

大鼠 XAF1 基因启动子荧光素酶报告质粒的构建及 IRF-1 结合位点的鉴定

周建博, 邱文, 卢燕来, 单锴, 赵聃, 王迎伟*

(南京医科大学微生物与免疫学系, 江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**构建大鼠 X 染色体连锁的凋亡抑制蛋白相关因子 1(X-linked inhibitor of apoptosis associated factor 1, XAF1) 基因启动子(全长和截断)荧光素酶报告质粒,并观察在人胚肾细胞 HEK293 中过表达干扰素调节因子-1(interferon regulatory factor-1, IRF-1)对 XAF1 基因启动活性的影响,同时,筛选其可能的 IRF-1 结合位点。**方法:**采用 PCR 技术,扩增出大鼠 XAF1 基因启动子序列(-1497 ~ +166 nt),将 XAF1 基因启动子插入荧光素酶报告基因载体 pGL3-basic 中获得 pGL3-XAF1-QC,与大鼠野生型 IRF-1 表达质粒(pcDNA3.1-IRF-1)共转染 HEK293 细胞,检测其荧光素酶活性,确定 IRF-1 对 XAF1 基因的启动作用。同时,应用生物信息学软件预测 XAF1 基因启动子上 IRF-1 潜在的结合位点,并构建截断的 XAF1 基因启动子荧光素酶报告质粒(pGL3-XAF1-1、pGL3-XAF1-2、pGL3-XAF1-3 和 pGL3-XAF1-4)。将上述全长和各截断的 XAF1 基因启动子荧光素酶报告质粒和 IRF-1 过表达质粒共转染 HEK293 细胞,再行荧光素酶活性测定,筛选 IRF-1 的结合位点。**结果:**菌液 PCR 及核酸测序证实,上述荧光素酶报告质粒均构建成功。将 pGL3-XAF1-QC 和 pcDNA3.1-IRF-1 共转染 HEK293 细胞发现,XAF1 基因启动子活性显著增加。而将 pGL3-XAF1-QC、pGL3-XAF1(1~4 号)和 pcDNA3.1-IRF-1 共转染 HEK293 细胞后证实,pGL3-XAF1-3 的启动活性显著低于 pGL3-XAF1-1 和 pGL3-XAF1-2。提示 IRF-1 可能结合在大鼠 XAF1 基因启动子的-337 ~ -47 nt 区域。**结论:**本实验成功构建了大鼠全长及截断的 XAF1 基因启动子荧光素酶报告质粒,并初步筛查出 IRF-1 在 XAF1 基因启动子上的结合区域,为后续研究奠定了基础。

[关键词] X 染色体连锁的凋亡抑制蛋白相关因子 1(XAF1); 干扰素调节因子-1(IRF-1); 启动子; 生物信息学; 荧光素酶报告质粒

[中图分类号] Q786

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)03-295-06

Construction of rat XAF1 promoter and identification of its binding sequence with IRF-1

ZHOU Jian-bo, QIU Wen, LU Yan-lai, SHAN Kai, ZHAO Dan, WANG Ying-wei*

(Department of Microbiology and Immunology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:**To construct luciferase reporter plasmids of full-length and truncated promoters of rat X-linked inhibitor of apoptosis associated factor 1 (XAF1) gene and detect their activity in HEK293 cells in response to interferon regulatory factor-1 (IRF-1) overexpression, screening the possible binding sites for IRF-1. **Methods:** Rat XAF1 promoter (-1497 ~ +166 nt) was amplified by PCR and cloned into the luciferase reporter plasmid(pGL3-basic). The recombinant plasmid(pGL3-XAF1-QC) and rat IRF-1 expression plasmid (pcDNA3.1-IRF-1) were co-transfected into HEK293 cells and then the luciferase activity was detected to confirm the role of IRF-1 in XAF1 gene transcription. Meanwhile, the possible IRF-1 binding sites within XAF1 promoter were predicted by using bioinformatics software. Based on the predicted results, different luciferase reporter plasmids of truncated XAF1 gene promoter (pGL3-XAF1-1, pGL3-XAF1-2, pGL3-XAF1-3 and pGL3-XAF1-4) were constructed. The promoter luciferase reporter plasmids of pGL3-XAF1-QC or pGL3-XAF1-1, -2, -3, -4 and the plasmid of pcDNA3.1-IRF-1 were co-transfected into HEK293 cells. Then, the luciferase activity was detected to screen the IRF-1 binding sites. **Results:** It was verified that different kinds of plasmids were all constructed correctly by PCR analysis and nucleotide sequencing. The plasmids of pGL3-XAF1-QC and pcDNA3.1-IRF-1 were co-transfected into HEK293 cells, and then the luciferase activity was detected. The result showed that the transcriptional

