

# 大鼠 IL-6 基因启动子荧光素酶报告质粒的构建及其与 C/EBP $\beta$ 结合位点的鉴定

庞蓉蓉,李妍,张婧,单锴,邱文,何凤霞,赵聃,王迎伟\*

(南京医科大学微生物与免疫学系,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:构建大鼠 IL-6 基因启动子(全长和截短)荧光素酶报告质粒并予鉴定,观察人胚肾细胞(HEK293)中过表达 CCAAT/增强子结合蛋白  $\beta$ (CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$ , C/EBP  $\beta$ )对该质粒基因启动子活性的影响。同时,筛选 C/EBP  $\beta$  与 IL-6 基因启动子区的结合位点。方法:采用 PCR 技术,扩增出大鼠 IL-6 基因启动子全长序列(-1 791~ +30 nt),将 IL-6 基因启动子插入荧光素酶报告基因载体 pGL3-basic 中。将 IL-6 基因启动子全长荧光素酶报告质粒(pGL3-IL-6-1)和大鼠野生型 C/EBP  $\beta$  表达质粒(pIRES2-EGFP-C/EBP  $\beta$ )共转染 HEK293 细胞,检测其荧光素酶活性,确定 C/EBP  $\beta$  对 IL-6 基因的启动作用。另用生物信息学软件预测 IL-6 基因启动子上 C/EBP  $\beta$  潜在的结合位点,并构建 IL-6 基因启动子截短的荧光素酶报告质粒(即 pGL3-IL-6-2~5)。将上述 IL-6 基因启动子全长和各截短的荧光素酶报告质粒和 C/EBP  $\beta$  过表达质粒共转染 HEK293 细胞,再行荧光素酶活性测定,筛选出 C/EBP  $\beta$  的结合位点。结果:菌液 PCR 及核酸测序证实,上述荧光素酶报告质粒均构建成功。将 pGL3-IL-6-1 和 pIRES2-EGFP-C/EBP  $\beta$  共转染 HEK293 细胞发现,IL-6 基因启动子活性显著增加。另将 pGL3-IL-6-1、pGL3-IL-6-2~5 和 pIRES2-EGFP-C/EBP  $\beta$  共转染 HEK293 细胞后发现,pGL3-IL-6-5 的启动活性显著低于其他组。提示 C/EBP  $\beta$  可能结合在 IL-6 基因启动子的-618 bp~ -126 bp 区域。结论:成功构建了大鼠 IL-6 基因启动子全长及截短荧光素酶报告质粒,并初步筛查出了 C/EBP  $\beta$  在 IL-6 基因启动子上的结合部位。

**[关键词]** IL-6;CCAAT/增强子结合蛋白  $\beta$ (C/EBP  $\beta$ );荧光素酶报告质粒;启动子活性

**[中图分类号]** Q939.91

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)06-722-06

**doi:**10.7655/NYDXBNS20130602

## Construction of rat IL-6 promoter plasmid and identification of its binding sequence with C/EBP $\beta$

Pang Rongrong, Li Yan, Zhang Jing, Shan Kai, Qiu Wen, He Fengxia, Zhao Dan, Wang Yingwei\*

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

**[Abstract]** **Objective:** To construct luciferase reporter plasmids of full-length and truncated promoters of rat IL-6 gene and detect their activity in HEK293 cells in response to CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$  (C/EBP  $\beta$ ) overexpression, screening the possible binding sites for C/EBP  $\beta$ . **Methods:** Rat IL-6 promoter (-1 791~+30 nt) was amplified by PCR and cloned into the luciferase reporter plasmid (pGL3-basic). The recombinant plasmid (pGL3-IL-6-1) and rat C/EBP  $\beta$  expression plasmid (pIRES2-EGFP-C/EBP  $\beta$ ) were co-transfected into HEK-293 cells and then the luciferase activity was detected to determine the role of C/EBP  $\beta$  in IL-6 gene transcription. Meanwhile, the potential C/EBP  $\beta$  binding sites within IL-6 promoter were predicted by using bioinformatics software. Based on the predicted results, different luciferase reporter plasmids of truncated IL-6 gene promoter that named pGL3-IL-6-2~5 were constructed. The promoter luciferase reporter plasmids of pGL3-IL-6-1 or pGL3-IL-6-2~5 and the plasmid of pIRES2-EGFP-C/EBP  $\beta$  were co-transfected into HEK293 cells. Then, the luciferase activity was detected to screen the C/EBP  $\beta$  binding sites. **Results:** It was verified that different kinds of plasmids were all constructed correctly by PCR analysis and nucleotide sequencing. The plasmids of pGL3-IL-6-1 and pIRES2-EGFP-C/EBP  $\beta$  were also co-transfected into HEK293 cells, and then the luciferase activity was detected. The results showed that the transcriptional activity of IL-6 gene was increased markedly in response to C/EBP  $\beta$  over-

