

β- 萘黄酮能抑制荧光素酶活性 *

王 胜 陈云芳 付 欣 洪 伟 李 冰[△]

(广州医学院 广东 广州 510182)

摘要 目的 研究β- 萘黄酮对荧光素酶活性的影响。方法 利用人 GCLC 基因调控序列驱动的 GCLC-PGL3-enhancer-Luciferase 报告载体 (PL45) 转染人肺腺癌细胞 A549,人肝癌细胞 HepG2,人子宫癌细胞 HeLa,人乳腺癌细胞 MCF-7,人肝癌细胞 Bel-7402,人支气管上皮细胞 16HBE,β- 萘黄酮刺激后,双荧光素酶报告基因检测系统分析其对 GCLC 基因表达的影响。wester blot 检测 β-NF 刺激 16HBE 细胞后 GCLC 蛋白水平的变化。β- 萘黄酮刺激转染了表达 Luciferase 的真核表达载体 pRC/CMV2- luc+ 的 A549 和 HepG2 细胞后,双荧光素酶报告基因检测系统分析其对 Luciferase 基因表达的影响。PL45 转染 A549 和 HepG2 细胞,裂解细胞后用 β-NF 刺激,双荧光素酶报告基因检测系统分析其对 Luciferase 基因的影响。结果 在各种细胞中,转染 PL45 报告载体后,β-NF 处理组荧光素酶相对活性值与 DMSO 对照组相比均明显下降 ($P<0.01$)。wester blot 结果显示 β-NF 处理组 GCLC 蛋白的表达较 DMSO 对照组明显升高。在 A549 和 HepG2 细胞中,转染 pRC/CMV2- luc+ 载体后,β-NF 处理组荧光素酶相对活性值与 DMSO 对照组相比均明显下降 ($P<0.01$)。PL45 转染 A549 和 HepG2 细胞,裂解细胞后用 β-NF 刺激,β-NF 处理组荧光素酶相对活性值与 DMSO 对照组相比均明显下降 ($P<0.01$)。结论 β- 萘黄酮直接抑制了荧光素酶的活性

关键词 β- 萘黄酮 基因转录调控 荧光素酶 报告基因

中图分类号 Q75 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 20-3853-04

β-Naphthoflavone Can Inhibit Luciferase Activity*

WANG Sheng, CHEN Yun-fang, FU Xin, HONG Wei, LI Bing[△]

(Guangzhou Medical University, Guang dong, Guang zhou, 510182 China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of β-Naphthoflavone on the firefly luciferase activity. **Methods:** A549, HepG2, HeLa, MCF-7, Bel-7402, 16HBE cells were transfected with GCLC5'-upstream regulatory sequence driven PGL3-enhancer-Luciferase reporter vector (PL45) and treated with β-NF. The dual-luciferase reporter assay system was used to analyze the effect of β-Naphthoflavone on the expression of GCLC gene. Western blot was used to detect the change of protein level. A549 and HepG2 cells were transfected with the eukaryotic expression vector pRC/CMV2- luc+ and treated with β-NF. The dual-luciferase reporter assay system was used to analyze the effect of β-Naphthoflavone on the firefly luciferase activity. A549 and HepG2 cells were transfected with the PL45 vector, cells were lysed, then treated with β-NF for 25 min to analyze the effect of β-NF on the firefly luciferase activity. **Results:** In all the cells, the relative luciferase activity of β-NF treatment group was significantly lower compared with that in DMSO control group ($P<0.01$). The result of western blot showed that the expression of GCLC were higher in β-NF treatment group than that in DMSO control group. In A549 and HepG2 cells, after transfected with pRC/CMV2- luc+ vector, the relative luciferase activity of β-NF treatment group was lower than that in DMSO control group ($P<0.01$). A549 and HepG2 cells were transfected with PL45 vector, then lysed, and the relative luciferase activity in β-NF treatment group was lower than that in DMSO control group ($P<0.01$). **Conclusion:** β-Naphthoflavone directly inhibits Firefly Luciferase activity.

