

大鼠 Caspase 8 基因启动子荧光素酶报告质粒的构建及其与 IRF-1 结合位点的鉴定

单 锴,邱 文,李 妍,周建博,刘丽莎,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 Caspase 8 基因启动子(全长和截短)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 Caspase 8 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 Caspase 8 基因启动子序列(-1136~+101 nt),将 Caspase 8 基因启动子插入到荧光素酶报告基因载体 pGL3-basic 中。将 Caspase 8 基因启动子全长荧光素酶报告质粒(pGL3-Caspase 8-FL)和大鼠野生型 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 Caspase 8 基因的启动作用。另用生物信息学软件预测 Caspase 8 基因启动子上 IRF-1 潜在的结合位点,并构建 Caspase 8 基因启动子截短的荧光素酶报告质粒(即 pGL3-Caspase 8-1~4)。将上述 Caspase 8 基因启动子全长和各截短的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-Caspase 8-FL 和 pcDNA3.1-IRF-1 共转染 HEK293 细胞发现,Caspase 8 基因启动子活性显著增加。而将 pGL3-Caspase 8-FL、pGL3-Caspase 8-1~4 和 pcDNA3.1-IRF-1 共转染 HEK293 细胞后证实,pGL3-Caspase 8-4 的启动活性显著低于 pGL3-Caspase 8-2 和 pGL3-Caspase 8-3。提示 IRF-1 可能结合在 Caspase 8 基因启动子的-336~-136 nt 区域。**结论:**本实验成功构建了大鼠 Caspase 8 基因启动子全长及截短荧光素酶报告质粒,并初步筛查出 IRF-1 在 Caspase 8 基因启动子上的结合区域。

[关键词] Caspase 8;干扰素调节因子-1;荧光素酶报告质粒;启动子活性

[中图分类号] R392.21

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)03-291-06

doi:10.7655/NYDXBNS20130301

Construction of rat Caspase 8 promoter and identification of its binding sequence with IRF-1

Shan Kai, Qiu Wen, Liu Lisha, Li Yan, Zhou Jianbo, Zhao Dan, Wang Yingwei*

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

[Abstract] **Objective:**To construct luciferase reporter plasmids of full-length and truncated promoters of rat Caspase 8 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 Caspase 8 promoter (-1136~+101 nt) was amplified by PCR and cloned into the luciferase reporter plasmid (pGL3-basic). The recombinant plasmid (pGL3-Caspase 8-FL) and rat interferon regulatory factor-1 (IRF-1) expression plasmid (pcDNA3.1-IRF-1) were co-transfected into HEK-293 cells and then the luciferase activity was detected to determine the role of IRF-1 in Caspase 8 gene transcription. Meanwhile, the potential IRF-1 binding sites within Caspase 8 promoter were predicted by bioinformatics software. Based on the predicted results, different luciferase reporter plasmids of truncated Caspase 8 gene promoter that named pGL3-Caspase 8-1~4 were constructed. The promoter luciferase reporter plasmids of pGL3-Caspase 8-FL or pGL3-Caspase 8-1~4 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-Caspase 8-FL and pcDNA3.1-IRF-1 were also co-transfected into HEK293 cells, and then the luciferase activity was detected. The results showed that the transcriptional activity of Caspase 8 gene was increased markedly in response to IRF-1 overexpression. In addition, the plasmids of pGL3-Caspase 8-FL or pGL3-Caspase 8-1~4 and pcDNA3.1-IRF-1 were co-transfected into HEK293 cells, and then the luciferase activity in different groups was determined. The re-

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30772016, 81072402, 81273333)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wangyw1508@njmu.edu.cn

sult displayed that the activity of pGL3-Caspase 8-4 was much lower than that in pGL3-Caspase 8-2 and pGL3-Caspase 8-3, indicating that the region of rat Caspase 8 promoter (-336~-136 nt) might contain IRF-1 binding element. **Conclusion:** The rat full-length and truncated rat Caspase 8 promoter luciferase reporter plasmids were constructed successfully, and the IRF-1 binding region was identified.

