

· 生物技术与方法 ·

# 稳定表达 PSMB9-eGFP-His 蛋白的 THP-1 细胞系建立及免疫蛋白酶体活性检测

王佳豪<sup>1</sup>, 冯利杰<sup>1</sup>, 张瑶<sup>2\*</sup>, 徐平<sup>1,2\*</sup>

1 安徽医科大学 基础医学院, 安徽 合肥 230032

2 军事科学院军事医学研究院生命组学研究所 中国医学科学院蛋白质组学与药物研发新技术创新单元 北京蛋白质组研究中心 医学蛋白质组全国重点实验室, 北京 102206

王佳豪, 冯利杰, 张瑶, 徐平. 稳定表达 PSMB9-eGFP-His 蛋白的 THP-1 细胞系建立及免疫蛋白酶体活性检测[J]. 生物工程学报, 2024, 40(7): 2282-2293.

WANG Jiahao, FENG Lijie, ZHANG Yao, XU Ping. Establishment of a stable THP-1 cell line expressing PSMB9-eGFP-His protein and detection of immunoproteasome activity[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(7): 2282-2293.

**摘要:** 泛素/蛋白酶体系统(ubiquitin/proteasome system, UPS)在调控细胞内蛋白质稳态过程中发挥重要功能, UPS 中蛋白酶体的催化活性受  $\beta 1$  (PSMB6)、 $\beta 2$  (PSMB7)和  $\beta 5$  (PSMB5)亚基调控, 在干扰素- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、炎症反应、氧化应激等条件诱导下,  $\beta 1$ 、 $\beta 2$  和  $\beta 5$  可被相应的  $\beta 1i$  (PSMB9)、 $\beta 2i$  (PSMB10)和  $\beta 5i$  (PSMB8)替换, 组装形成免疫蛋白酶体(immunoproteasome)。与标准蛋白酶体相比, 免疫蛋白酶体具有更强的免疫调节作用, 如加工递呈 MHC I 抗原、调节促炎细胞因子的产生及 T 细胞分化、增殖等。免疫蛋白酶体的异常聚集会导致帕金森病、阿尔茨海默病、肌萎缩侧索硬化等神经退行性疾病的发生。为探究 PSMB9 在细菌感染后发挥的功能, 本研究通过构建过表达 PSMB9-eGFP-His 的慢病毒质粒, 利用三质粒系统转染 HEK293T 包装慢病毒, 嘌呤霉素筛选, 获得稳定表达 PSMB9 融合蛋白的人髓系白血病单核细胞 THP-1 细胞系, 利用蛋白免疫印迹(Western blotting, WB)及荧光显微镜验证了 PSMB9 融合蛋白的表达, 通过实时荧光定量 PCR (quantitative PCR, qPCR)计算了稳转细胞系中 *PSMB9-eGFP* 基因的拷贝数。免疫荧光结果发现 eGFP-His 不会影响 PSMB9 的亚细胞定位, 镍柱亲和纯化实验证实 PSMB9 融合蛋白可组装至 20S 免疫蛋白酶体中, 且具有底物切割活性。上述结果证明 *PSMB9-eGFP* 基因成功整合入 THP-1 细胞基因组并稳定表达, 可用于探究 PSMB9 亚基在活细胞模型中不同感染条件及疾病进程中的细胞定位、动态表达和活性的变化, 并为其他 2 个免疫蛋白酶体亚基 PSMB8 和 PSMB10 的稳转细胞系构建提供了参考。

**关键词:** 免疫蛋白酶体; 慢病毒; 稳转细胞系; PSMB9; THP-1

资助项目: 京津冀基础研究合作专项(J200001); 国家自然科学基金(32141003, 31901037)

This work was supported by the Beijing-Tianjin-Hebei Basic Research Cooperation Project (J200001) and the National Natural Science Foundation of China (32141003, 31901037).

\*Corresponding authors. E-mail: XU Ping, xuping\_bprc@126.com; ZHANG Yao, zhangyaowsw@163.com

Received: 2024-02-20; Accepted: 2024-04-01; Published online: 2024-04-15

# Establishment of a stable THP-1 cell line expressing PSMB9-eGFP-His protein and detection of immunoproteasome activity

WANG Jiahao<sup>1</sup>, FENG Lijie<sup>1</sup>, ZHANG Yao<sup>2\*</sup>, XU Ping<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> School of Basic Medical Science, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui, China

<sup>2</sup> State Key Laboratory of Medical Proteomics, Research Unit of Proteomics & Research and Development of New Drug of Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing Proteome Research Center, Institute of Biogenomics, Academy of Military Medical Sciences of Academy of Military Science, Beijing 102206, China

**Abstract:** The ubiquitin/proteasome system (UPS) plays a crucial role in maintaining cellular protein homeostasis. The catalytic activity of proteasome in the UPS is regulated by  $\beta 1$  (PSMB6),  $\beta 2$  (PSMB7), and  $\beta 5$  (PSMB5) subunits. Interferon (IFN)- $\gamma$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , inflammation, and oxidative stress can induce the replacement of  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ , and  $\beta 5$  with their respective immuno-subunits  $\beta 1i$  (PSMB9),  $\beta 2i$  (PSMB10), and  $\beta 5i$  (PSMB8), which can be assembled into the immunoproteasome. Compared with the standard proteasome, the immunoproteasome exerts enhanced regulatory effects on immune responses, such as processing and presenting MHC class I antigens, production of pro-inflammatory cytokines, and T cell differentiation and proliferation. Abnormal aggregation of immunoproteasomes can cause neurodegenerative diseases like Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. To explore the function of PSMB9 after bacterial infection, we constructed a lentivirus plasmid overexpressing PSMB9-eGFP-His and transfected the plasmid into HEK293T cells for packaging by using a triple-plasmid system in this study. After screening with puromycin, we obtained a stable human leukemia monocytic THP-1 cell line expressing the fusion protein of PSMB9. Western blotting (WB) and fluorescence microscopy verified the expression of the fusion protein in the stable THP-1 cells. Quantitative PCR (qPCR) was employed to measure the copies of *PSMB9-eGFP* in THP-1 cells. Immunofluorescence results found that eGFP-His did not affect the subcellular localization of PSMB9. The purification with nickel affinity chromatography confirmed that the fusion protein could be assembled into the 20S immunoproteasome and exhibited cleaving activity for fluorescent peptide substrates. These results indicated that the *PSMB9-eGFP* fusion gene was integrated into the chromosome, and could be stably expressed in the constructed THP-1 cell line. This cell line can be utilized for the research on subcellular localization, dynamic expression, and activity of PSMB9 in live cells at different infection conditions and disease stages. It also provides a model for the stable cell lines construction of other immunoproteasome subunits PSMB8 and PSMB10.