[基金项目] 国家自然科学基金 (31000396, 81072402); 江苏省自然科学基金 (BK2009417); 江苏省高校自然科学基金 (10KJB310006); 南京医科大学科技发展基金面上项目 (09NMUM003)

*通讯作者, E-mail: wangyw1508@njmu.edu.cn

activity of XAF1 gene was increased markedly in response to IRF-1 overexpression. In addition, when the plasmids of pGL3-XAF1-QC or pGL3-XAF1-1, -2, -3, -4 and pcDNA3.1-IRF-1 were co-transfected into HEK293 cells, the activity of pGL3-XAF1-3 was much lower than that in pGL3-XAF1-1 and pGL3-XAF1-2, indicating that the region of rat XAF promoter(-337 ~ -47 nt) might contain IRF-1 binding element. **Conclusion:** The rat full-length and truncated rat XAF1 promoter luciferase reporter plasmids were constructed successfully, and the IRF-1 binding region was found, which could be beneficial to further studies.

[Key words] X-linked inhibitor of apoptosis associated factor 1 (XAF1); interferon regulatory factor-1 (IRF-1); promoter; bioinformatics; luciferase reporter plasmid

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(3): 295-300]

人类系膜增生性肾炎 (mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN) 是一种免疫相关的肾脏疾病,其发病约占原发性肾小球肾炎的 30%~50%^[1]。MsPGN 病变特征是肾小球系膜细胞 (glomerular mesangial cells, GMCs) 早期凋亡、坏死和继发性增生。由于 MsPGN 病因及致病机制至今不明,大多患者最终因肾组织纤维化导致肾功能衰竭而死亡,预后较差,危害较大,故国内外众多学者对此肾炎进行了深入的研究。大鼠 Thy-1 肾炎 (Thy-1 nephritis, Thy-1N) 是一种公认的研究人类 MsPGN 的动物模型^[2]。给大鼠注射抗 Thy-1 抗原的抗体,该抗体能与 GMCs 表面的 Thy-1 抗原结合,形成免疫复合物后激活补体,导致炎症反应。已有文献报道,补体终末效应产物,即 C5b-9 复合物,尤其是亚溶解型 C5b-9 (sublytic C5b-9) 复合物与 Thy-1N 病变关系密切^[3]。已知 Thy-1N 早期病变的特征是:肾小球内部分 GMCs 呈现凋亡反应,同时,其细胞表面又可查见 C5b-9 的沉积^[4],提示 sublytic C5b-9 可能诱导了 GMCs 的凋亡。为了查找参与 Thy-1N 早期 GMCs 凋亡的关键基因,本课题组前期的实验已利用基因芯片检查了 Thy-1N 凋亡时相 (40 min 和 3 h 时) 肾组织基因谱系的变化,并与体外用 sublytic C5b-9 刺激 GMCs 诱导上调的基因谱系进行比对,结果发现干扰素调节因子-1 (interferon regulatory factor-1, IRF-1) 不仅芯片检查两时段上调倍数均较高,而且 real-time PCR 和 Western blot 已确证,两时段的 IRF-1 mRNA 和蛋白的表达均明显增加,且沉默 IRF-1 基因确能抑制由 sublytic C5b-9 诱导的 GMCs 凋亡。

IRF 属于众多经 IFN 诱导表达的蛋白质中的一个转录调节因子家族^[5],它是 1988 年由 Miyamoto 等^[6]从小鼠 L929 细胞株中发现的一种可结合在 IFN-β 基因启动子上的转录调节因子,目前该家族成员已超过 10 个。人的 IRF-1 基因定位于 5q31.1,编码区为 987 bp,其蛋白由 329 个氨基酸残基组成。IRF-1

