

· 基础研究 ·

## 大鼠 MIP-1 $\alpha$ 基因启动子荧光素酶报告质粒的构建及其 IRF-8 结合元件的初步鉴定

钱宝梅, 王文博, 罗 灿, 张 婧, 赵 聃, 王迎伟, 邱 文\*

南京医科大学基础医学院免疫学系, 江苏 南京 211166

**[摘要]** **目的:** 构建大鼠巨噬细胞炎性蛋白-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ ) 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 (HEK-293T) 中过表达干扰素调节因子-8 (interferon regulatory factor-8, IRF-8) 对 MIP-1 $\alpha$  基因启动活性的影响, 同时筛选其可能的 IRF-8 结合元件。**方法:** 采用 PCR 技术, 扩增出大鼠 MIP-1 $\alpha$  基因启动子序列, 将 MIP-1 $\alpha$  基因启动子插入到荧光素酶报告基因载体 pGL3-basic 中, 构建 MIP-1 $\alpha$  基因启动子全长荧光素酶报告质粒 (pGL3-MIP-1 $\alpha$ -FL)。将上述 pGL3-MIP-1 $\alpha$ -FL 和本课题组已构建的大鼠 IRF-8 过表达质粒 (pIRES2-IRF-8) 共转染 HEK-293T 细胞, 检测细胞内荧光素酶活性, 确定 IRF-8 对 MIP-1 $\alpha$  基因的启动作用。同时, 应用生物信息学软件预测 MIP-1 $\alpha$  基因启动子上 IRF-8 的结合元件, 并据此构建 3 个 MIP-1 $\alpha$  基因启动子截短的荧光素酶报告质粒 (pGL3-MIP-1 $\alpha$ -1~3)。将上述 MIP-1 $\alpha$  基因启动子全长和各截短的荧光素酶报告质粒和 IRF-8 过表达质粒共转染 HEK-293T 细胞, 再测定荧光素酶活性, 初步确定 IRF-8 的结合元件。**结果:** 菌液 PCR 及核酸测序证实, 上述 pGL3-MIP-1 $\alpha$ -FL (-1 400~+94 nt) 质粒构建成功。将 pGL3-MIP-1 $\alpha$ -FL 和 pIRES2-IRF-8 共转染 HEK-293T 后发现, 过表达 IRF-8 可显著增加 MIP-1 $\alpha$  基因启动子活性。应用生物信息学软件预测发现 MIP-1 $\alpha$  基因启动子上 IRF-8 的结合元件 (-1 157~-1 144nt, -740~-734 nt, -683~-670 nt, -365~-359 nt, -249~-236 nt), 并据此构建 3 个 MIP-1 $\alpha$  基因启动子截短的荧光素酶报告质粒, 即 pGL3-MIP-1 $\alpha$ -1 (-453~+94 nt)、pGL3-MIP-1 $\alpha$ -2 (-352~+94 nt) 和 pGL3-MIP-1 $\alpha$ -3 (-3~+94 nt)。将 pGL3-MIP-1 $\alpha$ -FL、pGL3-MIP-1 $\alpha$ -1~3 和 pIRES2-IRF-8 共转染 HEK-293T 后发现, pGL3-MIP-1 $\alpha$ -3 的启动活性显著低于 pGL3-MIP-1 $\alpha$ -FL、pGL3-MIP-1 $\alpha$ -1 和 pGL3-MIP-1 $\alpha$ -2。提示 IRF-8 可能结合在大鼠 MIP-1 $\alpha$  基因启动子的 -352~-3 nt 区域的 IRF-8 结合元件 (-249~-236 nt) 上。**结论:** 本实验成功构建了大鼠 MIP-1 $\alpha$  基因启动子全长及截短荧光素酶报告质粒, 并初步筛选出 IRF-8 在 MIP-1 $\alpha$  基因启动子上的可能结合元件, 为后续研究奠定了基础。

**[关键词]** 巨噬细胞炎性蛋白-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ); 干扰素调节因子-8 (IRF-8); 启动子

**[中图分类号]** Q756

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2019)01-010-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20190102

