文章编号:1000-5404(2010)01-0033-03

论著

小鼠 MCP-1 基因启动子的克隆及核受体 FXR 下调其活性初步分析

彭家和[1*],刘 红[2*],张 迁[1],申丽丽[1],张 艳[1],董金瑜[1],苏 畅[1],江 渝[1] (400038 重庆,第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室[1], 400037 重庆,第三军医大学新桥医院血液科[2])

[摘要] **目的** 小鼠单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)启动子的克隆及其活性分析。**方法** 从小鼠巨噬细胞株 ANA-1 中分别扩增一长一短 2 个小鼠 MCP-1 启动子片段,并克隆入虫荧光素酶报告基因载体中。2 个不同长度的 MCP-1 启动子片段重组报告基因质粒分别与类法尼醇 X 受体(farnesoid X receptor, FXR)真核表达质粒共转染 HEK293 细胞中,经鹅脱氧胆汁酸(chenodeoxycholic acid, CDCA)处理后,检测荧光素酶活性。**结果** 小鼠 MCP-1 启动子报告基因载体构建成功。经 CDCA 处理后,转染 FXR 表达质粒可下调 2 个不同长度的 MCP-1 启动子活性,且下调幅度相当。**结论** 激活 FXR 可能通过小鼠 MCP-1 基因启动子 -322 ~ +82 bp 区域 FXR 负性结合元件而下调该基因转录活性。

[关键词] 单核细胞趋化蛋白-1;类法尼醇 X 受体;鹅脱氧胆汁酸;启动子
[中图法分类号] R392-33; R392.11; R392.2 **[文献标志码]** A

Cloning of mouse monocyte chemoattractant protein-1 promoter and down-regulation of its activity by farnesoid X receptor

Peng Jiahe[1], Liu Hong[2], Zhang Qian[1], Shen Lili[1], Zhang Yan[1], Dong Jinyu[1], Su Chang[1], Jiang Yu[1] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[Abstract] **Objective** To clone the mouse monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) promoter and analyze its activity. **Methods** Two promoter fragments of mouse MCP-1 gene were amplified from murine macrophage cell line ANA-1 and then cloned into luciferase reporter vector. They were respectively transfected with or without farnesoid X receptor (FXR) expression vector into HEK293 cells. The luciferase activity of transfected HEK293 after the treatment of chenodeoxycholic acid (CDCA, 50 μmol/L) was determined with chemiluminescent analysis and normalized against β-galactosidase activity. **Results** The 2 luciferase reporter vectors of MCP-1 promoter were successfully constructed. After treatment with CDCA, FXR expression vector transfection equivalently down-regulated the promoter activity of both mouse MCP-1 promoter fragments in HEK293 cells. **Conclusion** Activated by CDCA, FXR may down-regulate the activity of mouse MCP-1 promoter through negative FXR element which lies between position −322 and +82 bp.

[Key words] monocyte chemoattractant protein-1; farnesoid X receptor; chenodeoxycholic acid; promoter

Supported by the National Natural Science Foundation of China(2007BB5050) and the Starting Fund for Overseas Returning Scholar of Third Military Medical University(06HG010). Peng Jiahe and Liu Hong are the first author who contributed equally to the article. Corresponding author: Jiang Yu, Tel: 86-23-68752841, E-mail: yujiang61@gmail.com

