

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.03.005

稳定表达人 BACE1 启动子及荧光素酶报告基因 HEK293 细胞株的建立*

邓常青^{1,2},朱炳林¹,龙艳¹,罗伟¹,陈国俊^{1△}

(1. 重庆医科大学附属第一医院神经病学重点实验室,重庆 400016;2. 重钢总医院重症医学科,重庆 400037)

[摘要] **目的** 对人 β 位点裂解酶-1(BACE1)基因核心启动子进行克隆,构建携带 BACE1 基因启动子的荧光素酶报告载体,筛选稳定表达细胞株并分析其转录活性。**方法** 提取人胚肾 HEK293 细胞基因组 DNA,以其为模板,PCR 扩增 BACE1 核心启动子(-691~+67)并克隆至荧光素酶报告载体 pGL4.21 中,构建 BACE1 基因启动子荧光素酶报告载体 pGL4.21-BACE1,将其转染 HEK293 细胞(无启动子的 pGL4.21 载体作阴性对照),利用嘌呤霉素筛选稳定表达株后检测其转录活性。**结果** 成功扩增到 758 bp 的 BACE1 核心启动子,pGL4.21-BACE1 载体经双酶切鉴定正确;HEK293 细胞被该载体转染后经嘌呤霉素筛选得到 6 株稳定表达 BACE1 启动子的细胞株,其转录活性分别是对照组(HEK293/pGL4.21)的(134.7±22.3)、(634.0±13.9)、(437.6±6.1)、(805.5±5.5)、(492.8±59.1)、(1 021.1±46.6)倍($P=0.001$)。**结论** 成功构建了人 BACE1 基因启动子荧光素酶报告载体。

[关键词] β 位点裂解酶-1;核心启动子;荧光素酶报告载体;高通量药物筛选**[中图分类号]** Q291**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)03-0302-03**Construction of HEK293 cell line stably expressing human BACE1 promoter and luciferase reporter gene***Deng Changqing^{1,2}, Zhu Binglin¹, Long Yan¹, Luo Wei¹, Chen Guojun^{1△}

(1. Key Laboratory of Neurology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Department of Intensive Medicine, Chonggang General Hospital, Chongqing 400037, China)

[Abstract] **Objective** To clone human β -site APP cleaving enzyme (BACE1) gene core promoter for constructing luciferase reporter gene vector carrying BACE1 gene promoter and screening stable expression cell line, and to investigate its transcriptional activity. **Methods** The human embryo kidney HEK293 cell genome DNA was extracted as the template, BACE1 core promoter(-691~+67) was amplified by PCR, then was inserted into luciferase reporter vector pGL4.21. BACE1 gene promoter luciferase reporter vector pGL4.21-BACE1 was constructed, which was transfected into HEK293 cell (pGL4.21 vector without promoter as the negative control), after screening stable expression cell line by puromycin, the transcriptional activity was detected. **Results** About 758 bp BACE1 gene core promoter was successfully amplified by PCR. pGL4.21-BACE1 vector was correct by double enzyme identification. After transfecting HEK293 cell by this vector, 6 cell strains stably expressing BACE1 promoter were obtained, and their transcriptional activities were (134.7±22.3), (634.0±13.9), (437.6±6.1), (805.5±5.5), (492.8±59.1), (1 021.1±46.6) times($P=0.001$) of the control group(HEK293/pGL4.21) respectively. **Conclusion** Luciferase reporter vector of BACE1 gene promoter is constructed successfully.

[Key words] β -site APP cleaving enzyme-1; core promoter; luciferase reporter gene vector; high-throughput drug screening

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种神经退行性疾病,近年来其发病率不断增高。现有许多证据支持淀粉样蛋白(amyloid beta, A β)的沉积是 AD 主要致病机制之一^[1]。因此,减少 A β 沉积成为治疗 AD 的一条重要途径。 β 位点裂解酶-1(BACE1)是体内主要的 β -分泌酶,是裂解淀粉样前体蛋白(APP)产生 A β 的限速酶。A β 具有神经毒性,可引起神经突触功能障碍、神经元丢失,进而导致认知功能受损^[2]。研究表明,在小鼠脑内注射 BACE1 的小干扰 RNA 可减轻 APP 转基因小鼠的 A β 沉积和提高认知功能^[3-6],这说明抑制 BACE1 表达会改善 A β 相关的认知功能障碍,因此 β -分泌酶 BACE1 被作为开发 AD 药物的潜在靶点。

