文章编号:1000-5404(2011)21-2249-03

论著

转录因子 Sp1 在人内皮细胞高表达脂多糖相关因子 1 基因转录中的作用

梁自文[1],吴惠玲[1],罗 敏[1],杨宗城[2],陈 建[2],陈 渝[2],罗 勤[2] (400038 重庆,第三军医大学西南医院:内分泌科[1],全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[2])

[摘要] **目的** 明确转录因子 Sp1 在人内皮细胞高表达脂多糖相关因子 1(endothelial-overexpressed lipopolysiccharide-associated factor 1, EOLA1)基因转录调控中的作用。**方法** 定点突变 EOLA1 基因核心启动子 -734 ~ -666 序列中推断的 Sp1 结合位点,观察启动子活性变化;进行凝胶电泳迁移和染色质免疫共沉淀验证 Sp1 转录因子与启动子区顺式作用元件发生相互作用。**结果** 突变 Sp1 结合位点后,核心启动子的活性(0.12 ± 0.01)较野生启动子(2.51 ± 0.98)显著下降($P < 0.05$),EMSA 和染色质免疫共沉淀验证了 SP1 与启动子区顺式作用元件相互作用。**结论** 转录因子 Sp1 调控了 EOLA1 基因的基础转录。

[关键词] EOLA1;Sp1;启动子;凝胶电泳迁移;染色质共沉淀
[中图法分类号] R394-33;R394.3 [文献标志码] A

Transcription factor Sp1 regulates basal transcription of human EOLA1 gene

Liang Ziwen[1], Wu Huiling[1], Luo Min[1], Yang Zongcheng[2], Chen Jian[2], Chen Yu[2], Luo Qin[2] ([1]Department of Endocrinology, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of stimulating protein 1 (Sp1) transcription factor in the transcriptional regulation of human endothelial-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor 1 (EOLA1) gene. **Methods** Site-mutation of a putative Sp1 regulatory site locating at -734 to -666 of the core promoter of EOLA1 gene was used to analyze promoter activity. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and chromatin immunoprecipitation analysis (ChIP) were performed to confirm whether Sp1 bound to the site. **Results** Mutation of the Sp1 regulatory site resulted in a significant decline of EOLA1 promoter activity ($P < 0.05$). EMSA and ChIP showed that Sp1 bound to the site. **Conclusion** Basal transcription of EOLA1 gene is regulated by Sp1 transcription factor.

[**Key words**] endothelial-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor 1; stimulating protein 1; promoter; electrophoretic mobility shift assay; chromatin immunoprecipitation analysis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670838). Corresponding author: Liang Ziwen, E-mail: liangzw99@yahoo.com.cn

人内皮细胞高表达脂多糖相关因子 1(endothelial-overexpressed lipopolysiccharide-associated factor 1, EOLA1, GenBank No: 074889)系本实验室在脂多糖刺激的 ECV304 差异表达基因谱中克隆的功能未明基因,后来发现其在静息的人脐静脉内皮细胞不表达,而在脂多糖激活后显著表达,故命名为 EOLA1[1]。EOLA1 蛋白在全细胞均有表达,但胞核聚集更明显,在细胞内高表达 EOLA1 后促进了细胞的增殖和凋亡的抑制,在炎症反应组织中参与细胞抗炎作用[2]。在组织表达检测中,显示 EOLA1 表达于血管丰富的正常组织,在肿瘤组织中仅表达于肿瘤间质的血管内皮细胞和成纤维细胞,但在某些乳腺癌标本也观察到 EOLA1 的表达[3]。迄今为止对 EOLA1 基因的功能尚不清楚。分析 EOLA1 精氨酸序列中 C-端含活化信号集合子 1 类似物(activating signal cointegrator 1, ASC-1 homology or ASCH)功能域,因此,EOLA1 属 ASCH 超家族成员。ASCH 蛋白在细胞内组合成活化因子复合物,能与 RNA 聚合酶和多种转录因子结合,架起转录因子和 DNA 之间结合的桥梁,调控相关基因的转录[4]。

