

· 基础研究 ·

NF- κ B p65 调控 IRF-8 基因启动子活性及其启动子结合元件的初步鉴定王文博¹, 钱宝梅¹, 罗 灿¹, 彭明玉¹, 张 婧¹, 赵 聃¹, 王迎伟¹, 邱 文^{1*}, 季明德^{2*}¹南京医科大学免疫学系, 江苏 南京 211166; ²江苏省中医院检验科, 江苏 南京 210006

[摘要] **目的:**探讨大鼠核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)p65 亚基在细胞内过表达和其活性变化对干扰素调节因子-8(interferon regulatory factor-8, IRF-8)基因启动子的影响,并初步筛查 IRF-8 启动子上可能的 p65 结合元件。**方法:**采用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术扩增大鼠 p65 基因蛋白编码区(complete sequence coding, CDS)序列,将其插入到空载 pIRES2-EGFP 质粒中,构建大鼠野生型(wild type, WT)p65 过表达质粒(pIRES2-p65 WT)。在此基础上,将 p65 第 535 位丝氨酸(serine, S)突变为天冬氨酸(aspartic, D)或丙氨酸(alanine, A),分别构建 p65 持续活化突变型质粒(pIRES2-p65 S535D)和 p65 显性负性突变型质粒(pIRES2-p65 S535A)。之后应用生物信息学软件预测 IRF-8 基因启动子区 p65 的结合元件,并据此构建 IRF-8 启动子全长(full-length, FL)和 3 个截短的荧光素酶报告质粒,即 pGL3-IRF-8-FL(-1 892 ~ +174 nt)、pGL3-IRF-8-1(-1 360 ~ +174 nt)、pGL3-IRF-8-2(-752 ~ +174 nt)和 pGL3-IRF-8-3(-68 ~ +174 nt)。将上述质粒行不同组合共转染人胚肾 293T(human embryonic kidney 293T, HEK-293T)细胞,Western blot 和荧光素酶实验分别检查 p65 的表达和 IRF-8 的启动子活性,并分析 IRF-8 启动子区可能的 p65 结合元件。**结果:**菌液 PCR 及测序证实上述质粒构建成功。分别将 pIRES2-p65 WT、pIRES2-p65 S535D、pIRES2-p65 S535A 和 pGL3-IRF-8-FL 共转染 HEK-293T,发现过表达 pIRES2-p65 WT 或 pIRES2-p65 S535D 均可明显增加 IRF-8 启动子活性,且以 pIRES2-p65 S535D 更为显著;而过表达 pIRES2-p65 S535A 后,IRF-8 启动子活性无明显变化。将 pGL3-IRF-8-FL、pGL3-IRF-8-1~3 和 pIRES2-p65 S535D 共转染 HEK-293T 后发现,pGL3-IRF-8-3 的启动子活性显著低于 pGL3-IRF-8-FL、pGL3-IRF-8-1 和 pGL3-IRF-8-2,提示大鼠 IRF-8 启动子-752~68 nt 区域可能存在 p65 结合元件。**结论:**在 HEK-293T 细胞内过表达野生型或持续活化突变型 p65 可显著促进 IRF-8 基因的启动,且 p65 与 IRF-8 启动子的结合元件可能位于-752~-68 nt 部位。

[关键词] 核因子- κ B p65(NF- κ B p65);干扰素调节因子-8(IRF-8);启动子;结合元件**[中图分类号]** R329.25**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2020)05-638-07

doi:10.7655/NYDXBNS20200505

The regulatory effects of NF - κ B p65 on IRF - 8 gene promoter activity and initial identification of its binding elementsWANG Wenbo¹, QIAN Baomei¹, LUO Can¹, PENG Mingyu¹, ZHANG Jing¹, ZHAO Dan¹, WANG Yingwei¹, QIU Wen^{1*}, JI Mingde^{2*}¹Department of Immunology, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; ²Department of Laboratory Medicine, Jiangsu Provincial Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210006, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the effect of rat nuclear factor- κ B(NF- κ B)p65 subunit over-expression and its activity changes on the gene promoter activity of interferon regulatory factor-8(IRF-8), and initially screen the possible p65-binding elements within IRF-8 promoter. **Methods:** To construct the rat wild type p65 over-expression plasmid(pIRES2-p65 WT), complete sequence coding(CDS)of rat p65 was amplified by polymerase chain reaction(PCR) and cloned into pIRES2-EGFP. Then, S535D and S535A mutation was done respectively based on the wild type p65 over-expression plasmid to construct p65 constitutively active mutant(pIRES2-p65 S535D)and p65 dominant negative mutant(pIRES2-p65 S535A). The potential p65-binding elements within IRF-8

