

## 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<sup>®</sup> FastPfu DNA Polymerase 购自北京全金公司。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<sup>®</sup> 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 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,95 $^{\circ}$ C 变性 20 s,52 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s/kb,循环 30 次后,72 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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

表 1 扩增大鼠 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子(全长和截短)的引物序列  
Table 1 Primers for rat Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  gene promoters(full-length and truncated)

名称	引物序列(5'→3')	位置
Gadd45 $\beta$	上游:CGACGCGTGTGGTTCATGCTGCGTACTAC(全长)	-1 105 ~ +236 nt
	上游:CGACGCGTCCACGGTCCTCAAACCTACCA(截短 1)	-561 ~ +236 nt
	上游:CGACGCGTGCCGGGAAATCAGGAGAGA(截短 2)	-391 ~ +236 nt
	上游:CGACGCGTCGCCCTTTCTACCTCCAG(截短 3)	-146 ~ +236 nt
	上游:CGACGCGTACCTCCGTCTTCTTGGATTAATTT(截短 4)	+23 ~ +236 nt
	下游:GAAGATCTATTCAGTCACACTTCACAGCG	
Gadd45 $\gamma$	上游:CGAGCTCATCAGAATCCCAGCAGCCA(全长)	-913 ~ +72 nt
	上游:CGAGCTCTGCAACAGTCCCGTAAACTTCA(截短 1)	-456 ~ +72 nt
	上游:CGAGCTCTGACAAAAGCGGCAGATTTG(截短 2)	-211 ~ +72 nt
	上游:CGAGCTCCGCGGAGCCGGTCTATAA(截短 3)	-61 ~ +72 nt
	下游:CCCTCGAGAGCAAGTTATCCAAAAGTGAAGAG	

Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子全长活性的影响时,具体实验分组如下:①MEM 组:pGL3-Gadd45 $\beta$ / $\gamma$ -FL 和 pRL-SV40 共转染;②pIRES2 组:pIRES2、pGL3-Gadd45 $\beta$ / $\gamma$ -FL 和 pRL-SV40 共转染;③pIRES2/ATF3 组:pIRES2/ATF3、pGL3-Gadd45 $\beta$ / $\gamma$ -FL 和 pRL-SV40 共转染。

### 1.2.6 荧光素酶活性的测定

质粒转染 GMCs 后 48 h,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 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子全长和各截短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(relative luciferase activity,RLU)。

### 1.3 统计学方法

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

## 2 结果

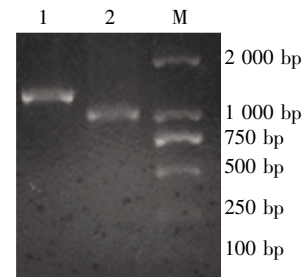
### 2.1 大鼠 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$ 基因启动子全长荧光素酶报告质粒的构建和鉴定

PCR 分别扩增大鼠 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)后,将其分别插入 pGL3-basic 质粒中。重组质粒经转化后涂布于 LB 平板,各挑 3 个克隆摇菌,菌液 PCR 反应筛出阳性克隆(图 1),送公司测序。将所得的测序序列与 NCBI 上报告序列进行比对后证实,两者序列及插入方向均正确。表明大鼠 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子全长荧光素酶报告质

粒(pGL3-Gadd45 $\beta$ / $\gamma$ -FL)已成功构建。

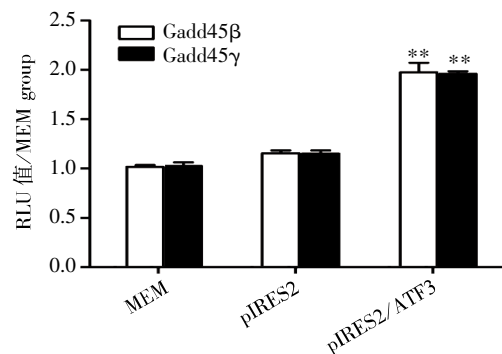
### 2.2 ATF3 过表达对大鼠 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$ 基因启动子全长活性的影响

