文章编号:1000-5404(2011)07-0707-04

论著

Klotho基因启动子区域定位及活性分析

宋双双,王虎林,司良毅 (400038 重庆,第三军医大学西南医院老年病科)

【摘要】 **目的** 构建含不同长度klotho基因启动子片段的报告基因载体,研究其在不同细胞系中的转录活性。**方法** 以人全血基因组DNA为模板,克隆长短不同的klotho基因启动子片段,命名为klotho Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ;分别克隆入荧光素酶报告基因质粒pGL3-Basic构建真核表达载体;采用Lipofectamine 2000将重组质粒分别和pRL-TK共转染HEK293和HeLa细胞,分析不同长度的klotho基因启动子片段在细胞内的转录活性。**结果** 双酶切和测序鉴定均显示表达载体构建成功;klotho基因的核心启动子区域位于-504~-6;双荧光素酶活性检测显示klotho Ⅲ在2种细胞中的转录活性明显高于klotho Ⅰ、Ⅱ($P<0.05$),而klotho Ⅳ的转录活性在HEK293细胞中能维持高水平,在HeLa细胞中显著下降($P<0.01$)。**结论** klotho基因启动子在不同细胞中的转录活性不同,-973~-504区域可能是导致HeLa细胞中klotho Ⅳ转录活性下降的原因。

【关键词】 klotho;基因;启动子;报告基因载体;转录活性
【中图法分类号】 R394-33;R394.3 【文献标志码】 A

Promoter region of human klotho and its transcriptional activity in different cell lines

Song Shuangshuang, Wang Hulin, Si Liangyi (Department of Geriatrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To construct vectors with report gene containing klotho promoter segments in different lengths and identify their transcriptional activities in different cell lines. **Methods** Genomic DNA of human red cells was used as the template, and human klotho promoter segments in different lengths were amplified by PCR. The amplified products were named klotho Ⅰ to Ⅳ and then respectively cloned into pGL3-Basic vectors with luciferase report gene to construct eukaryotic expression vectors. The recombinant vectors were respectively co-transfected with pRL-TK vectors into HEK293 and HeLa cells with Lipofectamine 2000. The transcriptional activities were analyzed by double luciferase method. **Results** The different length klotho promoter segments were successfully cloned and their expression vectors were successfully constructed by double digestion and sequencing. The sequence -504 to -6 may be a core promoter region of klotho. The activities of klotho Ⅰ and klotho Ⅱ in the both cells were lower, and the activity of klotho Ⅲ in the both cell lines was higher ($P<0.05$). The activity of klotho Ⅳ was maintained at a high level in HEK293 cells, but significantly the activity was decreased in HeLa cell ($P<0.01$). **Conclusion** Its expression level of klotho is cell-specific and the sequence -973 to -504 may be responsible for the activity decrease of klotho Ⅳ in HeLa cells.

【**Key words**】 klotho; gene; promoter; vector with reporter gene; transcriptional activity

Corresponding author: Si Liangyi, E-mail: siliangyi@126.com

klotho基因具有抗衰老作用。研究表明klotho基因产物参与衰老及衰老性疾病的发生、发展。它与冠心病、骨质疏松、肾脏疾病、神经系统的退行性变等衰老性疾病具有密切关系[1-4]。目前也有研究者把klotho基因作为靶点来研究恶性肿瘤的防治[5-7]。虽然关于klotho表达水平与衰老性疾病发生、发展的研究越来越多,但是目前对klotho基因启动子区的相关研究较少。研究者对klotho翻译起始点上游500 bp内的序列进行了研究,发现没有典型的TATA盒或CAAT盒,而是存在5个SP1结合位点,但是klotho核心启动子所在的区域以及启动子区域内的调控元件还没有相关实验证实。本研究克隆了不同长度的klotho

【通信作者】 司良毅,E-mail:siliangyi@126.com

基因启动子片段，利用双荧光素酶法检测其在HEK293和HeLa细胞中的转录活性，以明确klotho基因启动子区域的功能。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

