论著

文章编号:1000-5404(2006)09-0896-04

IFN-β基因启动子调控区域的分析及IRF-3报告基因的构建

蒋 静,胡福泉,蹇 锐,张 伟,邓少丽,程小星 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室,重庆 400038)

提 要: 目的 对IRF-3的主要靶基因——小鼠IFN-β基因启动子区域进行分析并构建IRF-3报告基因载体。**方法** 将小鼠IFN-β基因启动子全序列以及不同截短片段克隆到无启动子的pGF3basic/enhancer质粒中,以EGFP为报告基因,转染小鼠Raw264.7巨噬细胞系后观察细胞对LPS刺激的反应。**结果** IFN-β启动子PRD调控区域上游序列、PRDI区,PRDII区和PRDIV区缺失后,LPS同样能诱导EGFP报告基因的表达。只保留PRD区及IFN-β启动子核心区的载体转染Raw264.7细胞后,可以在LPS刺激下诱导EGFP报告基因的高表达。**结论** 构建了能检测IRF-3活性的报告基因载体,为进一步研究LPS激活IRF-3的信号转导通路奠定了基础。

关键词: IRF-3;IFN-β;启动子;调控元件;报告基因

中图法分类号: Q74; Q754; Q781 **文献标识码**: A

Analysis of regulatory elements of IFN-β gene promoter and construction of IRF-3 reporter gene

JIANG Jing, HU Fu-quan, JIAN Rui, ZHANG Wei, DENG Shao-li, CHENG Xiao-xing (Department of Microbiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 40038, China)

Abstract: **Objective** To analyze the regulatory elements that regulates the transcription of murine IFN-β gene and to construct IRF-3 reporter gene. **Methods** The promoter region of murine IFN-β gene was amplified from murine genomic DNA by PCR and was cloned into promoter-free plasmid pGF3basic/enhancer, upstream of EGFP reporter gene. Vectors with serial deletions at 5′ side of promoter region were also constructed. Following transient transfection of murine Raw264.7 cells with the vectors and LPS stimulation, the expression of EGFP reporter gene was observed under fluorescent microscopy. **Results** This study showed that LPS could induce expression of EGFP reporter gene when DNA fragment upstream of PRD region, as well as PRD Ⅰ, Ⅱ and Ⅳ region, were deleted. **Conclusion** An IRF-3 EGFP reporter gene was established by including only PRD Ⅲ sequence and core region of IFN-β promoter. This reporter gene is an important tool for investigation of LPS-induced IRF-3 signaling transduction pathways.

Key words: IRF-3; IFN-β; promoter; regulatory element; reporter gene

干扰素调节因子3 (interferon regulatory factor, IRF-3)是IRF大家族的成员之一。干扰素β(interferon β,IFN-β)基因直接受IRF-3的调控。IRF-3通过其N端DNA结合域(DNA binding domain, DBD)结合IFN-β基因启动子上游保守的DNA序列,即IFN刺激应答元件(IFN stimulated response element, ISRE),从而直接调控IFN-β的表达。许多研究已证明,LPS由TLR4(toll like receptor 4)介导可诱导IFN-β的表达。最近的研究证实,IRF-3是LPS\TLR4信号通路中的关键分子之一,在LPS诱导的炎症反应失控和休克中起了重要的作用。IRF-3基因敲除的小鼠对LPS具有明显的抗性[1]。LPS(lipopolysaccharide),即内毒素(endotoxin),是革兰阴性细菌外膜的重要成分,由特异性多糖、核心多糖和脂质A 3部分组成,脂质A是其主要的毒性成分。LPS是目前所知最强的诱导炎症反应的细菌分子之一,可以导致细胞因子的过度产生以及炎症反应的失控,产生内毒素休克。脓毒血症(sepsis)和脓毒性休克(septic shock)是重危患者最常见的致死原因之一,到目前为止尚无有效的治疗手段,而LPS是革兰阴性细菌所致脓毒血症的主要致病因子之一。虽然LPS激活炎症反应机制的研究已经取得了一些突破,但对LPS怎样激活IRF-3信号转导通路的