Key words: β-Naphthoflavone ;Gene transcriptional regulation ;Luciferase ;Reporter gene

Chinese Library Classification(CLC): Q75 Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)20-3853-04

前言

报告基因常用于测定启动子对基因表达的影响及其与反式作用因子的相互作用,即将所研究的目的基因调控序列克隆到含有报告基因的表达质粒中,通过测定报告基因表达的水平,间接评价在调控序列指导下对基因表达的影响^[1]。目前常用

的报告基因所编码的都是一些在真核细胞中不表达或者表达很低的酶,包括萤光素酶、氯霉素转移酶、β-半乳糖苷酶、以及分泌性人胎盘碱性磷酸酶等^[2]。其中最常用的是双萤光素酶报告分析系统^[3],其中一种用于待测启动子活性分析,而另一种由组成性启动子驱动,代表细胞本身的特性而作为内参照校正。

β-NF 是黄酮类物质^[4],是很多抗氧化酶的典型诱导物^[5],

* 基金项目 国家自然科学基金项目资助 (30971166)

作者简介 王胜 (1984),男,硕士。主要研究方向 基因的表达调控 Tel:15088056646,

E-mail wangyunshier123@163.com

△通讯作者 李冰, E-mail libing@gzhmc.edu.cn

(收稿日期 2011-06-10 接受日期 2011-06-30)

其机制可能是暴露于 β -NF 后,引起 Nrf1 和 Nrf2 尤其是 Nrf2 转录因子的活化和转位,诱导这些基因的表达。因此,在研究药物对二相解毒酶等作用的时候,常被用作阳性对照。本课题组利用 Luciferase 报道系统的研究中发现, β -NF 强烈抑制 GCLC 表达,结果与 Mulcahy RT 等人的研究结果相反^[6],但用 western blot 方法检测 GCLC 蛋白水平则发现 GCLC 的表达上调。因此怀疑 β -NF 可能对 Luciferase 蛋白的活性具有直接的抑制作用。鉴于 β -NF 在研究中的广泛使用,以及 Luciferase 报道载体越来越多的被用于氧化抗氧化平衡研究中,对于这个问题的阐明具有重要的意义。本研究设计不同的处理实验,以了解是否 β -NF 对 Luciferase 有直接的作用。之后我们在其他几种不同组织来源的细胞进行了实验,并直接刺激转染有 Luciferase 的报道载体,结果发现 β -NF 对 Luciferase 直接起了作用。这提示我们在应用报道系统进行研究的时候得考虑报道系统本身这个因素,而且应多方面进行研究才能得出可靠的结论。

1 材料和方法

1.1 材料

质粒提取试剂盒(德国 Qiagen),LipofectamineTM2000(美国 Invitrogen),荧光素酶分析系统 GLO MAXTM 96Microplate luminometer 及配套试剂盒(美国 Promega),各种培养基和胎牛血清(美国 Hyclone), β -萘黄酮(美国 Sigma),含 GCLC 基因 5' 上游启动子序列的报道载体 GCLC-PGL3-enhancer-Luciferase (PL45)、含 Luciferase 基因片段的真核表达载体 pRC/CMV2- luc+ (广州医学院实验中心提供),人肺腺癌细胞(A549),人肝癌细胞(HepG2),人子宫腺癌细胞(HeLa),人乳腺癌细胞(MCF-7),人肝癌细胞(Bel-7402),人支气管上皮细胞(16HBE)(广州医学院实验中心提供),Western 试剂(JET-WAY),抗体(Abcam)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、转染、报告基因分析 A549 细胞用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养,HepG2 用含 10%胎牛血清的 MEM 培养,16HBE 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养,HeLa、MCF-7、BEL-7402 细胞用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养,转染前一天将 $0.5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^5$ 细胞数接种于 48 孔细胞培养板,约 24 h 后待细胞单层融合度达到 80%~90%,按 LipofectamineTM 2000 试剂盒说明书将插入 GCLC 基因上游调控序列的报道载体 GCLC-PGL3-enhancer-Luciferase (PL45) 与 PRL-SV40 海肾荧光素酶内参表达质粒共转染细胞。转染 12 h 后,添加 10 μ mol/L β -NF,同时设立 DMSO 对照组。12 h 后,PBS 洗涤细胞,按 Luciferase assay kit 双报道系统说明书,GLO MAXTM96Microplate luminometer 报道系统检测虫荧光素酶活性及内参荧光素酶活性,最后计算两者的比值,即反映调控序列的活性。

1.2.2 western blot 16HBE 细胞常规培养在 6 孔细胞培养板中,待细胞融合至 80%的时候,更换新鲜培养基培养,并添加 10 μ mol/L β -NF,同时设立 DMSO 对照组,12 h 后收集,western blot 测定 GCLC 蛋白水平。各组均用含蛋白酶抑制剂的裂解液于冰上裂解细胞 30min,4℃14000g 离心 10 min,收集上清液用 BCA 法测定蛋白浓度,每组取总蛋白 25 μ g,SDS-PAGE 分离

