

专  
家  
介  
绍

周红文,女,南京医科大学第一附属医院内分泌科主任医师,教授,博士生导师,江苏省第四期“333 高层次人才培养对象”、江苏省六大人才高峰培养对象、兴卫工程医学重点人才、江苏省卫生拔尖人才、江苏省医学会糖尿病分会委员。主持多项国家自然科学基金及江苏省自然科学基金;发表 SCI 论文 10 余篇及国内核心期刊论文 50 余篇。获江苏省卫生厅新技术引进一等奖、南京市科技进步三等奖。主要研究方向:肥胖、糖尿病及代谢病发病机制。

## 免疫细胞在脂肪组织炎症中的调控作用

马祎喆,周红文\*

(南京医科大学第一附属医院内分泌科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 越来越多的研究证明,脂肪组织炎症在肥胖相关代谢性疾病中发挥重要作用。脂肪组织不但是储能器官,能够供应机体能量消耗,还是人体最大的内分泌器官,分泌多种脂肪因子作用于人体其他器官,参与各种生理过程。脂肪组织由脂肪细胞、免疫细胞、内皮细胞及成纤维细胞组成,其中免疫细胞在正常生理状态下维持脂肪组织抗炎平衡状态。病态肥胖状态下这种平衡被打破,脂肪组织中促炎性巨噬细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞、辅助性 T 细胞 1、树突状细胞、肥大细胞数量增加,抑炎性辅助性 T 细胞 2、调节性 T 细胞、嗜酸性粒细胞数量减少,导致脂肪组织处于炎症状态。这种脂肪组织炎症与糖尿病、心血管疾病、脂肪肝等多种疾病的发生相关。文章拟概述免疫细胞在脂肪组织炎症中的调控作用,讨论以脂肪组织免疫细胞为靶点改善脂肪组织炎症的相关研究,揭示脂肪组织免疫细胞是肥胖相关代谢紊乱的潜在治疗靶点。

**[关键词]** 脂肪组织炎症;免疫细胞;巨噬细胞;T 淋巴细胞;树突状细胞;肥大细胞;嗜酸性粒细胞

**[中图分类号]** R589.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)01-019-07

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20160105

## Immune cells in adipose tissue inflammation

Ma Yizhe, Zhou Hongwen\*

(Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** Accumulating evidence showed that adipose inflammation plays an important role in obesity-associated metabolic disorders. As known, adipose tissue acts not only as an energy organ but also an endocrine organ, mainly consisting of fat cells, immune cells and other cells. Almost all of the immune cells participate in adipose inflammation, some of which are pro-inflammatory and others are anti-inflammatory. This review will summarize the participants in adipose inflammation, such as macrophages, T lymphocytes, dendritic cells, mast cells, eosinophils, and focus on the therapeutic potential of these adipose tissue immune cells in protecting from inflammation and obesity-related metabolic diseases will be discussed.

**[Key words]** adipose tissue inflammation; immune cells; macrophages; T lymphocytes; dendritic cells; mast cells; eosinophils

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(01): 019-025]

众所周知,肥胖是一种慢性炎症状态。它常伴有脂肪组织的大量堆积,容易引起各种并发症,加速衰老和死亡。以往人们认为脂肪组织是单纯的储

能器官,主要由大量群集的脂肪细胞构成,脂肪细胞的主要功能是合成、转运和储存甘油三酯,释放游离脂肪酸入血,以供其他组织的能量需要。根据是否能够产热,脂肪组织可以分为白色脂肪组织、棕色脂肪组织。白色脂肪组织广泛分布在体内皮下组织和内脏周围,主要功能是将体内过剩的能量以

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

中性脂肪的形式储存起来,以供机体使用,是体内脂肪的主要储存形式。棕色脂肪组织在人类仅存在于婴幼儿期,主要分布于肩胛骨间、颈背部、腋窝、纵隔及肾脏周围,通过细胞内脂肪酸的非耦联氧化磷酸化分解产热。最近研究发现白色脂肪组织在寒冷刺激下会变成米色脂肪组织。成年人的棕色脂肪组织其实是米色脂肪组织,主要存在于颈部、锁骨上以及脊柱旁<sup>[1]</sup>。脂肪组织还是人体最大的内分泌器官,能够分泌大量细胞因子、炎症因子、激素、血管紧张素原、代谢产物及脂类,通过旁分泌和自分泌发挥作用,参与人体生理和病理过程<sup>[2]</sup>。

近来研究证明,脂肪组织还是一个免疫器官,包含有巨噬细胞、T 细胞、B 细胞、肥大细胞、树突状细胞及中性粒细胞等多种免疫细胞<sup>[3]</sup>。在正常生理状态下,这些免疫细胞维持脂肪组织抗炎平衡状态。肥胖状态下,这种平衡状态被打破。促炎性巨噬细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞、辅助性 T 细胞 1(Th1)细胞数量增加,分泌大量白介素(IL)-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )等促炎性细胞因子。负责抑制炎症的调节性 T 细胞、辅助性 T 细胞 2(Th2)、嗜酸性粒细胞数量减少,分泌 IL-10、IL-4 等抑炎性细胞因子功能减退,甚至分泌促炎性细胞因子,导致脂肪组织炎症状态的发生。

脂肪组织炎症已被证明与胰岛素抵抗、2 型糖尿病、高脂血症、脂肪肝、心血管疾病甚至癌症恶病质的发生密切相关<sup>[4-7]</sup>,所以了解脂肪组织炎症的发生发展过程至关重要。虽然肥胖炎症的触发机制还不清楚,但研究已经证明脂肪组织免疫细胞数量比例失衡、功能变化在脂肪组织炎症中起重要作用。本文围绕参与内脏脂肪组织炎症过程的巨噬细胞、T 淋巴细胞、树突状细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞的相关研究,对以其中几种免疫细胞为靶点治疗肥胖相关代谢性疾病的研究进行讨论,揭示免疫细胞在脂肪组织炎症调控中的重要意义。

