

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.29.001

· 基础研究 ·

大鼠 GCLC 基因 5'-上游调控区域 (-876~+1) 的 3 个 E-box 元件
功能分析*蔡磊 黄楚琴 李冰[△]

(广州医科大学实验医学研究中心 广东 广州 510182)

摘要 目的: GCLC 基因表达调控有助于在分子水平了解 GSH 变化的机制,对进一步探索机体抗氧化失衡的机制有重要意义。本实验主要研究 GCLC 基因上游调控区域 (-876~+1) 三个相邻 E-box 元件的作用及探讨 E-box 元件组合的基因转录作用机制。**方法:** 利用 PCR 定点缺失法构建多种组合的缺失 E-box 元件的 GCLC 上游启动子序列的报告基因载体。将所构建的载体在脂质体介导下瞬时转染大鼠 II 型肺泡上皮细胞(L2 细胞),通过比较转染后细胞的荧光素酶活性,分析 E-box 元件对 GCLC 基因转录活性的影响。**结果:** 成功构建出多组定点缺失 E-box 元件的 GCLC-Luc 基因。在大鼠 II 型肺泡上皮细胞中转染缺失了 E-box 的 GCLC-Luc 组较转染 GCLC-Luc 组均有明显升高(P 均 <0.05)。**结论:** 三个 E-box 元件(-804~-779, -729~-724, -590~-585)在 GCLC 基因的基础状态下的转录表达中都起到一定的抑制作用,可能以转录因子及元件复合物形式抑制 GCLC 基因的转录调控。此结果揭示 GCLC 基因上其他 E-box 元件之间也可能存在着相互作用方式,而非简单的单独作用。

关键词: 谷氨酰半胱氨酸连接酶催化亚基(GCLC); E-box 元件; 大鼠 II 型肺泡上皮细胞 (L2)

中图分类号: Q95-3, Q78 **文献标识码:** B **文章编号:** 1673-6273(2014)29-5601-04

Analysis of three E-box Elements in the 5' upstream Region of
Rat GCLC Gene*CAI Lei, HUANG Chu-qin, LI Bing[△]

(Experimental Medical Research Center, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510182, China)

ABSTRACT Objective: Analyses of the expression and regulation of rat GCLC gene can help to understand the mechanisms GSH changes the body's resistance at the molecular level which is important to explore the mechanism of oxidative imbalance in the further. This study is to explore the mechanism of gene transcription suppression of E-box element composition by analyzing the three adjacent E-box elements of GCLC (Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit) gene in rats. **Methods:** Using SDM (sire-directed mutagenesis) PCR method constructed a various combinations of E-box elements GCLC promoter sequence upstream of a reporter gene vector. The constructed vectors were transfected to rat lung alveolar type II cell (L2) to determine the relative contribution of E-box on Gclc transcriptional activity. **Results:** We successfully constructed a multiple fixed missing E-box elements GCLC-Luc genes. In rat type II alveolar epithelial cells transfected the missing group than GCLC-Luc group were significantly higher (P<0.05). **Conclusion:** Three E-box elements (-804 ~ -779, -729 ~ -724, -590 ~ -585) in the GCLC gene transcription and expression have inhibiting effects to a certain extent and may form complexes to suppress GCLC gene transcription. The results also reveal other E-box elements may interact with each other, rather than simply act alone.

Key words: GCLC (Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit); E-box element; Rat Lung Alveolar Type II Cell (L2)

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, Q78 **Document code:** B

Article ID: 1673-6273(2014)29-5601-04

前言

谷胱甘肽(GSH)是肺内重要的抗氧化剂,在机体抗氧化应激中发挥着至关重要的作用^[1,2]。而谷氨酸—半胱氨酸连接酶(GCL)是合成GSH的第一限速酶,是决定细胞内GSH水平的重要物质^[3,4]。GCLC几乎含有GCL所有底物的结合位点和催化亚基,具有GCL所有的催化活性^[4,6]。因此,研究GCLC的表