[Key words] Caspase 8; interferon regulatory factor-1 (IRF-1); luciferase reporter plasmid; promoter activity

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(3): 291-296]

大鼠 Thy-1 肾炎 (Thy-1 nephritis, Thy-1N) 是一种公认的研究人类系膜增生性肾小球肾炎 (mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN) 的动物模型^[1]。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^[2]。已知 Thy-1N 早期病变的特征是: 肾小球内部分系膜细胞 (glomerular mesangial cells, GMCs) 呈现凋亡反应的同时, 其细胞表面可查见 C5b-9 的沉积^[3]。为了查找参与 Thy-1N 早期 GMCs 凋亡的关键基因, 本课题组前期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, 而且通过 real-time PCR 和 Western blot 已确证, 上述两时段的 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 属于众多经干扰素 (IFN) 诱导表达的蛋白质中的一个转录调节因子家族^[4], 目前该家族成员已超过 10 个。业已发现, IRF-1 除了能与 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 及相关基因的表达外, 还参与了细胞周期, 肿瘤抑制和细胞凋亡等多种细胞事件^[5-6]。

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。有研究报道, IRF-1 表达的降低在裸鼠中可以使 Caspase 8 的活性显著降低^[7]。另外, IRF-1 与 IRF-2 能通过 Caspase 8 启动子上的 IFN 反应元件活化 Caspase 8 的转录^[8]。Caspase 8 是半胱氨酸蛋白酶家族成员之一, 参与了多种细胞的凋亡和细胞因子的产生。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 Caspase 8 的表达, 但在大鼠 Thy-1N 中, IRF-1 能否通过启动 Caspase 8 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 Caspase 8 基因启动子 (全长和

截短) 的荧光素酶报告质粒, 与 IRF-1 过表达质粒共转染 HEK293 细胞, 研究 IRF-1 对 Caspase 8 基因的启动情况, 同时筛选 IRF-1 在 Caspase 8 基因启动子上可能的结合区域, 拟为进一步研究 Caspase 8 基因在 sublytic C5b-9 诱导 GMCs 凋亡中所起的作用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

HEK293 细胞 (ATCC 公司, 美国)。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 (Promega 公司, 美国)。IRF-1 表达质粒 (pcDNA3.1-IRF-1) 由本室构建^[9]。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 (NEB 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

登陆 NCBI, 搜索 GenBank 数据库中的大鼠 Caspase 8 DNA 序列 (NC_005108.3), 利用 Primer 5.0 软件辅助设计针对 Caspase 8 基因启动子区 (-1136~+101 nt) 的引物, 然后应用 TFSearch 软件预测 Caspase 8 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短片段。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 Caspase 8 基因启动子序列 (全长和截短) 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 Caspase 8 基因启动子序列 (全长和截短)。引物序列

见表 1,其中下划线分别表示 *Kpn* I、*Hind* III 酶切位点, GCGC 代表保护性碱基。

表 1 扩增大鼠 Caspase 8 基因启动子(全长和截短)的引物序列

Table 1 The primers for rat Caspase 8 gene full-length and truncated promoter

| 名称 | 引物序列 | 位置(nt) |
|-------|---|---------------|
| 全长 | 上游:5'-GCGCGGTACCCCTTGGCTTGTGTCA-3' 下游:5'-GCGCAAGCTTTCTTCTGCGGGATGT-3' | -1 136 ~ +101 |
| 1 号截短 | 上游:5'-GCGCGGTACCACTGGACAGGTCTGTG-3' 下游:5'-GCGCAAGCTTTCTTCTGCGGGATGT-3' | -936 ~ +101 |
| 2 号截短 | 上游:5'-GCGCGGTACCGACTCTATAAGCTATA-3' 下游:5'-GCGCAAGCTTTCTTCTGCGGGATGT-3' | -736 ~ +101 |
| 3 号截短 | 上游:5'-GCGCGGTACCCACTTTTCTTTAAGA-3' 下游:5'-GCGCAAGCTTTCTTCTGCGGGATGT-3' | -336 ~ +101 |
| 4 号截短 | 上游:5'-GCGCGGTACTCTAAAGTCTTGAA-3' 下游:5'-GCGCAAGCTTTCTTCTGCGGGATGT-3' | -136 ~ +101 |