## 1 参与脂肪组织炎症的细胞

### 1.1 脂肪组织巨噬细胞

#### 1.1.1 巨噬细胞的分类

巨噬细胞是髓细胞的一种,通常表达 CD11b、CD14、CD16 及 CD68 等表面分子,主要通过吞噬和消化作用参与机体免疫防御。骨髓源性巨噬细胞在不同刺激下能够表现出两种相反的表型:①M1 型巨噬细胞:由脂多糖和 IFN- $\gamma$  刺激激活,具有促进炎症的功能,主要分泌 TNF- $\alpha$ 、IL-12 和 IL-6,特异性表

达 CD11c、CD40 等表面分子;②M2 型巨噬细胞:可由 IL-4 和 IL-13 刺激激活,具有抗炎性,可以分泌 IL-10、IL-4 等抗炎性细胞因子和精氨酸酶 1,特异性表达表面分子 CD206、CD209、CD301<sup>[8-9]</sup>。巨噬细胞也在脂肪组织炎症中发挥重要作用,并一度被认为是脂肪组织炎症的主要参与者。

#### 1.1.2 脂肪组织巨噬细胞参与炎症

研究者们发现瘦素基因敲除的肥胖小鼠脂肪组织中含有大量巨噬细胞,这些巨噬细胞呈冠状结构分布于坏死的脂肪细胞周围,负责清除细胞残片和脂解作用产生的游离脂滴<sup>[10]</sup>。肥胖状态下,脂肪组织巨噬细胞数量与体重指数(BMI)、脂肪细胞大小呈正相关,并且是肥胖状态下检测到的循环炎症标志物 TNF- $\alpha$  的主要来源<sup>[11]</sup>,表明这类细胞是脂肪组织炎症的重要参与者。

#### 1.1.3 脂肪组织巨噬细胞的功能

脂肪组织巨噬细胞分泌 TNF- $\alpha$ 、IL-6、单核细胞趋化因子(MCP-1)等炎症因子,其中 TNF- $\alpha$  能够促使胰岛素受体底物 1(IRS-1)磷酸化,抑制脂肪细胞胰岛素信号通路,导致胰岛素抵抗;IL-6 可以刺激脂肪细胞分解脂质,导致血清游离脂肪酸的浓度升高,引起一系列代谢紊乱<sup>[11]</sup>;MCP-1 则进一步促进脂肪组织巨噬细胞浸润<sup>[6]</sup>。上述细胞因子进一步加重脂肪炎症,引起脂肪组织功能异常。

在不同状态下脂肪组织巨噬细胞和脂肪细胞之间存在不同的相互作用;在非肥胖状态下,脂肪细胞分泌 IL-4、IL-13 促进 M2 型巨噬细胞活化。而在肥胖状态下,脂肪细胞则分泌游离脂肪酸、炎症趋化因子和细胞因子促进 M1 型巨噬细胞活化<sup>[12]</sup>。值得一提的是,脂肪组织巨噬细胞还可以作为抗原提呈细胞,将抗原提呈给能够分泌促炎性细胞因子 IFN- $\gamma$  的 CD4<sup>+</sup>T 细胞并促进其增殖<sup>[13]</sup>,促进脂肪组织炎症发生发展。

#### 1.1.4 肥胖与脂肪组织巨噬细胞

无论是对肥胖患者还是对经高脂饮食诱导或瘦素基因敲除的肥胖小鼠的研究发现<sup>[4,14]</sup>,肥胖状态下,脂肪组织巨噬细胞数量明显增加,并伴随炎症性因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的增加。最近研究提出肥胖状态下,脂肪组织巨噬细胞不仅表现出数量的增加,还表现出抗炎性 M2 型巨噬细胞趋向促炎性 M1 型巨噬细胞的转变。表现为 M2 型巨噬细胞典型因子 IL-10 和精氨酸酶 1 基因表达下降,M1 型巨噬细胞典型因子 TNF- $\alpha$  和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)基因表达上调<sup>[9]</sup>。表明巨噬细胞数量增加与脂肪组织炎

症密切相关,其中M1型巨噬细胞在促进炎症方面发挥更加重要的作用。

MCP-1和巨噬细胞浸润脂肪组织密切相关,在肥胖小鼠脂肪组织中浓度上升<sup>[15]</sup>。因此肥胖状态下脂肪组织巨噬细胞数量增加可能和MCP-1的表达上调增加循环中单核细胞进入脂肪组织有关。研究发现,和脂肪组织本身具有的巨噬细胞相比,肥胖状态下招募到脂肪组织的巨噬细胞中IL-6、iNOS及CC趋化因子受体2(CCR2,即MCP-1的受体)基因表达上调。这些分子能够促进巨噬细胞迁移、吞噬,发挥促炎作用<sup>[16]</sup>。表明脂肪组织本身的巨噬细胞可能更趋向于M2抗炎表型,而从循环招募来的巨噬细胞更趋向于M1表型。另外有研究表明,肥胖状态下脂肪组织巨噬细胞具有一定增殖能力,增殖的巨噬细胞趋向M2抗炎表型<sup>[14]</sup>。说明肥胖状态下巨噬细胞数量增加不仅与循环中单核细胞的浸润增加有关,也与脂肪组织本身的巨噬细胞增殖有关。

脂肪组织巨噬细胞作为脂肪组织炎症因子的主要来源,其数量及分泌谱的变化和炎症息息相关,它们是脂肪组织炎症发生发展的关键,近来研究发现除了巨噬细胞,其他类型免疫细胞也参与脂肪组织炎症过程。

## 1.2 脂肪组织 T 淋巴细胞

### 1.2.1 T 淋巴细胞分类

在机体发生有菌性炎症的过程中,中性粒细胞聚集到感染部位,分泌一系列趋化因子,促使巨噬细胞和淋巴细胞聚集。同样地,在肥胖状态下脂肪组织无菌性炎症中,T和B淋巴细胞也发挥重要作用。其中T淋巴细胞来源于骨髓中的多能干细胞,在胸腺内分化成熟,成为具有免疫活性的T细胞,经血流分布至外周免疫器官,发挥细胞免疫及免疫调节等功能。T细胞是一个不均一的细胞群体,有多种分类方法。按细胞表面分化抗原的不同,可分为CD8<sup>+</sup>T细胞和CD4<sup>+</sup>T细胞两大亚群,其中CD4<sup>+</sup>T细胞又可以分为辅助性T细胞(Th)和调节性T细胞。辅助性T细胞有多种亚型,包括Th1、Th2、Th3、Th9、Th17等。

