Flexercell 4000T应变加载系统(美国Flexercell公司)。

### 1.2 pDsRed1-1-HMGB1P报告基因载体的构建

已知HMGB1启动子区(碱基数从5′末端-1 684至3′末端的+1片段)是插入在pGL3载体上,以pGL3-HMGB1P为模板,扩增带*Sac* Ⅰ和*Hind* Ⅲ酶切位点的HMGB1P,用*Sac* Ⅰ和*Hind* Ⅲ双酶切,将酶切所得的启动子序列插入pDsRed1-1的*Sac* Ⅰ和*Hind* Ⅲ位点之间,得到pDsRed1-1-HMGB1P重组体,经酶切、测序鉴定无误后大量扩增。

### 1.3 细胞培养及细胞基因转染

按文献[4]的方法进行基因转染:HEK293细胞常规培养铺于Bioflex培养板,待细胞长至50%融合时进行转染。DNA以无血清DMEM培养基稀释,与PolyFect转染试剂混匀,室温静置10 min。将二者轻轻混匀后再次室温孵育10 min。更换新鲜无血清DMEM,将DNA/PolyFect混合物加入培养板,置于培养箱孵育5 h,吸去含转染混合物的培养基,加入含5% FBS的新鲜DMEM,置于培养箱继续培养48 h。

### 1.4 实验分组及机械牵张刺激

实验分为4组:pDsRed1-1转染组、pDsRed1-1转染+机械牵张刺激组、pDsRed1-1-HMGB1P转染组、pDsRed1-1-HMGB1P转染+机械牵张刺激组。需用机械牵张刺激的组,分别于转染后12 h将Bioflex细胞培养板置于Flexercell 4000T应变加载系统(美国Flexercell公司),设定牵张频率为30周/min,应变幅度为20%,在牵张状态下培养细胞24 h。上述实验重复3次。用Nikon荧光显微镜观察并照相。

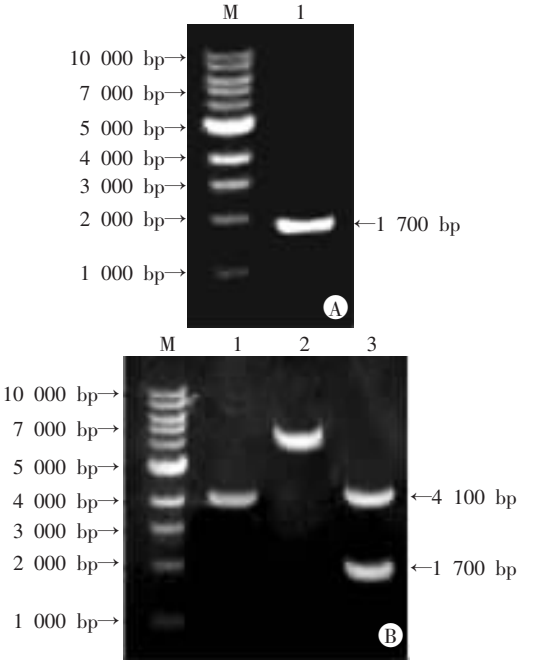
### 1.5 统计学处理

数据用$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件行方差分析。

## 2 结果

### 2.1 pDsRed1-1-HMGB1P载体的鉴定

以重组pDsRed1-1-HMGB1P载体为模板进行PCR扩增,产物行1%琼脂糖电泳,可见1条约1.7 kb的DNA片段,与预期大小相符(图1A)。对构建的pDsRed1-1-HMGB1P载体行*Sac* Ⅰ和*Hind* Ⅲ双酶切鉴定,分别切出约1.7 kb和4.1 kb两条带,符合预期结果。测序结果与HMGB1P启动子完全一致,证实载体构建成功,电泳结果见图1B。



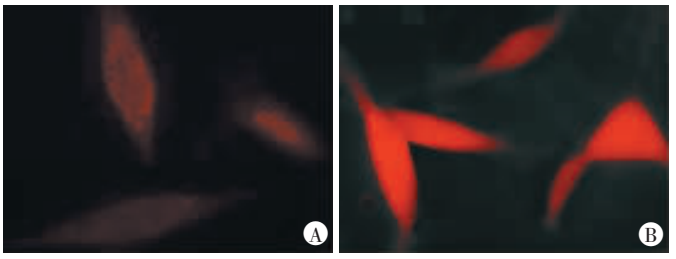

A: PCR鉴定结果 M:DNA标准; 1:HMGB1启动子; B:酶切鉴定结果 M:DNA标准; 1:空载体pDsRed1-1; 2:重组载体pDsRed1-1-HMGB1P; 3:*Sac* Ⅰ和*Hind* Ⅲ双酶切重组载体pDsRed1-1-HMGB1P

**图1 重组pDsRed1-1-HMGB1P载体的PCR与酶切鉴定**

### 2.2 pDsRed1-1-HMGB1P报告基因载体在HEK293细胞中的表达

在荧光显微镜下观察,转染空载体pDsRed1-1的HEK293细胞几乎未见红色荧光,而且在牵张作用下也没有反应。将

pDsRed1-1-HMGB1P 转染 HEK293 细胞后可见微弱的红色荧光(图 2A),施加牵张后,观察到由 HMGB1 启动子驱动的红色荧光蛋白发出高亮度的红色荧光(图 2B)。3 次重复实验均获得相同结果。




