

用于靶向于 NFAT 的免疫抑制类小分子化合物筛选的细胞模型的建立 Establishment of a Cell Model Targeted to NFAT Signal Transduction Pathway for Preliminary Screening of FK506-like Immunosuppressants

肖 鹤¹, 钱 露¹, 秦卫松¹, 李 松², 沈倍奋¹, 黎 燕^{1*}

XIAO He¹, QIAN Lu¹, QIN Wei-Song¹, LI Song², SHEN Bei-Fen¹ and LI Yan^{1*}

1. 军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850

2. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850

1. Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

2. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

摘 要 建立 IL-2 启动子以及 NFAT-AP1 增强子调控报告基因包括 d2EGFP 或 Luciferase 在 Jurkat 细胞中瞬时表达的细胞模型。首先, 利用三步连接将 IL-2 promoter - 255 ~ + 285 处的序列插入到 pNF- κ B-d2EGFP 表达载体启动子上游, 形成 3 个拷贝的前后串联的增强子序列, 然后从人外周血钩取两条 IL-2 promoter 序列, 包括 - 326 ~ + 46 以及 - 89 ~ + 46 两段基因组序列, 分别替代上述重组表达载体中的 TK minimal promoter, 构建所需的 IL-2 promoter 以及 NFAT-AP1 enhancer 调控的报告基因表达质粒 3 × NFAT-AP1-IL-2P/d2EGFP 和 3 × NFAT-AP1-TATA/d2EGFP; 最后, 分别将 3 × NFAT-AP1-IL-2P 以及 3 × NFAT-AP1-TATA 融合基因克隆到 pGL3-basic 载体中, 构建相应的 Luciferase 报告基因表达质粒。利用电转染方法将重组的报告基因表达载体瞬时转入 Jurkat 细胞后发现, 未刺激以及 PMA、离子霉素(Ionomycin)单刺激均不能激活下游报告基因的表达, 只有 PMA 和离子霉素联合刺激才能启动 d2EGFP 以及 Luciferase 的转录表达, 并且 5 μ g/mL FK506 预先作用 1h 能几乎完全阻断刺激剂诱导的无论是 IL-2 promoter 还是 NFAT-AP1 enhancer 调控的报告基因的表达。实验结果提示, 所构建的 Jurkat 细胞瞬时表达模型可用于靶向于 NFAT 信号通路的 FK506 类免疫抑制小分子化合物的初步筛选。

关键词 IL-2 启动子, NFAT-AP1 增强子, 报告基因, 联合刺激, FK506 阻断, 初步筛选

中图分类号 Q2, Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)05-0759-07

Abstract To screen NFAT antagonistic drugs and research signal transduction pathway related to NFAT. Four recombinant vectors were constructed. Each consists of three tandem copies of the human IL-2 distal NFAT-AP1 binding site in the context of the minimal IL-2 enhancer, either the sequence from - 326 ~ + 46 or the sequence from - 89 ~ + 46 (containing only the TATA box), driving a luciferase reporter gene or a destabilized enhanced green fluorescence protein (d2EGFP) reporter gene, respectively. Transient transfection of Jurkat cells was achieved by electroporation with 5 ~ 10 μ g of the above plasmid and one pulse at 200V, 65ms. Plasmid pEFBos-mNFAT1 constitutively expressing murine full length NFAT1 protein was used for transient cotransfection. The results showed that neither of non-stimulation nor PMA or ionomycin stimulation alone could activate the reporter gene except PMA plus ionomycin costimulation. Furthermore, overexpressed murine NFAT1 augmented the activation of

Received: April 13, 2005; Accepted: June 7, 2005.

This work was supported by the Special Funds for Major State Basic Research Program of China (No.2003 CB515508).

* Corresponding author. Tel: 86-10-66931325; E-mail: Liyan62033@yahoo.com.cn

国家重点基础研究发展规划项目(973)(No.2003CB515508)资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

either IL-2 promoter or NFAT-AP1 enhancer driven reporter gene compared to the endogenous did. However, the reporter gene expression was nearly completely inhibited by pretreatment for 1h with FK506 at 5 μ g/mL and then stimulation for 6-12h with PMA plus ionomycin in the presence of FK506. These findings indicated that such a transient Jurkat cell model offered a potential platform for preliminary screening of FK506 or CsA-like immunosuppressive agents.