**Keywords:** immunoproteasome; lentivirus; stable cell line; PSMB9; THP-1

细胞中蛋白质选择性降解是通过蛋白酶体 (proteasome)实现的<sup>[1-2]</sup>, 蛋白酶体约 2 500 kDa,

是一种高度复杂的超大分子复合物, 由 20S 蛋白酶体催化核心颗粒(catalytic core particle, CP)和

19S 或 11S 调节颗粒(regulatory particle)组成<sup>[3-4]</sup>。20S 蛋白酶体 CP 是由 4 个七聚环组成的桶状复合物,包括由  $\alpha$  亚基组成( $\alpha 1-7$ )的两个相同外环及  $\beta$  亚基组成( $\beta 1-7$ )的两个相同内环<sup>[5-6]</sup>。其蛋白水解活性受  $\beta 1$  (PSMB6)、 $\beta 2$  (PSMB7) 和  $\beta 5$  (PSMB5)调控,它们分别具有含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(caspase-like)、胰蛋白酶(trypsin-like)及胰凝乳蛋白酶活性(chymotrypsin-like)<sup>[7]</sup>。

与组成型表达的标准蛋白酶体相比,免疫蛋白酶体在非刺激条件下通常表达量较低。但在 IFN- $\gamma$ <sup>[8-9]</sup>、TNF- $\alpha$ <sup>[10]</sup>等促炎因子刺激下,或受 NO<sup>[11]</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>[12-13]</sup>及高血糖<sup>[14]</sup>等外界因素的影响,免疫蛋白酶体的表达量会显著提升,且其亚基  $\beta 1i$  (PSMB9)、 $\beta 2i$  (PSMB10)和  $\beta 5i$  (PSMB9) 替换了标准蛋白酶体的  $\beta 1$ 、 $\beta 2$  和  $\beta 5$  亚基,以相互协作的方式组装至免疫蛋白酶体 CP 中,其组装速度约为标准型蛋白酶体亚基的 4 倍,从而使细胞能够快速响应外界刺激<sup>[15]</sup>。其中 PSMB10 的组装需要 PSMB9 的辅助,PSMB8 参与 PSMB9 和 PSMB10 亚基的成熟<sup>[16-17]</sup>,免疫蛋白酶体能够更有效地切割抗原,进而加强对 MHC I 类复合物的抗原提呈并促进 CD8<sup>+</sup> T 细胞的激活<sup>[18-19]</sup>。

PSMB9 亚基的突变会诱发诸多疾病。Lv 等<sup>[20]</sup>发现 PSMB9 (Arg60His)和 PSMB8 (Gln145Lys)的突变与肠道结核感染具有较强的遗传易感关联性。Maksymowych 等<sup>[21]</sup>和 Qian 等<sup>[22]</sup>发现 PSMB9 (Arg60His)突变在高加索人群中,会增加直性脊柱炎患者急性前葡萄膜炎的感染。免疫蛋白酶体的失调也与多发性骨髓瘤<sup>[23]</sup>、类风湿性关节炎<sup>[24-25]</sup>、阿尔茨海默病<sup>[26]</sup>等疾病的进展相关。Nakamura 等<sup>[27]</sup>通过定量蛋白质组学研究发现,与健康人群相比,PSMB9 亚基在皮肤炎和系统性红斑狼疮患者中上调约 2.5 倍。

Zu 等<sup>[28]</sup>发现 PSMB9 亚基对心血管有保护作用,在糖尿病小鼠心脏缺血再灌注实验中发现 PSMB9 亚基的缺失,会加剧心肌质量损失和心脏收缩障碍。Matsumoto 等<sup>[29]</sup>发现在神经元细胞中,铜/锌超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD1)突变体的错误聚集会阻隔 PSMB9,进而导致肌萎缩侧索硬化症的发生。以上研究表明免疫蛋白酶体 PSMB9 亚基在抵抗细菌感染、调节适应性免疫、维持蛋白质稳态及心肌缺血保护中发挥了重要的作用。

人髓系白血病单核细胞 THP-1 的生物学特性类似人原代单核细胞,常被用于研究单核/巨噬细胞的功能<sup>[30]</sup>、机制<sup>[31]</sup>、信号通路<sup>[32]</sup>及药物递送<sup>[33-34]</sup>。THP-1 作为悬浮细胞,瞬时转染效率低<sup>[35]</sup>,本研究通过慢病毒感染策略,成功在 THP-1 细胞中构建了 PSMB9-eGFP-His 过表达稳转细胞系。免疫蛋白酶体亲和纯化实验证明,PSMB9-eGFP-His 融合蛋白成功在免疫蛋白酶体中完成了组装,并替换了标准蛋白酶体的 PSMB6 亚基,且组装后具有对 Ac-PAL-AMC<sup>[36]</sup> 荧光多肽底物的切割活性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 质粒、菌株及细胞

pHAGE-CMV-eGFP-Puro、psPAX2、pMD2.G 质粒均为实验室保存。HEK293T 细胞及 THP-1 细胞购自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC)。大肠杆菌(*Escherichia coli*) 在 LB 固体培养基(1%胰蛋白胨,0.5%酵母提取物,1% NaCl,1.5%琼脂粉)中培养。HEK293T 细胞在含有 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, Gibco),100 U/mL 青霉素,100  $\mu$ g/mL 链霉素的达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM, Gibco)中培养。THP-1 细胞在含有 10% FBS、

55  $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -巯基乙醇( $\beta$ -Mercaptoethanol, Sigma)的 RPMI1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640, RPMI1640, Gibco)培养基中培养。

## 1.2 主要试剂

线性聚乙烯亚胺粉末(polyethylenimine, PEI)购自 Polysciences 公司; DNA marker 和 DNA 同源重组酶均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; DNA 凝胶纯化试剂盒、哺乳动物细胞基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司; SYBR Green Relatime PCR 试剂购自 Toyobo 公司; 嘌呤霉素、伏波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)均购自北京索莱宝科技有限公司; 兔抗人 PSMA4、PSMB6、PSMB7 抗体及小鼠抗人 PSMB9 抗体均购自武汉爱博泰克生物技术公司; 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体、Polybrene、Myc-Lumi<sup>TM</sup> 发光法支原体检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司; Aleax Fluor 488 绿色荧光基团的山羊抗小鼠 IgG、Aleax Fluor 561 红色荧光基团的山羊抗兔 IgG, 及 Na/K-ATP 小鼠抗人抗体均购自 Abcam 公司; Ni-NTA 琼脂糖珠购自北京欣茂凯源科技有限公司; 免疫蛋白酶体荧光肽底物 Suc-LLVY-AMC 和 Ac-PAL-AMC 均购自上海皓元生物医药科技有