### 1.2.2 脂肪组织 CD8<sup>+</sup>T 细胞促进炎症

在高脂饮食诱导的肥胖小鼠模型中,研究者们发现,脂肪组织CD8<sup>+</sup>T细胞浸润要早于巨噬细胞,它们的数量高于正常饮食喂养的对照组,用中和抗体特异性清除CD8<sup>+</sup>T细胞可降低脂肪组织M1型巨噬细胞浸润。体外实验还证明CD8<sup>+</sup>T细胞分泌大量已知的促使巨噬细胞聚集的物质如干扰素诱导蛋

白-10、MCP-1等<sup>[17]</sup>。据此提出CD8<sup>+</sup>T具有促进炎症作用,可能是炎症级联反应中的始动因素。另外,研究者们分别用肥胖、精瘦小鼠脂肪组织来源的CD8<sup>+</sup>T细胞和巨噬细胞进行共培养,发现肥胖状态下的CD8<sup>+</sup>T能够诱导产生TNF- $\alpha$ 的巨噬细胞数量明显增加<sup>[17]</sup>。说明肥胖状态下CD8<sup>+</sup>T细胞通过诱导巨噬细胞浸润脂肪组织和促炎性M1表型转变发挥促进脂肪组织炎症的作用。

### 1.2.3 脂肪组织辅助性 T 细胞参与炎症

与CD8<sup>+</sup>T细胞一样,Th1具有促进炎症作用,而Th2、调节性T细胞具有抑制炎症作用。Th1分泌的IFN- $\gamma$ 能够促进M1型巨噬细胞聚集,加重脂肪组织炎症反应<sup>[18]</sup>。Th2分泌抗炎因子IL-4、IL-13等,它们可以诱导巨噬细胞中过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (peroxisome-proliferator-activated receptor, PPAR- $\gamma$ )的表达,从而激活巨噬细胞抗炎表型的表达<sup>[19]</sup>。Th1和Th2细胞比例失衡被证实与哮喘、肥胖相关代谢紊乱等多种疾病相关<sup>[20]</sup>。在肥胖状态下,多个研究发现Th1细胞数量和比例增多、Th2细胞数量和比例降低与脂肪组织炎症密切相关<sup>[21-22]</sup>。

### 1.2.4 脂肪组织调节性 T 细胞抑制炎症

作为近年来免疫学的研究热点,调节性T细胞除了在机体免疫耐受和自稳中发挥负向调节作用外,也参与抑制脂肪炎症过程。研究发现精瘦小鼠附睾脂肪组织中存在丰富的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>调节性T细胞,它们特异性表达PPAR- $\gamma$ 和叉头转录因子-3(forkhead transcription factor-3, Foxp3),主要通过产生大量IL-10、转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )抑制炎症<sup>[23]</sup>。IL-10可以抑制炎症因子TNF- $\alpha$ 的作用<sup>[9]</sup>。脂肪组织调节性T细胞的特异性清除可使小鼠表现出严重的脂肪炎症浸润和胰岛素敏感性下调<sup>[24]</sup>,说明调节性T细胞在抑制脂肪组织炎症方面发挥重要作用。从外周血分离的调节性T细胞可以通过细胞因子依赖和非依赖的方式促进巨噬细胞表型转换。在与调节性T细胞共培养后,单核细胞(巨噬细胞)表现出抗炎性M2表型的典型特征;经与调节性T细胞培养后,巨噬细胞在脂多糖刺激下分泌炎症因子的能力也下降<sup>[25]</sup>;特异性敲除调节性T细胞中的PPAR- $\gamma$ 能够降低脂肪组织促炎性M1型巨噬细胞的数量<sup>[24]</sup>,提示脂肪组织调节性T细胞可能也参与脂肪组织巨噬细胞的表型转换过程。反过来,脂肪组织巨噬细胞可以维持表达PPAR- $\gamma$ 的调节性T细胞数量<sup>[26]</sup>。在高脂饮食诱导的肥胖小鼠模型中,调节性T细胞数量减少,分泌IL-10减少,甚至表

现出 Th1 细胞的表型,分泌 IFN- $\gamma$  和 Th1 细胞相关的趋化因子受体 CXCR3<sup>[27-28]</sup>。PPAR- $\gamma$  促进调节性 T 细胞迁移至脂肪组织<sup>[24]</sup>,有上调脂肪组织调节性 T 细胞基因表达的功能<sup>[28]</sup>。肥胖状态下调节性 T 细胞的减少可能和 PPAR- $\gamma$  磷酸化有关<sup>[29]</sup>。

总结以上研究本文认为,T 淋巴细胞也是脂肪组织炎症的重要参与者。CD8<sup>+</sup>T 可能在炎症级联反应中扮演上游信号的角色,Th1/Th2 比例失衡影响巨噬细胞 M1/M2 表型转换,而调节性 T 细胞在抑制脂肪组织炎症中起关键作用。肥胖状态下脂肪组织调节性 T 细胞数量减少和分泌功能减退,甚至表现出 Th1 细胞类似的表型,进一步促进炎症的发展。

### 1.3 脂肪组织树突状细胞

除了在脂肪组织中相对数量比较丰富的巨噬细胞和 T 淋巴细胞外,树突状细胞、肥大细胞、中性粒细胞等也存在于脂肪组织中并发挥独特作用。

近来研究发现树突状细胞也参与脂肪组织炎症。树突状细胞是一种抗原提呈细胞,通过 MHC II 类分子将抗原提呈于 T 淋巴细胞发挥作用。脂肪细胞死亡使脂肪细胞表位抗原暴露给树突状细胞<sup>[14]</sup>,饱和脂肪酸也可能诱导树突状细胞的激活<sup>[30]</sup>。高脂饮食诱导的肥胖小鼠脂肪组织表现出树突状细胞数量增多,且与冠状分布的巨噬细胞相关<sup>[31-32]</sup>。树突状细胞特异性缺失的小鼠脂肪组织巨噬细胞数量下降,且在高脂饮食喂养后不发展为肥胖,没有代谢紊乱,注射树突状细胞能够增加脂肪组织巨噬细胞的数量<sup>[31]</sup>。因此,这一细胞群可能通过调节巨噬细胞表型和促进 M1 型巨噬细胞在脂肪组织浸润而发挥促炎症的作用。研究表明脂肪组织树突状细胞还具有较强的分泌功能,能够产生 IL-6、IL-23 等细胞因子,且促进脂肪组织中能分泌炎症因子 IL-17 的 Th17 细胞增殖<sup>[32]</sup>。还有研究提示树突状细胞可能作用于调节性 T 细胞<sup>[26]</sup>。由于脂肪组织树突状细胞具有抗原提呈功能,能够作用于 T 淋巴细胞,它们与其他 T 淋巴细胞之间是否存在相互作用也是一个值得探讨的问题。