### Construction of luciferase reporter plasmids of rat MIP - 1 $\alpha$ promoter and initial identification of IRF-8 binding element

Qian Baomei, Wang Wenbo, Luo Can, Zhang Jing, Zhao Dan, Wang Yingwei, Qiu Wen\*

Department of Immunology, School of Basic Medicine, NMU, Nanjing 211166, China

**[Abstract]** **Objective:** To construct luciferase reporter plasmids of full-length and truncated promoters of rat macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) gene and detect their activity in HEK-293T cells in response to interferon regulatory factor-8 (IRF-8) overexpression, screening the possible binding elements for IRF-8. **Methods:** Rat MIP-1 $\alpha$  promoter was amplified by PCR and cloned into the luciferase reporter plasmid (pGL3-basic). The recombinant plasmid (pGL3-MIP-1 $\alpha$ -FL) and rat IRF-8 overexpression plasmid (pIRES2-IRF-8) were co-transfected into HEK-293T cells and then the luciferase activity was detected to determine the role of IRF-8 in MIP-1 $\alpha$  gene transcription. Meanwhile, the potential IRF-8 binding elements within MIP-1 $\alpha$  promoter were predicted by using bioinformatics software. Based on the predicted results, three luciferase reporter plasmids of truncated MIP-1 $\alpha$  gene promoter (pGL3-MIP-1 $\alpha$ -1~3) were constructed. The promoter luciferase reporter plasmids of pGL3-MIP-1 $\alpha$ -FL or pGL3-MIP-1 $\alpha$ -1~3 and the plasmid of pIRES2-IRF-8 were co-transfected into HEK-293T cells. Then, the luciferase activity was detected to screen the IRF-8 binding

**[基金项目]** 国家自然科学基金(31470853, 81471626); 南京医科大学优秀中青年教师支持计划

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

elements. **Results:** It was verified that pGL3-MIP-1 $\alpha$ -FL (-1 400~+94 nt) plasmid was constructed correctly by PCR analysis and nucleotide sequencing. The plasmids of pGL3-MIP-1 $\alpha$ -FL and pIRES2-IRF-8 were co-transfected into HEK-293T cells, and then the luciferase activity of MIP-1 $\alpha$  gene promoter was markedly increased in response to IRF-8 overexpression. The potential IRF-8 binding elements (-1 157~-1 144 nt, -740~-734 nt, -683~-670 nt, -365~-359 nt, and -249~-236 nt) within MIP-1 $\alpha$  promoter were predicted by using bioinformatics software. Based on the predicted results, we constructed three luciferase reporter plasmids of truncated MIP-1 $\alpha$  gene promoter, namely pGL3-MIP-1 $\alpha$ -1(-453~+94 nt), pGL3-MIP-1 $\alpha$ -2(-352~+94 nt) and pGL3-MIP-1 $\alpha$ -3(-3~+94 nt). The plasmids of pGL3-MIP-1 $\alpha$ -FL or pGL3-MIP-1 $\alpha$ -1~3 and pIRES2-IRF-8 were co-transfected into HEK-293T cells, and the result displayed that the activity of pGL3-MIP-1 $\alpha$ -3 was much lower than that in pGL3-MIP-1 $\alpha$ -FL, pGL3-MIP-1 $\alpha$ -1 and pGL3-MIP-1 $\alpha$ -2, indicating that the region of rat MIP-1 $\alpha$  promoter(-352~-3 nt) might contain an IRF-8 binding element(-249~-236 nt). **Conclusion:** The rat full-length and truncated rat MIP-1 $\alpha$  promoter luciferase reporter plasmids were constructed successfully, and the possible IRF-8 binding element was found, which could be beneficial to further studies.