Key words IL-2 promoter, NFAT-AP1 enhancer, reporter gene, costimulation, FK506 inhibition, preliminary screening

T 细胞初始活化的一个重要标志是细胞因子 IL-2 的分泌表达。NFAT 是调控 IL-2 基因转录激活的重要核因子^[1]。目前研究认为, NFAT 蛋白家族主要包括四个成员: NFATp, NFATc, NFAT3 及 NFAT4/NFATx。其中, NFATp(NFAT1)蛋白组成性地合成于许多细胞系, 尤其是在外周淋巴细胞中高表达, 而 NFATc(NFAT2)仅在细胞尤其是辅助性 T 淋巴细胞中诱导合成^[2]。一般认为, T 淋巴细胞经抗原特异性的信号(Ag-TCR-CD3 复合物)或非抗原特异性的信号(共刺激分子例如 CD2 以及 CD28 等)刺激后, 导致细胞内 Ca^{2+} 的募集以及蛋白激酶 α (PKC)的活化^[3-4]。前者通过激活 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖的磷酸酶—Calceineurin(CaN, 钙调磷酸酶), 直接或间接地介导了静止的 NFAT 蛋白的去磷酸化及入核; 而后者则激活了核内 Jun、Fos 蛋白(AP-1, activated protein-1)的表达。入核的 NFAT 蛋白与核内新合成的 AP-1 蛋白形成复合物, 从而稳定地与相应的 IL-2 promoter 上游的特异性的 DNA 序列(ARRE-2, antigen responsive regulatory element-2)识别结合, 最终启动 IL-2 基因的转录表达^[5]。目前临床上广泛使用的免疫抑制剂 CsA 和 FK506 就是通过阻断 Ca^{2+} 依赖的信号途径即阻断 NFAT 入核而抑制 T 淋巴细胞增殖及活化的^[6-7]。

在静止的 T 淋巴细胞中, NFAT 蛋白以磷酸化的非激活形态表达于胞浆; T 细胞一经刺激活化后, 激活的 CaN 介导 NFAT 蛋白的去磷酸化, 继而暴露出其核定位信号(NLS, nuclear localization signal), 引导激活形态的 NFAT 蛋白入核并启动 IL-2 的转录表达。CsA 和 FK506 免疫抑制作用的发挥正是通过与其各自相应的免疫亲和素以及 CaN 结合形成三元复合物后阻断了 CaN 依赖的 NFAT 蛋白的核转位, 最终抑制 IL-2 的生成, 从而阻抑了 T 淋巴细胞的活化^[8-11]。

然而临床应用显示, FK506 和 CsA 对人体均具有较大毒性, 能引起诸如肾功能进行性丧失、神经毒性、增加恶变等副作用。因此, 鉴于 CsA 和 FK506 均是作为 NFAT 入核抑制剂发挥免疫抑制作用的, 一些研究者试图以 NFAT 为靶点, 设计合成一系列

肽分子或非肽类小分子化合物, 期望从中找到具有更高选择性和较小毒副作用的新型免疫抑制剂, 能在将来替代 CsA 和 FK506, 引起器官移植的又一次革命^[12]。

本研究的目的是通过构建一个 IL-2 promoter 或 NFAT-AP1 enhancer 调控的报告基因表达体系, 为 FK506 或 CsA 样免疫抑制类小分子化合物的初步筛选提供一个可应用的实验平台。其中, 所使用的报告基因选用新近研制的不稳定型 EGFP (d2EGFP)^[13], 其特点是半衰期短(2h), 蓄积性低, 较之 EGFP 能灵敏动态地反映顺反因子作用效果的改变。

1 材料和方法

1.1 材料

Jurkat 细胞由本室保存; pNF- κ B-d2EGFP 表达质粒购自 Clontech 公司, 由秦卫松博士提供; pGL3-basic 以及 pRL-TK 质粒由钱露博士提供; Dual-Luciferase Reporter Assay System 购自 Promega 公司, 由钱露博士提供。鼠源性全长 NFAT1 表达质粒 pEFBos-mNFAT1 赠自哈佛大学的 Dr. Rao Anjana。人外周血采自 301 医院; 人淋巴细胞分离液, 比重 1.077 \pm 0.002, 购自北京通宝达生物公司。PMA 以及 Ionomycin 购自 Sigma 公司。转染试剂 Lipofect AMINE 购自 Invitrogen 公司。引物合成以及测序均由上海博亚公司完成。

1.2 方法

1.2.1 IL-2 微型启动子(IL-2 minimal promoter)序列的钓取: 首先从人外周血分离单个核细胞, 提取基因组 DNA; 然后以其为模板, PCR 扩增一长(-326 ~ +46, 其中含有多数 NFAT-AP1 binding domain, 被认为足以介导激活的 T 细胞中 IL-2 的分泌表达)一短(-89 ~ +46, 仅含 TATA box)两条 IL-2 promoter 序列。

(1) 人外周血单个核细胞的分离: 取人外周血, 用无菌生理盐水等体积稀释。先向试管中加入人淋巴细胞分离液, 再沿试管壁轻轻滴加稀释后的人外周血, 二者比例约为 1:2。2000r/min 离心 20min, 吸

取中间的白膜层 ,即外周血单个核细胞(PBMC)层 ,放于无菌生理盐水中洗涤。2000r/min 离心 10min ,弃上清 ,将沉淀打匀 ,用无菌生理盐水洗涤。1500 r/min离心 10min 弃上清。

