DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.10.003

文章编号:1000-5404(1999)10-0705-04

培养细胞SAA3启动子调控基因表达及对炎症信号的响应特性研究*

太光平** 王 裴 陈 渝 尤忠义 汪仕良 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**:利用构建的血清淀粉样蛋白启动子(SAA3)报告基因表达载体观察SAA3启动子/增强子应用于调控目的基因在培养细胞株的表达及对炎症刺激的响应特性,探索SAA3用于调控靶基因的可能性。**方法**:pSAA3CAT3采用脂质体转染U937细胞、肝细胞株SMMC7721,48 h后LPS、重组rIL-6+rIL-1、巨噬细胞活化上清(CM)攻击、测定不同时间CAT的诱导表达(ELISA法)。**结果**:LPS活化的转染U937细胞,6 h CAT开始表达,24 h达峰值,LPS活化后4.6倍增加CAT基因的表达,72 h开始下降;重组rIL-6+rIL-1联合诱导,10%、20%CM诱导转染SMMC7721细胞24 h可启动报告基因表达,20%的条件活化上清诱导作用显著,6 h始启动,36~48 h达峰值,96 h下降;本研究结果显示在0.1~62.5 ng/ml的剂量范围内,rIL-6+rIL-1联合诱导剂量依赖诱导转染U937细胞、SMMC7721细胞报告基因CAT的表达。**结论**:本研究证实SAA3启动子转录调控序列(-306~+47)可启动SMMC7721、U937细胞转染报告基因CAT表达,SAA3启动子适用于构建炎症诱导性表达载体,将为基因治疗的表达调控提供新治疗策略及方法。

关键词 血清淀粉样蛋白启动子(SAA3);氯霉素乙酰转移酶(CAT);LPS;基因治疗
中图法分类号 Q789 **文献标识码**:A

急性相反应蛋白(Serum amyloid A3,SAA3)是一类进化上高度保守的应激蛋白,是机体对感染、创伤及炎性刺激的保护性应答反应。SAA3启动子上游调控序列存在IL-1、IL-6等激活因子应答元件[1]。对病理信号及炎症介质响应的SAA3启动子有可能用于解决治疗基因表达的时机和表达水平动态控制这一基因治疗的关键问题[2]。本研究探索SAA3启动子在体外细胞株对报告基因表达的调控作用及炎症信号刺激的响应特性。

1 材料与方法

1.1 细胞株

U937细胞株(人单核细胞,本校免疫学教研室引进),SMMC7721(人肝癌细胞株,本所保存),细胞培养常规用10% FCS的DMEM培养。

1.2 主要试剂及药盒

DOTAP脂质体转染药盒、质粒DNA抽提药盒、报告基因CAT ELISA药盒(Boehringer Mannheim公司),重组IL-6、IL-1(邦定公司),LPS(*E. coli* 0111:B4, Sigma公司)。

1.3 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启动子下游为报告基因氯霉素乙酰转移酶编码区(CAT)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。

1.4 培养细胞的基因转染

常规质粒转化大肠杆菌*DH5α*,碱裂解法抽提、纯化质粒DNA。DNA/脂质体复合物的制备:溶液A,取10~15 μg pSAA3CAT3质粒DNA,用HEPES缓冲液稀释至50 μl;溶液B,取10 μl DOTap脂质体用HEPES缓冲液稀释至50 μl,混合A、B溶液,轻轻摇匀,室温静置10~25 min,可见云雾状。基因转染:生长良好的U937细胞,SMMC7721细胞换液后,调整细胞数量为5×10^6/ml,每瓶2 ml加入脂质体复合物100 μl,37℃培养过夜,次日换液,调整细胞数量为1×10^5/ml,加入24孔板进入试验。

1.5 报告基因CAT的表达诱导

分别用LPS(10 μg/ml)活化U937细胞,用10%或20%的活化巨噬细胞上清(CM)活化SMMC7721细胞。不同剂量的rIL-1+rIL-6分别刺激U937细胞及SMMC7721细胞,不同时间收集细胞测定CAT表达。

1.6 报告基因CAT表达的测定

转染培养细胞用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。加样:取CAT标准品200 μl(0.5、0.25、0.125 ng/ml)及样品加入MTP包被板中加盖,37 ℃ 1 h,加抗CAT-DIG标记一抗200 μl,37 ℃摇床孵育1 h,加冲洗液250 μl冲洗1 min,重复3次。加二抗(POD标记抗DIG抗体)200 μl 37 ℃摇床孵育2 h,冲洗30 s,重复3次。加显色液200 μl 37 ℃显色10~24 min,在405 nm、490 nm测吸光度,以A_{405}~A_{490}对CAT浓度作图,估计CAT浓度。