[Key words] macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ (MIP1- $\alpha$ ); interferon regulatory factor-8(IRF-8); promoter

[Acta Univ Med Nanjing, 2019, 39(01): 010-015]

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,其发病率约占临床肾活检病例的40%<sup>[1-2]</sup>。MsPGN的主要病理变化是肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cells, GMCs)异常增生及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度分泌,最终引起肾小球纤维化<sup>[3-4]</sup>。但是MsPGN的病因及致病机制至今不明。

大鼠Thy-1肾炎(Thy-1N)是公认的一种研究人类MsPGN的动物模型<sup>[5-6]</sup>。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,继而激活补体引起炎症反应。已知,补体C5b-9复合物是Thy-1N免疫性炎症损伤的重要启动原<sup>[7-8]</sup>,而病变过程中继发的巨噬细胞(M $\phi$ )浸润也与肾损伤关系密切<sup>[5,9-10]</sup>。补体对靶细胞的作用分为溶解型(lytic)和亚溶解型(sublytic)两种<sup>[11]</sup>。Lytic C5b-9可使靶细胞穿孔破坏,而sublytic C5b-9则能刺激靶细胞,开启多条信号通路或上调多种转录因子<sup>[12-13]</sup>,诱导细胞分泌一些炎症或趋化因子,引发炎症反应<sup>[14-15]</sup>。本课题组前期的研究发现,Thy-1N大鼠肾组织(体内)和受sublytic C5b-9刺激的大鼠GMCs(体外)中巨噬细胞炎性蛋白-1 $\alpha$ (macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ )即C-C家族趋化因子配体3(chemokine C-C motif ligand 3, CCL3)的表达均明显上调。提示sublytic C5b-9作为疾病的启动原,能刺激GMCs产生巨噬细胞趋化因子MIP-1 $\alpha$ ,并招募巨噬细胞,进而促进了肾组织的炎性损伤。

为了寻找调控MIP-1 $\alpha$ 基因的转录调控机制,本课题前期的实验又筛查了Thy-1N大鼠肾组织和受sublytic C5b-9刺激的大鼠GMCs中上调表达的转录因子,尤其是对干扰素调节因子(interferon regulato-

ry factors, IRFs)家族的9个成员进行了检查。对比发现,IRF-8的表达在体内外均显著上调,且其峰值略早于MIP-1 $\alpha$ 。IRF-8也称作干扰素保守序列结合蛋白(ICSBP),是IRFs的重要成员,其基因定位在人16q24.1,编码区为1 281 bp,蛋白质由426个氨基酸组成<sup>[16]</sup>。已发现IRF-8可调节细胞的增殖、分化和自噬等行为<sup>[17-18]</sup>。此外,近年来研究还表明,IRF-8能促进靶细胞合成一些趋化因子,诱发机体炎症反应。例如,有学者指出,IRF-8可与PU.1和核因子(NF)- $\kappa$ B结合成复合物,进而增强其DNA结合结构域(DNA-binding domain, DBD)与DNA的结合能力和促进巨噬细胞中Rantes基因的转录<sup>[19]</sup>。Nardi等<sup>[20]</sup>还报道,IRF-8可上调B细胞中CCL6和CCL9基因的表达,从而抑制由转染原癌基因BCR-ABL诱导的小鼠B细胞白血病。

我们前期的研究已经证实,在大鼠GMCs中过表达IRF-8可上调MIP-1 $\alpha$ 基因的表达,生物信息学软件预测亦揭示大鼠MIP-1 $\alpha$ 启动子区含有多个IRF-8结合元件。但是,有关sublytic C5b-9能否通过上调IRF-8直接启动大鼠GMCs中MIP-1 $\alpha$ 基因转录,目前尚不清楚。鉴于此,本实验构建了大鼠MIP-1 $\alpha$ 基因启动子(全长和截短)的荧光素酶报告质粒,与大鼠IRF-8过表达质粒共转染HEK-293T细胞,研究IRF-8对MIP-1 $\alpha$ 基因的启动情况,同时筛选IRF-8在MIP-1 $\alpha$ 基因启动子上可能的结合区域,拟为进一步研究IRF-8启动MIP-1 $\alpha$ 基因转录在sublytic C5b-9诱导大鼠Thy-1N病变中所起的作用提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