蛋白,湿转法将蛋白转至硝酸纤维素膜,经 5%脱脂奶粉封闭液封闭 1 h 后,分别加一抗兔抗人 γ -GCS(1:1000)和兔抗人 GADPH 抗体(1:1000)4℃孵育过夜,二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG,1:10000)孵育 1 h 后化学发光法显色。

1.2.3 细胞培养、转染、报告基因分析 含 Luciferase 基因片段的真核表达载体 pRC/CMV2- luc+ 转染 A549 细胞和 HepG2,转染及检测程序同上。

1.2.4 细胞培养、转染、报告基因分析 PL45 质粒转染 A549 细胞和 HepG2 细胞,裂解后添加 10 μ mol/L β -NF 刺激 25 min,上机检测,同上。

2 结果

2.1 在多种细胞中报告基因检测系统结果显示 β -NF 具有抑制作用

10 μ mol/L β -NF 刺激转染了 PL45 的 A549、HepG2、HeLa、MCF-7、Bel-7402、16HBE 细胞后,荧光素酶相对活性 (0.1334 ± 0.0072 、 0.8058 ± 0.0716 、 0.1276 ± 0.0166 、 0.025 ± 0.0048 、 0.2337 ± 0.0026 、 0.0473 ± 0.0053) 较 DMSO 对照组 (8.0969 ± 0.5079 、 20.1537 ± 2.5938 、 4.3815 ± 0.6354 、 1.1632 ± 0.1605 、 8.5824 ± 0.7838 、 1.4765 ± 0.3890) 明显下降,差别有统计学意义 ($P < 0.01$),见图 1。在这几种细胞中, β -NF 对 GCLC 的表达起抑制作用,与文献报道相反,经过多次试验均是相同结果。

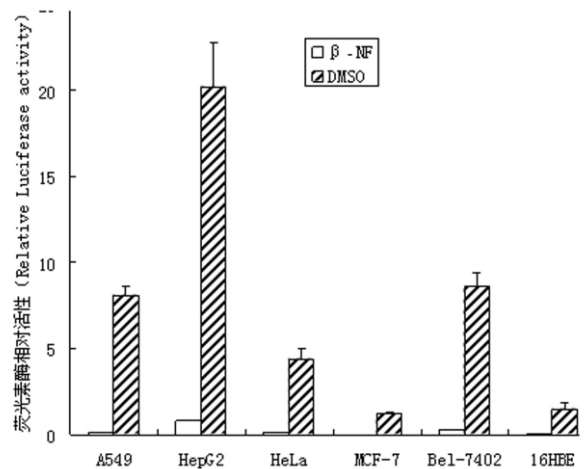


图1 β -NF 对 A549、HepG2、HeLa、MCF-7、Bel-7402、16HBE 细胞中 GCLC 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig.1 the effects of β -NF on the expression of GCLC in A549, HepG2, HeLa, MCF-7, Bel-7402, 16HBE cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

2.2 western blot 显示 β -NF 上调内源性 GCLC 的表达

本研究选用了 16HBE 细胞,用 western blot 测定刺激后 GCLC 蛋白的变化,发现 β -NF 处理组 GCLC 蛋白较 DMSO 对照组明显升高,见图 2,与报道系统结果相反。

2.3 β -NF 能抑制非 β -NF 反应性报道载体的活性

本实验中心已有成功构建好的含 Luciferase 基因片段的真核表达载体 pRC/CMV2- luc+,其中 pRC/CMV2 载体启动子不受 β -NF 影响。我们将 pRC/CMV2- luc+ 载体转染到 A549 细胞和 HepG2 细胞后按相同条件进行刺激发现, β -NF 处理组荧光素酶相对活性 (0.1317 ± 0.0179 、 0.1072 ± 0.0128) 较 DMSO 对照组 (7.5097 ± 0.1864 、 5.8036 ± 0.4151) 明显下降,差别有统计

学意义 ($P < 0.01$), 见图 3。

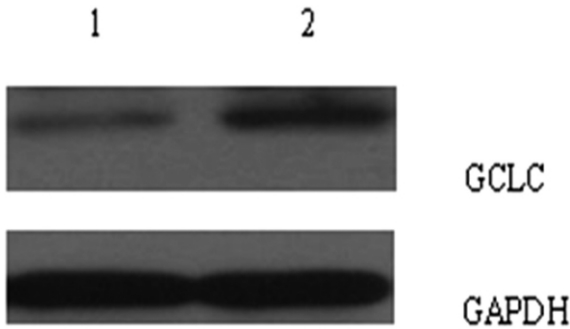


图 2 16HBE 细胞中 GCLC 蛋白表达的变化泳: 1 DMSO 对照组 泳道 2 β-NF 处理组

Fig. 2 The expression of GCLC in 16HBE cells: 1: DMSO control group;