达调控有助于在分子水平了解GSH变化的机制,对进一步探索机体抗氧化失衡的机制有重要意义。

对大鼠GCLC基因上游调控序列(约5.8 kb)元件分析,发现存在30多个可能E-box元件。E-box元件,是一段高度保守且广泛分布在基因启动子区域的核苷酸序列(CANNTG),能够参与相关基因的表达调控^[7]。该元件普遍存在于多种基因的调控序列中,已有研究证实E-box参与BMAL/CLOCK基因^[8,9]、

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30971166)

作者简介:蔡磊(1988-),女,硕士研究生,主要研究方向:GCLC基因的转录抑制元件,电话:020-81340778,E-mail:caicailei1226@163.com

△通讯作者:李冰,E-mail:libing@gzhmc.edu.cn

(收稿日期:2013-12-09 接受日期:2013-12-30)

OsChia4a 基因^[10]、人类黑皮质素受体 (MC2R) 基因^[11]、脂联素^[12]、mPer1 节律基因^[13]等的表达调控。

课题组前期研究发现,GCLC 基因上游调控序列上具有能与转录因子 (USF、DEC) 结合的 E-box 元件(-729~-724),E-box 元件(-3853~-3848)^[14,15],该元件在大鼠多种组织来源的细胞中起负性调控作用,并且具有组织特异性,可以在很多细胞中表达抑制^[16]。建立模型后发现,由于数目的众多,缺失了其中的几个 E-box 元件之后仍有其他多个 E-box 元件干扰实验结果,如要全部缺失这些 E-box 元件又不具实际操作意义,而其作用方式的复杂性还可能影响其他基因的表达,致使其生理意义的研究难以进行下去。由此提出研究方向:在 Gclc 基因上游调控序列上选取一段只含有有限数目(≤ 3 个)的 E-box 元件的序列中,对有限的元件进行单缺失及各个组合缺失,载体构建成功之后进行转染,观察萤火虫荧光素酶的表达活性,进而具体探讨 E-box 元件对 Gclc 基因表达是否存在一定的调控作用及可能的相互作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

PCR 试剂购于日本 Toyobo 公司;质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购于德国 Qiagen 公司;限制性内切酶和 T4-DNA 连接酶购于美国 NEB 公司;Lipofectamine™2000 购于美国 Invitrogen 公司;双荧光素酶分析系统试剂盒购于美国 Promega 公司;胎牛血清购于美国 Gibco 公司;F-12K 培养基购于杭州吉诺公司;大肠杆菌株 Top10 购于北京百泰克公司;所有引物由上海英潍捷基合成。含 GCLC 上游启动子序列的报道载体 (GCLC-Luc)及含 GCLC 上游启动子序列并突变 E-box 元件的报告基因载体(GCLC-dE-box-Luc)由本课题组自行构建。大鼠 II 型肺泡上皮细胞(L2)由广州医科大学实验医学研究中心提供。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 Gclc 上游调控序列的克隆及其报告载体的构建
为了解 E-box 元件在转录调控中的作用,需要利用荧光素酶报告基因对敲除 E-box 元件的上游调控序列进行转录活性检测,并对结果进行分析。

(1) GCLC₄₃₄₇-Luc 的克隆及鉴定:以 GCLC₅₈₉₂-Luc 为模板,经 Age I 和 Xho I 进行双酶切后,T4 DNA 连接酶连接到经 Age I / Xho I 双酶切的 PGL3-enhancer 线性载体,构建 GCLC₄₃₄₇-Luc。经转化至 TOP 10 感受态细胞,挑取单克隆,摇菌,提取质粒后,酶切鉴定。