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助(81072402, 81273333)

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

expression. In addition, the plasmids of pGL3-IL-6-1 or pGL3-IL-6-2~5 and pIRES2-EGFP-C/EBP  $\beta$  were co-transfected into HEK293 cells, and then the luciferase activity in different groups was also determined. The result displayed that the activity of pGL3-IL-6-5 was remarkably lower than that in other groups, indicating that the region of rat IL-6 promoter (-618~126 nt) might contain C/EBP  $\beta$  binding element. **Conclusion:** The rat full-length and truncated rat IL-6 promoter luciferase reporter plasmids were constructed successfully, and the C/EBP  $\beta$  binding region was identified.

[Key words] IL-6; CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$  (C/EBP  $\beta$ ); luciferase reporter plasmid; promoter activity

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(6): 722-727]

大鼠 Thy-1 肾炎 (Thy-1 nephritis, Thy-1N), 又名抗胸腺细胞血清性肾炎 (anti-thymocyte serum nephritis, ATSN), 是一种研究人类系膜增生性肾小球肾炎 (mesangioproliferative glomerulonephritis, MsPGN) 的良好模型。Thy-1N 发病特点为具有补体 C5b-9 依赖性<sup>[1]</sup>。有文献报道, 补体 C5b-9 对靶细胞的作用有全溶解型 (lytic) 和亚溶解型 (sublytic) 两种类型<sup>[2-3]</sup>, lytic C5b-9 可使靶细胞穿孔破坏或产生渗透效应, 而 sublytic C5b-9 则能刺激靶细胞, 触发一系列生化事件, 导致细胞炎症、凋亡与增生<sup>[2,4]</sup>。本课题组前期研究已发现, Thy-1N 发病早期, 大多 GMC 在 C5b-9 攻膜后并未发生溶解反应, 反而呈现出某些信号转导途径的激活, 导致炎症介质或细胞因子的大量释放<sup>[1,5-7]</sup>, 提示此种现象与 sublytic C5b-9 的作用有一定的关系。

业已发现, sublytic C5b-9 诱导大鼠肾小球系膜细胞 (glomerular mesangial cell, GMC) 产生炎症因子和介质时不仅涉及到某些信号转导通路的活化, 也可能与某些核转录因子的上调表达进而启动炎症相关基因的表达明显相关。因此, 为了寻找 sublytic C5b-9 刺激 GMC 上调某些关键的核转录因子, 本研究前期工作已用基因芯片筛查了 Thy-1N 大鼠肾组织基因表达谱的变化, 并与体外同期用 sublytic C5b-9 直接刺激 GMC 后的基因表达谱变化进行了比对, 结果发现了一些体内外同期上调表达的核转录因子, 如 CCAAT 增强子结合蛋白  $\beta$  (CCAAT enhancer binding protein  $\beta$ , C/EBP  $\beta$ ) 便是其中的一个。

C/EBP  $\beta$  是 C/EBPs 家族 (即 C/EBP  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\varepsilon$  和  $\zeta$ ) 的成员之一, 广泛表达于多种组织, 能独立或与其他蛋白结合构成复合物。一方面能直接参与细胞的增殖、分化等多种过程; 另一方面在其被诱导上调表达后, 可形成同源二聚体, 或者与 C/EBP  $\alpha$ 、C/EBP  $\gamma$  或 C/EBP  $\delta$  形成异源二聚体结合在 DNA 特定的调节区域, 调控相应的基因转录<sup>[8]</sup>。

