

人源 pEGFP-C1-p38 γ 真核表达质粒的构建及其功能研究

胡爽¹ 杨莉¹ 陈晨¹ 潘林鑫² 李良云¹ 杨俊发¹ 周焕³ 徐涛¹

摘要 目的 构建人源 pEGFP-C1-p38 γ 表达质粒,并观察其对乙醇刺激的 L0-2 肝细胞的增殖和凋亡及炎症因子分泌的影响。方法 在人源 L0-2 肝细胞中提取 RNA 并且逆转录为 cDNA,同时将引物稀释到 10 μ mol/L,其余作为储液备用。采用 PCR 技术扩增 p38 γ 并鉴定,使用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒进行 PCR 产物的纯化回收,再对 PCR 产物及载体进行酶切回收,酶切片段连接后,进行连接产物的转化、挑菌、摇菌、质粒小抽。酶切鉴定后,进行测序鉴定。将构建好的质粒转染至乙醇刺激的人源 L0-2 细胞中,通过 MTT 实验和流式细胞术检测对其增殖和凋亡的影响,并用 Western blot 技术检测炎症因子白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)在 L0-2 肝细胞中的表达。结果 测序显示 pEGFP-C1-p38 γ 真核表达质粒构建成功。同时,MTT 实验显示,乙醇刺激 L0-2 细胞 24 h 后 p38 γ 过表达组细胞的增殖率为(0.42 \pm 0.08)%,低于转染空载体的对照组(0.60 \pm 0.03)%;流式细胞术检测结果显示,p38 γ 过表达组细胞的凋亡率为(17.46 \pm 1.52)%,高于转染空载体质粒的对照组(13.18 \pm 1.34)%;Western blot 检测显示 p38 γ 过表达组中的 IL-6 和 TNF- α 表达较对照组升高。结论 p38 γ 能够抑制乙醇刺激的 L0-2 肝细胞的增殖,并促进其凋亡。同时,p38 γ 能够促进乙醇刺激后的 L0-2 肝细胞中 IL-6 和 TNF- α 的表达。

关键词 p38 γ ; L0-2; 增殖; 凋亡; 白细胞介素-6; 肿瘤坏死因子- α

中图分类号 R 345.57

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)01-0092-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.01.018

细胞外信号调节激酶^[1] P38 是 P38 MAPKs 的一个亚型,P38 γ 与人类约一半的癌症、感染、自身免

疫性疾病等引起的炎症有关,其主要是通过对炎症信号通路调节,从而促进肿瘤的发生^[2]。相关实验表明 p38 γ 可能是肝癌治疗的一个新靶点^[3],p38 γ 可能在肝脏疾病的发生发展中起到关键性的作用。相关研究^[4]表明 p38 γ 在非酒精性肝病中高表达,且沉默 p38 γ 后能够减轻小鼠脂肪变性的程度。然而,p38 γ 在酒精性肝病中的表达情况及其对炎症因子的调节作用尚不清楚。L0-2 细胞是正常人源肝细胞,常用于研究酒精性肝病中炎症分泌及脂质代谢的相关调节机制。故选取 L0-2 细胞,用 100 mmol/L 乙醇刺激细胞 24 h,研究 p38 γ 对相应炎症因子的调节作用^[5]。该实验将通过构建 p38 γ 的过表达质粒,研究 p38 γ 对乙醇刺激后的 L0-2 细胞的增殖和凋亡及其炎症因子白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)表达情况的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料 L0-2 细胞株(安徽医科大学药学院保存);Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(上海 BestBio 公司);p38 γ 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);Western blot 试剂盒、超敏 ECL 化学发光试剂及 TRIzol Reagent RNA 提取试剂(上海 Beyotime 公司);细胞培养瓶及培养板(无锡 NEST 公司);PVDF 膜(上海安谱实验科技股份有限公司);DMEM 培养基、胎牛血清(北京沃卡威生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 重建质粒的构建 pEGFP-C1-p38 γ 人源质粒由安徽通用生物系统有限公司构建,并送至上海生工生物有限公司测序鉴定。