单核细胞趋化蛋白(monocyte chemoattractant protein,MCP)是一系列结构相似,相对分子质量为(8 ~ 10)×10³,具有趋化功能的细胞因子。MCP 通过其受体而发挥作用[1]。MCP-1 基因有 2 个调控区:近端调控区、远端调控区。多种物质能刺激 MCP-1 活化,如 PHA、INF-γ、IL-1、IL-4、LPS、TNF-α 等。在调节 MCP-1 表达过程中,转录调节因子或其他蛋白因子通过 MCP-1 启动子上调或下调该基因的表达[2,3]。激活 FXR 可下调巨噬细胞(ANA-1 细胞)MCP-1 转录水平和蛋白水平的表达[4]。FXR 属于核受体,当被其配体激活后,FXR 构象发生改变,一般以自身或与视黄醇 X 受体(retinoid X receptor, RXR)形成同源或异源二聚体同靶基因启动子区的 FXR 结合元件(FXR element, FXRE)结合,进而调节靶基因的转录活性。以 FXR 调节靶基因活性不同 FXRE 分 2 种:①FXR 正性结合元件(positive FXR element),FXR 与之结合后激活靶基因转录;②FXR 负性结合元件(negative FXR element),FXR 与之结合后抑制靶基因转录[4,5]。最典型的 FXRE 由反向重复的 AGGTCAnTGACCT 模序组成(*n* 代表反向重复序列之间间隔的核苷酸个数,反向重复序列之间有一个核苷酸相隔,即 IR-1,在 IR-1 中 *n* = 1)。本研究构建小鼠 MCP-1 的启动子报告基因载体,

[基金项目] 重庆市自然科学基金(2007BB5050);第三军医大学留学回国人员启动基金(06HG010)
*: 同等贡献者
[通信作者] 江 渝,电话:(023)68752841,E-mail:yujiang61@gmail.com

将FXR的真核表达载体与含不同长度MCP-1启动子的报告基因载体共转染细胞,检测报告基因的活性,初步分析MCP-1启动子活性,旨在为弄清FXR是否直接结合MCP-1启动子的负性结合元件而下调MCP-1的表达奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌DH5α菌株和HEK293细胞由本室保存,pGL3-Basic(Promega公司),pSV-β-Galactosidase、真核表达质粒载体pCMX、FXR真核表达质粒pCMX-FXR、RXR真核表达质粒pCMX-RXR为本实验室保存,DMEM、胎牛血清购于HyClone公司,Lipofectamine 2000购于Invitrogen公司,转染用培养基购于Gibco公司,KOD PLUS DNA聚合酶购于TOYOBO公司,限制性内切酶*Mlu* Ⅰ和*Xho* Ⅰ,T_4 DNA连接酶购于New England Biolabs公司,荧光素酶分析系统和β半乳糖苷酶检测试剂盒购于Promega公司。

1.2 方法

ANA-1细胞株接种于含有10%新生小牛血清、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素的RPMI1640培养基中,37 ℃,5% CO_2培养。HEK293细胞接种于含有10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中,37 ℃,5% CO_2培养。转染前1 d,将其平均接种于12孔板中,调整密度使转染时细胞达到70% ~80%融合。

小鼠MCP-1基因启动子区的FXR可能结合序列的生物信息学分析真核细胞,调控基因转录的启动子区域往往位于基因5′侧翼序列-3 000 bp区域中,据报道小鼠MCP-1基因启动子区的调控序列主要位于-2 600 ~ -1 bp。因此,我们首先在NCBI的GenBank中获得了小鼠MCP-1基因5′侧翼-2 915 ~ +116 bp区域的序列。而后根据NUBIScan V2.0网站的NUBIScan algorithm在小鼠的MCP-1启动子区分析FXR的可能结合序列,发现在MCP-1基因转录起始位点上游存在一些分值较高的FXR可能结合序列(表1)。根据生物信息学分析结果以及文献报道的关于小鼠MCP-1启动子调控相关区域,我们设计了2对引物,扩增产物分别为包括现今所报道的小鼠MCP-1基因5′调控区序列(-2 642 ~ +82 bp)和MCP-1基因近端调控区(-322 ~ +82 bp),来进行启动子分析实验。以ANA-1细胞基因组为模板,根据生物信息学分析结果,扩增两端不同长度的MCP-1启动子片段并引入*Mlu* Ⅰ、*Xho* Ⅰ酶切位点。小鼠MCP-1启动子区2 724 bp(-2 642 ~ +82 bp):上游引物5′-CGACGCGTACGTTCCATTGTCCATCTGGGT-3′(*Mlu* Ⅰ酶切),下游引物5′-CCGCTCGAGGGTGGTGGAGGAAGAGAGAG-3′;小鼠MCP-1启动子区近端调控区424 bp(-322 ~ +82 bp):上游引物5′-CGACGCGTCAGTGAAAGCAGAGCCACTCCATTCAC-3′(*Mlu* Ⅰ酶切),下游引物:5′-CCGCTCGAGGGTGGTGGAGGAAGAGAGAGAG-3′(*Xho* Ⅰ酶切);PCR扩增:95 ℃,5 min;95 ℃,30 s,62 ℃,30 s,72 ℃,30 s,40个循环;72 ℃ 10 min;PCR扩增片段用*Mlu* Ⅰ、*Xho* Ⅰ双酶切后,连接到同样被这2种酶酶切的pGL3-Basic载体中的多克隆位点内,构建含MCP-1基因5′调控序列虫荧光素酶报告基因的重组质粒,并分别命名为pmMCP-1-Luc1(-2 642 ~ +82 bp)与pmMCP-1-Luc2(-322 ~ +82 bp)。重组质粒经双酶切和测序进一步鉴定。