(2)人外周血单个核细胞基因组 DNA 的提取 :收集上述分离的 PBMC($5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$) ,加 1mL Trizol 液裂解细胞 ,混匀 ,室温放置 5min ,加 0.2mL 氯仿抽提 ,混匀振摇 15s ,室温放置 2 ~ 3min , 4℃ 12 000g离心 15min ;用枪尖吸去上层无色相 ,保留中间白膜层及下层有机相 ,加 0.3mL 无水乙醇颠倒混匀 ,室温放置 2 ~ 3min , 4℃ 2000g 离心 5min ,吸去有机相 ;用 0.1mol/L 柠檬酸钠 + 10% 乙醇清洗沉淀 2 次 ,每次室温放置 30min ,不时振摇混匀 , 4℃ 2000g 离心 5min ,弃上清 ,进一步利用 75% 乙醇清洗沉淀 ,

室温放置 15 ~ 20min ,不时振摇混匀 , 4℃ 2000g 离心 5min。弃上清 ,室温放置 5 ~ 15min 至 DNA 沉淀风干 ,加 8mmol/L NaOH 溶解基因组 DNA ,同时利用 0.1mol/L HEPES 将 pH 值调至 8.4 左右。紫外分光光度计测基因组 $OD_{260} = 0.304$,计算浓度为 0.76 $\mu\text{g/mL}$ 。

(3)IL-2 minimal promoter 基因序列的钓取 :设计引物 P1、P2、P3、P4(表 1) ,分别以人外周血基因组 DNA 为模板 PCR 扩增一长一短 IL-2 promoter 序列。其中 ,P1 和 P3 以及 P1 和 P4 均扩增 IL-2 promoter - 326 ~ + 46 的序列 ,P3 引物引入 *Hind*Ⅲ 酶切位点而 P4 引入 *Eco*R Ⅰ 酶切位点。P2 和 P3 以及 P2 和 P4 均扩增 IL-2 promoter - 89 ~ + 46 的序列。P1 和 P2 引物均引入 *Bgl* Ⅱ 酶切位点。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences used for the PCR amplification		
Primer	Sequence(5'→3')	Note
P1	GGAAGATC T TATGTGTAATATGTAAAC	- 326 ~ + 46
	<i>Bgl</i> Ⅱ	5'
P2	GGAAGATCTGCTATTCACATGTTCACTGTAG	- 89 ~ + 46
	<i>Bgl</i> Ⅱ	5'
P3	CCCAAGCT T TGTGGCAGGAGTTGAGGTTACTGTG	3'
P4	CCGGAAT T CTGTGGCAGGAGTTGAGGTTACTGTG	3'
	<i>Eco</i> R Ⅰ	

1.2.2 表达载体的构建 : (1) IL-2 启动子调控 d2EGFP 表达载体的构建 :首先设计引物 P5、P6 (表 2)。其中 P5 5'端引入 *Spe* Ⅰ 酶切位点 ,3'端引入 *Nhe* Ⅰ 酶切位点。以 pNF- κ B-d2EGFP 表达载体为模板 PCR 扩增 NFAT-AP1/d2EGFP 融合基因。其中 , NFAT-AP1 为 IL-2 promoter 上游 - 255 ~ - 285 处的 ARRE2 序列。PCR 产物经 *Spe* Ⅰ / *Not* Ⅰ 双酶切后 , 插入到 pNF- κ B-d2EGFP 载体中相应的 *Nhe* Ⅰ 以及 *Not* Ⅰ 位点。由于 *Spe*I 和 *Nhe* Ⅰ 为同尾酶 ,这两个酶切割后形成的粘性末端一经连接 ,*Spe*I 和 *Nhe* Ⅰ 酶切位点均同时消失。但是由于 P5 的 3'端引入了一个 *Nhe* Ⅰ 酶切位点 ,因此可以将 NFAT-AP1/d2EGFP 融合基因 *Spe*I/*Not* Ⅰ 双酶切产物再次连入重组表达质粒 1 × NFAT-AP1/d2EGFP 中(同样 ,插入到 *Nhe* Ⅰ 以及 *Not* Ⅰ 位点处) ,构建重组表达质粒 2 × NFAT-AP1/d2EGFP ,同理 ,再将 NFAT-AP1/d2EGFP 融合基因 *Spe* Ⅰ / *Not* Ⅰ 双酶切产物插入到 2 × NFAT-AP1/d2EGFP 的 *Nhe* Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 位点处 ,构建重组表达质粒 3 × NFAT-AP1/d2EGFP(图 1)。最后将 IL-2 promoter - 326 ~ + 46 序列插入到重组表达质粒 3 × NFAT-AP1/d2EGFP 中相应的 *Bgl* Ⅱ 以及 *Eco*R Ⅰ 位