1.2.2 pEGFP-C1-p38 γ 质粒的转染及实验分组 L0-2 细胞置于 6 孔板中培养至 60%。将 A 液(200 μ l 的 Opti-MEM 及 1 μ g pEGFP-C1-p38 γ 质粒)与 B 液(200 μ l 的 Opti-MEM 及 4 μ l LipofectamineTM2000 脂质体)分别置于 1.5 ml EP 管中静置 5 min 后,将 A、B 液混匀静置 20 min,置于 6 孔板中再补齐 Opti-MEM 至 2 ml,6 h 后,更换为含 100 mmol/L 乙醇的

2020-08-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81700522) 安徽省自然科学基金(编号:1808085MH235)

作者单位:安徽医科大学¹ 药学院、² 生命科学学院,合肥 230032

³ 蚌埠医学院第一附属医院国家药物临床试验机构,蚌埠 233004

作者简介:胡爽,女,硕士研究生;

周焕,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:zhouhuanbest@163.com;

徐涛,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: xutao@ahmu.edu.cn

培养基,继续培养 24 h 后待用。L0-2 细胞,未加处理的为正常组,经 100 mmol/L 乙醇刺激 24 h 的为模型组,在此基础上再转染空载体质粒的为对照组或转染 pEGFP-C1-p38 γ 质粒的为过表达组。

1.2.3 Western blot 实验 弃去 6 孔板中培养基, PBS 清洗 3 遍,每孔 200 μ l 加入蛋白裂解液(RIPA 裂解液:苯甲基磺酰氟=100:1)于冰上裂解细胞 30 min 提取蛋白。进行 SDS-PAGE 电泳,在 200 mA 恒流的条件下湿转 60 min 后,取出 PVDF 膜置于 5% 牛奶中封闭 2 h,用 Tris-HCl 缓冲盐溶液(TBST)清洗 3 遍,孵育一抗(β -actin、p38 γ)过夜。TBST 清洗 3 遍,室温孵育二抗 1 h, TBST 清洗后显影。

1.2.4 MTT 实验 在 96 孔培养板中接种 5 000 数量的 L0-2 细胞至 70% 后,再向每孔转染约 70 ng pEGFP-C1-p38 γ 质粒 6 h 后更换含 100 mmol/L 乙醇的培养基,再培养 48 h 后每孔加入 20 μ l MTT 4 h 后,用 5 ml 注射器弃去培养基,每孔加入 150 μ l 二甲基亚砜,充分裂解 10 min 后,测定吸光度,计算细胞存活率。

1.2.5 流式细胞术 将 L0-2 细胞接种至 6 孔板中,转染 pEGFP-C1-p38 γ 质粒,转染成功后,使用 PBS 清洗 3 次,加入 1 ml 的胰酶进行消化,收集细胞放置于 15 ml 离心管中,每组用 400 μ l Binding Buffer 重悬细胞,再加入 5 μ l Annexin V 染液,避光孵育 15 min,再加入 10 μ l PI,避光孵育 5 min 后,使用流式细胞仪检测细胞凋亡率,观察并记录。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行统计,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验两两比较,采用 One-way ANOVA 检验多组比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pEGFP-C1-p38 γ 真核表达质粒的构建 在人源 L0-2 细胞中提取 RNA,逆转录后 PCR 扩增 p38 γ 的 CDS 序列,利用 XhoI 和 EcoRI 双酶切扩增产物和 pEGFP-C1 载体,并用 T4 DNA 连接酶连接两产物,将其转化到 TG 1 感受态细胞,用抽提试剂盒提取质粒,酶切鉴定(XhoI 和 EcoRI 双酶切)阳性重组质粒的插入,送至上海生工生物有限公司鉴定测序。pEGFP-C1-p38 γ 质粒成功构建,见图 1。