HEK-293T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-8 过表达质粒 (pIRES2-IRF-8) 由本实验室前期构建。组织基因组 DNA 提取试剂盒由北京天根生化技术有限公司提供。Phanta<sup>®</sup> Max Super-Fidelity DNA Polymerase 由南京诺唯赞生物科技有限公司提供。限制性内切酶 *Kpn* I、*Xho* I 和 T4 DNA 连接酶均购自日本 TaKaRa 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 MIP-1 $\alpha$  DNA 序列 (NC\_005109.4), 利用 Primer 5.0 软件辅助设计针对 MIP-1 $\alpha$  基因启动子区 (-1 400 ~ +94 nt) 的引物, 然后应用 GenePlan 和 JASPAR 软

件预测 MIP-1 $\alpha$  基因启动子区域 IRF-8 结合元件, 并根据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、*Xho* I 酶切元件序列 (表 1)。

### 1.2.2 大鼠 MIP-1 $\alpha$ 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 Phanta<sup>®</sup> Max Super-Fidelity DNA Polymerase, 进行 PCR 反应, 扩增大鼠 MIP-1 $\alpha$  基因启动子全长和截短序列。引物序列见表 1, 其中下划线分别表示 *Kpn* I、*Xho* I 酶切元件, GG、CCG 代表保护性碱基。PCR 扩增条件如下: 95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 63.3  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 60 s, 循环 30 次后; 72  $^{\circ}$ C 最后延伸 5 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 MIP-1 $\alpha$  基因启动子 (全长和截短) 的引物序列

Table 1 The primers for rat MIP-1 $\alpha$  gene full-length and truncated promoter

名称	引物序列	位置
全长	上游: 5'-GGG <u>G</u> TACCACGCAAGCATTTCGCATAC-3' 下游: 5'-CCGCTCGAGCAAGGGCAGCGGTGGA-3'	-1 400 ~ +94 nt
1号截短	上游: 5'-GGG <u>G</u> TACCAGCCCCTCCTGGTGGTG-3' 下游: 5'-CCGCTCGAGCAAGGGCAGCGGTGGA-3'	-453 ~ +94 nt
2号截短	上游: 5'-GGG <u>G</u> TACCTGGCAAGGAACGGGGTT-3' 下游: 5'-CCGCTCGAGCAAGGGCAGCGGTGGA-3'	-352 ~ +94 nt
3号截短	上游: 5'-GGG <u>G</u> TACCACAAGAGGCAGCGAGTAC-3' 下游: 5'-CCGCTCGAGCAAGGGCAGCGGTGGA-3'	-3 ~ +94 nt

### 1.2.3 大鼠 MIP-1 $\alpha$ 基因启动子 (全长和截短) 荧光素酶报告质粒的构建与鉴定

将 pGL3-basic 和上述不同 PCR 产物用 *Kpn* I 和 *Xho* I 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  $^{\circ}$ C 过夜), 将连接产物转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 并涂布于含 Amp 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 Amp 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 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-MIP-1 $\alpha$ -FL (全长)、pGL3-MIP-1 $\alpha$ -1 (1号截短)、pGL3-MIP-1 $\alpha$ -2 (2号截短) 和 pGL3-MIP-1 $\alpha$ -3 (3号截短)。

### 1.2.4 重组质粒转染 HEK-293T 细胞

将 HEK-293T 细胞接种于 24 孔板中 (1  $\times$  10<sup>5</sup> 个/孔), 培养过夜, 待细胞融合度达到 70% 时, 用 Lipo-

fectamine 2000 转染试剂将 pIRES2-IRF-8、pRL-SV40 分别与 MIP-1 $\alpha$  基因启动子质粒 (pGL3-MIP-1 $\alpha$ -FL、pGL3-MIP-1 $\alpha$ -1、pGL3-MIP-1 $\alpha$ -2 或 pGL3-MIP-1 $\alpha$ -3) 共转染 HEK-293T 细胞。其中 pRL-SV40 作为转染率内参照, 实验同时设转染 pGL3 空载质粒 (pGL3-basic) 作为对照。

### 1.2.5 荧光素酶活性的测定

质粒转染 HEK-293T 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 MIP-1 $\alpha$  基因启动子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 (M1)/内参照 pRL-SV40 质粒的海肾荧光素酶活性 (M2), 即为被检测质粒的相对荧光素酶活性 (RLU)。

