

神经元限制性沉默因子对人胰岛素 基因转录调控作用的研究*

刘庆斌** 李艳华** 杨印祥 袁红丰 张 锐 秦立蓬

吕 洋 张赛男 孙迪金 陈 琳 白慈贤 南 雪 王韞芳 裴雪涛***

(军事医学科学院输血研究所干细胞与再生医学研究室, 北京 100850)

摘要 为了研究神经元限制性沉默因子(NRSF)调控神经元及胰岛细胞中神经特异性基因的表达, 进一步寻找胰岛细胞中可能存在的其他 NRSF 调控基因. 先用生物信息学手段对相关基因进行了分析. 筛选及序列比对发现, 人胰岛素核心启动子区有一段与 NRSE 相似的序列, 提示, 它可能受 NRSF 调控. 构建了含 NRSF 基因的慢病毒载体, 将其稳定转染于 INS-1 细胞. 构建了 3 种荧光素酶报告载体: 含有人胰岛素启动子 - 荧光素酶 (hInsP-LUC) 的慢病毒载体, pGL3-Basic 载体和含有 2 拷贝 NRSE 样基序 - 荧光素酶 (NRSE-LUC) 的报告载体. 利用稳定转染及瞬时转染实验观察 NRSF 对报告载体中荧光素酶活性的影响. 利用电泳迁移率变动分析实验观察 NRSE 样基序与 NRSF 蛋白的结合情况, 并通过竞争结合实验、引入特异性抗体实验证实探针与蛋白质结合的特异性. RT-PCR 检测证实, 感染空病毒的 INS-1 细胞不表达 NRSF, 感染含目的基因慢病毒的 INS-1 细胞能表达 NRSF. 将含有 hInsP-LUC 的慢病毒载体稳定转染于上述 2 种细胞, 荧光素酶活性分析结果显示, NRSF 的过表达能明显降低胰岛素启动子的活性. 瞬时转染 hInsP-LUC 报告系统于上述 2 种细胞, 结果也显示 NRSF 能明显抑制胰岛素启动子 - 荧光素酶的活性. 将含有 NRSE-LUC 的报告载体瞬时转染于上述 2 种细胞, 结果表明过表达 NRSF 的 INS-1 细胞组的荧光素酶相对值比对照组有明显下降. 电泳迁移率变动分析实验进一步证实, 此 NRSE 样序列可以与 NRSF 蛋白特异结合, 这种特异结合可以被标准的 NRSE 序列所竞争. 结果表明, 人胰岛素启动子中含有 NRSE 样序列, 该序列通过与 NRSF 蛋白结合从而抑制人胰岛素启动子的转录活性. 这一研究工作有助于进一步了解 NRSF 在胰岛细胞中的调控作用.

关键词 神经元限制性沉默因子 (NRSF), 神经元限制性沉默元件 (NRSE), 胰岛素, 启动子

学科分类号 Q27, Q291, Q343

神经元限制性沉默因子 (neuron-restrictive silencer factor, NRSF; RE-1 silencing transcription factor, REST) 最初是在神经系统中被广泛研究的. 它作为阻遏蛋白出现在胚胎、神经前体细胞及非神经细胞中并阻遏神经性基因的表达. 该蛋白质负调控功能的发挥依赖于其自身可以和某些基因的神经元限制性沉默元件 (neuron-restrictive silencer element, NRSE/repressor element, RE1)^[1,2]相结合, 结合到 NRSE 上的 NRSF 蛋白与组蛋白去乙酰化酶 HDAC1/2 及 mSin3A/B^[3]等形成复合物, 使序列中的组蛋白发生去乙酰化, 从而对某些神经特异性基因的转录发挥阻遏作用. 除此之外, 也有报道甲基化机制参与实现 NRSF 的阻遏^[4,5]作用. 大量研究结果表明, NRSF 蛋白在神经系统的发育过程中扮演着重要的角色, 其调控的绝大多数基因随神经细胞

分化而表达逐渐增多, 这些基因编码的蛋白质涉及离子通道、神经递质、生长因子、激素及调控轴突生长、囊泡运输及释放的因子等.

人们很早之前就发现, 尽管胚胎起源不同, 胰岛细胞和神经细胞却具有相似的发育机制, 相似的表型及功能特点, 比如 β 细胞也存在电兴奋性, 其胞吐作用与神经突触小泡释放神经递质的过程相似, 两者对激素刺激的反应相似, 2 种细胞除了共表达很多分子如 NeuroD/Beta2、Islet-1、Pax6 之

*国家重点基础研究发展规划项目(973)(2005CB522702), 国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA02A100)和国家自然科学基金资助项目(30470831).