外周血来自本院体检中心的健康体检者，*E. coli* DH5α菌株、HEK293细胞、HeLa细胞均由第三军医大学免疫研究所陈戬博士赠送，荧光素酶报告基因质粒pGL3-Basic、pRL-TK、T_4DNA连接酶、*Mlu* Ⅰ、*Xho* Ⅰ为美国Promega公司产品，DMEM培养基为美国Gibco公司产品，Primer STAR DNA聚合酶为日本TaKaRa公司产品，新生胎牛血清为杭州四季青生物公司产品，Lipofectamine 2000为美国Invitrogen公司产品，Dual luciferase荧光素酶检测试剂盒为江苏碧云天公司产品，血液基因组DNA提取试剂盒、PCR产物回收试剂盒、质粒抽提试剂盒均为北京天泽公司产品，引物由上海英骏公司合成，其余化学试剂均为国产生化试剂。

1.2 方法

1.2.1 klotho基因5′侧翼端序列的生物信息学分析 在NCBI中以klotho为基因名查找参考序列并截取klotho基因翻译起始位点上游2 000 bp的基因组DNA序列，利用Promoter 2.0、NNPP、Promoter SCAN、ConSite、TFSEARCH ver 1.3预测软件进行启动子和转录因子结合位点的特征分析。

1.2.2 引物设计 通过引物设计软件以及对荧光素酶报告基因质粒pGL3-Basic多克隆酶切位点的分析，设计引物并命名为P、PⅠ、PⅡ、PⅢ、PⅣ，其中P为公用下游引物，PⅠ～PⅣ是上游引物，分别克隆不同长度的klotho基因启动子片段，见表1。其中上、下游引物分别引入*Mlu* Ⅰ和*Xho* Ⅰ酶切位点。

表1 扩增klotho基因启动子片段的引物序列和重组载体
（翻译起始点定位为1）

引物	引物序列	扩增片段范围(bp)	重组载体
PⅠ	ACGACGCGTGCAGTCCCGGCTCGCAGGTAA	−143～−6	pGL3-Basic-KLⅠ
PⅡ	ACGACGCGTGAATGAACCTGAGCGTCCACG	−318～−6	pGL3-Basic-KLⅡ
PⅢ	GCGACGCGTATGTCCAGCCGGAGCTTCTTT	−504～−6	pGL3-Basic-KLⅢ
PⅣ	TCGACGCGTCAGATGGCAAATGTGCGACC	−973～−6	pGL3-Basic-KLⅣ
P	CCGCTCGAGGGGAGCCAGGCTCCGGGGCCC		

1.2.3 klotho基因启动子片段的PCR扩增、表达载体的构建及鉴定 从人全血中提取血液基因组DNA作为模板，PCR扩增不同长度的klotho基因启动子片段。反应体系：Primer STAR DNA聚合酶0.3 μl，Prime STAR GC Buffer 12 μl，dNTP 2 μl，模板3 μl，分别取上游引物PⅠ～PⅣ和下游引物P各1 μl，加ddH_20至总体积25 μl。反应条件：98 ℃预变性5 min，98 ℃ 30 s，60 ℃ 30 s，72 ℃ 40 s，30个循环，72 ℃延伸10 min。PCR产物用1%琼脂糖电泳检测，胶回收PCR产物，PCR产物和pGL3-Basic载体经*Xho* Ⅰ和*Mlu* Ⅰ双酶切后，克隆入pGL3-Basic体，构建重组质粒pGL3-Basic-KL Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ，见表1。转化*E. coli* DH5α，酶切鉴定为阳性克隆后送上海生工生物工程技术服务有限公司测序[8]。