点处。重组的表达质粒命名为 3 × NFAT-AP1-IL-2P/d2EGFP。

表 2 PCR 引物序列

Table 2 Primer sequences used for the PCR amplification		
Primer	Sequence(5'→3')	
P5	GGACTAGTGGAGGAA A ACTGTTTCATACAGAAAGCGCT	
	<i>Spe</i> Ⅰ	NFAT AP-1
	GCTAGCGGGAATTTCCGGGAATTTCC	
P6	<i>Nhe</i> Ⅰ	
	AAGGAAAAAAGCGGCCGCTACACATTGATCCTAG	
	<i>Not</i> Ⅰ	

(2) IL-2 启动子调控 Luciferase 表达载体的构建 :将 3 × NFAT-AP1-IL-2P 融合基因经 *Mlu* Ⅰ / *Hind* Ⅲ 双切从表达质粒 3 × NFAT-AP1-IL-2P/d2EGFP 中亚克隆进 pGL3-basic 载体中(*Mlu* Ⅰ 以及 *Hind*Ⅲ 位点)。构建的重组表达质粒命名为 3(NFAT-AP1-IL-2P/Luciferase。

(3) NFAT-AP1 增强子调控 d2EGFP 表达载体的构建 :将 IL-2 promoter - 89 ~ + 46 序列(含 TATA box)的 *Bgl* Ⅱ / *Eco*R Ⅰ 双酶切产物插入到重组表达质粒 3 × NFAT-AP1/d2EGFP 相应位点处。构建的重组表达质粒命名为 3 × NFAT-AP1-TATA/d2EGFP。

(4) NFAT-AP1 增强子调控 Luciferase 表达载体的构建: 将 3 × NFAT-AP1-TATA 融合基因经 *Mlu* I / *Hind* III 双切从表达质粒 3 × NFAT-AP1-TATA/ d2EGFP 中克隆进 pGL3-basic 载体中(*Mlu* I 以及 *Hind* III 位点)。构建的重组表达质粒命名为 3 × NFAT-AP1-TATA/Luciferase。

1.2.3 Jurkat 细胞的电转染: 培养 Jurkat 细胞至对数生长期, 用 1640 培养基清洗细胞 2 次, 加新鲜培养基继续培养 3h。收集细胞(1 ~ 2) × 10⁷ 用转染缓冲液(1640 培养基含 20mmol/L HEPES)清洗 2 遍。1000r/min 离心 5min 后, 重悬细胞于 250μL 转染缓冲液中。同时, 转染用 DNA 溶于 50μL 转染缓冲液。将细胞以及 DNA 稀释液混匀后(300μL)加入 4mm 转染小杯中, 200V 电击 65ms。转染后细胞重悬于

10mL 新鲜培养基, 37℃、5% CO₂ 孵箱继续培养 48 ~ 72h。

(1) IL-2 启动子或 NFAT-AP1 增强子调控 d2EGFP 表达载体的转染: 取 10μg 表达质粒与 Jurkat 细胞混匀, 200V 电击 65ms 后继续培养 48h。将细胞均分于 24 孔板中, 每孔 5 × 10⁵ 细胞。分别加相应的刺激剂以及药物作用 6 ~ 12h 后, 荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达。同时, 取 5μg 报告基因表达质粒以及 5μg 全长鼠源性 NFAT1 蛋白表达质粒 pEFBos-mNFAT1 共转染进 Jurkat 细胞。后面的实验步骤同上。

(2) IL-2 启动子或 NFAT-AP1 增强子调控 Luciferase 表达载体的转染: 具体实验方法同上。Luciferase 检测方法详见试剂盒说明书。