(2) GCLC₈₇₆-Luc 的克隆及鉴定:设计 2 条引物,引物 P1: 5'-ATTGGTACCGACACACGTATGTCTAATCTCCGTAG-3'; 引物 P4:5'-AATGCCAAGCTTGCCGCGT-3'。以质粒 GCLC₁₇₅₉-Luc 为模板,引物 P1、P4 为引物,进行 PCR 扩增。反应条件:94℃ 预变性 2 min;98℃ 变性 10 s,53℃ 退火 30 s,68℃ 延伸 1 min 共 30 个循环;最后延伸 68℃ 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,回收目的产物后,胶回收 876 bp 的目的产物,经 Kpn I 和 Hind III 进行双酶切后,T4 DNA 连接酶连接到经 Kpn I / Hind III 双酶切的 PGL3-enhancer 线性载体,构建 GCLC₈₇₆-Luc。经转化至 TOP 10 感受态细胞,挑取单克隆,摇菌,提取质粒后,送上海生工生物工程公司测序。同样的方法,以 GCLC₁₇₅₉-dE-box2-Luc、GCLC₁₇₅₉-dE-box3-Luc、

GCLC₁₇₅₉-dE-box2/3-Luc 为模板,得到 GCLC₈₇₆-dE-box2-Luc、GCLC₈₇₆-dE-box3-Luc、GCLC₈₇₆-dE-box2/3-Luc 荧光素酶报告载体。

(3)GCLC₈₇₆-dE-box1-Luc 的克隆及鉴定:以 GCLC₈₇₆-Luc 为模板,利用两次 PCR 法构建缺失 E-box1(-590~-585)元件的 GCLC-Luc 质粒,即 GCLC-dE-box1-Luc。除上述引物 P1、P4 外,再加 2 条引物,引物 P2:5'-GCTTAAGTATCTGCTTTTG-TACCGGTATATAG-3'; 引物 P3:5'-CCGGTACAAAAGCA-GATACTTAAGCTGC-3';引物 P1 和引物 P2 用于扩增 GCLC 基因的近 5' 端片段;引物 P3 和引物 P4 用于扩增 GCLC 基因的近 3' 端片段。以质粒 GCLC₈₇₆-Luc 为模板,分别以引物 P1 及引物 P2,引物 P3 及引物 P4 为引物,进行 PCR 扩增。反应条件同上。PCR 产物经电泳、回收,得到的两个 PCR 片段为模板,再以 P1、P4 为引物,进行第二轮 PCR 扩增,经电泳,胶回收 876 bp 的目的产物,经 Kpn I 和 Hind III 进行双酶切后,T4 DNA 连接酶连接到经 Kpn I / Hind III 双酶切的 PGL3-enhancer 线性载体,构建 GCLC₈₇₆-dE-box1-Luc。经转化至 TOP 10 感受态细胞,挑取单克隆,摇菌,提取质粒后,送上海生工生物工程公司测序。另外,同样的方法,分别以 GCLC₈₇₆-dE-box2-Luc、GCLC₈₇₆-dE-box3-Luc、GCLC₈₇₆-dE-box2/3-Luc 为模板,用上述引物,构建 GCLC₈₇₆-dE-box1/2-Luc、GCLC₈₇₆-dE-box1/3-Luc、GCLC₈₇₆-dE-box1/2/3-Luc 载体。

1.2.2 瞬时转染及荧光素酶活性分析 L2 细胞用含有 10% 胎牛血清的 F-12K 培养基在 37℃、5%CO₂ 的细胞培养箱中培养。转染前一天将 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞接种到 48 孔细胞培养板,培养基为 0.3 mL 10%胎牛血清。待长至 90%~95%融合时,细胞状态良好,按 Lipofectamine2000 试剂盒说明书将 GCLC₈₇₆-Luc、GCLC₈₇₆-dE-box1-Luc、GCLC₈₇₆-dE-box2-Luc、GCLC₈₇₆-dE-box3-Luc、GCLC₈₇₆-dE-box1/2-Luc、GCLC₈₇₆-dE-box1/3-Luc、GCLC₈₇₆-dE-box1/2/3-Luc (300 ng/孔) 分别与 PRL-SV40 (15 ng/孔) 共转染细胞。于转染 24 h 后,用 PBS 洗孔板中的细胞 2~3 次,按荧光素酶分析系统试剂盒说明书裂解细胞,检测各孔细胞荧光素酶活性。

1.3 统计学分析

数据处理采用 SPSS16.0 统计软件进行分析,所有数据均采用表示,多组数据间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示有统计学差异, $P > 0.05$ 为尚不能认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两轮 PCR 定点缺失法扩增出目的片段