** 同为第一作者.

*** 通讯联系人. Tel: 010-66932240, Fax: 010-68104807

E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2007-02-15, 接受日期: 2007-04-02

外, 它们也都不表达 NRSF 蛋白^[6]. 这就提示 NRSF 蛋白在胰岛细胞发育分化中可能也发挥重要的调控作用. 后来的研究表明胰岛细胞中的神经性基因^[6]及与胰岛发育相关的分子 Pax4^[7]的表达也受到 NRSF 的调控. 那么, 胰岛中是否还存在更多的 NRSF 调控的靶基因呢?

让我们感兴趣及疑惑的是, 胰岛素基因不仅在胰岛细胞中表达, 中枢神经系统中的某些神经元、神经肿瘤细胞中^[8~11]也表达胰岛素, 那么胰岛素基因是否也同样受到 NRSF 调控呢? 为验证这一假设, 我们首先利用生物信息学手段对胰岛素启动子进行基序分析以寻找可能的 NRSE 结构, 在核心启动子区 -3~+18 bp 找到了一个与 NRSE 十分相似的基序. 随后, 我们通过电泳迁移率变动分析 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 及胰岛素启动子荧光素酶报告系统进一步验证了 NRSF 对胰岛素启动子的调控作用.

1 材料与方法

1.1 材料

INS-1 细胞是大鼠胰岛素瘤细胞系 (insulinoma cell line), 由中国科学院生物物理研究所徐涛教授惠赠. 293FT 细胞由本室保存. 细胞培养基及血清为 Gibco 公司产品. 丙酮酸钠、 β - 巯基乙醇、非必需氨基酸、L- 谷氨酰胺为 Sigma 公司产品. 携带人 NRSF 基因的质粒由瑞士 Gerward Waerber 教授惠赠. 携带人胰岛素启动子的质粒由德国 Knepel 教授惠赠. 慢病毒载体为意大利 Amendola 教授惠赠^[12]. 慢病毒包装质粒 pLP1、pLP2 和包膜质粒 pLP/VSVG 购自 Invitrogen 公司. pGL3-Basic 质粒购自 Promega 公司. pGL3-Control 质粒由国家生物医学分析中心惠赠. PCR 试剂盒、各种限制性内切酶、连接酶购自宝生物公司和 BioLab 公司. 小量质粒抽提试剂盒购自北京道普公司. 转染级质粒抽提试剂盒购自 Qiagen 公司. 转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司. 核抽提试剂盒购自 Panomics 公司. EMSA 试剂盒购自 Pierce 公司. 双重荧光素酶检测试剂盒 (Dual-luciferase report assay system) 购自 Promega 公司. NRSF 抗体 (P-18) 购自 Santa Cruz 公司.

1.2 方法

1.2.1 质粒构建.

a. 携带人 NRSF 基因的慢病毒载体的构建: 慢病毒载体是在 Amendola 惠赠的载体 MA1 (携带绿

色荧光蛋白) 基础上改造的, MA1 质粒经 *Pst* I 及 *Sal* I 限制性内切酶酶切后, 加入多克隆位点序列 (5' ggctagcatgctctagagcgctg 3', 3' acgtccgacgtacgagatctcgacagct 5') 构建新的慢病毒表达质粒 pBPLV. 利用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Xho* I 将 pcDNA3.1-NRSF 载体上的人 NRSF 全长片段酶切下来, *Xho* I 与 *Sal* I 是同尾酶, 故选 *Nhe* I 和 *Sal* I 酶切慢病毒质粒 pBPLV. 回收 NRSF 片段与 pBPLV 载体, 16℃ 连接过夜. 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α . 提取质粒, 用 *Hind* III 和 *Not* I 酶切鉴定.

b. 携带人胰岛素启动子及萤火虫荧光素酶的慢病毒载体的构建: 从 pGL3-Basic 质粒中用 *Nhe* I 和 *Hpa* I 切下荧光素酶基因. *Hpa* I 与 *Aor*51H1 是同尾酶, 故选择 *Nhe* I 和 *Aor*51H1 酶切 pBPLV, 并连入荧光素酶基因. 用 *Nhe* I 和 *Sal* I 酶切鉴定连接产物. 然后, 选择 *Eco*R V 和 *Nhe* I 将上述获得的慢病毒质粒荧光素酶基因上游的 hPGK 启动子切下, 将人胰岛素启动子 -339~+112 片段连入. PCR 鉴定新载体中目的序列的表达, 胰岛素启动子 P1: 5' cggctagcagagctggggcctggg 3', P2: 5' ccgatatcc-tgcagcctc cagctctct 3', 扩增片段大小为 451 bp. 萤火虫荧光素酶基因 P1: 5' cttcttcgcccagcactc 3', P2: 5' cacacagttcgctctttgg 3', 扩增片段大小为 276 bp.

c. 携带 NRSE 样基序载体的构建: 合成人胰岛素启动子内的 2 拷贝 NRSE 样基序, 正义序列: 5' cgcagccctcagccctccaggacaggctgcagcgcctcagccc-tccaggacaggctgcac 3'; 反义序列: 5' gatctgatgcagcctgtcctggagggtgagggtgcgagtcagcctgtcctggagggtga-gggctgcgtac 3'. 2 个片段等摩尔混合, 退火形成双链. pGL3-Control 质粒经 *Kpn* I 和 *Hind* III 酶切后回收, 与小片段 16℃ 连接后转化, 提取质粒后, 送测序.