1.2.4 大鼠 Caspase 8 基因启动子(全长和截短) 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菌 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。取培养后的菌液(1 μ l)用上述引物分别进行 PCR 扩增,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-Caspase 8-FL(全长)、pGL3-Caspase 8-1(1 号截短)、pGL3-Caspase 8-2(2 号截短)、pGL3-Caspase 8-3(3 号截短)、pGL3-Caspase 8-4(4 号截短)。

1.2.5 重组质粒转染 HEK293 细胞

将 HEK293 细胞接种于 24 孔板中(1 \times 10⁵/个孔)培养,待细胞融合度达到 70%时,用 GenEscort™ III 转染试剂将 pcDNA3.1-IRF-1、pRL-SV40 分别与上述 5 种 Caspase 8 基因启动子质粒分别共转染 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。实验重复 3 次,每次 3 个复孔。

1.2.6 荧光素酶活性的测定

质粒转染 HEK293 细胞 48 h 后,收集细胞裂解物用双荧光素酶报告基因检测试剂盒分别检测上述 Caspase 8 基因启动子质粒的荧光活性,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)。

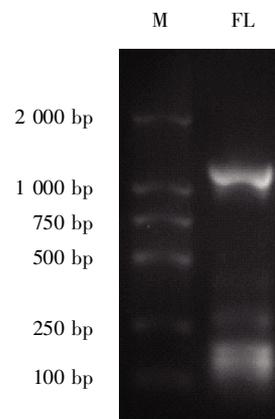
1.3 统计学方法

所得数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS17.0 软件进行方差分析和 Bonferroni 检验, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 Caspase 8 基因启动子荧光素酶报告质粒的构建与鉴定

PCR 扩增大鼠 Caspase 8 基因启动子全长(-1136 ~ +101 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。结果显示,其序列及插入方向均正确。表明大鼠 Caspase 8 基因启动子全长荧光素酶报告质粒已成功构建(命名为 pGL3-Caspase 8-FL)。



M:Marker;FL:pGL3-Caspase 8-FL 质粒菌液 PCR 扩增产物。

图 1 琼脂糖凝胶电泳

Figure 1 Agarose gel electrophoresis

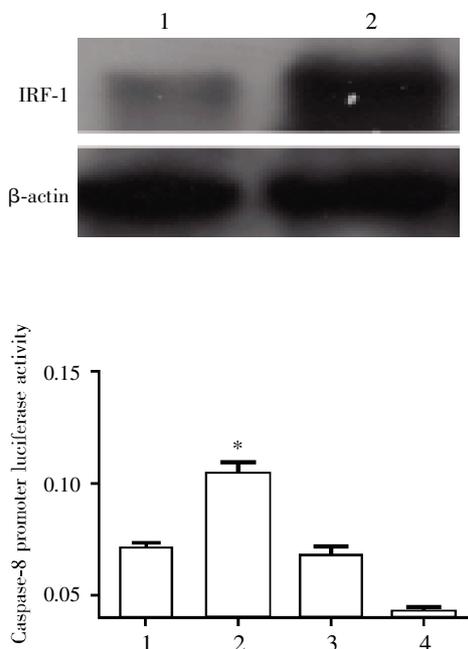
2.2 IRF-1 过表达对于大鼠 Caspase 8 基因启动子全长活性的影响

将 pGL3-Caspase 8-FL、pGL3-basic、pcDNA-IRF-1 3 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-Caspase 8-FL 和 pcDNA-IRF-1 的细胞,IRF-1 表达量明显高于阴性对照组,其 RLU 值显著高于转染 pCDNA3.1、pGL3-basic 或 pAL3-Caspase 8,-FL 与 pcDNA3.1 的共转染细胞,提示,IRF-1 过表达能够启动 Caspase 8 基因的转录。

