

核因子- κ B 反应性不稳定增强型绿色荧光蛋白报告系统的建立与应用*

王付龙^{1,2)} 梁华平¹⁾ 刘 昕¹⁾ 徐 祥^{1)**} 王正国¹⁾

(¹⁾第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所, 重庆 400042; ²⁾中国人民解放军第 285 医院, 邯郸 056001)

摘要 建立核因子- κ B (NF- κ B) 反应性不稳定增强型绿色荧光蛋白 (d2EGFP) 报告系统, 作为筛选 NF- κ B 拮抗药物及研究其相关信号转导途径的工具. 分别以 EGFP 与 d2EGFP 为报告基因、neo^r 为筛选基因, 构建成 4 × κ B 基序为增强子、SV40 为基本启动子的报告基因载体 p4 κ B-EGFP 和 p4 κ B-d2EGFP. 两载体分别与 p65 载体瞬时共转染 HEK293 细胞, 通过比较不同时相点 EGFP 和 d2EGFP 的调控表达, 证明 p4 κ B-d2EGFP 是较理想的 NF- κ B 反应性绿色荧光蛋白 (GFP) 报告基因载体. 将 p4 κ B-d2EGFP 稳定转染 HEK293 细胞, 从而获得 NF- κ B 反应性报告细胞株 HEK-d2EGFP. 应用 NF- κ B “圈套” 寡核苷酸 (TFD) 与 p65 载体瞬时共转染 HEK-d2EGFP, 1 mg/L NF- κ B 和 2 mg/L NF- κ B TFD 组对 p65 蛋白诱导调控表达的 d2EGFP 具有明显拮抗作用. 结果表明, NF- κ B 反应性 d2EGFP 报告系统可特异、灵敏、动态地反映和监测 NF- κ B 的活性变化.

关键词 基因表达调控, 不稳定增强型绿色荧光蛋白, κ B 基序, 核因子- κ B, 寡核苷酸

学科分类号 Q743, R365, R45

核因子- κ B (NF- κ B), 作为一种普遍存在的转录因子, 系由两种 Rel 家族蛋白构成的二聚体蛋白质, 其中以多肽链 p50 和 p65 两亚基形成的异源二聚体是 NF- κ B 的典型代表, 而既含 DNA 结合域, 又含 DNA 活化域的 p65 亚基单独即可激活靶基因的转录与表达. 已证实, NF- κ B 是多种信号转导途径的汇聚点, 不仅参与介导免疫应答、病毒复制、细胞凋亡和增殖的多种基因表达调控, 而且在调节炎症反应的基因中起关键作用^[1,2]. 故有关 NF- κ B 的研究正日益受到重视并成为目前最活跃的研究领域之一. 有证据表明^[2,3], NF- κ B 可高效诱导多种细胞因子、粘附分子、趋化因子和急性期反应蛋白的基因表达, 同时对参与炎症反应放大与延续 (即级联瀑布效应) 的多种酶基因表达也具有重要的调控作用. 各种急慢性炎症疾病的致病过程均与 NF- κ B 的过度活化密切相关. 为此, 许多学者最近提出 NF- κ B 是极具潜力的新型抗炎靶点^[4].

建立灵敏可靠的监测 NF- κ B 活性及活化程度的方法, 是准确抑制 NF- κ B 的过度激活, 评价 NF- κ B 拮抗药物效果以及研究其相关信号转导途径所必需的前提条件. 通常应用测定报告基因表达的方法来反映 NF- κ B 及其顺式元件 κ B 的功能. 绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 基因是一种新型体内分析报告基因, 具有直观原位、实时全程、分析简单的特征^[5]. 但野生型 GFP 及增强型 GFP (EGFP) 等因半衰期长, 稳定性强, 对反映一过性转录表达调控的变化不甚理想. 新近研制