[基金项目] 国家自然科学基金(31470853,81603358,31770934,81971468)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:37693532@qq.com; qiuwen@njmu.edu.cn

promoter were predicted by using bioinformatics software. Based on the predicted results, luciferase reporter plasmids of full-length (FL) and three truncated IRF-8 gene promoter were constructed, namely pGL3-IRF-8-FL(-1 892~+174 nt), pGL3-IRF-8-1(-1 360~+174 nt), pGL3-IRF-8-2(-752~+174 nt), pGL3-IRF-8-3(-68~+174 nt). The above-mentioned plasmids were co-transfected into human embryonic kidney 293T(HEK-293T) cells in different groups. Then, the expression level of p65 was detected by Western blot, and the promoter activity of IRF-8 was detected by luciferase experiment to screen the p65-binding elements. **Results:** It was verified that above-mentioned plasmid was constructed correctly by PCR analysis and nucleotide sequencing. The plasmids of pIRES2-p65 WT, pIRES2-p65 S535D, pIRES2-p65 S535A were respectively transfected into HEK-293T cells together with pGL3-IRF-8-FL. The luciferase results showed that the activity of IRF-8 promoter was markedly increased in response to pIRES2-p65 WT and pIRES2-p65 S535D, especially the later. However, there was no significant change of IRF-8 promoter activity after over-expression of pIRES2-p65 S535A. The plasmids of pGL3-IRF-8-FL or pGL3-IRF-8-1~3 and pIRES2-p65 were co-transfected into HEK-293T cells, and the result displayed that the activity of pGL3-IRF-8-3 was much lower than that of pGL3-IRF-8-FL, pGL3-IRF-8-1 and pGL3-IRF-8-2, indicating that the region of rat IRF-8 promoter(-752~-68 nt) might contain p65-binding elements. **Conclusion:** Over-expression of wild-type or continuously activated mutant p65 in HEK-293T cells can significantly promote the activity of IRF-8 promoter, and the p65-binding elements in IRF-8 promoter might be located in the -752~-68 nt region.

[Key words] nuclear factor- κ B p65(NF- κ B p65); interferon regulatory factor-8(IRF-8); promoter; binding elements

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(05):638-644]

干扰素调节因子(interferon regulatory factors, IRFs)因其能够调节干扰素(interferon, IFN)及IFN诱导性基因的表达而得名,目前发现IRFs家族共有9个成员,即IRF-1~IRF-9。IRFs的N端为保守的DNA结合区,可形成helix-turn-helix基序,能与靶基因DNA序列(5'-AANNGAAA-3')结合^[1-2]。IRF-8是IRFs家族的重要成员,其基因位于人染色体的16q24.1区域,蛋白质由426个氨基酸组成^[3]。业已发现,IRF-8可调节细胞的活化、增殖、自噬、炎症和趋化因子生成等多种生物学行为^[4-6]。有文献报告,IRF-8可上调经伤寒沙门氏菌、铜绿假单胞菌等感染的小鼠骨髓来源的巨噬细胞中相关凋亡抑制性蛋白的表达,后者通过结合细菌鞭毛蛋白促进炎症小体核苷酸寡聚化结构域样受体家族半胱天冬酶募集结构域蛋白4(nucleotide binding oligomerization domain-like receptor family caspase recruitment domain containing 4, NLRC4)的组装活化,继而引起半胱氨酸天冬氨酸特异蛋白酶-1(caspase-1)的激活及其介导的炎症反应^[7]。又有学者指出,IRF-8表达上调后正向调控幽门螺杆菌感染小鼠所诱导的胃上皮细胞干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)基因的转录,促进小鼠胃黏膜的抗感染免疫^[8]。由此可见,IRF-8作为一种转录因子,在机体炎症、感染等多种疾病中确实发挥了较为重要的作用。需要指出的是,目前国内外学者对IRF-8的研究多集中在其如何调控下游靶基因转录方面,但对IRF-8基因的上游调控鲜有报道。鉴于此,本实验拟对此问题进行

