

· 论 著 ·

用于转化生长因子 β /Smad 信号转导通路抑制剂筛选的
慢病毒报告载体的构建杨翠平^{1,2}, 何 园², 刘慧莹², 张 砾³, 周晨辰³, 米志强⁴, 查玉华³, 柏长青²

(1. 解放军医学院, 北京 100039; 中国人民解放军总医院第五医学中心南院区 2. 呼吸与危重症医学科, 3. 医学工程科, 北京 100071; 4. 军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071)

摘要:目的 构建由转化生长因子 β (TGF- β)诱导的含有 Smad 响应元件(Smad RE)和红色荧光蛋白 mCherry 或荧光素酶报告基因序列的慢病毒报告载体,为筛选 TGF- β /Smad 信号转导通路抑制剂提供有效工具。方法 合成 UAS-Smad RE-Pmin-Gal4VP64-mCherry 和 UAS-Smad RE-Pmin-Gal4VP64-luciferase 报告基因序列,分别将其插入经 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切后的 pCDH-GFP-Puro-noCMV 慢病毒质粒载体,获得响应 TGF- β 的含有 Smad RE 和 mCherry 或荧光素酶报告基因序列的慢病毒报告载体,分别命名为 pCDH-USPG-mCherry 和 pCDH-USPG-luciferase。利用慢病毒三质粒包装系统在 293FT 细胞中分别包装出慢病毒并感染 A549 细胞(分别命名为 USPG-mCherry A549 和 USPG-luciferase A549 细胞),在倒置荧光显微镜下观察细胞中绿色荧光蛋白(GFP)的表达,鉴定 A549 细胞是否被感染成功。用 TGF- β ($10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)及其受体拮抗剂 LY2109761 ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和 SB431542 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)分别处理 USPG-mCherry A549 和 USPG-luciferase A549 细胞 24 h,倒置荧光显微镜下观察 USPG-mCherry A549 细胞 mCherry 的表达,用荧光素酶报告基因检测试剂盒检测 USPG-luciferase A549 细胞荧光素酶的表达,验证所构建慢病毒报告载体用于筛选 TGF- β /Smad 信号转导通路抑制剂的可行性。用 TGF- β 及其受体拮抗剂 LY2109761 和 SB431542 处理 A549 细胞 24 h,Western 印迹法检测 A549 细胞磷酸化 Smad2/3 蛋白表达,验证 LY2109761 和 SB431542 对 TGF- β /Smad 信号转导通路的抑制作用。结果 经限制性内切酶酶切鉴定及测序分析,成功构建 pCDH-USPG-mCherry 和 pCDH-USPG-luciferase 慢病毒重组质粒;分别转染 293FT 细胞包装出慢病毒并感染 A549 细胞,倒置荧光显微镜下观察到被感染的 A549 细胞表达 GFP,表明 USPG-mCherry A549 和 USPG-luciferase A549 细胞构建成功。加入 TGF- β 处理 24 h 后,USPG-mCherry A549 细胞表达 mCherry,USPG-luciferase A549 细胞表达荧光素酶;而加入 LY2109761 和 SB431542 后,USPG-mCherry A549 细胞几乎检测不到 mCherry 的表达,USPG-luciferase A549 细胞检测不到荧光素酶的表达。Western 印迹法结果表明,TGF- β 刺激后 A549 细胞中有磷酸化 Smad2/3 蛋白表达,加入 LY2109761 和 SB431542 后未检测到磷酸化 Smad2/3 蛋白表达。结论 成功构建由 TGF- β 诱导的受 Smad 调控表达 mCherry 和荧光素酶的 2 个慢病毒报告载体,可有效感染目的细胞。该慢病毒报告载体可用于筛选 TGF- β /Smad 信号转导通路抑制剂。

关键词: 转化生长因子 β ; Smad; 慢病毒报告基因; 受体; 拮抗剂

中图分类号:R965.1 文献标志码:A 文章编号:1000-3002-(2022)04-0274-08

DOI:10.3867/j.issn.1000-3002.2022.04.005

转化生长因子 β (transforming growth factor- β ,

基金项目:国家重点研发计划(2017YFF0108605);国家重点研发计划(2018YFC160025);北京市自然科学基金(7202196);北京市自然科学基金(5192021)

作者简介:杨翠平,硕士研究生,主要从事呼吸与危重症治疗研究。

通讯作者:柏长青,E-mail: Baicq307@163.com; 查玉华,E-mail: ygk307@sina.com

TGF- β)是一个由多种分泌型多肽信号分子组成的细胞因子超家族,调节机体的多种生物学功能。Smad 蛋白在 TGF- β 的胞内信号转导中起关键作用,是目前发现的唯一一个 TGF- β 受体胞内激酶底物,可将 TGF- β 信号由细胞膜外直接转入细胞核,TGF- β /Smad 信号转导通路在生物体的胚胎发育、成体组织再生及内环境稳态中均发挥重要作用^[1]。Smad 蛋白是 TGF- β I 型受体(TGF- β receptor I,