限公司。

## 1.3 重组载体的构建及检测

PSMB9 基因从 THP-1 细胞 cDNA 文库中扩增获得, 并通过同源重组的方法连接至 pHAGE-CMV-eGFP-His-Puro 载体中。扩增使用引物序列详见表 1。引物合成由北京擎科生物科技股份有限公司完成。构建完成质粒通过菌落 PCR 及测序进行验证。

## 1.4 慢病毒包装、浓缩及 THP-1 稳转株的筛选

运用三质粒包装系统, 将携带外源基因的慢病毒穿梭质粒与辅助质粒共转染 HEK293T 细胞。HEK293T 细胞铺板至 10 cm 细胞皿, 待细胞密度到 80%–90%时(1 d), 用 PEI 将慢病毒载体转染至 HEK293T 中。共转染 15  $\mu\text{g}$  质粒: pHAGE-PSMB9-eGFP-His, 7.5  $\mu\text{g}$ ; psPAX2, 4.8  $\mu\text{g}$ ; pMD2.G, 2.7  $\mu\text{g}$ 。转染后, 将细胞置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱内培养 4–6 h 后, 换为 DMEM 完全培养基继续培养。

连续培养 2 d 或 3 d 后收集细胞培养基, 2 000 r/min 离心 5 min 去除细胞碎片。加入 5 $\times$ 慢病毒浓缩液(NaCl 8.766 g, PEG8000 50 g, ddH<sub>2</sub>O 200 mL, 121  $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 30 min), 4  $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min 后颠倒混匀, 重复 2 次, 置于 4  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。4 000 $\times$ g 离心 30 min, 沉淀即为白色病毒

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequences (5'→3')
PSMB9-F	TTAAACTTAAGCTTGCCACCATGCTGCGGGCGGGAG
PSMB9-R	CTTCCAAAGAATTCGACTCATCATAGAATTTTGGCA
pHAGE-F	TCGAATTCTTTGGAAGTTTT
pHAGE-R	GGTGGCAAGCTTAAGTTTAA
eGFP-F	CACAACATCGAGGACGCGCAG
eGFP-R	CATGTGATCGCGCTTCTCGT
GAPDH-F	ACTTTGGTATCGTGGGAAGGACTC
GAPDH-R	GTTTTTCTAGACGGCAGGTCAGG

颗粒。将处于生长对数期的 THP-1 接种到 6 孔细胞培养板中, 每孔约  $1 \times 10^6$  个细胞, 培养基重悬后取 1/5 体积的浓缩病毒进行感染, 2 d 后换液, 加入含  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  嘌呤霉素的 1640 完全培养基进行筛选, 通过镜下观察荧光强度确定其感染效率, 待培养稳定后减为  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  嘌呤霉素维持培养。

### 1.5 THP-1 稳转细胞株中 PSMB9-eGFP 基因拷贝数检测

将 pHAGE-PSMB9-eGFP-His 质粒稀释至  $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$  及  $1 \times 10^4$  拷贝数, 绘制标准曲线, 进行实时荧光定量 PCR (quantitative PCR, qPCR) 检测。反应体系  $20 \mu\text{L}$ , 反应条件:  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  60 s;  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  15 s,  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  10 s,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  15 s, 共 40 个循环。以标准品的  $C_t$  值为横坐标, 拷贝数的对数为纵坐标, 绘制标准曲线, 获得标准曲线方程。拷贝数( $\text{copies}/\mu\text{L}$ )=[质粒浓度( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) $\times 6.022 \times 10^{23}$ ]/[length (bp) $\times 10^9 \times 660$ ]。

收集野生型及 PSMB9-eGFP 稳转细胞系, 各约  $1 \times 10^7$  个细胞, 提取基因组 DNA, 分光光度计测量 DNA 浓度后用于 qPCR 检测, 采用 PSMB9-eGFP= $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算基因拷贝数差异, 设计 PSMB9-eGFP 及内参 GAPDH 基因特异性 qPCR 引物, 详见表 1。

### 1.6 THP-1 稳转细胞株中 PSMB9 的表达检测

收集慢病毒包装的 HEK293T 细胞及嘌呤霉素药物筛选后得到的 THP-1 稳转细胞系, PBS 清洗 3 次后, 加入 1 mL 细胞裂解液, 冰上裂解 30 min 后加入 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液[250 mmol/L Tris (pH 6.8), 8% SDS, 0.1% 溴酚蓝, 40% 甘油, 100 mmol/L 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)]。用 10% SDS-PAGE 对蛋白质样本进行凝胶电泳分离, 通过半干转法将电泳分离后的蛋白质转移至硝酸纤维素膜上(0.2  $\mu\text{m}$ , 15 V, 50 min),

10% 脱脂奶粉封闭后, 用 Anti-PSMB9 一抗 (1:2 000) 和二抗 Anti-Mouse 依次孵育, 显影仪检测蛋白免疫印迹(Western blotting, WB)信号。

### 1.7 免疫荧光检测 THP-1 中 PSMB9 重组蛋白的表达及定位

将野生型及过表达 PSMB9-eGFP-His 的 THP-1 细胞铺至 24 孔板中, 每孔  $1 \times 10^6$  个细胞, 用  $100 \text{ ng}/\text{mL}$  PMA 刺激 48 h, 使得 THP-1 细胞贴壁分化后制作成细胞爬片。PBS 洗涤 2 次, 在 4% 多聚甲醛(polyformaldehyde, PFA) 中固定 15 min, 0.2% Triton X-100 通透 5 min。5% BSA 封闭 1 h, Anti-PSMB9 一抗  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  过夜孵育。用 PBS 洗涤 3 次后, Aleax Fluor 488 绿色荧光基团的山羊抗小鼠 IgG 二抗孵育 1 h。细胞膜用 Anti-Na/K-ATP 一抗孵育 2 h, 后用 Aleax Fluor 561 红色荧光基团的山羊抗兔 IgG 二抗孵育 1 h。加入含 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 的抗淬灭剂, 染色 1 h 后封片, 在 405、488、561 nm 下进行激光共聚焦分析。