初步探讨。

核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)由Sen等^[9]首次报道于1986年,是一种重要的核转录因子。NF- κ B在体内广泛表达,按照结构功能和合成方式不同,其家族可分为两类:一类是p105和p100,其裂解活化后形成p50和p52;另一类是p65/RelA、RelB和c-Rel。上述亚基之间形成多种同源或异源二聚体,发挥转录调控作用^[10-11]。目前,p65是NF- κ B家族中研究最多的亚基,业已发现,p65可与其靶基因的启动子结合,从而上调靶基因的转录和表达,进而影响相关疾病的发生发展。例如,p65可通过与诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)启动子结合显著促进该基因的转录,从而诱导结肠癌细胞的增殖与迁移^[11]。也有研究指出,在人类弥漫性大B淋巴瘤细胞中,活化的p65可与信号转导及转录激活因子4(signal transducer and activator of transcription 4, STAT4)协同作用于谷草转氨酶2(transglutaminase 2, GOT2)启动子,进而上调GOT2基因的转录和表达,促进B淋巴瘤细胞的增殖^[12]。此外,帕金森患者脑组织中异常表达的 α 突触核蛋白(α -synuclein)可激活小胶质细胞中的p65,后者通过上调白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、核苷酸寡聚化结构域样受体蛋白3(nucleotide binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)基因的转录、表达,引起炎症小体NLRP3的组装活化及其介导的炎症反应,继而加重神经细胞损伤^[6]。

大鼠Thy-1肾炎(Thy-1nephritis, Thy-1N)^[13]是一种研究人类系膜增生性肾小球肾炎(mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN)的动物模型。本课题组前期实验已发现,在Thy-1N大鼠肾组织内和体外受亚溶解型C5b-9(sublytic C5b-9)刺激的大鼠肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cells, GMC)^[14]中,IRF-8的表达和p65的磷酸化均显著上调,且p65磷酸化时相略早于IRF-8的表达。与此同时,抑制p65活性后,IRF-8的表达亦被显著下调,生物信息学软件预测亦表明大鼠IRF-8启动子区含有多个p65结合元件。提示p65可能是调控Thy-1N大鼠GMC中IRF-8基因表达的上游因子。为了证实NF-κB p65亚基调控IRF-8基因转录的作用,本实验构建了大鼠p65过表达质粒(包括野生型、持续活化突变型和显性负性突变型^[15])以及大鼠IRF-8基因启动子(全长和截短)荧光素酶报告质粒,将上述质粒行不同组合共转染HEK-293T工具细胞,观察前述不同p65质粒对大鼠IRF-8基因启动的影响,同时筛选IRF-8启动子区域可能的p65结合序列,为后续深入探讨Thy-1N大鼠GMC中活化或上调的p65和IRF-8之间的关系及其IRF-8上游的调控机制提供有价值的实验数据。

1 材料和方法

1.1 材料

人胚肾293T(HEK-293T)细胞购自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC)。pGL3-Basic、pRL-SV40荧光素酶报告质粒以及双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Promega公司,美国)。血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒(北京天根生化技术有限公司)。高保真酶PrimeSTAR@ Max DNA Polymerase、限制性内切酶Xho I、Sac II和T4 DNA连接酶(TaKaRa公司,日本)。琼脂糖凝胶回收试剂盒(南京翼飞雪生物科技有限公司)。单克隆兔源性NF-κB p65抗体、单克隆兔源性HA标签抗体(Cell Signaling Technology公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

通过Nucleotide数据库查找大鼠p65基因mRNA序列(NM_199267.2)和大鼠IRF-8基因DNA序列(NC_005118.4),利用Primer 5.0软件设计表达连接有HA标签的大鼠p65基因CDS区序列的引物,引物上下游分别加入酶切位点和保护性碱基序列。上游引物:5'-CCGCTCGAGGCCATGTACCCA-

TA-CGATGTTCCAGATTACGCTGACGATCTGTT-3';下游引物:5'-TCCCCGCGGGCCCCTCAAATGCTGGT-3'。下划线分别表示Xho I、Sac II酶切位点,CCG、TCC为保护性碱基。用Primer 5.0软件设计针对IRF-8基因启动子全长(-1 892~+174)的引物,然后应用JASPAR软件预测IRF-8启动子区域p65的可能结合元件(表1),根据预测的结合元件设计启动子各截短片段,并用Primer 5.0软件设计相应的引物。启动子全长与截短的扩增引物序列见表2(下划线分别表示Sac I、Hind III酶切元件,C、CCC为保护性碱基)。

表1 JASPAR预测IRF-8启动子区p65结合元件
Table 1 p65-binding elements in the IRF-8 promoter predicted by JASPAR

预测结合序列	位置
TGGAATTCTC	-1 653~-1 644 nt
CAGGGTTTCC	-1 437~-1 428 nt
CCGGCTTTCC	-1 101~-1 090 nt
GGAAATCCCC	-840~-831 nt
GGTACTTTAC	-585~-576 nt
GGAAAGCACT	-293~-284 nt