1.7 统计学处理

用SSPS统计程序包处理。

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39600140
** 太光平,男,31岁,主治医师,博士

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

2 结果

2.1 表达载体 pSAA3CAT3 的鉴定

pSAA3CAT3 表达载体结构见图 1。

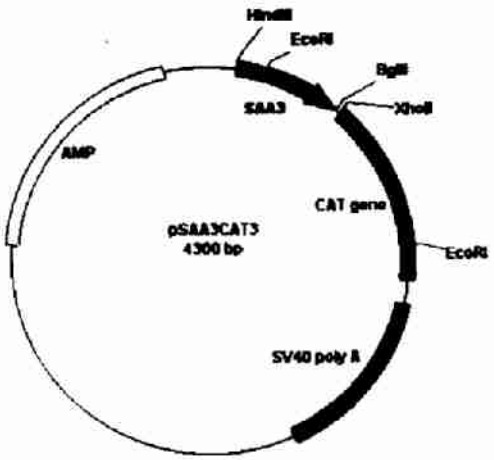


图 1 pSAA3CAT3 表达载体结构示意图

Fig 1 Structure of pSAA3CAT3 expression vector

根据质粒载体酶切图谱，其酶切片段符合理论计算值，见图 2。

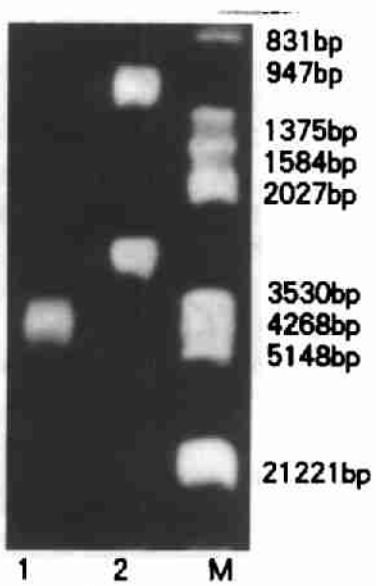


图 2 表达载体 pSAA3CAT3 的酶切鉴定

Fig 2 Restrictive enzyme analysis of pSAA3CAT3 expression vector

Lane 1: *Hind* Ⅲ; Lane 2: *EcoR* Ⅰ; M: Marker

2.2 培养细胞株 CAT 表达动态

LPS 活化 U937 细胞 6 h 可见 CAT 表达，LPS 诱导 7.4 倍增加 U937 细胞 CAT 基因表达，72 h 后回落；20% 的活化上清可显著诱导转染 SMMC7721 的报告基因表达，6 h 检出，36～48 h 达峰值，96 h 显著下降，见表 1。

表 1 体外培养细胞株 CAT 诱导表达动态(ng/mg，$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Kinetics of expresston of CAT in U937 cell and SMMC7721 cell lines(ng/mg，$\bar{x}\pm s$)

Time(h)	CAT	
	U937	SMMC7721
12	2.53±0.25	1.33±0.17
24	4.02±0.30	2.57±0.61
36	6.54±0.76	4.22±0.67
48	4.72±0.27	4.10±0.82
72	2.63±0.66	2.05±0.30
96	1.32±0.02	1.49±0.36

2.3 U937 细胞 CAT 表达的剂量效应关系

rIL-6＋rIL-1 联合活化 U937 细胞 24 h，在 0.1～62.5 ng/ml 的剂量范围内，U937 细胞 CAT 表达有剂量依赖性，见表 2。

表 2 rIL6＋rIL-1 诱导 U937 细胞 CAT 表达剂量效应关系(ng/mg，$\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Dose-dependent expression of CAT induced by rIL-6＋IL-1 in U937 cell(ng/mg，$\bar{x}\pm s$)

	rIL-6＋rIL-1(ng/ml)				
	0.1	0.5	2.5	12.5	62.5
CAT	1.34±0.17	4.70±0.62	5.46±0.13	6.30±1.16	6.73±1.92

2.4 肝细胞 CAT 的诱导表达特性

IL-6＋IL-1 联合作用 24 h，启动报告基因 CAT 诱导表达，20% 的活化巨噬细胞上清 CM 对 SMMC7721 细胞 CAT 表达诱导作用水平显著高于 IL-6＋IL-1 联合作用的诱导表达效应，见表 3。

表 3 肝细胞 CAT 的诱导表达特性(ng/mg，$\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Characteristics of CAT expression in SMMC7721 cell(ng/mg，$\bar{x}\pm s$)

	IL-1＋IL-6(ng/ml)		CM(%)	
	12.5	62.5	10	20
CAT	1.67±0.23	2.87±0.41	3.01±0.36	6.47±0.79