在 Thy-1N 病变的过程中, 肾小球微环境中的致炎因素较为复杂<sup>[9]</sup>, 本课题组前期研究已经证实,

Thy-1N 大鼠早期肾组织中 C/EBP  $\beta$ 、IL-6 的表达均显著增加, 且 IL-6 随时间的变化趋势与 C/EBP  $\beta$  的变化基本一致。本实验用生物信息学软件预测显示, 大鼠 IL-6 基因启动子上含有 C/EBP  $\beta$  的结合区域。综合以上因素, 本文推测, C/EBP  $\beta$  作为一种 IL-6 的上游基因, 可能在 sublytic C5b-9 刺激 GMC 诱导的一系列生化事件中调控着 IL-6 的合成。

为了证实上述的推测, 本实验首先构建了大鼠 IL-6 基因启动子 (全长和截短) 的荧光素酶报告质粒, 并与 C/EBP  $\beta$  过表达质粒共转染 HEK293 细胞, 以研究 C/EBP  $\beta$  对 IL-6 基因的启动情况, 同时筛选了 C/EBP  $\beta$  在 IL-6 基因启动子上可能的结合区域, 拟为进一步研究 IL-6 基因在 sublytic C5b-9 导致的炎性病变中所起的作用提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

HEK293 人胚肾细胞 (ATCC 公司, 美国); GMC (武汉大学中国典型培养物保藏中心)。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 (Promega 公司, 美国)。C/EBP  $\beta$  过表达质粒 (pIRES2-EGFP-C/EBP  $\beta$ ) 为本课题组前期构建并能成功表达。组织基因组 DNA 提取试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司)。PrimeS-TAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase (TaKaRa 公司, 日本)。限制性内切酶 *Kpn* I, *Bgl* II 和 T4 DNA 连接酶 (NEB 公司, 美国)。以上试剂盒的使用均按生产厂家提供的说明书操作。Western blot 所用大鼠 IL-6 抗体 (R&D 公司, 美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 引物设计与大鼠 IL-6 基因启动子序列扩增

登陆 NCBI, 搜索 GenBank 数据库中的大鼠 IL-6 DNA 序列 (Gene ID: 24498), 利用 Primer 5.0 软件辅助设计针对 IL-6 基因启动子区 (-1 791~+30 nt) 的引物, 应用 TF Search 软件预测 IL-6 基因启动子区域全部的 C/EBP  $\beta$  结合位点, 根据软件预测结果

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、*Bgl* II 酶切位点序列(表1)。以大鼠基因组 DNA 为模板,应用 PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase 进行 PCR 反应,扩增大鼠 IL-6 基因启动子序列(全长和截短)。

### 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。

表1 扩增大鼠 IL-6 基因启动子(全长和截短)的引物序列

Table 1 The primers for rat IL-6 gene full-length and truncated promoter

名称	引物序列(5'→3')	位置
全长	上游:5' GCGCGTACCGGCACCACTTGTAGGACCAT 3' 下游:5' GCGCAGATCTCCTTCACTTACTTGCGGAGA 3'	-1 791~ +30 nt
1号截短	上游:5' GCGCGTACCGCTTCAATAGGCAGTTTCTCGT 3' 下游:5' GCGCAGATCTCCTTCACTTACTTGCGGAGA 3'	-1 392~ +30 nt
2号截短	上游:5' GCGCGTACCGGCAGCAGTGGGATCA 3' 下游:5' GCGCAGATCTCCTTCACTTACTTGCGGAGA 3'	-890~ +30 nt
3号截短	上游:5' GCGCGTACCTATGCAGCAGGCATCACTAC 3' 下游:5' GCGCAGATCTCCTTCACTTACTTGCGGAGA 3'	-618~ +30 nt
4号截短	上游:5' GCGCGTACCTTCCCATGAGTCTCAAAAGT 3' 下游:5' GCGCAGATCTCCTTCACTTACTTGCGGAGA 3'	-126~ +30 nt