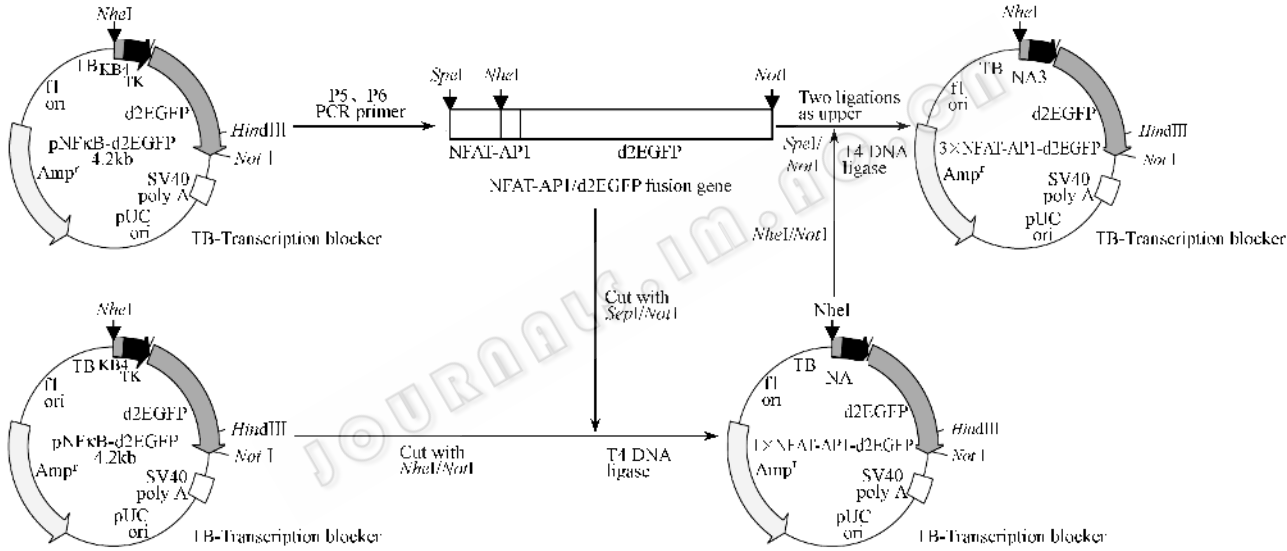


图 1 3 × NFAT-AP1-d2EGFP 表达载体的构建

Fig.1 Construction of expression vector 3 × NFAT-AP1-d2EGFP

2 结果与讨论

2.1 IL-2 微型启动子(IL-2 minimal promoter) 序列的获取

以人外周血基因组 DNA 为模板, PCR 扩增两条 IL-2 微型启动子(IL-2 minimal promoter) 序列。其中一条为 IL-2 promoter 上游 - 326 ~ + 46 的基因组序列(图 2) ; 一条为 IL-2 promoter 上游 - 89 ~ + 46 的基因组序列(图 3)。前者包含有多个核因子识别结合的位点, 包括 NFAT、NF-κB、AP-1 等。一些文献报道认为, IL-2 promoter 上游 - 326 ~ + 46 的序列足以在 T 细胞活化后启动 IL-2 因子的分泌表达, 而后者仅包含 TATA box。

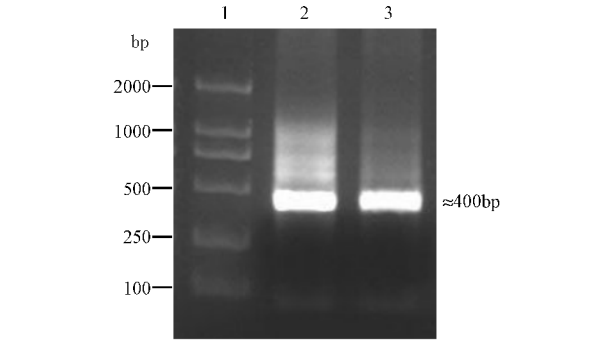


图 2 PCR 扩增 IL-2 promoter - 326 ~ + 46 的基因组序列

Fig.2 Amplification of IL-2 promoter sequence between - 326 and + 46 by PCR

1 :DL2000 DNA marker ; 2,3 IL-2 promoter sequence between - 326 and + 46.

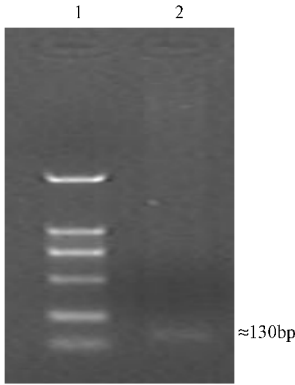


图 3 PCR 扩增 IL-2 promoter - 89 ~ + 46 的基因组序列
Fig.3 Amplification of IL-2 promoter sequence between - 89 and + 46 by PCR

1 :DL2000 DNA marker ; 2 β IL-2 promoter sequence between - 89 and + 46.

2.2 报告基因表达载体的构建及鉴定

3 × NFAT-AP1-IL-2P/d2EGFP 以及 3 × NFAT-AP1-IL-2P/Luciferase 重组表达质粒分别经 *Bgl* II / *Eco* R I、*Bgl* II / *Hind* III 双切后均得到一约 400bp 的片段 (3 × NFAT-AP1-IL-2P 融合基因 ,图 4) ;重组表达质粒 3 × NFAT-AP1-TATA/d2EGFP 以及 3 × NFAT-AP1-TATA/Luciferase 分别经 *Bgl* II / *Eco* R I、*Bgl* II / *Hind* III 双切后均得到一约 140bp 的片段 (3 × NFAT-AP1-TATA 融合基因 ,图 5)。

