

· 技术与方法 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.28.020

稳定表达人 α -分泌酶 *adam10* 基因启动子荧光素酶报告基因细胞系的构建研究

唐颖, 胡小童, 朱炳林, 韩宇 Δ

(重庆医科大学附属第一医院神经内科 400016)

[摘要] **目的** 构建携带 *adam10* 基因启动子的荧光素酶报告载体, 筛选稳定表达细胞系并分析其活性。**方法** 提取人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y 细胞)基因组 DNA, 以其为模板, PCR 扩增 *adam10* 基因启动子并克隆至荧光素酶报告载体 pGL4.17 中, 构建 *adam10* 基因启动子荧光素酶报告载体 pGL4.17-*adam10*, 将其转染 SH-SY5Y 细胞(无启动子的 pGL4.17 载体作阴性对照, 带有 CMV 启动子的 pGL4.51 载体作阳性对照), 经 G418 进行稳定表达株的筛选, 用 1 $\mu\text{mol/L}$ 维甲酸处理细胞 4 d 后检测其荧光活性。**结果** 成功扩增到 438 bp 的 *adam10* 基因启动子, pGL4.17-*adam10* 经 PCR 和双酶切鉴定均正确。SH-SY5Y 细胞被该载体转染后经 G418 筛选得到稳定表达 *adam10* 基因启动子的细胞株, 经检测具有较强的转录活性; 1 $\mu\text{mol/L}$ 维甲酸能诱导 *adam10* 基因启动子高效表达。**结论** 成功构建了人 *adam10* 基因启动子荧光素酶报告载体, *adam10* 基因启动子在 SH-SY5Y 细胞中能稳定表达, 为深入研究 *adam10* 基因的表达调控、多态性分析及其高通量药物筛选提供基础。

[关键词] 去整合素和金属蛋白酶 10; 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)28-3947-03

Construction of SH-SY5Y cell line stably expressing human α -secretase *adam10* gene promoter luciferase reporter gene

Tang Ying, Hu Xiaotong, Zhu Binglin, Han Yu Δ

(Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective** To construct the luciferase report vector carrying a disintegrin and metalloprotease 10(*adam10*) gene promoter, to screen its stable expression cell line and to analyze its activity. **Methods** The genome DNA of human neuroblastoma SH-SY5Y cells was extracted as the template. The *adam10* gene promoter was amplified by PCR and was cloned into luciferase reporter vector pGL4.17. The *adam10* gene promoter luciferase reporter vector pGL4.17-*adam10* was constructed and transfected in to SH-SY5Y cells(pGL4.17 vector without promoter as the negative control and pGL4.17 vector with CMV promoter as the positive control). Then the stable expression cell line was screened by G418 and its fluorescence activity was detect after treating with 1 $\mu\text{mol/L}$ retinoic acid(RA) for 4 d. **Results** About 438 bp *adam10* gene promoter was successfully amplified by PCR. The pGL4.17-*adam10* vector was correct by PCR and double enzyme digestion identification. The cell line stably expressing *adam10* gene promoter was obtained after transfecting SH-SY5Y cells by this vector and screening by G418, which had stronger transcriptional activity by detection; 1 $\mu\text{mol/L}$ RA could induce high efficiency expression of *adam10* gene promoter. **Conclusion** Human *adam10* gene promoter luciferase vector is successfully constructed. *adam10* gene promoter can be stably expressed in SH-SY5Y cells, which provides a basis for deeply studying *adam10* gene expression regulation, polymorphism analysis and high-throughput drug screening.

