

· 基础研究 ·

人短链 TSLP 启动子区的克隆鉴定及功能分析

何佳,曹倩,周国平*

南京医科大学第一附属医院儿科,江苏 南京 210029

[摘要] 目的:构建人短链胸腺基质淋巴生成素(short isoform thymic stromal lymphopoietin, sTSLP)启动子全长及其长度不等片段的萤光素酶报告质粒,以确定启动子活性区域并预测功能性转录因子结合位点。方法:使用按基因组序列设计的引物,通过PCR分离人sTSLP启动子片段,并将之插入萤光素酶报告基因载体pGL3-basic中。通过步移缺失构建其截短片段,通过双萤光素酶报告基因系统测定所有启动子缺失克隆在HEK-293细胞中的活性,并使用生物信息学手段预测其潜在的转录结合位点。结果:经菌液PCR、双酶切、测序,成功构建了人sTSLP启动子及其截短片段萤光素酶报告质粒,并确定其启动子活性区域位于5'侧翼区-200~+25 nt区域内,且可能含有SP1/SP3、SPI1/SPIB、TCF3、ETS1等转录因子结合位点。结论:首次对人sTSLP启动子区进行了研究,初步确定了其启动子活性区域及可能的转录因子结合位点,为进一步的研究指明了方向。

[关键词] 胸腺基质淋巴生成素;启动子;转录调控

[中图分类号] Q756

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)01-010-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20200103

Identification and characterization of human short isoform TSLP promoter

HE Jia, CAO Qian, ZHOU Guoping*

Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To identify the regions of the human short isoform thymic stromal lymphopoietin (sTSLP) promoter and to predict the potential transcription factor binding sites. **Methods:** Original human promoter fragments were isolated by PCR, using primers generated from genomic sequences of sTSLP. Amplified fragments were then cloned into the pGL3-basic vector. Five promoter fragments with different length were obtained by walking deletion and cloned into pGL3-basic vector. The vector expression activities were determined by measuring luciferase activity in HEK-293 cells. Its potential transcriptional binding sites were predicted by bioinformatics methods. **Results:** A nested series of deletion constructs of the human sTSLP gene promoter were generated and the core promoter region was determined to be located in the -200~+25 region at the 5' side, which may contain the binding sites of SP1/SP3, SPI1/SPIB, TCF3, ETS1 and other transcription factors. **Conclusion:** It is the first study on the promoter fragments of human sTSLP. The core promoter region was found and the possible transcription factor binding sites were also preliminarily identified, which can be the basis of further study.

[Key words] TSLP; promoter; transcriptional regulation

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(01): 010-014]

胸腺基质淋巴生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)是过敏性疾病中关注度较高的一类先天性淋巴细胞因子,它可以直接或间接激活树突状细胞、T细胞和B细胞,促进2型炎症因子分泌^[1-2],在包括支气管哮喘、特应性皮炎在内的多种过敏性

[基金项目] 国家自然科学基金(81970579)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: guopzhou@126.com

炎症中发挥重要作用^[3-4]。此外,它在上皮细胞、角质形成细胞、树突细胞、肥大细胞等多种细胞内表达,参与黏膜屏障免疫平衡的建立^[5]和机体耐受性的形成^[6],并能在细菌感染中发挥保护作用^[7]。这种双重免疫调节,从功能上而言似乎是矛盾的。这使得对其蛋白异构体的研究引起了关注。现有的研究表明,TSLP不同蛋白异构体受差异调节并分别

参与炎症和抗炎反应。

人TSLP基因转录3种不同的mRNA异构体,但其中只有2种编码功能蛋白。剪切异构体1由4个外显子组成,编码长度为159个氨基酸的长链TSLP(long form thymic stromal lymphopietin, lftTSLP)。异构体2由2个外显子组成,包含lftTSLP的最后63个残基,编码短链TSLP(short isoform thymic stromal lymphopietin, sftTSLP)。sftTSLP大多在健康的组织细胞中表达,并在多种不同细胞中表现出强大的抗炎特性^[8]。在多种疾病模型中,sftTSLP与lftTSLP发挥了截然不同的作用^[9]。目前对lftTSLP,不管是转录调控还是结构功能方面,均有了较为清晰的认识,针对哮喘开发的人TSLP单克隆抗体Tezepelumab也已进入三期临床阶段。而对于sftTSLP的认识尚不深入,其转录调控机制也有待进一步研究。