3 讨论

SAA 基因家族中，SAA3 是唯一既能在肝细胞合成，也可以在肝外细胞如巨噬细胞表达的 SAA 蛋白。SAA3 启动子能调控自身编码基因在肝脏及网状巨噬细胞系统表达的特性，对于 SAA3 启动子应用于炎性

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

疾病如抗炎症介质的细胞因子基因治疗有独特的意义。有报道 LPS 攻击小鼠 24 h 后，血清中 SAA 蛋白水平增加 1 000 倍；体外 20% 的条件培养基（单核巨噬细胞上清）诱导 HepG2 细胞表达 SAA mRNA，可 24 倍（6 h），375 倍（24 h）增加 SAA mRNA 表达[3]。SAA3 对炎症信号灵敏响应，可调节下游目的基因的表达，随疾病（感染、创伤）的病程而启动或终止治疗基因的表达，从而实现由疾病（炎性反应水平）病理过程自动控制治疗基因的表达水平的新型基因治疗策略[4]。本研究显示 LPS 活化 U937 细胞 6 h CAT 开始表达，LPS 诱导 4.6 倍增加 CAT 基因的表达。而 rIL-6＋rIL-1 联合诱导及 10%、20% 活化上清诱导 24 h 可启动转染肝细胞株 SMMC7721 报告基因表达。rIL-6＋rIL-1 联合活化 24 h，在 0.1～62.5 ng/ml 的剂量范围内，转染 U937 细胞报告基因 CAT 表达有剂量依赖性。Bogdan[5]报道 LPS 活化巨噬细胞 IL-6 产生，2 h 始起动，6 h 达峰值 1 800 pg/ml，12 h 降至 700 pg/ml，维持至 24 h，48 h 降至 300 pg/ml；Richards[6]报道 20% 的活化上清或 rIL-1 可在体外活化培养肝细胞表达 SAA3，SAA3 mRNA 3 h 开始增加，24 h 达峰值，体外活化可 10～15 倍增加 SAA2/CAT 嵌合基因的表达[7,8]。本试验证实单独 rIL-1 或 rIL-6 不能启动诱导肝细胞 CAT 表达，单独 LPS 也不能活化肝细胞 CAT 的表达。业已阐明肝细胞存在 3 条信号途径可启动 APP（急性相反应蛋白）表达。IL-1 可诱导鼠肝及转染了人 SAA 表达质粒的纤维母细胞 SAA 表达，但不能单独诱导人肝细胞 SAA 表达，唯有条件活化上清可激活多数 APP 的表达[9]，与本试验 SAA3/CAT 报告基因诱导表达的特征相符。

本实验说明，内源性细胞启动子调节元件可有效指导下游目的基因在体外细胞表达，其表达水平与炎症介质水平有关。本研究提示 SAA3 启动子/增强子元件调控目的基因表达的策略是可行的，由于 SAA3 独特的炎症诱导性、应答性表达及自动终止等表达特点，提示其将可能用于细胞因子（IL-10）基因治疗及炎症介质拮抗剂分子（IL-1ra、sTNF-R）基因治疗中调控治疗基因表达[9]。

参考文献

1 Ray A, Ray BK. Serum amyloid A gene expression level in liver in response to different inflammatory agents is dependent upon the nature of activated transcription factors. DNA Cell Biol, 1997, 16(3): 1

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

3 Betts J C, Cheshire J K, Akira S, *et al*. The role of NF-kappa B and NF-IL6 transactivating factors in the synergistic activation of human serum amyloid A gene epxression by interleukin-1 and interleukin-6. J Biol Chem, 1993, 268(34): 25624

4 Hiroko S, Yamamoto K. NF-kB and C/EBP transcription factor families synergistically function in mouse serum amyloid A gene expression induced by inflammatory cytokines. Gene, 1994, 149(10): 305

5 Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. J Exp Med, 1991, 174(6): 1549

6 Richard C, Gauldie J, Baumann H. Cytokine control of acute phase protein expression. Eur Cytokine Netw, 1991, 2(2): 89

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

8 Hiron M, Daveau M, Arnaud P, *et al*. The human hepatoma Hep3B cell line as an experimental model in the study of the long-term regulation of acute-phase proteins by cytokines. Biochem J, 1992, 287(Pt 1): 255

9 McCoy R D, Davidson B L, Roessler B J, *et al*. Expression of human interleukin-1 receptor antagonist in mouse lungs using a recombinant adenovirus: Effects on vector-induced inflammation. Gene Ther, 1995, 2(7): 43

（收稿：1998-12-04，修回：1999-09-05）

（编辑　王　红）

Study of expression of SAA3 promotor in incubating cells and responsive characteristics of the gene to inflammatory stimulus*

Tai Guangping, Wang Pei, Chen Yu, You Zhongyi, Wang Shiliang, Li Ao (Research Institute of Burn Injury, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To study the expression characteristics of constructed pSAA3/CAT and its responsive characteristics to inflammatory stimulus in incubating cells in order to assess the possibility to modulate a target gene in gene therapy with the promotor of serum amyloid A3 gene (SAA3). **Methods**: U937 and