以构建的 GCLC₈₇₆-dE-box1/2/3-Luc 与 GCLC₈₇₆-Luc 载体举例,两者均经 Kpn I / Hind III 双酶切鉴定,结果亦符合预期,片段长度分别 GCLC₈₇₆-Luc (图 1.F) 为 5012 bp 和 876 bp, GCLC₈₇₆-dE-box1/2/3-Luc(图 1.ddd)为 5012 bp 和 876 bp,这与大鼠 GCLC 基因上游调控序列,重组载体经重组载体经测序鉴定,插入序列与预期序列一致。结果表明,所克隆序列已正确插入重组载体,成功构建 GCLC₈₇₆-dE-box1/2/3-Luc 重组质粒。

2.2 重组质粒的测定鉴定

所有重组质粒经测序鉴定,结果显示,GCLC₈₇₆-Luc、GCLC₈₇₆-dE-box1-Luc、GCLC₈₇₆-dE-box2-Luc、GCLC₈₇₆-dE-box3-Luc、GCLC₈₇₆-dE-box1/2-Luc、GCLC₈₇₆-dE-box1/3-Luc、GCLC₈₇₆-

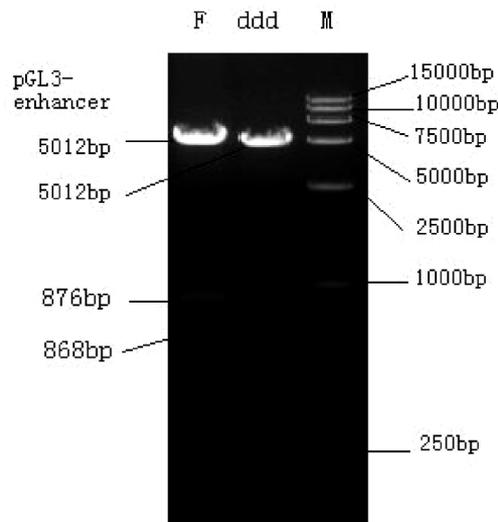


图 1 GCLC876-dE-box1/2/3-Luc 质粒构建的鉴定

Fig. 1 Identification of GCLC876-dE-box1/2/3-Luc plasmid

M:marker 15000bp

dE-box2/3-Luc、GCLC₈₇₆-dE-box1/2/3-Luc 与预期设计相符 (图 2,以 GCLC₈₇₆-dE-box1/2/3-Luc 举例),成功构建重组载体。

2.3 荧光素酶活性检测结果

(1) GCLC₅₈₉₂-Luc、GCLC₄₃₄₇-Luc 和 GCLC₅₈₉₂-dE-box 2/3-luc 分别转染 L2 细胞后,荧光素酶活性发生显著上调 (P<0.05),比较缺失了富含 E-box 的约 1.5 kb 片段的 GCLC 基因与仅缺失了其中的两个 E-box 元件 GCLC 基因的转录抑制作用(图 3)。

(2) GCLC₈₇₆-Luc、GCLC₈₇₆-dE-box1-Luc、GCLC₈₇₆-dE-box2-Luc、GCLC₈₇₆-dE-box3-Luc、GCLC₈₇₆-dE-box1/2-Luc、GCLC₈₇₆-dE-box1/3-Luc、GCLC₈₇₆-dE-box2/3-Luc、GCLC₈₇₆-dE-box1/2/3-Luc 转染 L2 细胞后,在大鼠上游 876 bp 调控序列中,无论是单缺失、双缺失还是三缺失 E-box 元件都使荧光素酶活性显著上调 (P<0.05),说明 E-box1 (-590~-585)、E-box2 (-729~-724)、E-box3 (-804~-779) 这 3 个 E-box 元件在 GCLC 的基础表达中都起着转录抑制作用(图 4)。