### 1.8 PSMB9-eGFP-His 融合蛋白亲和纯化及免疫蛋白酶体组成检测

取  $1 \times 10^8$  个过表达 PSMB9-eGFP 的 THP-1 细胞, 加入 1 mL 细胞裂解液(1% NP-40, 2 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 300 mmol/L NaCl, 2 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , 50 mmol/L HEPES, 5 mmol/L ATP, 1 mmol/L DTT, 5 mmol/L 咪唑, 10% 甘油, 蛋白酶抑制剂), 冰上裂解 30 min, 13 300 r/min 离心 15 min, 取  $100 \mu\text{L}$  上清用于 WB 检测, 剩余  $900 \mu\text{L}$  上清与  $40 \mu\text{L}$  Ni-NTA 琼脂糖珠于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 1 h, 将琼脂糖珠-蛋白混合物转移至截流柱中, 保留流穿液, 用含 40 mmol/L 咪唑的洗涤缓冲液 (pH 7.4), 洗 3 次。用  $100 \mu\text{L}$  含 400 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液 (pH 7.4), 洗脱与磁珠结合的蛋白, 加入 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液。细胞裂解液

(in put, IP)、流穿液(flow through, FT)、洗涤液(wash)及洗脱液(elution, Elu)各取 20  $\mu$ L 进行 WB 检测。

### 1.9 PSMB9-eGFP-His 融合蛋白活性检测

重复上述 THP-1 细胞中的免疫蛋白酶体免疫沉淀实验, 对 100  $\mu$ L 洗脱缓冲液, 用 10 kDa 超滤管去除咪唑后, 重悬在蛋白酶体活性检测液中(5 mmol/L ATP, 1 mmol/L DTT, 40  $\mu$ mol/L Suc-LLVT-AMC 或 Ac-PAL-AMC), 混匀后分装至 96 孔板中进行蛋白酶体活性检测。100  $\mu$ L/孔, 37  $^{\circ}$ C 避光孵育 40 min, 380 nm 激发光、460 nm 吸收光进行检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 慢病毒载体 pHAGE-PSMB9-eGFP-His 的构建

本研究在 PSMB9 亚基的 C 端融合表达了 eGFP-His 蛋白, 在 PSMB9-eGFP-His 组装过程中, 融合蛋白的 N 端会组装至 20S 蛋白酶体内部, 而 eGFP-His 则暴露在蛋白酶体外<sup>[37-38]</sup>。构建的慢病毒载体 pHAGE-PSMB9-eGFP-His 如图 1A 所示, 从 THP-1 cDNA 文库中对 PSMB9 进行 PCR 扩增, 并与质粒 pHAGE-CMV-eGFP-His-Puro 进行重组, 重组产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 涂布于含氨苄青霉素(100  $\mu$ g/mL)的 LB 平板中, 挑取单克隆进行菌落 PCR 验证, 扩增条带与目的产物大小一致, 为 816 bp, 如图 1B 所示, 提取质粒后进行测序, 进一步证实 pHAGE-PSMB9-eGFP-His 质粒构建成功。

### 2.2 PSMB9-eGFP-His 蛋白的表达检测

将慢病毒载体 pHAGE-PSMB9-eGFP-His 与辅助质粒 pMD2.G、psPAX2 共转染 HEK293T 细胞包装病毒。浓缩的慢病毒转染 THP-1 2 d

后, 使用倒置荧光显微镜可明显观察到绿色荧光(图 2), 经嘌呤霉素筛选后, 细胞无明显形态学变化, 生长状态良好且未受支原体污染。过表达质粒中的 PSMB9-eGFP-His 融合蛋白大小为 55 kDa。WB 结果显示, pHAGE-PSMB9-eGFP-His 质粒成功转染至 HEK293T 细胞中, 且 WB 结果表明在 THP-1 的 55 kDa 处, 成功检测到融合蛋白条带, 在 22 kDa 处检测到 THP-1 内源 PSMB9 蛋白表达(图 3), 证明过表达 PSMB9-eGFP-His 的稳转细胞系构建成功。

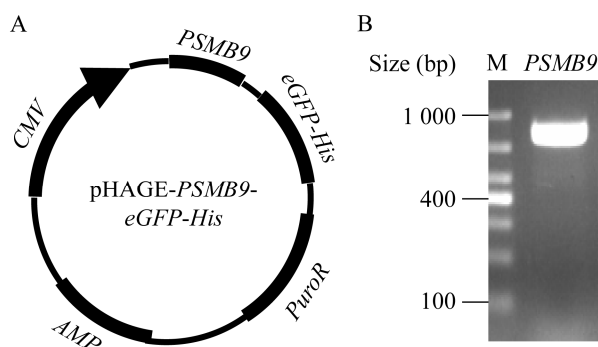


图 1 慢病毒载体质粒的构建 A: pHAGE-PSMB9-eGFP-His 慢病毒质粒构建示意图. B: 菌落 PCR 验证. M: 5 000 bp DNA Marker

Figure 1 Construction of lentivirus plasmid. A: Schematic diagram of plasmid construction of pHAGE-PSMB9-eGFP-His. B: PCR verification of target gene. Lane M: 5 000 bp DNA Marker.

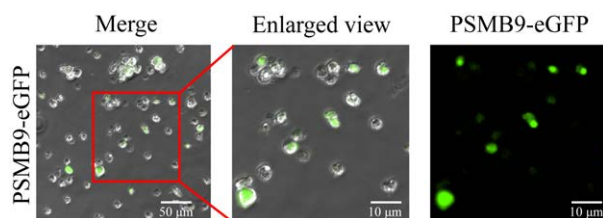


图 2 慢病毒感染 THP-1 中 PSMB9-eGFP 的表达检测

Figure 2 Detection of PSMB9-eGFP expression in THP-1 cells infected with lentivirus.

### 2.3 *PSMB9-eGFP* 基因的拷贝数计算

基于荧光定量 PCR 的方法, 计算 *PSMB9-eGFP* 基因在 THP-1 稳转细胞系中的拷贝数, 用 *GAPDH* 基因进行校准。通过质粒标准品绘制 *PSMB9-eGFP* 基因的标准曲线(图 4A),

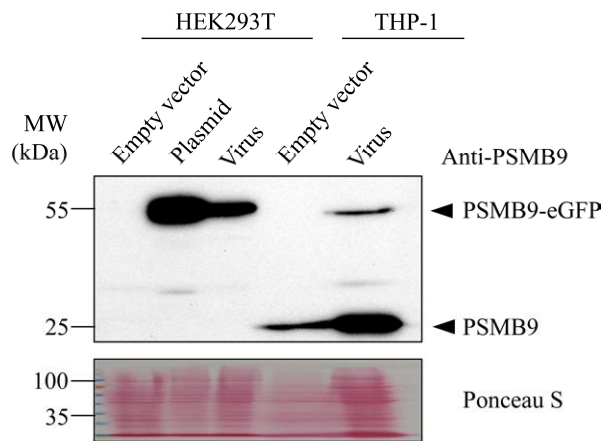


图 3 基于 WB 的 *PSMB9-eGFP* 蛋白表达检测  
Figure 3 *PSMB9-eGFP* protein was detected by WB method.