下划线分别表示 *Kpn* I、*Bgl* II 酶切位点,CGGC 代表保护性碱基。

### 1.2.3 大鼠 IL-6 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 *Kpn* I 和 *Bgl* II 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℃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℃培养 14 h 后挑取菌落接种于 3 ml 含 Amp 的 LB 培养液中。取培养后的菌液(1  $\mu$ l)用上述引物分别进行 PCR 扩增,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-IL-6-1(全长)、pGL3-IL-6-2(1号截短)、pGL3-IL-6-3(2号截短)、pGL3-IL-6-4(3号截短)、pGL3-IL-6-5(4号截短)。

### 1.2.4 重组质粒转染 HEK293 细胞

将 HEK293 细胞接种于 24 孔板中 ( $1 \times 10^5$  个/孔)培养,待细胞融合度达到 70%时,用 GenEscort<sup>™</sup> III 转染试剂将 pIRES2-EGFP-C/EBP  $\beta$ 、pRL-SV40 分别与上述 5 种 IL-6 基因启动子质粒分别共转染 HEK-293 细胞。其中 pRL-SV40 作为转染率内参照,实验同时设转染 pGL3 空质粒(pGL3-basic)和未转染组作为对照。

### 1.2.5 荧光素酶活性的测定

质粒转染 HEK293 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上述

IL-6 基因启动子质粒的荧光活性,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(RLU)。

### 1.3 统计学方法

所得数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS17.0 统计软件进行方差分析和 Bonfferoni 检验, $P \leq 0.05$  为差异具有显著性。

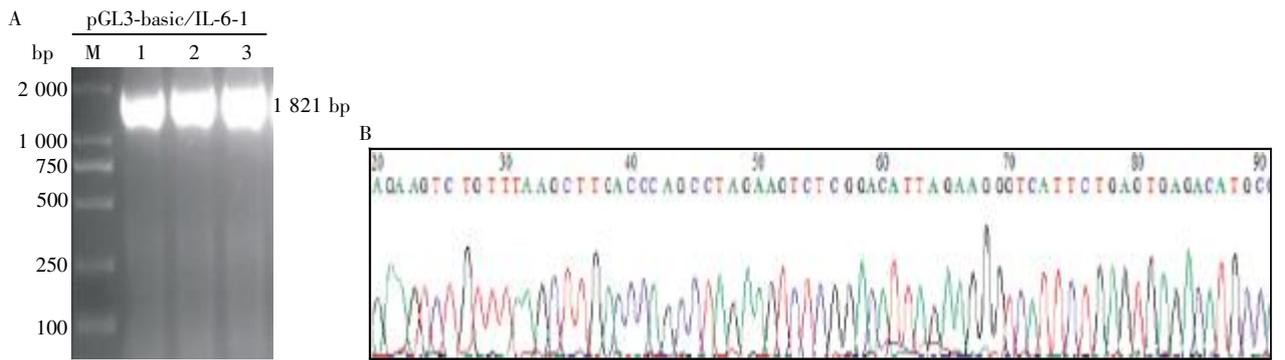
## 2 结果

### 2.1 大鼠 IL-6 基因启动子荧光素酶报告质粒的构建与鉴定

PCR 扩增大鼠 IL-6 基因启动子全长(-1 791~+30 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,挑 3 个克隆摇菌,菌液 PCR 反应均出现了明显的阳性目的条带(图 1A);另将所得的测序序列与 NCBI 上报告序列进行比对,结果显示,两者序列完全一致(图 1B)。提示,大鼠 IL-6 基因启动子全长荧光素酶报告质粒已成功构建(命名为 pGL3-IL-6-1)。

### 2.2 C/EBP $\beta$ 过表达对大鼠 IL-6 基因表达的影响

将 pIRES2-EGFP P、pIRES2-EGFP-C/EBP  $\beta$  两种质粒分别转染 GMC 细胞,48 h 后裂解细胞用 Western blot 检测 IL-6 的蛋白表达情况。转染