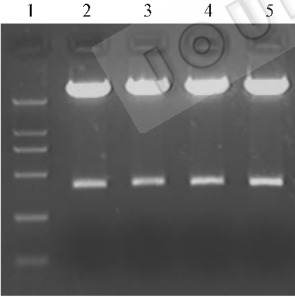
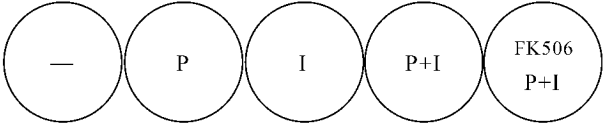


图 4 IL-2 promoter 调控的报告基因表达载体的酶切鉴定
Fig.4 Restriction enzyme identification of IL-2 promoter-driven reporter expression vector

1 :DL2000 DNA marker ; 2、3 :3 × NFAT-AP1-IL-2P/d2EGFP cut with *Bgl* II// *Eco* R I、*Bgl* II// *Hind* III。 4、5 :3 × NFAT-AP1-IL-2P/Luciferase cut with *Bgl* II// *Hind* III。

2.3 IL-2 promoter 调控报告基因表达体系的建立

利用电转染方法将重组 3 × NFAT-AP1-IL-2P/d2EGFP 表达质粒导入 Jurkat 细胞中 ,48h 后 ,以 5 × 10⁵ 细胞/孔接种细胞于 24 孔板 ,24h 后 ,一孔预先加 5μg/mL FK506 作用 1h ,然后对各孔分别加相应的刺激剂作用 6 ~ 12h ,包括未刺激 (-)、PMA 单刺激 (P)、Ionomycin 单刺激 (I)以及 P + I 联合刺激。如下图所示。



荧光显微镜下观察发现 :未刺激、PMA 单刺激以及 Ionomycin 单刺激孔均基本看不到 d2EGFP 的表达 ,P + I 联合刺激后可看到 d2EGFP 的瞬时表达 ,24h 后绿色荧光基本淬灭 ;预先加 FK506 作用的实验孔经 P + I 联合刺激后亦基本看不到绿色荧光蛋白的表达 (图 6 A)。



图 5 NFAT-AP1 enhancer 调控的报告基因表达载体的酶切鉴定
Fig.5 Restriction enzyme identification of NFAT-AP1 enhancer-driven reporter expression vector
1 :DL2000 DNA marker ; 2 :3 × NFAT-AP1-TATA /d2EGFP cut with *Bgl* II// *Eco* R I 3 :3 × NFAT-AP1-TATA /Luciferase cut with *Bgl* II// *Hind* III。

同时共转染 pEFBos-mNFAT1 表达质粒后发现 :过表达的 NFAT1 蛋白 (较内源性 NFAT 蛋白)能增强 IL-2 promoter 调控的 d2EGFP 的表达。同样 ,只有 P + I 联合刺激才能激活报告基因 d2EGFP 的表达 ;5μg/mL FK506 几乎能完全阻断绿色荧光蛋白的表达 (图 6B)。

另一方面 ,取 5μg 3 × NFAT-AP1-IL-2P/Luciferase + 0.5μg pRL-TK 表达质粒转染进 Jurkat 细胞中 ,48h 后均分于 24 孔板 ,同上加相应的刺激剂和药物 (FK506)作用 8h ,收集细胞以检测 Luciferase 的相对活性。具体方法如下 :收集各孔细胞 1000r/min 离心 5min → PBS 洗细胞 1 次 → 每孔细胞加 100μL 裂解液室温孵育 15min ,不时振荡 → 冻融细胞 1 次以确保细胞完全裂解 → 上机检测。检测过程详见 Dual-Luciferase Reporter Assay System 试剂盒。同时亦做共转染外源性 NFAT1 蛋白的实验组 (pEFBos-mNFAT1)。检测结果发现 :与报告基因 d2EGFP 一致 ,未刺激以及单刺激均不能激活荧光素酶的转录表达 ,只有 P + I 联合刺激才能激活 Luciferase 的表达 ,并且外源性 NFAT1 蛋白的表达能增强报告基因 Luciferase 的活性。5μg/mL FK506 预先作用 1h 能显

