

人 PD-L1 基因启动子克隆及其荧光素酶报告基因载体的构建

丰江舟¹ 杨梦梦² 朱彬彬³ 曹文清² 郑立春⁴ 周兴路⁴ 王 潞¹ 吴志浩⁵

(1.皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 肿瘤内科,安徽 芜湖 241001; 2.皖南医学院 麻醉学院,安徽 芜湖 241002; 3.皖南医学院 法医学院,安徽 芜湖 241002; 4.皖南医学院 医学影像与检验学院,安徽 芜湖 241002; 5.皖南医学院 医学生物学教研室,安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 对人源 PD-L1 基因启动子进行 PCR 扩增 构建 PD-L1 荧光素酶报告基因。方法: 用 PCR 扩增方法获得 PD-L1 基因启动子; PD-L1 启动子和载体行 Kpn I、Xho I 酶切、连接和转化 然后行菌落 PCR 以及测序等。构建成功后转染至 A549 细胞中并检测 PD-L1 启动子活性。结果: 经 PCR 方法扩增出 PD-L1 基因启动子片段; 菌落 PCR 鉴定各重组体构建正确并经生工测序成功; 瞬时转染 A549 细胞后经报告基因检测得知所克隆的不同片段序列具有启动子活性。结论: 成功克隆 PD-L1 基因启动子 构建出不同片段基因启动子荧光素酶报告基因 为进一步研究其分子机制提供详实基础。

【关键词】PD-L1; 启动子克隆; 双荧光素酶报告基因

【中图分类号】R 346 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2016.06.004

Construction of human PD-L1 gene promoter luciferase reporter gene vectors

FENG Jiangzhou, YANG Mengmeng, ZHU Binbin, CAO Wenqing, ZHENG Lichun, ZHOU Xinglu, WANG Lu, WU Zhihao

Department of Medical Oncology, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

【Abstract】Objective: To clone PD-L1 gene promoter for constructing the luciferase reporter gene vectors. **Methods:** PD-L1 gene promoter was obtained via PCR amplification and then sub-cloned into luciferase reporter gene vector to construct three different recombinant plasmids that were transfected into A549 cell lines after digestion with enzyme KpnI and Xho I. Then the transcription activation of these promoters was determined. **Results:** Segments of PD-L1 gene promoter was amplified by PCR. Recombined plasmids were identified by colony PCR and verified through contracted sequencing by Biotechnology (Shanghai, China) which indicated successful construction of the vectors. Transient transfection of the A549 cells showed activation of different sequences of reporter gene. **Conclusion:** Human PD-L1 gene promoter luciferase reporter gene vector was successfully constructed, which may lay a foundation for following research of the molecular mechanisms of PD-L1.

【Key words】PD-L1; promoter cloning; dual luciferase reporter gene

程序性细胞死亡蛋白 1 (programmed death-1, PD-1) 为 PDCD1 基因编码的 I 型跨膜糖蛋白^[1], PD-1 表达于活化的免疫细胞表面, 如 CD4⁺T 细胞、B 细胞等^[2]。PD-L1 (programmed death-1-ligand 1, 程序性死亡配体-1) 是程序性细胞死亡蛋白 1 的配体之一, 同属 CD28/B7 家族。PD-L1 多表达于肿瘤细胞表面, 如 PD-L1 在乳腺癌^[3]、非小细胞肺癌^[4]、黑色素瘤^[5] 等癌细胞表面都呈过表达。肿瘤细胞表面的 PD-L1 与免疫细胞表面的 PD-1 结合后可抑制免疫细胞的增殖与活性并可诱导免疫细胞凋亡,

从而对机体免疫应答过程起负性调节作用^[6-7]。PD-1/PD-L1 通路在肿瘤细胞的免疫逃逸中具有重大意义, 近年来越来越多与此相关的实验得以开展, 并且 PD-1 单克隆抗体、PD-L1 单克隆抗体在晚期肿瘤病人身上发挥惊人的疗效。目前关于调控 PD-L1 的分子机制尚未明了, 为了深入研究其调控机制, 我们克隆了 PD-L1 基因启动子, 并构建到报告基因载体 PGL3-Basic 上, 然后对其启动因子活性进行初步检测。