2.2 pEGFP-C1-p38 γ 真核表达质粒的表达 将 pEGFP-C1-p38 γ 表达质粒转染至 L0-2 细胞中,利用 Western blot 检测其蛋白表达情况。结果显示过表达组的 p38 γ 的蛋白表达量高于转染空载体的对照

组($t = 8.786$ $P < 0.01$),见图 2。

2.3 p38 γ 对 L0-2 细胞增殖的影响 MTT 检测将 pEGFP-C1-p38 γ 表达质粒转染至 L0-2 细胞后的细胞增殖情况,结果显示 24 h 后正常组增殖率为 $(0.96 \pm 0.06) \%$,模型组及对照组增殖率为 $(0.65 \pm 0.05) \%$ 和 $(0.60 \pm 0.03) \%$,过表达组的细胞增殖率为 $(0.42 \pm 0.08) \%$,低于模型组和转染空载体的对照组($F = 42.91$ $P < 0.05$),见图 3。

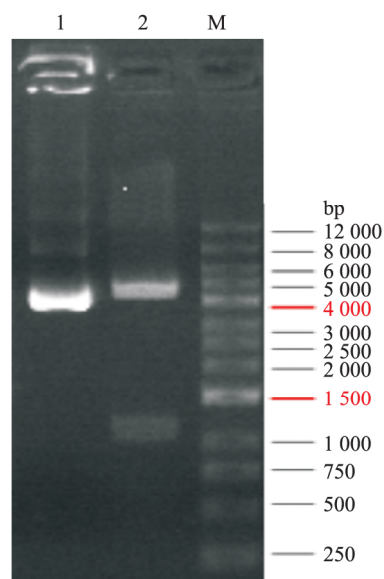


图 1 重组质粒 pEGFP-C1-p38 γ 的酶切鉴定

1: pEGFP-C1-p38 γ 的酶切鉴定; 2: pEGFP-C1 的酶切鉴定; M: DNA Marker

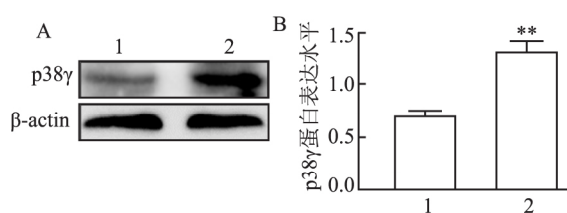


图 2 重组质粒 pEGFP-C1-p38 γ 的蛋白表达

A: Western blot 检测质粒 pEGFP-C1-p38 γ 的蛋白表达; B: p38 γ 蛋白表达图; 1: 对照组; 2: 过表达组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

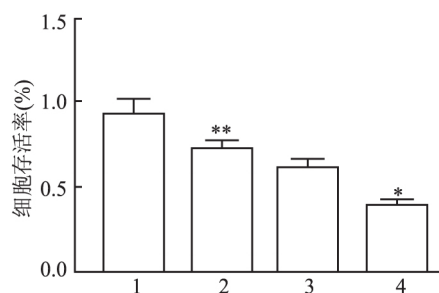


图 3 MTT 检测细胞增殖

1: 正常组; 2: 模型组; 3: 对照组; 4: 过表达组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