本研究旨在通过构建人sftTSLP启动子区萤光素酶报告基因重组质粒并通过步移缺失确定人sftTSLP启动子的活性区域,并预测其5'侧翼区中的功能性转录因子结合位点,为更深入地研究人sftTSLP的转录调控机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

人胚肾细胞(HEK-293)、pGL3-basic质粒、pRL-TK(海肾萤光素酶报告质粒)为本实验室保存。DMEM培养基(ThermoScientific公司,美国)。胎牛血清、Opti-MEM培养基(Gibco公司,美国)。大肠杆菌*E.coli* DH5 α (大连宝生物公司)。基因组DNA提取试剂盒、小量切胶回收试剂盒、小量质粒抽提试剂盒(Omega公司,美国)。DNA Marker、限制性内切酶*Mlu* I和*Xho* I、T4 DNA连接酶和TaKaRa Ex Taq保真酶(TaKaRa公司,日本)。质粒转染试剂Lipofectamine™2000脂质体(Invitrogen公司,美国)。双萤光素酶检测试剂盒(Promega公司,美国)。琼脂糖(GENE公司,西班牙)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和基因组DNA的提取

HEK-293细胞以含有10%灭活胎牛血清的高糖DMEM培养基培养,置于37℃、5%CO₂培养箱,2~3d传代1次。实验操作均采用对数期生长细胞。按基因组DNA提取试剂盒操作步骤提取HEK-293细胞全基因组DNA。

1.2.2 PCR引物设计

根据美国国立生物技术中心数据库NCBI中人

sftTSLP基因序列(NC_000005.10),选取其启动子区,即转录起始密码子上游2000bp~起始密码子后200bp共计2200bp大小片段。利用Primer5.0软件设计PCR引物,在引物的5'端分别引入*Mlu* I及*Xho* I限制性内切酶位点。上游:5'-CGACGCGTAG-GAAATGCTCAAAGATGTTTCAG-3';下游:5'-CC-GCTCGAGTGGCTGCTCATAGGCGGCAAA-3'。引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成。

1.2.3 RT-PCR扩增

以步骤1提取的基因组DNA为模板,PCR扩增人sftTSLP基因启动子序列。PCR反应条件:94℃预变性5min,94℃变性30s,62℃退火45s,72℃延伸2min,35个循环,72℃延伸8min。PCR扩增产物以1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.4 质粒构建与鉴定

选取鉴定后的PCR产物,切胶纯化,将所得产物与真核表达载体pGL3-basic经过*Mlu* I及*Xho* I双酶切并纯化,目的片段和载体于37℃连接1h,将连接产物转化至大肠杆菌*E.coli* DH5 α ,均匀涂布于含有氨苄青霉素的固体LB培养基上。37℃培养过夜后挑选单克隆菌落进行菌液PCR验证。PCR阳性组提取质粒后双酶切鉴定阳性克隆,得到阳性重组子并命名为pTSLP-1,再送至擎科公司进行序列测定。

1.2.5 sftTSLP近端启动子区截短质粒的构建

为了鉴定sftTSLP基因启动子的5'侧翼区中的功能性转录因子结合位点,从pGL3-basic萤光素酶载体中构建了一系列启动子区截短片段克隆。具体方法为:以鉴定后的pTSLP-1质粒为模板,通过步移缺失获得长度不等的TSLP基因启动子片段,引物见表1。按上述方法逐步构建相关质粒,分别命名为pTSLP-2、pTSLP-3、pTSLP-4、pTSLP-5、pTSLP-6。

