

人 *cidec* 基因启动子的克隆及 PPAR γ 上调其活性大小比较研究*

郭冬妹^{1,2}, 刘小花², 彭家和², 杨星勇¹, 江 渝²

(1. 重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 401331; 2. 第三军医大学 基础部 生物化学与分子生物学教研室, 重庆 400038)

摘要:人诱导细胞死亡的 DFF45 样效应因子 C(Cell death-inducing DNA fragmentation factor 45-like c, *cidec*)可调节脂肪代谢,与动脉粥样硬化有密切联系,研究显示该因子表达受到过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ)的调节,但其中的表达机制还不清楚。从人肝癌细胞 HepG2 中扩增 *cidec* 基因启动子不同长短片段,分别克隆到虫荧光素酶报告基因载体中;*cidec* 基因启动子片段重组报告基因质粒转染 HepG2 细胞,经 PPAR γ 激动剂罗格列酮(Rosiglitazone, ROZ)处理后,检测荧光素酶活性。结果发现,*cidec* 基因启动子(-1 800~+150 bp)加 ROZ 前后均无明显变化,而 *cidec* 基因启动子(-2 289~+150 bp)质粒荧光素酶活性明显增加,且加 ROZ 后活性显著升高($p < 0.05$)。这表明激活 PPAR γ 可能通过 *cidec* 基因启动子的 -2 289~-1 800 bp 区域 PPAR γ 结合元件而上调该基因转录活性。

关键词:诱导细胞死亡的 DFF45 样效应因子 C;过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ;罗格列酮;启动子

中图分类号:Q523

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2015)05-0148-04

人诱导细胞死亡 DFF45 样效应因子 C(Cell death-inducing DNA fragmentation factor 45-like c, *cidec*)在小鼠(*Mus musculus*)体内又名 FSP27(Fat specific protein 27, FSP27),于 1992 年首次在小鼠脂肪细胞中发现,人 *cidec* 蛋白属于 *cide* 家族,它的基因位于 3 号染色体 3p25,全长为 16.9 kb,编码 238 个氨基酸,相对分子质量为 27.3 kD^[1-2]。该蛋白可定位于脂肪细胞的脂滴表面,促进脂肪的储存和脂滴体积的增大^[3],与脂代谢、糖代谢、体内能量平衡和心脑血管疾病密切相关。有研究发现过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ)能够直接结合于鼠 *cidec* 基因启动子区 -219~-207 bp 的 DNA 序列而激活其表达^[4-5]。PPAR γ 是核受体超家族成员,它的基因位于 3 号染色体短臂上^[6],主要在脂肪组织及免疫系统中表达,与脂肪细胞分化、脂代谢、动脉粥样硬化和机体免疫等过程密切相关^[7-8]。PPAR γ 的激动剂分两类:生理性配体和药理性配体,生理性配体是 15-脱氧前列腺素 J2(15d-PGJ2)及其代谢产物和不饱和脂肪酸等;药理性配体是包括罗格列酮、曲格列酮、匹格列酮等^[9]在内的胰岛素增敏剂噻唑烷酮类化合物(TZDs)。药理性配体是 PPAR γ 的高效配体,PPAR γ 被配体激活后,调节靶基因的转录活性^[10]。由于肝脏对血液中甘油三酯、胆固醇等的代谢有重要作用,故本研究选取人肝癌细胞 HepG2 细胞来克隆构建人 *cidec* 基因不同长度启动子(-1 800~+150 bp, -2 289~+150 bp)报告基因质粒,并将质粒转染 HepG2 细胞后检测其活性,进而分析两段 *cidec* 基因启动子的活性,为验证 PPAR γ 是否能够直接结合于 *cidec* 基因启动子区而上调其表达奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