的不稳定型 EGFP (d2EGFP), 半衰期短, 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^[6~8]. 目前反映 NF- κ B 活性的 d2EGFP 报告基因载体均是以瞬时表达为基础构建的基因载体, 而以新霉素抗性筛选基因和 SV40 基本启动子为基础, 建立可调控表达 d2EGFP 的稳定报告细胞株, 用于监测 NF- κ B 活性的研究尚未见文献报道. 本实验室为评价 NF- κ B 拮抗药物的拮抗效果, 首先拟以稳定的报告细胞株为实验平台, 建立较理想的 NF- κ B 反应性 d2EGFP 报告系统, 后应用靶向 NF- κ B 的“圈套”寡核苷酸 (TFD) 竞争抑制 NF- κ B, 与其顺式元件的结合而抑制 NF- κ B 的转录活性, 以此检测该报告系统的优劣. 该报告系统的建立为判定 NF- κ B 的活化程度、研究相关信号转导因子及筛选高效的 NF- κ B 拮抗药物奠定基础.

1 材料和方法

1.1 质粒与菌株

增强型绿色荧光蛋白基因载体 (pEGFP-N1)、不稳定增强型绿色荧光蛋白基因-Basic 载体 (pd2EGFP-Basic) 购自 Clontech 公司. pGL2-control (Promega 公司产品) 为第一军医大学曾位

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G1999054203) 和国家自然科学基金资助项目 (30080009).

** 通讯联系人.

Tel: 023-68757431, E-mail: xuxiang75@cta.cq.cn

收稿日期: 2002-06-24, 接受日期: 2002-08-02

森博士馈赠. p65 载体 (来源于 AIDS Research & Reference Reagent Program, NIH, USA) 为本所陈永华博士惠赠. HB101 大肠杆菌为本室保存.

1.2 细胞与主要试剂

HEK293 细胞株购自 ATCC 公司, lipofectin 转染试剂购自 Invitrogen 公司, G418 购自 Sigma 公司. 实验所用的酶、培养液等试剂, DNA 纯化、回收、连接、抽提试剂盒等分别购自 TAKARA、MBI、Hyclone 公司.

1.3 核苷酸链序列设计

以 pGL2-control 为模板扩增 SV40 片段的 5' 端和 3' 端引物. 5' 端引物为 CGGATTAATGGA-CTGTAAGTGAAG (Ase I), 3' 端引物为 CCCAAGCTTTTGGCAAAAGCCTA (Hind III). 4 × κB 基序的寡脱氧核苷酸链由 4 个拷贝的 κB 基序 GGGAATTTCC 前后首尾相连: 正义链 5' 端 TCGAG (GGGAATTTCC)₄ A (Xho I 粘端), 反

义链 5' 端 GATCT (GGAAATTCCC)₄ C (Bgl II 粘端), 退火后形成双链 (下画线标明括号中酶的酶切位点或粘端). NF-κB TFD: 5'-CGGAAAGTCCGTTTCTTA (GGGACTTTCC) GTG (GGGACTTTCC) TTTTGGAAAGTCCCCA-3', 括号内为 κB 基序, 退火后形成含 2 × κB 基序哑铃型的 TFD. 上述序列均由上海博亚生物有限公司合成.

1.4 载体的构建

以 pGL2-control 为模板扩增 SV40 片段的 PCR 产物与载体 pEGFP-N1 均经 Ase I 和 Hind III 双酶切后, 片段和载体连接, 构建成载体 pSV40-EGFP. 该载体经 Xho I 和 Bgl II 双酶切后, 将 4κB 基序双链插入到 SV40 的上游, 构建成 p4κB-EGFP 报告基因载体作为对照. p4κB-EGFP 与 pd2EGFP-Basic 载体均经 EcoR I 和 Hpa I 双酶切后, d2EGFP 片段置换 p4κB-EGFP 中的 EGFP, 构建成 p4κB-d2EGFP 报告基因载体 (图 1).