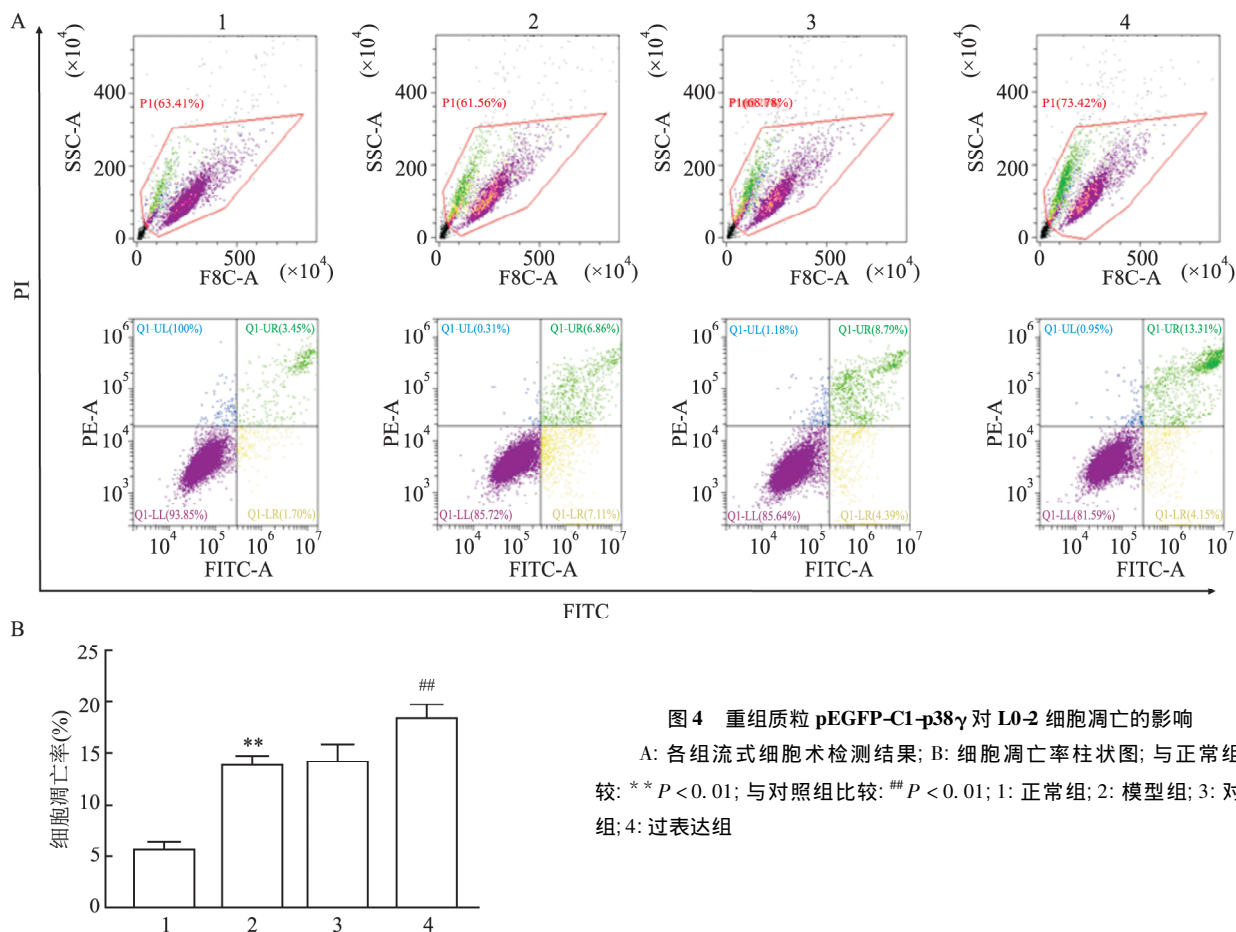


图4 重组质粒 pEGFP-C1-p38 γ 对 L0-2 细胞凋亡的影响

A: 各组流式细胞术检测结果; B: 细胞凋亡率柱状图; 与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与对照组比较: ## $P < 0.01$; 1: 正常组; 2: 模型组; 3: 对照组; 4: 过表达组