目前对 EOLA1 基因自身的转录调控机制仍不清

[基金项目] 国家自然科学基金(30670838)
[通信作者] 梁自文,E-mail:liangzw99@yahoo.com.cn

楚。我们前期克隆了 EOLA1 基因 5′-侧翼区序列,经系列缺失突变和点突变报告基因活性检测,确定 EOLA1 基因的核心启动子区域,它决定了 EOLA1 基因的基础转录,并通过生物信息学分析显示核心启动子周围存在数个可能的转录因子结合位点[5]。本研究进一步用实验证明转录因子 Sp1 与启动子区域的结合对 EOLA1 转录的调节起着关键作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人 ECV304 细胞株(ATCC 公司)培养于含 10% 胎牛血清的 M199 培养基中,置 5% CO_2 细胞培养箱培养。

1.2 定点突变

取我们前期扩增的 EOLA1 基因 5′-侧翼区 -734 ~ +50 片段作为模板[5],突变启动子区域上 Sp1 顺式调控元件。根据 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene 公司)说明书操作,将 Sp1 结合位点定点突变 4 个碱基,即将 -704GGGCGG -697 突变为 -704GAATCG -697,经 PCR 扩增后将野生片段和突变片段分别插入 pGL3-basic 质粒,测序确认,转染 ECV304 细胞,瞬时表达,测定萤火虫荧光素酶活性值(M1)和海葵荧光素酶活性值(M2),计算样本相对活性(M1/M2)。

1.3 凝胶电泳迁移和超迁移分析(EMSA)

准备 ECV304 细胞核提取物,合成下列含 24 bp 寡核苷酸(5′-TTTAAAAACCCCGCCCCCAGCCCC-3′)作为探针进行 EMSA,探针末端标记[γ -^{32}P] ATP,根据 EMSA 试剂盒(Promega 公司)进行操作反应,每个反应包括 4.8 μg 的 ECV304 细胞核提取物、25 ng 放免标记寡核苷酸(150 000 cpm)和结合缓冲液,反应产物在 4% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳,干胶后 -80℃过夜显影。竞争试验采用下列方法完成,分别取 50 倍剂量的非标记探针(冷探针)、合成 Sp1 结合位点突变探针(5′-TTTAAAAACGAATCCCCCAGCCCC-3′)和非特异竞争复合物 poly (dI-dC),加入到结合反应混合液中,15 min 后再加入放免探针。超迁移试验采用下述方法完成,分别取 4 μg 抗 Sp1 抗体(Santa 公司)或对照正常 IgG,加入到结合反应复合物中,置冰上孵育 30 min,再加入标记探针,所有反应在 4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳和放射自显影。

1.4 染色质免疫沉淀分析(ChIP)

根据 ChIP 检测试剂盒说明书(Upstate 公司)进行操作。简述如下,取约 1×10^6 ECV304 细胞,于培养液中加入甲醛,终浓度为 1%,37 ℃固定细胞 10 min,使蛋白质和 DNA 发生交联,在冰冷的 PBC 溶液中收割细胞,加 SDS 裂解细胞,超声波剪切 DNA,用 30% 最大功率剪切 10 次,每次持续 15 s,2 次超声剪切之间冰上预冷 1 min。将超声剪切后的 DNA 用 ChiP 稀释缓冲液稀释 10 倍,取 20 μl 稀释液保存备 PCR 反应作为对照。其余稀释液加入蛋白 A 琼脂糖磁珠,4 ℃孵 2 h,分为 2 组,一组加入抗 Sp1 抗体(2 μg),4℃振荡过夜,另一组加入 IgG 抗体(无关抗体)作为阴性对照;将免疫复合物用磁珠沉淀,将沉淀物分别经低盐、高盐和氯化锂 3 次系列冲洗,然后用 TE 缓冲液冲洗 2 次,每次冲洗时间 5 min,4 ℃倒置,新配 250 μl 洗脱缓冲液将蛋白/DNA 复合物从磁珠上洗脱,加氯化钠使 Na^+ 浓度为 200 mmol/L,65℃孵育 4 h,松解蛋白/DNA 交联,用 PCR 纯化试剂盒(Qiagen 公司)纯化 DNA 片段,以回收 DNA 片段为模板,进行 PCR 反应,合成引物(上游:5′-CTCTCAGCCCCGCCCCA-3′,下游:5′-GAGCTCGCGGACTCTTGA-3′),扩增产物越过 EOLA1 启动子区域,片段长度为 250 bp,电泳检测。

1.5 统计学处理

将各样本(M1/M2)值以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 SPSS 12.0 软件进行单因素方差分析。