著地抑制 Luciferase 的转录表达(图 7)。

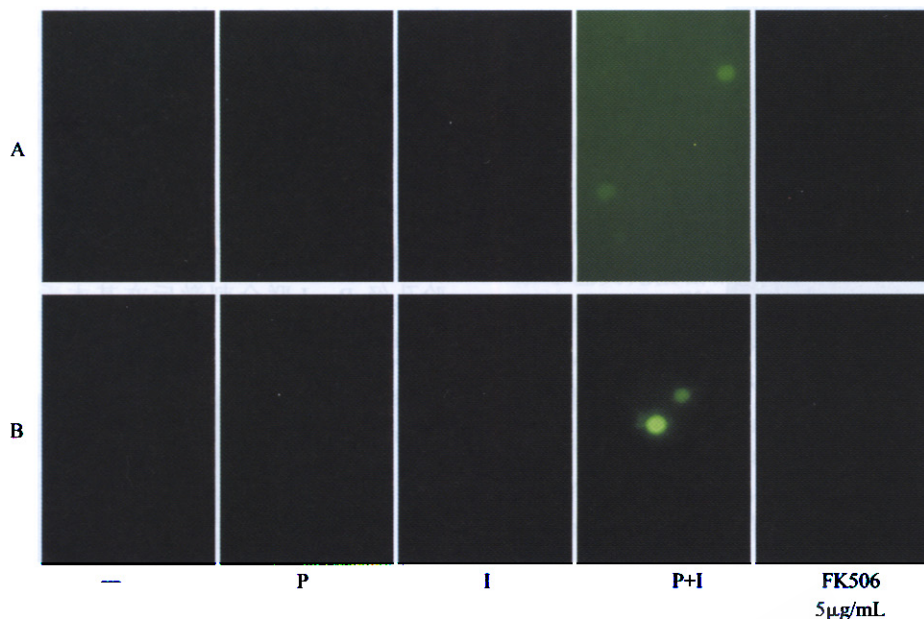


图 6 不同刺激剂和药物作用 12h 后 d2EGFP 表达的变化

Fig.6 Detection of d2EGFP expression after 12h treatment with various stimulators in presence of FK506 or not

A: $3 \times \text{NFAT-AP1-IL-2P/d2EGFP}$ transfected Jurkat cells; B: $3 \times \text{NFAT-AP1-IL-2P/d2EGFP}$ and pEFBos-mNFAT1 cotransfected Jurkat cells.

2.4 NFAT-AP1 enhancer 调控报告基因表达体系的建立

利用电转染方法将重组 $3 \times \text{NFAT-AP1-TATA/d2EGFP}$ 表达质粒导入 Jurkat 细胞, 48h 后, 以 5×10^5 细胞/孔接种于 24 孔板(三孔)。其中一孔不刺激; 一孔加 P + I 联合刺激; 一孔预先加 $5 \mu\text{g/mL}$ FK506 作用 1h 后, 再加 P + I 联合刺激。荧光显微镜下观察发现: 未刺激孔基本看不到 d2EGFP 的表达; P + I 联合刺激 6 ~ 12h 后可看到 d2EGFP 的瞬时表达, 24h 后绿色荧光基本淬灭; 预先加 FK506 作用 1h 后

d2EGFP 的表达基本被完全阻断(图 7A)。另外, 共转 mNFAT1 蛋白表达质粒能明显增强 NFAT-AP1 enhancer 调控的瞬时绿色荧光蛋白的表达(图 7B)。

同上, 将报告基因替换为 Luciferase 后发现, 与报告基因 d2EGFP 一致, 未刺激孔基本检测不到荧光素酶的活性; P + I 联合刺激后启动 Luciferase 的转录表达, 并且外源性 NFAT1 蛋白的表达能增强 Luciferase 的表达活性。 $5 \mu\text{g/mL}$ FK506 预先作用 1h 能显著地抑制 Luciferase 的转录表达(图 9)。

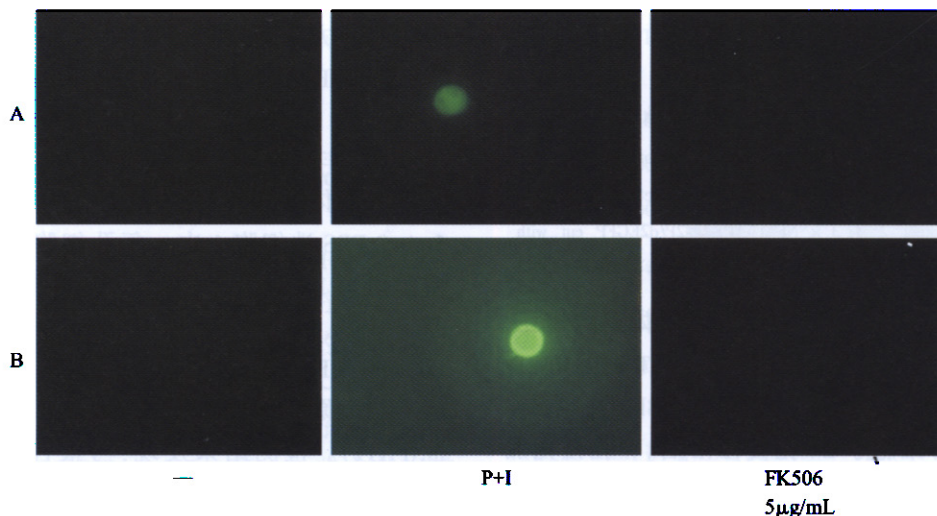


图 7 FK506 阻断 NFAT-AP1 增强子调控的 d2EGFP 的表达

Fig.7 Blockade of NFAT-AP1 enhancer-driven d2EGFP expression by FK506

A: $3 \times \text{NFAT-AP1-TATA/d2EGFP}$ transfected Jurkat cells; B: $3 \times \text{NFAT-AP1-TATA/d2EGFP}$ and pEFBos-mNFAT1 cotransfected Jurkat cells.