1.2.2 目的基因的扩增

提取大鼠GMC总RNA,反转录为cDNA,此外提取大鼠GMC基因组DNA,以cDNA或DNA为模板,用PrimeSTAR@ Max DNA Polymerase进行PCR反应,反应体系:PrimeSTAR Max Premix(2×)25 μL,上、下游引物各2 μL,cDNA或DNA模板2 μL,灭菌双蒸水19 μL;反应程序:95℃变性10 s;55℃退火5 s,72℃延伸2 min,循环35次;扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳后进行割胶纯化回收(表2)。

1.2.3 质粒的构建与鉴定

将pIRES2-EGFP空载质粒与p65基因CDS区PCR产物分别用Xho I和Sac II双酶切,然后行1.5%琼脂糖凝胶电泳割胶回收,再用T4 DNA连接酶对二者进行连接反应,并将连接产物转化至感受态细胞DH5α中。将其均匀涂布于含卡那霉素的LB平板表面,37℃培养12 h,挑取单个菌落接种于5 mL含卡那霉素的LB培养液中,37℃培养过夜。取培养后的菌液1 μL进行PCR反应,筛选出的阳性克隆送往通用生物系统(安徽)有限公司测序鉴定,将构建成功的质粒命名为pIRES2-p65 WT。以pIRES2-p65 WT过表达质粒为基础,将535位丝氨酸(S)分别突变为天冬氨酸(D)和丙氨酸(A),即p65持续活化突变型质粒(pIRES2-p65 S535D)和p65显性负性突变型质粒(pIRES2-p65 S535A)。同法构建pGL3-

表2 扩增大鼠IRF-8基因启动子(全长和截短)的引物序列

Table 2 Primers for rat IRF-8 gene full-length and truncated promoter

名称	引物序列	位置
全长	上游:5'-CGAGCTCGCTTTCAATTGACATAGC-3'	-1 892~ +174 nt
	下游:5'-CCCAAGCTTCTTGAAGATTGAAGCGTC-3'	
截短1	上游:5'-CGAGCTCTCCAGTCCCCAGCAAGGG-3'	-1 360~ +174 nt
	下游:5'-CCCAAGCTTCTTGAAGATTGAAGCGTC-3'	
截短2	上游:5'-CGAGCTCGCCGGTGAGAATGTCTAA-3'	-752~ +174 nt
	下游:5'-CCCAAGCTTCTTGAAGATTGAAGCGTC-3'	
截短3	上游:5'-CGAGCTCTGTCTGTCCGGTCCCGGA-3'	-68~ +174 nt
	下游:5'-CCCAAGCTTCTTGAAGATTGAAGCGTC-3'	

IRF-8-FL质粒,应用JASPAR软件预测IRF-8启动子区域p65的可能结合元件(表1),据此预测结果构建各截短质粒。

1.2.4 重组质粒转染HEK-293T细胞及其蛋白表达鉴定

用Neon™细胞电转染系统将pIRES2-EGFP质粒转染至HEK-293T细胞,倒置显微镜下观察绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的表达,评估转染效率。之后,按以下分组转染质粒至HEK-293T细胞:即pIRES2-EGFP、pIRES2-p65 WT、pIRES2-p65 S535D和pIRES2-p65 S535A组,48 h后Western blot检测t-p65与HA标签的表达以评估外源性p65的过表达效率;Western blot大致过程如下:HEK-293T细胞中加入裂解液放置于冰上进行裂解,随后将裂解物转移至EP管中进行煮沸从而使蛋白变性,之后上样进行SDS-PAGE电泳,再将蛋白转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜上。PVDF膜经5%脱脂奶粉封闭后于一抗中孵育(4℃过夜),TBST洗涤10 min×5次。将PVDF膜放进二抗中孵育(室温45 min),洗涤后加入ECL发光液进行曝光。

1.2.5 荧光素酶活性的测定

将上述质粒行不同组合共转染HEK-293T细胞,48 h后裂解细胞,用双荧光素酶报告基因试剂盒测定IRF-8基因启动子活性。具体如下:将处理好的样本放置于Modulus™荧光计中检测数值,此数值为目的基因的萤火虫荧光素酶活性(M1);加入终止液后再次于荧光计中检测数值,此数值为内参照pRL-SV40质粒的海肾荧光素酶活性(M2)。最终结果以M1/M2表示,即为被检测细胞中的相对荧光素酶活性(relative luciferase activity, RLU)。

1.3 统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件进行统计学分析。所

得定量数据均以均数±标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示。采用方差分析和Bonferroni法进行两两比较, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