收稿日期: 2016-09-09

作者简介: 丰江舟 (1989-) 男, 2014 级硕士研究生 (电话) 18315361831 (电子信箱) feng421937821@ 163.com;

王 潞, 女, 主任医师 (电子信箱) lucyyjs@ 163.com 通信作者;

吴志浩, 男, 教授 (电子信箱) zwu2ster@ 163.com 通信作者。

1 材料与方法

1.1 材料 DMEM 培养基, 购自 Gibco 公司; Lipofectamine2000, 购自 invitrogen 公司; E. coli DH5 α Competent Cells 为 TaKaRa 公司产品; pGL3-Basic 质粒、质粒小量提取试剂盒, 购自 Promega 公司; Kpn I、Xho I, 购自 NEW ENGLAND BioLabs; T4 DNA 连接酶, Takara 公司; A549 细胞, 本室冻存。

1.2 方法

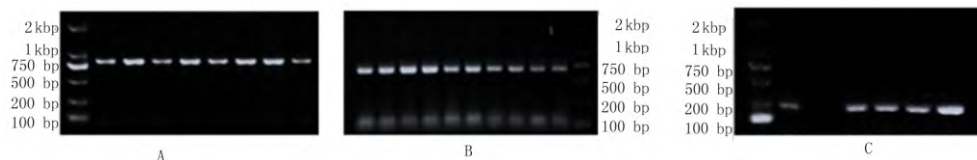
1.2.1 PD-L1 基因系列启动子的扩增

1.2.1.1 引物设计 在 NCBI 网站中根据 PD-L1 基因序列, 选择启动子区域。设计 5 对引物, 其中 1987 bp 片段的扩增引物如下, 上游 5'-TCTCCGGG-TAGTTGATCAATTGTATGG-3'; 1375 bp 的扩增引物为: 上游 5'-TCCTAGAGGTCACAGTCACCAAAGTTG-3'; 1011 bp 的扩增引物为: 上游 5'-AGAAGGAAAG-GCAAACAACGAAGAGTC-3'; 632 bp 的扩增引物为: 上游 5'-TCATTATGTCGAGGAACTTTGAGGAAG-3'; 145 bp 的扩增引物为: 上游 5'-TCACCGAAGGTCAG-GAAAGTCCAACGC-3'; 下游引物共为: 5'-GGAGC-CTCGGAAGCTGCCGAGAACTG-3'。

1.2.1.2 PCR 扩增 对 A549 细胞运用细胞基因组提取试剂盒提取基因组, 提取的基因组 DNA 为 PCR 扩增的模板, PCR 反应条件: 预变性 94 $^{\circ}$ C、3 min; 变性 94 $^{\circ}$ C、30 s, 退火 61 $^{\circ}$ C、30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C、60 s, 共 30 个循环, 延伸 72 $^{\circ}$ C、5 min。扩增的 PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.2 PD-L1 荧光素酶报告基因重组质粒的构建与鉴定 将上述克隆的系列 PD-L1 启动子和 pGL3-Basic 载体分别经 Kpn I、Xho I 双酶切、连接, 然后进行转化。挑取单克隆菌落做菌落 PCR 鉴定其阳性的克隆, 然后阳性的克隆再次进行摇菌, 保种后行质粒提取并送往上海生工生物工程有限公司测序。

1.2.3 PD-L1 基因启动子报告基因载体转染 A549



细胞与活性检测 将上述构建的质粒进行转染, 质粒转染操作按转染试剂说明书严格进行。在细胞转染质粒两天后, 进行收样等处理, 利用双荧光检测试剂盒在荧光检测仪 GloMax20/20(Promega 公司) 上检测萤火虫和海肾荧光素酶活力。实验重复 3 次, 每次平行做 3 个复孔。