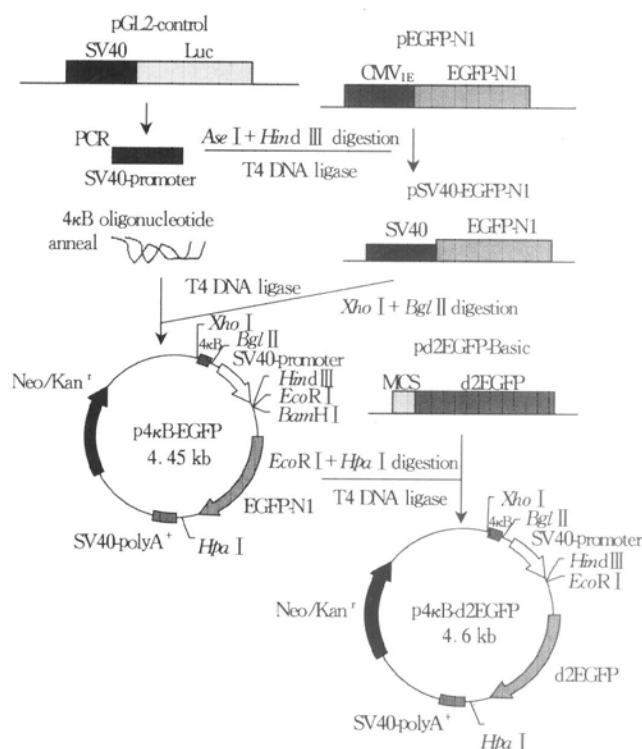


Fig 1 Construction of p4κB-EGFP and p4κB-d2EGFP

1.5 载体的功能鉴定

将 HEK293 细胞以 1×10^6 密度接种于 12 孔培养板中, 70% 细胞汇合时, 参照 Lipofectin 转染试剂说明书^[9], 以载体: lipofectin 试剂 = 1 μg: 3 μl 的比例, 分别应用 p65 载体 0、1 μg 与各 1 μg 的两种报告基因载体 (p4κB-EGFP 和 p4κB-d2EGFP) 瞬

时共转染, 于转染后 0 h、4 h、12 h、24 h、36 h 5 个时相点以及分别应用不同剂量的 p65 载体 (0 μg、0.5 μg、1 μg、2 μg) 与各 1 μg 的 2 种载体共转染 12 h, 于 495 nm 激发波长的荧光显微镜下观察荧光, 并以曝光时间为 15 s 拍摄荧光照片, 继之收获细胞, 用 4% 多聚甲醛的 PBS 固定 10 min, 荧光

活化细胞分类仪 (fluorescence activated cell sorter, FACS) 检测表达绿色荧光蛋白的阳性细胞率及荧光强度的变化. 每孔做三次平行转染, 以各自单纯转染报告基因载体的荧光强度及阳性细胞率作为基准, 计算相对荧光强度及阳性细胞率.

1.6 NF- κ B 反应性 d2EGFP 报告细胞株的建立

应用 lipofectin 介导 p4 κ B-d2EGFP 载体转染细胞汇合达 50% 的 HEK293 细胞. 转染结束后, 20% FCS 的 DMEM 完全培养液 4 ml 培养 48 h, 然后以 1:4 传代, 更换含 G418 (800 mg/L) 的选择性完全培养液培养, 每隔 3~4 天换液一次, 观察 G418 抗性克隆的生长情况. 细胞形成克隆后, 挑选单克隆继续在 G418 筛选下扩大培养, 获得稳定转染命名为 HEK-d2EGFP 的细胞株. 分别以 HEK293 细胞和 G418 筛选获得的 HEK-d2EGFP 细胞株基因组 DNA 为模板, 以 4 $\times$ κ B 寡脱氧核苷酸链的正义链和 PCR 扩增 SV40 片段的 3' 端引物作为一对引物, 进行 PCR 扩增目的片段.

1.7 NF- κ B TFD 转染效率检测

将上海博亚生物有限公司合成的 5' 端标记有 6-羧基荧光素 (FAM) 的 NF- κ B TFD, 以 1 mg/L 的剂量应用 lipofectin 介导转染 HEK293 细胞 12 h 后, 1 $\times$ PBS 洗细胞 3 次, 观察荧光并进行 FACS 检测有荧光标记的细胞百分率.