2.3 大鼠 Caspase 8 基因启动子(各截短)荧光素酶报告质粒的构建

2.3.1 大鼠 Caspase 8 基因启动子截短位置的确定

为进一步研究 Caspase 8 基因启动子区 IRF-1 可能的结合位点,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 Caspase 8 基因启动子区域共含有 4 个可能的 IRF-1 结合位点(表 2)。设计的 Caspase 8 基因启动子 4 个截短的长度分别为 1 038 bp(-936~+101 nt)、838 bp(-736 ~ +101 nt)、438 bp(-336 ~ +101 nt)和 238 bp(-136 ~ +101 nt)。



1: pGL3-Caspase 8-FL+pcDNA3.1 质粒; 2: pGL3-Caspase-8-FL+pcDNA-IRF-1 质粒; 3: pcDNA3.1 质粒; 4: pGL3-basic 质粒。与 1、3、4 组比较 *P < 0.01。

图 2 IRF-1 对大鼠 Caspase 8 基因启动子全长活性的影响
Figure 2 The effect of IRF-1 on the activity of rat Caspase 8 gene promoter (full-length)

表 2 TFSearch 预测的大鼠 Caspase 8 基因启动子区 IRF-1 结合位点

Table 2 IRF-1 binding sites within rat Caspase 8 gene promoter predicted by TFSearch

| 预测的 IRF-1 结合元件 | 位置(nt) |
|----------------|---------------|
| 1 | -1136 ~ -1086 |
| 2 | -785 ~ -735 |
| 3 | -635 ~ -605 |
| 4 | -335 ~ -305 |

2.3.2 大鼠 Caspase 8 基因启动子(截短)荧光素酶报告质粒的构建与鉴定

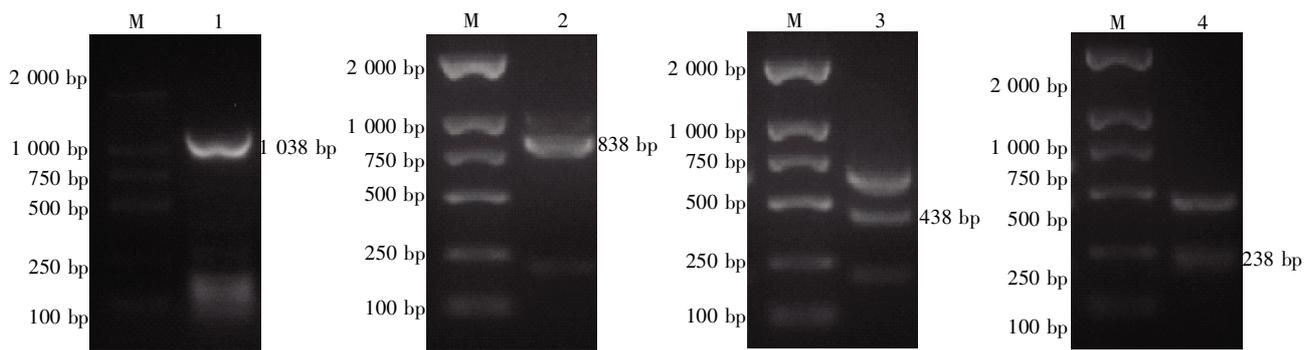
上述各截短荧光素酶报告质粒构建方法同全长,菌液 PCR 鉴定结果如图 3 所示,目的片段大小均相吻合。DNA 测序结果亦显示,序列及插入方向均正确。表明大鼠 Caspase 8 基因启动子截短荧光素酶报告质粒已构建成功。

2.4 IRF-1 过表达对于大鼠 Caspase 8 基因启动活性的影响

将 Caspase 8 基因启动子全长(pGL3-Caspase 8-FL)和各截短荧光素酶报告质粒(pGL3-Caspase 8-1、pGL3-Caspase 8-2、pGL3-Caspase 8-3 和 pGL3-Caspase 8-4) 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 可见, pGL3-Caspase 8-FL、pGL3-Caspase 8-1、pGL3-Caspase 8-2、pGL3-Caspase 8-3、pGL3-Caspase 8-4 质粒转染组,其 RLU 值均高于 pGL3-basic 质粒转染组,而转染 pGL3-Caspase 8-1 和 pGL3-Caspase 8-4 质粒细胞的 RLU 值与转染 pGL3-Caspase 8-FL、pGL3-Caspase 8-2 和 pGL3-Caspase 8-3 质粒组相比,其 RLU 值显著降低。而转染 pGL3-Caspase 8-1 质粒组,荧光素酶活性虽然有显著性下降,但由于之后的截短存在明显的回复,其中可能还有别的机制,将在后文加以探讨。上述结果提示,在 Caspase 8 基因启动子上 IRF-1 的结合位点可能存在于-136~+101 nt 区域。