转染及荧光素酶报告基因活性检测:具体方法参见Lipofectamine 2000产品说明书。转染前1 d,消化细胞,以一定密度接种于12孔细胞培养板。当细胞生长至70% ~80%融合时,准备转染。置备Lipofectamine 2000与质粒混合液,室温放置10 min。混合2管,室温放置20 min。吸尽孔中细胞培养液,用PBS冲洗2遍,用OPTIM洗1遍。加入Lipofectamine 2000与质粒混合液,并补加OPTIM。每孔中含有1/10总量pSV-β-Galactosidase作为内对照,转染5 h后,弃去转染液,加入正常细胞培养液,12 h后,分别加入含终浓度50 μmol/L CDCA(实验组)或等量DMSO(对照组)的OPTIM培养液,培养24 h,收集细胞。共转染:每组中除加入启动子报告基因质粒和pSV-β-Galactosidase外,再加入等量pCMX-FXR和pCMX-RXR表达质粒或pCMX空质粒。荧光素酶报告基因活性检测转染4 h后,每孔细胞加入1 × reporter lysis,4 ℃裂解30 min,离心收集上清。取20 μl上清按照检测试剂说明书操作,用化学发光检测仪检测荧光素酶的活性,酶标仪检测β-半乳糖苷酶的活性。

1.3 统计学分析

采用SPSS 10.0统计软件,数据用$\bar{x} \pm s$表示,组间差别行t检验。

2 结果

2.1 小鼠MCP-1基因启动子区的FXR可能结合序列的生物信息学分析

登陆美国生物技术信息中心的GenBank(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html)查找并下载小鼠MCP-1基因5′侧翼2.7 kb序列,而后根据NUBIScan V2.0(http://www.nubiscan.unibas.ch/)网站的NUBIScan algorithm在该序列中分析FXR的可能结合位点。结果见表1。

表1 小鼠MCP-1基因启动子区FXR可能结合位点序列和分值(FXR结合位点分析软件)

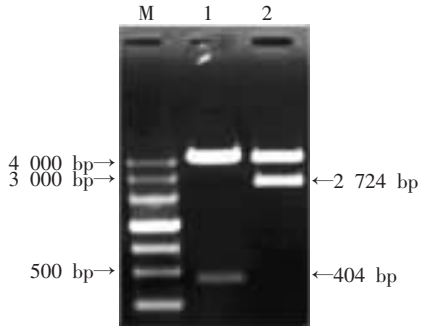
经典序列	正、负链序列位置(bp)	得分	z-分值	*P*值	E值	半位点E值	结合位点序列(5′→3′)
DR3	2 037(-)	0.838	n/a	0.007	n/a	n/a	GGGTCAtgtAGGTAA
IR10	2 016(+)	0.821	n/a	0.008	n/a	n/a	AGGGCAgttacctacaTGACCC
DR4	2 047(-)	0.765	n/a	0.018	n/a	n/a	AGGTCCannaGGGTCA
DR3	1 359(-)	0.749	n/a	0.023	n/a	n/a	AGGTAAcacAGGTGA
DR6	1 053(+)	0.740	n/a	0.018	n/a	n/a	AGATCAtgatatAGGTGA
DR10	1 037(+)	0.738	n/a	0.026	n/a	n/a	AGGACAgtgactagcaAGATCA
IR1	2 016(+)	0.727	n/a	0.046	n/a	n/a	AGGGCAgTTACCT
ER2	1 354(+)	0.719	n/a	0.057	n/a	n/a	TTACCTatGGGTAA