目前,BACE1 基因单核苷酸多态性与 AD 发病是否相互作用尚未定论^[7-8],而针对 BACE1 分子的靶向治疗有望为治

疗 AD 提供新思路,但对于 BACE1 分子的上游调控机制仍不清楚。为此本试验通过克隆人 BACE1 基因核心启动子区,构建荧光素酶报告系统并筛选其稳定表达细胞株,为进一步研究 BACE1 基因转录调控、多态性分析及其高通量药物筛选提供有力工具。

1 材料与方法

1.1 材料 人胚肾 HEK293 细胞为本实验室保存;Phanta HS 高保真 DNA 聚合酶购自 Vazyme 公司;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司;无内毒素质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒、荧光素酶报告质粒 pGL4.21、荧光素酶检测试剂购自 Promega 公司;TRIzol、脂质体 2000 购自 Invitrogen 公司;DMEM 培养基、Opti-MEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司;嘌呤霉素、二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司;感受态细

* 基金项目:国家自然科学基金国际合作重大项目(81220108010);国家自然科学基金(81171197);重庆市卫生局重点基金(2011-1-018)。

作者简介:邓常青(1980—),主治医师,本科,主要从事阿尔茨海默病发病机制方面研究。△ 通信作者,E-mail: woodchen2015@163.com。

胞 DH5 α 购自北京鼎国公司;引物由上海英骏生物技术有限公司合成。其余试剂为进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 人基因组模板的制备 取对数生长期的 HEK293 细胞,采用 TRIzol 法^[9]提取基因组 DNA,置于 -20 °C 保存备用。

1.2.2 人 BACE1 基因启动子的扩增 以基因组 DNA 为模板,采用 Phanta HS 高保真 DNA 聚合酶以特异性引物扩增 BACE1 基因上游约 758 bp 的核心启动子(-691~+67)区,上游引物:5'-CTA GCT AGC CAG CCA TTT CTC CTC AGT CTG-3',下游引物:5'-CCG CTC CTC GAG TCA GGC CAC CAT AAT CCA GCT-3',下划线分别为 NheI 和 XhoI 酶切位点。PCR 反应体系为:10 \times PCR 缓冲液 3.0 μ L,dNTPs 1.0 μ L,上下游引物各 0.5 μ L (10 μ mol/L),Phanta HS 酶 0.5 μ L,基因组 DNA 3.0 μ L,加 ddH₂O 补足至 30.0 μ L。反应条件:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 30 s,56 °C 退火 60 s,72 °C 延伸 30 s,共 30 个循环;72 °C 延伸 7 min,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.3 BACE1 基因启动子荧光素酶报告载体的构建 PCR 产物和 pGL4.21 载体经 NheI 和 XhoI 双酶切后,在 T4 DNA 连接酶作用下 16 °C 连接过夜并转化入 DH5 α 感受态细胞,挑取 2 个氨苄青霉素筛选的阳性克隆。再经 NheI 和 XhoI 双酶切鉴定后送上海英骏公司测序,测序正确的命名为 pGL4.21-BACE1,提取质粒后 -20 °C 保存备用。

1.2.4 细胞培养及稳定表达株的筛选 HEK293 细胞培养于含有 10% 胎牛血清,100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基,置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。将汇合度约 80% 的 HEK293 细胞以 4 \times 10⁵ 接种 6 孔板,待细胞贴壁生长至约 70%~80% 汇合度时进行转染。用 Opti-MEM 培养基分别稀释载体 pGL4.21-BACE1 (每孔 5 μ g) 和脂质体 (每孔 5 μ L) (单独转染 pGL4.21 作为阴性对照组),室温孵育 5 min,载体和脂质体混合后室温孵育 20 min,加入 HEK293 细胞中,37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。转染后 48 h 采用 1 μ g/mL 浓度的嘌呤霉素筛选,筛选第 14 天时采用 96 孔板有限稀释法克隆化,待单细胞长满后转至 24 孔板继续培养,然后依次转至 12 孔板、6 孔板及 10 cm 培养皿继续扩大培养(此过程 2~3 个月)。得到来自 6 株单克隆扩大培养的稳定表达细胞株,用化学发光仪检测其转录活性。选取荧光强度最高的进行后续试验并命名为 HEK293/pGL4.21-BACE1 (阴性对照组命名为 HEK293/pGL4.21)。