HepG2 细胞、pRL-TK 和 pGL3-Basic 由本教研室保存;DH5 α 购于 Promega 公司;DMEM、胎牛血清购于 HyClone 公司;PrimeSTAR DNA 聚合酶、限制性内切酶 KpnI 和 XhoI、T4 DNA 连接酶购于 TaKaRa 公司;转染用培养基购于 Gibco 公司;Lipofectamine 2000 购于 Invitrogen 公司;报告基因检测试剂盒购于 Promega 公司;基因组提取试剂盒购于天根生化科技有限公司;质粒提取试剂盒购于 OMEGA;罗格列酮购于 Sigma 公司。

1.2 方法

HepG2 细胞接种于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基后于孵箱中(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)培养。将细胞平均接种

* 收稿日期:2014-11-26 修回日期:2015-05-26 网络出版时间:2015-06-08 12:30

资助项目:国家自然科学基金(No. 81270363; No. 81070228)

作者简介:郭冬妹,女,研究方向为脂代谢,E-mail:gdm0106@126.com;通信作者:杨星勇,E-mail:yangxy94@swu.edu.cn

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.n.20150608.1230.014.html>

于 48 孔板中培养 24 h,使细胞密度达到 70%~80%融合即可进行转染实验。进行人 *cidec* 基因启动子区的 PPAR γ 可能结合位点序列的生物信息学分析,调控基因转录的启动子区域往往位于基因 5'序列-3 000 bp 区域中,在 NCBI 的 GenBank 中获得 *cidec* 基因 5'端-3 000~+150 bp 区域的序列。根据 nubiscan 网站在线分析人 *cidec* 基因转录起始位点上游 3 kb 的序列,预测 PPAR γ 的结合位点,结果显示在 *cidec* 基因转录起始位点上游存在部分分值较高的 PPAR γ 可能结合序列(表 1)。根据生物信息学分析的结果,设计了两对扩增引物,扩增产物 2 439 bp(-2 289~+150 bp)和 1 950 bp(-1 800~+150 bp)片段来进行报告基因实验。提取 HepG2 细胞基因组并以其为模板,扩增以上两段 *cidec* 基因启动子片段,并在 5'端引入 KpnI 酶切位点,3'端引入 XhoI 酶切位点。人 *cidec* 基因启动子区 2 439 bp(-2 289~+150 bp)上游引物:5'-CGGGGTACCAAC-CCT GAAAGAAACCCT-3'(KpnI 酶切),下游引物:5'-CCGCTCGAGTCAC CCACTTCGTATCCC-3'(XhoI 酶切);人 *cidec* 基因启动子区 1 950 bp(-1 800~+150 bp)上游引物:5'-CGGGGTACCGTACTGGCTTT-GTCTAC T-3'(KpnI 酶切),下游引物:5'-CCGCTCGAGTCACCCACTTCGTATCCC-3'(XhoI 酶切)。PCR 扩增体系:98 °C 预变性 4 min;98 °C 变性 10 s,68 °C 延伸 2.5 min,35 个循环;12 °C 保持。PCR 产物行胶回收后与 PGL3-Basic 载体均用 KpnI、XhoI 双酶切并回收,回收的 PCR 产物分别与回收的 PGL3-Basic 载体进行连接,构建含 *cidec* 基因不同长度启动子的报告基因重组质粒,并命名为 pmcidec-Luc1(-2 289~+150 bp)和 pmcidec-Luc2(-1 800~+150 bp),重组质粒通过 KpnI、XhoI 双酶切和测序再进行鉴定。转染 HepG2 细胞和报告基因活性检测:根据 Lipofectamine 2000 试剂说明书进行转染。转染前将 HepG2 细胞以每毫升 4×10^5 个的密度接种于 48 孔细胞培养板中培养 24 h 后准备转染。Lipofectamine 2000 和质粒($m_{\text{pmcidec-Luc}} : m_{\text{pRL-TK}} = 10 : 1$,pRL-TK 作为内对照)分别与 OPTIM 以一定比例混匀,室温静置 5 min;将 2 管混合,室温静置 20 min;弃掉孔中的培养液,先用 PBS 洗 2 遍,再用 OPTIM 洗 1 遍,吸尽液体后将 Lipofectamine 2000 与质粒的混合液加入孔中,并用 OPTIM 补加至 250 μL ;转染 6 h 后吸尽转染液,加入含 10%胎牛血清的 DMEM 细胞培养液,孵箱培养 12 h;再加入终浓度为 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的罗格列酮,培养 24 h 后收集细胞,按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书进行操作,检测虫荧光素酶与 pRL-TK 的活性。

