基础研究 文章编号:0253-3626(2011)02-0133-03

腐胺对小鼠成纤维细胞中 *Atp8a1* 基因表达的影响

万 涛[1],李朝幸[2],田园园[2],王李英[2],秦栋栋[2],李 凯[2],曲嘉琳[2],汤 华[2]
(1. 重庆医科大学附属第一医院呼吸科,重庆 400016;2. 重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究腐胺对小鼠成纤维细胞中 *Atp8a1* 基因表达的影响,初步探讨其作用机制。方法:用基因芯片和 Real-time PCR 检测正常小鼠和 *Azin1* (Antizyme inhibitor 1)基因敲除小鼠肝脏组织中 *Atp8a1* 基因的在 mRNA 水平上的表达;构建 *Atp8a1* 基因启动子的虫荧光素酶报告质粒 pGL3-*Atp8a1*-P;将重组质粒转染 NTH3T3 成纤维细胞中,分别在含有 4 μg/ml 腐胺和不含腐胺的条件下,用双荧光素酶检测系统检测虫荧光素酶活性。结果:在含有腐胺的培养条件下,转染 *Atp8a1* 基因启动子虫荧光素酶报告质粒的细胞虫荧光素酶的活性明显改变。结论:腐胺能够抑制 *Atp8a1* 基因启动子活性而降低其在 NIH3T3 成纤维细胞中的表达。

【关键词】腐胺;*Atp8a1*;启动子;基因表达;*Azin1* 基因敲除小鼠
【中国图书分类法分类号】Q553 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-01-04

Effects of putrescine on *Atp8a1* gene expression in mouse NTH3T3 cells

WAN Tao, et al
(*Department of Respiratory Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of putrescine on the expression of *Atp8a1* in NIH3T3 cells and reveal its regulatory mechanism. *Methods*: DNA microarray and Real-time PCR were performed to detect the *Atp8a1* gene expression in normal mouse liver and Azin1 knockout mouse liver. *Atp8a1* promoter luciferase reporter plasmid, pGL3-*Atp8a1*-P, was constructed. NTH3T3 cells were transiently transfected with pGL3-*Atp8a1*-P, and cultured in medium with and without putrescine respectively. Then the luciferase activity was detected. *Results*: The relative luciferase activity was changed in the cells which were transfected with pGL3-*Atp8a1*-P when cultured in medium added with putrescine. *Conclusion*: Putrescine could down-regulate the *Atp8a1* gene expression in NIH3T3 cells by inhibiting its promoter's activity.

【Key words】putrescine; *Atp8a1*; promoter; gene expression; *Azin1* knockout mouse

多胺是一种低分子量的有机多聚阳离子,包括腐胺(Putrescine)、精胺(Spermine)、精脒(Spermidine),广泛存在于哺乳动物细胞,在细胞增殖、分化中起重要作用。多胺能够通过与 DNA、RNA、各种胞质内配体及膜蛋白相互作用而导致机体发生一系列生理或病理改变[1]。通过基因捕获技术,我们得到了鸟氨酸脱羧酶抗酶抑制子基因缺失型小鼠[2],前期研究中,利用高效液相色谱检测 *Azin1* 基因敲除小鼠和野生型小鼠体内腐胺的水平,结果表明腐胺含量在 *Azin1* 基因敲除小鼠纯合型的肝脏、肾脏和脑组织中均出现降低。另外,通过基因芯片,我们发现 *Azin1* 基因敲除之后,小鼠体内多个基因的表达发生显著改变[3]。其中,P 型镁离子依赖的三磷酸腺苷酶 Ⅱ(Atp8a1)的表达量明显上调。*Atp8a1* 是一种氨基磷脂转运酶,主要功能是帮助维持细胞膜上磷脂的不对称分布[4]。为明确 *Azin1* 基因敲除小鼠体内腐胺含量的变化是否与 *Azin1* 基因敲除所导致的 *Atp8a1* 基因表达存在相关性,我们构建了 *Atp8a1* 基因启动子的虫荧光素酶报告质粒,将其转染 NTH3T3 成纤维细胞中,加入含腐胺的培养液进行培养,通过检测荧光素酶活性的变化来研究腐胺在转录水平是否能够调节 *Atp8a1* 基因的表达。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠成纤维细胞 NTH3T3 及大肠杆菌 DH5α 由重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室保存。盐酸

作者介绍:万 涛(1983-),男,硕士,
研究方向:细胞病理学与分子生物学。
通信作者:汤 华,男,研究员,Email:tanghua86162003@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金(编号:30671080)。