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39600140

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

SMMC7721 cell lines were transfected with pSAA3CAT3 using Dotap liposome. The cells were incubated for 48 h and then challenged with LPS, rIL-6+IL-1 or conditioned medium (CM). The expression of CAT was detected with ELISA. **Results**: In U937 cells, LPS challangerapidly induced CAT expression. In the 6th hour after LPS stimulation, there was a 4.6 fold increase of CAT expression which began to decline in the 96th hour. rIL-6+IL-1 or 20% and 10% CM were also effective to induce CAT expression in SMMC7721 cells. 20% CM resulted in CAT expression in the 6th h after stimulation, reached the peak value between 36th to 48th hour and began to decrease after 96th hour. The combined stimulation of rIL-6+IL-1 (0.1～62.5 ng/ml) induced CAT expression in a dosage-dependent and inflammation inducible manner in U937 cells and in SMMC7721 cells too. **Conclusion**: Our findings suggest that SAA3 is suitable to construct inflammation-inducible vector, which provides new therapeutic strategy and methods for the expression of target gene in gene therapy.

Key words　serum amyloid A3 gene (SAA3); promotor; LPS; IL-6; CAT gene therapy

个案与短篇

文章编号:1000-5404(1999)10-0708-02

加压舱内婴幼儿氧罩的研制与应用

Development of oxygen mask used in pressure-oxygen cabin for infants and its application

张香菊*　王　勇　王湘渝　李兴明　晏莉娜　谭　聪　郑世钢　(第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所高压氧治疗科)　重庆,400042

婴幼儿在高压氧治疗时因肺活量小、吸排氧阻力大造成吸氧困难而难以达到治疗效果等问题。

为此,我科在 1997～1998 年间,研制成在加压舱中用于婴幼儿进行高压氧治疗的氧罩(简称婴幼儿氧罩)。通过多次调试、检测及婴幼儿治疗表明,此氧罩能满足出生后的新生儿至学龄前儿童的高压氧治疗。现将研制和应用情况报告如下。

1　婴幼儿氧罩的设计与制作[1]

该罩由罩体和不锈钢架平车组成:①罩体采用半圆形无毒透明有机玻璃板材质用氯仿密封粘合而成。有机玻璃厚度为 10 mm,罩体长 1 000 mm,宽 580 mm,高 450 mm,为增强罩体强度,其底部用厚 2 mm,宽 120 mm 的两层不锈钢板及钢板之间用厚 8 mm,宽 120 mm 的铝型材料包绕,在铝型材料底部用不锈钢螺丝固定磁性橡胶密封条。②不锈钢平车架采用厚 1 mm,直径 38 mm 的不锈钢管焊接而成,车架长 1 400 mm,宽 680 mm,高 780 mm,车架上固定安放一阻燃板,长 1 200 mm,宽 680 mm,厚 300 mm,其板上铺放一层 3 mm 厚不锈铁板,长、宽与阻燃板大小一致。车架一侧设有氧罩控制板,板上装有控制进罩内氧气的转子流量计及显示罩内压力的膜盒压力表。在阻燃板和不锈铁板的 4 个角适当的位置开设 4 个小孔,B 号孔与膜盒压力表相连接,A 号孔与转子流量计出氧管口相连接,4 号孔采用三通管分别与转子流量计进氧口及进氧软管相连,C 号孔与排气管相连接,上述联接方法均用橡胶管。不锈钢车架的四只脚安装有橡胶万向轮。③罩体与车架组合:罩体的长边一侧外面安装 2 个自锁合页并固定在阻燃板上,而对侧外面安装 2 付紧固扣,中间安有一提手,其罩体短边一侧外面安装 1 个定位卡。

2　使用方法及检测结果

2.1　使用方法

将婴幼儿氧罩推入高压舱内后,操作者(陪伴或医护人员)握住提手将氧罩揭开,使氧罩由定位卡支撑成 70°的角度,然后将排气管与高压氧舱内排气阀的波纹管相连接,进氧软管与高压舱内进氧管开关相连。待高压氧舱压力加压到患儿所需治疗的压力后,将患儿放入氧罩内,操作者一手握住提手,另一手将定位卡向后推使定位卡脱离支撑作用后将氧罩慢慢地放下盖严,再将紧固卡扣住。然后将高压舱内的进氧开关打开,再将婴幼儿氧罩的转子流量计旋钮开关反时针旋转使氧流量固定在 800 L/h,接着打开充氧开关,使膜盒压力表指针在 500 Pa 位

(下转 711 页)

*　张香菊,女,44 岁,副主任技师

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