A: 转染重组载体 pDsRed1-1-HMGB1P 的 HEK293 细胞,未行机械牵张; B: 转染重组载体 pDsRed1-1-HMGB1P 的 HEK293 细胞,行机械牵张

**图 2　荧光显微镜观察 pDsRed1-1-HMGB1P 重组体在 HEK293 细胞中的表达**　(×400)

## 3　讨论

高迁移率族蛋白是一类广泛分布于高等真核生物细胞核内的非组 DNA 结合蛋白,是维持核小体稳定,调控基因复制、转录等过程不可缺乏的调控蛋白[5]。近年来研究表明,HMGB1 作为"晚期"炎症介质参与脓毒症、急性肺损伤等的发病过程[1,6]。已知脂多糖(lipopolysaccharides, LPS、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)和白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)等通过活化单核巨噬细胞,促进 HMGB1 的释放;释放入血的 HMGB1 作用于多种类型细胞,诱生一系列炎性介质以及 HMGB1 自身的释放,引起炎症级联反应[7]。这就提示,HMGB1 在致炎细胞因子网络中可能是一个中心环节,不仅自身分泌有级联放大效应,而且还能调节其他炎性介质分泌。

HMGB1 在 VILI 的发病过程中发挥重要作用。大潮气量通气组(VT = 30 ml/kg)家兔支气管肺泡灌洗液(BALF)中 HMGB1 水平是小潮气量通气组(VT = 8 ml/kg)的 5 倍,而给予抗 HMGB1 抗体则明显降低机械通气引起的肺微血管通透性增加及支气管肺泡灌洗液中的 TNF-α 含量[3]。临床研究证实,正常人血清中 HMGB1 为阴性,长期应用机械通气的呼吸衰竭患者血清中 HMGB1 水平显著升高[8]。我们应用免疫组化技术观察到,VILI 大鼠肺组织 HMGB1 表达明显增加,并与肺毛细血管通透性和肺损伤的严重程度密切相关;Western blot 和 PCR 实验显示 16 ml/kg 的潮气量即可诱导 HMGB1 蛋白和 mRNA 的表达量显著增加,且其表达量与潮气量成正比;在体外细胞牵张模型中也证实了机械牵张对 HMGB1 的诱导表达作用[4]。因此,研究牵张应变激活的 HMGB1 表达调控对认识 VILI 的炎症反应机制有重要意义。

报告基因(reporter gene)技术是将一段已确定的顺式调控序列插入报告基因上游以控制报告基因的表达,从而直观地"报道"宿主细胞内某基因的表达调控与其相关信号转导通路的活动[9]。RFP 是新近鉴定的一个相对分子质量为 $28 \times 10^3$ 的荧光蛋白,具有观察方便、灵敏度高、对极端 pH 值和光漂白抗性强、定性和定量测定方便等特点,因而日益受到关注。

为了研究受机械牵张刺激的效应细胞 HMGB1 基因表达的调控机制,我们构建了 HMGB1 红色荧光蛋白报告基因并转染 HEK293 细胞。结果显示,在静息状态下,HMGB1 的表达很低或缺乏,这与以往的研究结果相符合;而在机械牵张作用下,可见由 HMGB1 启动子驱动的红色荧光蛋白基因高表达,发出高亮度的红色荧光。这表明,本研究构建的 HMGB1 启动子驱动的报告基因具有完整的细胞内功能,为进一步探讨机械牵张诱导 HMGB1 的基因表达调控和相关的信号转导机制,提供了一个方便、灵敏的工具。

## 参考文献:

[1] 王彦博, 姚咏明, 王　强, 等. 丙酮酸乙酯对烫伤大鼠肺组织高迁移率族蛋白 B1 表达和肺损伤的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(21): 1984 - 1987.

[2] Yang H, Ochani M, Li J, *et al*. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(1): 296 - 301.

[3] Ogawa E N, Ishizaka A, Tasaka S, *et al*. Contribution of high-mobility group box-1 to the development of ventilator-induced lung injury[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2006, 174(4): 400 - 407.

[4] 丁　宁, 肖　慧, 高　巨, 等. P38 及上游激酶 MKK6 对周期性牵张应变诱导的肺泡巨噬细胞高迁移率族蛋白 B1 表达的调控[J]. 生理学报, 2009, 61 (1): 49 - 55.

[5] 陈　婧, 袁志强, 彭毅志. 人高迁移率族蛋白的分子改建及原核表达[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(7): 572 - 575.

[6] Muller S, Ronfani L, Bianchi M E. Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function[J]. J Intern Med, 2004, 255(3): 332 - 343.

[7] Erlandsson-Harris H, Andersson U. Mini-review: The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator[J]. Eur J Immunol, 2004, 34(6): 1503 - 1512.

[8] Van-Zoelen M A, Ishizaka A, Wolthuls E K, *et al*. Pulmonary levels of high-mobility group box 1 during mechanical ventilation and ventilator-associated pneumonia[J]. Shock, 2008, 29(4): 441 - 445.

[9] Massoud T F, Paulmurugan R, De A, *et al*. Reporter gene imaging of protein-protein interactions in living subjects[J]. Curr Opin Biotechnol, 2007, 18(1): 31 - 37.

(编辑　龙　亮)