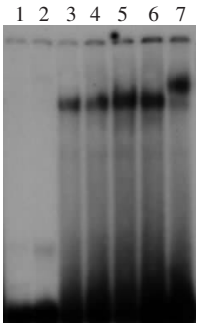
2 结果

2.1 突变 Sp1 结合位点后核心启动子活性

将 pGL3-basic 质粒、带野生核心启动子的 pGL3-785 和突变核心启动子上 Sp1 结合位点的 pGL3-785m 分别转染 ECV304 细胞,瞬时表达后,测定双荧光素海肾蓝(M1)和海葵荧光素酶活性值(M2)活性,每组重复 3 次,取平均值,结果显示,突变 Sp1 结合位点后核心启动子活性(0.12 ± 0.01)较野生启动子(2.51 ± 0.98)显著下降($P<0.05$),接近阴性对照水平(0.10 ± 0.01)。

2.2 EMSA 检测 Sp1 与 EOLA1 启动子间的相互作用

采用 EMSA 实验进一步验证转录因子 Sp1 能否与核心启动子位点结合,结果如图 1 显示,放免标记探针和细胞核提取物之间发生了结合,显示了凝胶迁移带;过量未标记的寡核苷酸(冷探针)有效地竞争标记探针的结合位点;提示 Sp1 特异地结合到核心启动子上的相应位点。进一步采用突变核心启动子 Sp1 位点的寡核苷酸(突变探针)并不能竞争野生探针与 Sp1 的结合,显示我们引入的突变不能剥夺野生寡核苷酸与 Sp1 的结合,非特异竞争复合物 poly(dI-dC)也不能竞争野生探针与 Sp1 的结合;加非特异性抗体 IgG 没有超迁移现象,而加抗 Sp1 抗体于结合反应中导致了一条放免条带的超迁移。结果证明了 Sp1 转录因子结合到了 EOLA1 启动子的 GC 盒,是 EOLA1 基础转录活性所必需的转录因子。

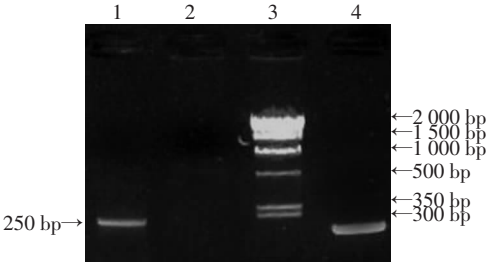


1:仅 ECV304 细胞核提取物;2:过量的非标记寡核苷酸(冷探针);3:标记探针;4:突变探针;5:非特异竞争复合物 poly(dI-dC);6:正常 IgG;7:加抗 Sp1 抗体

图 1 Sp1 与 EOLA1 启动子间的相互作用的 EMSA 检测结果

2.3 染色质共沉淀检测 Sp1 与 EOLA1 启动子的结合

为了证实 Sp1 结合到 EOLA1 启动子的 GC 盒，我们用 ChIP 实验检测了 Sp1 在天然染色质的存在，主要通过 3 个步骤完成：完整细胞内发生化学交联形成蛋白质-DNA 复合物，通过免疫共沉淀恢复特异蛋白质；通过 PCR 反应检测共沉淀的 DNA。如图 2 所示，Sp1 抗体能从 ECV304 细胞成功地免疫沉淀 EOLA1 启动子 DNA 和 Sp1 蛋白。未加抗体的阴性对照免疫沉淀物中无 PCR 产物。结果表明 Sp1 的确结合到 EOLA1 启动子并调控了 ECV304 细胞内的转录活性，因此，再次验证了我们在实验中突变 EOLA1 启动子上 GC 盒后，Sp1 不能与启动子结合而致转录活性显著降低的结果。