1.2.2 包装病毒. 293-FT 细胞培养条件为: 高糖 DMEM 添加 10% FBS、0.1 mmol/L NEAA、2 mmol/L L- 谷氨酰胺、500 mg/L G418. 转染前, 撤除 500 mg/L G418. 制备慢病毒空质粒 pBPLV, 含有 NRSF 基因的慢病毒质粒, 不含胰岛素启动子而含有荧光素酶的慢病毒质粒, 含有胰岛素启动子荧光素酶报告基因的慢病毒质粒. 用 Lipofectamine 2000 介导慢病毒表达质粒及包装质粒 pLP1, pLP2, pVSVG 质粒共转染 293FT 细胞. 10 h 后换液并补加丙酮酸钠 (1 mmol/L). 转染 48~72 h 后收集上清于 15 ml 的无菌离心管中. 4℃, 3 000 r/min

离心 15 min 以去除细胞碎片, 病毒上清分装冻存于 -70°C 备用. 取各毒液感染 INS-1 细胞, 估算病毒感染效率.

1.2.3 获得稳定表达 NRSF 的 INS-1 细胞. INS-1 细胞培养基为 RPMI 1640, 10% 胎牛血清, 1 mmol/L 丙酮酸钠, 50 $\mu\text{mol/L}$ β - 巯基乙醇, 50 U/ml 青霉素, 50 mg/L 链霉素. 去除 INS-1 细胞的培养基, 加入含 NRSF 慢病毒毒液或空病毒毒液及 6 mg/L polybrene, 置 37°C , 5% CO_2 的孵箱中培养过夜. 次日, 去除毒液, 添加完全培养液, 待细胞生长至 80%~90% 融合时, 按 1:3 传代. 流式细胞术分选表达绿色荧光蛋白的细胞.

1.2.4 RT-PCR. 用 Trizol 试剂提取细胞的总 RNA. 各取 1 μg RNA, 反转录成 cDNA. 用 PCR 检测 NRSF mRNA 的表达情况. 人 NRSF P1: 5' acgcgtc-gaccagcaacaaagaaaagtagtcg 3', P2: 5' ccgctcgagatcagttctgccatctgtct 3', 扩增片段为 315 bp. 人 β -actin P1: 5' taccactggcatcgtgatggact 3', P2: 5' tccttctgcatcctgtcggcaat 3', 扩增片段为 506 bp. 大鼠 β -actin P1: 5' tggtgggtatgggtcagaaggactc 3', P2: 5' catggctgggtgttgaaggtctca 3', 扩增片段为 265 bp.

1.2.5 胰岛素启动子 - 荧光素酶活性的检测. 24 孔板中每孔种入 2×10^5 个 NRSF-INS-1 细胞或感染空病毒的 INS-1 细胞 (各 3 孔). 次日, 去除培养液, 加入含有胰岛素启动子 - 荧光素酶报告系统的慢病毒 (1 ml/ 孔). 感染 12 h 后换液. 72 h 后检测萤火虫荧光素酶活性.

1.2.6 NRSE 样基序 - 荧光素酶活性的检测. 24 孔板中每孔种入 2×10^5 个 NRSF-INS-1 细胞或感染空病毒的 INS-1 细胞 (各 6 孔). 按说明书操作 Lipofectamin2000 脂质体, 转染连有人胰岛素启动子的 pGL3-Basic 质粒或空 pGL3-Basic 质粒 (400 ng/ 孔), 转染含有 NRSE 样结构的 pGL3-Control 质粒或空 pGL3-Control 质粒 (400 ng/ 孔), 同时共转染 pRL-CMV 质粒 (2 ng/ 孔) 作为内参. 转染 6 h 后为细胞换液. 用完全培养液培养 48 h 后, 使用双重荧光素酶检测试剂盒检测萤火虫及海肾荧光素酶活性.