T β R- I) 的直接作用底物,从结构和功能上主要分为 3 个亚型:① 受体调节型 Smad (receptor-activated Smad, R-Smad), 包含 5 个成员: Smad 1, 2, 3, 5 和 8; ② 共同通路型 Smad, 哺乳动物中只有 Smad 4, 与其他 Smad 的同源性较低, 参与所有 TGF- β 超家族的信号转导, C 端功能域无磷酸化位点, 不与受体直接作用, 与 R-Smad 形成稳定的异源多聚体进入细胞核; ③ 抑制型 Smad, 包含 Smad 6 和 7, 通过阻断 R-Smad 磷酸化, 对 TGF- β 信号转导通路发挥负调控作用^[2]。TGF- β /Smad 信号转导通路中各型 Smad 分子之间的作用精密协调, 共同完成生理及病理状态下 TGF- β 的生物学效应^[2]。研究 TGF- β /Smad 信号转导通路的具体作用机制对阐明肺纤维化等疾病发生机制及筛选药物治疗靶点十分重要, 亦有助于进一步探索 Smad 蛋白在多细胞生物体结构的发育和维持中发挥的调节作用^[3]。

红色荧光蛋白 mCherry 和荧光素酶报告基因载体具有操作简便、易于观察、灵敏度高、稳定性好等优点。本研究构建一种以 Smad 响应元件 (Smad response elements, Smad RE) 作为转录调控顺式元件、以 Gal4VP64 为放大调控因子、以 mCherry 或荧光素酶为报告基因的表达式载体, 并进一步构建由 TGF- β 诱导表达 mCherry 或荧光素酶的人非小细胞肺癌 A549 细胞系, 通过观察 mCherry 或荧光素酶的表达筛选 TGF- β /Smad 信号转导通路相关抑制剂。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂和主要仪器

A549 细胞 (人非小细胞肺癌细胞系) 和 293FT (人肾上皮细胞系) 及慢病毒质粒载体 pCDH-GFP-Puro-noCMV 由本实验室保存; UAS-Smad RE-Pmin-Gal4VP64-mCherry 和 UAS-Smad RE-Pmin-Gal4VP64-luciferase 报告基因序列由通用生物系统 (安徽) 有限公司合成, 报告基因序列中的 Smad RE 参照 Dennler 等^[4] 设计, 序列为: 5'-TC-GAGAGCCAGACAAAAGCCAGACATTTAGCC-AGACAAAAGCCAGACATTTAGCCAGACAAA-AAGCCAGACATTTAGCCAGACAAAAGCCAG-ACATTTAGCCAGACAC-3'; *EcoR I* 和 *BamH I* 限制性核酸内切酶、DNA 聚合酶、PCR 反应试剂及 3.1NEB 缓冲液 (美国 NEB 公司); 感受态细菌 DH5 α 、质粒提取试剂盒及 DNA 电泳凝胶回收试剂盒 [天根科技生化 (北京) 有限公司]; 脂质体 lipo-

fectamine 2000 (美国 Invitrogen 公司); 胎牛血清和 DMEM 高糖培养基 (美国 Gibco 公司); TGF- β 受体拮抗剂 LY2109761 和 SB431542、兔抗人 Smad2/3 和磷酸化 Smad2/3 (phospho-Smad2/3, p-Smad2/3) 多克隆抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司); 小鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体 (美国 Santa Cruz Biotechnology); 辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG 和羊抗兔 IgG 多克隆抗体 (二抗) (美国 Jackson 公司); RIPA 裂解液和 PMSF 蛋白酶抑制剂 (北京索莱宝科技有限公司); ECL 发光试剂盒和重组人 TGF- β (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 荧光素酶检测试剂盒 (美国 Promega 公司); 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 重组慢病毒质粒 pCDH-USPG-mCherry 和 pCDH-USPG-luciferase 的构建和鉴定

首先用限制性核酸内切酶 *EcoR I* 和 *BamH I* 分别酶切 pCDH-GFP-Puro-noCMV 慢病毒质粒载体及 UAS-Smad RE-Pmin-Gal4VP64-mCherry 和 UAS-Smad RE-Pmin-Gal4VP64-luciferase 报告基因序列, 使它们线性化后通过 T4 DNA 连接酶将该载体分别与 UAS-Smad RE-Pmin-Gal4VP64-mCherry 和 UAS-Smad RE-Pmin-Gal4VP64-luciferase 报告基因序列连接 (图 1), 分别获得由 TGF- β 诱导的含有 Smad RE 和 mCherry 或荧光素酶报告基因序列的重组慢病毒质粒载体, 分别命名为