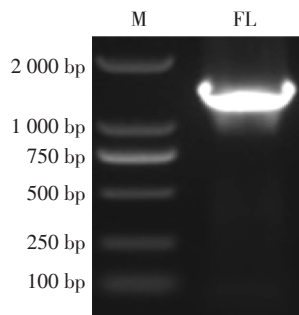
## 1.3 统计学方法

定量数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS 19.0 软件进行方差分析和 Bonferroni 法进行两两比较,  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 大鼠MIP-1 $\alpha$ 基因启动子荧光素酶报告质粒的构建与鉴定

PCR扩增大鼠MIP-1 $\alpha$ 基因启动子全长(-1 400 ~ +94 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MIP-1 $\alpha$ 基因启动子全长荧光素酶报告质粒已成功构建(命名为pGL3-MIP-1 $\alpha$ -FL)。



M: marker; FL: pGL3-MIP-1 $\alpha$ -FL质粒菌液PCR扩增产物。

图1 琼脂糖凝胶电泳

Figure 1 Agarose gel electrophoresis

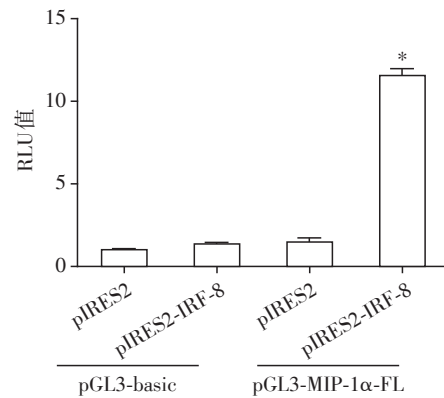
### 2.2 IRF-8过表达对于大鼠MIP-1 $\alpha$ 基因启动子全长活性的影响

将pGL3-basic、pGL3-MIP-1 $\alpha$ -FL、pRL-SV40、pIRES2、pIRES2-IRF-8行不同组合转染HEK-293T细胞,转染后48 h裂解细胞进行双荧光素酶报告基因检测。结果显示,共转染pGL3-MIP-1 $\alpha$ -FL和pIRES2-IRF-8的细胞,其RLU值显著高于其他组(图2)。提示IRF-8过表达能够促进MIP-1 $\alpha$ 基因的转录。

### 2.3 大鼠MIP-1 $\alpha$ 基因启动子(各截短)荧光素酶报告质粒的构建

#### 2.3.1 大鼠MIP-1 $\alpha$ 基因启动子截短位置的确定

为进一步研究MIP-1 $\alpha$ 基因启动子区IRF-8可能的结合元件,应用生物信息学软件GenePlan和JASPAR进行了IRF-8结合元件的预测。结果表明,在MIP-1 $\alpha$ 基因启动子区域共含有5个可能的IRF-8结合元件,具体位置见表2。据此设计了3对引物以扩增MIP-1 $\alpha$ 基因启动子各截短序列,引物序列见表1。拟扩增MIP-1 $\alpha$ 基因启动子3个截短的长度分别为547 bp(-453 ~ +94 nt)、446 bp(-352 ~ +94 nt)和97 bp(-3 ~ +94 nt)。



检测各转染组HEK-293T细胞中荧光素酶活性( $n=3$ )。与其他转染组比较, $P < 0.01$ 。

图2 IRF-8对于大鼠MIP-1 $\alpha$ 基因启动子全长活性的影响

Figure 2 The effect of IRF-8 on the activity of rat MIP-1 $\alpha$  gene promoter (full-length)

表2 GenePlan 和 JASPAR 预测的大鼠MIP-1 $\alpha$ 基因启动子区IRF-8结合元件

Table 2 IRF-8 binding elements within rat MIP-1 $\alpha$  gene promoter predicted by GenePlan and JASPAR