A: PCR 扩增结果, M; DNA Marker; 1~3: 3 个克隆的 pGL3-IL-6-1 质粒菌液 PCR 扩增产物; B: 重组 IL-6 启动子荧光素酶报告质粒的测序图谱(部分)。

图 1 重组 IL-6 基因启动子荧光素酶报告质粒的鉴定

Figure 1 Identification of luciferase reporter plasmid for IL-6 gene promoter

pIRES2-EGFP-C/EBP  $\beta$  的细胞,其 IL-6 蛋白表达量显著高于转染 pIRES2-EGFP 的细胞。提示 C/EBP  $\beta$  过表达能够促进 IL-6 基因的表达(图 2)。

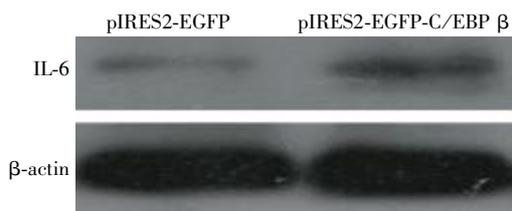


图 2 C/EBP  $\beta$  过表达对大鼠 IL-6 蛋白表达的影响

Figure 2 The effect of C/EBP  $\beta$  on IL-6 protein expression in GMC

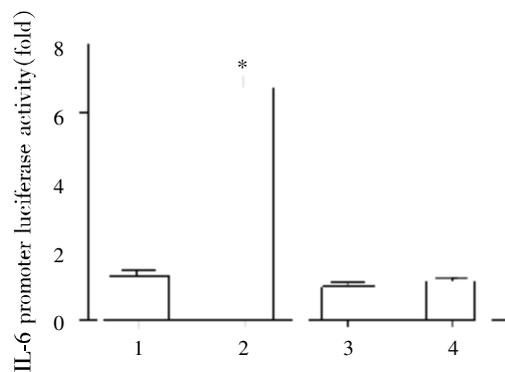
### 2.3 C/EBP $\beta$ 过表达对于大鼠 IL-6 基因启动子全长活性的影响

将 pGL3-IL-6-1, pGL3-basic, pIRES2-EGFP-C/EBP  $\beta$  3 种质粒分别或共转染 HEK293 细胞,48 h 后裂解细胞进行双荧光素酶报告基因检测。共转染 pGL3-IL-6-1 和 pIRES2-EGFP-C/EBP  $\beta$  的细胞,其 RLU 值显著高于单独转染 pGL3-IL-6-1、pGL3-basic 或 pIRES2-EGFP-C/EBP  $\beta$  的细胞。提示 C/EBP  $\beta$  过表达能够启动 IL-6 基因的转录(图 3)。

### 2.4 大鼠 IL-6 基因启动子(各截短)荧光素酶报告质粒的构建

#### 2.4.1 大鼠 IL-6 基因启动子截短位置的确定

为进一步研究 IL-6 基因启动子区 C/EBP  $\beta$  可能的结合位点,应用生物信息学软件 TFSearch 进行了 C/EBP  $\beta$  结合位点的预测。结果表明,在 IL-6 基因启动子区域共含有 4 个可能的 C/EBP  $\beta$  结合位点。据此,设计了 4 对引物以扩增 IL-6 基因启动子各截短序列(表 1),长度分别为 1 422 bp(-1 392~ +30 nt)、920 bp (-890~ +30 nt)、648 bp (-618~ +30 nt)和



1: pGL3-IL-6-1 + pIRES2; 2: pGL3-IL-6-1 + pIRES2-EGFP-C/EBP  $\beta$ ; 3: pIRES2; 4: pGL3-basic。与 1, 3, 4 组比较, \* $P < 0.001$  ( $n=3$ )

图 3 C/EBP  $\beta$  对于大鼠 IL-6 基因启动子全长活性的影响

Figure 3 The effect of C/EBP  $\beta$  on the luciferase activity of rat IL-6 gene promoter (full-length)