2.2 MCP-1基因启动子报告基因载体的构建

以ANA-1基因组DNA为模板,以所设计的2对引物通过PCR扩增小鼠MCP-1基因5′侧翼包括MCP-1启动子、FXR可能结合序列的长启动子调控区(-2 642 ~ +82 bp)和近端调控区(-322 ~ +82 bp)两端序列,插入pGL3 Basic的*Mlu* Ⅰ和*Xho* Ⅰ位点间。并用*Mlu* Ⅰ和*Xho* Ⅰ双酶切鉴定pmMCP-1-Luc1与pmMCP-1-Luc2。有阳性目的条带的克隆继续扩增,并送测序,测序结果与GenBank序列一致。构建的长短MCP-1基因启动子pGL3重组质粒经限制性内切酶*Mlu* Ⅰ和*Xho* Ⅰ双酶切后,经琼脂糖凝胶电泳,分别可见2 724、404 bp 2段插入片段,说明构建分析启动子活性的报告基因载体成功(图1)。

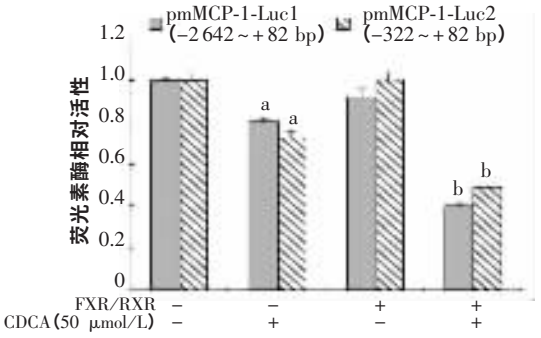
2.3 FXR对2段MCP-1启动子活性的影响

在FXR天然配体CDCA刺激下,pmMCP-1-Luc1(-2 642 ~ +82 bp)与pmMCP-1-Luc2(-322 ~ +82 bp)活性,与无配体刺激的对照组相比,在没有共转染FXR表达质粒时,有略微降低,可能为HEK293细胞中存在内源性的FXR;而共转染FXR和RXR真核表达质粒时,CDCA处理组与对照组相比,2段启动子的活性都显著降低($P<0.05$),且二者启动子活性下降幅度相当(图2)。



M:标准; 1: pmMCP-1-Luc2(－322～＋82 bp)重组质粒;
2: pmMCP-1-Luc1(－2 642～＋82 bp)重组质粒

图1 重组质粒双酶切电泳结果



a: $P<0.05$,与 FXR/RXR(－)、CDCA(50 μmol/L)(－)比较;
b: $P<0.05$,与 FXR/RXR(＋)、CDCA(50 μmol/L)(－)比较

图2 小鼠 MCP-1 基因启动子转染活性

3 讨论

为了研究 FXR 下调 MCP-1 的分子机制,我们首先对小鼠 MCP-1 基因 5′上游区域进行生物信息学分析,根据 NUBIScan V2.0 网站的 NUBIScan algorithm 分析了 MCP-1 启动子区的可能 FXR 结合序列(FXREs),发现可能的 FXREs 大概位于 MCP-1 基因启动子区上游(－1 500～－700 bp)区域。文献[6]报道小鼠 MCP-1 基因启动子区主要存在近段和远端两个调控区。本研究结果表明在 FXR 存在时,经 CDCA 处理后,2 段启动子活性都显著下降,且下降程度相当。关于 FXR 调控其靶基因的研究中,当其上调某一靶基因启动子的活性时,往往是 FXR/RXR 异二聚体或 FXR 单体通过直接结合靶基因启动子区的正性结合元件,促进其启动子的转录;而 FXR 下调某一靶基因启动子活性时,FXR/RXR 异二聚体或 FXR 单体通过直接结合靶基因启动子区的负性结合元件,抑制靶基因的表达。根据本实验结果,可推测 MCP-1 基因启动子的 FXR 负性结合元件可能在－322～＋82 bp 区域内。Claudel 等[6]研究发现 FXR 在肝癌细胞中以直接结合负性结合元件的方式下调 apoA1 基因的转录。分析 MCP-1 基因近端启动子序列的调控位点,存在有与炎症相关的转录因子调控位点[7],当然,FXR 下调靶基因表达也可通过间接方式进行,如 He 等[8]发现,FXR 可通过抑制 AP-1、NF-κB 活性而下调内皮细胞内皮素-1 的表达。而 FXR 激活后,可显著上调小异二聚体伴侣(SHP)的表达,在内皮细胞中,FXR 可通过上调 SHP 进而抑制基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达[9]。但 FXR 究竟是通过何种机制下调 MCP-1 的转录,尚需进一步研究。