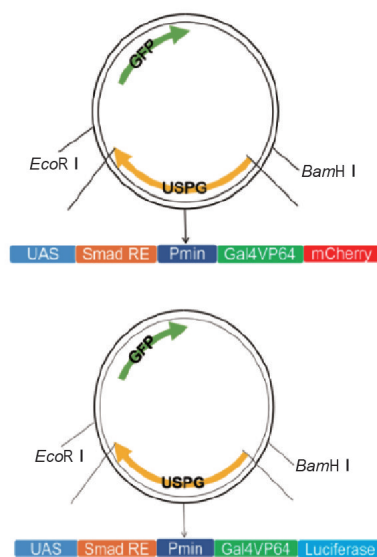


Fig. 1 Schematic diagrams of construction of recombinant lentiviral plasmid vectors—pCDH-USPG-mCherry and pCDH-USPG-luciferase recombinant lentiviral plasmids induced by transforming growth factor- β (TGF- β), which contained Smad response elements (Smad RE) and mCherry (red fluorescent protein) or luciferase sequences, respectively.

pCDH-USPG-mCherry 和 pCDH-USPG-luciferase。将该 2 个重组慢病毒质粒分别转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞扩增,随后挑取单克隆、酶切和测序,鉴定重组慢病毒质粒 pCDH-USPG-mCherry 和 pCDH-USPG-luciferase 是否构建成功。

1.3 慢病毒包装

取对数期生长状态良好的 293FT 细胞,接种于 60 mm \times 15 mm 皿中,37 $^{\circ}$ C,5% CO $_2$ 培养箱内培养,当细胞汇合度达到 60%~70% 时开始转染。1 个目标质粒:pCDH-USPG-mCherry 或 pCDH-USPG-luciferase,4 μ g;2 个辅助质粒:pMD2G 1 μ g,psPAX2 3 μ g。首先用 Opti-MEM 100 μ L 分别稀释 2 个辅助质粒和 1 个目标质粒,轻轻吹吸 3~5 次混匀;其次用 Opti-MEM 100 μ L 稀释 16 μ L LipofectamineTM2000,轻轻吹吸 3~5 次混匀,室温下静置 5 min;随后混合转染试剂和质粒 DNA 稀释液,轻轻吹吸 3~5 次混匀,室温下静置 20 min;最后将转染复合物加入到 293FT 细胞培养皿中,前后轻摇培养皿混合均匀。转染 6 h 后更换新鲜培养基,48 h 后收集细胞上清液 1 次;加入新鲜培养基继续培养,72 h 后再次收集细胞上清液。将 2 次收集的上清液合并,300 \times g 离心 5 min 去除残余细胞。用 0.22 μ m 的滤器过滤后,4000 \times g 离心 20 min 得到病毒浓缩液约 200 μ L,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 慢病毒感染 A549 细胞

以每孔 $3\times 10^4\sim 5\times 10^4$ A549 细胞接种于 6 孔培养板,待细胞生长至对数增长期且状态良好时,加入浓缩后的 pCDH-USPG-mCherry 或 pCDH-USPG-luciferase 病毒液 50 μ L。感染后约 72 h,在 450 nm 激发光照射下,利用倒置荧光显微镜观察 A549 细胞是否表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)。随后加入嘌呤霉素 5 mg \cdot L $^{-1}$ 筛选感染成功的细胞。24 h 后更换新鲜培养基,未成功感染的细胞被嘌呤霉素杀死,感染成功的细胞完好,并表达 GFP。感染成功的细胞分别命名为 USP-g-mCherry A549 和 USP-g-luciferase A549 细胞,扩大培养后备用。

1.5 倒置荧光显微镜观察 USP-g-mCherry A549 细胞 mCherry 的表达

取稳定感染的 USP-g-mCherry A549 细胞加入 24 孔板,在 37 $^{\circ}$ C,5%CO $_2$ 及饱和湿度条件下培养,待细胞汇合度达约 80% 时进行实验。实验分为细胞对照、TGF- β (终浓度 10 μ g \cdot L $^{-1}$)、LY2109761(终浓度 5 μ mol \cdot L $^{-1}$)、SB431542(终浓度 10 μ mol \cdot L $^{-1}$)、LY2109761+TGF- β 和 SB431542+TGF- β 组,其中 LY2109761+TGF- β 和 SB431542+TGF- β 组先分别

加入 LY2109761(终浓度 5 μ mol \cdot L $^{-1}$)和 SB431542(终浓度 10 μ mol \cdot L $^{-1}$)预孵育 1 h,然后加入 TGF- β (终浓度 10 μ g \cdot L $^{-1}$)。各组继续培养 24 h 后,通过倒置荧光显微镜观察各组细胞 mCherry 的表达。

1.6 荧光素酶检测试剂盒检测 USP-g-luciferase A549 细胞荧光素酶的表达

取稳定感染的 USP-g-luciferase A549 细胞加入 24 孔板中,在 37 $^{\circ}$ C,5%CO $_2$ 及饱和湿度条件下培养,待细胞汇合度达约 80% 时进行实验。实验分为细胞对照、TGF- β (终浓度 10 和 50 μ g \cdot L $^{-1}$)、LY2109761(终浓度 5 μ mol \cdot L $^{-1}$)+TGF- β (终浓度 10 μ g \cdot L $^{-1}$)和 SB431542(终浓度 10 μ mol \cdot L $^{-1}$)+TGF- β (终浓度 10 μ g \cdot L $^{-1}$)组,其中 LY2109761+TGF- β 和 SB431542+TGF- β 组先加入 LY2109761 和 SB431542 孵育 1 h,然后加入 TGF- β 。各组继续培养 24 h 后裂解细胞,使用 Tanon 5200 化学发光成像分析系统拍摄荧光图像,并利用荧光素酶检测试剂盒检测荧光素酶的表达。