腐胺购于上海生工生物公司。质粒 pGL3-Basic、pRL-TK 及双荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司。转染试剂 Lipofectamine 2000™ 购自 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 NTH3T3 成纤维细胞培养于含有 10%胎牛血清,1%青/链霉素的 DMEM 培养基中,培养条件为:5% CO_2,37℃孵箱。

1.2.2 Real-time PCR Real-time PCR 采用 IQ5 multicolor Real-time PCR detection system (Bio-Rad) 测定,用 Power SYBR Green PCR Master Mix 在 25 μl 反应体系中进行,采用 ABI Primer Express 软件设计 *Atp8a1* 基因上游引物:5'-CAGAGCCTATGACACCACGAAA-3';下游引物:5'-GGCTTAGGCCTGCCAATCA-3',β-*actin* 上游引物:5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3',下游引物:5'-GCCGATCCACACGGAGTA -3',Real-time PCR 反应条件:50℃ 2 min,95℃ 5 min;95℃ 20 s,55℃ 20 s,40 个循环。通过计算阈值(Ct 值)来评估 mRNA 水平,Ct 值用 β-*actin* 来标化,目的基因(GT)的 mRNA 相对量 $=2^{-\Delta\Delta Ct}$

$$\Delta\Delta Ct=[Ct_{GT(sample)}-Ct_{\beta-actin(sample)}]-[Ct_{GT(control)}-Ct_{\beta-actin(control)}]$$

所有实验都是同时做 3 份,并进行 3 次独立实验。

1.2.3 *Atp8a1* 基因启动子虫荧光素酶报告重组质粒的构建及鉴定 从 Promoter 2.0 Prediction Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/) 中获得 *Atp8a1* 启动子的 DNA 序列,以小鼠 NTH3T3 成纤维细胞基因组 DNA 为模板,PCR 扩增启动子片段,引物序列为上游引物:5'-CGCGAGCTCAAAC-CACAAACAGCATAATT-3';下游引物:5'-TATAAGCTTGCGCACAGCCTCCTGCTGCG-3'。(下划线标记的分别是 *Sac* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ的酶切位点)。PCR 扩增 *Atp8a1* 基因启动子序列的 DNA 片段后,回收纯化。将纯化后的 *Atp8a1* 基因启动子片段和虫荧光素酶报告质粒 pGL3-Basic 分别用 *Sac* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切后用 T4 连接酶连接。提取质粒,并进行测序,命名为 pGL3-*Atp8a1*-P。

1.2.4 细胞转染及荧光素酶活性检测 NTH3T3 成纤维细胞经计数后,以每孔约 2×10^5 个的密度转入 24 孔板,待细胞贴壁后按照 Lipofectamine 2000™ 转染试剂盒说明书进行转染。转染重组质粒后,分别加入含有腐胺的培养液和不含腐胺的培养液培养细胞。48 h 后,收集细胞,按照 Promega 试剂盒 Dual-Luciferase reporter assay system 技术手册操作,进行荧光素酶活性检测。以海肾荧光素酶表达载体 pRL-TK 为内参,Turner TD20/20 luminometer 检测仪检测荧光强度。以虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值(FL/RL)来表示相对荧光素酶活性。

1.2.5 统计学分析 所有试验都是同时做 3 份,进行 3 次独立实验。采用 t 检验(Excel, Microsoft)进行显著性分析。$P<0.05$ 则认为差异有统计学意义。数据以均数 ± 标准差的形式表示。

2 结 果

2.1 *Azin1* 基因敲除小鼠体内腐胺的含量低于野生型小鼠

前期研究工作中,我们利用高效液相色谱法测定鸟氨酸脱羧酶抑制子基因敲除小鼠纯合子、杂合子和野生型小鼠组织中的腐胺含量。证明了在鸟氨酸脱羧酶抑制子基因敲除小鼠的肝脏、脑和肾脏组织中腐胺的含量与野生型相比明显减少[5]。

2.2 *Atp8a1* 在 *Azin1* 基因敲除小鼠中的表达高于野生型

我们利用基因芯片分析了 *Azin1* 基因敲除小鼠和正常小鼠体内基因表达量的差异,结果显示在 *Azin1* 基因敲除小鼠体内,*Atp8a1* 表达量明显高于正常小鼠。为了验证 *Atp8a1* 的表达在两种小鼠体内的差异,我们分别提取了两种小鼠的总 RNA,进行 Real-time PCR。结果如图 2 所示,*Atp8a1* 在 *Azin1* 基因敲除小鼠体内表达量为正常小鼠的 2.73 倍,且两者有显著差异。