得到的回归方程为  $y = -2.9066x + 36.032$ , 相关系数为  $R^2 = 0.9951$ , 表明在标准质粒稀释质量浓度范围内线性关系良好。将校准后的 *PSMB9-eGFP* 基因  $C_t$  值带入回归方程计算, 在该稳转细胞系中 *PSMB9-eGFP* 基因的拷贝数为  $10^{3.14}$  copies/ $\mu\text{L}$ 。通过 qPCR 比较稳转细胞系 (*PSMB9-eGFP*) 与野生型 (wild-type) 的 *PSMB9-eGFP* 基因拷贝数差异, 结果显示稳转细胞系的 *PSMB9-eGFP* 基因相对拷贝数为野生型的 1.4 倍 ( $P < 0.01$ ) (图 4B), 意味着在慢病毒感染后、嘌呤霉素筛选得到的稳转细胞系中, *PSMB9-eGFP* 基因的拷贝数显著提高, 外源目的基因有效整合至 THP-1 基因组中。

### 2.4 免疫荧光检测稳转细胞系中 *PSMB9* 的细胞定位

通过免疫荧光检测 THP-1 细胞中内源性 & 外源过表达 *PSMB9* 的细胞定位。结果表明与内源性 *PSMB9* 一致, 外源过表达 *PSMB9*, 主要

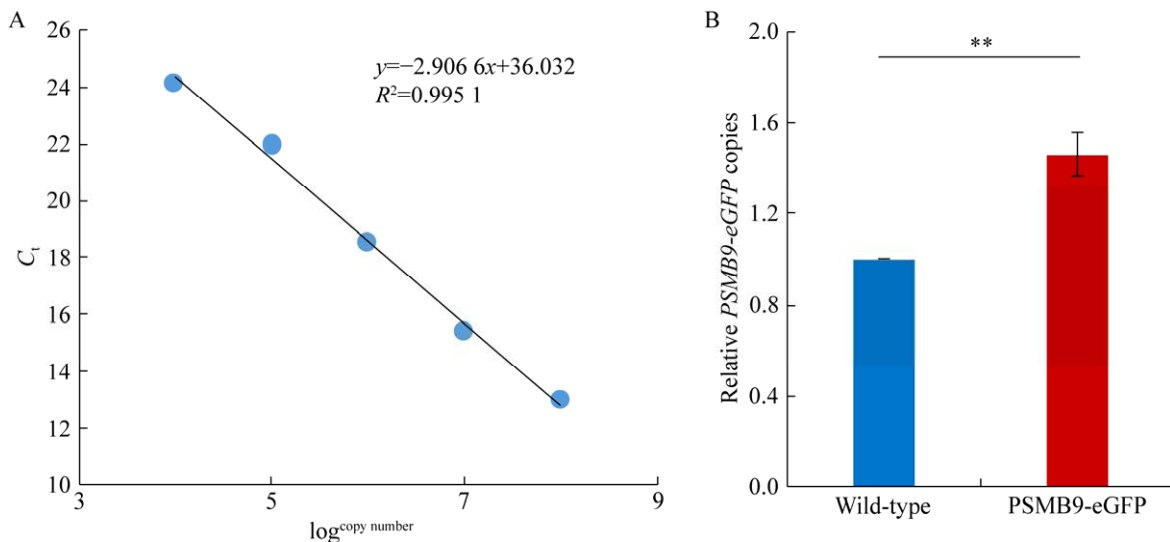


图 4 THP-1 稳转细胞系 *PSMB9-eGFP* 的基因拷贝数检测 A: *PSMB9-eGFP* 基因的标准曲线 ( $n=3$ ). B: 基因组中的 *PSMB9-eGFP* 拷贝数 ( $n=4$ )

Figure 4 Gene copies detection of *PSMB9-eGFP* in THP-1 stable transfected cell lines. A: Standard curve of *PSMB9-eGFP* ( $n=3$ ). B: *PSMB9-eGFP* copies in genome ( $n=4$ ). \*\*:  $P < 0.01$  (two-tailed Student's  $t$ -test).



定位在细胞核和细胞质中(图 5), 与 UniProt 数据库中已报道的定位一致。此外, 在稳转细胞系中能够观察到更多的细胞核定位融合蛋白表达, 可能因 PSMB9 融合蛋白过量表达、部分游离 PSMB9 融合蛋白仍在核中、eGFP 暴露在外未完全组装进入 20S 蛋白酶体内部所致。

## 2.5 PSMB9-eGFP-His 融合蛋白的 Ni-NTA 亲和纯化物检测蛋白酶体的组装

通过 Ni-NTA 纯化 THP-1 稳转细胞的 PSMB9-eGFP-His 融合蛋白, 在全细胞蛋白上样液 (IP) 及洗脱液 (Elu) 样本中, 基于 Anti-PSMB9 抗体检测目的融合蛋白, 结果显示, 在 55 kDa 处检测到显著的蛋白表达信号, 证明成功纯化了外源过表达的 PSMB9 融合蛋白, 纯化得率约 38.4% (图 6A)。且在 29 kDa 处成功检测到 PSMA4 ( $\alpha 4$ ) 的蛋白表达信号, 而在 22 kDa 处未检测到 PSMB6 ( $\beta 1$ ) 的蛋白表达信号, 证明 PSMB9-eGFP-His 融合蛋白成功组装至 20S 免疫蛋白酶体中, 且基本完全替换了原始标准蛋白酶体亚基 PSMB6。此外, 在洗脱液的 30 kDa

处还检测到 PSMB7 ( $\beta 2$ ) 亚基的表达。PSMA4 及 PSMB7 蛋白表达灰度定量结果显示, PSMA4 及 PSMB7 蛋白的纯化得率分别为 3.2% 及 1.1%, 这些结果表明并非所有 PSMB9 融合蛋白均在 20S 免疫蛋白酶体中完成了组装, 因 PSMB9 融合蛋白表达量较高, 在稳转细胞系中仍存在游离形式的 PSMB9 融合蛋白(图 6B)。

## 2.6 PSMB9-eGFP-His 融合蛋白的活性测定

为进一步检测上述成功组装的蛋白酶体亚基 PSMB9 的活性, 对基于 Ni-NTA 纯化的产物利用 Ac-PAL-AMC<sup>[36]</sup> 荧光多肽底物来检测组装后的 PSMB9-eGFP-His 融合蛋白的活性, 利用 Suc-LLVY-AMC<sup>[39]</sup> 荧光多肽底物来检测被 PSMB9-eGFP-His 融合蛋白替换的标准蛋白酶体 PSMB6 亚基的活性。结果显示, 组装了 PSMB9-eGFP-His 融合蛋白的免疫蛋白酶体几乎无法对 Suc-LLVY-AMC 荧光多肽底物进行切割, 但对 Ac-PAL-AMC 荧光多肽底物有着极强的切割活性(图 7), 意味着 PSMB9-eGFP-His 不仅可以完全替换 PSMB6 后组装至蛋白酶体中, 还具有切割荧光肽底物的活性。

