DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.11.001

文章编号: 1000-5404(1999)11-0777-03

论著

SAA3启动子调控的炎症诱导表达系统体内表达及对内毒素响应特性研究

太光平,汪仕良,王 裴,王桂珍,黎 鳌 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

【提要】 目的: 探索应用血清淀粉样蛋白启动子(SAA3)调控下游基因的可能性,利用构建的 SAA3启动子/氯霉素乙酰转移酶(CAT)表达载体观察 SAA3启动子/增强子应用于调控目的基因体内表达特性及对体内炎症信号刺激的响应特性。方法: 小鼠随机分2组,采用腹腔注射法转染脂质体/DNA复合物,48 h后LPS攻击,测定 LPS攻击后不同时间 CAT的诱导表达(ELISA法)及不同时间的血清 IL-6水平(ELISA法)。结果: LPS攻击可诱导转染小鼠 CAT在肝、肺表达,LPS活化迅速诱导肝脏 CAT表达,12 h达 3.74 ng/mg蛋白,36~48 h维持较高的表达水平,96 h下降;小鼠血清 IL-6的水平与肝脏 CAT表达显著正相关 $r=0.87$。结论: 本研究证实 SAA3启动子转录调控序列(-306~+47)在体内可响应炎症刺激灵敏启动、诱导下游的报告基因 CAT表达,适合于构建自适应炎症诱导性表达载体,为炎症疾病的基因治疗奠定基础及治疗新策略。

关键词 血清淀粉样蛋白启动子(SAA3);氯霉素乙酰转移酶(CAT);LPS;IL-6;基因治疗
中图法分类号 R394;R996 文献标识码 A

急性相反应蛋白(Acute responsive phase proteins, ARPS)是一类进化上高度保守的蛋白,能对各种炎性刺激灵敏响应。业已阐明,血液 ARPS水平的升高与创伤、感染及炎症反应的严重程度成正比,并随病程的波动而波动。ARPS主要在肝细胞合成(如补体 C_3、抗胰蛋白酶 a-AT),其中血清淀粉样蛋白启动子(Serum amyloid A_3, SAA3)既可表达于肝细胞,也表达于肝外单核细胞系统。SAA3启动子存在 IL-1、IL-6激活应答元件[1]。因此,利用 ARPS基因启动子能对病理信号迅速响应的特性,就可能使其调节的目的基因表达随疾病的病理生理信号(炎性反应水平)变化而改变,受疾病病理过程自动控制,为解决基因治疗中目的基因表达的时机和表达水平动态控制这关键问题将提供一极好的治疗基因调节策略[2]。本实验选用含 SAA3启动子(-306~+47)调节序列及报告基因氯霉素乙酰转移酶(Chloramphenicol acetyltransferase, CAT)的真核表达质粒(PSAA3CAT3),观察 SAA3启动子/增强子对报告基因调控作用及对体内炎症信号及刺激的响应特性,探索应用 SAA3体内调控基因表达的可能性。

1 材料与方法

1.1 动物

BALB/C小鼠,雌雄不限,体重 18~25 g,本校实验动物中心提供。

1.2 表达载体

PSAA3CAT3为一穿梭质粒,含鼠 SAA3启动区(-306~+47)转录调节序列,SAA3启动子下游为 CAT编码区及 SV40 poly A序列,系载体 pBLCAT3(EMBL/GenBank编号 X64409)的衍生载体,该载体由日本 Kanazawa大学 Yamamoto教授惠赠。常规质粒转化(DH5a大肠杆菌)及碱裂解法抽提、纯化质粒 DNA[3]。

1.3 体内基因导入

BALB/C小鼠随机分成两组,实验组(PSAA3CAT3 DNA + LPS攻击组)及对照组(PSAA3CAT3 DNA组),实验分3次进行,实验组 21只,对照组 14只。实验组每只小鼠腹腔注射 0.5 ml含 DNA 20 μg的 DNA脂质体复合物及生理盐水,实验组同时注射 250 μg LPS(*Ecoli* O111 B_4 Sigma),DOTAP脂质体购自 Boehringer Mannheim公司,对照组单纯腹腔注射 PSAA3CAT3 DNA脂质体复合物及生理盐水。不同时相点 12、24、36、48、72、96、120 h,取眼眶血,取肝、肾、脾、肺、肠,液氮冻存待测。

1.4 氯霉素乙酰转移酶 CAT的测定

收集不同时相点组织用 0.25 mmol/L Tris缓冲液冰浴中匀浆,反复冻融3次,12 000× g离心沉淀,取上清。Lowery法定蛋白含量,CAT酶联免疫试剂药盒(Boehringer Mannheim公司)测定 CAT蛋白水平。