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470094)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30470094)
作者简介:蒋 静(1972-),女,重庆市人,硕士研究生,助教,主要从事分子免疫学和微生物学方面的研究。电话:(023)68752241
通讯作者:程小星,E-mail:xiaoxing@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2005-09-09;修回日期:2005-12-09

了解还十分有限。为进一步探索 IFN-β(interferon β)基因启动子调控区域及 IRF-3 结合位点进行了分析，并构建了 IRF-3 的 EGFP(enhanced green fluorescence protein)报告基因载体。

1　材料与方法

1.1　菌种、质粒、小鼠血细胞总 DNA

pGL3basic 和 pGL3enhancer 质粒购自 promega 公司；pEGFP-N2 质粒和大肠杆菌 JM109 株为本室保存；pUCm-T 载体购自博亚。小鼠血细胞总 DNA 由张伟馈赠。

1.2　细胞株

小鼠巨噬细胞 Raw264.7 由本室保存。

1.3　工具酶与主要试剂

限制性核酸内切酶 *Xba* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ、*Nco* Ⅰ、*Xho* Ⅰ、*Hind* Ⅲ购自 MBI；T_4 DNA 连接酶购自 New England 公司；PCR 扩增试剂盒 DNA 凝胶回收试剂盒，PCR 产物纯化回收试剂盒购自上海生工；去内毒素质粒抽提试剂盒购自博大泰克公司；Lipofectamine™ 2000，Opti-MEM Ⅰ reduced-serum medium 购自 Invitrogen 公司；LPS(*E. coli*；O55：B5)，高糖 DMEM 细胞培养液购自 Sigma 公司。

1.4　引物设计与合成(表 1)

表 1　PCR 扩增引物

片段	引物
EGFP	5′-AAGGCATGCCATGGTGAGCAAG -3′
	5′-GGAACCTCTAGAATTACTTGTACAGC -3′
A	5′- AGCCAGGAGCTTGAATAAAATGAATATTAG -3′
	5′- CTGGTGTCGGCTGCTACCTGCAAGATGAG -3′
B	5′- GCCGCTCGAG ATGAATATTAGAAG -3′
	5′- GCCCAAGCTT CCTGCAAGATGA -3′
C	5′- GCCGCTCGAG ATGACAGAGGAAAACT -3′
	5′- GCCCAAGCTT CCTGCAAGATGA -3′
D	5′- CCGCTCG AGGAAAACTGAAAGAG GTCTGAGGCAGAAA -3′ (PRDⅢ)
	5′- GCCCAAGCTT CCTGCAAGATGA -3′
E	5′ -CCGCTCGAGTCTGAGGCAGAAA-3′
	5′- GCCCAAGCTT CCTGCAAGATGA -3′

以上引物均由上海博亚公司合成与纯化

1.5　EGFP 基因的扩增及无启动子 EGFP 报告基因载体

根据表 1 所列引物以 pEGFP-N2 为模版行 PCR 扩增 EGFP 片段。将 PCR 产物纯化并用 *Nco* Ⅰ与 *Xba* Ⅰ双酶切。胶回收 EGFP(725 bp)片段后用 T4 连接酶将其与去掉 luciferase 片段的 pGL3basic/enhancer 连接。将连接产物分别转化大肠杆菌 Jm109 株，筛选扩增并提取质粒行酶切鉴定并经测序证实。将其命名为 pGF3basic/enhancer。

1.6　鼠 IFN-β 启动子区域系列截短片段(A、B、C 和 E 片段)的扩增及相应重组载体的构建(图 1)

采用逐渐截短的方法根据表 1 所列引物以小鼠血细胞总 DNA 为模板扩增鼠 IFN-b 启动子基因 A 片段(209 bp)。将其 T-A 克隆至 pUCm-T 载体，质粒命名为 pIFN-β-150(含 A 片段)。经测序鉴定证实。根据表 1 所列引物以 pIFN-β-150 为模板扩增鼠 IFN-b 基因 B 片段，C 片段，E 片段。各扩增片段经纯化后与用 *Xho* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切消化的 pGF3basic/enhancer 混合，用 T4 连接酶连接。将连接产物分别转化大肠杆菌 Jm109 株，筛选扩增并提取质粒行酶切鉴定，并经测序鉴定证实，将其分别命名为 pGF-131basic/enhancer(含 B 片段)，pGF-99basic/enhancer(含 C 片段)，pGF- PRDneg basic/enhancer(含 E 片段)。