按不同实验分组转染后 48 h,裂解细胞行双荧光素酶报告基因检测。结果显示,pGL3-Gadd45 $\beta$ / $\gamma$ -FL 和 pIRES2/ATF3 联合转染组,其 RLU 值显著高于其分各组(图 2)。提示,在 GMCs 中过表达 ATF3 能够启动 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因的转录。



1:pGL3-Gadd45 $\beta$ -FL; 2:pGL3-Gadd45 $\gamma$ -FL; M:DL2000 Marker。

图 1 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子荧光素酶报告质粒的 PCR 鉴定  
Figure 1 Identification of Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  promoter luciferase reporter plasmids by PCR

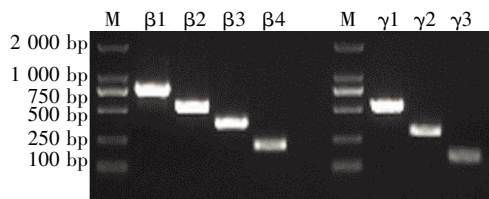


\*\* $P < 0.001$  vs. MEM 组、pIRES2 组。

图 2 ATF3 对大鼠 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子全长活性的影响  
Figure 2 The effects of ATF3 on the activities of rat Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  gene promoters(full-length)

### 2.3 大鼠 Gadd45β/γ 基因启动子各截短片段荧光素酶报告质粒的构建与鉴定

大鼠 Gadd45β/γ 基因启动子各截短片段荧光素酶报告质粒的菌液 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 Gadd45β/γ 基因启动子截短片段荧光素酶报告质粒均已构建成功,可用于后续功能实验。



M:DL2000 Marker; β1:pGL3-Gadd45β-1; β2:pGL3-Gadd45β-2; β3:pGL3-Gadd45β-3; β4:pGL3-Gadd45β-4; γ1:pGL3-Gadd45γ-1; γ2:pGL3-Gadd45γ-2; γ3:pGL3-Gadd45γ-3。

图 3 各截短片段荧光素酶报告质粒菌液 PCR 鉴定  
Figure 3 Identification of different truncated promoter luciferase reporter plasmids by PCR

### 2.4 ATF3 过表达对大鼠 Gadd45β 基因启动子各截短片段活性的影响

将 pGL3-basic、Gadd45β 基因启动子全长 (pGL3-Gadd45β-FL) 和各截短片段 (pGL3-Gadd45β-1、pGL3-Gadd45β-2、pGL3-Gadd45β-3 和 pGL3-Gadd45β-4) 荧光素酶报告质粒分别与 pIRES2/ATF3 质粒和 pRL-SV40 质粒共转染 GMCs, 检测各组荧光素酶活性。由图 4 可见, pGL3-Gadd45β-1、pGL3-Gadd45β-2 质粒的启动子活性显著高于 pGL3-Gadd45β-FL。此外, 转染 pGL3-Gadd45β-4 质粒的细胞与转染 pGL3-Gadd45β-FL、pGL3-Gadd45β-1、pGL3-Gadd45β-2 和 pGL3-Gadd45β-3 质粒组相比, 其 RLU 值显著降低。这一结果提示, 在大鼠 Gadd45β 基因启动子(-146 ~ +23 nt)区域可能存在 ATF3 的结合位点。

### 2.5 ATF3 过表达对大鼠 Gadd45γ 基因启动子各截短片段活性的影响

将 pGL3-basic、Gadd45γ 基因启动子全长 (pGL3-Gadd45γ-FL) 和各截短片段 (pGL3-Gadd45γ-1、pGL3-Gadd45γ-2 和 pGL3-Gadd45γ-3) 荧光素酶报告质粒分别与 pIRES2/ATF3 质粒和 pRL-SV40 质粒共转染 GMCs, 检测各组荧光素酶活性。由图 5 可见, 转染 pGL3-Gadd45γ-2 和 pGL3-Gadd45γ-3 质粒的细胞与转染 pGL3-Gadd45γ-FL 和 pGL3-Gadd45γ-1 质粒组相比, 其 RLU 值显著降低。提示, 在大鼠 Gadd45γ 基因启动子(-456 ~ -61 nt)区域可