### 1.4 脂肪组织肥大细胞、嗜酸性粒细胞

#### 1.4.1 脂肪组织肥大细胞促进炎症

肥大细胞主要参与机体免疫反应,越来越多的研究表明这类细胞在炎症性疾病中发挥重要作用。肥胖状态下,脂肪组织肥大细胞数量增加,且与巨噬细胞浸润相关<sup>[33]</sup>,用肥大细胞稳定剂色甘酸钠处理肥胖小鼠后,脂肪组织巨噬细胞数量减少并且血清炎症因子和趋化因子水平下降<sup>[34]</sup>。脂肪组织肥大

细胞可能是通过分泌炎症介质 IL-6、IFN- $\gamma$  和影响巨噬细胞表型或浸润发挥作用。近来研究表明肥大细胞参与脂肪组织纤维化,在肥胖炎症中发挥着独特的作用<sup>[33]</sup>。

#### 1.4.2 脂肪组织嗜酸性粒细胞抑制炎症

嗜酸性粒细胞与调节性 T 细胞类似,对脂肪组织炎症具有负向调节作用。研究发现,它们通过分泌 IL-4、IL-13 等细胞因子维持脂肪组织中 M2 型巨噬细胞数量<sup>[35]</sup>。嗜酸性粒细胞在瘦型小鼠脂肪组织中相对丰富,肥胖状态下其数量减少,并伴随抗炎性 M2 型巨噬细胞的减少<sup>[35]</sup>。

由于脂肪组织肥大细胞、嗜酸性粒细胞与巨噬细胞的表型维持紧密相关,这些细胞已经得到了研究者的重视,尽管肥大细胞或嗜酸性粒细胞的数量远少于巨噬细胞,但它们的数量改变也会导致巨噬表型和数量的变化,在脂肪组织炎症中起着意想不到的巨大作用。

## 2 以脂肪组织免疫细胞为治疗靶点改善肥胖相关代谢紊乱

### 2.1 以脂肪组织巨噬细胞为靶点

肥胖状态下脂肪组织巨噬细胞浸润加重脂肪组织炎症,其机制可能和循环中巨噬细胞迁移至脂肪组织增加相关,也可能是脂肪组织巨噬细胞表现为抗炎性 M2 型向促炎性 M1 型的转换。多项研究表明肥胖患者减重后脂肪组织巨噬细胞数量减少,并伴随炎症标志物降低和胰岛素敏感性上调。因此,以减少脂肪组织促炎性 M1 型巨噬细胞为目标,通过阻断外周巨噬细胞迁移至脂肪组织,或抑制脂肪组织内巨噬细胞在肥胖状态下向促炎表型转换,可能是减轻脂肪组织炎症的有效办法。

#### 2.1.1 阻断外周巨噬细胞迁移至脂肪组织

MCP-1 和 CCR2 是促使巨噬细胞从外周迁移至脂肪组织的重要参与者,特异性敲除 MCP-1 和 CCR2 基因的肥胖小鼠表现为脂肪组织巨噬细胞含量减少,炎症减轻,胰岛素敏感性上调和肝脏脂肪变性减轻<sup>[6,36]</sup>。在肥胖小鼠模型中,短期使用 CCR2 的拮抗剂 INCB3344 可减少巨噬细胞浸润脂肪组织,虽然没有改善体重和肝脏脂肪变性,但是胰岛素敏感性得到上调<sup>[36]</sup>。这些研究说明在肥胖状态下被招募进入脂肪组织的巨噬细胞有向促炎性 M1 表型转换的趋势,阻断这些巨噬细胞的进入能够改善脂肪组织炎症。

#### 2.1.2 抑制脂肪组织巨噬细胞表型转换

脂肪组织中 M2 型巨噬细胞分泌 IL-10 等参与抑制炎症,研究发现转录因子 PPAR- $\gamma$  的激活介导 M2 型巨噬细胞的活化<sup>[37]</sup>。噻唑烷二酮类药物是 PPAR- $\gamma$  激动剂,非糖尿病的肥胖患者在使用罗格列酮治疗后血清 TNF- $\alpha$  水平明显下降<sup>[38]</sup>。白杨素也是一种 PPAR- $\gamma$  调节剂,可以激活巨噬细胞 M2 表型,减少 M1 表型数量,用白杨素处理高脂饮食诱导的肥胖小鼠后脂肪组织巨噬细胞浸润减少,改善脂肪肝的情况<sup>[39]</sup>。由于 CD8<sup>+</sup>T 在巨噬细胞浸润脂肪组织中作用显著,用特异性 CD8 中和抗体治疗瘦素基因敲除的肥胖小鼠表现为脂肪组织 M1 型巨噬细胞数量减少,胰岛素抵抗和葡萄糖耐受不良均得到改善<sup>[17]</sup>。同样地,通过寄生虫感染诱导嗜酸性粒细胞的增加继而增加抗炎性 M2 型巨噬细胞的数量<sup>[35]</sup>也是一个潜在的治疗手段。

总结以上研究得出,抑制肥胖患者巨噬细胞浸润脂肪组织,或是促进脂肪组织巨噬细胞趋向 M2 型的转变,能够减轻脂肪组织炎症,改善炎症带来的一系列代谢紊乱。

## 2.2 以脂肪组织调节性 T 细胞为靶点

脂肪组织调节性 T 细胞负责抑制脂肪组织炎症,肥胖状态下其数量减少,分泌功能减退,甚至分泌促炎性细胞因子,导致炎症的失控和进一步加重。多项研究表明诱导调节性 T 细胞数量的增加有助于减轻炎症,改善炎症带来的不良后果。因此,以增加脂肪组织调节性 T 细胞为目标,通过促进循环中调节性 T 细胞迁移至脂肪组织,或诱导脂肪组织内调节性 T 细胞数量增加,可能是减轻脂肪组织炎症的有效办法。