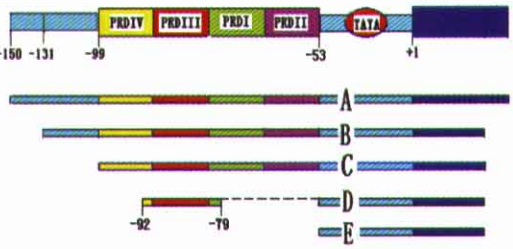


图 1　小鼠 IFN-β 基因启动子区域及 PCR 扩增片段示意图

1.7　IRF-3 报告基因载体 pGF PRDⅢ basic/enhance(含 D 片段)的构建

在 D 片段的构建上，如果只采用逐渐截短的方法不能构建只保留 PRDⅢ区而去除 PRDⅠ和 PRDⅡ区的载体(图 1)，所以我们将 PRDⅢ区及其前后各两个碱基(AGGAAAACTGAAAGGGA)序列直接与 IFN-β 启动子核心区上游序列设计为一个引物，扩增出来的目的片段 D 含 PRDⅢ及其前后各两个碱基和 IFN-β 启动子核心区(图 1)。为了克隆的需要，在该序列 5′端增加 *Xho* Ⅰ酶切位点及保护性碱基(表 1)。以 pIFN-150 为模板，用该上游引物与相应的下游引物行 PCR 扩增，片段 D 经纯化后与用 *Xho* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切消化的 pGF3basic/enhancer 混合，用 T_4 连接酶连接。将连接产物分别转化大肠杆菌 Jm109 株，筛选扩增，提取质粒行酶切鉴定并经测序鉴定证实，将其命名为 pGF- PRDⅢ basic/enhancer。

1.8　细胞培养及脂质体 Lipofectamine™2000 转染

Raw264.7 鼠巨噬细胞系用含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养液在 37 ℃，5% CO_2 细胞培养箱内常规培养传代。转染前 1 d 于 96 孔板每孔接种 2×10^4 个细胞/孔，体积为 100 μl。37 ℃，5% CO_2 细胞培养箱内培养 24 h，以使转染时细胞生长汇合率达到 90% ~95%。转染 24 h 后换含 LPS(100 ng/ml)的高糖 DMEM 细胞培养液；LPS 刺激 8 h 后在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达变化并照相。

2　结果

2.1　PCR 扩增目的 DNA 片段

以设计的每 1 对引物(表 1)及其相应的模版行 PCR，产物经琼脂糖凝胶电泳，清楚可见与各目的基因片段大小基本相符的条带。除了均含 IFN-β 启动子核心区外，B 片段(174 bp)含 PRDⅠ~Ⅳ区及上游 32 bp 片段；C 片段(142 bp)含 PRDⅠ~

Ⅳ区;D 片段(111 bp)含 PRD 区及其前后各两个碱基(AGGAAAACTGAAAGGGA);作为对照的 E 片段(96 bp),不含 PRD Ⅰ-PRDⅣ,只含 IFN-β 启动子核心区(图 1)。