1.3 统计分析

报告基因实验所得数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析对组间数据进行比较,显著性标准为 $p < 0.05$ 。

2 结果

2.1 人 *cidec* 基因启动子区的 PPAR γ 可能结合位点序列的生物信息学分析

登陆 NCBI 的 GenBank 查找并下载人 *cidec* 基因 5'端 3 kb 序列,根据 nubiscan 网站在线分析 PPAR γ 可能在 *cidec* 基因启动子区的结合位点,分析结果见表 1。

表 1 人 *cidec* 基因启动子区 PPAR γ 可能结合位点在线分析

经典序列	位置	得分	Z 分值	P 值	E 值	半位点 E 值	结合位点序列
DR2	2 258(-)	0.898 595	n/a	0.002 161 84	n/a	n/a	AGGTCAGGAGTTCA
ER1	2 253(+)	0.883 939	n/a	0.002 398 11	n/a	n/a	TGACCTCAGGTAA
DR2	1 894(-)	0.858 709	n/a	0.004 329 75	n/a	n/a	AGGCCAGGAGTTCA
DR0	2 777(-)	0.858 709	n/a	0.004 329 75	n/a	n/a	AGTTCAAGGCCA
DR8	2 258(-)	0.812 955	n/a	0.013 766 70	n/a	n/a	AGGTCAGGAGTTCAAGACCA
DR8	1 578(-)	0.806 892	n/a	0.015 879 00	n/a	n/a	AGGTCAGGCATTTGAGAGCA
ER9	2 245(+)	0.794 171	n/a	0.012 190 80	n/a	n/a	TGAACTCCTGACCTCAGGTAA
DR8	2 785(-)	0.776 870	n/a	0.027 572 10	n/a	n/a	AGACCAGGAGTTCAAGGCCA

2.2 构建 *cidec* 基因启动子片段报告基因质粒

提取 HepG2 细胞基因组并以其为模板,扩增人 *cidec* 基因启动子 5'端两段序列。PCR 胶回收产物连接到 pGL3-Basic 载体上,双酶切鉴定两个质粒,有正确目的条带的质粒送公司进行测序。序列结果与 GenBank 的 *cidec* 基因启动子区序列一致,测序一致的两个 *cidec* 基因启动子 pmcidec-Luc 重组质粒经 KpnI 和 XhoI 双酶切后,在凝胶成像仪下分别可见 2 439,1 950 bp 两段片段,说明两个报告基因质粒构建成功(图 1)。

2.3 PPAR γ 对 *cidec* 基因启动子活性的调控

加入 PPAR γ 激动剂罗格列酮后 pmcidec-Luc1(-2 289~+150 bp)活性与无 PPAR γ 配体罗格列酮存在时的情况相比,前者显著升高($p < 0.05$);而无论是否加入 PPAR γ 配体罗格列酮,pmcidec-Luc2(-1 800~+150 bp)活性在均无明显变化(图 2)。

3 讨论

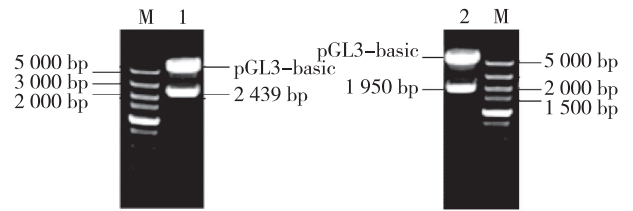
为了研究 PPAR γ 上调人 *cidec* 基因表达的分子机制,本研究对人 *cidec* 基因 5' 端上游区域进行生物信息学分析,通过 NUBIScan 网站分析了 *cidec* 基因启动子区 PPAR γ 可能的结合位点,结果发现分值最高的可能结合位点位于 *cidec* 基因启动子上游 -2 300~-1 800 bp 区域。该结果与在线生物信息学的分析结论一致,pmcidec-Luc1(-2 289~+150 bp)重组质粒受 PPAR γ 上调,而 pmcidec-Luc2(-1 800~+150 bp)重组质粒报告基因活性不受 PPAR γ 影响;如果不加 PPAR γ 配体时,也能上调 *cidec* 基因,原因是 PPAR γ 在肝细胞中有组成型表达并表现基础活性,但如加入 PPAR γ 配体罗格列酮时 *cidec* 基因表达活性更高(图 2)。