### 2.2.1 诱导调节性 T 细胞浸润于脂肪组织

PPAR- $\gamma$  是脂肪组织调节性 T 细胞迁移至脂肪组织的重要因素,特异性消除调节性 T 细胞中的 PPAR- $\gamma$  表达将导致脂肪组织中这类细胞的大幅减少,而其他淋巴器官中调节性 T 细胞的数量则不受影响<sup>[24]</sup>。用吡格列酮(一种 PPAR- $\gamma$  激动剂)治疗高脂诱导的肥胖小鼠,能够使脂肪组织中调节性 T 细胞的数量上升,减少脂肪组织炎症,改善肥胖引起的代谢紊乱<sup>[24]</sup>。

### 2.2.2 促使脂肪组织调节性 T 细胞数量增加

在瘦素基因敲除的肥胖小鼠模型中,通过口服抗 CD3 抗体和  $\beta$ -葡萄糖,诱导脂肪组织调节性 T 细胞增加,能够降低脂肪组织炎症,改善血糖水平,降低肝酶<sup>[40]</sup>。用 IL-33 治疗增加高脂饮食诱导的肥胖小鼠调节性 T 细胞数量,能够减轻脂肪组织炎症,改

善炎症相关的胰岛素抵抗和高胰岛素血症<sup>[41]</sup>。

诱导肥胖患者脂肪组织调节性 T 细胞数量增加,促进外周调节性 T 细胞迁移至脂肪组织,能够减轻脂肪组织炎症,改善炎症带来的一系列代谢紊乱。有趣的是,以上手段诱导的脂肪组织调节性 T 细胞增加常伴随巨噬细胞数量的减少,进一步证明了调节性 T 细胞对巨噬细胞的潜在作用。因此以脂肪组织调节性 T 细胞为靶点将为肥胖相关并发症的防治提供新的治疗手段。

## 3 总结与展望

虽然炎症的触发机制不明,但研究者们已经发现氧化和内质网应激、饱和脂肪酸、炎症细胞因子可以激活负责炎症靶基因转录的 NF- $\kappa$ B 和 c-JNK 通路。这两条通路广泛存在于多种细胞中,包括巨噬细胞、调节性 T 细胞等,在炎症过程中发挥着至关重要的作用。炎症通路的激活伴随着炎症因子的分泌和促炎性巨噬细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞、Th1 细胞的数量增加,抑制炎症的 Th2 细胞、调节性 T 细胞、嗜酸性粒细胞功能减退,数量减少,进一步加重脂肪组织功能异常,导致异常的脂肪因子分泌和炎症细胞浸润。这种正反馈炎症级联反应进一步加重脂肪组织炎症,其中巨噬细胞是肥胖状态下循环炎症标志物的主要来源,本身的数量增加及向促炎性 M1 表型的转换促进了炎症的发展。其他免疫细胞与巨噬细胞之间的相互作用也促使了肥胖状态下巨噬细胞的表型转换。其中 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞、Th1 细胞、树突状细胞、肥大细胞可以维持巨噬细胞促炎性 M1 表型,而调节性 T 细胞、嗜酸性粒细胞、Th2 细胞可以激活抗炎性 M2 巨噬细胞表型。这些证据表明脂肪组织巨噬细胞在炎症的发展过程中起着关键作用,T 细胞的浸润先于巨噬细胞可能提示 T 细胞在炎症的始动机制中扮演重要角色。同时免疫细胞与脂肪细胞间也存在复杂的相互作用,炎性免疫细胞分泌的炎症因子可以阻断脂肪细胞的胰岛素信号通路,脂肪细胞分泌的细胞因子可以促进炎性免疫细胞的激活与聚集。

目前多个研究发现以脂肪组织巨噬细胞、调节性 T 细胞、肥大细胞为治疗靶点,能够减轻脂肪组织炎症,改善肥胖带来的一系列代谢紊乱,证实了以脂肪组织免疫细胞为炎症治疗靶点的可行性及有效性,肯定了免疫性治疗在脂肪组织炎症乃至肥胖炎症中的独特价值。由于脂肪组织免疫细胞间存

在复杂的相互作用,即使是像嗜酸性粒细胞这类数量上不占优势的细胞,诱导其增加也可以明显改善炎症。因此以脂肪组织免疫细胞为潜在治疗靶点,将是调节脂肪组织抗炎平衡状态的切实而高效率的手段。近些年来针对脂肪组织免疫细胞的研究成为热点,它们不仅在脂肪组织炎症中发挥重要作用,而且研究表明巨噬细胞和嗜酸性粒细胞也参与白色脂肪棕色化过程<sup>[42]</sup>。因此,需要对脂肪组织免疫细胞的功能进行更加深入的探讨。这不仅能为免疫系统和代谢系统之间的交互作用提供新的理解,也为脂肪组织炎症的防治、肥胖相关代谢紊乱的治疗提供了新思路。