的主要功能是与 IFN 及 IFN 诱导性基因中的顺式作用元件 (IRSE/IRF-E) 结合,调控 I 型 IFN 及相关基因的表达。

已知 IRF-1 调控细胞凋亡的机制十分复杂,可能涉及到不同的下游靶基因,如 NOXA、PUMA、Caspase 8 等。Wang 等^[7-8]的研究发现,IRF-1 能与 X 染色体连锁凋亡抑制蛋白相关因子 1 (X-linked inhibitor of apoptosis associated factor 1, XAF1) 基因的转录起始位点上游 -30 ~ -38 nt 区域的 IRF-E 结合,启动 XAF1 的基因转录。XAF1 是一种可以拮抗 X 染色体连锁凋亡抑制蛋白 (X-linked inhibitor of apoptosis, XIAP) 的蛋白,它可通过抑制 XIAP 对 Caspase 的作用而促进细胞凋亡^[8-9,13]。据文献报道,XAF1 在多种肿瘤细胞和组织中存在低表达或表达缺失^[9-12],XAF1 过度表达可诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤生长^[8]。本课题组前期的研究表明,大鼠 Thy-1N 及体外用 sublytic C5b-9 刺激 GMCs 后均能上调 XAF1 的表达,但有关 IRF-1 能否启动 XAF1 基因转录,进而促进 GMCs 凋亡,目前尚不清楚。正鉴于此,本实验构建了大鼠 XAF1 基因启动子 (全长和截断) 的荧光素酶报告质粒,与 IRF-1 过表达质粒共转染 293 细胞,研究 IRF-1 对 XAF1 基因的启动情况,同时筛选 IRF-1 在 XAF1 基因启动子上可能的结合区域,拟为进一步研究 XAF1 基因在 sublytic C5b-9 诱导 GMCs 病变中所起的作用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

HEK293 细胞购自美国 ATCC。pGL3-basic、pRL-SV40 荧光素酶双报告载体质粒以及双荧光素酶报告基因检测试剂盒均购自美国 Promega 公司。IRF-1 表达质粒 (pcDNA3.1-IRF-1) 由本室构建^[14]。组织基因组 DNA 提取试剂盒由北京百泰克生物技术有限公司提供。PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase

由日本 TaKaRa 公司提供。限制性内切酶 *Kpn* I、*Hind* III 和 T4 DNA 连接酶均购自美国 NEB 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

登陆 NCBI, 搜索 GenBank 数据库中的大鼠 XAF1 DNA 序列(NC_005109.2), 利用 Primer 5.0 软件辅助设计针对 XAF1 基因启动子区(-1 497 ~ +166 nt) 的引物, 然后应用 TFSearch 软件预测 XAF1 基因启动子区域全部的 IRF-1 结合位点, 并根据软件预测结果设计引物扩增启动子各截断片段。合成上下游引物时, 分别加入 *Kpn* I、*Hind* III 酶切位点序列。

1.2.2 大鼠肾组织总 DNA 的抽提及鉴定

采用组织基因组 DNA 提取试剂盒抽提大鼠肾

组织基因组 DNA, 具体操作步骤详见试剂盒说明书。应用紫外/可见分光光度仪测定总 DNA 的含量和纯度, 并通过琼脂糖凝胶电泳鉴定其 DNA 的完整性。

1.2.3 大鼠 XAF1 基因启动子序列(全长和截断)的扩增

以大鼠基因组 DNA 为模板, 应用 PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase 进行 PCR 反应, 扩增大鼠 XAF1 基因启动子序列(全长和截断)。引物序列见表 1, 其中下划线分别表示 *Kpn* I、*Hind* III 酶切位点, GG、CCC 代表保护性碱基。PCR 扩增条件如下: 98℃ 预变性 5 min, 98℃ 10 s, 55℃ 15 s, 72℃ 60 s/kb 循环 30 次后, 72℃ 最后延伸 10 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后进行割胶纯化。