1.7 Western 印迹法检测 A549 细胞中 Smad2/3 蛋白磷酸化水平

将 A549 细胞接种于 24 孔培养板中,在 37 $^{\circ}$ C,5%CO $_2$ 及饱和湿度条件下培养,待细胞汇合度达约 80% 时进行实验。实验分为细胞对照、TGF- β (终浓度 1,5 和 10 μ g \cdot L $^{-1}$)、LY2109761(终浓度 5 μ mol \cdot L $^{-1}$)、SB431542(终浓度 10 μ mol \cdot L $^{-1}$)、LY2109761(终浓度 5 μ mol \cdot L $^{-1}$)+TGF- β (终浓度为 1,5 和 10 μ g \cdot L $^{-1}$)和 SB431542(终浓度 10 μ mol \cdot L $^{-1}$)+TGF- β (终浓度为 1,5 和 10 μ g \cdot L $^{-1}$)组。① 细胞对照组用 DMEM 培养基培养;② LY2109761+TGF- β 和 SB431542+TGF- β 组先加入 LY2109761 和 SB431542 孵育 0.5 h,然后加入 TGF- β 。各组继续培养 1.0 h 后去除细胞培养基,用预冷的 PBS 洗 2 次,加入 RIPA 裂解液(RIPA 裂解液中加入 10% 的 PMSF,现用现配)裂解细胞;然后加入等体积 2 \times 蛋白上样缓冲液,于 98 $^{\circ}$ C 水浴锅中 15 min,使细胞充分裂解;6400 \times g 离心 2 min,上清用 BCA 法进行蛋白质定量后制成上样液。各样品取等量蛋白质上样,SDS-PAGE 电泳分离蛋白,随后电转移至 NC 膜。5% 的脱脂牛奶室温封闭 1 h,与 1:1000 稀释的一抗工作液 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。加入 1:1000 稀释的二抗工作液摇床上室温孵育 1 h;TBST 洗 3 次,每次 10 min。加入 ECL 显色液置 Tanon 5200 化学发光成像分析系统显影,参考蛋白质分子质量标准观察是否有 p-Smad2/3 蛋白表达。

2 结果

2.1 重组慢病毒质粒 pCDH-USPG-mCherry 和 pCDH-USPG-luciferase 的鉴定

构建的重组慢病毒质粒 pCDH-USPG-mCherry 和 pCDH-USPG-luciferase 经 *EcoR* I 与 *Bam*H I 双酶切后经琼脂糖凝胶电泳分离,随后用凝胶成像分析仪观察。如图 2 所示,pCDH-USPG-mCherry 酶切后,可见一条约 1690 bp 的条带,大小与 UAS-Smad RE-Pmin-Gal4VP64-mCherry 序列一致;pCDH-USPG-luciferase 酶切后,可见一条约 1772 bp 的条带,大小与 UAS-Smad RE-Pmin-Gal4VP64-luciferase 序列一致。选取酶切正确的单克隆菌落进行测序分析,测序结果显示与上述序列一致,表明重组慢病毒质粒载体 pCDH-USPG-mCherry 和 pCDH-USPG-luciferase 构建成功。

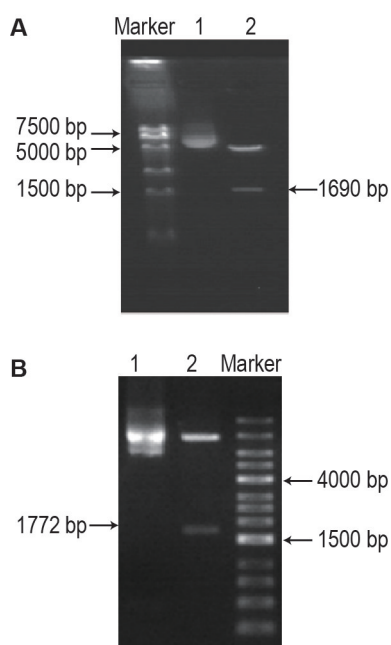


Fig.2 Identification of recombinant lentiviral plasmid vectors pCDH-USPG-mCherry and pCDH-USPG-luciferase. A: pCDH-USPG-mCherry vector identification by *EcoR* I and *Bam*H I enzymes digestion; lane 1: PCR product; lane 2: pCDH-USPG-mCherry enzymes digestion product. B: pCDH-USPG-luciferase vector identification by *EcoR* I and *Bam*H I enzymes digestion; lane 1: PCR product; lane 2: pCDH-USPG-luciferase enzyme digestion product.