#### [参考文献]

- [1] Shinoda K, Luijten IH, Hasegawa Y, et al. Genetic and functional characterization of clonally derived adult human brown adipocytes [J]. *Nat Med*, 2015, 21 (4): 389–394
- [2] Fasshauer M, Blüher M. Adipokines in health and disease [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2015, 36(7): 461–470
- [3] Exley MA, Hand L, O'shea D, et al. Interplay between the immune system and adipose tissue in obesity [J]. *J Endocrinol*, 2014, 223(2): R41–R48
- [4] Lee J. Adipose tissue macrophages in the development of obesity-induced inflammation, insulin resistance and type 2 diabetes [J]. *Arch Pharm Res*, 2013, 36(2): 208–222
- [5] Luna-Luna M, Medina-Urrutia A, Vargas-Alarcón G, et al. Adipose tissue in metabolic syndrome: onset and progression of atherosclerosis [J]. *Arch Med Res*, 2015, 46(5): 392–407
- [6] Kanda H, Tateya S, Tamori Y, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(6): 1494–1505
- [7] Seelaender MC, Batista ML. Adipose tissue inflammation and cancer cachexia: the role of steroid hormones [J]. *Horm Mol Biol Clin Invest*, 2014, 17(1): 5–12
- [8] Lee BC, Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842(3): 446–462
- [9] Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(1): 175–184
- [10] Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(12): 1821–1830
- [11] Weisberg SP, Mccann D, Desai M, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue [J]. *J Clin Invest*, 112(12): 1796–1808
- [12] Itoh M, Suganami T, Hachiya R, et al. Adipose tissue remodeling as homeostatic inflammation [J]. *Int J Inflamm*, 2011, 2011: 720926
- [13] Morris DL, Cho KW, Delproposito JL, et al. Adipose tissue macrophages function as antigen-presenting cells and regulate adipose tissue CD4<sup>+</sup> T cells in mice [J]. *Diabetes*, 2013, 62(8): 2762–2772
- [14] Haase J, Weyer U, Immig K, et al. Local proliferation of macrophages in adipose tissue during obesity-induced inflammation [J]. *Diabetologia*, 2014, 57(3): 562–571
- [15] Kamei N, Tobe K, Suzuki R, et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(36): 26602–26614
- [16] Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, et al. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity [J]. *Diabetes*, 2007, 56(1): 16–23
- [17] Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, et al. CD8<sup>+</sup> effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity [J]. *Nat Med*, 2009, 15(8): 914–920
- [18] Harford KA, Reynolds CM, McGillicuddy FC, et al. Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue [J]. *Proc Nutr Soc*, 2011, 70(4): 408–417
- [19] Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 451–483
- [20] Jovicic N, Jetic I, Jovanovic I, et al. Differential immunometabolic phenotype in Th1 and Th2 dominant mouse strains in response to high-fat feeding [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0134089
- [21] Winer S, Chan Y, Paltser G, et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy [J]. *Nat Med*, 2009, 15(8): 921–929
- [22] Priceman SJ, Kujawski M, Shen S, et al. Regulation of adipose tissue T cell subsets by Stat3 is crucial for diet-induced obesity and insulin resistance [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(32): 13079–13084
- [23] Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters [J]. *Nat Med*, 2009, 15(8): 930–939
- [24] Cipolletta D, Feuerer M, Li A, et al. PPAR- $\gamma$  is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tis-



## 转录因子 ATF3 对大鼠 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$ 基因启动活性的影响及其可能的结合部位

周梦雅,何凤霞,张 婧,刘 玉,虞天一,卢燕来,王璐璐,赵 聘,邱 文,王迎伟\*

(南京医科大学免疫学系,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:构建大鼠生长阻滞及 DNA 损伤诱导基因 45(growth arrest and DNA-damage-inducible gene 45,Gadd45) $\beta$ / $\gamma$  启动子(全长和截短)荧光素酶报告质粒,并观察在大鼠肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cells,GMCs)中过表达激活转录因子 3(activating transcription factor 3,ATF3)后分别对大鼠 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动活性的影响。同时筛选其可能的 ATF3 结合位点。方法:采用 PCR 技术,将扩增出的大鼠 Gadd45 $\beta$  基因启动子全长(-1 105 ~ +236 nt)和 Gadd45 $\gamma$  基因启动子全长(-913 ~ +72 nt)分别插入到荧光素酶报告基因载体 pGL3-basic 中,获得 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子全长荧光素酶报告质粒(pGL3-Gadd45 $\beta$ / $\gamma$ -FL),再将 pGL3-Gadd45 $\beta$ / $\gamma$ -FL 分别与课题组前期构建的大鼠野生型 ATF3 过表达质粒(pIRES2/ATF3)共转染 GMCs,检测其荧光素酶活性,以确定 ATF3 对 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因的启动作用。另用生物信息学软件预测 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子上 ATF3 潜在的结合位点,并据此构建 4 个 Gadd45 $\beta$  和 3 个 Gadd45 $\gamma$  基因启动子截短片段的荧光素酶报告质粒。将 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子全长和各截短片段的荧光素酶报告质粒与 pIRES2/ATF3 共转染 GMCs,再行荧光素酶活性测定,以筛选 ATF3 的结合位点。结果:菌液 PCR 及核酸测序证实,大鼠 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子(全长和截短)的荧光素酶报告质粒均构建成功。将 pGL3-Gadd45 $\beta$ / $\gamma$ -FL 分别和 pIRES2/ATF3 共转染 GMCs 发现,Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子活性均显著增加。而将 Gadd45 $\beta$  启动子全长及 4 个截短质粒分别与 pIRES2/ATF3 共转染 GMCs 后显示,pGL3-Gadd45 $\beta$ -4 的启动活性显著低于 pGL3-Gadd45 $\beta$ -FL、pGL3-Gadd45 $\beta$ -1、pGL3-Gadd45 $\beta$ -2 和 pGL3-Gadd45 $\beta$ -3。提示 ATF3 可能结合在 Gadd45 $\beta$  基因启动子的(-146 ~ +23 nt)区域。同样,将 Gadd45 $\gamma$  启动子全长及 3 个截短质粒分别与 pIRES2/ATF3 共转染 GMCs 后显示,pGL3-Gadd45 $\gamma$ -2、pGL3-Gadd45 $\gamma$ -3 的启动活性显著低于 pGL3-Gadd45 $\gamma$ -FL 和 pGL3-Gadd45 $\gamma$ -1。提示 ATF3 可能结合在 Gadd45 $\gamma$  基因启动子的(-456 ~ -61 nt)区域,且这段区域可能包含 1 个以上 ATF3 结合位点。结论:成功构建了大鼠 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子全长及各截短片段的荧光素酶报告质粒,并初步确定了 ATF3 在 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子上的结合区域。

**[关键词]** 生长阻滞和 DNA 损伤基因 45(Gadd45);激活转录因子 3(ATF3);荧光素酶报告质粒;启动子活性

**[中图分类号]** R692.3

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)01-026-07

doi:10.7655/NYDXBNS20160106

## Construction of rat Gadd45 $\beta$ / $\gamma$ promoter and identification of its binding sequence with ATF3

Zhou Mengya, He Fengxia, Zhang Jing, Liu Yu, Yu Tianyi, Lu Yanlai, Wang Lulu, Zhao Dan, Qiu Wen, Wang Yingwei\*