表 1 扩增大鼠 XAF1 基因启动子(全长和截断)的引物序列

Table 1 The primers for rat XAF1 gene full-length and truncated promoter

名称	引物序列(5'→3')	位置
全长	上游: GGGGTACCCAGAAACGCCATTATTAG 下游: CCCAAGCTTCTTACACCAGAGCGTCCAG	-1 497 ~ +166 nt
1 号截断	上游: GGGGTACCCCAAATCTCTGAGCCTGAG 下游: CCCAAGCTTCTTACACCAGAGCGTCCAGTCCC	-554 ~ +166 nt
2 号截断	上游: GGGGTACCGAGGCAAAGCCAGTTAGA 下游: CCCAAGCTTCTTACACCAGAGCGTCCAG	-337 ~ +166 nt
3 号截断	上游: GGGGTACCTGTGCAAAGAAACAGAAA 下游: CCCAAGCTTCTTACACCAGAGCGTCC	-47 ~ +166 nt
4 号截断	上游: GGGGTACCTGAGGAGCAGACCATG 下游: CCCAAGCTTCTTACACCAGAGCGTCC	-14 ~ +166 nt

1.2.4 大鼠 XAF1 基因启动子(全长和截断)pGL3 质粒的构建与鉴定

将 pGL3-basic 和上述不同 PCR 产物用 *Kpn* I 和 *Hind* III 进行双酶切, 运用割胶法纯化线性化的 pGL3-basic 和酶切后的 PCR 产物, 再在 T4 DNA 连接酶的作用下分别行连接反应(16℃ 过夜), 将连接产物转化感受态细胞 DH5 α , 并涂布于含氨苄抗性的 LB 平板上, 37℃ 培养 14 h 后, 挑取菌落接种于 3 ml 含氨苄抗性的 LB 培养液中, 37℃ 培养过夜。取培养后的菌液(1 μ l)用上述引物分别进行 PCR 扩增, 其产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 筛选出阳性克隆质粒再送测序鉴定。最后, 将构建的重组质粒分别命名为 pGL3-XAF1-QC (全长)、pGL3-XAF1-1 (1 号截断)、pGL3-XAF1-2 (2 号截断)、pGL3-XAF1-3 (3 号截断)、pGL3-XAF1-4 (4 号截断)。

1.2.5 重组质粒转染 HEK293 细胞

将 HEK293 细胞接种于 24 孔板(1×10^5 个/孔), 培养过夜, 待细胞融合度达到 70% 时, 用 GenEscort[™] III 转染试剂将 pcDNA3.1-IRF-1、pRL-SV40 分别与 XAF1 基因启动子质粒(pGL3-XAF1-QC、pGL3-XAF1-1、pGL3-XAF1-2、pGL3-XAF1-3 或 pGL3-XAF1-4) 分别共转染 HEK293 细胞。其中 pRL-SV40 作为转染率内参照, 实验同时设转染 pGL3 空质粒(pGL3-basic) 和未转染组作为对照。

1.2.6 荧光素酶活性的测定

质粒转染 HEK293 细胞 48 h 后, 加入裂解液裂解细胞, 收集的裂解物用双荧光素酶报告基因检测试剂盒分别检测 XAF1 基因启动子全长和各截断表达质粒及内参照质粒的荧光活性, 操作步骤详见试剂盒说明书。其中, 目的基因的萤火虫荧光素酶活性标记为 M1, 内参照 pRL-SV40 质粒的海肾荧光素酶活性标记为 M2, M1/M2 即为被检测质粒的相对荧光素酶活性(RLU)。

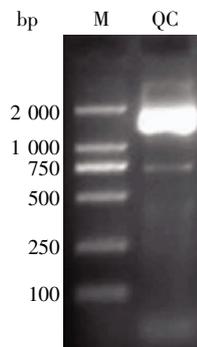
1.3 统计学处理

所得数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 软件进行方差分析和 Bonfferoni 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 XAF1 基因启动子荧光素酶报告质粒的构建与鉴定