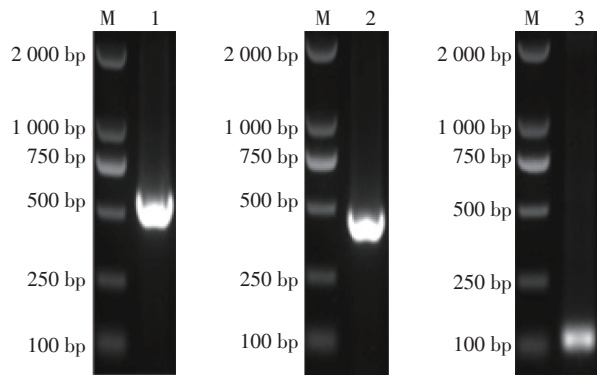
预测的IRF-8结合元件	位置
1	-1 157 ~ -1 144 nt
2	-740 ~ -734 nt
3	-683 ~ -670 nt
4	-365 ~ -359 nt
5	-249 ~ -236 nt

### 2.3.2 大鼠MIP-1 $\alpha$ 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测序结果亦显示插入序列及插入方向均正确。表明大鼠MIP-1 $\alpha$ 基因启动子截短荧光素酶报告质粒即pGL3-MIP-1 $\alpha$ -1(-453 ~ +94 nt)、pGL3-MIP-1 $\alpha$ -2(-352 ~ +94 nt)和pGL3-MIP-1 $\alpha$ -3(-3 ~ +94 nt)已构建成功,可用于后续研究。

### 2.4 IRF-8过表达对于大鼠MIP-1 $\alpha$ 基因启动子各截短活性的影响

将MIP-1 $\alpha$ 基因启动子全长(pGL3-MIP-1 $\alpha$ -FL)和各截短荧光素酶报告质粒(pGL3-MIP-1 $\alpha$ -1~3)分别与pIRES2-IRF-8质粒共转染HEK-293T细胞,检测其荧光素酶活性。由图4可以看到,转染pGL3-MIP-1 $\alpha$ -3质粒细胞的RLU值与转染pGL3-MIP-1 $\alpha$ -FL、pGL3-MIP-1 $\alpha$ -1、pGL3-MIP-1 $\alpha$ -2质粒组相比,其RLU值显著降低。提示在MIP-1 $\alpha$ 基因启动子上,IRF-8的结合元件可能存在于-352 ~ -3 nt区域,而

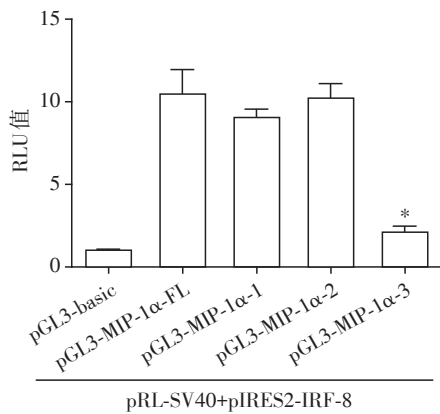


菌液 PCR 扩增产物(M:marker; 1:pGL3-MIP-1α-1 质粒; 2:pGL3-MIP-1α-2 质粒; 3:pGL3-MIP-1α-3 质粒)。

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

此区域含有生物信息学软件预测的 IRF-8 结合元件 (-249 ~ -236 nt, 5'-TCATAAGAGAACT-3')。



检测各转染组 HEK-293T 细胞中荧光素酶活性(n=3)。与 pGL3-MIP-1α-FL、pGL3-MIP-1α-1、pGL3-MIP-1α-2 转染组比较, \*P < 0.01。

图4 IRF-8 对于大鼠 MIP-1α 基因启动子各截短活性的影响  
Figure 4 The effects of IRF-8 on the activity of different truncated rat MIP-1α 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<sup>[7-8]</sup>。本课题组前期研究已揭示, 大鼠 Thy-1N 早期, 肾小球内有 sublytic C5b-9 沉积, 其伴有 Mφ 细胞浸润<sup>[5, 9-10]</sup>。在 Thy-1N 发病早期和体外用 sublytic C5b-9 刺激 GMCs 后能够增加转录因子 IRF-8 和 Mφ 细胞趋化因子 MIP-1α 基因的表达。进一步研究发现, IRF-8 可正向调控大鼠 GMCs 中 MIP-1α 基因的表达。已有学者报道, IRF-8 可以结合到 Rantes、CCL6、CCL9 等趋化因子基因的启动子上, 促进这些