1.2.7 电泳迁移率变动分析实验 (EMSA). 通过奥科生物技术公司合成 5' 末端标记生物素的胰岛素 NRSE 样基序的探针, P1: 5' 生物素 - GCAGCCC-TCAG CCCTCCAGGACAGGCTGCATC 3'. 竞争探针选用 SCG10 基因中被验证的 NRSE 序列, 未标记生物素, SCG10 P1: 5' GCAAAGCCATTTCA-

GCACCACGGAGAGTGCCTCTGC 3'; 突变竞争探针 SCG10, 未标记生物素: mSCG10 P1: 5' GCAAAGCCATTTTCAGCACCACCTTAGAGTGCCT-CTGC 3'. 一并合成上述探针的互补序列, 等摩尔混匀后 98°C 加热 10 min, 自然冷却退火. 从 HeLa 细胞制备核提取物并测定蛋白质浓度. 每 20 μl 体系中分别加入 5 μg 、15 μg 、25 μg HeLa 细胞核抽提物, 2 μl Poly (dI·dC), 2 μl 结合缓冲液, 1 μl 50% 甘油, 1 μl 1% NP-40, 1 μl 100 mmol/L 氯化镁. 此时, 可加入抗体共孵育 5 min. 再加入生物素标记探针, 用量为 100 fmol, 待全部组分加入后室温孵育 20 min. 检测竞争结合反应时, 加入不同浓度竞争探针. 使用 0.5% TBE 作为电泳缓冲液, 在 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳 30 min, 随即于尼龙膜上进行半干电转 2 h. 将尼龙膜置 312 nm 紫外灯下交联 10 min. 尼龙膜依次在链霉亲和素 - 辣根过氧化物酶结合物以及发光底物与增强液中浸泡, 于暗室中曝光显影.

2 实验结果

2.1 NRSE 样基序的确定

经生物信息学分析及与保守的 NRSE 序列比较, 我们发现, 人胰岛素启动子 -3~+18 bp 的序列 (转录起始位点为 +1 bp) 与 NRSE 序列相似, 保守 NRSE: TTCAGCACCCACGGACAGCGCC^[7]; 人胰岛素启动子中 NRSE 样序列: CTCAGCCC-TCCAGGACAGGCT. 有报道保守 NRSE 序列中的 **CAGCACCC**GGACAG***C 是决定其功能的核心序列, 其中相连的核苷酸序列 GG 很关键, 当 GG 突变后, NRSF 与 NRSE 的结合能力及沉默基因表达的能力明显下降^[3]. 人胰岛素启动子中的 NRSE 样序列中含有决定保守 NRSE 功能的大部分核心序列.

2.2 质粒鉴定

插入 pcDNA3.1 的目的片段经测序证实为人 NRSF 全长 cDNA (3 940 bp). 酶切下 NRSF 片段与 pBPLV 连接, 转化. 对提取 2 个单克隆菌液进行 PCR 鉴定, 均检测出 NRSF 基因的表达 (扩增片段大小为 315 bp, 图 1a). 对鉴定为阳性的质粒用 Hind III 和 Not I 双酶切, 切出了 3 969 bp 的 NRSF 片段及 4 段不同大小的 pBPLV 片段, 分别为 3 341 bp, 1 806 bp, 756 bp, 586 bp, 563 bp (图 1b). 从连有荧光素酶的 pBPLV 质粒中切去 hPGK 启动子, 将人胰岛素启动子 -339~+112 片段连入,

获得的新载体经 PCR 鉴定证实含有所插入启动子及基因(图 1c). 该质粒用 *EcoR V* , *Nhe I* 和 *Sal I* 进行 3 酶切, 切出 pBPLV 片段 8 000 bp, 1 700 bp 左

右的荧光素酶片段和 451 bp 的胰岛素启动子片段(图 1d). 改造后的 *pGL3-Control* 质粒经测序, 证实人胰岛素 NRSE 样基序已插入其多克隆位点.

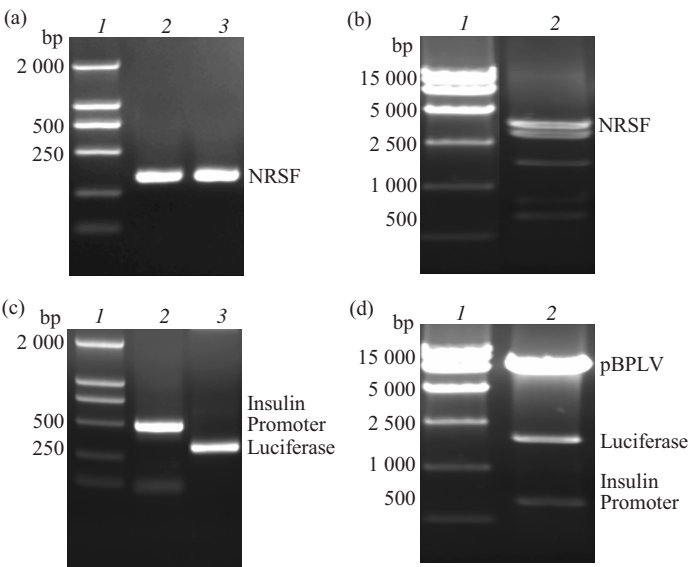


Fig. 1 Identification of pBPLV-NRSF and pBPLV-insulin-promoter-luciferase

(a) Identification of NRSF expression by PCR. 1: Marker; 2, 3: PCR products of NRSF fragment. (b) Recombinant lentiviral plasmid digested by *Hind III* / *Not I*. 1: Marker; 2: Digested fragments. (c) PCR results of lentiviral plasmid containing insulin-promoter-luciferase. 1: Marker; 2: PCR products of insulin-promoter; 3: PCR products of luciferase. (d) Recombinant lentiviral plasmid digested by *EcoR V* / *Nhe I* / *Sal I*. 1: Marker; 2: Digested fragments.