1.8 NF- κ B TFD 抑制 d2EGFP 表达的实验

将 NF- κ B TFD 以 0 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L 和 2 mg/L 的剂量分别与 1 μ g p65 载体瞬时共转染 HEK-d2EGFP 细胞 12 h, 观察荧光并进行 FACS 检测 d2EGFP 的表达情况.

1.9 HEK-d2EGFP 细胞株稳定性的鉴定

将具有功能的 HEK-d2EGFP 细胞株经冻存 6 周后复苏, 连续传代培养 6 个月. 继之应用 p65 载体 1 μ g 以 lipofectin 介导转染该细胞 12 h、36 h, 观察荧光并进行 FACS 检测 d2EGFP 的表达情况.

1.10 统计学处理

实验所得数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间资料应用多因素方差分析, 相关性应用线性回归分析, 各项统计均用 SPSS 10.0 统计软件在计算机上完成.

2 结 果

2.1 p4 κ B-EGFP 和 p4 κ B-d2EGFP 凝胶电泳鉴定

应用 4 $\times$ κ B 寡脱氧核苷酸链的正义链和 PCR 扩增 SV40 片段的 3' 端引物作为一对引物, 以载体

p4 κ B-EGFP 为模板可扩增出长约 330 bp 的 4 $\times$ κ B-SV40 片段. 应用 *Hind* III 酶切 p4 κ B-d2EGFP 可得到 0.7 kb 和 3.9 kb 两片段, 两载体鉴定结果与预期一致 (图 2).

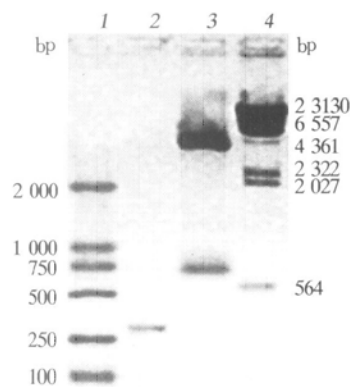


Fig. 2 Identification of p4 κ B-d2EGFP and p4 κ B-EGFP

1: DL2000 marker; 2: 4 $\times$ κ B-SV40 fragment; 3: p4 κ B-d2EGFP digested by *Hind* III; 4: λ DNA/*Hind* III marker.

2.2 载体的功能鉴定

从 p65 蛋白作用于增强子 κ B 基序, 诱导调控 d2EGFP 和 EGFP 表达的时间效应分析可见 (图 3 和图 4), p4 κ B-d2EGFP 载体组 0 h 未见绿色荧光细胞, 4 h 可见少部分荧光较弱的细胞, 绿色荧光满布于胞浆, 12 h 达高峰, 荧光细胞的荧光强亮, d2EGFP 的相对阳性细胞率约为 20, 36 h 荧光细胞明显减少, 强度减弱变暗. p4 κ B-EGFP 载体组 0 h 即有略亮、稍多的荧光细胞, 12 h 荧光细胞增多且荧光亮, 24 h 达高峰, 荧光细胞的荧光强亮, EGFP 的相对阳性细胞率约为 3, 36 h 荧光细胞的

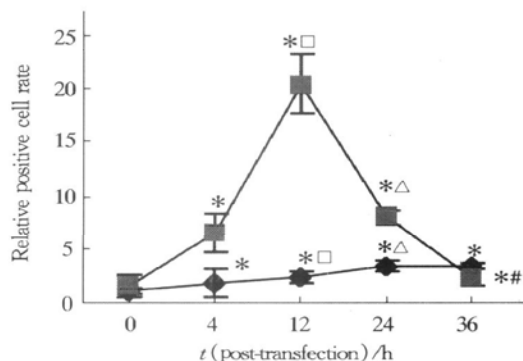


Fig. 3 Effects of relative positive cell rate and post-transfection time

* means $P < 0.01$, vs 0 h; Δ means $P < 0.01$, vs 12 h, 36 h; # means $P < 0.01$, vs 4 h; $\square$ means $P < 0.01$, vs 4 h, 24 h, 36 h. Negative control: positive cell rate 0.21%. $\blacklozenge$ — $\blacklozenge$: p4 κ B-EGFP; $\blacksquare$ — $\blacksquare$: p4 κ B-d2EGFP.