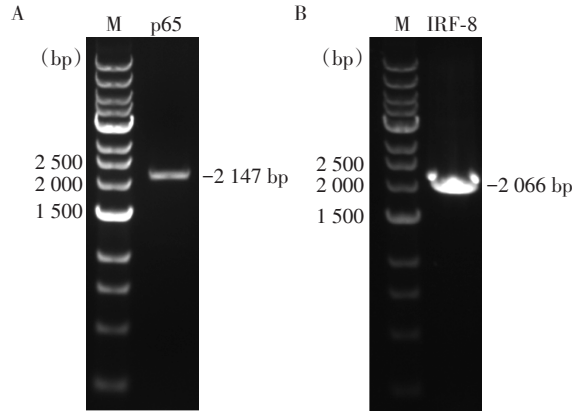
2.1 大鼠p65过表达质粒及IRF-8启动子荧光素酶报告质粒的构建与鉴定

PCR扩增大鼠p65基因CDS区序列,同时连接HA标签,将其插入到pIRES2-EGFP空载质粒。重组质粒经菌液PCR筛出阳性克隆后(图1A)送公司测序,结果显示其序列及插入方向均正确,表明大鼠野生型p65过表达质粒已构建成功,将其命名为pIRES2-p65 WT。随后,将pIRES2-p65 WT的第535位丝氨酸(S)突变为天冬氨酸(D)或丙氨酸(A),即构建p65持续活化突变型质粒(pIRES2-p65 S535D)和p65显性负性突变型质粒(pIRES2-p65 S535A)。

PCR扩增大鼠IRF-8基因启动子序列后,将其插入到pGL3-basic空载质粒。重组质粒经菌液PCR筛出阳性克隆后(图1B)送公司测序,将构建成功的质粒命名为pGL3-IRF-8-FL。应用JASPAR软件预测IRF-8启动子区域p65的可能结合元件,据此构建各截短质粒,分别命名为IRF-8启动子1号截短质粒即pGL3-IRF-8-1(-1 360~ +174 nt)、IRF-8启动子2号截短质粒即pGL3-IRF-8-2(-752~ +174 nt)和IRF-8启动子3号截短质粒即pGL3-IRF-8-3(-68~ +174 nt)。

2.2 p65过表达质粒转染效率和表达水平的测定

通过Neon™电转染系统将pIRES2-EGFP质粒转染HEK-293T细胞,荧光显微镜下观察GFP的表达情况。结果显示,pIRES2-EGFP质粒电转染HEK-293T细胞后48 h,GFP显著表达,转染效率达80%左右(图2A)。随后,按以下分组将不同质粒转染至HEK-293T细胞(即pIRES2-EGFP组、pIRES2-p65 WT组、pIRES2-p65 S535D组和pIRES2-p65 S535A



A: 大鼠 p65 过表达质粒菌液 PCR 电泳条带; B: 大鼠 IRF-8 全长启动子质粒菌液 PCR 电泳条带。

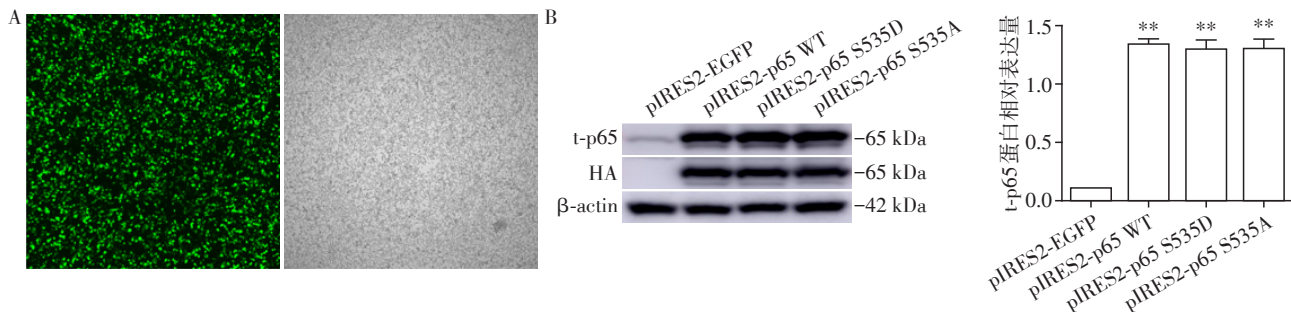
图1 p65 过表达质粒与 IRF-8 启动子全长质粒的菌液 PCR 鉴定

Figure 1 PCR identification of p65 over-expression plasmid and IRF-8 gene promoter full-length luciferase reporter plasmid