3 讨论

由于 E-box 元件在大鼠 GCLC 基因上游调控序列的广泛存在,提示 E-box 元件在 GCLC 基因的表达调控中有不可忽视

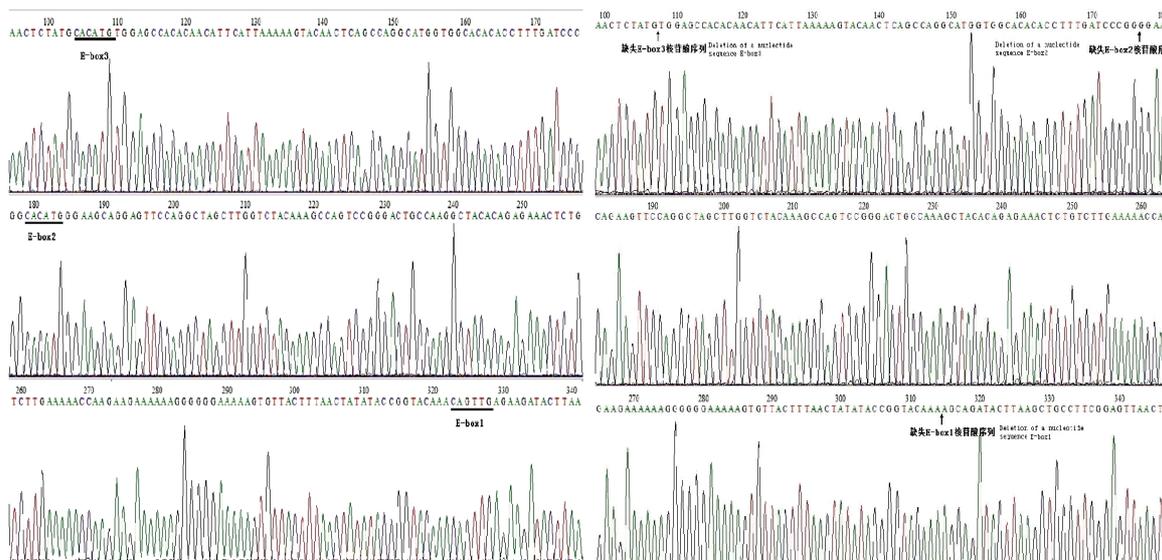


图 2 GCLC₈₇₆-Luc 重组质粒与 GCLC₈₇₆-dE-box1/2/3-Luc 重组质粒 E-box1、E-box2、E-box3 元件附近测序结果图(左:正常,右:缺失)

Fig. 2 GCLC₈₇₆-Luc recombinant plasmid and sequencing diagram near the three E-box elements of GCLC₈₇₆-dE-box1/2/3-Luc

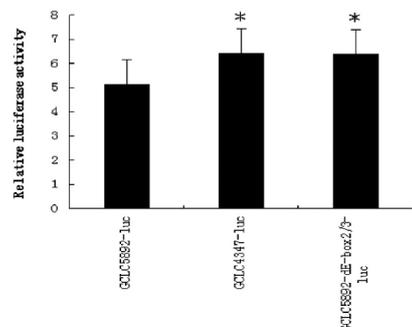


图 3 大鼠 GCLC₅₈₉₂-Luc、GCLC₄₃₄₇-Luc 和 GCLC₅₈₉₂-dE-box2/3-luc 荧光素酶活性对比

Fig. 3 luciferase activity compared among GCLC₅₈₉₂-Luc, GCLC₄₃₄₇-Luc and GCLC₅₈₉₂-dE-box2/3-luc

注:n=3,*号代表 P<0.05。Note:n=3,* represents P<0.05.

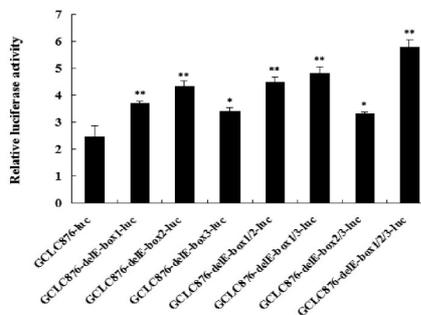


图 4 E-box1 (-590~-585)、E-box2 (-729~-724)、E-box3 (-804~-779) 在大鼠 GCLC 基因 -876~+1 上的作用分析

Fig. 4 Analysis the mechanism of gene transcription suppression of the three adjacent E-box elements

注:n=3,*号代表 P<0.05,**号代表 P<0.01。

Note:n=3,* represents P<0.05,** represents P<0.01.