2.2 PCR 扩增片段的克隆与鉴定

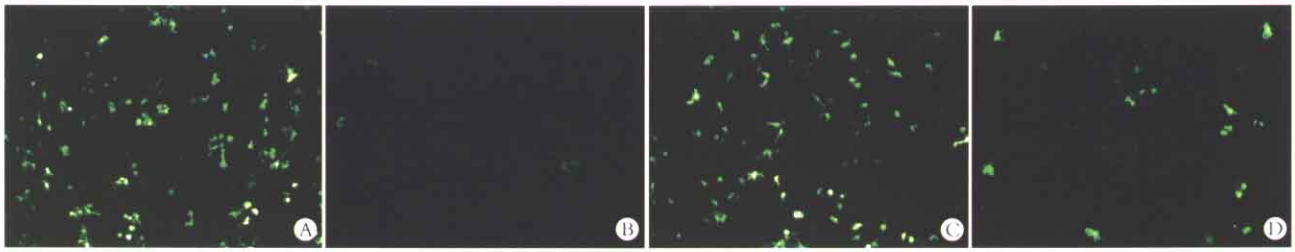
各 PCR 扩增片段经 *Xho* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切,分别克隆于无启动子的 pGF3basic 和 pGF3enhancer 载体的 *Xho* Ⅰ/*Hind* Ⅲ酶切位点。由于 IFN-β 启动子片段克隆于 EGFP 报告基因的上游,可以利用报告基因检测启动子的活性。将连接产物分别转化大肠杆菌 Jm109 株,筛选阳性克隆并提纯相应质粒。行 *Xho* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切并经琼脂糖凝胶电泳,可见除4 221 bp的 pGF3enhancer 和3 951 bp 的 pGF3basic 载体片段外,还分别有与各目的片段大小基本一致的条带。测序结果证实克隆的各目的片段序列与 IFN-β 启动子中相应的目的基因序列完全一致。由此表明各重组载体被成功构建。

2.3 IFN-β 启动子区域及不同截短片段功能分析

含 IFN-β-131~1 区域 B 片段(图 1 中 B 片段)的 EGFP 报告基因载体转染 Raw264.7 巨噬细胞,LPS 刺激 8 h 后,荧光显微镜下可见细胞内有强荧光,说明 EGFP 高表达;而同时间观察不用 LPS 刺激的对照组,可见细胞内荧光表达很微弱(图 2),而转染对照载体的细胞在 LPS 刺激下没有明显的荧光。删除-131~-99 片段(图 1 中 C 片段)的报告基因载体在 LPS 刺激下,EGFP 报告基因同样可以高效地表达,说明 IFN-β 启动子上游-131~-99 区域对 LPS 诱导的 EGFP 表达无明显影响。删除所有 PRD 调控区域的报告基因载体(图 1 中 E 片段)对 LPS 刺激无明显反应,提示调控区域位于 PRD 区域。

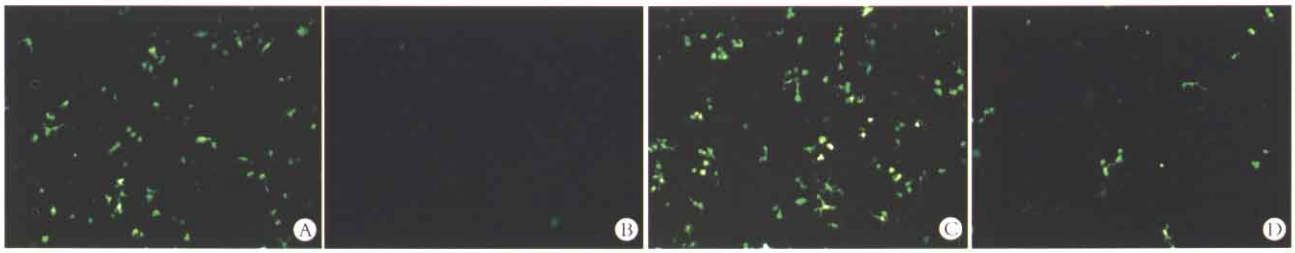
2.4 IRF-3 报告基因的建立

以往的研究证明,IFN-β 启动子的 IRF-3 结合和调控序列位于 PRDⅢ区。为了构建 IRF-3 报告基因载体,我们将 PRDⅢ及其前后各两个碱基(AGGAAAACTGAAAGGGA)序列直接与 IFN-β 启动子核心区上游序列设计为一个引物,与启动子下游引物配合,扩增出仅含有 PRDⅢ区和 IFN-β 启动子核心区的片段 D(图 1 D 片段),克隆于 pGF PRDⅢbasic/enhancer 载体。该载体转染 Raw264.7 巨噬细胞,LPS 刺激 8 h 后观察,可见细胞内有强荧光表达;同时间观察不用 LPS 刺激的对照组,可见细胞荧光表达很微弱(图 2)。这一结果证明,IFN-β 启动子 PRDⅠ区、PRDⅡ区和 PRDIV 区缺失后,LPS 同样能诱导 EGFP 报告基因的表达,说明这些区域的缺失不会明显影响 IRF-3 与 DNA 靶序列的结合和调控功能。由于该载体只含有 IRF-3 结合序列,删除了其他已知转录因子的结合位点,可以作为 IRF-3 活性的报告基因。