荧光仍强亮, 阳性细胞率仍未明显降低. 从剂量效应分析, p65 载体在 0.5~2 μg 剂量范围内, p4 κ B-d2EGFP 组 d2EGFP 的平均荧光强度呈剂量增高趋势; 1~2 μg 剂量范围内, p4 κ B-EGFP 组 EGFP 的平均荧光强度呈剂量增高趋势 (图 5). 说明在 p65 蛋白调控下, d2EGFP 较 EGFP 能敏感反映 NF- κ B 活性的变化.

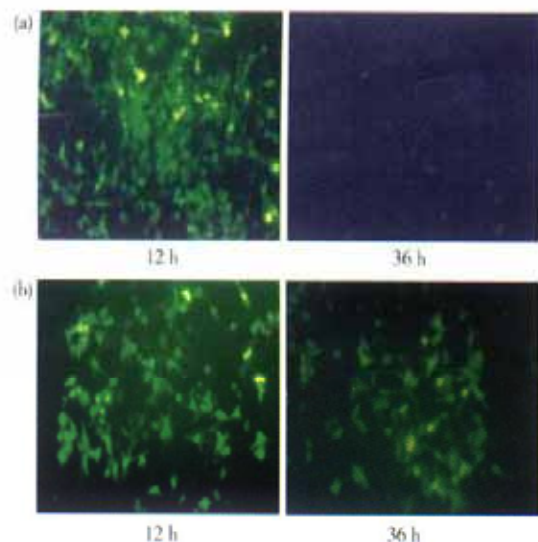


Fig. 4 The GFP fluorescence image in different time points (200 $\times$)

(a) cotransfection of p4 κ B-d2EGFP and p65 in 12 h, 36 h respectively;
(b) cotransfection of p4 κ B-EGFP and p65 in 12 h, 36 h respectively.

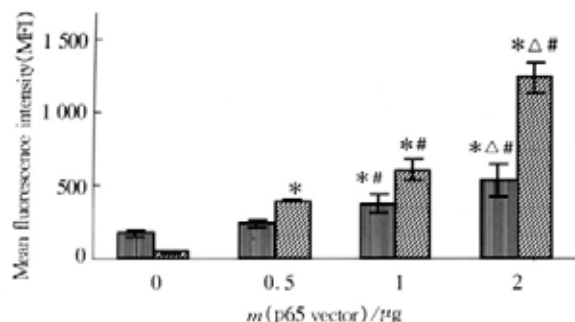


Fig. 5 Effects of mean fluorescence intensity and p65 vector dose

* means $P < 0.01$, vs 0 μg ; # means $P < 0.01$, vs 0.5 μg ; Δ means $P < 0.05$, vs 1 μg . Negative control: mean fluorescence intensity 40.12. $\square$: p4 κ BEGFP; $\square$: p4 κ Bd2EGFP.

2.3 NF- κ B 反应性 d2EGFP 报告细胞株的建立

p4 κ B-d2EGFP 转染 HEK293 细胞, 经筛选 4 周后共获得 22 株克隆细胞 HEK-d2EGFP. 扩大培养后, 在未诱导情况下应用荧光显微镜观察, 结果

均未见有绿色荧光的细胞. 从 22 株克隆细胞中, 随机挑选一克隆细胞株的 PCR 扩增结果看出, 整合有 p4 κ B-d2EGFP 的 HEK293 细胞基因组 DNA 中, 可扩增到与 4 $\times$ κ B-SV40 片段大小一致的约 330 bp 片段, 未转染的 HEK293 细胞中则无 (图 6). 将此细胞株作为后续实验的受体细胞.