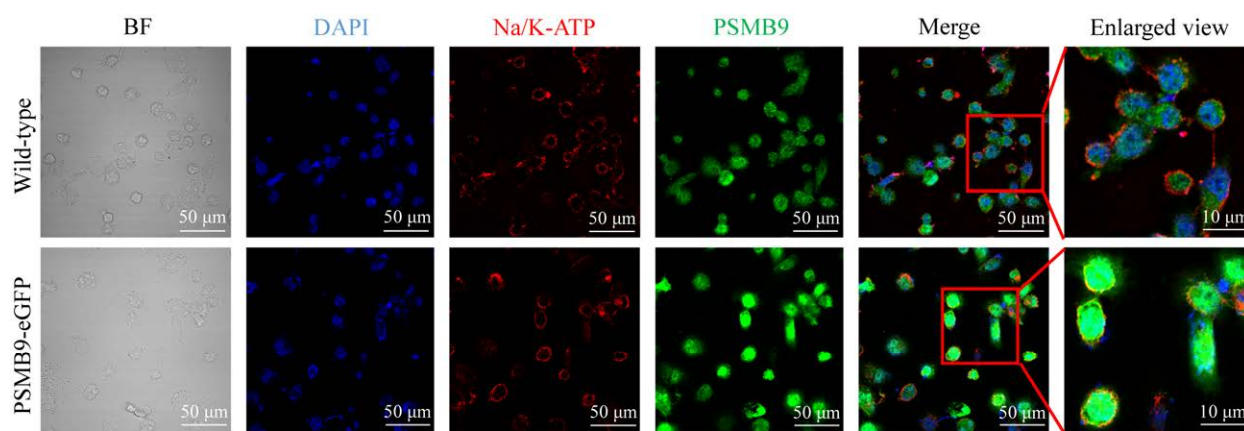


图 5 THP-1 内源性 & 稳转细胞系中 PSMB9 蛋白的亚细胞定位检测 Na/K-ATP (红色), PSMB9 (绿色), DAPI (蓝色)

Figure 5 Subcellular localization detection of PSMB9 protein in THP-1 endogenous and stable transfected cell lines. Na/K-ATP (red), PSMB9 (green) and DAPI (blue).



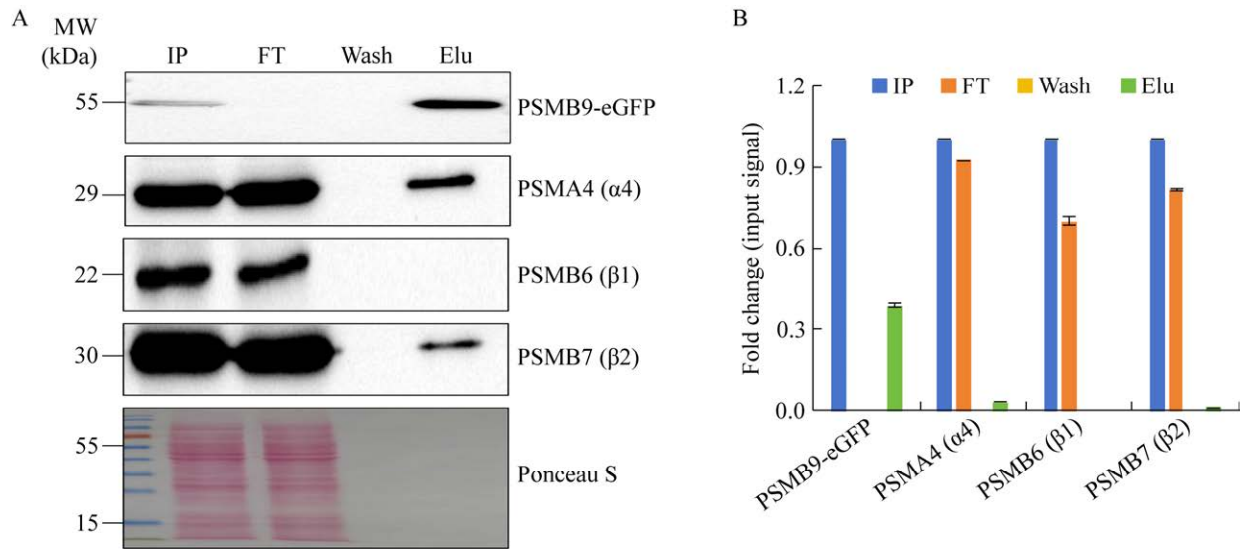


图6 稳转细胞系中 PSMB9-eGFP 免疫蛋白酶体组装检测 PSMB9-eGFP-His 镍柱亲和纯化产物中, PSMA4 ( $\alpha$ 4)、PSMB6 ( $\beta$ 1)、PSMB7 ( $\beta$ 2)的 WB 检测(A)以及灰度定量(B)

Figure 6 Immunoproteasome assembly detection of PSMB9-eGFP-His in stable transfected cell lines. WB detection (A) and grayscale quantification (B) of PSMB9-eGFP, PSMA4 ( $\alpha$ 4), PSMB6 ( $\beta$ 1), and PSMB7 ( $\beta$ 2) from the purified subjects of PSMB9-eGFP-His by nickel affinity chromatography method. IP: In put; FT: Flow through; Elu: Elution.

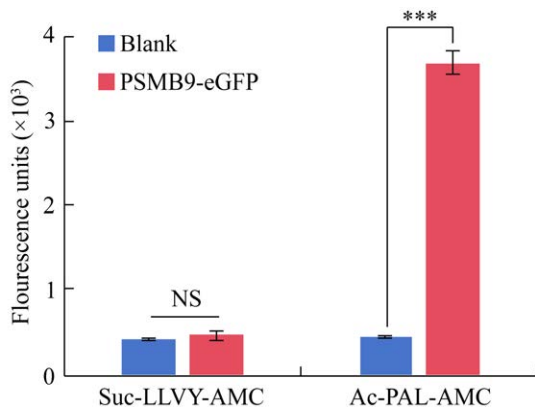


图7 PSMB9-eGFP 融合蛋白的活性检测

Figure 7 Activity assessment of PSMB9 fusion protein ( $n=3$ ). NS: No significance; \*\*\*:  $P < 0.001$  (two-tailed Student's  $t$ -test).