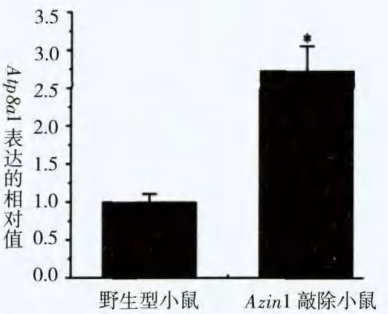
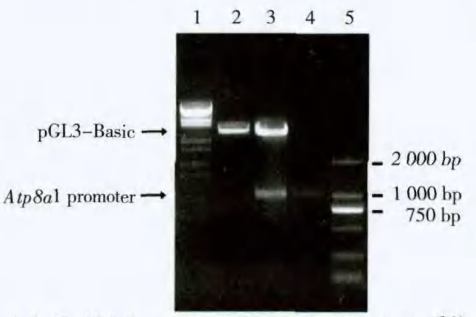


图 1 Real-time PCR 检测 *Atp8a1* 在正常小鼠和 *Azin1* 敲除小鼠体内的表达。β-actin 作为内参。(*$P<0.05$)

2.3 *Atp8a1* 基因启动子荧光素酶报告质粒的鉴定

构建成功的 *Atp8a1* 基因启动子的荧光素酶报告质粒用 *Sac* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切和测序的方法进行鉴定。结果如图 2 所示,经 *Sal* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切,可获得大小约 1 kb 和 4.8 kb 的两个片段。另外,测序结果也表明我们的 pGL3-*Atp8a1*-P 质粒构建成功。



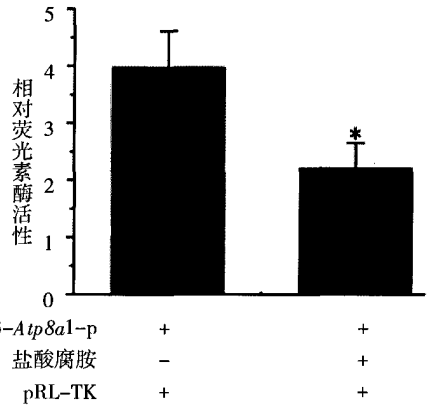
1. λ-EcoT14 digested DNA Marker; 2. pGL3-Basic 质粒;
3. pGL3-*Atp8a1*-P 质粒; 4. *Atp8a1* promoter PCR 片段;
5. DL2000 DNA Marker

图 2 pGL3-*Atp8a1*-P 质粒的 *Sal* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切鉴定图

2.4 腐胺对 *Atp8a1* 启动子活性的影响

为了研究腐胺对 *Atp8a1* 基因表达在转录水平的影响,

我们将 pGL3-*Atp8a1*-P 重组质粒转染 NTH3T3 成纤维细胞，转染后 4~6 h，加入 4 μg/ml(最佳有效浓度)的盐酸腐胺继续培养。48 h 后，收集细胞，提取蛋白，进行启动子荧光素酶活性检测。结果如图 3 所示。



pRL-TK 质粒作为内参用来标化转染效率，转染后 48 h 检测双荧光素酶的活性。相对荧光素酶活性用虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值(FL/RL)来表示。(*P<0.05)

图 3　腐胺能够抑制 *Atp8a1* 基因启动子活性

3　讨　论

在细胞体系中，多胺能影响 DNA 合成的启动和复制叉的移动速度。在 ΦW-14 噬菌体中，这种作用是通过腐胺和 DNA 的共价结合实现的[6]。精胺和亚精胺可以促进 DNA 的聚合沉淀，进而阻止 DNA 的热变性和辐射变性，这种稳定作用可以通过中和核苷酸链上磷酸基团所带的负电荷来实现。进一步研究表明，在稀释的 DNA 溶液中，多胺可以与单个的 DNA 分子发生作用，促进 DNA 的浓缩和超螺旋过程[7]。Fajardo 等[8]报道，多胺可以激活或抑制与 DNA 合成有关的酶，但这种作用能被高浓度的钙或镁离子所代替。这些结论，证实了多胺与 DNA 的转录是密切相关的。