2.2 转染细胞 USP-g-mCherry A549 和 USP-g-luciferase A549 的鉴定

用浓缩的含 pCDH-USPG-mCherry 或 pCDH-USPG-luciferase 的病毒液感染 A549 细胞,72 h 后用倒置荧光显微镜在 488 nm 激发光照射下可观察到被感染的 A549 细胞表达 GFP(图 3),表明 A549

细胞被感染成功,分别命名为 USP-g-mCherry A549 和 USP-g-luciferase A549 细胞。

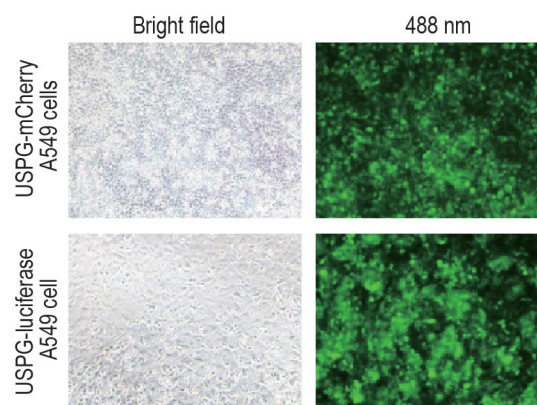


Fig.3 Identification of USP-g-mCherry A549 and USP-g-luciferase A549 transfected cells ($\times 100$). A549 cells were infected with concentrated virus fluids containing pCDH-USPG-mCherry or pCDH-USPG-luciferase (namely USP-g-mCherry A549 and USP-g-luciferase A549 cells, respectively). The expressions of green fluorescent protein in USP-g-mCherry A549 cells and USP-g-luciferase A549 were observed under excitation light at 488 nm under an inverted fluorescence microscope.

2.3 TGF- β 及其受体拮抗剂对 USP-g-mCherry A549 细胞 mCherry 表达的影响

如图 4 所示,USP-g-mCherry A549 细胞对照组及单独加入 LY2109761 或 SB431542 组未检测到 mCherry 的表达;TGF- β 组 mCherry 的表达较细胞对照组明显增强,分别加入 LY2109761 和 SB43154 后 mCherry 的表达较 TGF- β 组明显减弱。上述结果表明,受 Smad 调控表达 mCherry 的 USP-g-mCherry A549 细胞可用于筛选 TGF- β /Smad 信号转导通路抑制剂。

2.4 TGF- β 及其受体拮抗剂对 USP-g-luciferase A549 细胞荧光素酶表达的影响

如图 5 所示,USP-g-luciferase A549 细胞对照组荧光素酶的表达在基线水平,几乎不表达;与细胞对照组相比,加入 TGF- β (10 和 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)刺激后荧光素酶表达明显升高,分别为细胞对照组的 3.55 和 3.76 倍;而 LY2109761+TGF- β (10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)和 SB431542+TGF- β (10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)组荧光素酶表达较 TGF- β (10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)组又明显减弱,仅为 TGF- β (10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)组的约 1/3。上述结果表明,受 Smad 调控表达荧光素酶的 USP-g-luciferase A549 细胞可用于筛选 TGF- β /Smad 信号转导通路抑制剂。