2.3 慢病毒毒液的产生

用 Lipofectamine 2000 介导慢病毒表达质粒及包装质粒 pLP1, pLP2, pVSVG 质粒共转染 293FT 细胞 48 h 后于荧光显微镜下观察: 大部分细胞表达绿色荧光蛋白, 并形成合胞体, 病毒已开始进行包装(图 2). 转染 72 h 后收集细胞上清液并离心去除细胞碎片. 将毒液分装冻存或直接感染靶细胞.

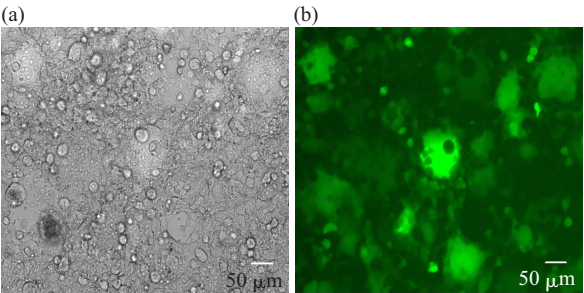


Fig. 2 Producing lentivirus in 293FT cells

(a) The appearance of multinucleated syncytia of 293FT cells by the expression of the VSVG glycoprotein. (b) The eGFP expression of 293FT cells after transfection with lentiviral vectors.

2.4 获得稳定表达 NRSF 的 INS-1 细胞

荧光显微镜下观察感染慢病毒的 INS-1 细胞, 可见几乎所有细胞都表达绿色荧光蛋白, 提示慢病毒携带的目的基因在细胞中开始表达(图 3a, b). 提取过表达 NRSF、感染空病毒的 INS-1 细胞及 HeLa 细胞(阳性对照)的总 RNA, RT-PCR 鉴定 NRSF 基因的表达. 结果表明, INS-1 细胞被含 NRSF 的慢

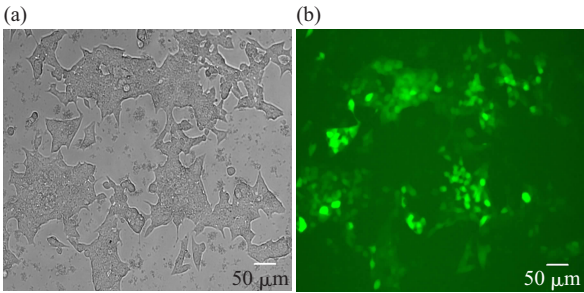


Fig. 3 The NRSF and eGFP expression of INS-1 cells after infected with NRSF-lentivirus

(a,b) INS-1 cells infected with lentivirus containing NRSF. (a) and (b) are the same cells viewed under ordinary microscope and fluorescence microscope, respectively.

病毒感染后能够表达 NRSF 基因, 而感染空病毒的 INS-1 细胞不表达 NRSF (图 4).

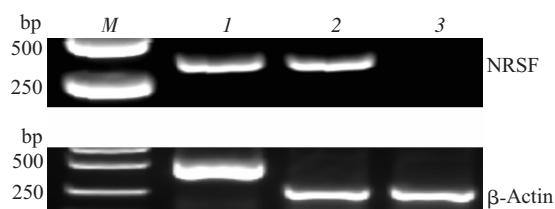


Fig. 4 RT-PCR analysis of NRSF and β -actin in different cells

M: DL2000 marker; *1*: HeLa; *2*: INS-1-NRSF; *3*: INS-1-GFP.

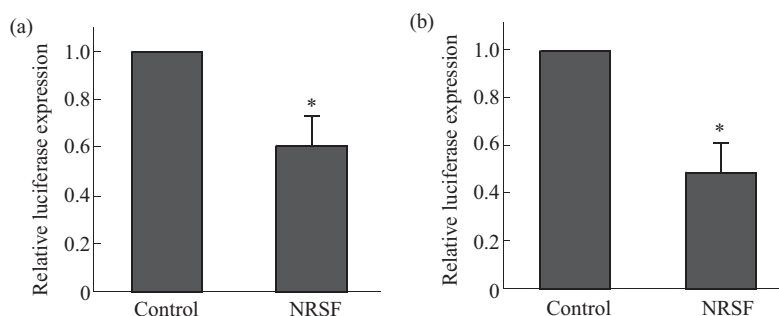


Fig. 5 Transcriptional activity of human insulin promoter

(a) Lentivirus containing human insulin promoter-luciferase (hIns-Luc) was used to infect into INS-1-NRSF or INS-1-GFP (control). (b) Cells were transiently transfected with plasmid containing hIns-Luc. Firefly luciferase reporter activity was normalized to Renilla luciferase activity in (b). Expression levels were presented as the ratio of reporter gene activities between the two conditions. Each experiment was performed at least three times in triplicate (* $P < 0.05$, $n = 3$).