基因转录<sup>[19-20]</sup>。生物信息学软件预测亦揭示大鼠 MIP-1α 启动子区含有多个 IRF-8 的结合元件。故我们推测, 在大鼠 Thy-1N 的发病中, sublytic C5b-9 刺激 GMCs 后, 可能会经过 IRF-8 直接作用于 MIP-1α 基因启动子区域进而激活 MIP-1α 基因转录。

为了研究 IRF-8 促进 MIP-1α 基因转录的作用, 本实验构建了大鼠 MIP-1α 基因启动子全长荧光素酶报告质粒 (pGL3-MIP-1α-FL)。将 pGL3-basic、pGL3-MIP-1α-FL、pRL-SV40、pIRES2、pIRES2-IRF-8 行不同组合转染 HEK-293T 细胞, 然后检测各组细胞荧光素酶活性, 用含有海肾荧光素酶的 pRL-SV40 质粒作为内参照, 以消除转染效率的影响。结果发现, 将 pGL3-MIP-1α-FL 与 pIRES2-IRF-8 共转染后, 其荧光素酶活性明显高于其他转染组。提示 IRF-8 作为转录因子能够启动大鼠 MIP-1α 基因的转录, 这与本课题组前期实验发现的“IRF-8 过表达促进大鼠 GMCs 中 MIP-1α 基因表达”的实验结果是一致的。