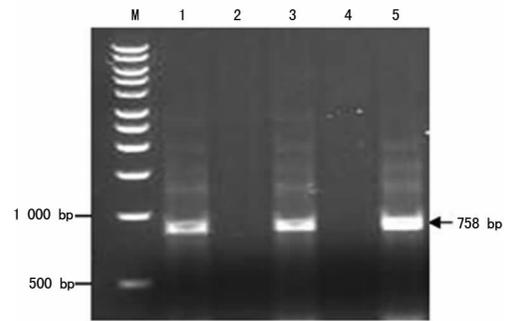
1.2.5 荧光素酶活性测定 荧光素酶活性测定按照荧光素酶活性检测试剂盒说明书进行操作。简单来说,将 HEK293/pGL4.21-BACE1 和 HEK293/pGL4.21 (阴性对照组) 细胞以 2 \times 10⁴ 接种 96 孔板(各 3 个重复孔),培养 24 h 后每孔加与培养基等体积的 Luciferase Reagent,轻轻混匀。室温裂解 10 min 后在化学发光仪 Glomax 96 (Promega) 中测量萤火虫荧光素酶活性。

1.3 统计学处理 采用 SAS14.0 的统计软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 Excel student's *t* 检验分析,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BACE1 基因启动子扩增产物的鉴定 提取 HEK293 细胞

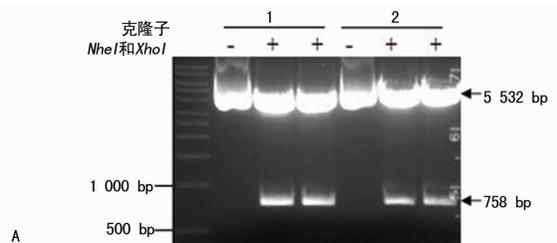
基因组 DNA,以其为模板进行 PCR 扩增 BACE1 基因上游长度 758 bp 的核心启动子(-691~+67),PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳可见大小约 758 bp 的条带,与目的片段大小相符,见图 1。



M:DNA 相对分子质量标准;泳道 1~5:BACE1 基因启动子。

图 1 BACE1 基因启动子的 PCR 扩增

2.2 荧光素酶报告载体 pGL4.21-BACE1 的构建与鉴定 758 bp 的 PCR 产物与携带萤火虫荧光素酶基因的 pGL4.21 分别以 NheI 和 XhoI 双酶切,连接并转化 DH5 α 后挑取 2 个阳性克隆子。经 NheI 和 XhoI 双酶切后可见大小约 5 532 bp (pGL4.21) 与 758 bp (BACE1 启动子) 的 2 个片段出现(图 2A)。测序验证也正确,这说明本研究成功构建携带 BACE1 启动子的荧光素酶报告载体,见图 2B。



A: 荧光素酶报告载体 pGL4.21-BACE1 的酶切鉴定;B: 携带 BACE1 基因启动子的荧光素酶报告载体结构图。Luc2P: 萤火虫荧光素酶基因;PSV40:SV40 启动子;Puro: 嘌呤霉素抗性基因;1:1 号克隆子;2:2 号克隆子。

图 2 荧光素酶报告载体 pGL4.21-BACE1 的鉴定及结构图

2.3 构建稳定表达 BACE1 启动子的细胞系 pGL4.21-BACE1 和阴性对照 pGL4.21 转染 HEK293 细胞(6 孔板)后 48 h,培养基中加入嘌呤霉素进行稳定筛选。培养第 14 天时采用有限稀释法克隆化,最后筛选得到 6 株单克隆稳定表达细胞株 HEK293/pGL4.21-BACE1 (克隆子 1~6)。

2.4 稳定表达细胞株具有转录活性 本研究对筛选到的 6 株稳定表达细胞株进行荧光素酶活性检测(把阴性对照组 HEK293/pGL4.21 的荧光值看作 1)。结果表明,克隆子 1~6 均具有较强的荧光活性,其荧光值分别为对照组(HEK293/pGL4.21)的(134.7 \pm 22.3)、(634.0 \pm 13.9)、(437.6 \pm 6.1)、(805.5 \pm 5.5)、(492.8 \pm 59.1)、(1 021.1 \pm 46.6)倍($P=0.001$)。其中,6 号克隆子荧光活性最强,作为后续试验使用。

3 讨论

BACE1 是人体内唯一的 β 分泌酶,它能剪切 APP 生成

A β ,且在 AD 患者脑中,A β 是淀粉样炎症斑的主要组成成分,A β 沉积在 AD 的发生、发展中起着关键作用。抑制 BACE1 活性以降低 A β 生成成为治疗 AD 的靶点。目前对 AD 治疗的研究均致力于开发 β -和 γ -分泌酶抑制剂,以抑制 A β 的产生^[10-13],但是 APP 还可以被 α -和 γ -分泌酶裂解产生可溶性且具有神经营养和神经保护作用的 sAPP α 片段。所以非特异性地抑制 γ -分泌酶会导致生理功能紊乱^[14]。有报道称在 AD 发病过程中,A β 随着 BACE1 的上调而增多,并与 AD 发病呈正相关^[15];用 BACE1 siRNA 处理神经干细胞后 A β 产生明显减少^[6]。BACE1 过表达或活性增强可能导致 A β 过度产生,最终诱导认知功能损伤。因此,针对 BACE1 的靶向治疗可能成为治疗 AD 的一种新途径^[10-12]。因此,构建携带 BACE1 基因的荧光素酶报告载体来研究 BACE1 基因的调控和功能具有重要意义。