3 讨论

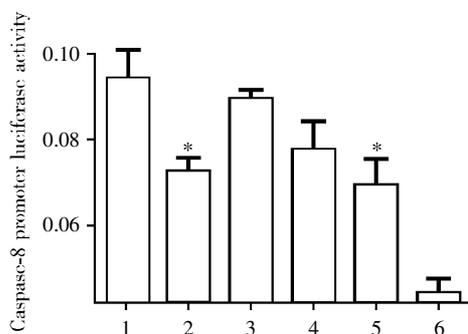
大鼠 Thy-1N 病理变化类似于人类 MsPGN,因此多年来一直被用于人类 MsPGN 的实验研究。大鼠 Thy-1N 病变具有补体依赖性,尤其是 sublytic C5b-9 的依赖性^[10]。本课题组前期的研究已揭示,在 Thy-1N 发病早期和体外用 sublytic C5b-9 刺激 GM-Cs 后能够增加 IRF-1 和 Caspase 8 基因 mRNA 和蛋白的表达。有学者报道,IRF-1 能结合到 Caspase 8



M:marker; 1:pGL3-Caspase 8-1 质粒; 2:pGL3-Caspase 8-2 质粒; 3:pGL3-Caspase 8-3 质粒; 4:pGL3-Caspase 8-4 质粒。

图 3 各截短荧光素酶报告质粒菌液 PCR 鉴定

Figure 3 PCR identification of different truncated luciferase reporter plasmids



1:pGL3-Caspase 8-FL 质粒; 2:pGL3-Caspase-8-1 质粒; 3:pGL3-Caspase 8-2 质粒; 4:pGL3-Caspase-8-3 质粒; 5:pGL3-Caspase-8-4 质粒; 6:pGL3-basic 质粒。与 1、3、4 组比较, * $P < 0.05$ 。

图 4 IRF-1 过表达对于大鼠 Caspase 8 基因启动子各截短活性的影响

Figure 4 The effects of IRF-1 overexpression on the activity of different truncated rat Caspase 8 gene promoter

基因的启动子区域,促进 Caspase 8 的基因转录,从而诱导细胞的凋亡^[7-8]。由于 Caspase-8 是死亡受体介导的凋亡途径中关键的启动子,能够通过寡聚而自身切割活化,并能激活下游 Caspase,产生凋亡效应^[11]。故本文推测,在大鼠 Thy-1N 的发病中,sublytic C5b-9 刺激 GMCs 后,可能也会经过上调 IRF-1 作用于 Caspase 8 基因启动子区域进而激活 Caspase 8 基因的转录,最终导致 GMCs 的早期凋亡。

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。由于荧光素酶报告质粒编码的萤火虫荧光素酶上游没有其转录所需的启动子与增强子,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,借用目的基因的启动子启动萤火虫荧光素酶,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。为了

研究 IRF-1 对 Caspase 8 基因转录的启动作用,本实验构建了大鼠 Caspase 8 基因启动子全长荧光素酶报告质粒(pGL3-Caspase 8-FL)。将大鼠野生型 IRF-1 表达质粒(pcDNA3.1-IRF-1)与 pGL3-Caspase 8-FL 质粒共转染 HEK-293 细胞,检测各组细胞荧光素酶活性。结果发现,将 pGL3-Caspase 8-FL 与 pcDNA3.1-IRF-1 共转染后,其荧光素酶活性明显强于 pGL3-basic 对照组,提示 IRF-1 作为转录因子能够启动 Caspase 8 基因的转录。