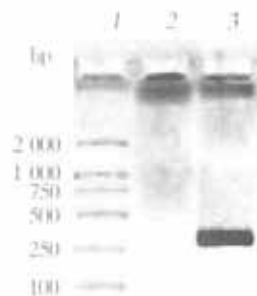


Fig. 6 Identification of reporter cell line HEK-d2EGFP gene by PCR

1: DL2000 marker; 2: HEK293 cell; 3: HEK-d2EGFP reporter cell line.

2.4 NF- κ B TFD 转染效率检测

将标记有 6-FAM 的 TFD 转染 HEK293 细胞 12 h, 有荧光标记的阳性细胞率达 80%, 说明 TFD 能大量有效地进入细胞.

2.5 NF- κ B TFD 抑制 d2EGFP 表达的实验

NF- κ B TFD 在 0 mg/L 组 (即单纯 p65 组), 几乎所有的细胞均为强亮的绿色荧光细胞, 0.5 mg/L 剂量组肉眼可见略亮、较少的荧光细胞, 1 mg/L、2 mg/L 剂量组均未见荧光细胞. 0.5~2 mg/L 剂量组阳性细胞率与 0 mg/L 组差异显著, 1 mg/L 和 2 mg/L 剂量组间阳性细胞率差异不显著 (图 7), 表明 NF- κ B TFD 在一定剂量范围内能有效拮抗 NF- κ B 的过度活化.

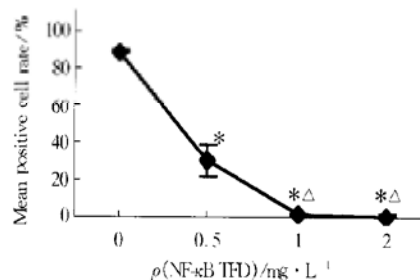


Fig. 7 Effects of mean positive cell rate and TFD dose

* means $P < 0.01$, vs 0 mg/L; Δ means $P < 0.01$, vs 0.5 mg/L. Negative control: positive cell rate 0.85%.

2.6 HEK-d2EGFP 细胞株稳定性的鉴定

经冻存复苏且传代培养 6 个月的 HEK-d2EGFP 细胞株在 p65 蛋白诱导 12 h 后, 绿色荧光细胞率从 0 升至 90% 以上, 荧光强度强亮; 36 h 后, 荧光细胞率为 0.78%, 荧光强度减弱变暗. 证实 HEK-d2EGFP 细胞株具有可靠的稳定性.

3 讨 论

目前, 有几种监测 NF- κ B 活性的方法, 其中 RNA 印迹、核酸酶保护实验、蛋白质印迹分析、EMSA 和 ELISA 等是在 DNA、RNA 或蛋白质水平来反映 NF- κ B 的激活状态, 但由于 NF- κ B 家族中的某些异源或同源二聚体具有转录抑制的作用 (如 p55/p55), 故与 κ B 基序作用结合的二聚体不总是促进下游基因表达的, 具有转录活性的 NF- κ B 家族因子. 因此应用 EMSA 存在一定的假阳性. RNA 印迹因内源性基因发生转录的 mRNA 水平不一定与其蛋白质水平成正比, 且背景较高. 核酸酶保护实验和 ELISA 亦或多或少存在上述类似的不确定因素^[10, 11]. 另一种监测 NF- κ B 活性的方法是应用遗传报告基因系统, 通过测定报告分子来反映与 κ B 基序相互作用的 NF- κ B 活性, 评估其调控某一基因的表达水平. 它在一定程度上克服了上述实验技术的负面效应, 简化了步骤, 降低了背景.