的作用。为更准确客观地反应 GCLC 基因的转录调控,本实验利用已克隆并构建的 GCLC 基因上游 5892 bp 的调控序列的荧光素酶报告载体 GCLC₅₈₉₂-Luc, 并设计将一段富含 E-box 元件的 GCLC 上游调控基因 (-2145~600) 切除, 构建出 GCLC₄₃₄₇-Luc 基因, 猜测缺失了这一段 GCLC 基因后表达会有明显的变化 (P<0.05)。研究实验结果发现: 构建成功的 GCLC₄₃₄₇-Luc 与 GCLC₅₈₉₂-Luc 相比, 荧光素酶活性有一定的升高, 显示缺失片段中有转录抑制作用, 但与仅双缺失剪切片段内的两个 E-box 元件 (E-box3、E-box2) 的 GCLC₅₈₉₂-Luc 载体却表现出相似的转录抑制活性, 没有明显的区别, 这就说明了 GCLC 基因长片段分析 E-box 元件的复杂性。

而前期实验主要集中在研究 GCLC 基因 -1759~+1 区段的位于 -804~-779、-729~-724 的 2 个 E-box 元件^[6], 然而除此之外, 我们分析知道还存在多个 E-box 元件, 为避免其它 E-box 元件干扰, 更单纯地观察在没有 E-box 元件的情况下 GCLC 基因的转录状态。我们通过分析得知 GCLC 基因 (-876~+1) 区段上只存在 3 个 E-box 元件, 分别是 E-box1 (-804~-779)、E-box2 (-729~-724)、E-box3 (-590~-585), 故在此片段长度下分析 E-box 元件的作用, 可以排除其他 E-box 元件的干预, 可以更具体地了解这些 E-box 元件在 GCLC 基因表达中的地位。通过克隆并构建不同组合的 E-box 缺失的 GCLC 上游调控序列 (-876~+1) 萤火虫荧光素酶报告载体, 通过瞬时转染大鼠肺泡上皮细胞(L2), 分析 E-box 元件在大鼠 GCLC 基因的转录调控中的功能。

前期课题组工作证实: E-box2 和 E-box3 元件在 GCLC 基因转录调控中是抑制元件。而且本实验通过构建仅缺失 E-box1 独立元件的荧光素酶报告载体也显示, 位于 -590~-585 区域的 E-box 元件亦是一个功能抑制元件。此外, 不同组合的缺失 E-box1、E-box2、E-box3, 都能使 GCLC 的转录活性上调, 且有一定的变化, 这说明三个 E-box 元件之间存在一定的相互作用。研究结果发现: 单缺失, 双缺失和三缺失的实验结果没有出现明显的叠加性, 故猜测三个 E-box 元件可能以转录因子及元件复合物形式抑制 GCLC 基因的转录调控, 非单纯的叠加调控作用。这就启示了我们 GCLC 基因上的转录抑制元件分析不仅仅是单个元件分别单独作用, 更要考虑到元件之间的相互影响, 进而更深一步探讨 GCLC 基因的表达机制, 以助于在分子水平了解 GSH 变化的机制, 对进一步探索机体抗氧化失衡的机制有重要意义。本实验只是对有限长度基因上有限元件的相关分析, 对长片段的研究有一定的指导意义, 后期实验设计可以采用本文的实验方法, 转移到在长片段上逐段选取进行研究, 随后再综合研究成果, 进行系统分析。关于 GCLC 上游调控序列全长上的各个 E-box 元件的作用及相互作用机制还有待于继续讨论和研究。

参考文献 (References)