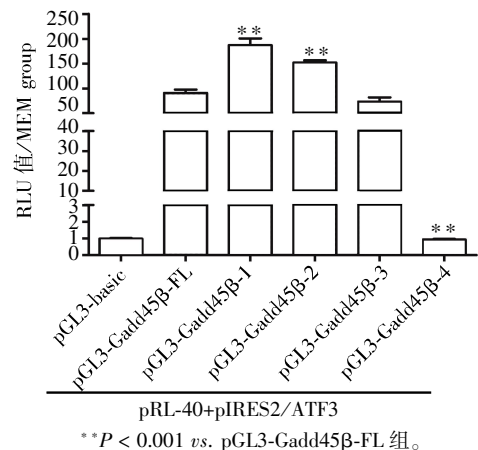


图 4 ATF3 对大鼠 Gadd45β 基因启动子各截短片段活性的影响

Figure 4 The effects of ATF3 on the activity of different truncated rat Gadd45β gene promoters

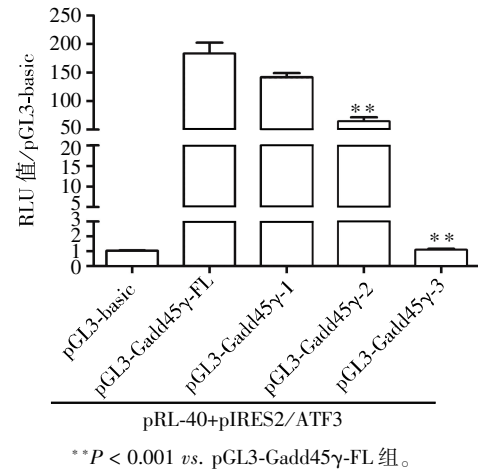


图 5 ATF3 对大鼠 Gadd45γ 基因启动子各截短片段活性的影响

Figure 5 The effects of ATF3 on the activity of different truncated rat Gadd45γ gene promoters

能存在 ATF3 的结合位点, 且结合位点为 1 个以上。

## 3 讨论

Thy-1N 因其病理变化类似于人类 MsPGN, 多年来一直被用于 MsPGN 的实验研究。有文献报道, Thy-1N 大鼠肾小球中可查见补体 C5b-9 复合体的沉积 [19], 而本课题组前期的研究也发现, sublytic C5b-9 刺激大鼠 GMCs 后可促进其凋亡、增生及细胞外基质 (ECM) 的分泌 [4-6]。

本课题组以往的实验表明, 在大鼠 Thy-1N 发病早期和体外用 sublytic C5b-9 刺激 GMCs 后, ATF3 和 Gadd45β/γ 2 种基因的 mRNA 和蛋白水平均显著上调; 此外, 沉默 GMCs 中 ATF3 基因后, 由 sublytic C5b-9 诱导的 GMCs 凋亡反应受到抑制; 另

ATF3 与 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  的表达时相基本一致,且沉默 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  后亦可减少 sublytic C5b-9 诱导的 GMCs 凋亡数量。有文献报道,在人类结直肠癌细胞中,姜叶可以通过 ERK1/2 途径诱导 ATF3 的表达,从而诱导癌细胞的凋亡,发挥抗癌作用<sup>[13]</sup>。Notas 等<sup>[16]</sup>在对肝细胞的研究中发现,增殖诱导配体(a proliferation-inducing ligand, APRIL)能够与 B 细胞成熟抗原(B cell maturation antigen, BCMA)相互作用,通过 JNK2-FoxO3a 途径诱导 Gadd45 的表达,从而阻滞 G<sub>2</sub>/M 期细胞生长。这些结果提示,ATF3 和 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  在细胞凋亡中可能起一定的调控作用。鉴于本课题组以往的研究已揭示,ATF3 表达上调可通过启动下游靶基因,如 Gadd45 $\alpha$  和 KLF6 基因的转录,从而促进 sublytic C5b-9 诱导的 GMCs 凋亡<sup>[18]</sup>,故本研究推测,在大鼠 Thy-1N 发病中,sublytic C5b-9 刺激 GMCs 后,表达上调的 ATF3 可能结合于 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子区域,从而增强了 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因的转录,最终促进了 GMCs 的凋亡。