组),通过 Western blot 检查 t-p65 与 HA 标签的表达情况。结果表明,大鼠野生型、持续活化突变型、显性阴性突变型 p65 质粒均可在 HEK-293T 细胞中显著表达外源性 p65 蛋白(图 2B)。

2.3 p65 过表达对大鼠 IRF-8 基因全长启动子活性的影响

将 pIRES2-EGFP、pIRES2-p65 WT、pIRES2-p65 S535D 和 pIRES2-p65 S535A 质粒分别与 pGL3-IRF-8-FL、pRL-SV40 质粒共转染 HEK-293T 细胞,于转染后 48 h 裂解细胞行双荧光素酶报告基因检测。结果显示,pIRES2-p65 WT 和 pIRES2-p65 S535D 转染组,其 RLU 值明显高于 pIRES2-EGFP 及 pIRES2-p65 S535A 转染组,且以 pIRES2-p65 S535D 转染组上调最为显著(图 3)。提示,p65 过表达能够启动 IRF-8 基因转录,且以过表达持续活化突变型 p65 (pIRES2-p65 S535D)作用最为显著,对于显性阴性



A: pIRES2-EGFP 质粒转染 HEK-293T 细胞后 48 h, GFP 的表达情况(左:荧光;右:白光,×100); B: 将 pIRES2-EGFP、pIRES2-p65 WT、pIRES2-p65 S535D 和 pIRES2-p65 S535A 分别转染至 HEK-293T 细胞后 48 h, Western blot 检查 t-p65 蛋白和 HA 标签的表达水平(左:电泳条带;右:直方图,与 pIRES2-EGFP 比较,** $P < 0.01, n=3$)。

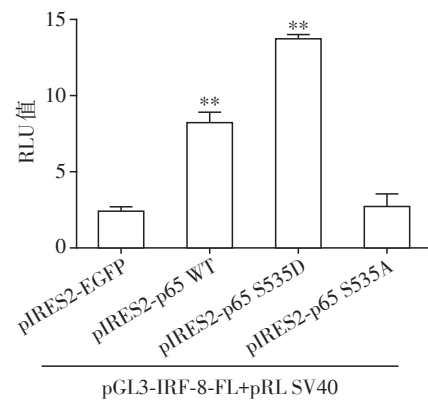
图2 HEK-293T 细胞中 pIRES2-EGFP 质粒转染效率的评估和 p65 表达水平的测定

Figure 2 Transfection efficiency of pIRES2-EGFP and p65 protein expression in HEK-293T cells

突变型 p65 (pIRES2-p65 S535A) 而言,可能由于结构改变导致其失去了启动 IRF-8 基因转录的功能,故其 RLU 值与空载对照组相比未见明显差异($P > 0.05$)。因此,在后续实验中,将探讨过表达 pIRES2-p65 S535D 质粒对大鼠 IRF-8 基因各截短启动子活性的影响。

2.4 p65 过表达对大鼠 IRF-8 基因各截短启动子活性的影响

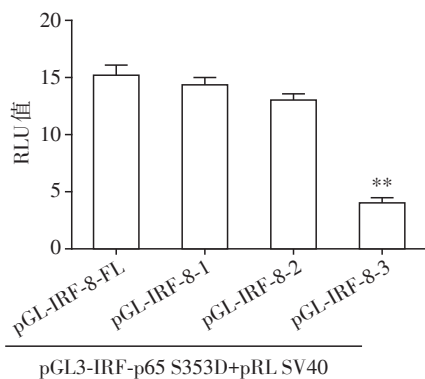
将 IRF-8 基因启动子全长(pGL3-IRF-8-FL)、各截短启动子质粒(pGL3-IRF-8-1、pGL3-IRF-8-2 和 pGL3-IRF-8-3)分别与 pIRES2-p65 S535D 质粒共转染 HEK-293T 细胞后 48 h,检测其启动子活性。结果如图 4 所示,转染 pGL3-IRF-8-3 (-68 ~ +174 nt) 质粒的细胞其 RLU 值显著低于转染 pGL3-IRF-8-FL



HEK-293T 细胞中转染不同质粒后 IRF-8 基因的启动子活性荧光素酶活性(与 pIRES2-EGFP 比较,** $P < 0.01, n=5$)。

图3 p65 过表达对大鼠 IRF-8 基因启动子全长活性的影响
Figure 3 The effect of p65 over-expression on rat IRF-8 promoter activity (full-length)