PCR 扩增大鼠 XAF1 基因启动子全长(-1 497 ~ +166 nt)后,将其插入 pGL3-basic 质粒中。重组质粒经转化后涂布于 LB 平板,菌液 PCR 筛出阳性克隆后(图 1),送公司测序。测序结果显示其序列及插入方向均正确。表明大鼠 XAF1 基因启动子全长荧光素酶报告质粒(pGL3-XAF1-QC)已成功构建。



M: Marker; QC: pGL3-XAF1-QC 质粒菌液 PCR 扩增产物。

图 1 琼脂糖凝胶电泳

Figure 1 Agarose gel electrophoresis

2.2 IRF-1 过表达对于大鼠 XAF1 基因启动子全长活性的影响

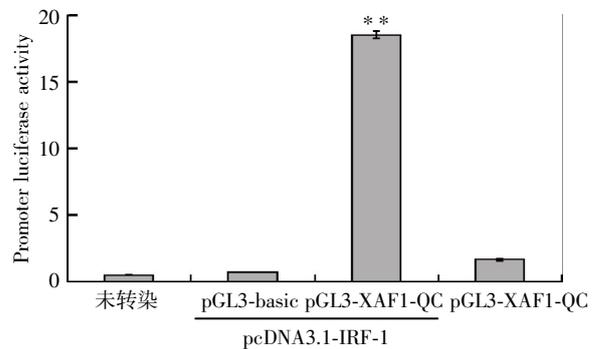
将 pGL3-XAF1-QC、pGL3-basic、pRL-SV40、pcDNA3.1-IRF-1 这 4 种质粒分别或共转染 HEK293 细胞,48 h 后裂解细胞进行双荧光素酶报告基因检测。由图 2 可见,共转染 pGL3-XAF1-QC 和 pcDNA3.1-IRF-1 的细胞,其 RLU 值显著高于单独转染 pGL3-XAF1-QC、pGL3-basic 或 pcDNA3.1-IRF-1 的细胞。提示 IRF-1 过表达能够启动 XAF1 基因的转录。

2.3 大鼠 XAF1 基因启动子(各截断)荧光素酶报告质粒的构建

2.3.1 大鼠 XAF1 基因启动子截断位置的确定

为进一步研究 XAF1 基因启动子区可能的 IRF-1 结合位点,应用生物信息学软件 TFSearch 进行了 IRF-1 结合位点的预测。结果表明,在 XAF1 基因启动子区域共含有 4 个可能的 IRF-1 结合位点,见表 2。据此设计了 4 对引物以扩增 XAF1 基因启动子各截断序列,详见表 1。设计的 XAF1 基因启动子 4 个截断的长度分别为 721 bp(-554 ~ +166 nt)、504 bp

(-337 ~ +166 nt)、217 bp(-47 ~ +166 nt)和 181 bp (-14 ~ +166 nt)。



** $P < 0.01$ vs. 未转染组、pGL3-basic+pcDNA3.1-IRF-1 组、pGL3-XAF1-QC 组。

图 2 IRF-1 对于大鼠 XAF1 基因启动子全长活性的影响

Figure 2 The effect of IRF-1 on the activity of rat XAF1 gene promoter (full-length)

表 2 TFSearch 预测的大鼠 XAF1 基因启动子区 IRF-1 结合位点

Table 2 IRF-1 binding sites within rat XAF1 gene promoter predicted by TFSearch

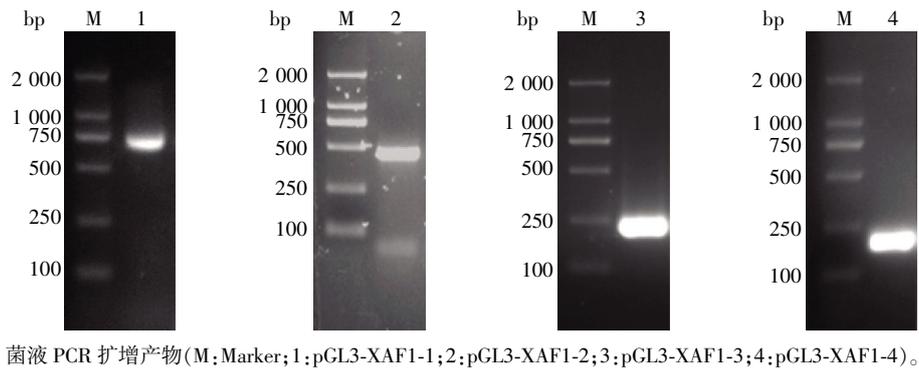
预测的 IRF-1 结合元件	位置
1	-710 ~ -699 nt
2	-476 ~ -464 nt
3	-59 ~ -47 nt
4	-40 ~ -28 nt