1.5 血清 IL-6的测定

收集不同时相点血清,用 IL-6酶联免疫试剂药盒(第四军医大学免疫教研室提供),酶标仪测定 OD值,估计样品 IL-6含量。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39600140)
作者简介: 太光平,男,31岁,主治医师,博士
收稿日期: 1998-10-14;修回日期: 1999-08-06

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.6 统计学分析

所有数据 $\bar{x}\pm s$ 表示,以 t 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 转染小鼠体内脏器 CAT表达分布

LPS攻击可诱导转染 CAT在肝、肺表达,而未能在脾、肾、肠及血清检测到 CAT表达,该方法 CAT检测下限为 5 pg,见表 1。

2.2 肝脏 CAT诱导表达的时间动态分析

LPS活化迅速诱导肝脏 CAT表达,12 h达 3.74 ng/mg蛋白,36~ 48 h维持较高的表达水平,96 h下降,120 h接近对照组水平(2.74~1.80 ng/mg蛋白),见表 2。

表 1 LPS攻击不同脏器报告基因 CAT表达水平

Tab 1 LPS induced CAT expression in different organs *in vivo*

	CAT(ng/mg protein)					
	Liver	Lung	Spleen	Kidney	Intestine	Serum
CAT	16.26± 3.25	3.71± 2.43	–	–	–	–

表 2 LPS诱导肝脏报告基因 CAT表达动态分析(CAT ng/mg)

Tab 2 Kinetics of CAT expression in liver induced by LPS

12 h	24 h	36 h	48 h	72 h	96 h	120 h
3.72± 1.28	9.25± 3.86	18.28± 6.32	16.60± 5.18	8.54± 3.36	5.43± 1.08	3.04± 1.10

2.3 肝脏 CAT诱导表达的剂量效应关系

不同剂量内毒素攻击小鼠,结果显示 100 μg的内毒素 48 h已显著激活、启动了 CAT基因的表达,与 200 μg、300 μg剂量组间无显著差异($P > 0.05$),见表 3。

表 3 LPS诱导肝脏 CAT表达的剂量-效应关系

Tab 3 Dose-dependent expression of CAT in liver induced by LPS

	LPS(μg/mouse)				
	25	50	100	200	300
CAT(ng/mg)	8.62± 1.53	11.88± 3.80	15.52± 5.44	17.08± 7.59	17.34± 6.21

2.4 小鼠血清炎症介质水平与 CAT诱导表达的相关分析

相关分析显示 LPS攻击肝脏 CAT表达与小鼠血清 IL-6的水平显著正相关 $r = 0.87$,见图 1。

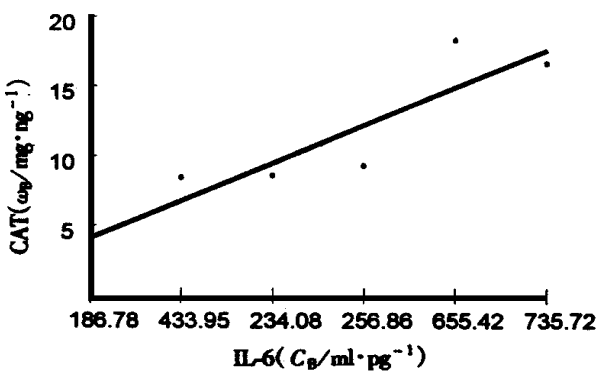


图 1 肝脏 CAT表达与血清 IL-6水平的相关分析

Fig 1 Correlation analysis of hepatic CAT expression and serum IL-6 level

3 讨论

目前普遍采用的基因治疗载体其目的基因的表达受载体自带启动子自发激活,表达不受限制,不能解决目的基因表达的时机和表达水平动态控制这一关键问题,难于符合临床要求(可控制性基因治疗)。急性相反应是生物界较普遍的一种对各种炎性打击(创伤、感染)的应答及保护性反应。业已阐明血清急性相反应产物(C-RP)、小鼠血清淀粉样蛋白(SAA)的表达正比与疾病(感染、创伤)的严重程度,随疾病病程的变化而波动。SAA在 LPS攻击后 24 h后血清水平增加 1 000倍;体外 20%的单核细胞上清诱导的肝细胞 HepG2 SAA mRNA表达增加 150~ 224倍(6~ 24 h)及 375倍(48 h)。其中 SAA3是唯一既能在肝细胞合成,亦在肝外细胞如巨噬细胞表达的 SAA蛋白[4]。SAA3能表达于多种细胞系统的特性对炎性疾病基因治疗有独特意义。本研究选用的 SAA3启动子调节序列(- 306~ + 47),其包括了外显子Ⅰ,邻近转录起点的 31 bp的保守序列 TATA盒子,含有 C/EBP增强子结合蛋白元件,NF-KB结合元件(- 164~ - 155 ATTTCTG-GAAATGCC)、NF-IL-6(IL-6核因子)作用元件及肝组织特异性增强子元件(- 96~ - 38)[5]。本试验证明腹腔注射转染 CAT基因主要在肝脏诱导表达,肺有低水平表达,而脾、肾、肠及血液均无可测水平的 CAT表达。CAT体内分布特点与该表达体系中启动子、增强子组织特异性元件及脂质体分布特点有关。LPS攻击 12 h小鼠肝 CAT开始上升,36~ 48 h维持在较高