2.4 p38 γ 对细胞凋亡的影响 转染 pEGFP-C1-p38 γ 质粒到处于对数期生长的 L0-2 细胞中, 48 h 后用凋亡试剂盒在流式仪上检测细胞凋亡率, 结果显示正常组的细胞凋亡率为 $(5.15 \pm 0.81)\%$, 模型组及对照组的细胞凋亡率分别为 $(13.97 \pm 1.14)\%$ 和 $(13.18 \pm 1.34)\%$, 而过表达组的细胞凋亡率 $(17.46 \pm 1.52)\%$, 高于对照组 ($F = 24.33$, $P < 0.05$)。结果表明过表达 p38 γ 能够促进乙醇刺激后的 L0-2 细胞的凋亡, 见图 4A、4B。

2.5 p38 γ 在 L0-2 细胞中对炎症因子的影响 在 L0-2 细胞中转染 pEGFP-C1-p38 γ 质粒, Western blot 检测细胞中 IL-6 和 TNF- α 炎症因子的表达, 转染后的过表达组中的 IL-6 表达较对照组升高 ($P < 0.01$); TNF- α 的表达对照组升高 ($F = 50.33$, $P < 0.01$), 表明在 L0-2 细胞中, p38 γ 促进炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的表达。见图 5。

3 讨论

有丝分裂原激活蛋白激酶 p38 家族包含 4 种亚型 p38 α 、p38 β 、p38 γ 和 p38 δ , 是存在于各种生物细

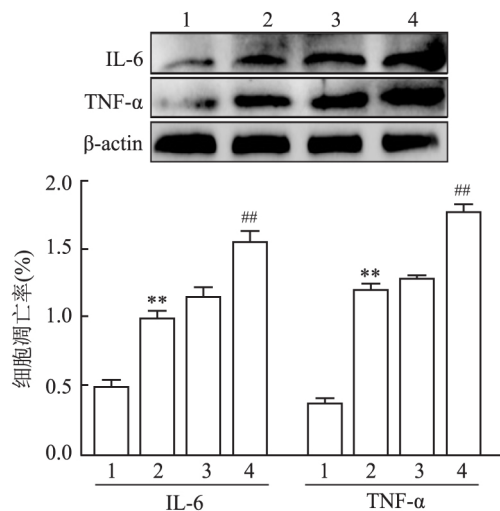


图5 p38 γ 转染后 Western blot 检测炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的表达

1: 正常组; 2: 模型组; 3: 对照组; 4: 过表达组; 与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与对照组比较: ## $P < 0.01$

胞中一条重要的信号传导通路^[1], 其在细胞对环境应激反应中起着重要作用^[6]。其中, p38 γ 在骨骼肌中含量丰富, 对细胞周期进展至关重要^[3], 同时参

与肿瘤的发生、癌症干细胞的迁移/侵袭和细胞转化的调节^[7]。研究证实 p38 γ 在非酒精性脂肪肝^[4]及肝癌^[3]中都发挥着一定的调节作用,但其在酒精性肝病中的调节作用仍不清楚。酒精性肝病是由于长期大量饮酒所致的肝脏疾病,在西方国家,长期大量饮酒导致的酒精性肝硬化是肝硬化的最主要类型,也是肝移植最常见的适应证之一^[8]。炎症作为酒精性肝病的初始阶段,在酒精性肝病的发展进程中的起着至关重要的作用。其研究中主要的炎症细胞因子有 IL-6 和 TNF- α ^[9]。L0-2 是正常肝细胞系,细胞多为圆核状,有中等数量的内质网、线粒体等特征^[10],是研究肝脏毒性常用的细胞模型,可用于评价外源生物性异物的安全性或毒性实验等^[11-12]。乙醇刺激 L0-2 细胞后会促使其分泌炎症因子,该实验在乙醇刺激 L0-2 细胞 24 h 后构建 p38 γ 过表达模型,探索 p38 γ 对炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的调节作用。Western blot 结果显示过表达 p38 γ 后,IL-6 和 TNF- α 的表达升高,表明 p38 γ 会加重 L0-2 细胞的炎症反应。同时,本实验研究了 p38 γ 对乙醇刺激的 L0-2 细胞增殖和凋亡的影响。研究^[13]表明正常的肝细胞增殖和凋亡可以调节正常肝细胞的数量,维持肝脏功能和体积,但病理状态下,异常的肝细胞增殖和凋亡会参与酒精性肝病的发生。尽管相关文献显示 p38 的主要作用为促进细胞的增殖,但 p38 家族和 p38 γ 之间的功能并不完全一致,且 p38 γ 在不同疾病中的功能也不是完全一致。该研究 MTT 及流式细胞术实验结果显示,乙醇刺激 24 h 后,过表达 p38 γ 能够抑制乙醇刺激后的 L0-2 细胞的增殖,促进乙醇刺激后的 L0-2 细胞的凋亡。该研究揭示 p38 γ 可能通过调节乙醇刺激后的肝细胞的增殖和凋亡来影响酒精性肝病发病进程。