- [1] Gould NS, Min E, Cauthier S, et al. Lung glutathione adaptive responses to cigarette smoke exposure[J]. *Respir Res*, 2011, 12(1): 133
- [2] Haddad JJ, Harb HL. L-gamma-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro-and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox (y) immunologic sensor (s) ? [J]. *Molecular immunology*, 2005, 42(9): 987
- [3] Dickinson DA, Forman HJ. Glutathione in defense and signaling[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2002, 973(1): 488-504
- [4] Franklin CC, Backos DS, Mohar I, et al. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase[J]. *Mol Aspect Med*, 2009, 30 (1-2): 86-98
- [5] Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies[J]. *The FASEB Journal*, 1999, 13(10): 1169-1183
- [6] Krzywanski DM, Dickinson DA, Iles KE, et al. Variable regulation of glutamate cysteine ligase subunit proteins affects glutathione biosynthesis in response to oxidative stress[J]. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2004, 423(1): 116-125
- [7] Chaudhary J, Cupp AS, Skinner MK. Role of basic-helix-loop-helix transcription factors in Sertoli cell differentiation: identification of an E-box response element in the transferrin promoter[J]. *Endocrinology*, 1997, 138(2): 667-675
- [8] Miki I, Kazutoshi Y, Hiroyuki Y, et al. Construction of a rhythm transfer system that mimics the cellular clock [J]. *ACS Chem. Biol*, 2012, 7: 1817-1821
- [9] Malatesta M, Baldi B, Marcheggiani F, et al. Immunocytochemical analysis of the circadian clock protein in mouse hepatocytes [J]. *Microsc Res Tech*, 2003, 61(5): 414-418
- [10] Koji Miyamoto, Takafumi Shimizu, Fengqi Lin, et al. Identification of an E-box motif responsible for the expression of jasmonic acid-induced chitinase gene OsChia4a in rice[J]. *Journey of Plant Physiology*, 2012, 169(6): 621-627
- [11] Blondet A, Doghman M, Durand P, et al. An E-box-containing region is involved in the tissue-specific expression of the human MC2R gene [J]. *J Mol Endocrinol*, 2004, 32(3): 811-823
- [12] Park Y, Lee Y, Kim S, Lee E, et al. Snail, a transcriptional regulator, represses adiponectin expression by directly binding to an E-box motif in the promoter[J]. *Metabolism*, 2012, 61(11): 1622-1632
- [13] 左晓虹, 刘妹, 林庆林, 等. 启动子区 E-box 以及周围 CpG 岛的甲基化与基因节律性表达的关系[J]. *首都医科大学学报*, 2011, 32 (6): 781-786
- Zuo Xiao-hong, Liu Zhu, Lin Qing-lin, et al. Circadian E-boxes and surrounding CpG islands are free from methylation throughout the day[J]. *Journal of Capital Medicinal University*, 2011, 32(6): 781-786
- [14] 程令, 李冰, 徐洪斌, 等. γ -GCS 基因抑制元件 E-box 的实验研究[J]. *中华医学杂志*, 2005, 85(8): 560-563
- Cheng Ling, Li Bing, Xu Hong-bin, et al. Experimental Study of E-box, a Transcriptional Suppressor Element in γ -GCS gene [J]. *National Medical Journal of China*, 2005, 85(8): 560-563
- [15] 黄楚琴, 周问渠, 付欣, 等. 转录因子 DEC1 和 DEC2 通过 Ebox 元件下调大鼠 Gclc 基因的表达 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2013, 29(6): 585-590
- Huang Chu-qin, Zhou Wen-qu, Fu Xin, et al. DEC1 and DEC2 Down-regulate the Expression of R at Gclc through Ebox Element [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 29(6): 585-590
- [16] 洪玮, 付欣, 赖宁, 等. 大鼠 GCLC 基因两个相邻 E-box 元件功能分析 [J]. *中华生物医学工程杂志*, 2008, 14 (1): 63-67
- Hong Wei, Fu Xin, Lai Ning, et al. Functional Analysis of Two Adjacent E-box Elements of Rat GCLC Gene [J]. *Journal of Modern Clinical Medical Bioengineering*, 2008, 14(1): 63-67