1.2.6 脂质体转染细胞及双萤光素酶报告基因系统检测启动子活性

将生长状态良好的HEK-293细胞按1×10⁴个/孔接种于96孔培养板,待细胞汇集度达到80%~90%时,由脂质体Lipofectamine™2000介导将pGL3-basic和构建成功的TSLP萤光素酶报告基因表达质粒分别与pRL-TK质粒共转染HEK-293细胞,置于5%CO₂、37℃培养箱培养24h。弃培养基,每孔加100μL PBS清洗2遍,加入30μL裂解液后室温震荡45min,按照双萤光素酶检测试剂盒说明测定所有启动子截短克隆在HEK-293细胞系中的活性。将每组相对萤光素酶活性的倍数变化与pGL3-basic基本载体

表1 扩增人TSLP基因启动子区片段引物序列

Table 1 Primers designed for human TSLP gene promotor

引物	位置(nt)	序列(5'→3')	目的片段大小(bp)
pTSLP-1 F	-2 000~+201	CGACGCGTAGGAAATGCTCAAAGATGTTTCAG	2 201
pTSLP-2 F	-600~+201	CGACGCGTACCAGCACTATCTAATGGCTATTTTC	801
pTSLP-3 F	-201~+201	CGACGCGTGTTCCAATTTAGGGAGAGGAAGTC	402
pTSLP-4 F	-44~+201	CGACGCGTAGCGTGGGTGACAGTCTTTT	245
pTSLP-5 F	+25~+201	CGACGCGTGCGGTTGGTTCCTCCTTG	176
pTSLP-6 F	+91~+201	CGACGCGTTCCTCCCTGACCTTCCT	110
pTSLP R		CCGCTCGAGTGGCTGCTCATAGGCGGCAAA	

酶切位点用下划线标出,上游酶切位点为限制性内切酶 *MIU* I,下游酶切位点为限制性内切酶 *Xho* I。

(阴性对照组)相比较。

1.3 统计学方法

采用GraphPad Prism 7及SPSS 22.0软件对数据进行统计分析。实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK法。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人TSLP近端启动子区重组质粒的鉴定

人TSLP基因启动子区PCR扩增后产物经琼脂糖凝胶电泳可见1条大小在2 000 bp左右的条带,与预期的2 200 bp扩增片段大小相同(图1A)。

选取6个生长良好的单克隆菌落扩大培养,并进行菌液PCR验证,所提质粒经 *MIU* I及 *Xho* I双酶切后电泳,可见2条特异性片段,1条约5 000 bp即pGL3-basic载体片段,另1条片段大小约为2 000 bp,与目的片段大小相同(图1B)。核酸序列测定结果提示,此片段核苷酸序列与人TSLP基因启动子区序列一致,说明人sfTSLP基因启动子区已经成功插入pGL3-basic载体中。

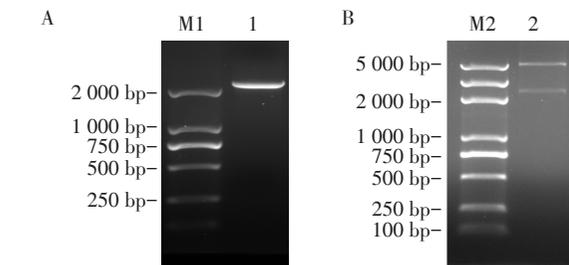


图1 pTSLP-1质粒构建与验证
A: PCR扩增人TSLP基因启动子片段; B: 含人TSLP基因启动子的重组萤光素酶报告质粒pTSLP-1双酶切鉴定。M1: DL2000 DNA Marker; M2: DL5000 DNA Marker; 1: PCR扩增产物; 2: pTSLP-1重组质粒双酶切产物。

Figure 1 Construction and identification of pTSLP-1 recombinant plasmid

2.2 近端启动子区缺失质粒的构建

以构建成功的重组质粒pTSLP-1为模板,步移缺失获得长度不等的sfTSLP基因启动子片段,经双酶切鉴定,核酸电泳显示相应大小的各种缺失片段(图2)。DNA测序结果显示序列相符且插入方向均正确,表明人sfTSLP基因启动子截短萤光素酶报告质粒构建成功,可用于后续研究。