A:有 LPS 刺激的 pGF-131basic;B:无 LPS 刺激的 pGF-131basic;C:有 LPS 刺激的 pGF-131enhancer;D:无 LPS 刺激的 pGF-131enhancer

图 2 转染 pGF-131basic/enhancer(含 B 片段)的 Raw264.7 细胞中 EGFP 表达 (荧光显微镜×100)



A:有 LPS 刺激的 pGF PRDⅢbasic;B:无 LPS 刺激的 pGF PRDⅢbasic;C:有 LPS 刺激的 pGF PRDⅢenhancer;D:无 LPS 刺激的 pGF PRDⅢenhancer

图 3 转染 pGF PRDⅢbasic/enhancer(含 D 片段)的 Raw264.7 细胞中 EGFP 表达 (荧光显微镜×100)

3 讨论

IRF-3 是一由 427 个氨基酸组成的转录因子,在几乎所有细胞内都有表达,是 IRF 大家族的成员之一。正常情况下,IRF-3 在细胞质内以一种单体非活性的形式存在,当受到上游信号刺激,如病毒感染,双链 RNA,LPS 的刺激时,IRF-3 即被磷酸化激活,形成二聚体后进入细胞核,发挥其调控转录活性[2]。

TLR4 是 LPS 的细胞受体,LPS 通过激活 TLR4 的信号转导级联反应(signal transduction cascade)导致细胞因子的产生,二者的相互作用需要 CD14 和 MD-2 的辅助[3]。在 LPS 介导的炎症反应中 TLR4 主要通过两

条不同的信号转导通路刺激细胞因子的分泌，分别是 MyD88 依赖的 NF-κB/JNK/p38 信号转导通路和 MyD88 非依赖性的 IRFs（IFN regulatory factors）信号转导通路（图 4）。

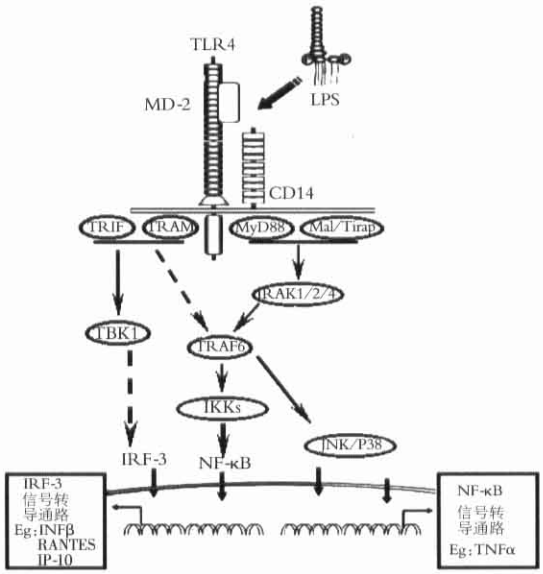


图 4　MyD88 依赖的 NF-κB/JNK/P38 信号转导通路和 MyD88 非依赖性的 IRFs 信号转导通路

IRF-3 在 LPS 诱导 IFN-β 的产生中具有决定性的调控作用。IRF-3 基因敲除的小鼠对 LPS 具有明显的抗性[1]，说明 IRF-3 在 LPS 的致病中发挥了重要的作用。目前已知 TRIF 和 TRAM（TOLL-IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-β-related adaptor molecule）可能在 IRF-3 的激活中起了重要的作用[4]。小鼠的 TRIF 基因被敲除后，经 LPS 诱导的 IRF-3 激活以及 IFN-β 的产生均显著降低[5]。最近还陆续发现 IRFs 信号转导通路中的其他几个大分子，如 TBK1、KKs、IRAK1/4、TRAF6、等。研究 LPS 激活 IRF-3 and 的信号转导通路及其调控机制对内毒素休克的防治有非常重要的意义。IRF-3 报告基因的构建目前尚少见文献报道。