常用的报告基因有 Cat、Luc、LacZ 等酶类基因, 但它们都需相应的底物和辅助因子的参与才能间接监测报告分子, 故检测步骤较繁琐, 实验重复性欠佳, 更重要的是不能原位直接观察报告分子的动态表达情况. 来源于水母的 GFP 是一种能在活细胞内观测、无需底物和内对照、经紫外和蓝光激发产生绿色荧光的蛋白质类报告基因; 经人工改造的 GFP 具有编码 DNA 的人源化、无毒性 and 荧光量子化程度较高等特性, 尤其是在 EGFP 的 C 端融合了小鼠鸟氨酸脱羧酶 PEST 区 (422~461) 的 d2EGFP 基因, 其表达的 EGFP 蛋白在 PEST 多肽作用下降解, 半衰期从原来的 24 h 降至 2 h, 使蛋白质前后表达的水平有显著差异^[12~14]. 本文应用 p65 表达载体一过性表达作为内源性诱导剂, 对人工设计的 κ B 基序的特异性、增强性以及 d2EGFP 与 EGFP 的稳定性、灵敏性等进行了对照比较研究 (图 3~图 5), 发现基础表达的 d2EGFP 观察不到荧光, 诱导表达的 d2EGFP 荧光强度强亮, 诱导后荧光迅速减弱, 并且在 p65 载体 0.5 μ g 时即敏感观察到 d2EGFP 的显著表达. 以上表明 p4 κ B-

d2EGFP 报告基因载体所表达的 d2EGFP, 能较精确地全程动态反映 NF- κ B 的激活和失活, 较好地模拟出 NF- κ B 过度激活导致相关基因大量转录的情形.

为奠定高通量实验的基础, 需建立一个同一低背景、同一较高灵敏性、避免反复转染的 NF- κ B 反应性报告细胞株. 目前以 d2EGFP 作为报告分子来反映 NF- κ B 活性的研究尚处于起步阶段, 而且均是以瞬时转染为基础构建的基因载体. 但因瞬时转染存在重复性欠佳, 需多次转染, 对难转染细胞转染效率低等缺点而不宜在大批量、高重复的筛选药物实验中操作应用. 本文将报告基因 d2EGFP 和筛选基因 neo^r 构建在同一载体上, 获得了稳定报告细胞株 HEK-d2EGFP, 其未诱导时无荧光细胞, 而诱导时几乎均为荧光细胞. 以 HEK-d2EGFP 细胞为操作平台, 应用转录因子圈套策略设计的 NF- κ B TFD, 能有效抑制 p65 蛋白诱导的 d2EGFP 的表达, 进一步证明所建立的 NF- κ B 反应性 d2EGFP 报告系统具有特异性和实效性^[15~17]. 该细胞株经冻存复苏并连续传代培养 6 个月以上, 仍具有可靠的稳定性及良好的功能.

此外, 采用经典的去除了增强子的 SV40 启动子作为弱启动子, 可增加诱导前后表达水平的差异, 同时又因含 SV40 启动子的基因在不同受体细胞的转染及表达效率相对稳定, 故具有多细胞通用性的优点.

参 考 文 献

- 1 Baldwin A S. Series Introduction: The transcription factor NF- κ B and human disease. *J Clin Invest*, 2001, **107** (1): 3~10
- 2 Baeuerle P A, Baltimore D. NF- κ B: ten years after. *Cell*, 1996, **87** (1): 13~20
- 3 Goebeler M, Gillitzer R, Kilian K, *et al.* Multiple signaling pathways regulate NF- κ B-dependent transcription of the monocyte chemoattractant protein 1 gene in primary endothelial cells. *Blood*, 2001, **97** (1): 46~55
- 4 Yamamoto Y, Gaynor R B. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest*, 2001, **107** (2): 135~142
- 5 Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, **263** (5148): 802~805
- 6 Bi J X, Wirth M, Beer C, *et al.* Dynamic characterization of recombinant Chinese hamster ovary cells containing an inducible c-fos promoter GFP expression system as a biomarker. *J Biotechnol*, 2002, **93** (3): 231~242
- 7 Lai L, Sun Q, Wu G, *et al.* Development of porcine embryos and offspring after intracytoplasmic sperm injection with liposome transfected or non-transfected sperm into *in vitro* matured oocytes.