(-1 892~ +174 nt)、pGL3-IRF-8-1(-1 360~ +174 nt)和 pGL3-IRF-8-2(-752~ +174 nt)质粒细胞的RLU值。提示p65的结合元件可能存在于IRF-8基因启动子-752~-68 nt区域,而此段DNA序列含有JASPAR软件预测的p65结合元件(-585~-576 nt、-293~-284 nt)。



检测各转染组HEK-293T细胞中荧光素酶活性(与pGL3-IRF-8-FL比较,** $P < 0.01, n=5$)。

图4 过表达持续活化突变型p65对大鼠IRF-8基因启动子各截短活性的影响

Figure 4 The effects of constitutively active mutant p65 over-expression on different truncated rat IRF-8 promoter activity

3 讨论

业已发现,作为IRFs家族的一员,IRF-8可调节细胞的活化、增殖、分化和炎症等多种生物学功能^[4,16-17]。有学者指出IRF-8参与调控IFN- γ 与CC趋化因子3(C-C motif chemokine ligand 3, CCL3)等多种促炎因子和趋化因子的基因启动与表达^[8,18],但截至目前有关IRF-8基因的自身转录调控因素及其分子机制并不十分清楚。p65是在多种炎症反应和免疫应答中发挥关键作用的NF- κ B复合体的亚基,其活性受自身磷酸化修饰调节。有文献报道,p65可结合其下游靶基因,如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6、iNOS和GOT2等的启动子区域,从而上调这些基因的转录水平^[11-12,19]。但是,p65能否直接结合IRF-8基因启动子促进其基因转录目前尚不知晓。本课题组前期实验发现:人类MsPGN的动物模型即大鼠Thy-1N肾组织内和体外受sublytic C5b-9刺激的大鼠GMC中,其IRF-8的表达和p65的磷酸化均显著上调,且抑制p65活性后,IRF-8的表达可显著下调;生物信息学软件预测亦表明大鼠IRF-8启动子区含有多个p65结合元件。上述实验结果提示,p65可能是调控Thy-1N大鼠

GMC中IRF-8基因表达的上游转录因子。

为了探讨p65是否具有直接促进IRF-8基因转录的作用及其可能的结合位点,本实验构建了大鼠野生型、持续活化突变型、显性负性突变型p65过表达质粒(即pIRES2-p65 WT、pIRES2-p65 S535D和pIRES2-p65 S535A),同时构建了大鼠IRF-8基因启动子全长荧光素酶报告质粒(pGL3-IRF-8-FL)。之后,利用工具细胞HEK-293T进行相关研究,即将pIRES2-p65 WT、pIRES2-p65 S535D或pIRES2-p65 S535A质粒分别与pGL3-IRF-8-FL质粒共转染HEK-293T细胞,然后测定各组细胞荧光素酶活性。结果发现,pIRES2-p65 WT转染组和pIRES2-p65 S535D转染组,其荧光素酶活性明显高于pIRES2-EGFP转染组和pIRES2-p65 S535A转染组,且以pIRES2-p65 S535D转染组升高最显著。提示过表达p65能够促进IRF-8基因启动转录,且过表达持续活化突变型p65作用最为显著,可作为有效的p65过表达载体,而显性负性突变型p65无明显作用,是良好的阴性对照载体。

为了进一步确定大鼠p65与IRF-8基因启动子的结合部位,用JASPAR软件预测发现了大鼠IRF-8基因启动子区可能存在的p65结合元件,并据此设计不同截短序列后构建了3个IRF-8基因启动子截短的荧光素酶报告质粒,即pGL3-IRF-8-1(-1 360~ +174 nt)、pGL3-IRF-8-2(-752~ +174 nt)和pGL3-IRF-8-3(-68~ +174 nt),将上述质粒分别与持续活化突变型p65过表达质粒(pIRES2-p65 S535D)共转染HEK-293T细胞,检测各组细胞内荧光素酶活性。结果表明,pGL3-IRF-8-3转染组其启动子活性明显低于pGL3-IRF-8-FL、pGL3-IRF-8-1和pGL3-IRF-8-2转染组,提示pGL3-IRF-8-3与pGL3-IRF-8-2质粒相比,可能截去了有效的p65结合元件,即IRF-8启动子-752~-68 nt区域可能存在有效的p65结合元件。而根据JASPAR预测的结果,该DNA序列具有2个可能的IRF-8结合元件,即-585~-576 nt (GGTACTTTAC)和-293~-284 nt (GGAAAGCACT)。然而,具体的p65结合元件及其确切功能仍有待于染色质免疫沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)实验和启动子突变实验进一步验证。

众所周知,基因的转录调控本身是一件十分精细和复杂的生物学过程。本研究为了探讨p65影响IRF-8基因启动的作用及其与IRF-8启动子可能的结合元件,利用HEK-293T工具细胞进行了相关的