已有研究发现,IRF-1 可以促进人 Caspase 8 基因的表达^[12],其机制为 IRF-1 能与 Caspase 8 启动子区的 ISRE 结合,启动 Caspase 8 的转录^[8,13]。为了确定大鼠 IRF-1 与 Caspase 8 基因启动子的结合区域,我们先通过 TFSearch 软件预测出了 Caspase 8 基因启动子上含有 4 个 IRF-1 的结合位点,并据此设计构建了 Caspase 8 基因启动子(截短)荧光素酶报告质粒,即 pGL3-Caspase 8-1、pGL3-Caspase 8-2、pGL3-Caspase 8-3、pGL3-Caspase 8-4,随后将这几种质粒(包括全长质粒)分别与 pcDNA3.1-IRF-1 共转染 HEK-293 细胞,再测定各组细胞荧光素酶活性。结果发现,pGL3-Caspase 8-1 与 pGL3-Caspase 8-4 的荧光素酶活性明显低于其他各组。pGL3-Caspase 8-4 荧光素酶活性的降低提示,该截短去除了 Caspase 8 的 IRF-1 结合区域,表明 IRF-1 在 Caspase 8 启动子上的结合区域可能位于-336~-136 nt 的区域内。然而,实验还发现 pGL3-Caspase 8-1 的荧光素酶启动活性也有显著的降低,由于 pGL3-Caspase 8-1 的荧光素酶启动子活性也有明显的降低,但之后的截短(pGL3-Caspase 8-2 和 pGL3-Caspase 8-3)的荧光素酶活性出现了回复,故本文认为这种现象可能存在两种原因:①1 号截短可能影响了 Caspase 8 启动子

区域的核酸二级结构,可能影响了 IRF-1 的结合;② -1136 ~ -936 nt 区域内或许存在着 Caspase 8 启动子的活化元件,但是-936 ~ -736 的区域内可能存在着 Caspase 8 的抑制性元件。鉴于有文献报道, Caspase 8 启动子的-151 ~ +16 nt 区域可以与 IRF-1 结合^[8],这与本实验验证的-336~ -136 nt 区域存在一定程度的交叉。不过, Caspase 8 与 IRF-1 的具体的结合元件仍有待于通过染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation assay, ChIP) 和突变实验进行确定。

综上所述,本实验成功构建了大鼠 Caspase 8 基因启动子(全长)荧光素酶质粒,并证实过表达 IRF-1 可促进 Caspase 8 基因的启动。与此同时,根据软件预测的 IRF-1 结合位点,设计并构建了不同的大鼠 Caspase 8 基因启动子(截短)荧光素酶报告质粒,另在 HEK293 细胞中探讨了 IRF-1 过表达对大鼠 Caspase 8 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, Caspase 8 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] 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
- [2] 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
- [3] 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
- [4] 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
- [5] Romeo G, Fiorucci G, Chiantore MV, et al. IRF-1 as a negative regulator of cell proliferation [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2002, 22(1): 39-47
- [6] Ekwuagu C, Li W, Yu C, et al. Interferon- γ induces regression of epithelial cell carcinoma; Critical roles of IRF-1 and ICSBP transcriptional factors [J]. *Oncogene*, 2006, 25 (26): 3670-3679
- [7] Bouker KB, Skaar TC. Interferon regulatory factor-1 (IRF-1) exhibits tumor suppressor activities in breast cancer associated with caspase activation and induction of apoptosis [J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26(9): 1527-1535
- [8] Casciano I, De Ambrosio A, Croce M, et al. Expression of the caspase-8 gene in neuroblastoma cells is regulated through an essential interferon-sensitive response element (ISRE) [J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11(1): 131-134
- [9] 刘丽莎, 刘 忻, 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
- [10] 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(2): 230-233
- [11] Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, et al. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation [J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14(1): 44-55
- [12] Ruiz-Ruiz C, Ruiz de Almodóvar C, Rodríguez A, et al. The Up-regulation of human Caspase-8 by interferon- γ in breast tumor cells requires the induction and action of the transcription factor interferon regulatory factor-1 [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(19): 19712-19720
- [13] Ehrhardt H, Wachter F, Maurer M, et al. Important Role of Caspase-8 for Chemosensitivity of ALL Cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(24): 7605

[收稿日期] 2012-11-29