### 3 讨论与结论

免疫蛋白酶体活性亚基的失调会导致帕金森病、阿尔茨海默病<sup>[26]</sup>、亨廷顿病等神经退行性疾病的发生<sup>[40]</sup>,其活性亚基细胞系的构建,有

助于检测其在感染条件下、疾病过程中的动态变化,并探索其功能。

Reits 等<sup>[41]</sup>在人成纤维 HT1080 细胞中过表达 PSMB9-eGFP 融合蛋白,探究了细胞有丝分裂期间的免疫蛋白酶体核质运输。Rantanen 等<sup>[42]</sup>在人宫颈癌 Hela 细胞中过表达 PSMB9-eGFP 融合蛋白,发现脯氨酰羟化酶 3 型异构体(prolyl hydroxylase, PHD3)诱导的细胞氧化应激,会导致免疫蛋白酶体的聚集并诱发细胞凋亡。Matsumoto 等<sup>[29]</sup>在神经元细胞过表达 PSMB9-YFP 融合蛋白,发现 SOD1 的聚集会阻隔 PSMB9 并影响蛋白酶体活性,进而诱发肌萎缩侧索硬化症。研究者们主要是在肿瘤细胞及神经元细胞中进行过表达来探究 PSMB9 的功能。然而,单核细胞、巨噬细胞是重要的抗原提呈细胞,发挥了先天免疫与固有免疫的桥梁作用。因此,构建 PSMB9 免疫细胞系将有助于探究病理过程中 PSMB9 的空间定位及动态表达变化。

本研究成功构建了 PSMB9 融合蛋白过表达 THP-1 稳转细胞系, 在免疫蛋白酶体亚基 PSMB9 的 C 端融合表达了绿色荧光蛋白, 可动态检测活细胞中 PSMB9 亚基的定位及含量变化; 由于 PSMB9 融合蛋白 C 端具有 His 标签, 可通过镍柱对免疫蛋白酶体进行纯化, 进一步研究 PSMB9 亚基的组装及活性。本研究构建的过表达 PSMB9 融合蛋白的 THP-1 稳转细胞系, 可以在活细胞中系统性研究不同感染条件、疾病进程中, PSMB9 亚基的表达变化、空间定位以及活性变化, 探索其在氧化应激、炎症反应、抗原递呈及蛋白质水解平衡等方面的功能, 并为其他 2 个免疫蛋白酶体亚基 PSMB8 和 PSMB10 的稳转细胞系构建提供了参考。

## REFERENCES

- [1] ROCK KL, GRAMM C, ROTHSTEIN L, CLARK K, STEIN R, DICK L, HWANG D, GOLDBERG AL. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules[J]. *Cell*, 1994, 78(5): 761-771.
- [2] TANAKA K. Molecular biology of proteasomes[J]. *Molecular Biology Reports*, 1995, 21(1): 21-26.
- [3] VOGES D, ZWICKL P, BAUMEISTER W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1999, 68: 1015-1068.
- [4] COLLINS GA, GOLDBERG AL. The logic of the 26S proteasome[J]. *Cell*, 2017, 169(5): 792-806.
- [5] GROLL M, DITZEL L, LÖWE J, STOCK D, BOCHTLER M, BARTUNIK HD, HUBER R. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution[J]. *Nature*, 1997, 386(6624): 463-471.
- [6] UNNO M, MIZUSHIMA T, MORIMOTO Y, TOMISUGI Y, TANAKA K, YASUOKA N, TSUKIHARA T. The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution[J]. *Structure*, 2002, 10(5): 609-618.
- [7] DEMARTINO GN, SLAUGHTER CA. The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(32): 22123-22126.
- [8] CHATTERJEE-KISHORE M, KISHORE R, HICKLIN DJ, MARINCOLA FM, FERRONE S. Different requirements for signal transducer and activator of transcription 1 $\alpha$  and interferon regulatory factor 1 in the regulation of low molecular mass polypeptide 2 and transporter associated with antigen processing 1 gene expression[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(26): 16177-16183.
- [9] FOSS GS, PRYDZ H. Interferon regulatory factor 1 mediates the interferon- $\gamma$  induction of the human immunoproteasome subunit multicatalytic endopeptidase complex-like 1[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(49): 35196-35202.
- [10] GAVILÁN MP, CASTAÑO A, TORRES M, PORTAVELLA M, CABALLERO C, JIMÉNEZ S, GARCÍA-MARTÍNEZ A, PARRADO J, VITORICA J, RUANO D. Age-related increase in the immunoproteasome content in rat hippocampus: molecular and functional aspects[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2009, 108(1): 260-272.
- [11] KOTAMRAJU S, MATALON S, MATSUNAGA T, SHANG TS, HICKMAN-DAVIS JM, KALYANARAMAN B. Upregulation of immunoproteasomes by nitric oxide: potential antioxidative mechanism in endothelial cells[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2006, 40(6): 1034-1044.
- [12] DING QX, REINACKER K, DIMAYUGA E, NUKALA V, DRAKE J, BUTTERFIELD DA, DUNN JC, MARTIN S, BRUCE-KELLER AJ, KELLER JN. Role of the proteasome in protein oxidation and neural viability following low-level oxidative stress[J]. *FEBS Letters*, 2003, 546(2/3): 228-232.
- [13] KHAN MAS, OUBRAHIM H, STADTMAN ER. Inhibition of apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells leads to increases in levels of oxidized protein and LMP2 immunoproteasome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(32): 11560-11565.
- [14] ANGELES A, FUNG G, LUO HL. Immune and non-immune functions of the immunoproteasome[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2012, 17(5): 1904-1916.
- [15] KLIPP E, NORDLANDER B, KRÜGER R, GENNEMARK P, HOHMANN S. Integrative model of the response of yeast to osmotic shock[J]. *Nature Biotechnology*, 2005, 23: 975-982.
- [16] GROETTRUP M, STANDERA S, STOHWASSER R, KLOETZEL PM. The subunits MECL-1 and LMP2 are