2.6 NRSF 通过与 NRSE 样基序相互作用发挥抑制功能

为进一步确定 NRSF 对胰岛素启动子活性的抑制是通过与 NRSE 样基序结合发挥作用的, 我们构建了含有双拷贝 NRSE 样基序的荧光素酶报告载体 (图 6a), 用脂质体瞬时转染该报告质粒于过表达 NRSF 的 INS-1 或不表达 NRSF 的细胞, 结果过表达 NRSF 的 INS-1 细胞组的荧光素酶相对值比对照组下降了 32.56% (图 6b). 这一组数据表明, NRSF 能抑制人胰岛素启动子的转录活性, 这种转录负调控功能的实现与启动子中的 NRSE 样基序有关.

2.7 NRSF 蛋白能与 NRSE 样基序结合

生物素标记的 NRSE 样基序探针与高表达 NRSF 的 HeLa 细胞核抽提物孵育后电泳, 可观察到 DNA-蛋白质复合物的出现, 该复合物丰度随核蛋白浓度增加而增加 (图 6a). 反应体系中分别加入 100 倍, 50 倍, 20 倍, 10 倍 SCG10 NRSE 竞争探针(无生物素标记)后, 可观察到逐渐减弱的竞争效

2.5 NRSF 能抑制胰岛素启动子的转录活性

用含有人胰岛素启动子-荧光素酶(hInsP-LUC)的慢病毒毒液感染过表达 NRSF 的 INS-1 细胞(实验组)或空病毒-INS-1 细胞(对照组), 继续培养 72 h 后检测荧光素酶活性. 结果显示, 实验组荧光素酶活性比对照组下降了 38.07% (图 5a). 用脂质体瞬时转染 hInsP-LUC 报告系统于上述 2 种细胞, 检测结果显示, 过表达 NRSF 的 INS-1 细胞中的荧光素酶活性明显下降 (图 5b).

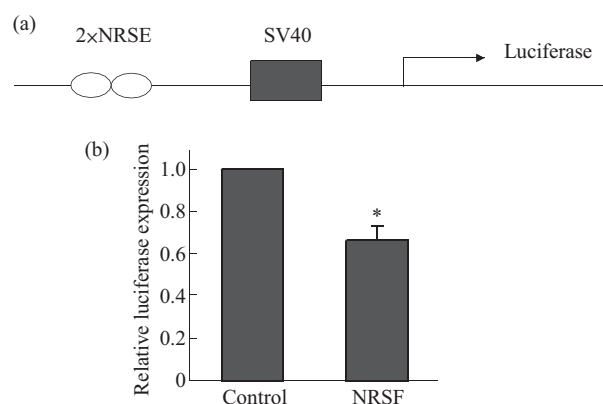


Fig. 6 Transcriptional activity of NRSE-like sequence

(a) The human insulin NRSE-like sequence was cloned into the multiple cloning site of the pGL3-control vector. (b) INS-1-NRSF or INS-1-GFP (control) were transiently transfected with pGL3-Control-NRSE like sequence. Firefly luciferase reporter activity was normalized to Renilla luciferase activity. Expression levels were presented as the ratio of reporter gene activities between the two conditions. Each experiment was performed at least three times in triplicate (* $P < 0.05$, $n = 3$).

果；而当竞争探针突变后，就失去了与蛋白质结合的能力，即不改变复合物的丰度，这证明标准 NRSE 与 NRSE 样基序竞争结合同一蛋白质(图 6b). 在核蛋白中加入 NRSF 抗体，可明显减少 DNA- 蛋

白质复合物的形成 (图 6c)，证实 NRSE 样基序结合的蛋白质是 NRSF. 以上结果证实 NRSE 样基序在体外可以和 NRSF 特异结合.