Chanel 2: β-NF treatment group

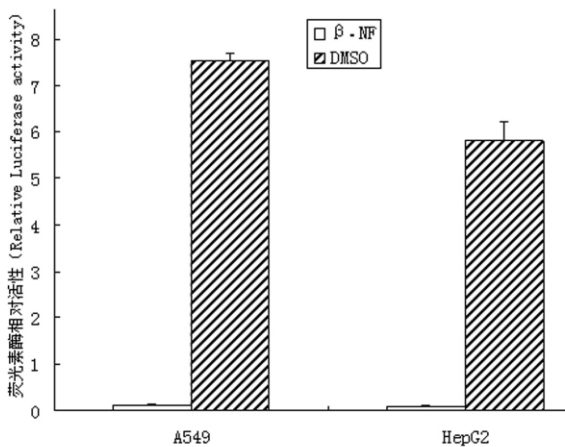


图 3 β-NF 对 Luciferase 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig.3 the effects of β-NF on Luciferase ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

2.4 β-NF 同样抑制已表达的 Luciferase 的活性

另外,为了排除细胞内表达阶段的影响,我们将 PL45 转染入 A549 和 HepG2 细胞,不经处理使 Luciferase 表达 16 h,裂解后再给予 $10 \mu\text{mol/L}$ β-NF 刺激 25 min 检测,发现 β-NF 处理组荧光素酶相对活性 (0.0137 ± 0.0012 , 0.1394 ± 0.0287) 较 DMSO 对照组 (5.5327 ± 0.5103 , 6.4650 ± 0.6012) 依然是明显下降,差别有统计学意义 ($P < 0.01$),见图 4。

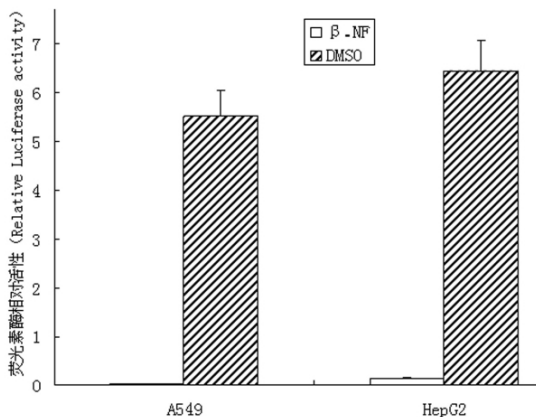


图 4 β-NF 对 Luciferase 的直接抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig.4 β-NF directly inhibits Luciferase activity ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

综合以上结果,可以得出结论:在应用双荧光素酶报告基因检测系统分析 β-NF 对 GCLC 基因表达影响的时候,β-NF 对报告基因直接起了作用,无法反应出它对目的基因的真实作用。

3 讨论

GSH 是一种细胞内广泛分布的小分子抗氧化剂^[7],体内 GSH 含量减少会影响体内许多重要功能并与常见疾病、慢性病的发生发展有关^[8,9]。其在体内浓度与 γ-GCS 表达活性有关,而 γ-GCS 又受体内外各种因子的调节^[10]。细胞内 γ-GCS 活性改变是机体对众多刺激的重要适应性反应^[11]。β-NF 属黄酮类化合物,具有促氧化和抗氧化的双重作用^[12],能影响 γ-GCS 的催化亚基 GCLC 基因 5' 上游调控序列启动子区域的 ARE 元件与转录因子的结合^[13-15],从而上调人类 HePG2 细胞内 γ-GCS 基因的表达。本课题组长期开展基因上游调控序列的研究,其中最适用的方法是双荧光素酶报告分析方法。而 β-NF 是多种抗氧化酶的典型诱导物,其它研究也常常把它作为典型的阳性对照。