[Key words] a disintegrin and metalloprotease 10; promoter; luciferase reporter vector; high-throughput drug screening

阿尔茨海默病(Alzheimer 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)沉积是 AD 主要致病机制之一^[1]。A β 是由 β -和 γ -分泌酶在异常情况下水解淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)后产生的短肽。正常情况下, α -分泌酶水解 APP 产生可溶性且具有神经营养和神经保护作用的 sAPP α 片段,从而防止有毒性的 A β 的产生^[2]。研究证实,去整合素和金属蛋白酶(a disintegrin and metalloprotease 10, ADAM10)是神经细胞生理相关的组成型 APP α -分泌酶^[3],且 ADAM10 过表达能预防淀粉样病变和提高长时程增强作用及学习记忆功能^[4-5]。因此, α -分泌酶 ADAM10 被作为 AD 药物潜在靶点。近年来, *adam10* 基因多态性已在许多神经系统疾病中得到研究^[6-7], *adam10* 基因 rs653765 和 rs514049 位点的

多态性被认为可调节 AD 患者 APP 表达^[8]。目前,有大量关于 ADAM10 与其底物相互作用的研究,针对 ADAM10 分子的靶向治疗有望为治疗 AD 提供新思路,然而对于 ADAM10 分子上游调控机制尚不清楚。本实验通过克隆人 *adam10* 基因启动子,构建荧光素酶报告系统并筛选稳定细胞株,为进一步研究 *adam10* 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 细胞与主要试剂 人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y 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; pMD19T simple 载体购自 Takara 公司; 质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒、荧光素酶报告质粒 pGL4.17 与 pGL4.51、荧光素酶

检测试剂均购自 Promega 公司; TRIzol、逆转录酶试剂盒、脂质体 2000 购自 Invitrogen 公司; DMEM/F12 培养基、Opti-MEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司; 维甲酸、二甲基亚砷 (DM-SO) 购自 Sigma 公司; 感受态细胞 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 SH-SY5Y 细胞, 采用 TRIzol 法提取基因组 DNA, 置于 -20°C 保存备用。

1.2.2 *adam10* 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 *adam10* 基因上游约 438 bp 的启动子区, 上游引物: 5'-CGG GGT ACC AGC TCT CCG CCG GCG GA C-3', 下游引物 5'-CCG CTC GAG TCC TCA CGG GTT AAC AGC AGC ACA T-3', 下划线分别为 Kpn I 和 Xho I 酶切位点。PCR 反应体系为: $10\times$ PCR buffer 3.0 μL , dNTPs 1.0 μL , 上下游引物各 0.5 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), Phanta HS 酶 0.5 μL , 基因组 DNA 3.0 μL , 加 ddH $_2$ O 补至 30 μL 。反应条件为: 95°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s, 56°C 退火 30 s, 72°C 延伸 15 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 *adam10* 基因启动子荧光素酶报告载体的构建 PCR 产物回收纯化后连接 pMD19T simple 载体, 连接产物转化 DH5 α 感受态, 挑取氨苄青霉素筛选的阳性克隆经 PCR 鉴定, 鉴定正确的送测序并命名为 pMD19T-*adam10*。以 Kpn I 和 Xho I 双酶切 pMD19T-*adam10* 和 pGL4.17 质粒, 割胶回收后经 T4 DNA 连接酶连接 pGL4.17 和 *adam10* 基因启动子片段。连接产物转化 DH5 α , 挑取阳性克隆后用 PCR 及 Kpn I 和 Xho I 双酶切鉴定, PCR 和双酶切鉴定均正确的命名为 pGL4.17-*adam10*, 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 SH-SY5Y 细胞培养于含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 DMEM/F12 培养液中, 置于 37°C 、5% CO $_2$ 的培养箱中培养。

将融合度约 80% 的 SH-SY5Y 细胞以 6×10^5 接种 6 孔板, 待细胞贴壁生长至 70%~80% 融合度时进行转染。用 Opti-MEM 培养基分别稀释载体 pGL4.17-*adam10* (每孔 5 μg) 和脂质体 (每孔 5 μL), pGL4.17 和 pGL4.51 分别作阴性、阳性对照, 室温孵育 5 min, 载体和脂质体混合后室温孵育 20 min, 加入到 SH-SY5Y 细胞中, 37°C 、5% CO $_2$ 的培养箱中培养。转染后 48 h 采用 1 $\mu\text{g/mL}$ G418 进行筛选, 筛选后第 14 天时采用有限稀释法克隆化, 待单细胞长满后分别转至 24、12、6 孔板, 10 cm 培养皿继续扩大培养 (此过程需 2~3 个月)。得到了来自 1 株单克隆扩大培养的的稳定表达细胞株, 用化学发光仪检测其荧光活性。选取荧光强度高的进行后续实验并命名为 SH-SY5Y/pGL4.17-*adam10* 和 SH-SY5Y/pGL4.51 细胞, 阴性对照命名为 SH-SY5Y/pGL4.17。