2.3.2 大鼠 XAF1 基因启动子(截断)荧光素酶报告质粒的构建与鉴定

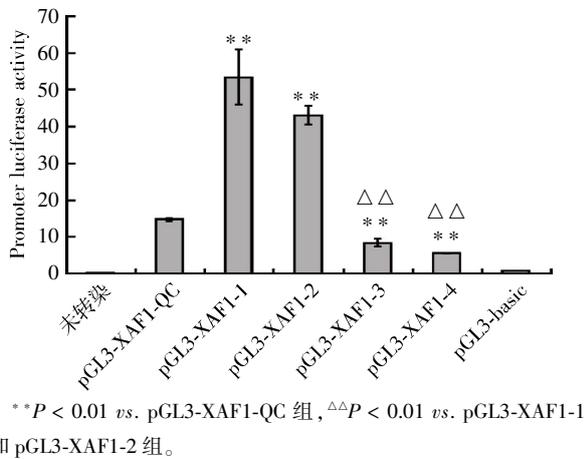
上述各截断荧光素酶报告质粒构建方法同全长,菌液 PCR 鉴定结果如图 3 所示,目的片段大小均相吻合。DNA 测序结果亦显示序列及插入方向均正确。表明大鼠 XAF1 基因启动子截断荧光素酶报告质粒已构建成功,可用于后续功能实验。

2.4 IRF-1 过表达对于大鼠 XAF1 基因启动子各截断活性的影响

将 XAF1 基因启动子全长 (pGL3-XAF1-QC)和各截断荧光素酶报告质粒(pGL3-XAF1-1、pGL3-XAF1-2、pGL3-XAF1-3、pGL3-XAF1-4) 分别与 pcDNA3.1-IRF-1 质粒共转染 HEK293 细胞,检测其荧光素酶活性。由图 4 可以看到,pGL3-XAF1-1 和 pGL3-XAF1-2 质粒转染组,其 RLU 值高于 pGL3-XAF1-QC 质粒转染组,而转染 pGL3-XAF1-3 和 pGL3-XAF1-4 质粒的细胞与转染 pGL3-XAF1-1 和 pGL3-XAF1-2 质粒组相比,其 RLU 值则显著降低。提示,在 XAF1 基因启动子上 IRF-1 的结合位点可能存在于-337 ~ -47 nt 区域。



菌液 PCR 扩增产物(M:Marker;1:pGL3-XAF1-1;2:pGL3-XAF1-2;3:pGL3-XAF1-3;4:pGL3-XAF1-4)。
图 3 各截断荧光素酶报告质粒菌液 PCR 鉴定
Figure 3 PCR identification of different truncated luciferase reporter plasmids



* $P < 0.01$ vs. pGL3-XAF1-QC 组, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs. pGL3-XAF1-1 组和 pGL3-XAF1-2 组。
图 4 IRF-1 对于大鼠 XAF1 基因启动子各截断活性的影响
Figure 4 The effects of IRF-1 on the activity of different truncated rat XAF1 gene promoter

3 讨论

大鼠 Thy-1N 病理变化类似于人类 MsPGN, 因此多年来一直被用于人类 MsPGN 的实验研究。大鼠 Thy-1N 病变具有补体依赖性, 尤其是 sublytic C5b-9 的依赖性^[15]。本课题组前期的研究已揭示, 大鼠 Thy-1N 早期, 肾小球内有 sublytic C5b-9 的沉积, 被 sublytic C5b-9 包绕的 GMCs 发生了凋亡反应, 提示, 此部分 GMCs 的凋亡可能与 sublytic C5b-9 直接刺激相关。另我们的前期实验还发现, 体外用 sublytic C5b-9 刺激 GMCs 后确可直接诱导 GMCs 凋亡。