关于核受体 FXR,最初研究主要集中于调节胆汁酸生成和胆固醇代谢,而近年来在代谢综合征的研究中,发现 FXR 在调控脂代谢和糖代谢中具有越来越重要的作用[7],这进一步拓展了 FXR 的研究领域。本室以往研究发现,在小鼠巨噬细胞株 ANA-1 中 FXR 天然配体 CDCA 激活 FXR 后,能下调 MCP-1 的表达[4]。动脉粥样硬化是一炎症反应,而 MCP-1 是一炎性介质,能参与动脉粥样硬化发生、发展。本研究进一步探讨 FXR 下调 MCP-1 表达的分子机制,在克隆的不同长度的 2 段 MCP-1 基因启动子活性分析中发现,FXR 分别降低 2 段 MCP-1 启动子活性,说明小鼠 MCP-1 基因启动子区的 FXR 负性结合元件很有可能在－322～＋82 bp 区域内。本实验结果为进一步研究 FXR 下调 MCP-1 分子表达的详细分子机制奠定了实验基础。同时,本室发现 FXR 下调 MCP-1 的表达为动脉粥样硬化的炎症发生机制提供了新的实验依据,也为临床治疗动脉粥样硬化提供了新的思路和新的靶标分子。

参考文献:

[1] Kumar S N, Boss J M. Site A of the MCP-1 distal regulatory region functions as a transcriptional modulator through the transcription factor NF1[J]. Mol Immunol, 2000, 37(11): 623－632.
[2] Ahmed R A, Murao K, Imachi H, *et al*. c-Jun N-terminal kinases inhibitor suppresses the TNF-alpha induced MCP-1 expression in human umbilical vein endothelial cells[J]. Endocrine, 2009, 35(2): 184－188.
[3] Mukerjee R, Deshmane S L, Darbinian N, *et al*. St. John's Wort protein, p27SJ, regulates the MCP-1 promoter[J]. Mol Immunol, 2008, 45(15): 4028－4035.
[4] 张迁, 甘淋, 鲁力, 等. 类法尼醇 X 受体在巨噬细胞中下调单核细胞趋化蛋白 1 的表达[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(1): 21－24.
[5] Ping D, Boekhoudt G, Zhang F, *et al*. Sp1 binding is critical for promoter assembly and activation of the MCP-1 gene by tumor necrosis factor[J]. J Biol Chem, 2000, 275(3): 1708－1714.
[6] Claudel T, Sturm E, Duez H, *et al*. Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription *via* a negative FXR response element[J]. J Clin Invest, 2002, 109(7): 961－971.
[7] Das A, Fernandez-Zapico M E, Cao S, *et al*. Disruption of an SP2/KLF6 repression complex by SHP is required for farnesoid X receptor-induced endothelial cell migration[J]. J Biol Chem, 2006, 281(51): 39105－39113.
[8] He F, Li J, Mu Y, *et al*. Downregulation of endothelin-1 by farnesoid X receptor in vascular endothelial cells[J]. Circ Res, 2006, 98(2): 192－199.
[9] Kim M S, Shigenaga J, Moser A, *et al*. Repression of farnesoid X receptor during the acute phase response[J]. J Biol Chem, 2003, 278(11): 8988－8995.

(**收稿**:2009-04-17;**修回**:2009-05-07)
(编辑 龙 亮)