1.2.4 统计学分析 应用 GraphPad Prism 5 软件的 *t-test* 方法进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PD-L1 不同片段启动子的克隆 以 A549 细胞基因组 DNA 为模板, 克隆出 5 段启动子, 分别命名为 F1: 1987 bp, F2: 1375 bp, F3: 1011 bp, F4: 632 bp, F5: 145 bp。将克隆出的目的片段进行 1% 琼脂糖电泳分析, 其结果与所设计的 PD-L1 片段大小一致, 表明 PD-L1 不同片段启动子的克隆成功(图 1)。

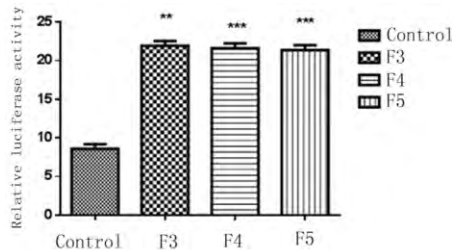
图 1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

2.2 PD-L1 启动子报告基因载体的 PCR 鉴定 根据实验需求, 选取 1011 bp、632 bp 和 145 bp 的 PD-L1 启动子及选取荧光素酶报告基因载体 pGL3-Basic 进行酶切、连接和转化。挑取单个菌落作模板加入相应上下游引物等进行菌落 PCR, 初步证实重组体构建成功。图 2 中图 A、B 和 C 分别为构建的不同片段的 PD-L1 荧光素酶报告基因载体荧光素酶报告基因菌落 PCR 结果。

图 2 PD-L1 启动子荧光素酶报告基因质粒菌落 PCR 鉴定结果

2.3 启动子活性的检测 在 12 孔板 A549 细胞中, 转染与荧光素酶基因融合的 PD-L1 promoter, 并且与海肾荧光素酶基因以 1000:1 的比例共转。转染空载 pGL3-Basic 质粒为对照, pGL3-Basic-PDL1 Promoter F3、pGL3-Basic-PDL1 Promoter F4 和 pGL3-Basic-PDL1 Promoter F5 重组体为 3 个实验组。转染 48 h 后利用 Promega 公司的 Dual-Luciferase Re-

porter Assay System(双荧光素酶报告基因检测系统) 检测显示, pGL3-Basic-PDL1 Promoter F3、pGL3-Basic-PDL1 Promoter F4 和 pGL3-Basic-PDL1 Promoter F5 与对照 pGL3-Basic 相比显著升高, 结果具有显著的统计学差异($P < 0.01$), 由此可见所克隆的报告基因具有启动子活性(图 3)。



** P<0.01, *** P<0.01.

图3 双荧光素酶报告基因法检测 PD-L1 启动子活性

3 讨论

两种新的 PD-1/PD-L1 抗体被批准用于不能手术或者转移性黑色素瘤的治疗^[8]。除了恶性黑色素瘤, PD-1/PD-L1 抗体在肺癌病人中也显示出令人惊喜的疗效。我们运用 PCR 扩增、酶切、连接等实验方法克隆出不同片段的 PD-L1 启动子, 然后经过菌落 PCR 鉴定和测序验证, 证实成功构建 PD-L1 基因启动子报告基因。在此基础上, 经荧光素酶报告基因检测发现与空载体对照组相比所构建的 PD-L1 启动子报告基因具有明显的启动子活性。

据相关研究报道, PD-L1 在人体多种肿瘤细胞表面均有表达, 促进肿瘤细胞表面高表达 PD-L1 的相关因素大体可分为肿瘤细胞外在因素和内在因素。肿瘤微环境中外在刺激促进 PD-L1 表达主要通过激活 TLRs 和 IFN- γ 受体, 进而激活下游信号通路, 如 NF- κ B^[9]、MAPK^[10]、PI3K^[11] 和 JAK/STAT^[12] 信号转导通路等; 肿瘤细胞内在因素促进 PD-L1 表达, 主要是通过抑癌基因 LKB1 和 Pten^[13] 缺失来激活 PI3K/Akt/mTOR 通路, 核增殖抗原 Ki-67 的活化^[14]、EGFR 通路的激活^[15] 等途径来促进肿瘤细胞表面高表达 PD-L1。目前报道的肿瘤细胞中调控 PD-L1 表达的相关信号通路主要有 Akt 信号通路和 MAPK 信号通路。为了研究肿瘤细胞在转录水平上对 PD-L1 的调控机制, 我们运用 PCR 扩增、酶切和连接等实验技术构建了人 PD-L1 基因启动子荧光素酶报告基因, 并根据相关信号通路的转录因子在 PD-L1 启动子区域的潜在结合位点构建出不同片段的 PD-L1 基因荧光素酶报告基因, 以明确该信号通路在转录水平这方面促进 PD-L1 的转录, 以及根据不同片段的 PD-L1 报告基因来明确促进 PD-L1 转录的具体转录因子。我们可明确该信号通路的转录因子可促进 PD-L1 的转录从而促进 PD-L1 的表达, 阻断该信号转导通路肿瘤细胞表达的 PD-L1 将明显下调, 从而阻断肿瘤细胞发生免疫逃逸等恶性事件的发生, 同时为临床抗 PD-L1 的靶点药物的研发提供详实的分子基础。