为了确定大鼠 IRF-8 与 MIP-1α 基因启动子的结合元件, 先通过 GenePlan 和 JASPAR 软件预测发现了大鼠 MIP-1α 基因启动子区存在 5 个可能的 IRF-8 结合元件, 并据此设计构建了 3 个 MIP-1α 基因启动子(截短)荧光素酶报告质粒, 即 pGL3-MIP-1α-1、pGL3-MIP-1α-2 和 pGL3-MIP-1α-3, 随后将 pGL3-MIP-1α-FL、pGL3-MIP-1α-1、pGL3-MIP-1α-2 和 pGL3-MIP-1α-3 分别与 pIRES2-IRF-8 共转染 HEK-293T 细胞, 再测定各组细胞内荧光素酶活性。结果表明, pGL3-MIP-1α-3 的启动子活性明显低于 pGL3-MIP-1α-FL、pGL3-MIP-1α-1 和 pGL3-MIP-1α-2, 提示 pGL3-MIP-1α-3 与 pGL3-MIP-1α-2 相比, 可能截去了 1 个有效的 IRF-8 结合元件, 而根据上述生物信息学软件预测的结果, 该截短区域(-352 ~ -3 nt)内存在 1 个可能的 IRF-8 结合元件(即-249 ~ -236 nt, 5'-TCATAAGAGAACT-3')。不过, 具体的结合元件及其功能仍有待于染色质免疫沉淀(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 MIP-1α 基因启动子(全长)荧光素酶报告质粒, 并在 HEK-293T 细胞中证实过表达 IRF-8 可促进 MIP-1α 基因启动。与此同时, 根据生物信息学软件预测的 IRF-8 结合元件, 设计并构建了不同的大鼠 MIP-1α 基因启动子截短荧光素酶报告质粒, 并在 HEK-293T 细胞中探讨了过表达 IRF-8 对上述不同启动子区域的激活作用, 初步筛出了其可能的结合元件, 这为今后进一步研究 sublytic C5b-9 刺激大鼠 GMCs 中 MIP-1α 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] Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, et al. Identification of alternatively activated macrophages in new-onset paediatric and adult immunoglobulin A nephropathy: potential role in mesangial matrix expansion [J]. *Histopathology*, 2011, 58(2): 198-210
- [2] Al Hussain T, Hussein MH, Al Mana H, et al. Pathophysiology of IgA nephropathy [J]. *Adv Anat Pathol*, 2017, 24(1): 56-62
- [3] Zhang L, Han C, Ye F, et al. Plasma gelsolin induced glomerular fibrosis via the TGF-beta1/Smads signal transduction pathway in IgA nephropathy [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(2): 390
- [4] Tsai YL, Hua KF, Chen A, et al. NLRP3 inflammasome: Pathogenic role and potential therapeutic target for IgA nephropathy [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41123
- [5] Wang PR, Kitamura H, Shimizu A, et al. Glomerular damage in experimental proliferative glomerulonephritis under glomerular capillary hypertension [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2015, 40(2): 188-199
- [6] Rintala JM, Savikko J, Rintala SE, et al. Epidermal growth factor receptor inhibition with erlotinib ameliorates anti-Thy 1.1 - induced experimental glomerulonephritis [J]. *J Nephrol*, 2016, 29(3): 359-365
- [7] Zhu G, Qiu W, Li Y, et al. Sublytic C5b-9 induces glomerular mesangial cell apoptosis through the cascade pathway of MEKK2-p38 MAPK-IRF-1-TRADD-Caspase 8 in rat Thy-1 nephritis [J]. *J Immunol*, 2017, 198(3): 1104-1118
- [8] Zhang J, Li Y, Shan K, et al. Sublytic C5b-9 induces IL-6 and TGF-beta1 production by glomerular mesangial cells in rat Thy-1 nephritis through p300-mediated C/EBPbeta acetylation [J]. *Faseb J*, 2014, 28(3): 1511-1525
- [9] Ikezumi Y, Kawachi H, Toyabe S, et al. An anti - CD5 monoclonal antibody ameliorates proteinuria and glomerular lesions in rat mesangioproliferative glomerulonephritis [J]. *Kidney Int*, 2000, 58(1): 100-114
- [10] Qin D, Morita H, Inui K, et al. Aldosterone mediates glomerular inflammation in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis [J]. *J Nephrol*, 2013, 26(1): 199-206
- [11] Tan LX, Toops KA, Lakkaraju A. Protective responses to sublytic complement in the retinal pigment epithelium [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(31): 8789-8794
- [12] Fosbrink M, Niculescu F, Rus V, et al. C5b-9-induced endothelial cell proliferation and migration are dependent on Akt inactivation of forkhead transcription factor FOXO1 [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(28): 19009-19018
- [13] He F, Zhou M, Yu T, et al. Sublytic C5b-9 triggers glomerular mesangial cell apoptosis in rat Thy-1 nephritis via Gadd45 activation mediated by Egr-1 and p300-dependent ATF3 acetylation [J]. *J Mol Cell Biol*, 2016, 8(6): 477-491
- [14] Kunchithapautham K, Rohrer B. Sublytic membrane - attack - complex (MAC) activation alters regulated rather than constitutive vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion in retinal pigment epithelium monolayers [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(27): 23717-23724
- [15] Liu J, Jha P, Lyzogubov VV, et al. Relationship between complement membrane attack complex, chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) and vascular endothelial growth factor in mouse model of laser-induced choroidal neovascularization [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(23): 20991-21001
- [16] Sung JY, Park SY, Kim JH, et al. Interferon consensus sequence - binding protein (ICSBP) promotes epithelial - to - mesenchymal transition (EMT) - like phenomena, cell - motility, and invasion via TGF - beta signaling in U2OS cells [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1224
- [17] Sichen D, Scott CL, Martens L, et al. IRF8 transcription factor controls survival and function of terminally differentiated conventional and plasmacytoid dendritic cells, respectively [J]. *Immunity*, 2016, 45(3): 626-640
- [18] Gupta M, Shin DM, Ramakrishna L, et al. IRF8 directs stress - induced autophagy in macrophages and promotes clearance of *Listeria monocytogenes* [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6379
- [19] Liu J, Ma X. Interferon regulatory factor 8 regulates RANTES gene transcription in cooperation with interferon regulatory factor - 1, NF - kappaB, and PU.1 [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(28): 19188-19195
- [20] Nardi V, Naveiras O, Azam M, et al. ICSBP-mediated immune protection against BCR-ABL-induced leukemia requires the CCL6 and CCL9 chemokines [J]. *Blood*, 2009, 113(16): 3813-3820

[收稿日期] 2018-10-24