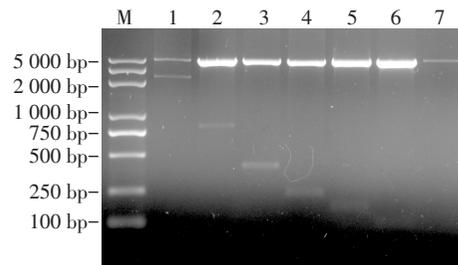


图2 人sfTSLP启动子萤光素酶报告基因重组质粒双酶切鉴定
M: DL5000 DNA Marker; 1: pTSLP-1(-2 000~+201 nt, 插入片段长度2 201 bp); 2: pTSLP-2(-600~+201 nt, 插入片段长度801 bp); 3: pTSLP-3(-201~+201 nt, 插入片段长度402 bp); 4: pTSLP-4(-44~+201 nt, 插入片段长度245 bp); 5: pTSLP-5(+25~+201 nt, 插入片段长度176 bp); 6: pTSLP-6(+91~+201 nt, 插入片段长度110 bp); 7: pGL3-basic。

Figure 2 Identification of luciferase report gene recombinant plasmids of human sfTSLP promoter by double enzyme digestion

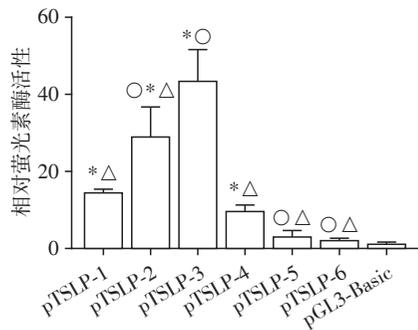
2.3 启动子活性检测

如图3所示,与pGL3-basic对照组(1.00 ± 0.14)相比,重组质粒转染组相对荧光活性分别为 14.21 ± 0.69 、 28.75 ± 4.72 、 43.38 ± 4.83 、 9.63 ± 0.99 、 2.22 ± 0.18 和 1.99 ± 0.15 。比较这6个不同长度的启动子重组质粒转染的HEK-293中相对萤光素酶活性,其中在转染pTSLP-3的细胞中活性最强。pTSLP-5、pTSLP-6与pGL3-basic间无显著差异。pTSLP-3与pTSLP-4、pTSLP-4与pTSLP-5之间均有显著差异($P < 0.05$)。

故推测人sfTSLP的启动子活性区域位于-200~+25 nt 区域。

2.4 人sfTSLP启动子区转录因子结合位点预测

根据上述人TSLP启动子重组质粒的荧光素酶活性检测结果分析,提示-200~+25 nt 区域内可能存在明显影响启动子活性的转录因子结合位点,应用JASPAR对该区域进行分析,获得可能的转录因子结合位点。如图4所示,预测结果提示该序列范围内可能存在SPI1、SPIB、SP1/SP3、ETS1等转录因子结合位点。



与 pGL3-Basic 相比, * $P < 0.05$; 与 pTSLP-3 相比, ^ $P < 0.05$; 与 pTSLP-4 相比, ° $P < 0.05, n \geq 3$ 。

图3 人sfTSLP启动子荧光素酶报告基因重组质粒在HEK-293细胞中相对荧光素酶活性

Figure 3 Analysis of luciferase relative activity in HEK-293 cells of six promoter luciferase report gene recombinant plasmids of human sfTSLP