- mutually required for incorporation into the 20S proteasome[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(17): 8970-8975.
- [17] GRIFFIN TA, NANDI D, CRUZ M, FEHLING HJ, KAER LV, MONACO JJ, COLBERT RA. Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits[J]. The Journal of Experimental Medicine, 1998, 187(1): 97-104.
- [18] CRAIU A, GACZYNSKA M, AKOPIAN T, GRAMM CF, FENTEANY G, GOLDBERG AL, ROCK KL. Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(20): 13437-13445.
- [19] GROETTRUP M, SOZA A, KUCKELKORN U, KLOETZEL PM. Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency[J]. Immunology Today, 1996, 17(9): 429-435.
- [20] LV Y, YAN B, YANG HL, LIU J, ZHONG W, LI K, CHEN ZP, XU CQ. LMP2/LMP7 gene variant: a risk factor for intestinal *Mycobacterium tuberculosis* infection in the Chinese population[J]. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2011, 26(7): 1145-1150.
- [21] MAKSYMOWYCH WP, TAO S, VAILE J, SUAREZ-ALMAZOR M, RAMOS-REMUS C, RUSSELL AS. LMP2 polymorphism is associated with extraspinal disease in HLA-B27 negative Caucasian and Mexican Mestizo patients with ankylosing spondylitis[J]. The Journal of Rheumatology, 2000, 27(1): 183-189.
- [22] QIAN YF, CHEN BQ, SHENG XW, PENG YQ. The LMP2 CfoI polymorphism is associated with ankylosing spondylitis (AS) risk but not with acute anterior uveitis (AAU): a meta-analysis[J]. Medicine, 2019, 98(45): e17804.
- [23] ADAMS J. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs[J]. Cancer Cell, 2004, 5(5): 417-421.
- [24] MUCHAMUEL T, BASLER M, AUJAY MA, SUZUKI E, KALIM KW, LAUER C, SYLVAIN C, RING ER, SHIELDS J, JIANG J, SHWONEK P, PARLATI F, DEMO SD, BENNETT MK, KIRK CJ, GROETTRUP M. A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis[J]. Nature Medicine, 2009, 15: 781-787.
- [25] EGERER T, MARTINEZ-GAMBOA L, DANKOF A, STUHLMÜLLER B, DÖRNER T, KRENN V, EGERER K, RUDOLPH PE, BURMESTER GR, FEIST E. Tissue-specific up-regulation of the proteasome subunit beta5i (LMP7) in Sjögren's syndrome[J]. Arthritis and Rheumatism, 2006, 54(5): 1501-1508.
- [26] MISHTO M, BELLAVISTA E, SANTORO A, STOLZING A, LIGORIO C, NACMIAS B, SPAZZAFUMO L, CHIAPPELLI M, LICASTRO F, SORBI S, PESSION A, OHM T, GRUNE T, FRANCESCHI C. Immunoproteasome and LMP2 polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains[J]. Neurobiology of Aging, 2006, 27(1): 54-66.
- [27] NAKAMURA K, JINNIN M, KUDO H, INOUE K, NAKAYAMA W, HONDA N, KAJIHARA I, MASUGUCHI S, FUKUSHIMA S, IHN H. The role of PSMB9 upregulated by interferon signature in the pathophysiology of cutaneous lesions of dermatomyositis and systemic lupus erythematosus[J]. British Journal of Dermatology, 2016, 174(5): 1030-1041.
- [28] ZU LY, BEDJA D, FOX-TALBOT K, GABRIELSON KL, KAER LV, BECKER LC, CAI ZP. Evidence for a role of immunoproteasomes in regulating cardiac muscle mass in diabetic mice[J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2010, 49(1): 5-15.
- [29] MATSUMOTO G, STOJANOVIC A, HOLMBERG CI, KIM S, MORIMOTO RI. Structural properties and neuronal toxicity of amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu/Zn superoxide dismutase 1 aggregates[J]. The Journal of Cell Biology, 2005, 171(1): 75-85.
- [30] CARAS I, TUCUREANU C, LERESCU L, PITICA R, MELINCEANU L, NEAGU S, SALAGEANU A. Influence of tumor cell culture supernatants on macrophage functional polarization: *in vitro* models of macrophage-tumor environment interaction[J]. Tumori, 2011, 97(5): 647-654.
- [31] MOSMANN TR, CHERWINSKI H, BOND MW, GIEDLIN MA, COFFMAN RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins[J]. Journal of Immunology, 1986, 136(7): 2348-2357.
- [32] BRUCKMEIER M, KUEHN A, CULMES M, PELISEK J, ECKSTEIN HH. Impact of oxLDL and

- LPS on C-type natriuretic peptide system is different between THP-1 cells and human peripheral blood monocytic cells[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 2012, 30(1): 199-209.
- [33] MEHTA SR, ZHANG XQ, BADARO R, SPINA C, DAY J, CHANG KP, SCHOOLEY RT. Flow cytometric screening for anti-leishmanials in a human macrophage cell line[J]. *Experimental Parasitology*, 2010, 126(4): 617-620.
- [34] SCHROECKSNADEL S, JENNY M, FUCHS D. Myelomonocytic THP-1 cells for *in vitro* testing of immunomodulatory properties of nanoparticles[J]. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2011, 7(1): 209-210.
- [35] TANG XR, ALJAHDALI B, ALASIRI M, BAMASHMOUS A, CAO F, DIBART S, SALIH E. A method for high transfection efficiency in THP-1 suspension cells without PMA treatment[J]. *Analytical Biochemistry*, 2018, 544: 93-97.
- [36] BASLER M, LAUER C, MOEBIUS J, WEBER R, PRZYBYLSKI M, KISSELEV AF, TSU C, GROETTRUP M. Why the structure but not the activity of the immunoproteasome subunit low molecular mass polypeptide 2 rescues antigen presentation[J]. *Journal of Immunology*, 2012, 189(4): 1868-1877.
- [37] NANDI D, JIANG H, MONACO JJ. Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN-gamma-inducible proteasome subunit[J]. *Journal of Immunology*, 1996, 156(7): 2361-2364.
- [38] SCHMIDTKE G, KRAFT R, KOSTKA S, HENKLEIN P, FRÖMMEL C, LÖWE J, HUBER R, KLOETZEL PM, SCHMIDT M. Analysis of mammalian 20S proteasome biogenesis: the maturation of beta-subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis[J]. *The EMBO Journal*, 1996, 15(24): 6887-6898.
- [39] DEBIASI RL, SQUIER MK, PIKE B, WYNES M, DERMODY TS, COHEN JJ, TYLER KL. Reovirus-induced apoptosis is preceded by increased cellular calpain activity and is blocked by calpain inhibitors[J]. *Journal of Virology*, 1999, 73(1): 695-701.
- [40] CIECHANOVER A, BRUNDIN P. The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg[J]. *Neuron*, 2003, 40(2): 427-446.
- [41] REITS EA, BENHAM AM, PLOUGASTEL B, NEEFJES J, TROWSDALE J. Dynamics of proteasome distribution in living cells[J]. *The EMBO Journal*, 1997, 16(20): 6087-6094.
- [42] RANTANEN K, PURSIHEIMO J, HÖGEL H, HIMANEN V, METZEN E, JAAKKOLA PM. Prolyl hydroxylase PHD3 activates oxygen-dependent protein aggregation[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2008, 19(5): 2231-2240.

(本文责编 郝丽芳)