1.2.4 klotho启动子转录活性的检测 以pGL3-Basic为阴性对照，检测不同长度的klotho基因启动子片段在HEK293和HeLa细胞中的转录活性。HEK293和HeLa细胞均接种于含有10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中，37 ℃、5% CO_2培养箱中培养。转染前1 d，将其平均接种于24孔板中，调整密度使转染时细胞达到70% ～80%融合。用脂质体法将重组质粒pGL3-Basic-KLⅠ～Ⅳ分别和内对照质粒pRL-TK共转染HEK293和HeLa细胞，2种质粒的比例为20∶1，转染48 h后用PBS洗各细胞2次，裂解细胞后在化学发光仪中检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶活性，详细操作见碧云天双荧光素酶检测试剂盒说明书。计算荧火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值，即为报告基因的相对活性。每组重复3孔。

1.3 统计学处理

数据以$\bar{x} \pm s$表示，采用SPSS 13.0统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 klotho基因5′侧翼序列的生物信息学分析

利用上述提到的3种启动子在线分析软件对人类klotho基因翻译起始点上游2 000 bp的序列进行预测，得出潜在的启动子序列，见表2。3个软件的综合预测结果表明klotho基因的启动子区域位于−500～6 bp区域的可能性很大。

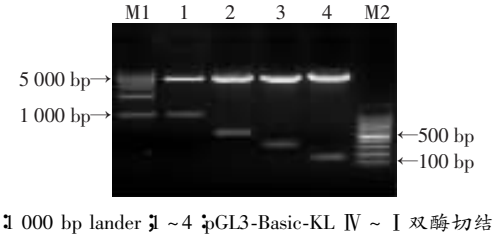
表2 klotho基因翻译起始点上游2 kb范围内启动子预测

启动子预测软件	预测结果定位	评分
Promoter2	900	0.646
	1 500 *	0.648
Nueral Network Promoter	422～472	0.95
Prediction	471～521	0.89
	479～529	0.82
	1 744～1 794 *	0.82
	1 900～1 950 *	1.00
Promoter Scan	1 604～1 854 *	80.41

*：表示预测结果与本实验结果相符合

2.2 klotho启动子片段的PCR扩增、表达载体的构建及鉴定

以人全血基因组DNA为模板，分别扩增不同长度的klothoⅠ（137 bp）、klothoⅡ（312 bp）、klothoⅢ（498 bp）、klothoⅣ（967 bp）片段，重组质粒pGL3-Basic-KL Ⅰ～Ⅳ经*Xho* Ⅰ和*Mlu* Ⅰ双酶切鉴定结果见图1。测序结果显示克隆的不同长度klotho启动子片段除一个碱基外，其余序列与klotho基因参考序列完全一致，而这个不一致的碱基正好是单核苷酸多态性位点，序列编号为rs1207568，提示克隆成功。