456 bp(-126~ +30 nt)。

#### 2.4.2 大鼠 IL-6 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 4 所示,与目的片段大小均相吻合。DNA 测序结果亦显示,序列及插入方向全部正确。表明大鼠 IL-6 基因启动子截短荧光素酶报告质粒均已构建成功。

### 2.5 C/EBP $\beta$ 过表达对于大鼠 IL-6 基因启动活性的影响

将 IL-6 基因启动子全长(pGL3-IL-6-1)和各截短荧光素酶报告质粒(pGL3-IL-6-2、pGL3-IL-6-3、pGL3-IL-6-4 和 pGL3-IL-6-5)分别与 pIRES2-EGFP-C/EBP  $\beta$  质粒共转染 HEK293 细胞,检测其荧光素酶活性。pGL3-IL-6-1、pGL3-IL-6-2、pGL3-IL-6-3、pGL3-IL-6-4 质粒转染组,其 RLU 值均高于 pGL3-basic 质粒转染组,而转染 pGL3-IL-6-5 质粒细胞的 RLU 值

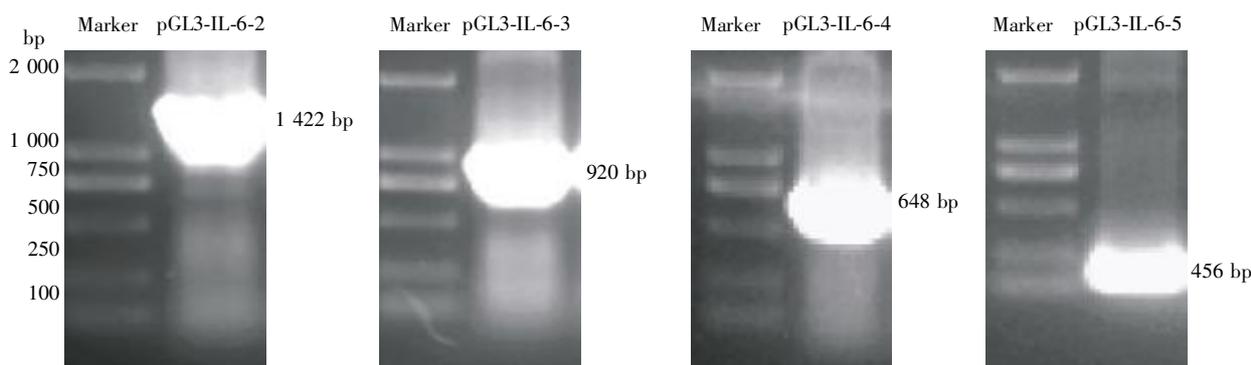
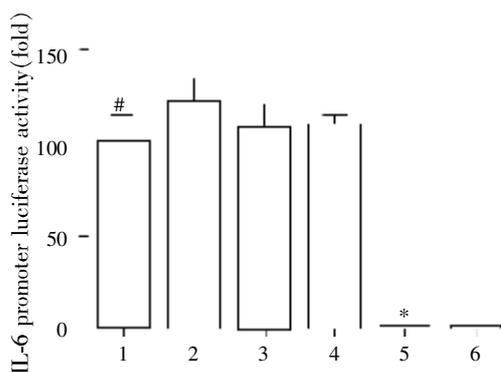


图4 各截短荧光素酶报告质粒菌液 PCR 鉴定

Figure 4 PCR identification of different truncated luciferase reporter plasmids

与转染 pGL3-IL-6-1、pGL3-IL-6-2、pGL3-IL-6-3 和 pGL3-IL-6-4 质粒组相比,其 RLU 值显著降低 ( $P < 0.05$ ,图 5)。这一结果提示,在 IL-6 基因启动子上 C/EBP  $\beta$  的结合位点可能存在于 -618~ -126 nt 区域。



1-5: 分别为 pGL3-IL-6-1、pGL3-IL-6-2、pGL3-IL-6-3、pGL3-IL-6-4、pGL3-IL-6-5 与 pIRES2-EGFP-C/EBP  $\beta$  共转染组;6:pGL3-Basic 组。与 6 组比较,\* $P < 0.001$ ;与 1-4 组比较,\* $P < 0.001$ ( $n=3$ )。