为了验证上述推测,本研究采用了荧光素酶报告基因技术进行实验。首先构建了大鼠 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子全长荧光素酶报告质粒(pGL3-Gadd45 $\beta$ / $\gamma$ -FL),将 pGL3-Gadd45 $\beta$ / $\gamma$ -FL 分别与大鼠野生型 ATF3 过表达质粒(pIRES2/ATF3)共转染 GMCs,检测 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  启动子的荧光素酶活性。结果发现,将 pGL3-Gadd45 $\beta$ / $\gamma$ -FL 与 pIRES2/ATF3 共转染 GMCs 后,其荧光素酶活性明显高于转染 pGL3-basic 的对照组细胞,提示 ATF3 作为转录因子能够启动 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因的转录。

为了进一步确定大鼠 ATF3 与 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子的结合区域,又通过 TF Search 软件预测了大鼠 Gadd45 $\beta$  基因启动子转录因子上 ATF3 可能的结合位点(分别在-1 105~-561 nt 和-146~+23 nt),并据此设计构建了 Gadd45 $\beta$  基因启动子(截短)荧光素酶报告质粒,即 pGL3-Gadd45 $\beta$ -1、pGL3-Gadd45 $\beta$ -2、pGL3-Gadd45 $\beta$ -3 和 pGL3-Gadd45 $\beta$ -4。与此同时,我们也预测了大鼠 Gadd45 $\gamma$  基因启动子上 ATF3 可能的结合位点(分别在-913~-456 nt、-456~-211 nt 和-211~-61 nt),同样构建了 Gadd45 $\gamma$  基因启动子(截短)荧光素酶报告质粒,即 pGL3-Gadd45 $\gamma$ -1、pGL3-Gadd45 $\gamma$ -2 和 pGL3-Gadd45 $\gamma$ -3。随后将这几种种质粒(包括全长质粒)分别与 pIRES2/ATF3 共转染 GMCs,再测定各组启动子的荧光素酶活性。结果发现,pGL3-Gadd45 $\beta$ -4 的启动子活性显著低于 pGL3-Gadd45 $\beta$ -FL、pGL3-Gadd45 $\beta$ -1、pGL3-Gadd45 $\beta$ -2 和

pGL3-Gadd45 $\beta$ -3 组,提示 ATF3 在 Gadd45 $\beta$  启动子上的结合区域可能位于(-146 ~ +23 nt)的区域。此外,我们还发现 pGL3-Gadd45 $\beta$ -1、pGL3-Gadd45 $\beta$ -2 的启动子活性显著高于 pGL3-Gadd45 $\beta$ -FL,提示在区域(-1 105~-319 nt)上可能存在负向调控 Gadd45 $\beta$  转录的元件。不过,这一结果还需要今后的实验加以验证。另对于 Gadd45 $\gamma$  启动子荧光素酶报告质粒结果而言,pGL3-Gadd45 $\gamma$ -2 和 pGL3-Gadd45 $\gamma$ -3 的启动子活性显著低于 pGL3-Gadd45 $\gamma$ -FL 和 pGL3-Gadd45 $\gamma$ -1 组,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。值得一提的是,关于 ATF3 与 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  具体的结合元件,则须通过染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation assay, ChIP)和启动子突变实验来加以确定。

综上所述,本研究成功构建了大鼠 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子(全长)荧光素酶报告质粒,并在 GMCs 中证实了过表达 ATF3 后可促进 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因的启动。除此之外,根据软件预测的 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子上转录因子 ATF3 可能的结合位点,设计并构建了不同的大鼠 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子截短片荧光素酶报告质粒,探讨了 ATF3 过表达对大鼠 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因启动子的激活作用,并初步筛出了其可能的结合区域。上述结果为今后深入研究大鼠 Thy-1N 发病过程中由 sublytic C5b-9 刺激 GMCs 后启动 Gadd45 $\beta$ / $\gamma$  基因的转录及其相应的调控机制等提供了必要的实验材料和研究依据。