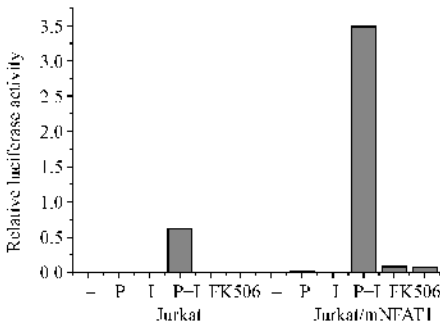


图 8 不同刺激剂和药物作用 8h 后荧光素酶的表达检测

Fig.8 Detection of relative Luciferase activity after 8h treatment of various stimulators in presence of FK506 or not

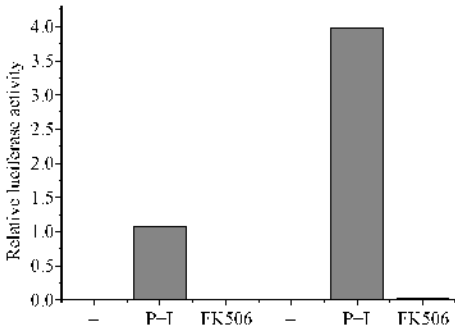


图 9 FK506 阻断 NFAT-AP1 增强子调控的荧光素酶的表达

Fig.9 Blockade of NFAT-AP1 enhancer-driven Luciferase activity by FK506

综上所述可看到 :只有 P + I 联合刺激才能够激活 IL-2 promoter 以及 NFAT-AP1 enhancer 调控的下游报告基因包括 d2EGFP 以及 Luciferase 的转录表达。其中 d2EGFP 作为一种新型的体内分析报告基因 ,较后者 Luciferase 具有直观原位、实时全程、分析简单的特征。另外 ,其还具有半衰期短、蓄积性低的特性 ,因而较增强型 GFP 能更灵敏动态地反映顺反因子作用效果的改变。而免疫抑制剂 FK506(NFAT 入核抑制剂 5μg/mL) 预先作用能有效地阻断 P + I 联合刺激激活的下游报告基因的表达提示 ,所构建的 Jurkat 细胞瞬时表达模型可以用于靶向于 NFAT 信号通路的 FK506 类免疫抑制小分子化合物的初步筛选。

REFERENCES(参考文献)

[1] Jain J , Loh C , Rao A. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol* , 1995b , 7 : 333 – 342

[2] Serfling E , Berberich-Siebelt F , Churpilo S *et al* . The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta* , 2000 , 1498 : 1 – 18

[3] Murphy LL , Hughes CC. Endothelial cells stimulate T cell NFAT nuclear translocation in the presence of cyclosporin A : Involvement of the wnt/glycogen synthase kinase-3 pathway. *J Immunol* , 2002 , 169 : 3717 – 3725

[4] Schwartz RH. Costimulation of T lymphocytes : the role of CD28 , CTLA-4 , and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* , 1992 , 71 : 1065 – 1068

[5] Mohammad A Pahlavani. Does caloric restriction alter IL-2 transcription ? *Frontiers in Bioscience* , 1998 , 3 : 125 – 135

[6] Flanagan WM , Corthesy B , Bram RJ *et al* . Nuclea rassociation of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporine A. *Nature* , 1991 , 352 : 803 – 807

[7] Randak C , Brabletz T , Hergenröther M *et al* . Cyclosporin A suppresses the expression of the interleukin 2 gene by inhibiting the binding of lymphocyte-specific factors to the IL-2 enhancer. *EMBO J* , 1990 , 9 : 2529 – 2536

[8] Crabtree GR , Cliptone NA. Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu Rev Biochem* , 1994 , 63 : 1045 – 1083.

[9] Serfling E , Avots A , Neumann M. The architecture of the interleukin-2 promoter : a reflection of T lymphocyte activation. *Biochim Biophys Acta* , 1995 , 1263 : 181 – 200

[10] Loh C , Shaw K T-Y , Carew J *et al* . Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J Biol Chem* , 1996 , 271 : 10884 – 10891

[11] Shaw KT-Y , Ho AM , Raghavan A *et al* . Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1995 , 92 : 11205 – 11209

[12] Fang LY(方兰艳) , Li Y(黎 燕) , Guo SX(郭顺星) *et al* . The research progress of immunosuppressants targeted to NFAT. *Foreign Medical Sciences · Section of Pharmacy(国外医学 · 药学分册)* , 2002 , 29(2) : 87 – 91

[13] Li XQ , Zhao XN , Fang Y *et al* . Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J Bio Chem* , 1998 , 273(52) : 34970 – 34975