前期的研究还表明, 在 Thy-1N 发病早期和体外用 sublytic C5b-9 刺激 GMCs 后能够增加 IRF-1 和 XAF1 基因 mRNA 和蛋白的表达。已有学者报道, IRF-1 可以结合到 XAF1 基因的启动子上, 促进 XAF1 的基因转录, 从而诱导消化道肿瘤细胞的凋亡^[7-8]。鉴于 XAF1 也可以通过 Beclin 的表达上调和 Akt 通路的抑制来诱导自体吞噬的细胞死亡^[16]。故我们推测, 在大鼠 Thy-1N 的发病中, sublytic C5b-9

刺激 GMCs 后, 可能也会经过 IRF-1 直接作用于 XAF1 基因启动子区域进而激活 XAF1 基因转录。

荧光素酶报告基因常用于检测启动子与反式作用元件的相互作用及其对靶基因表达的影响。因此, 将所要研究的目的基因的启动子序列克隆到报告基因表达载体中, 然后再将重组质粒导入适当的细胞中, 通过检测荧光素酶报告基因可反映插入片段的启动子活性。本实验所采用的 pGL3-basic 报告基因质粒无启动子和增强子, 故插入 XAF1 基因启动子后, 可通过报告基因的表达来测定其启动子活性。而在此过程中, 用含有海肾荧光素酶的 pRL-SV40 质粒作为内参照, 能消除转染效率的影响。

为了研究 IRF-1 启动 XAF1 基因转录的作用, 本实验构建了大鼠 XAF1 基因启动子全长荧光素酶报告质粒(pGL3-XAF1-QC)。将大鼠野生型 IRF-1 表达质粒(peDNA3.1-IRF-1)与 pGL3-XAF1-QC 质粒共转染 HEK293 细胞, 检测各组细胞荧光素酶活性。结果发现, 将 pGL3-XAF1-QC 转染 HEK293 细胞后, 其荧光素酶活性虽高于转染 pGL3-basic 的细胞, 但其活性仍然较低, 而将 pGL3-XAF1-QC 与 peDNA3.1-IRF-1 共转染后, 其荧光素酶活明显增强。提示 IRF-1 作为转录因子能够启动 XAF1 基因的转录。

已有研究发现, 人 XAF1 基因启动子序列-30 ~ -38 nt 存在 IRF-1 结合元件^[17]。为了确定大鼠 IRF-1 与 XAF1 基因启动子的结合区域, 我们先通过 TF-Search 软件预测了大鼠 XAF1 基因启动子上存在的 4 个 IRF-1 可能的结合位点, 并据此设计构建了 XAF1 基因启动子(截断)荧光素酶报告质粒, 即 pGL3-XAF1-1, pGL3-XAF1-2, pGL3-XAF1-3 和 pGL3-XAF1-4, 随后将 pGL3-XAF1-QC, pGL3-XAF1-1, pGL3-XAF1-2, pGL3-XAF1-3 和 pGL3-XAF1-4 分别与 peDNA3.1-IRF-1 共转染 HEK293 细胞, 测定各组

细胞荧光素酶活性。结果发现,pGL3-XAF1-1 启动子活性显著高于 pGL3-XAF1-QC,提示 pGL3-XAF1-1 与 pGL3-XAF1-QC 相比,可能截去了一个转录抑制元件。而 pGL3-XAF1-3 的启动子活性明显低于 pGL3-XAF1-2 和 pGL3-XAF1-QC,提示,pGL3-XAF1-3 与 pGL3-XAF1-2 相比,可能截去了一个 IRF-1 结合元件,而此元件存在于大鼠 XAF1 基因启动子上-337 ~ -47 nt 区域,这与先前在人肿瘤细胞中的发现有所不同。不过,具体的结合元件仍有待于染色质免疫沉淀技术(chromatin immunoprecipitation,ChIP)和突变实验进行确证。