利用荧光素酶报告载体研究启动子对下游基因的调控,可以避免下游基因表达产物对启动子的干扰,能较好地反映外在因素对调控序列的影响。近年来,利用荧光素酶报告基因载体的药物筛选方法得到广泛应用。本试验通过克隆人 BACE1 基因核心启动子,构建萤火虫荧光素酶报告载体 pGL4.21-BACE1,并成功筛选到 6 株稳定表达该启动子的 HEK293 细胞株。本研究构建的 HEK293/pGL4.21-BACE1 细胞株具有较强的转录活性,虽然比瞬时转染时的转录活性低 1~2 个数量级,但是稳定表达更利于药物的高通量筛选,减少了组间差异。

综上所述,本试验成功构建 BACE1 启动子驱动的荧光素酶报告载体,并筛选到了稳定表达细胞株,将为高通量药物筛选及进一步研究 BACE1 基因的转录调控提供重要的细胞学研究手段。

参考文献

- [1] Goldeck D,Witkowski JM,Fülop T,et al. Peripheral immune signatures in Alzheimer disease [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2016,13(7):739-749.
- [2] Kim DH,Yeo SH,Park JM,et al. Genetic markers for diagnosis and pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Gene*, 2014,45(2):185-193.
- [3] Laird FM,Cai H,Savonenko AV,et al. BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(50):11693-11709.
- [4] Singer O,Marr RA,Rockenstein E,et al. Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology

in a transgenic model [J]. *Nat Neurosci*, 2005, 8(10):1343-1349.

- [5] Kandalepas PC,Vassar R. The normal and pathologic roles of the Alzheimer's β -secretase,BACE1 [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2014,11(5):441-449.
- [6] Liu Z,Li S,Liang Z,et al. Targeting β -secretase with RNAi in neural stem cells for Alzheimer's disease therapy [J]. *Neural Regen Res*, 2013,8(33):3095-3106.
- [7] Zhou W,Cai F,Li Y,et al. BACE1 gene promoter single-nucleotide polymorphisms in Alzheimer's disease [J]. *J Mol Neurosci*, 2010,42(1):127-133.
- [8] Wang S,Jia J. Promoter polymorphisms which modulate BACE1 expression are associated with sporadic Alzheimer's disease [J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2010,53(1):159-166.
- [9] 杨宇虹,梁东春,郭刚,等. 改进 TRIZOL 法提取基因组 DNA [J]. *医学分子生物学杂志*, 2006,3(2):105-107.
- [10] Ohno M. Alzheimer's therapy targeting the β -secretase enzyme BACE1: benefits and potential limitations from the perspective of animal model studies [J]. *Brain Res Bull*, 2016;126(2):183-198.
- [11] Yan R. Stepping closer to treating Alzheimer's disease patients with BACE1 inhibitor drugs [J]. *Transl Neurodegener*, 2016(5):13-15.
- [12] Yan R,Vassar R. Targeting the β -secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy [J]. *Lancet Neurol*, 2014, 13(3):319-329.
- [13] Neumann U,Rueeger H,Machauer R,et al. A novel BACE inhibitor NB-360 shows a superior pharmacological profile and robust reduction of amyloid- β and neuroinflammation in APP transgenic mice [J]. *Mol Neurodegener*, 2015(10):44-47.
- [14] De Strooper B,Gutiérrez LC. Learning by failing: ideas and concepts to tackle γ -secretases in Alzheimer disease and beyond [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2014(55):419-437.
- [15] Li R,Lindholm K,Yang LB,et al. Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004,101(10):3632-3637.

(收稿日期:2016-07-12 修回日期:2016-10-06)

《重庆医学》对临床研究论文医学伦理学要求

凡投本刊的临床研究论文(主体是以人为研究对象),作者应说明其遵循的程序是否符合负责人体试验的委员会(单位性的、地区性的或国家性的)所制订的伦理学标准,并提供(上传)该委员会的批准文件复印件及受试对象或其亲属的知情同意书复印件。

《重庆医学》编辑部