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

**[Abstract]** **Objective:** To construct luciferase reporter plasmids of full-length and truncated promoters of growth arrest- and DNA-damage-inducible gene 45 (Gadd45)  $\beta$ / $\gamma$  and detect their activity in rat GMCs in response to activating transcription factor 3 (ATF3) overexpression respectively, screening the possible binding sites for ATF3. **Methods:** Rat Gadd45 $\beta$  promoter (-1105 ~ +236 nt) and Gadd45 $\gamma$  promoter (-913 ~ +72 nt) were amplified by PCR, and then cloned into the luciferase reporter plasmids (pGL3-basic) separately. The recombinant plasmids (pGL3-Gadd45 $\beta$ / $\gamma$ -FL) were transfected into GMCs accompanied with rat ATF3 expression plasmid (pIRES2/ATF3) and the luciferase activity was detected to determine the role of ATF3 in Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  gene transcription. Meanwhile, the potential ATF3 binding sites within Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  promoter were predicted by bioinformatics software. Based on the

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助(81273333, 81471626, 31470853);江苏省高校自然科学研究面上项目(14KJB310006)

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

predicted results, four truncated Gadd45 $\beta$  promoter luciferase reporters and three truncated Gadd45 $\gamma$  promoter luciferase reporters were constructed. Subsequently, the full-length as well as different truncated promoter luciferase reporters of Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  were transfected into GMCs accompanied with pIRES2/ATF3, and the luciferase activity was then detected to identify the ATF3 binding sites. **Results:** It was verified that different kinds of plasmids were all constructed correctly by PCR analysis and nucleotide sequencing. GMCs co-transfected with pGL3-Gadd45 $\beta$ / $\gamma$ -FL and pIRES2/ATF3 displayed increased luciferase activity of Gadd45 $\beta$  and Gadd45 $\gamma$  promoter, respectively. In addition, pGL3-Gadd45 $\beta$ -4 co-transfected with pIRES2/ATF3 in GMCs showed notably reduced Gadd45 $\beta$  promoter activity than that of pGL3-Gadd45 $\gamma$ -FL, pGL3-Gadd45 $\beta$ -1, pGL3-Gadd45 $\beta$ -2, pGL3-Gadd45 $\beta$ -3 co-transfected with pIRES2/ATF3, indicating that the region of rat Gadd45 $\beta$  promoter (-146 ~ +23 nt) might contain ATF3 binding element. Likewise, pGL3-Gadd45 $\gamma$ -2 and pGL3-Gadd45 $\gamma$ -3 co-transfected with pIRES2/ATF3 in GMCs exhibited acute reduction of Gadd45 $\gamma$  promoter activity than that of pGL3-Gadd45 $\gamma$ -FL and pGL3-Gadd45 $\gamma$ -1, indicating that the region of rat Gadd45 $\gamma$  promoter (-456 ~ -61 nt) might contain more than one ATF3 binding element. **Conclusion:** The full-length and truncated Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  promoter luciferase reporter plasmids were constructed successfully, and the ATF3 binding regions within Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  promoters were identified. **[Key words]** growth arrest-and DNA-damage-inducible gene 45(Gadd45); activating transcription factor 3(ATF3); luciferase reporter plasmid; promoter activity

[Acta Univ Med Nanjing,2016,36(01):026-032]

系膜增生性肾小球肾炎(mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN) 是一种免疫炎症性的肾小球疾病, 其发病约占临床肾活检病例的 50%<sup>[1-2]</sup>。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<sup>[3]</sup>。已有研究表明,Thy-1N 病变具有补体依赖性, 尤其是亚溶解型(sublytic)C5b-9 依赖性。我们以往实验显示,Thy-1N 发病早期,部分肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cells, GMCs) 呈现了凋亡现象。体外用 sublytic C5b-9 刺激 GMCs 确能诱导其凋亡发生<sup>[4-6]</sup>。那么,在大鼠 Thy-1N 发病时,由 sublytic C5b-9 启动的 GMCs 凋亡有哪些因素参与, 其涉及的分子机制如何, 目前尚未完全揭晓。为了澄清 Thy-1N 早期 GMCs 损伤的可能机制,本课题组前期利用基因芯片技术筛查了 Thy-1 肾炎发病早期肾组织基因谱的变化,与体外用 sublytic C5b-9 刺激培养的 GMCs 基因谱进行比对,结果发现多个同期共表达上调基因,其中激活转录因子 3 (activating transcription factor 3, ATF3)和生长阻滞及 DNA 损伤诱导基因 45(growth arrest- and DNA-damage-inducible gene 45, Gadd45)  $\beta$ / $\gamma$  基因不仅芯片显示上调倍数高, 而且体内实验已证实,两种基因的 mRNA 和蛋白水平均显著上调。此外,利用小干扰 RNA 沉默 ATF3 基因后发现,由 sublytic C5b-9 诱导的 GMCs 凋亡反应显著减少。再者,本课题组前期的实验还发现,ATF3 与 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  的表达时相基本一致,且沉默 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  后亦能下调 sublytic C5b-9 诱导的 GMCs 凋亡数量。

ATF3 属于激活转录因子/cAMP 反应元件结合蛋白 (activating transcription factor/cAMP response

element binding protein, ATF/CREB)家族成员之一, 是含碱性亮氨酸拉链结构(basic-region leucine zipper, bZIP)的转录因子,能与靶基因启动子上相应的 DNA 序列结合发挥不同作用<sup>[7]</sup>。ATF3 在大部分正常静息细胞中的表达水平较低,但当细胞受到体内外伤性压力信号(如创伤、缺血、缺血再灌注等)刺激时,ATF3 的表达水平显著上升<sup>[8]</sup>。有文献报道,ATF3 参与机体多种细胞进程,包括炎症应答、肿瘤形成和凋亡反应等<sup>[9-13]</sup>。