1：加 Sp1 抗体扩增后产物；2：加入 IgG 抗体扩增后产物；3：DNA 分子量标准；4：阳性对照组扩增后产物

图 2 ChIP 产物 PCR 反应结果

3 讨论

EOLA1 基因是在脂多糖刺激 ECV304 差异基因表达谱中克隆的功能未明基因，定位于染色体 Xq28，故又称为 Cxorf40A（chromosome X open reading frame 40A）基因，其基因组 DNA 跨越了 6794 bp，被 4 个内含子分割成 5 个外显子，其表达精氨酸序列中含多个磷酸化位点，可以通过磷酸化或去磷酸化活化自己及周围相关蛋白分子，达到传递信号的目的[1,6]；另外，通过生物信息学分析显示 EOLA1 蛋白 c-端含保守功能域 ASCH。ASCH 功能域遍布于所有生命体中，类似于 PUA 功能域也具有与 RNA 相互作用的能力[7]。ASCH 在功能上是作为一个 RNA 结合功能域而在共活化、RNA 加工和原核生物翻译调控中发挥作用。ASCH 的命名来源于 ASC-1 蛋白，即活化信号集合子 1 或甲状腺素受体相关蛋白 4（TRIP4）。ASC-1 蛋白在许多真核生物中保守存在，参与能与 RNA 相互作用的蛋白复合物的形成，介导了多种转录因子和基本转录机构之间的相互作用。因此，作为 ASCH 超家族成员，EOLA1 蛋白在胞浆内质网合成后转位进入胞核，参与共活化信号集合子的形成，调节着多种转录因子与目的基因间的相互作用。

虽然对 EOLA1 基因的功能尚不太清楚，其自身转录调控更是一无所知。我们前期克隆了 EOLA1 基因 5′-侧翼区序列片段，通过缺失突变和点突变确定了核心启动子，并通过生物信息学分析了核心启动子序列，未发现 TATA 盒，但存在 GC 盒，提示转录因子 Sp1 可能在 EOLA1 基因启动子活性方面发挥作用。因此，本实验通过定点突变 EOLA1 基因启动子上 GC 盒，再测定启动子活性，结果显示启动子活性基本全部消失。我们进一步作 EMSA 实验，实验结果提示合成的 EOLA1 核心启动子野生型探针与细胞核提取物发生了 DNA-蛋白质结合反应，且这种反应不能被非特异性探针和突变探针剥夺，但能被过量非标记野生型探针所竞争，加抗 Sp1 抗体后形成了超迁移现象，证明 Sp1 转录因子能与 EOLA1 核心启动子发生结合。最后采用 ChIP 实验进行检测，结果显示加 Sp1 抗体能特异结合细胞染色质上 EOLA1 启动子区域，证明 Sp1 转录因子的确结合到了 EOLA1 启动子的 GC 盒。

Sp1 是第一个被克隆和和鉴定的转录因子，它通过 3 个 C_2H_2-样锌指结构结合到 DNA 上 GC/GT 盒，调控着许多重要的细胞功能，如细胞增殖、凋亡、分化和肿瘤转移等[8-9]。本实验结果表明 Sp1 作为转录因子结合到 EOLA1 基因启动子的 GC 盒并调控了 EOLA1 基因的基础转录。

参考文献：

[1] Liang Z, Yang Z. Identification and characterization of a novel gene EOLA1 stimulating ECV304 cell proliferation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 325(3): 798-802.

[2] Ran C F, Dou K, Liang Z, *et al*. Changes in the expression of endothelial-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor 1 in grafts during acute rejection following liver transplantation in rats[J]. J Int Med Res, 2008, 36(3): 460-466.

[3] 梁自文，王清良，杨宗城，等. hEOLA1 抗体的制备及肿瘤组织中 EOLA1 的表达检测[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(24): 2418-2420.

[4] Lyer L M, Burroughs A M, Aravind L. The ASCH superfamily: novel domains with a fold related to the PUA domain and a potential role in RNA metabolism[J]. Bioinformatics, 2006, 22(3): 257-263.

[5] 梁自文，周广举，杨宗城，等. EOLA1 基因启动子序列的鉴定[J]. 第三军医大学学报，2009, 31(23): 2309-2311.

[6] 刘月明，刘战立，刘漪沦，等. 人新基因 EOLA1 生物信息学分析[J]. 成都医学院学报, 2010, 5(1): 1-7.

[7] Perez-Arellano L, Gallego J, Cervera J. The PUA domain - a structural and functional overview[J]. FEBS J, 2007, 274(19): 4972-4984.

[8] Dynan W S, Tjian R. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter[J]. Cell, 1983, 35(1): 79-87.

[9] Fasciano S, Kaufman A, Patel R C. Expression of PACT is regulated by Sp1 transcription factor[J]. Gene, 2007, 388(1/2): 74-82.

（**收稿**：2011-06-13；**修回**：2011-07-04）

（编辑 汪勤俭）