Atp8a1 是 P 型 ATP 酶 4 型亚族中的一员，这种高度保守的 P 型 ATP 酶广泛表达于真核和原核生物，含 5 个亚族，4型 ATP 酶仅表达于高等真核生物，典型的 P 型 ATP 酶均含有一保守序列 DKTGT[L,I,V,M][T,I,S]，并且包含 10 个被证实的跨膜区。它们的分子量从 70~150 kD 不等[9]。Sobcki 等[10]对 *Atp8a1* 基因启动子结构和功能分析表明，小鼠 *Atp8a1* 基因启动子缺少 TATA 盒和一个稳定的起始序列，全长和核心启动区虫荧光素酶报告系统分析显示 *Atp8a1* 基因启动子具有强的启动活性并且具有一定的细胞特异性。这种特异性可能因为更多的调控片段和不同的转录因子存在于不同的细胞以及转录起始复合物组合的不同而导致 *Atp8a1* 基因的差异表达。

本研究中，我们发现 *Azin1* 基因敲除小鼠和正常小鼠相比，体内腐胺的含量明显减少。因为鸟氨酸脱羧酶抗酶抑制子在腐胺的代谢过程中发挥作用，*Azin1* 基因缺失型小鼠体内通过鸟氨酸脱羧酶，鸟氨酸脱羧酶抗酶以及 AZI 相互作用对腐胺的代谢调节环节出现失衡，因而导致了腐胺含量的降低。另外，利用基因芯片我们获得了 *Azin1* 基因敲除小鼠和正常小鼠肝脏中差异表达的基因，其中，*Atp8a1* 基因表达在 *Azin1* 基因敲除小鼠中出现显著上调，这一结果说明 *Azin1* 基因的缺失所引起的小鼠体内生理或病理变化直接或间接影响了 *Atp8a1* 基因的表达。因此，我们构建了 *Atp8a1* 基因的启动子虫荧光素酶报告质粒(pGL3-*Atp8a1*-p)，通过加入腐胺这一调节因子来研究腐胺与 *Atp8a1* 基因表达的关系。小鼠成纤维细胞 NIH3T3 中转入 *Atp8a1* 基因的启动子虫荧光素酶报告质粒后，加入腐胺，其活性明显减弱，说明腐胺可以通过抑制 *Atp8a1* 基因启动子的活性进而降低其在小鼠成纤维细胞中的表达。这一结果显示了腐胺在基因转录调节中的作用，但具体机制仍有待进一步研究。

参　考　文　献

[1] Meana C, Bordallo J, Bordallo C, et al. Functional effects of polyamines via activation of human β 1- and β 2-adrenoceptors stably expressed in CHO cells[J]. Pharmacological Reports, 2010, 62(4): 696-706.

[2] 汤　华，唐任宽. 利用捕获载体解析小鼠基因在生物发育过程中的功能[J]. 生命的化学，2005，25(1)：49-51.

[3] Wan T, Hu Y, Zhang W, et al. Changes in liver gene expression of Azin1 knock-out mice[J]. Z Naturforsch C, 2010, 65(4): 519-527.

[4] Paulusma C C, Ronald P J, Elferink O. P4 ATPases-The physiological relevance of lipid flipping transporters[J]. FEBS Letters, 2010, 584(13): 2708-2716.

[5] Hua T, Kimi A, Makiko O, et al. Role of ornithine decarboxylase antizyme inhibitor in vivo[J]. Genes to Cells, 2009, 14(1): 79-87.

[6] Farriol M, Segovia-Silvestre T, Castellanos J M, et al. Role of putrescine in cell proliferation in a colon carcinoma cell line[J]. Nutrition, 2001, 17(11/12): 934-938.

[7] 王纪防，苏瑞斌，李　锦. 多胺与肿瘤发生发展及其在临床上的应用[J]. 国外医学药学分册，2004，31(5)：263-267.

[8] Fajardo I, Utdiales J L, Medina M A, et al. Effects of phorbol ester and dexamethasone treatment on histidinene decarboxylase and ornithine decarboxylase in basophilic cells[J]. Biochem Pharmacol, 2001, 61(9): 1101-1106.

[9] Kühlbrandt W. Biology, sructure and mechanism of P-Type ATPases[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004, 5(4): 282-295.

[10] Sobocki T, Jayman F, Sobocka M B, et al. Isolation, sequencing, and functional analysis of the TATA-less murine ATPase Ⅱ promoter and structural analysis of the ATPase Ⅱ gene[J]. Biochim Biophy Acta, 2007, 1769(1): 61-75.

(责任编辑：关蕴良)