【参考文献】

- [1] CEERAZ S, NOWAK E, NOELLE RJ *et al.* B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease [J]. Trends Immunol, 2013, 14: 556-563.
- [2] KEIR M, BUTTE M, FREEMAN GJ *et al.* PD-1 and its ligands in tolerance and immunity [J]. J. Annu Rev Immunol, 2008, 26: 677-704.
- [3] SOLIMAN H, KHALIL F, ANTONIA S. PD-L1 Expression is increased in a subset of basal type breast cancer cells [J]. PLoS One, 2014, 9(2): e88557.
- [4] VELCHETI V, SCHALPER KA, CARVAJAL DE *et al.* Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer [J]. Lab Invest, 2014, 94(1): 107-116.
- [5] SPRANGER S, SPAAPEN RM, ZHA Y *et al.* Up-regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells [J]. Transl Med, 2013, 5(200): 2418-2419.
- [6] LUSSIER DM, ONEILL L, NIEVES LM *et al.* Enhanced T-Cell Immunity to Osteosarcoma Through Antibody Blockade of PD-1/PD-L1 Interactions [J]. J Immunother, 2015, 38(3): 96-106.
- [7] BLAKE SJ, CHING AL, KENNA TJ *et al.* Blockade of PD-1/PD-L1 promotes adoptive T-Cell immunotherapy in a tolerogenic environment [J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0119483.
- [8] OTT PA, HODI FS, ROBERT C. CTLA-4 and PD-1/PD-L1 blockade: new immunotherapeutic modalities with durable clinical benefit in melanoma patients [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(19): 5300-5309.
- [9] KONDO A, YAMASHITA T, TAMURA H *et al.* Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha induce an immunoinhibitory molecule, B7-H1, via nuclear factor-kappaB activation in blasts in myelodysplastic syndromes [J]. Blood, 2010, 116: 1124-1131.
- [10] QIAN Y, DENG J, GENG L *et al.* TLR4 signaling induces B7-H1 expression through MAPK pathways in bladder cancer cells [J]. Cancer Invest, 2008, 26: 816-821.
- [11] CHEN J, FENG Y, LU L *et al.* Interferon-gamma-induced PDL1 surface expression on human oral squamous carcinoma via PKD2 signal pathway [J]. Immunobiology, 2012, 217: 385-393.
- [12] LEE SJ, JANG BC, LEE SW *et al.* Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN-gamma-induced upregulation of B7-H1 (CD274) [J]. FEBS Lett, 2006, 580: 755-762.
- [13] XU C, FILLMORE C, KOYAMA S *et al.* Loss of Lkb1 and Pten Leads to Lung Squamous Cell Carcinoma with Elevated PD-L1 Expression [J]. Cancer Cell, 2014, 25(5): 590-604.
- [14] GHEBEH H, TULBAH A, MOHAMMED S *et al.* Expression of B7-H1 in breast cancer patients is strongly associated with high proliferative Ki-67-expressing tumor cells [J]. Int J Cancer, 2007, 121: 751-758.
- [15] AZUMA K, OTA K, KAWAHARA A *et al.* Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected nonsmall-cell lung cancer [J]. Ann Oncol, 2014, 25: 1935-1940.