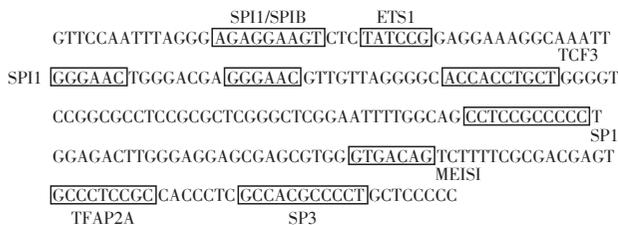


图4 运用JASPAR网站预测转录因子结合位点

Figure 4 Predication of binding sites of transcriptional-factors by JASPAR

3 讨论

胸腺基质淋巴生成素包括短链和长链两种不同的形式,sfTSLP广泛存在于健康的口腔、皮肤、气道、肠道上皮中,是上皮细胞黏膜屏障的重要组成部分,也是稳态条件下表达的主要蛋白异构体^[10]。本研究通过确定人sfTSLP启动子区所在位置,采用步移缺失方式构建6种含不同长度人sfTSLP启动子片段的荧光素酶报告基因质粒,通过瞬时转染和荧光素酶活性检测确定重组质粒的启动子活性,且推测其

核心启动子区位于5'侧翼区-200~+25 nt区域内,这提示在此区域中含有多个转录因子结合位点。

启动子是转录的起始。核心启动子,又称“转录门户”,通常被定义为指导RNA聚合酶II准确启动转录的最小DNA序列^[11]。它是确保正确转录起始的关键,是蛋白质编码基因以及真核生物中许多非编码基因表达的重要组分,但也是真核生物转录调控中容易被忽视的一部分^[12]。TSLP已被证实可受NF- κ B、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)等多种途径调控,但目前研究多是基于lftTSLP启动子区。sfTSLP在C末端区域中与lftTSLP的氨基酸序列完全重叠。但分析其不同表达模式后,发现其与人类TSLP基因座的分析一致,这意味着sfTSLP与lftTSLP间并非简单的交替剪接,而是源自两个独立的启动子区域^[10]。这提示lftTSLP与sfTSLP可能有着完全不同的转录调控途径。

通过构建sfTSLP启动子区荧光素酶报告质粒,确立了其活性区域,同时发现sfTSLP启动子区存在SP1/SP3、SPI1/SPIB、TCF3、ETS1等多种转录因子结合位点。这与其结合许多不同转录因子的高能力相符^[13]。Martin Mena等^[14]发现sfTSLP表达受过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (peroxisome proliferator activated receptor- γ , PPAR- γ)调节,并通过免疫共沉淀验证了PPAR- γ 在功能上与sfTSLP的启动子区结合,是sfTSLP基因的转录调节因子之一。转录因子特异性蛋白1(SPI1)参与多种细胞功能,已有研究发现敲除SPI1能显著降低角质形成细胞中TSLP的表达^[15]。SPI1和SPIB是ETS亚家族转录因子的成员,ETS蛋白共享保守的ETS结构域,其介导特定的DNA结合,在骨髓和B淋巴细胞发育过程中激活基因表达。SPIB可以与MAPK家族中成员结合共同发挥作用。MAPK是普遍表达的信号酶,它在先天免疫应答中具有多种作用,从促炎介质(例如细胞因子和趋化因子)的诱导到抗炎反馈途径的激活均有参与^[16]。

在屋尘螨诱发的哮喘中,sfTSLP能抑制lftTSLP的表达。有研究表明屋尘螨诱发哮喘中lftTSLP表达受MAPK途径调控^[17]。lftTSLP与哮喘的发生、难以控制的嗜酸性粒细胞浸润、类固醇抗性密切相关。而在屋尘螨引起的小鼠哮喘模型中,sfTSLP被证明可以通过抑制炎症反应时ERK1/2和p38的磷酸化及跨膜电阻降低,同时抑制lftTSLP依赖性STAT5磷酸化,从而显著抑制肺泡灌洗液中Th2相关细胞因子的产生和lftTSLP的上调,减弱屋尘螨和

IfTSLP 诱导的气道上皮屏障破坏,降低气道高反应性^[18]。这意味着 sTSLP 与 MAPK 途径密切相关,并可能成为哮喘治疗的新靶点。

本研究构建了 sTSLP 启动子区荧光素酶报告质粒并确立了其活性区域,同时预测了其启动子区存在的多种转录因子结合位点。这为后续的研究指明了方向,但进一步的验证还需更深入的实验证实。

[参考文献]