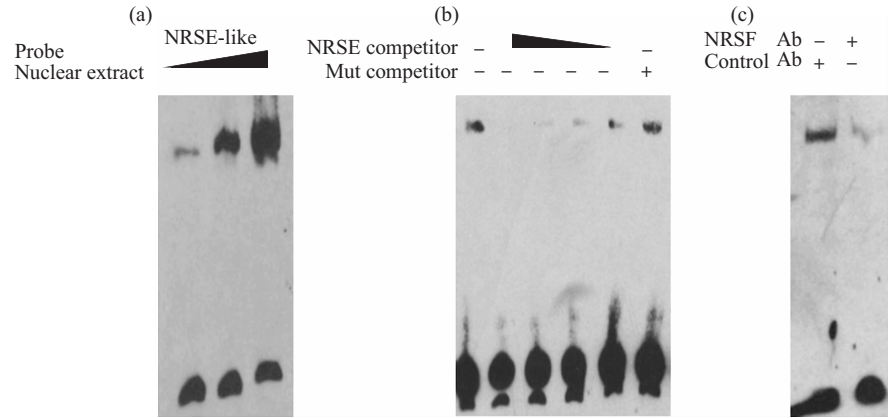


Fig. 7 Binding activity of insulin NRSE-like sequence

(a) DNA-protein complexes were formed when the human insulin NRSE-like sequence was added to the nuclear protein. (b) Sequence-specific binding activity of NRSF to the insulin NRSE-like sequence; DNA-protein complexes was abolished by adding a 10- to 100-fold molar excess of unlabeled wild-type NRSE. (c) DNA-protein complexes was abolished by adding antibody to NRSF.

3 讨 论

通过生物化学等手段筛选 NRSF 调控的靶基因并了解其调控机制是当前的研究热点^[14,15]. 已有研究表明, NRSF 调控神经细胞中大量基因的表达, 如 II 型钠离子通道、SCG10、突触蛋白、多巴胺羟化酶、神经粘附分子 L1 等基因. 最近的研究表明, NRSF 还调控胰岛细胞中的神经特异基因及胰岛功能相关分子 Pax4 等的表达, 这些研究结果提示, NRSF 在胰岛细胞的发育分化过程中可能发挥重要的作用. 进一步寻找胰岛中其他的 NRSF 调控的靶基因, 将有助于我们更好地了解 NRSF 的调控作用及胰岛的发育调控机制. NRSF 发挥作用的基础是其调控的靶基因中含有能与该转录因子相结合的 NRSE 结构. 经生物信息学检索和片段比对, 我们发现, 人胰岛素基因核心启动子区含有类似于 NRSE 的基序, 该 NRSE 样基序的预测及其是否受到 NRSF 蛋白调控的研究国内外尚没有报道. 我们选择 INS-1 细胞作为本研究中的细胞模型. INS-1 细胞是胰岛素瘤细胞系, 该细胞不表达 NRSF^[6], 高表达胰岛素, 是研究 NRSF 对胰岛素启动子调控情况最好的细胞模型.

慢病毒是一种新型病毒载体, 具有获得病毒周期短, 滴度高, 可以感染分裂、不分裂细胞, 能整合入宿主基因组从而稳定表达目的基因等特点. 我们选用慢病毒载体介导人胰岛素启动子 - 荧光素酶报告系统及 NRSF 基因在 INS-1 细胞中的表达, 具有 2 个优点: 一方面可以使进行分析的胰岛素启动子调控区 / 报告基因位于近乎天然染色质的构象, 具有近乎天然的拷贝数, 使调控区更精确地模拟正常功能; 另一方面, 由于脂质体转染 INS-1 细胞效率低, 利用慢病毒可以实现较高的感染效率, 可以更好地观察调控效果.

稳定转染分析结果表明, 人胰岛素启动子活性受到 NRSF 的负调控, 即 NRSF 能明显下调人胰岛素启动子的活性. 这一负调控现象在瞬时转染人胰岛素启动子 - 荧光素酶报告系统的实验中也得到了验证. 以上结果提示, 人胰岛素启动子中存在着能与 NRSF 结合的 NRSE 样结构. 为了进一步验证 NRSF 下调胰岛素启动子活性是通过预测的 NRSE 样结构进行的, 我们通过公司合成了双拷贝的 NRSE 样序列, 将其连入 pGL3-Control 载体中, 瞬时转染该报告系统于 INS-1 细胞中, 通过荧光素酶活性检测发现, 转染 NRSF 基因的 INS-1 细胞中

NRSE 样基序 - 荧光素酶活性比对照组下降了 32.56%。这一结果进一步说明, 胰岛素启动子中的 NRSE 样结构与标准的 NRSE 结构具有相似的功能, 能通过与 NRSF 结合即而发挥负调控基因启动子活性的作用。

为了进一步验证 NRSF 蛋白与胰岛素启动子中 NRSE 样序列的结合情况, 我们做了电泳迁移率变动分析实验(EMSA)。EMSA 实验采用生物素标记 DNA 探针, 该标记方法具有高灵敏度、低背景, 等同于放射性标记系统的优点, 同时, 去除了同位素放射性的危险和处理废物的麻烦。实验结果显示, 人胰岛素启动子中的 NRSE 样基序能与 HeLa 细胞核提取物中的蛋白质相结合, 其与蛋白质结合能力会随着 NRSE 样基序浓度的增加而增加, 该 DNA-蛋白质的结合可被标准的 NRSE 结构所竞争, 这种竞争呈现浓度依赖。为了确定 EMSA 复合体中的蛋白质是 NRSF, 我们向蛋白质提取物中引入抗 NRSF 的抗体, 再加入生物素标记探针进行结合反应, 检测结果显示, DNA-蛋白质复合物丰度明显减弱。这些结果表明, 胰岛素启动子中的 NRSE 样基序具有和 NRSF 蛋白结合的能力。