- Zygote, 2001, **9** (4): 339~ 346
- 8 Indraccolo S, Roni V, Zamarchi R, *et al.* Expression from cell type-specific enhancer-modified retroviral vectors after transduction: influence of marker gene stability. *Gene*, 2002, **283** (1-2): 199~ 208
 - 9 Zhang Q, Tiersch T R, Cooper R K. Inducible expression of green fluorescent protein within channel catfish cells by a cecropin gene promoter. *Gene*, 1998, **216** (1): 207~ 213
 - 10 Paunesku T, Chang-liu C M, Shearir Jones P, *et al.* Identification of genes regulated by UV/salicylic acid. *Int J Radiat Biol*, 2000, **76** (2): 189~ 198
 - 11 Hess D C, Howard E, Cheng C, *et al.* Hypertonic mannitol loading of NF- κ B transcription factor decoys in human brain microvascular endothelial cells blocks upregulation of ICAM-1. *Stroke*, 2000, **31** (5): 1179~ 1186
 - 12 Li X, Zhao X, Fang Y, *et al.* Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J Biol Chem*, 1998, **273** (52): 34970~ 34975
 - 13 Kiss-Toth E, Guesdon F M, Wyllie D H, *et al.* A novel mammalian expression screen exploiting green fluorescent protein-based transcription detection in single cells. *J Immunol Methods*, 2000, **239** (1-2): 125~ 135
 - 14 Andreatta C, Nahreini P, Hovland A R, *et al.* Use of short-lived green fluorescent protein for the detection of proteasome inhibition. *Biotechniques* 2001, **30** (3): 656~ 660
 - 15 王付龙, 徐 祥, 梁华平, 等. 转录因子圈套策略研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28** (6): 802~ 805
Wang F L, Xu X, Liang H P, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28** (6): 802~ 805
 - 16 Kupatt C, Habazettl H, Goedecke A, *et al.* Tumor necrosis factor alpha contributes to ischemia and reperfusion-induced endothelial activation in isolated hearts. *Circ Res*, 1999, **4** (4): 392~ 400
 - 17 Mann M J, Whittemore A D, Donaldson M C, *et al.* *Ex-vivo* gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoys: the prevent single-center, randomized, controlled trial. *The Lancet*, 1999, **354** (9189): 1493~ 1498

Application and Establishment of NF- κ B-Responsive d2EGFP Reporter System*

WANG Fu-Long^{1,2)}, LIANG Hua-Ping¹⁾, LIU Xin¹⁾, XU Xiang^{1)**}, WANG Zheng-Guo¹⁾

(¹⁾ Research Institute of Surgery, Daping Hospital, The Third Military Medical College, Chongqing 400042, China;

²⁾ The 285th Hospital, The People's Liberation Army of China, Handan 056001, China)

Abstract To screen NF- κ B antagonistic drugs and research signal transduction pathway related to NF- κ B, two vectors, p4 κ B-d2EGFP containing destabilized enhanced green fluorescent protein (d2EGFP) reporter gene and p4 κ B-EGFP with EGFP gene, were constructed on the base of 4 copies of NF- κ B *cis*-element κ B as enhancer, SV40 as basic promoter and neo^r gene as selective gene. The time and dose effects of d2EGFP and EGFP induced by p65 protein showed that p4 κ B-d2EGFP was the better NF- κ B-responsive GFP reporter gene system because it is more sensitive to detect the changes of gene transcription regulation after p65 vector transiently cotransfected with the two vectors respectively. The NF- κ B-responsive d2EGFP clonal cell line named HEK-d2EGFP was established after p4 κ B-d2EGFP stably transfected into HEK 293 cells. With the cotransfection of NF- κ B transcription factor decoy (TFD) and p65 vector into HEK-d2EGFP cells, the results showed the groups of 1 mg/L and 2 mg/L TFD could antagonized the d2EGFP expression induced by p65 protein significantly. It was demonstrated that the NF- κ B-responsive d2EGFP reporter system could report and detect NF- κ B activation accurately and dynamically.

Key words gene expression regulation, destabilized EGFP (d2EGFP), κ B motif, nuclear factor kappa B (NF- κ B), transcription factor decoy (TFD)

* This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (G19990542) and The National Natural Sciences Foundation of China (30080009).

** Corresponding author. Tel: 86-23-68757431, E-mail: xuxiang75@cta.cq.cn

Received: June 24, 2002 Accepted: August 2, 2002