图5 C/EBP  $\beta$  过表达对于大鼠 IL-6 基因启动子(各截短)活性的影响Figure 5 The effects of C/EBP $\beta$  overexpression on the activity of different truncated rat IL-6 gene promoter

### 3 讨论

大鼠 Thy-1N 作为研究人类 MsPGN 的动物模型,多年来一直被众多研究者采用。大鼠 Thy-1N 肾组织的病理变化类似于人类 MsPGN,且其病变具有补体依赖性,尤其是有 sublytic C5b-9 的依赖性<sup>[10]</sup>。本课题组前期的研究已揭示,在 Thy-1N 发病早期和体外用 sublytic C5b-9 刺激 GMC 后能够增加 C/EBP  $\beta$  和 IL-6 基因 mRNA 和蛋白的表达,且 IL-6 的表达趋势基本与 C/EBP  $\beta$  同步。据此推测,C/EBP  $\beta$  可能是调节 IL-6 的一个上游核转录因子,可

以通过调控 IL-6 的转录与翻译,进而影响大鼠 Thy-1N 中肾小球内产生 IL-17 细胞的分化及其 IL-17 的产生。

已知荧光素酶报告基因分析技术是一种研究基因转录调控的常用方法,故本实验借用了此种技术检查了 C/EBP  $\beta$  能否直接启动 GMC 中 IL-6 的基因转录,即上调 IL-6 的启动子活性。由于荧光素酶报告质粒编码的萤火虫荧光素酶上游没有其转录所需的启动子与增强子,因此,将所要研究的目的基因的启动子序列克隆到报告基因表达载体中,然后再将重组质粒导入适当的细胞中,借用目的基因的启动子启动萤火虫荧光素酶,通过检测荧光素酶报告基因可反映插入片段的启动子活性。为了研究 C/EBP  $\beta$  对 IL-6 基因转录的启动作用,本实验先构建了大鼠 IL-6 基因启动子全长荧光素酶报告质粒(pGL3-IL-6-1)。本研究首先将大鼠野生型 C/EBP  $\beta$  表达质粒(pIRES2-EGFP-C/EBP  $\beta$ )与 pIRES2-EGFP 质粒分别转染 GMC 细胞,检测各组细胞 IL-6 蛋白表达情况,结果发现,转染 pIRES2-EGFP-C/EBP  $\beta$  细胞 IL-6 蛋白表达量明显高于转染 pIRES2-EGFP 对照组;同时,将 pIRES2-EGFP-C/EBP  $\beta$  与 pGL3-IL-6-1 质粒共转染 HEK293 细胞,检测各组细胞的荧光素酶活性,结果发现,将 pGL3-IL-6-1 与 pIRES2-EGFP-C/EBP  $\beta$  共转染后,其荧光素酶活性明显强于 pGL-3-basic 对照组。提示 C/EBP  $\beta$  作为转录因子能够启动 IL-6 基因的转录。

已有研究发现,C/EBP  $\beta$  可以促进人 IL-6 基因的表达<sup>[11]</sup>。另有实验证实,C/EBP  $\beta$  作为一种转录因子能与小鼠 IL-6 基因启动子上的效应元件相结合,启动 IL-6 的基因转录,实现对 IL-6 的调控<sup>[12-13]</sup>。为了确定大鼠 C/EBP  $\beta$  与 IL-6 基因启动子的结合区域,先通过 TF Search 软件预测出 IL-6 基因启动子上含

有 4 个 C/EBP  $\beta$  的结合位点,并据此设计构建了 IL-6 基因启动子(截短)荧光素酶报告质粒,即 pGL3-IL-6-2, pGL3-IL-6-3, pGL3-IL-6-4, pGL3-IL-6-5, 随后将这几种质粒(包括全长质粒)分别与 pIRES2-EGFP-C/EBP  $\beta$  共转染 HEK293 细胞,再测定各组细胞荧光素酶的活性。结果发现, pGL3-IL-6-5 的荧光素酶活性明显低于其他各组。提示该截短质粒已去除了 IL-6 启动子部位的 C/EBP  $\beta$  结合区域。换言之, C/EBP  $\beta$  在 IL-6 启动子上的结合区域可能位于-618~-126 nt 的区域内。