本研究将 GCLC-pGL3-enhancer-Luciferase (-3490/+451bp) 报道基因载体导入到人 A549 细胞和 HepG2 细胞中,发现 β-NF 处理组的荧光素酶相对活性较 DMSO 对照组均明显下降,与 Mulcahy 等人报道的 β-NF 刺激 HepG2 细胞后促进 GCLC 基因表达的结果相反。本研究考虑细胞反应的特异性问题,选取其它肝癌细胞 Bel-7402,人宫颈癌细胞 (HeLa),人乳腺癌细胞 (MCF-7),人支气管上皮细胞 (16HBE) 进行测定,发现 β-NF 刺激对这三种细胞 GCLC 基因表达均极度抑制。报道系统是通过报告基因的活性间接反应目的基因的表达调控,而直接的蛋白测定则更能真实的反应内源性蛋白的变化。随后 Western blot 实验发现,在 16HBE 细胞中,β-NF 处理组 GCLC 蛋白表达明显升高,与双报道系统结果相反。因此,因此 β-NF 的这种作用是否是它直接影响了 Luciferase 值得考虑,在各种细胞中表现出强烈的抑制现象,从而掩盖了 β-NF 对目的基因的真实作用。pRC/CMV2-luc+ 是含 Luciferase 基因片段的真核表达载体,其启动子是 β-NF 非反应性的,我们将其转染到 A549 和 HepG2 细胞后按相同条件进行刺激发现,β-NF 处理组荧光素酶相对活性依然明显下降,这更加使我们肯定上述的猜想。为了验证 β-NF 的抑制作用与表达无关,本研究将 PL45 转染入 A549 和 HepG2 细胞中,细胞裂解后用 $10 \mu\text{L}$ 的时候,应综合应用多种方法进行多方面的验证才能得出可靠的结论。

参考文献(References)

- [1] 欧阳华伟,罗成群,周建大,等.小鼠 HMGB1 启动子荧光素酶报告基因的构建及功能鉴定[J].生命科学,2010,14(2):137-140
OUYANG Hua-wei, LUO Cheng-qun, ZHOU Jian-da, et al. Construction and Identification of Luciferase Reporter Gene Containing Mouse HMGB1 Promoter[J].Life Science Research, 2010,14(2):137-140
- [2] 李晖.APOBEC3G 转录调控机制研究[D].南方医科大学,2009:52-55
LI Hui. The Study of APOBEC3G Transcription Regulation mechanism[D].Southern Medical University, 2009: 52-55
- [3] GAO Xin, CAI Yun, XIN Hai-ming, et al. Creation and identification of luciferase reporter gene containing human bax promoter[J]. Journal

al of Oncology, 2009,15:46-49

- [4] 李建康,和凡,毕惠嫦,等.黄酮类化合物对细胞色素 P450 CYP1A2 的抑制作用及其构效关系研究 [J]. 药理学报, 2008,43 (12) : 1198-1204
LI Jian-kang, HE Fan, BIHui-chang, et al. Inhibition of human cytochrome P450 CYP1A2 by flavonoids: a quantitative structure-activity relationship study [J]. Acta Pharmaceutica Sinica 2008,43 (12) : 1198-1204
- [5] 谢英明,聂芳红,汤陈坚,等.2,3,7,8- 四氯二苯并二噁英和 β - 萘黄酮暴露对斑马鱼肝和鳃 MROD 酶活性的影响 [J]. 生态毒理学报, 2009,4(1):142-146
XIE Ying-ming, NIE Fang-hong, TANG Chen-jian, et al. Studies on Hepatic and Branchial MROD Activities in Zebrafish Exposed to 2,3,7,8 -Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin and Beta-Naphthoflavone [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2009, 4(1):142-146
- [6] Mulcahy RT, Wartman MA, Bailey HH, et al. Constitutive and beta-naphthoflavone-induced expression of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene is regulated by a distal antioxidant response element/TRE sequence [J]. Biol Chem, 1997,272:7445-7454
- [7] Erickson AM, Nevarea Z, Gipp JJ, et al. Identification of a variant antioxidant response element in the promoter of the human glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene [J]. J Biol Chem, 2002, 277: 30730-30737
- [8] Rahman I, MacNee W. Lung glutathione and oxidative stress : implications in cigarette smoke-induced airway disease [J]. Am J Physiol, 1999, 277(6 Pt 1) :L106721088
- [9] Rahman I, Morris on D, Donaldson K, et al. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1996, 154 (4 Pt 1) : 105521060
- [10] 邹国明,李冰,冉丕鑫.人支气管上皮细胞 GCLC 基因调控区 ARE 及 E-BOX 顺式调控元件功能的实验研究[J].中华生物医学工程杂志,2008,24:1543-1548
ZOU Guo-ming, LI Bing, RAN Pi-xin, et al. The study on regulatory function of the cis-regulating elements of ARE and E-box in the human GCLC gene[J]. Chin J Biomed Eng, 2008, 24:1543-1548
- [11] Yuuta F, Yasuteru U, Toru K, et al. Design and synthesis of highly sensitive fluorogenic substrates for glutathione transferase and application for activity imaging in living cells[J]. Am Chem Soc, 2008, 130: 14533-14543
- [12] 陆柏益, 张英, 吴晓琴. 黄酮类化合物的潜在毒性作用[J]. 中国中药杂志, 2006,31(7):533-536
LU Bai-yi, ZHANG Ying, WU Xiao-qin. Advances in studies on potential toxicity of flavonoids [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2006,31(7):533-536
- [13] Yang H, Zeng Y, Lee TD, et al. Role of AP-1 in the coordinate induction of rat glutamate-cysteine ligase and glutathione synthetase by tert-butylhydroquinone[J]. Biol Chem, 2002,277:35232-35239
- [14] Rahman I, Smith CA, Antonicelli F, et al. Characterisation of gamma-glutamylcysteine synthetase-heavy subunit promoter: a critical role for AP-1 [J]. FEBS Lett, 1998, 427(1): 129-133
- [15] Iwanaga M, Mori K, Iida T, et al. Nuclear factor kappa B dependent induction of gamma-glutamylcysteine synthetase by ionizing radiation in T98G human glioblastoma cells [J]. Free Radic Biol Med, 1998, 24(728) : 1256-1268