#### [参考文献]

- [1] Rifai A, Dworkin LD. IgA nephropathy: markers of progression and clues to pathogenesis [J]. *Kidney Int*, 2008, 73(12): 1338-1340
- [2] Mestecky J, Suzuki H, Yanagihara T, et al. IgA nephropathy: current views of immune complex formation [J]. *Contrib Nephrol*, 2007, 157: 56-63
- [3] 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): 186-193
- [4] Qiu W, Zhou J, Zhu G, et al. Sublytic C5b-9 triggers glomerular mesangial cell apoptosis via XAF1 gene activation mediated by p300-dependent IRF-1 acetylation [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1176
- [5] Liu L, Qiu W, Wang H, et al. Sublytic C5b-9 complexes induce apoptosis of glomerular mesangial cells in rats with Thy-1 nephritis through role of interferon regulatory factor-1-dependent caspase 8 activation [J]. *J Biol Chem*,

- 2012,287(20):16410-16423
- [6] Qiu W,Che N,Feng X,et al. Apoptosis of glomerular mesangial cells induced by sublytic C5b-9 complexes in rats with Thy-1 nephritis is dependent on Gadd45 gamma upregulation [J]. Eur J Immunol,2009,39 (11):3251-3266
- [7] Thompson MR,Xu D,Williams BR. ATF3 transcription factor and its emerging roles in immunity and cancer[J]. J Mol Med(Berl),2009,87(11):1053-1060
- [8] Zhou H,Guo H,Zong J,et al. ATF3 regulates multiple targets and may play a dual role in cardiac hypertrophy and injury[J]. Int J Cardiol,2014,174(3):838-839
- [9] Hellmann J,Tang Y,Zhang MJ,et al. Atf3 negatively regulates Ptg2/Cox2 expression during acute inflammation [J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2015,116-117:49-56
- [10] Wang Z,Xu D,Ding HF,et al. Loss of ATF3 promotes Akt activation and prostate cancer development in a Pten knockout mouse model[J]. Oncogene,2015,34 (38): 4975-4984
- [11] Pu H,Wang X,Su L,et al. Heroin activates ATF3 and CytC via c-Jun N-terminal kinase pathways to mediate neuronal apoptosis[J]. Med Sci Monit Basic Res,2015,21: 53-62
- [12] Ma S,Pang C,Song L,et al. Activating transcription factor 3 is overexpressed in human glioma and its knockdown in glioblastoma cells causes growth inhibition both in vitro and in vivo[J]. Int J Mol Med,2015,35 (6):1561-1573
- [13] Park GH,Park JH,Song HM,et al. Anti-cancer activity of Ginger (Zingiber officinale) leaf through the expression of activating transcription factor 3 in human colorectal cancer cells [J]. BMC Complement Altern Med,2014,14:408
- [14] Yang Z,Song L,Huang C. Gadd45 proteins as critical signal transducers linking NF-kappaB to MAPK cascades [J]. Curr Cancer Drug Tar,2009,9(8):915-930
- [15] Cretu A,Sha X,Tront J,et al. Stress sensor Gadd45 genes as therapeutic targets in cancer[J]. Cancer Ther,2009,7 (A):268-276
- [16] Notas G,Alexaki VI,Kampa M,et al. APRIL binding to BCMA activates a JNK2-FOXO3-GADD45 pathway and induces a G2/M cell growth arrest in liver cells[J]. J Immunol,2012,189(10):4748-4758
- [17] Saha A,Kuzuhara T,Echigo N,et al. Apoptosis of human lung cancer cells by curcumin mediated through up-regulation of "growth arrest and DNA damage inducible genes 45 and 153" [J]. Biol Pharm Bull,2010,33 (8): 1291-1299
- [18] Xu K,Zhou Y,Qiu W,et al. Activating transcription factor 3 (ATF3) promotes sublytic C5b-9-induced glomerular mesangial cells apoptosis through up-regulation of Gadd45 alpha and KLF6 gene expression [J]. Immunobiology,2011,216(8):871-881
- [19] Wang Y,He Q,Qin H,et al. The complement C5b-9 complexes induced injury of glomerular mesangial cells in rats with Thy-1 nephritis by increasing nitric oxide synthesis[J]. Life Sci,2006,79(2):182-192

[收稿日期] 2015-07-09



欢迎投稿 欢迎订閱