最近 Langhi 等人^[11]研究发现,PPAR α 能直接结合 *cidec* 基因启动子而上调该基因表达。关于 PPAR γ 调控其靶基因的研究中显示,PPAR γ 活化后与 RXR 形成异源二聚体,进入核内结合到目标基因的启动子序列上,对靶基因的表达进行调控。从本研究结果可知 PPAR γ 可能结合在 *cidec* 基因启动子 -2 289~-1 800 bp 区域内。在肝脏组织中,PPAR γ 的激动剂罗格列酮能上调载脂蛋白 M(apoM)的基因转录^[12],推测这可能与 PPAR γ 的作用有关。研究发现在鼠 3T3-L1 细胞中 PPAR γ 能上调 *cidec* 基因的表达^[5],但 PPAR γ 结合人 *cidec* 基因启动子的详细位点,尚需进一步研究证实。

研究者近些年来发现 PPAR γ 在调节糖代谢、脂代谢、能量代谢及动脉粥样硬化发生等诸多方面发挥重要作用。本教研室的前期研究发现在人肝细胞培养中加入人载脂蛋白 M,24 h 后可见 PPAR γ 表达下降(结果暂未发表);而 PPAR γ 可上调 *cidec* 基因表达,*cidec* 蛋白分子与脂肪细胞内脂滴形成及脂解有关,与肥胖、肝脂肪病变相关^[13]。本研究初步探讨 PPAR γ 上调人 *cidec* 基因表达的分子机制,对构建的 2 个报告基因质粒的活性分析发现,PPAR γ 上调 *cidec*(-2 289~+150 bp)启动子活性,而对 *cidec*(-1 800~+150 bp)启动子活性无明显作用,说明人 *cidec* 基因启动子区的 PPAR γ 结合元件很有可能在 -2 289~-1 800 bp 内。本研究所得结果为深入研究 PPAR γ 上调人 *cidec* 基因分子表达的机制打下了基础,也为肥胖、脂肪肝等疾病的发生提供了新的实验依据,为上述疾病的治疗提出新的方向。

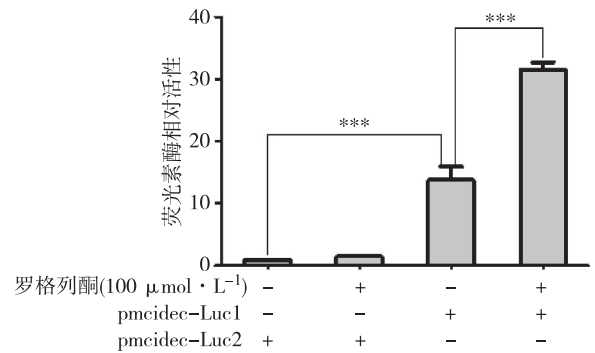
参考文献:

- [1] Keller P, Petrie J T, De Rose P, et al. Fat-specific protein 27 regulates storage of triacylglycerol[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(21):14355-14365.
- [2] Danesch U, Hoeck W, Ringold G M. Cloning and transcriptional regulation of a novel adipocyte-specific gene, FSP27. CAAT-enhancer-binding protein (C/EBP) and C/EBP-like proteins interact with sequences required for differentiation-dependent expression[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(10):7185-7193.
- [3] Nishino N, Tamori Y, Tateya S, et al. FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(8):2808-2821.
- [4] Matsusue K, Kusakabe T, Noguchi T, et al. Hepatic steatosis in leptin-deficient mice is promoted by the PPAR gamma target gene Fsp27[J]. *Cell Metab*, 2008, 7(4):302-311.
- [5] Kim Y J, Cho S Y, Yun C H, et al. Transcriptional activation of *cidec* by PPAR γ 2 in adipocyte[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 377(1):297-302.
- [6] Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR gamma