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

水平,至 120 h回降,该结果与小鼠内源性 SAA水平峰值时间相似[6]。本试验 SAA3启动子/增强子调节 CAT体内表达有诱导表达特性。LPS活化 36~ 48 h,肝 CAT表达增加 6.71~ 7.40倍,CAT表达水平与 LPS剂量有关,但不同剂量 LPS诱导 CAT表达水平个体变异较大。IL-6被认为是肝急性期蛋白的主要活化因子,LPS攻击组小鼠血清 IL-6水平与 CAT表达水平正相关,相关系数 r= 0.87 说明内源性细胞 SAA3启动子调节元件可有效指导下游目的基因在体内表达,其表达水平依赖于炎症介质水平,提示用急性期反应蛋白 SAA3启动子调控目的基因表达的策略是可行的。

参考文献

[1] Rygg M, Husby G, Marhaug G. Differential expression of rabbit serum amyloid A genes in response to various inflammatory agents[J]. Scand J Immunol, 1993, 38(5): 417 - 422.

[2] Brigham K L, Canonico A E, Meyrick B O, *et al*. Gene therapy for inflammatory diseases[J]. Prog Clin Biol Res, 1994, 388(15): 361- 365.

[3] 太光平,王　裴,陈　渝,等.培养细胞 SAA3启动子调控的基因表达及对炎症信号的响应特性研究[J].第三军医大学学报, 1999, 21(10): 705- 708.

[4] Ray B K, Ray A. Functional NF-kappa B element in rabbit serum amyloid A gene and its role in acute phase induction[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 193(3): 1159- 1167.

[5] Uhlar C M, Grehan S, Steel D M, *et al*. Use of the acute phase serum amyloid A2(SAA2) gene promoter in the analysis of pro- and anti-inflammatory mediators: Differential kinetics of SAA2 promoter induction by IL-1 beta and TNF-alpha compared to IL-6[J]. Methods Immunomethods, 1997, 203(6): 123- 130.

[6] Varley A W, Geiszler S M, Gaynor R B, *et al*. A two-component expression system that responds to inflammatory stimuli *in vivo*[J]. Nat Biotechnol, 1997, 15(10): 1002- 1006.

(编辑　冷怀明)

Study of SAA3-mediated inflammation inducible expression system *in vivo* and the responsive characteristics to endotoxin

TAI Guang-ping, WANG Shi-liang, WANG Pie, WANG Gui-zhen, LI Ao (Institute of Burn Research, Southwestern Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract **Objective**: To study the expression characteristics of pSAA3/CAT *in vivo* and its responsive charcteristics to inflammatory stimulus in order to assess the possibility to modulate a target gene with the promotor of serum amyloid A_3 gene (SAA3). **Methods**: Mice were randomized into two groups. They received intraperitoneally administration of pSAA3CAT-liposome mixture and then were challenged with LPS. CAT expression in the organs of the mice and their serum content of IL-6 were determined with ELISA. **Results**: LPS attack induced CAT receptor expression in the liver and lung. In the liver, CAT expression reached 3.74 ng/mg in the 12th hour after LPS attack and the peak value of CAT expression occured between the 24th and 48th hour. CAT expression began to decline after the 96th hour. The intensity of CAT expression in the liver was dependent on the dosage of LPS. The intensity of CAT expression in the liver was positively correlated to the serum content of IL-6 (r= 0.87). **Conclusion**: Our findings suggest that the promotor of SAA3 transcription modulation sequence (- 306~ + 46) is able to response to inflammatory stimulation sensitively, promote and induce the expression of the downstream gene of CAT, which is suitable to construct an inflammation-inducible vector. Our findings provide theoretical basis of gene therapy for inflammatory disease.

Key words serum amyloid A_3 gene; promotor; CAT; IL-6; gene therapy; mouse

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(39600140)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net