参考文献

- [1] 曾瑞霞,苏玉虹,巴彩凤,等.猪 MAPK12 基因 cDNA 的克隆及序列分析[J].中国农学通报 2006 22(9):31.
- [2] 孙晓宇,张丽梅. MAPK12 在甲状腺乳头状癌中的表达及临床意义[J].临床检验杂志(电子版) 2019,8(1):189-90.
- [3] Tomás-Loba A, Manieri E, González-Terán B, et al. p38 γ is essential for cell cycle progression and liver tumorigenesis[J]. Nature 2019 568(7753):557-60.
- [4] González-Terán B, Matesanz N, Nikolic I, et al. p38 γ and p38 δ reprogram liver metabolism by modulating neutrophil infiltration[J]. EMBO J 2016 35(5):536-52.
- [5] Wang H, Zhang Y, Bai R, et al. Baicalin attenuates alcoholic liver injury through modulation of hepatic oxidative stress, inflammation and sonic hedgehog pathway in rats[J]. Cell Physiol Biochem 2016 39(3):1129-40.
- [6] Xu M, Wang S, Wang Y, et al. Role of p38 γ MAPK in regulation of EMT and cancer stem cell[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis 2018 1864(11):3605-17.
- [7] 杨勇骥,汤莹,于洋,等.纳米材料侵入细胞的电镜研究[J].电子显微学报 2008 27(5):400-3.
- [8] 贡建蔚,张德奎,栾新明.酒精性肝病合并 2 型糖尿病临床特征分析[J].人民军医,2019 62(9):843-6 863.
- [9] 陈哲林,许金诚.心力衰竭患者血清肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素 6 和白细胞介素 6 受体水平的测定及临床意义[J].广东医学院学报,2002,20(4):276.
- [10] 冷新,游龙泰,杨春静,等. U10-66(Zr) 对人正常肝细胞 L02 的安全性评价[J].中南药学,2018,16(7):921-5.
- [11] Zeng T, Zhang C L, Xiao M, et al. Critical roles of kupffer cells in the pathogenesis of alcoholic liver disease: from basic science to clinical trials[J]. Front Immunol, 2016, 7: 538.
- [12] 吴泽建,雷正明,黎靖,等. TNF- α 、IL-6 与肝储备功能关系的探讨[J].泸州医学院学报,2001,24(6):483-5.
- [13] 孙健. Nrf2 与肝细胞凋亡在非酒精性脂肪性肝病小鼠中的作用及相互关系[D]. 济南:山东大学,2011.

Construction of eukaryotic expression of human derived pEGFP-C1-p38 γ plasmids and its function research

Hu Shuang, Yang Li, Chen Chen, et al

(College of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To construct a human derived pEGFP-C1-p38 γ expression plasmid and observe its expression of inflammatory factors in alcohol-induced L0-2 cells and its effect on cell proliferation and apoptosis. **Methods**

RNA was extracted from L0-2 cells and reversely transcribed into cDNA. At the same time, the primers were diluted to 10 μ mol/L and the rest were used as storage fluid. P38 γ was amplified by PCR technology and identified.