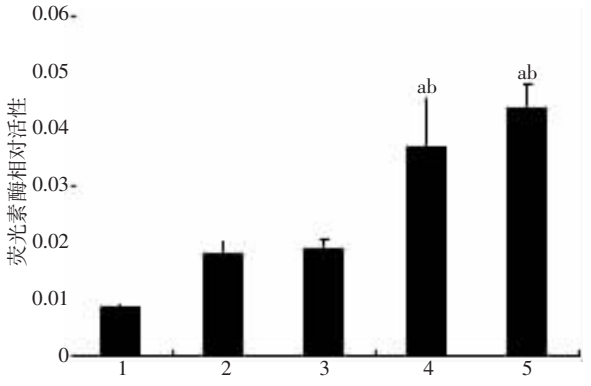


M1：1 000 bp lander；1～4：pGL3-Basic-KLⅣ～Ⅰ双酶切结果；M2：100 bp lander

图1 重组质粒pGL3-Basic-KL Ⅰ～Ⅳ双酶切电泳结果

2.3 klotho 启动子转录活性的检测

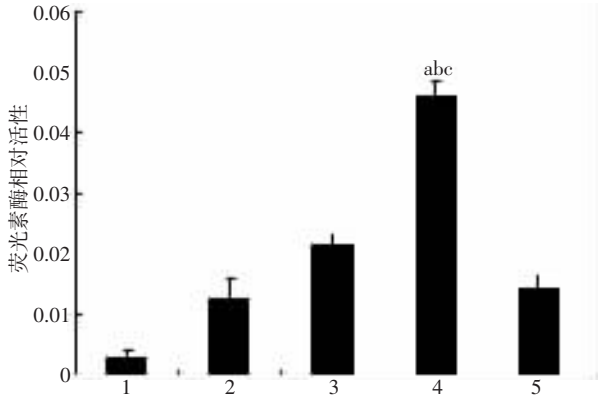
利用荧光素酶检测系统测定荧光值，结果表明重组质粒 pGL3-Basic-KL Ⅰ～Ⅲ在 2 种细胞中转录活性水平差异程度相似，与 pGL3-Basic 空载体相比，pGL3-Basic-KL Ⅲ的相对荧光值明显增强。其中，①pGL3-Basic-KL Ⅰ、pGL3-Basic-KL Ⅱ的相对荧光值较低，并且它们之间没有明显的差异；②pGL3-Basic-KL Ⅲ与 pGL3-Basic-KL Ⅰ、pGL3-Basic-KL Ⅱ相比，相对荧光值显著增强（$P<0.05$）。另外，pGL3-Basic-KL Ⅳ在 2 种细胞中的转录活性水平有较大的差异，在 HEK293 细胞中，它与 pGL3-Basic-KL Ⅰ、pGL3-Basic-KL Ⅱ相比，荧光素酶的相对活性显著增强（$P<0.05$），与 pGL3-Basic-KL Ⅲ相比，荧光素酶的相对活性无明显差异；在 HeLa 细胞中，它与 pGL3-Basic-KL Ⅲ相比，荧光素酶的相对活性明显降低（$P<0.01$），见图 2、3。



1：pGL3-Basic；2：pGL3-Basic-KL Ⅰ；3：pGL3-Basic-KL Ⅱ；4：pGL3-Basic-KL Ⅲ；5：pGL3-Basic-KL Ⅳ

a：$P<0.01$，与 pGL3-Basic 比较；b：$P<0.05$，与 pGL3-Basic-KL Ⅰ、pGL3-Basic-KL Ⅱ比较

图 2　不同 klotho 基因启动子片段在 HEK293 细胞中的相对活性



1：pGL3-Basic；2：pGL3-Basic-KL Ⅰ；3：pGL3-Basic-KL Ⅱ；4：pGL3-Basic-KL Ⅲ；5：pGL3-Basic-KL Ⅳ

a：$P<0.01$，与 pGL3-Basic 比较；b：$P<0.05$，与 pGL3-Basic-KL Ⅰ、pGL3-Basic-KL Ⅱ比较；c：$P<0.01$，与 pGL3-Basic-KL Ⅳ比较

图 3　不同 klotho 基因启动子片段在 HeLa 细胞中的相对活性

同时由于 pGL3-Basic-KL Ⅳ在 HEK293 和 HeLa 细胞中转录活性有显著差异，而 -504～-973 区域是 pGL3-Basic-KL Ⅲ和 pGL3-Basic-KL Ⅳ之间的差异所在，因此我们应用 Consite 软件对 klotho 基因 -504～-973 范围内的转录因子进行了预测，为进一步分析 klotho 基因存在表达差异的原因打下基础，见表 3。

表 3　klotho 基因 -504～-973 范围内转录因子预测结果

转录因子	结合序列	所在区域
NF-kappaB	GGGACCTCCC	-940～-949
SQUA	TCAAAATTGGAAAC	-809～-823
HFF-3	TGGTGTTGGTT	-783～-794
Pbx	AGAACAATCAAC	-764～-775
Staf	CCAGGGTATTCTGAGAGATC	-725～-744
Athb-1	AAATTATT	-692～-699
Irf-2	TAAAAGGGAGAGCAAAAC	-662～-697
Dorsal-1	GAGCAAAACCCC	-659～-670
Dorsal-2	GCAAAACCCC	-659～-668
P50	GGGGGAATCCC	-562～-572
NF-kappaB	GGGGAATCCC	-562～-571
P50	GGGGAATCCCT	-561～-571
Snail	CACCTG	-521～-526