综上所述,本实验成功构建了大鼠 IL-6 基因启动子(全长)荧光素酶质粒,并证实 C/EBP  $\beta$  可通过结合 IL-6 基因启动子启动 IL-6 的转录。与此同时,根据软件预测的 C/EBP  $\beta$  结合位点,设计并构建了不同的大鼠 IL-6 基因启动子(截短)荧光素酶报告质粒,另在 HEK293 细胞中探讨了 C/EBP  $\beta$  过表达对大鼠 IL-6 基因启动子的激活作用。此外,初步筛选出了 C/EBP  $\beta$  与 IL-6 基因启动子结合的可能部位,这为今后进一步研究 sublytic C5b-9 刺激 GMC 后, IL-6 基因的启动及其调控机制提供了有用的实验材料。

#### [参考文献]

- [1] 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
- [2] Badea TD, Park JH, Soane L, et al. Sublytic terminal complement attack induces c-fos transcriptional activation in myotubes [J]. *J Neuroimmunol*, 2003, 142(1-2): 58-66
- [3] Yamada K, Hori Y, Hanafusa N, et al. Clusterin is up-regulated in glomerular mesangial cells in complement-mediated injury [J]. *Kidney Int*, 2001, 59(1): 137-146
- [4] Niehof M, Streetz K, Rakemann T, et al. Interleukin-6-induced tethering of STAT3 to the LAP/C/EBP  $\beta$  promoter suggests a new mechanism of transcriptional regulation by STAT3 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(12): 9016-9027
- [5] Gao L, Zhang Y, Qiu W, et al. Effects of PI3-k/Akt short hairpin RNA on proliferation, fibronectin production and synthesis of thrombospondin-1 and transforming growth factor-beta1 in glomerular mesangial cells induced by sublytic C5b-9 complexes [J]. *Cell Prolif*, 2009, 42 (1): 83-93
- [6] Gao L, Qiu W, Wang Y, et al. Sublytic complement C5b-9 complexes induce thrombospondin-1 production in rat glomerular mesangial cells via PI3-k/Akt; association with activation of latent transforming growth factor-beta1 [J]. *Clin Exp Immunol*, 2006, 144(2): 326-334
- [7] Jiang X, Zhang J, Xia M, et al. Role of activating transcription factor 3 (ATF3) in sublytic C5b-9-induced glomerular mesangial cell apoptosis [J]. *Cell Mol Immunol*, 2010, 7 (2): 143-151
- [8] Tsukada J, Yoshida Y, Kominato Y, et al. The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation [J]. *Cytokine*, 2011, 54(1): 6-19
- [9] Ikezumi Y, Kanno K, Koike H, et al. FK506 ameliorates proteinuria and glomerular lesions induced by anti-Thy 1.1 monoclonal antibody 1-22-3 [J]. *Kidney Int*, 2002, 61(4): 1339-1350
- [10] 单凯, 邱文, 李研, 等. 大鼠 Caspase8 基因启动子荧光素酶报告质粒的构建及其与 IRF-1 结合位点的鉴定 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2013, 33(3) 291-296
- [11] Silverman AM, Nakata R, Shimada H, et al. A galectin-3-dependent pathway upregulates interleukin-6 in the microenvironment of human neuroblastoma [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(9): 2228-2238
- [12] Lu H, Wu JY, Kudo T, et al. Regulation of interleukin-6 promoter activation in gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori* [J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16 (10): 4954-4966
- [13] Spooner CJ, Guo X, Johnson PF, et al. Differential roles of C/EBP beta regulatory domains in specifying MCP-1 and IL-6 transcription [J]. *Mol Immunol*, 2007, 44 (6): 1384-1392

[收稿日期] 2013-03-03