1.2.5 维甲酸对 *adam10* 基因启动子转录功能的影响 将 SH-SY5Y/pGL4.17-*adam10*、SH-SY5Y/pGL4.17 和 SH-SY5Y/pGL4.51 细胞以 2×10^4 接种 96 孔板 (各 5 个重复孔), 生长至 70%~80% 融合度时加 1 $\mu\text{mol/L}$ 维甲酸连续处理 4 d, 然后检

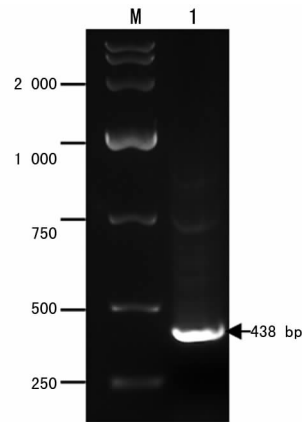
测其荧光素酶活性。

1.2.6 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 (Promega) 进行操作。将 SH-SY5Y/pGL4.17-*adam10*、SH-SY5Y/pGL4.17 和 SH-SY5Y/pGL4.51 细胞以 2×10^4 接种 96 孔板 (各 5 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) 中测量荧光素酶活性。

1.3 统计学处理 采用 Excel student's *t*-test 分析, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *adam10* 基因启动子扩增产物的鉴定 提取 SH-SY5Y 细胞基因组 DNA, 以其为模板进行 PCR 扩增 *adam10* 基因上游长度 438 bp 的核心启动子区, PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳可见大小约 438 bp 条带, 与目的片段大小相合 (图 1)。PCR 产物与克隆载体 pMD19T simple 连接构建 pMD19T-*adam10*, 测序显示所克隆序列无突变。



M: 分子量标准; 1: *adam10* 基因启动子样品

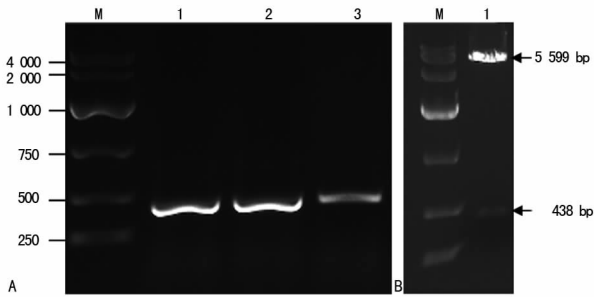
图 1 *adam10* 基因启动子 PCR 扩增

2.2 荧光素酶报告载体 pGL4.17-*adam10* 的构建与鉴定 克隆载体 pMD19T-*adam10* 与携带萤火虫荧光素酶基因的 pGL4.17 分别以 Kpn I 和 Xho I 双酶切, 回收 438 bp 的 *adam10* 基因启动子片段与 pGL4.17 载体连接, 转化 DH5 α 后菌液 PCR 结果表明筛选到阳性克隆。另外, pGL4.17-*adam10* 经 Kpn I 和 Xho I 酶切后可见大小约 5 600 bp (pGL4.17) 与 438 bp (*adam10* 基因启动子) 的两个片段出现。成功构建携带 *adam10* 基因启动子的荧光素酶报告载体。见图 2。

2.3 构建稳定表达 *adam10* 基因启动子的细胞系 在 6 孔板中采用 pGL4.17-*adam10*、pGL4.17 或 pGL4.51 对 SH-SY5Y 细胞进行转染, 48 h 后在培养基中加入 G418 进行稳定筛选, 14 d 后挑取单克隆转入细胞培养瓶中进行克隆扩大培养, 获得稳定表达株 SH-SY5Y/pGL4.17-*adam10*、SH-SY5Y/pGL4.17 和 SH-SY5Y/pGL4.51。