IFN-β 基因启动子的 ISRE 包含 4 个转录上调区域（positive regulation domain，PRD）分别是Ⅰ～Ⅳ区，如图 2 所示。这在病毒介导的炎症反应中得以发现[6-8]。目前已知 PRDⅠ区中 GAAAGT 序列与 IRF-7 结合，而 PRDⅢ区中 GAAAAC 序列与 IRF-3 结合[7,9,10,13]。PRDⅣ能与 ATF-2/CRE-BP-1 结合[8]，PRDⅡ与 NF-κB 结合[11,12]。因此，在 IFN-β 基因启动子的 4 个转录上调区域中只有 PRDⅢ与 IRF-3 转录调控的特异性相关。但我们不知道在 4 个 PRD 中只保留 PRDⅢ能否成功诱导下游基因的表达。因此，采取逐渐缩小 IFN-β 基因启动子调控区域的范围直至只保留 PRDⅢ的策略来分析 IFN-β 基因启动子的调控序列。

本实验结果证实，只保留调控区中 PRDⅢ区和 IFN-β 启动子核心区的载体可以在 LPS 诱导下激活报告基因的转录。由于该载体只含有 IRF-3 结合序列而删除了其他已知转录因子的结合位点，该载体可以作为 IRF-3 活性的报告基因，为进一步研究 LPS 激活 IRF-3 的信号转导通路奠定了基础。

参考文献：

[1] SAKAGUCHI S, NEGISHI H, ASAGIRI M, *et al*. Essential role of IRF-3 in lipopolysaccharide-induced interferon-beta gene expression and endotoxin shock[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 306 (4): 860 - 866.

[2] SERVANT M J, GRANDVAUX N, HISCOTT J. Multiple signaling pathways leading to the activation of interferon regulatory factor 3 [J]. Biochem Pharmacol, 2002, 64 (5 - 6): 985 - 992.

[3] MIYAKE K. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2[J]. Int Immunopharmacol, 2003, 3(1): 119 - 128.

[4] FITZGERALD K A, ROWE D C, BARNES B J, *et al*. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF[J]. J Exp Med, 2003, 198(7): 1043 - 1055.

[5] YAMAMOTO M, SATO S, HEMMI H, *et al*. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway[J]. Science, 2003, 301(5633): 640 - 643.

[6] GOODBOURN A, BURSTEIN H, MANIATIS H. The human beta-interferon gene enhancer is under negative control[J]. Cell, 1986, 45 (4): 601 - 610.

[7] LEBLANC J F, COHEN L, RODRIGUES M, *et al*. Synergism between distinct enhanson domains in viral induction of the human beta interferon gene [J]. Mol Cell Biol, 1990, 10(8): 3987 - 3993.

[8] DU W, MANIATIS T. An ATF/CREB binding site is required for virus induction of the human interferon beta gene [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89(6): 2150 - 2154.

[9] TANIGUCHI T, OGASAWARA K, TAKAOKA A, *et al*, IRF family of transcription factors as regulators of host defense [J]. Annu Rev Immunol, 2001, (19): 623 - 655.

[10] FAN C M, MANIATIS T. Two different virus-inducible elements are required for human beta-interferon gene regulation [J]. EMBO J, 1989, 8 (1): 101 - 110.

[11] FUJITA T, KIMURA Y, MIYAMOTO M, *et al*. Induction of endogenous IFN-alpha and IFN-beta genes by a regulatory transcription factor, IRF-1 [J]. Nature, 1989, 337(6204): 270 - 272.

[12] HISCOTT J, ALPER D, COHEN L, *et al*. Induction of human interferon gene expression is associated with a nuclear factor that interacts with the NF-kappa B site of the human immunodeficiency virus enhancer [J]. J Virol, 1989, 63(6): 2557 - 2566.

[13] MORIN P, BRAGANCA J, BANDU M T, *et al*. Preferential binding sites for interferon regulatory factors 3 and 7 involved in interferon-A gene transcription [J]. J Mol Biol, 2002, 316 (5): 1009 - 1022.

（编辑　陈聪连）