2.5 TGF- β 及其受体拮抗剂对 A549 细胞 Smad2/3 蛋白磷酸化的影响

如图 6 所示,细胞对照、LY2109761 和 SB431542 组 A549 细胞未见 p-Smad2/3 蛋白表达;加入 TGF- β

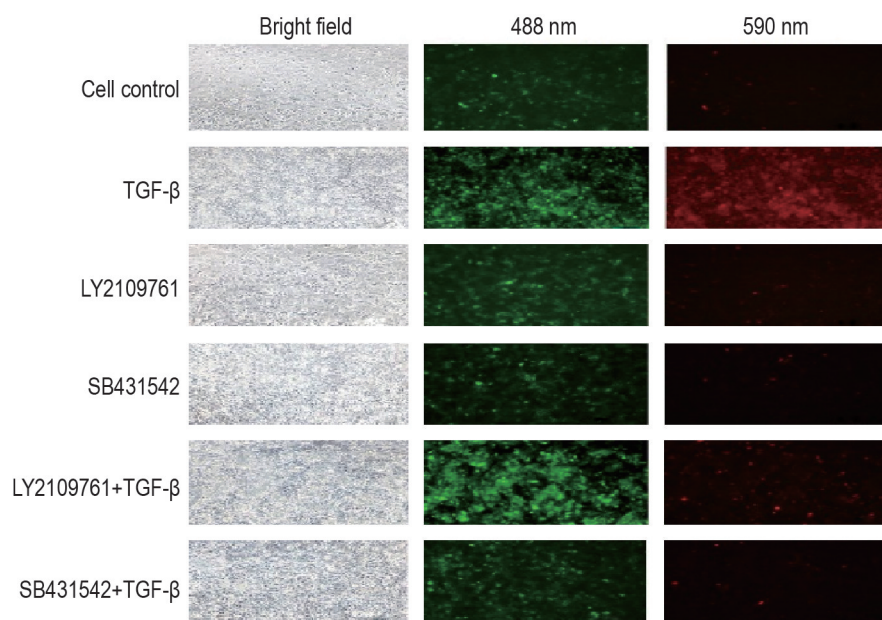


Fig.4 Effect of TGF- β and its receptor antagonists on mCherry red fluorescent protein expression of USP-g-mCherry A549 cells (100 \times). USP-g-mCherry A549 cells were divided into cell control, TGF- β (10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), LY2109761 (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), SB431542 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), LY2109761+TGF- β and SB431542+TGF- β groups. LY2109761+TGF- β and SB431542+TGF- β groups were pre-incubated with LY2109761 (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and SB431542 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), respectively, for 1 h before TGF- β (10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) was added. After 24 h of culture, the expression of mCherry in cells was observed under an inverted fluorescence microscope.

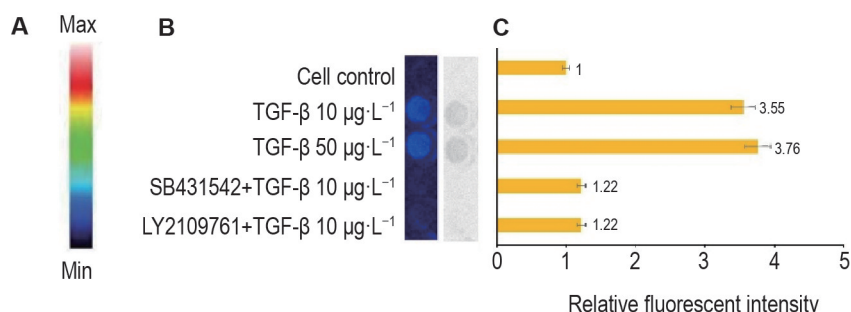


Fig.5 Effect of TGF- β and its receptor antagonists on luciferase expression of USP-g-luciferase A549 cells detected by luciferase detection kit. See Fig.4 for the cell treatment. A: pseudo-color image of cell luminescence imaging; B: luminescence imaging of cells; C: the relative expression level of luciferase was normalized by the cell control group.

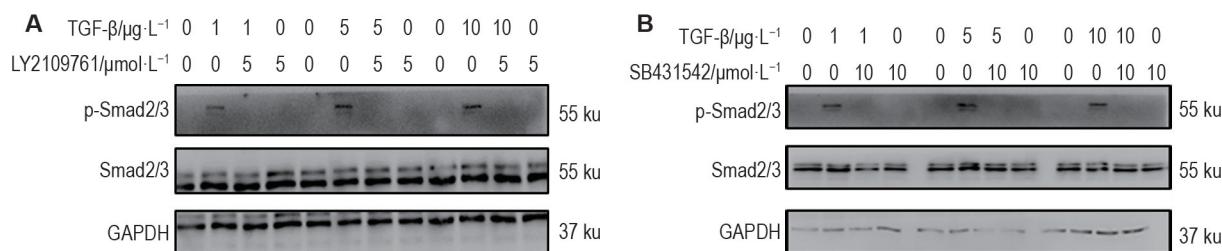


Fig.6 Effect of LY2109761 (A) and SB431542 (B) on expression of phosphorylated of Smad2/3 proteins (p-Smad2/3) in A549 cells by Western blotting. LY2109761+TGF- β and SB431542+TGF- β groups were pre-incubated with LY2109761 or SB431542 for 0.5 h, and then incubated with TGF- β for another 1.0 h.

(1,5和10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)刺激后,均可检测到p-Smad2/3蛋白表达;预先加入LY2109761或SB431542,TGF- β (1,5和10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)诱导的p-Smad2/3蛋白表达则

被明显抑制。上述结果表明,Smad2/3蛋白磷酸化被LY2109761或SB431542阻断,LY2109761和SB431542对TGF- β /Smad信号转导具有明显的抑制作用。

3 讨论

TGF- β /Smad 信号转导通路构成了一个多功能性的细胞因子网络,调控细胞周期、增殖、分化、黏附、转移和凋亡^[5-6]。Smad 蛋白是 TGF- β 超家族细胞内重要的信号转导和调节分子^[7],通过调节该信号通路中一系列下游基因的活性,参与人类多种疾病如纤维化、炎症、自身免疫性疾病和肿瘤等的发生与发展^[8]。阻断 TGF- β /Smad 信号传导可对其相关疾病的发展起到抑制作用。据文献报道,一些小分子抑制剂如 LY2109761 和 SB431542 可抑制该信号通路转导^[9],因此被广泛应用于与 TGF- β /Smad 信号转导相关的实验研究中。

mCherry 是一种来自于蘑菇珊瑚(mushroom corals)的红色荧光蛋白,能在特定波长激发时发出红色荧光^[10]。相对于其他荧光蛋白,mCherry 的优越性在于它可与应用较多的 GFP 共同标记,且荧光非常稳定。荧光素酶是能催化荧光素或脂肪醛氧化产生生物发光的一类酶,是一种常用的报告基因,因其具有非放射性、灵敏度高、操作简便、结果准确、无毒副作用等优点,在药物筛选领域已成为一种非常重要的研究工具^[11-14]。