3　讨论

关于 klotho 基因突变的小鼠的研究发现突变小鼠模型出现动脉硬化、骨质疏松、恶性肿瘤、肺气肿、不育以及寿命缩短等类似人类衰老的症状，用外源性 klotho 蛋白补充后上述症状明显缓解，从而推测 klotho 基因产物能够调节衰老以及衰老性疾病[9-11]。人类 klotho 基因全长大约 50 kb，位于 13q12，含有 5 个外显子。第三外显子区域内不同的剪接位点导致同一个 klotho 基因产生 2 个转录物，分别编码膜型蛋白和分泌型蛋白。Northern blot 检测显示人类 klotho mRNA 主要在前列腺、肾脏、小肠和胎盘表达，且分泌型蛋白是主要的表达类型。klotho 基因的启动子区域范围较大，且表达调控方式十分复杂，本课题组曾证实 klotho 启动子区的单核苷酸多态性与老年人动脉硬化和高血压发病密切相关[1]，充分说明了 klotho 启动子区域对基因表达调控以及蛋白功能的影响，但是关于 klotho 启动子区域的转录活性少见报道。

序列分析显示 klotho 基因启动子区域内无典型的 TATA 盒，而是存在 5 个 SP1 结合位点。SP-1 是 DNA 结合蛋白，含有 3 个锌指结构，主要结合于富含 GC 的 DNA 序列，调节缺乏 TATA 盒的基因的转录。推测 SP1 参与调控 klotho 基因的表达。它分别位于翻译起始点上游 -32～-42、-53～-63、-167～-177、-201～-211、-405～-415 区域。我们以 5 个 SP1 结合位点为基础，设计了序列缺失突变引物，用荧光素

酶报告基因载体 pGL3-Basic-KLⅠ~Ⅳ和海肾荧光素酶的内参质粒 pRL-TK 共转染 HEK293 和 HeLa 细胞，运用双荧光素酶法分析不同 klotho 启动子片段在细胞中的转录活性。双荧光素酶报告基因实验显示重组质粒 pGL3-Basic-KL Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ（分别包含了2、4、5个SP1结合位点）在 HEK293 和 HeLa 细胞中的转录活性逐渐增强，并且 pGL3-Basic-KLⅢ的相对荧光素酶活性明显高于 pGL3-Basic-KLⅠ、pGL3-Basic-KLⅡ和 pGL3-Basic 空载体，提示在 Klotho 基因翻译起始点上游 -506 bp 区域（含有全部的 SP1 结合位点）是核心启动子区域；pGL3-Basic-KLⅠ和 pGL3-Basic-KLⅡ分别包含了前2个 SP1 结合位点和前4个 SP1 结合位点，但是它们的相对荧光素酶活性没有明显差异，推测人类 klotho 基因的表达调控需要翻译起始点上游 -506 bp 区域内的5个 SP1 共同参与。

本实验结果提示 pGL3-Basic-KLⅣ同样包含了5个 SP1 结合位点，却在不同的细胞中有不同的表达趋势，原因主要在于：一方面不同的细胞系存在不同的转录调控途径，转录因子的不同导致目的基因的调控结果不同，进而影响转录活性和表达水平。关于 HEK293 细胞和 HeLa 细胞中有差异的转录因子我们研究的还不是很清楚，本研究通过生物信息学的方法预测了 pGL3-Basic-KLⅣ和 pGL3-Basic-KLⅢ的差异片段中存在的转录因子，接下来的研究可以以此为基础通过启动子区域的缺失突变实验和凝胶电泳迁移实验等方法证实具体的转录因子在细胞的转录调节中的作用及转录活性存在差异的原因。另一方面 SP1 结合位点为富含 GC 的 DNA 序列，可能存在甲基化现象，可能影响到 klotho 基因的启动子活性。另外研究表明在大鼠肝脏中，SP1 随着年龄增加逐渐被氧化，体外实验也发现 SP1 的结合活性可以被氧化剂可逆性抑制。体内实验也说明氧化剂通过氧化 SP1、抑制它的结合活性进而下调一些基因的表达[12-13]，由此推测 klotho 基因转录活性的下降可能与 SP1 的氧化状态有密切关系。接下来的实验有必要对其他含有 SP1 结合位点的区域进行分析。