实验,取得了上述研究结果。鉴于本课题前期在Thy-1N大鼠的GMC中发现:p65的磷酸化时相稍早于IRF-8的升高,且两者之间的关系目前尚不明了,因此本文认为:应用HEK-293T工具细胞进行实验获得的上述结果可为今后深入研究Thy-1N大鼠GMC中p65与IRF-8之间的关系及其IRF-8基因转录的调控机制提供有用的实验数据。

[参考文献]

- [1] DE IOANNES P, ESCALANTE C R, AGGARWAL A K. Structures of apo IRF-3 and IRF-7 DNA binding domains: effect of loop L1 on DNA binding[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(16): 7300-7307
- [2] SJOSTRAND M, JOHANSSON A, AQRAWI L, et al. The expression of BAFF is controlled by IRF transcription factors[J]. *J Immunol*, 2016, 196(1): 91-96
- [3] SUNG J Y, PARK S Y, KIM J H, 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
- [4] SICHIEN D, SCOTT C L, 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
- [5] LANGLAIS D, BARREIRO L B, GROS P. The macrophage IRF8/IRF1 regulome is required for protection against infections and is associated with chronic inflammation[J]. *J Exp Med*, 2016, 213(4): 585-603
- [6] PANICKER N, SARKAR S, HARISCHANDRA D S, et al. Fyn kinase regulates misfolded alpha-synuclein uptake and NLRP3 inflammasome activation in microglia [J]. *J Exp Med*, 2019, 216(6): 1411-1430
- [7] KARKI R, LEE E, PLACE D, et al. IRF8 regulates transcription of naips for NLRC4 inflammasome activation [J]. *Cell*, 2018, 173(4): 920-933
- [8] YAN M, WANG H, SUN J, et al. Cutting edge: Expression of IRF8 in gastric epithelial cells confers protective innate immunity against helicobacter pylori infection [J]. *J Immunol*, 2016, 196(5): 1999-2003
- [9] SEN R, BALTIMORE D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences [J]. *Cell*, 1986, 46(5): 705-716
- [10] XIAO X, PUTATUNDA R, ZHANG Y, et al. Lymphotoxin beta receptor-mediated NFkappaB signaling promotes glial lineage differentiation and inhibits neuronal lineage differentiation in mouse brain neural stem/progenitor cells [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 49
- [11] GAO Y, XIAO X, ZHANG C, et al. Melatonin synergizes the chemotherapeutic effect of 5-fluorouracil in colon cancer by suppressing PI3K/AKT and NF-kappaB/iNOS signaling pathways[J]. *J Pineal Res*, 2017, 62(2): e12380
- [12] FEIST M, SCHWARZFISCHER P, HEINRICH P, et al. Cooperative STAT/NF-kappaB signaling regulates lymphoma metabolic reprogramming and aberrant GOT2 expression[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1514
- [13] LU T, FAN Z, HOU J, et al. Loquat leaf polysaccharides improve glomerular injury in rats with anti-Thy 1 nephritis via peroxisome proliferator-activated receptor alpha pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(6): 3531-3542
- [14] YU T, WANG L, ZHAO C, et al. Sublytic C5b-9 induces proliferation of glomerular mesangial cells via ERK5/MZF1/RGC-32 axis activated by FBXO28-TRAF6 complex[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(8): 5654-5671
- [15] SASAKI C Y, BARBERI T J, GHOSH P, et al. Phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 defines an I{kappa}B{alpha}-independent NF-{kappa}B pathway [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(41): 34538-34547
- [16] WANG H, JAIN S, LI P, et al. Transcription factors IRF8 and PU.1 are required for follicular B cell development and BCL6-driven germinal center responses [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(19): 9511-9520
- [17] ELIZONDO D M, BRANDY N Z D, DA SILVA R L L, et al. Allograft inflammatory factor-1 governs hematopoietic stem cell differentiation into cDC1 and monocyte-derived dendritic cells through IRF8 and RelB in vitro [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 173
- [18] 钱宝梅, 王文博, 罗 灿, 等. 大鼠MIP-1 α 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[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(1): 10-15
- [19] SOMADE O T, AJAYI B O, SAFIRIYU O A, et al. Renal and testicular up-regulation of pro-inflammatory chemokines(RANTES and CCL2)and cytokines(TNF-alpha, IL-1beta, IL-6) following acute edible camphor administration is through activation of NF-kB in rats [J]. *Toxicol Rep*, 2019, 6: 759-767

[收稿日期] 2019-11-17