本研究利用 DNA 重组技术成功构建 pCDH-USPG-mCherry 和 pCDH-USPG-luciferase 2 个重组慢病毒报告基因载体,在 293FT 细胞中包装出慢病毒感染 A549 细胞,利用倒置荧光显微镜观察到被感染的 A549 细胞表达 GFP,表明表达 mCherry 和荧光素酶的 USP-G-mCherry A549 和 USP-G-luciferase A549 细胞构建成功。加入 TGF- β 后可观察到 USP-G-mCherry A549 细胞表达 mCherry, USP-G-luciferase A549 细胞表达荧光素酶;而加入 TGF- β 受体拮抗剂 LY2109761 和 SB431542 后,mCherry 和荧光素酶的表达被抑制,表明本研究构建的慢病毒表达载体可成功响应与 TGF- β /Smad 信号转导通路相关的信号刺激。

最后,为初步探讨 LY2109761 和 SB431542 在 TGF- β 下游 Smad2/3 蛋白信号转导中的抑制作用,本研究用 A549 细胞检测其阻断 Smad2/3 蛋白磷酸化的作用。结果表明,LY2109761 和 SB431542 可特异性阻断 A549 细胞 Smad2/3 蛋白磷酸化,对 TGF- β /Smad 信号转导具有明显的抑制作用。

综上所述,本研究构建了 pCDH-USPG-mCherry 和 pCDH-USPG-luciferase 2 个慢病毒报告基因载体,通过观察 mCherry 荧光蛋白或荧光素酶的表达可鉴别目的细胞对 TGF- β /Smad 信号通路的响应,

而且结果稳定,操作简便,可直接用于以 TGF- β 或其受体家族为靶点的药物筛选和活性检测。

参考文献:

- [1] Macias MJ, Martin-Malpartida P, Massagué J. Structural determinants of Smad function in TGF- β signaling[J]. *Trends Biochem Sci*, 2015, 40(6): 296-308.
- [2] 陈蓉, 谢梅林. TGF- β /Smads 信号通路在心肌纤维化发生和治疗中应用前景的研究进展[J]. *中国药理学通报 (Chinese Pharmacological Bulletin)*, 2012, 28(9): 1189-1192.
- [3] Itoh Y, Koinuma D, Omata C, et al. A comparative analysis of Smad-responsive motifs identifies multiple regulatory inputs for TGF- β transcriptional activation [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(42): 15466-15479.
- [4] Dennler S, Itoh S, Vivien D, et al. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene[J]. *EMBO J*, 1998, 17(11): 3091-3100.
- [5] 刘谿, 赵琴平, 董惠芬, 等. TGF- β 信号传导通路及其生物学功能[J]. *中国病原生物学杂志 (Journal of Pathogen Biology)*, 2014, 9(1): 77-83.
- [6] Battle E, Massague J. Transforming growth factor- β signaling in immunity and cancer [J]. *Immunity*, 2019, 50(4): 924-940.
- [7] Rosen AB, Kelly DJ, Schuldt AJT, et al. Finding fluorescent needles in the cardiac haystack: tracking human mesenchymal stem cells labeled with quantum dots for quantitative *in vivo* three-dimensional fluorescence analysis[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(8): 2128-2138.
- [8] David CJ, Massague J. Contextual determinants of TGFbeta action in development, immunity and cancer [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(7): 419-435.
- [9] 桑晓宏, 王昊, 游雪甫, 等. 靶向 TGF- β 及受体的小分子抑制剂研究进展[J]. *药学学报 (Acta Pharmaceutica Sinica)*, 2019, 54(9): 1538-1546.
- [10] Matz VM, Fradkov AF, Labas YA, et al. Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species [J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(10): 969-973.
- [11] Mezzanotte L, Que I, Kaijzel E, et al. Sensitive dual color *in vivo* bioluminescence imaging using a new red codon optimized firefly luciferase and a green click beetle luciferase[J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19277 (2011-04-22) [2021-10-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21544210>. DOI: 10.1371/journal.pone.0019277.

- [12] Kraitchman DL, Bulte JWM. *In vivo* imaging of stem cells and Beta cells using direct cell labeling and reporter gene methods[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(7): 1025-1030.
- [13] Iii L, Szalay AA. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review[J]. *Luminescence*, 2002, 17(1): 43-74.
- [14] Edinger M. Revealing lymphoma growth and the efficacy of immune cell therapies using *in vivo* bioluminescence imaging[J]. *Blood*, 2003, 101(2): 640-648.