The DNA gel recovery kit AxyPrep was used for the purification and recovery of PCR products. Then the PCR

(下转第 102 页)

Protective effect of Arctigenin on renal ischemia-reperfusion injury in elderly rats

Ke Xiaoyue, Huang Mengjiao, Du Hengjian, et al

(Dept of Geriatrics, Sichuan Academy of Medical Sciences • Sichuan People's Hospital, Chengdu 610027)

Abstract Objective To explore the effect of Arctigenin on renal ischemia-reperfusion injury model in aged rats. **Methods** The model of renal ischemia-reperfusion injury in elderly rats was established, and the rats were randomly divided into 6 groups by random number table method: Sham group, Arctigenin group (ACR), renal ischemia-reperfusion model group (RIRI), RIRI + ACR (10 mg/kg) group, RIRI + ACR (20 mg/kg) group and RIRI + ACR (50 mg/kg) group for follow-up experiments. Kit was used to detect Scr and BUN levels. HE staining was used to detect pathological damage of renal tissue. Apoptosis was detected by TUNEL staining. The levels of inflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-8 were detected by ELISA. The expression levels of KIM-1, NGAL, cleaved caspase-3, cleaved caspase-9, PI3K, p-PI3K, Akt and p-Akt were detected by Western blot. After the PI3K/Akt pathway inhibitor LY294002 was added, the rats were randomly divided into 5 groups: Sham group, RIRI group, RIRI + ACR (50 mg/kg) group, RIRI + LY294002 group and RIRI + ACR + LY294002 group. Western blot was used to detect the expression levels of PI3K, p-pi3k, Akt and p-akt in the rats in each group. The kit was used to detect the levels of Scr and BUN, and ELISA was used to detect the levels of TNF- α , IL-6 and IL-8. **Results** The results showed that compared with RIRI group, RIRI + ACR (20, 50 mg/kg) group of Scr and BUN levels in rats decreased obviously, obviously improved pathological damage degree, KIM-1, NGAL protein levels significantly decreased, apoptotic cells significantly reduced, cleaved caspase-3, cleaved caspase-9 protein levels significantly decreased, the TNF- α , IL-6, IL-8 levels significantly decreased, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt ratio increased significantly. **Conclusion** Arctigenin has protective effect on renal ischemia-reperfusion injury in aged rats.

Key words Arctigenin; renal ischemia-reperfusion injury in elderly rats; inflammatory factors; PI3K/Akt signaling pathway

(上接第 95 页)

products and carriers were recovered by enzyme digestion. After enzyme digestion and identification, they were sent to sequencing for identification and sequencing. The constructed plasmids were transfected into alcohol-induced L0-2 cells of human mononuclear macrophage cell line. The effects on cell proliferation and apoptosis were detected by MTT assay and flow cytometry, and the expressions of inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α in alcohol-induced L0-2 cells were detected by Western blot. **Results** Sequencing results showed that pEGFP-C1-p38 γ eukaryotic expression plasmid was successfully constructed. The results of MTT assay showed that 24 h later, the cell proliferation rate of the p38 γ overexpressed group (0.42 ± 0.08) % was significantly lower than that of the control group (0.60 ± 0.03) %. The results of flow cytometry showed that the apoptosis rate of p38 γ overexpressed cells group was (17.46 ± 1.52) %, significantly higher than that in the control group (13.18 ± 1.34) % ($P < 0.05$). Western blot result showed that the expression of IL-6 and TNF- α in L0-2 cells transfected with pEGFP-C1-p38 γ plasmid was higher than that in the control group. **Conclusion** P38 γ can significantly inhibit the proliferation and promote the apoptosis of alcohol-induced L0-2 liver cells. P38 γ promotes the expression of inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α in alcohol-induced L0-2 cells.

Key words P38 γ ; L0-2; proliferation; apoptosis; IL-6; TNF- α