Gadd45 是生长阻滞及 DNA 损伤诱导蛋白家族成员之一, 包含 3 种亚型 (Gadd45 $\alpha$ 、Gadd45 $\beta$  和 Gadd45 $\gamma$ )<sup>[14]</sup>。在生理和环境应激下,Gadd45 通过与其他参与细胞周期调节和应激应答蛋白相互作用,如增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、细胞分裂周期基因 2/细胞周期蛋白 B1 (cell division cycle gene 2/cyclinB1, cdc2/cyclinB1) 等,阻滞细胞周期,进行 DNA 修复及调控细胞生存、衰老或凋亡<sup>[15-16]</sup>。有研究表明,在人类肺癌细胞中,姜黄素可以通过上调 Gadd45 的表达,从而阻滞癌细胞生长并诱导其凋亡<sup>[17]</sup>。

本课题组以往研究已表明,ATF3 表达上调可启动下游靶基因,如 Gadd45 $\alpha$  和 Kruppel 样转录因子 6(Kruppel-like transcription factor 6, KLF6) 基因的转录,从而促进 sublytic C5b-9 诱导的 GMCs 凋亡反应<sup>[18]</sup>。此外,我们用生物信息学软件预测 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子上的结合元件发现,在大鼠 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因的启动子上含有 ATF3 的结合元件。那么,ATF3 作为转录因子是否也可通过启动 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因的转录,促进 GMCs 的凋亡,目前尚

不明了。为了探讨这一问题,本实验首先构建了大鼠 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子(全长和各截短片段)的荧光素酶报告质粒,在与 ATF3 过表达质粒共转染 GMCs 后,探讨 ATF3 对 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动活性的影响。同时筛选 ATF3 在 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子上可能的结合区域,拟为进一步研究 ATF3 和 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因在 sublytic C5b-9 诱导 GMCs 凋亡中所起的作用提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

大鼠 GMCs 细胞株(HBZY-1)购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。荧光素酶双报告载体质粒(pGL3-basic 和 pRL-SV40)以及荧光素酶报告基因检测试剂盒均购自美国 Promega 公司。组织基因组 DNA 提取试剂盒及限制性内切酶 *Mlu* I、*Bgl* II、*Sac* I、*Xho* I 和 T4 连接酶均由日本 TaKaRa 公司提供。TransStart® FastPfu DNA Polymerase 购自北京全式金公司。Neon 电转移和配套电转试剂盒由美国 Invitrogen 公司提供。真核表达载体 pIRES2-EGFP 由上海捷瑞生物工程有限公司提供。ATF3 过表达质粒 pIRES2-EGFP-ATF3(pIRES2/ATF3)为本课题组前期构建并成功表达。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 引物设计

登陆 NCBI, 搜索 GenBank 数据库中大鼠的 Gadd45 $\beta$  DNA 序列(NM\_001008321.1)和 Gadd45 $\gamma$  DNA 序列(NM\_001077640.1),利用 Primer 5.0 软件辅助设计针对 Gadd45 $\beta$  基因启动子区(-1 105 ~ +236 nt)和 Gadd45 $\gamma$  基因启动子区(-913 ~ +72 nt)的引物,然后应用 TF Search 软件分别预测 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子区域 ATF3 可能的结合位点,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 Gadd45 $\beta$  启动子上下游引物时,分别加入 *Mlu* I 和 *Bgl* II 酶切位点序列;而在合成 Gadd45 $\gamma$  启动子上下游引物时,分别加入 *Sac* I 和 *Xho* I 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 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$ 基因启动子结合元件的分析及其全长和截短的扩增

为了研究大鼠 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子区转录因子的结合位点,我们应用生物信息学软件 TF Search 分别预测了大鼠 Gadd45 $\beta$  和  $\gamma$  启动子上转录因子的结合元件。根据预测结果,我们分别设计了 1 对引物来扩增 Gadd45 $\beta$  或 Gadd45 $\gamma$  基因启动子全长序列及对应的 4 对或 3 对引物来扩增其截短序列。设计的 Gadd45 $\beta$  基因启动子 4 个截短片段的长度分别为 798 bp(-561 ~ +236 nt)、628 bp(-391 ~ +236 nt)、383 bp(-146 ~ +236 nt)和 214 bp(+23 ~ +236 nt);设计的 Gadd45 $\gamma$  基因启动子 3 个截短片段的长度分别为 529 bp(-456 ~ +72 nt)、284 bp(-211 ~ +72 nt)和 134 bp(-61 ~ +72 nt)。引物序列见表 1,其中下划线代表酶切位点,酶切位点前的序列为保护性碱基。以大鼠基因组 DNA 为模板,应用 TransStart® FastPfu DNA Polymerase 进行 PCR 反应,扩增大鼠 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子序列(全长和截短)。PCR 扩增条件如下:95℃预变性 2 min,95℃变性 20 s,52℃退火 20 s,72℃延伸 30 s/kb,循环 30 次后,72℃终延伸 5 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后进行割胶纯化。

#### 1.2.4 大鼠 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$ 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 产物用相对应的限制性内切酶进行双酶切,运用割胶法纯化线性化的 pGL3-basic 和酶切后的 PCR 产物,在 T4 DNA 连接酶的作用下连接反应(16℃过夜),将连接产物转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ ,并涂布于含氨苄抗性的 LB 平板上,37℃培养 12 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  $\mu$ L)用上述引物分别进行 PCR 扩增,其产物经 1.5%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 Gadd45 $\beta$  重组质粒分别命名为 pGL3-Gadd45 $\beta$ -FL(全长)、pGL3-Gadd45 $\beta$ -1(截短 1)、pGL3-Gadd45 $\beta$ -2(截短 2)、pGL3-Gadd45 $\beta$ -3(截短 3)和 pGL3-Gadd45 $\beta$ -4(截短 4)。同样,将构建的 Gadd45 $\gamma$  重组质粒分别命名为 pGL3-Gadd45 $\gamma$ -FL(全长)、pGL3-Gadd45 $\gamma$ -1(截短 1)、pGL3-Gadd45 $\gamma$ -2(截短 2)和 pGL3-Gadd45 $\gamma$ -3(截短 3)。

#### 1.2.5 重组质粒转染 GMCs

GMCs 传代培养 36 h 后,消化细胞并用 Neon 细胞电转系统将上述 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子全长和各截短质粒与 pIRES2/ATF3 共转染 GMCs,以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 24 孔板,其中各组均共转染 pRL-SV40 作为转染率内参照。鉴定 ATF3 过表达对大鼠