(上接第 3840 页)

- [3] Robert C, Moellering, J R. Avian Influenza: the Next Pandemic?[J]. Clinical Microbiology Newsletter, 2006,28(13): 97-101
- [4] Peng Dap-eng, Hu Sishun, Hua Yan, et al. Comparison of a new gold-immunochromatographic assay for the detection of antibodies against avian influenza virus with hemagglutination inhibition and agar gel immunodiffusion assays [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2007,117:17-25
- [5] Chana K H, Lam S Y, Puthavathana P, et al. Comparative analytical sensitivities of six rapid influenza A antigen detection test kits for detection of influenza A subtypes H1N1, H3N2 and H5N1[J]. Journal of Clinical Virology, 2007,38: 169-171
- [6] Sala G, Cordioli p, Moreno-Martin a, et al. ELISA test for the detection of influenza H7 antibodies in avian sera [J]. Avian Dis, 2003,47:1057-1059
- [7] Spackman E, Senne D A, Myers T J, et al. Development of a realtime reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes [J]. J. Clin. Microbiol, 2002,40:3256-3260
- [8] Cattoli G, Drago A, Maniero S, et al. Comparison of three rapid detection systems for type A influenza virus on tracheal swabs of experimentally and naturally infected birds[J]. Avian Pathol, 2004,33: 432-437
- [9] Piuino P A, Krull U J. Trends in the development of nucleic acid biosensors for medical diagnostics [J]. Anal Bioanal Chem, 2005, 381 (5):1004-1011
- [10] Marquette C A, Blum L J. State of the art and recent advances in immunoanalytical systems [J]. Biosens Bioelectron, 2006, 21 (8): 1424-1433
- [11] 詹爱军,王新卫,金鑫,等.蛋白 A 法压电免疫传感器检测 H9 亚型禽流感病毒的研究[J].畜牧兽医学报,2009,40 (8) :1266-1270
Zhan Ai-jun, Wang Xin-wei, Jin Xin, et al. Study on SPA-Piezoelectric Immunosensor for the Detection of H9 Sera-subtype Avian Influenza Virus[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2009,40 (8) :1266-1270
- [12] Bandyopadhyay K, Vijayamohan K. Formation of a self-assembled monolayer of diphenyl diselenide on polycrystalline gold[J]. Langmuir, 1998, 14: 625-629
- [13] Flink S, Van Veggel f C J M, Reinhoudt D N, et al. Sensor functionalities in self-assembled monolayer [J]. Adv Mater, 2000, 12: 1315-1328
- [14] Nie Xue-mei, Liu Zhong-ming, Zhang Shui-hua. Development of Piezoelectric Immunosensor for Hepatitis C [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2005, 24(5): 50-52
- [15] Zhang Bo, Fu Weiling, Zhang Xue, et al. A Novel Piezoelectric Tumor Marker Micro-array Immunosensor [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2006, 34(U09):306-310
- [16] Wen Zhi-li, Wang Shi-ping, Shen Guo-li. A Summary Description of Development in Immunosensor [J]. Journal of Biomedical Engineering, 2001, 18(4): 642-646