另外，本实验选择 HEK293 和 HeLa 细胞的原因是 klotho 基因在不同的组织表达有差异，在肾脏、生殖器官中高表达，而在其他器官表达较低甚至没有表达。我们通过 RT-PCR 法确认了这2个细胞株均有 klotho 基因表达，因此这2个细胞系肯定含有必要的调节 klotho 基因表达调控的细胞因子。而且，实验中测定的相对荧光素酶活性较低，一种可能性是 klotho 基因有多个启动子，我们只克隆到了较弱的一个。另外一种可能性是 klotho 基因组成性表达较低，而有着复杂的反式作用因子来调节其表达。

该研究初步探索了不同长度的 klotho 启动子片段在不同细胞中的转录活性，确定了 klotho 基因的核心启动子所在区域以及可能的调控元件，为研究 klotho 基因转录调控元件的作用以及阐明该基因的表达调控机制奠定了基础。

参考文献：

[1] 王虎林，司良毅，孙兰英，等. Klotho 基因 G-395A 多态性与动脉硬化的相关性研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志，2008，10(2)：96-98.

[2] 王虎林，肖航，司良毅. Klotho 基因与心血管病的关系及研究现状[J]. 中华老年心脑血管病杂志，2007，9(2)：136-138.

[3] Wang H L, Xu Q, Wang Z, *et al*. A potential regulatory single nucleotide polymorphism in the promoter of the Klotho gene may be associated with essential hypertension in the Chinese Han population[J]. Clin Chim Acta, 2010, 411(5/6): 386-390.

[4] Ogata N, Matsumura Y, Shiraki M, *et al*. Association of klotho gene polymorphism with bone density and spondylosis of the lumbar spine in postmenopausal women[J]. Bone, 2002, 31(1): 37-42.

[5] Wolf I, Levanon-Cohen S, Bose S, *et al*. Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer[J]. Oncogene, 2008, 27(56): 7094-7105.

[6] Chen B, Wang X, Zhao W, *et al*. Klotho inhibits growth and promotes apoptosis in human lung cancer cell line A549[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29: 99.

[7] Lee J, Jeong D J, Kim J, *et al*. The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma[J]. Mol Cancer, 2010, 9: 109.

[8] 司少艳，梁爽，宋淑军，等. 小鼠 TERT 启动子的克隆及在肿瘤细胞中的转录活性研究[J]. 现代肿瘤医学，2010，18(2)：226-229.

[9] Kurosu H, Yamamoto M, Clark J D, *et al*. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho[J]. Science, 2005, 309(5742): 1829-1833.

[10] Kurosu H, Kuro O M. The Klotho gene family as a regulator of endocrine fibroblast growth factors[J]. Mol Cell Endocrinol, 2009, 299(1): 72-78.

[11] 华明娟，马厚勋，牛永红，等. KLOTHO 的3个 SNP 位点分布与几种疾病相关性的研究[J]. 中国现代医学杂志，2008，18(9)：1174-1178.

[12] Ammendola R, Mesuraca M, Russo T, *et al*. Sp1 DNA binding efficiency is highly reduced in nuclear extracts from aged rat tissues[J]. J Biol Chem, 1992, 267(25): 17944-17948.

[13] Liu H, Zhou M, Luo X, *et al*. Transcriptional regulation of BRD7 expression by Sp1 and c-Myc[J]. BMC Mol Biol, 2008, 9: 111.

（收稿：2010-12-09 修回：2010-12-29）

（编辑 汪勤俭）