- [1] LIN S C, CHENG F Y, LIU J J, et al. Expression and regulation of thymic stromal lymphopoietin and thymic stromal lymphopoietin receptor heterocomplex in the Innate-Adaptive immunity of pediatric asthma[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4):E1231
- [2] HIRATA H, YUKAWA T, TANAKA A, et al. Th2 cell differentiation from naive CD4⁺ T cells is enhanced by auto-crine CC chemokines in atopic diseases[J]. *Clin Exp Allergy*, 2019, 49(4):474-483
- [3] 王文璐, 李红岩, 苗伟伟, 等. 布地奈德抑制支气管哮喘小鼠 TSLP 及 Th2 优势免疫作用的研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2012, 32(9):1207-1210
- [4] HAN M, RAJPUT C, HONG J Y, et al. The innate cytokines IL-25, IL-33, and TSLP cooperate in the induction of type 2 innate lymphoid cell expansion and mucous metaplasia in Rhinovirus-Infected immature mice[J]. *J Immunol*, 2017, 199(4):1308-1318
- [5] KOBAYASHI T, VOISIN B, KIM D Y, et al. Homeostatic control of sebaceous glands by innate lymphoid cells regulates commensal bacteria equilibrium[J]. *Cell*, 2019, 176(5):982-997.e16
- [6] CHUA H H, CHOU H C, TUNG Y L, et al. Intestinal dysbiosis featuring abundance of ruminococcus gnavus associates with allergic diseases in infants[J]. *Gastroenterology*, 2018, 154(1):154-167
- [7] KUGELBERG E. Infection: TSLP complements neutrophil killing of bacteria[J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(1):4-5
- [8] BJERKAN L, SCHREURS O, ENGEN S A, et al. The short form of TSLP is constitutively translated in human keratinocytes and has characteristics of an antimicrobial peptide[J]. *Mucosal Immunol*, 2015, 8(1):49-56
- [9] BJERKAN L, SONESSON A, SCHENCK K. Multiple functions of the new Cytokine-Based antimicrobial peptide thymic stromal lymphopoietin (TSLP) [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2016, 9(3):E41
- [10] FORNASE G, TSILINGIRI K, CAPRIOLI F, et al. Dichotomy of short and long thymic stromal lymphopoietin isoforms in inflammatory disorders of the bowel and skin[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 136(2):413-422
- [11] DANINO Y M, EVEN D, IDESES D, et al. The core promoter: At the heart of gene expression [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1849(8):1116-1131
- [12] JUVEN - GERSHON T, KADONAGA J T. Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery [J]. *Dev Biol*, 2010, 339(2):225-229
- [13] VERSTRAETE K, PEELMAN F, BRAUN H, et al. Structure and antagonism of the receptor complex mediated by human TSLP in allergy and asthma [J]. *Nat Commun*, 2017, 8:14937
- [14] MARTIN MENA A, LANGLOIS A, SPECA S, et al. The expression of the short isoform of thymic stromal lymphopoietin in the colon is regulated by the nuclear receptor peroxisome proliferator activated Receptor-Gamma and is impaired during ulcerative colitis [J]. *Front Immunol*, 2017, 8:1052
- [15] BIN L, KIM B E, HALL C F, et al. Inhibition of transcription factor specificity protein 1 alters the gene expression profile of keratinocytes leading to upregulation of kallikrein-related peptidases and thymic stromal lymphopoietin [J]. *J Invest Dermatol*, 2011, 131(11):2213-2222
- [16] KHORASANIZADEH M, ESKIAN M, GELFAND E W, et al. Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets for asthma [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 174:112-126
- [17] MOON P D, KIM H M. Thymic stromal lymphopoietin is expressed and produced by caspase-1/NF-κB pathway in mast cells [J]. *Cytokine*, 2011, 54(3):239-243
- [18] DONG H, HU Y, LIU L, et al. Distinct roles of short and long thymic stromal lymphopoietin isoforms in house dust mite-induced asthmatic airway epithelial barrier disruption [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:39559

[收稿日期] 2019-05-12