Construction of lentiviral reporter vectors for screening inhibitors of transforming growth factor- β /Smad signal transduction pathway

YANG Cui-ping^{1,2}, HE Yuan², LIU Hui-ying², ZHANG Luo³, ZHOU Chen-chen³, MI Zhi-qiang⁴,
ZHA Yu-hua³, BAI Chang-qing²

(1. Medical School of Chinese PLA, Beijing 100039, China; 2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, 3. Department of Biomedical Engineering, Southern District of the Fifth Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100071, China; 4. State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract: OBJECTIVE To construct lentiviral vectors containing Smad response elements (Smad RE) and red fluorescent protein mCherry or luciferase sequences induced by transforming growth factor- β (TGF- β). **METHODS** UAS-Smad RE-Pmin-Gal4VP64-mCherry and UAS-Smad RE-Pmin-Gal4VP64-luciferase reporter gene sequences were designed, constructed and inserted into the pCDH-GFP-Puro-CMV lentiviral plasmid vector digested by enzyme *EcoR* I and *Bam*H I, respectively. The TGF- β responded recombinant lentiviral vectors containing Smad RE and mCherry or luciferase sequences were named pCDH-USPG-mCherry and pCDH-USPG-luciferase, respectively. pCDH-USPG-mCherry and pCDH-USPG-luciferase were packaged in 293FT cells by using the lentivirus three-plasmid packaging system and infected A549 cells (named USPG-mCherry A549 and USPG-luciferase A549 cells, respectively), and the expression of green fluorescent protein (GFP) was observed under a fluorescence microscope to find out whether A549 cells were infected. USPG-mCherry A549 and USPG-luciferase A549 cells were treated with TGF- β ($10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) and its receptor antagonists LY2109761 ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and SB431542 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) for 24 h. The expression of mCherry in USPG-mCherry A549 cells was detected by a fluorescence microscope, while the expression of luciferase was detected by luciferase reporter gene detection kit to verify the feasibility of the constructed lentiviral reporter vector for screening TGF- β /Smad signaling pathway inhibitors. A549 cells was treated with LY2109761 and SB431542 for 24 h, and the phosphorylation of Smad2/3 proteins in A549 cells were detected by Western blotting to verify the inhibitory effect of LY2109761 and SB431542 on TGF- β /Smad signaling pathway. **RESULTS** The pCDH-USPG-mCherry and pCDH-USPG-luciferase recombinant lentiviral plasmid vectors were constructed and verified by enzyme digestion and sequence. A549 cells were infected by pCDH-USPG-mCherry or pCDH-USPG-luciferase lentivirus packaged in 293FT, respectively. The infected A549 cells were able to express GFP as was observed under a fluorescence microscope, indicating that USPG-mCherry A549 and USPG-luciferase A549 cells were constructed. After 24 h of TGF- β treatment, USPG-mCherry A549 cells expressed mCherry, and USPG-luciferase A549 cells expressed luciferase. However, after LY2109761 and SB431542 were added, the mCherry expression could hardly be detected in USPG-mCherry A549 cells, and the luciferase expression was not detected in USPG-luciferase A549 cells. Western blotting results showed that phosphorylated Smad2/3 protein was expressed in

A549 cells after stimulation with TGF- β , but after LY2109761 and SB431542 were added, phosphorylated Smad2/3 protein was not detected in A549 cells. **CONCLUSION** Lentiviral reporter vectors have been constructed, which can effectively infect target cells and serve as an effective tool for screening inhibitors of TGF- β /Smad signaling pathway.

Key words: transforming growth factor- β ; Smad; lentiviral reporter gene; receptor; antagonist

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2017YFF0108605); National Key Research and Development Program of China (2018YFC160025); Beijing Natural Science Foundation (7202196); and Beijing Natural Science Foundation (5192021)

Corresponding author: BAI Chang-qing, E-mail: Baicq307@163.com; ZHA Yu-hua, E-mail: ygk307@sina.com

(收稿日期: 2021-10-13 接受日期: 2022-03-25)

(本文编辑: 齐春会)

欢迎投稿 欢迎订阅

《中国药理学与毒理学杂志》是由中国药理学会、中国毒理学会和军事医学科学院毒物药物研究所共同主办的高级学术性刊物,1986年创刊,2016年由双月刊改为月刊。被北大图书馆评为药学专业中文核心期刊(中文核心期刊要目总览),同时还是中国核心科技期刊、中国学术核心期刊和中国生物医学核心期刊等。本刊被美国《化学文摘》(CA)等十余家数据库收录。

《中国药理学与毒理学杂志》设有前沿论坛、论著、实验方法和综述栏目。读者对象主要为从事药理学、毒理学、药理学、医学和生物基础科学研究的工作者。中英文稿件兼收,更欢迎英文稿件。

遵照上级部门有关规定,本刊目前暂停收稿件处理费和版面费。

本刊全年 12 期,每期定价 20.00 元。国内外公开发行,国内邮发代号:82-140,国外邮发代号:BM-1051。本刊主要通过邮局订阅,也可以联系编辑部商谈杂志订阅事宜。

地址:北京市海淀区太平路 27 号毒物药物研究所《中国药理学与毒理学杂志》编辑部

邮编: 100850

电话: (010)66930636, (010)66931617

E-mail: cjpt518@163.com

网址: http://202.38.153.236:81/Jweb_cjpt