综上所述,本实验成功构建了大鼠 XAF1 基因启动子(全长)荧光素酶质粒,并证实过表达 IRF-1 可促进 XAF1 基因启动。与此同时,根据软件预测的 IRF-1 结合位点,设计并构建了不同截断的大鼠 XAF1 基因启动子荧光素酶报告质粒,另在 HEK293 细胞中探讨了 IRF-1 对大鼠 XAF1 基因启动子的激活作用,初步筛出了其可能的结合区域,这为今后进一步研究 sublytic C5b-9 刺激 GMCs 后,XAF1 基因表达及其可能的启动机制提供了有用的实验材料。

[参考文献]

- [1] Alexopoulos E. Treatment of primary IgA nephropathy[J]. *Kidney Int*,2004,65(1):341-355
- [2] Nazeer K,Janech MG,Lin JJ,et al. Changes in protein profiles during course of experimental glomerulonephritis [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*,2009,296 (1):F186-193
- [3] Stangou M,Alexopoulos E,Pantzaki A,et al. C5b-9 glomerular deposition and tubular alpha3beta1-integrin expression are implicated in the development of chronic lesions and predict renal function outcome in immunoglobulin A nephropathy [J]. *Scand J Urol Nephrol*,2008,42(4):373-380
- [4] Qiu W,Che N,Feng XF,et al. Apoptosis of glomerular mesangial cells induced by sublytic C5b-9 complexes in rats with Thy-1 nephritis is dependent on Gadd45gamma upregulation[J]. *Eur J Immunol*,2009,39(11):3251-3266
- [5] Tamura T,Yanai H,Savitsky D,et al. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis [J]. *Annu Rev Immunol*,2008,26:535-584
- [6] Miyamoto M,Fujita T,Kimura Y,et al. Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor,IRF-1,that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements [J]. *Cell*,1988,54(6):903-913
- [7] Wang J,Peng Y,Sun YW,et al. All-trans retinoic acid induces XAF1 expression through an interferon regulatory factor-1 element in colon cancer [J]. *Gastroenterology*,2006,130(3):747-758
- [8] Plenchette S,Cheung HH,Fong WG,et al. The role of XAF1 in cancer [J]. *Curr Opin Investig Drugs*,2007,8 (6):469-476
- [9] Tu SP,Sun YW,Cui JT,et al. Tumor suppressor XIAP-Associated factor 1 (XAF1) cooperates with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand to suppress colon cancer growth and trigger tumor regression [J]. *Cancer*,2010,116(5):1252-1263
- [10] Xing Z,Zhou Z,Yu R,et al. XAF1 expression and regulatory effects of somatostatin on XAF1 in prostate cancer cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*,2010,29(1):162-169
- [11] Huang J,Yao WY,Zhu Q,et al. XAF1 as a prognostic biomarker and therapeutic target in pancreatic cancer[J]. *Cancer Sci*,2010,101(2):559-567
- [12] Tu SP,Liston P,Cui JT,et al. Restoration of XAF1 expression induces apoptosis and inhibits tumor growth in gastric cancer[J]. *Int J Cancer*,2009,125(3):688-697
- [13] Liston P,Feng WG,Kelly NL,et al. Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP antiCaspase activity[J]. *Nat Cell Biol*,2001,3(2):128-133
- [14] 刘丽莎,刘 焯,邱 文,等. 大鼠野生型 IRF-1 基因和 IRF-1 shRNA 真核表达质粒的构建及鉴定[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2010,30(2):174-178
- [15] 佟建霞,王迎伟,邱 文,等. 亚溶解剂量的补体 C5b-9 复合物诱导肾小球系膜细胞增生及其 NF- κ B 活化的作用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2006,26(4):230-233
- [16] Sun PH,Zhu LM,Qiao MM,et al. The XAF1 tumor suppressor induces autophagic cell death via upregulation of Beclin-1 and inhibition of Akt pathway [J]. *Cancer Letters*,2011,310(2):170-180
- [17] 师雷锋,高春芳,徐迪辉,等. 肿瘤抑制基因 XAF1 启动子序列中活性 IRF-1 作用元件的鉴定 [J]. *解放军医学杂志*,2008,33(4):388-390

[收稿日期] 2011-11-30