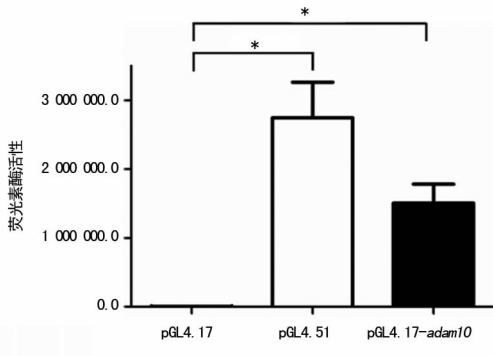
2.4 稳定表达株具有启动活性 荧光素酶活性检测分析表明, 阴性对照 SH-SY5Y/pGL4.17 的荧光活性仅有 $4\ 007.0\pm 95.4$, 而 SH-SY5Y/pGL4.17-*adam10* 和 SH-SY5Y/pGL4.51 均具有较强的荧光活性, 分别是阴性对照组的 (369.0 ± 51.6) 倍和 (697.7 ± 71.2) 倍, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见

图 3。



A: pGL4.17-*adam10* 载体的 PCR 鉴定, 泳道 1~3 为 1~3 号样品; B: pGL4.17-*adam10* 载体的双酶切鉴定, M 为 DNA marker, 泳道 1 为 *adam10* 基因启动子样品

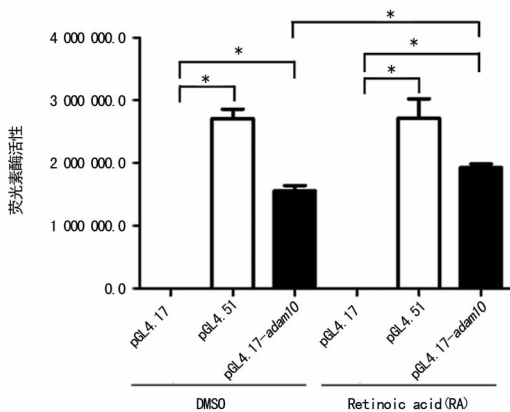
图 2 荧光素酶报告载体 pGL4.17-*adam10* 的鉴定



*: $P < 0.05$

图 3 荧光素酶活性的测定 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.5 维甲酸对 *adam10* 基因启动子的影响 稳定表达的 3 种细胞系经 $1 \mu\text{mol/L}$ 维甲酸处理 4 d 后, 测定其荧光素酶活性。结果表明, 相比 DMSO 处理组, 维甲酸处理后 SH-SY5Y/pGL4.17-*adam10* 的荧光活性明显升高 ($P = 0.029$), 但并没有影响 CMV 启动子的活性。见图 4。



*: $P < 0.05$

图 4 不同方式处理后荧光素酶活性分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论

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 $A\beta$ 的产生^[9-10]。但这两种分泌酶除参与 APP 剪切外, 还能剪切多种蛋白分子, 比如黏附分子 cadherin 和 Notch 等, 所以非特异性地抑制 β -和 γ -分泌酶会导致生理功能紊乱^[11-15]。相反, 提高 α -分泌酶比如 ADAM10 的活性既能防止

$A\beta$ 的形成, 而且产生的 sAPP α 又具有神经营养和保护作用。研究显示, *adam10* 转基因小鼠与 AD 模型小鼠杂交后, 其病理性斑块显著降低, 可溶性 sAPP α 片段明显升高, 小鼠的学习记忆能力有所提高; 相反 *adam10* 基因突变小鼠脑内 sAPP α 含量降低, 病理性斑块增加^[4]。因此, ADAM10 的靶向治疗可能成为治疗 AD 的一种新途径^[14-15]。因此, 构建携带人 *adam10* 基因的荧光素酶报告载体来研究 *adam10* 基因的调控和功能具有重要意义。

本实验通过克隆人 *adam10* 基因启动子区域, 构建荧光素酶报告载体 pGL4.17-*adam10*, 并成功筛选到稳定表达该启动子的 SH-SY5Y 细胞系。SH-SY5Y/pGL4.17-*adam10* 细胞具有较强的转录活性, 启动下游荧光素酶的表达, 而不含启动子的空白质粒 (pGL4.17) 转染后几乎没有转录活性。维甲酸能诱导 *adam10* 基因启动子高效表达。