注: M: 标准分子量; 1: pmcidec-Luc1(-2 289~+150 bp)重组质粒; 2: pmcidec-Luc2(-1 800~+150 bp)重组质粒。

图 1 人 *Cidec* 启动子重组质粒双酶切电泳图



注: *** 表示 $p < 0.05$ 。+: 有; -: 无。

图 2 人 *cidec* 基因启动子转染活性

- gene[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(30):18779-18789.
- [7] Bishop-Baily D, Warner T D. PPAR gamma ligands induce prostaglandin production in vascular smooth muscle cells: indomethacin acts as a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma antagonist[J]. *FASEB J*, 2003, 17(13):1925-1927.
- [8] 陈碧君, 杨家悦, 李玲, 等. 胰腺星状细胞活化相关的信号转导通路[J]. *生命科学*, 2012, 24(6):583-587.
Chen B J, Yang J Y, Li L, et al. Pancreatic stellate cell activation related to signal transduction pathways[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2012, 24(6):583-587.
- [9] André J S. Drug treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus in the 1990s[J]. *Drugs*, 1997, 54(3):355-368.
- [10] Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors; nuclear control of metabolism[J]. *Endocr Rev*, 1999, 20(5):649-688.
- [11] Langhi C, Baldán A. CIDEc/Fsp27 is regulated by PPAR α and plays a critical role in fasting- and diet-induced hepatosteatosis[J]. *Hepatology*, 2015, 61(4):1227-1238.
- [12] 屈晓冰, 赵水平, 高洁, 等. PPAR γ 激动剂对糖尿病大鼠载脂蛋白 M 分泌和表达的影响[J]. *中南大学学报:医学版*, 2012, 37(8):796-801.
Qu X B, Zhao S P, Gao J, et al. PPAR γ agonist's affection of diabetic rats apolipoprotein m secretion and expression [J]. *Journal of Central South University: Medical Science*, 2012, 37(8):796-801.
- [13] Tanaka N, Takahashi S, Matusbara T, et al. Adipocyte-specific disruption of fat-specific protein 27 causes hepatosteatosis and insulin resistance in high-fat diet-fed mice [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(5):3092-3105.

Cloning of Human *cidec* Gene Promoter and Up-regulation of its Activity by PPAR γ

GUO Dongmei^{1,2}, LIU Xiaohua², PENG Jiahe², YANG Xingyong¹, JIANG Yu²

(1. College of Life Science, Chongqing Normal University, Chongqing 401331; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Human cell death-inducing DNA fragmentation factor 45-like c (*cidec*) can regulate fat metabolism, is closely related to atherosclerosis. Some research shows that it was affected by Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ). So far, the expression of *cidec* gene mechanism is not clear. In this study from human liver cancer cell HepG2 amplification of *cidec* gene promoter fragment, and cloned into the luciferase reporter gene vector insect. A *cidec* gene promoter fragment reorganization report gene plasmid transfection HepG2 cells, PPAR γ agonist activity. The result found that report gene carrier to build successful *cidec* gene promoter. Report gene assay show that *cidec* gene promoter -1 800 ~ +150 bp had no obvious change add rosiglitazone (ROZ). But the promoter -2 289 ~ +150 bp plasmid luciferase activity increased significantly, and significantly increased add ROZ. The result show that activation of PPAR γ may pass *cidec* gene promoter -2 289 ~ -1 800 bp area PPAR γ combination components and increase the gene transcriptional activity.

Key words: cell death-inducing DNA fragmentation factor 45-like c; peroxisome proliferator-activated receptor gamma; rosiglitazone; promoter

(责任编辑 方 兴)