综上所述, 本实验成功构建了人 *adam10* 启动子驱动的荧光素酶报告载体, 并建立了稳定表达细胞株, 既可用于研究 *adam10* 基因的表达调控, 也可用于多态性分析及其高通量药物筛选, 为将来筛选有效的 AD 药物奠定基础。

参考文献

- [1] MacLeod R, Hillert EK, Cameron RT, et al. The role and therapeutic targeting of α -, β - and γ -secretase in Alzheimer's disease[J]. Future Sci OA, 2015, 1(3): FSO11.
- [2] Lee JH, Oh IH, Lim HK. Stem cell therapy: a prospective treatment for Alzheimer's disease[J]. Psychiatry Investig, 2016, 13(6): 583-589.
- [3] Saftig P, Lichtenthaler SF. The alpha secretase Adam10: A metalloprotease with multiple functions in the brain [J]. Prog Neurobiol, 2015, 135(1): 1-20.
- [4] Schroeder A, Fahrenholz F, Schmitt U. Effect of a Dominant-Negative form of Adam10 in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2009, 16(2): 309-314.
- [5] Schmitt U, Hiemke C, Fahrenholz FA. Over-expression of two different forms of the alpha-secretase Adam10 affects learning and memory in mice [J]. Behav Brain Res, 2006, 175(2): 278-284.
- [6] Kim M, Suh J, Romano D, et al. Potential late-onset Alzheimer's disease-associated mutations in the Adam10 gene attenuate alpha-secretase activity [J]. Hum Mol Genet, 2009, 18(20): 3987-3996.
- [7] Song JH, Yu JT, Liu M, et al. Genetic association between Adam10 gene polymorphism and Alzheimer's disease in a Northern Han Chinese population [J]. Brain Res, 2011, 1421: 78-81.
- [8] Bekris LM, Lutz F, Li G, et al. Adam10 expression and promoter haplotype in Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Aging, 2012, 33(9): e1-2229.
- [9] Habib A, Sawmiller D, Tan J. Restoring soluble amyloid precursor protein α functions as a potential (下转第 3952 页)

学、医学伦理学、社会学等。各高校还应注重医学生实习前教育(包括医疗法律法规、医院规章制度、医患沟通技巧等)、实习生的医患沟通能力及考核医学生的医患沟通能力^[11]。因为,实习医生是医疗活动过程中不可缺少的一部分,他们是未来的医生就必然要面临与患者沟通的问题^[12]。希望相关管理部门安排已在职的医护人员进行定期的人文科学类课程的进修,尤其是医学沟通学课程。医学沟通学的教师在讲授理论知识的同时还要注重学生对沟通技巧的应用能力,提高学生在日后工作中应用沟通技巧的频率,从而提高医患沟通满意度。

3.4 吸引更多的卫生技术人员加入社区卫生服务机构 据本调查结果显示,医方认为“医护人员短缺,工作繁忙,时间受限”是影响医患沟通的最主要原因,超过半数的患方亦认为如此。因此,希望相关政府部门注意并解决此问题。一方面可以依托医学高等院校招收面向社区的定向学生学习全科医学并鼓励其日后投入到社区卫生服务工作中,另一方面可以建立社区卫生服务机构与公立二、三级医院的长效对口双向交流机制,并制订相关进修学习政策^[3]。实行以患者为中心的临床策略,获得患者的疾病体验,了解患者情绪,强调预防措施与健康促进,加强医患关系^[13]。

3.5 提高全民的医疗知识 因医学知识复杂加之我国医学知识普及不够,导致患方严重缺乏简单基础的医学知识^[14]。本调查中,也有高达 89.4% 的医方认为患方“对医疗知识不了解”是影响医患沟通的第一要素。在这种情况下,提高全民的医疗知识是十分必要的。针对这一问题,医院内可以设置疾病宣传栏和提供问询服务的导医,还可以向患方发放宣传手册,设立可供全民参观和参与的“医院开放日”和医患沟通室,以及建设互联网上的医政沟通^[15];新闻媒体可以增加关于普及医疗知识的专栏或节目,拍摄并播放相关的公益广告。提高全民的医疗知识水平,有助于医患双方信息对等,使医患沟通更加容易,有效地减少医疗纠纷。

参考文献

[1] 邵金花,孙伟,陈芬.加强医患沟通提高患者满意度[J].

中国社会医学杂志,2012,29(6):381-383.

- [2] 王芙蓉,张云,苗志敏,等.医患沟通现状调查及改进对策[J].中国卫生质量管理,2012,19(1):49-52.
- [3] 单红娟,郭瑶鑫,魏洪娟.黑龙江省社区卫生人力资源现状分析[J].中国卫生经济,2013,32(12):62-64.
- [4] 冯军强.某综合医院医患沟通现状调查分析与对策引导的研究[D].重庆:第三军医大学,2008.
- [5] 叶莉华.医患沟通过程现状及其影响因素研究[D].长沙:中南大学,2011.
- [6] 刘平.医患沟通与医患沟通现状及促进策略的综述[D].重庆:重庆医科大学,2014.
- [7] 俞菲.康复技师与患者沟通技巧探讨[J].中医药管理杂志,2015,23(24):78-79.
- [8] 李晓芳,张永生.加强医患沟通 减少医患纠纷[J].中国中医药现代远程教育,2008,6(8):939-941.
- [9] 张颖丽.护患沟通技巧探讨[J].中国社区医师,2013,15(6):333-334.
- [10] 时吉庆,周建丽.医患沟通技巧与和谐医患关系[J].解放军医院管理杂志,2008,15(1):39-40.
- [11] 韦思明,戴玉英,蒋建平,等.医学生医患沟通能力培养的探索[J].教师观点,2013(26):70-71.
- [12] 何振华,张秀峰,廖志庆,等.关于实习医生进行医患沟通的技巧探讨[J].医药产业资讯,2006,3(15):277-278.
- [13] 侯胜田,张永康.主要医患沟通模式及 6S 延伸模式探讨[J].医学与社会学,2014,1(1A):54-57.
- [14] 袁伟伟,旋妮玲,陈志红.我国医患沟通面临的困境及对策[J].医学与社会学,2013,26(6):26-28.
- [15] 韩田,孙豪庭,黄莺.浅谈从医院管理角度改善医患沟通[J].中国医学伦理学,2013,26(3):297-299.

(收稿日期:2017-05-08 修回日期:2017-07-04)

(上接第 3949 页)

- treatment for alzheimer's disease [J]. J Neurosci Res, 2017,95(4):973-991.
- [10] Endres K, Fahrenholz F, Lotz J, et al. Increased CSF APPs-alpha levels in patients with Alzheimer disease treated with acitretin[J]. Neurology, 2014, 83(21):1930-1935.
- [11] Teng L, Zhao J, Wang FF, et al. A GPCR/secretase complex regulates beta- and gamma-secretase specificity for A beta production and contributes to AD pathogenesis[J]. Cell Res, 2010, 20(2):138-153.
- [12] Chávez-Gutiérrez L, Bammens L, Benilova I, et al. The mechanism of γ -Secretase dysfunction in familial Alzheimer disease[J]. EMBO J, 2012, 31(10):2261-2274.

- [13] Nakayama K, Nagase H, Koh CS, et al. Gamma-Secretase-Regulated mechanisms similar to notch signaling May play a role in signaling events, including APP signaling, which leads to alzheimer's disease[J]. Cell Mol Neurobiol, 2011, 31(6):887-900.
- [14] Manzine PR, Marcello E, Borroni BA, et al. Adam10 gene expression in the blood cells of Alzheimer's disease patients and mild cognitive impairment subjects[J]. Biomarkers, 2015, 20(3):196-201.
- [15] Fahrenholz F. Alpha-secretase as a therapeutic target[J]. Neurobiol Aging, 2006, 27(1):S7.

(收稿日期:2017-04-16 修回日期:2017-05-22)