综上所述, 我们通过生物信息学分析、荧光素酶报告系统检测及 EMSA 实验证实, 人胰岛素启动子中含有 NRSE 样序列, 该序列通过与 NRSF 蛋白结合从而抑制人胰岛素启动子的转录活性。这一研究工作使我们对人胰岛素基因的转录调控机制又有了新的认识, 该工作还有助于我们进一步了解 NRSF 蛋白在胰岛细胞中的调控作用。

致谢 中国科学院生物物理研究所徐涛教授, 陆敬泽老师, 葛茜老师热心帮助并提供细胞, 在此表示衷心感谢; 瑞士 Lausanne 大学 Gerward Waeber 教授及德国 Goettingen 大学 Elke Oetjen 教授惠赠质粒, 在此表示衷心感谢; 军事医学科学院放射医学研究所杨晓明教授, 李长艳博士, 王志东博士, 胡德庆博士对本工作多有指导和帮助, 在此表示衷心感谢。

参 考 文 献

- 1 Maue R A, Kraner S D, Goodman R H, *et al.* Neuron-specific expression of the rat brain type II sodium channel gene is directed by upstream regulatory elements. *Neuron*, 1990, **4** (2): 223~231
- 2 Mori N, Stein R, Sigmund O, *et al.* A cell type-preferred silencer element that controls the neural-specific expression of the SCG10 gene. *Neuron*, 1990, **4** (4): 583~594
- 3 Roopra A, Sharling L, Wood I C, *et al.* Transcriptional repression by neuron-restrictive silencer factor is mediated via the Sin3-histone deacetylase complex. *Mol Cell Biol*, 2000, **20** (6): 2147~2157
- 4 You A, Tong J K, Grozinger C M, *et al.* CoREST is an integral component of the CoREST human histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (4): 1454~1458
- 5 Roopra A, Qazi R, Schoenike B, *et al.* Localized domains of G9a-mediated histone methylation are required for silencing of neuronal genes. *Mol Cell*, 2004, **14** (6): 727~738
- 6 Atouf F, Czernichow P, Scharfmann R. Expression of neuronal traits in pancreatic beta cells. *J Biol Chem*, 1997, **272** (3): 1929~1934
- 7 Kemp D M, Lin J C, Habener J F, *et al.* Regulation of Pax4 paired homeodomain gene by neuron-restrictive silencer factor. *J Biol Chem*, 2003, **278** (37): 35057~35062
- 8 Papasani M R, Robison B D, Hardy R W, *et al.* Early developmental expression of two insulins in Zebrafish (*Danio rerio*). *Physiol Genomics*, 2006, **27** (1): 79~85
- 9 Deltour L, Leduque P, Bucchini D, *et al.* Differential expression of the two nonallelic proinsulin genes in the developing mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (2): 527~531
- 10 Devaskar S U, Singh B S, Giddings S J, *et al.* Insulin II gene expression in rat central nervous system. *Regul Pept*, 1993, **48** (1~2): 55~63
- 11 Nakamura T, Kishi A, Kikkawa R, *et al.* Insulin production in a neuroectodermal tumor that expresses islet factor-1, but not pancreatic-duodenal. Homeobox 1. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, **86** (4): 1795~1800
- 12 Amendola M, Venneri M A, Biffi A, *et al.* Coordinate dual-gene transgenesis by lentiviral vectors carrying synthetic bidirectional promoters. *Nat Biotechnol*, 2005, **23** (1): 108~116
- 13 Kim C S, Hwang C K, Loh H H, *et al.* Neuron-restrictive silencer factor (NRSF) functions as a repressor in neuronal cells to regulate the μ opioid receptor gene. *J Biol Chem*, 2004, **279** (45): 46464~46473
- 14 Mortazavi A, Leeper Thompson E C, Gacia S T, *et al.* Comparative genomics modeling of the NRSF/REST repressor network: from single conserved sites to genome-wide repertoire. *Genome Research*, 2006, **16** (10): 1208~1221
- 15 Bruce A W, Donaldson I J, Wood I C, *et al.* Genome-wide analysis of repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) target genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (28): 10458~10463

NRSF Plays a Regulatory Role in Human Insulin Gene Transcription*

LIU Qing-Bin**, LI Yan-Hua**, YANG Yin-Xiang, YUAN Hong-Feng,
ZHANG Rui, QIN Li-Peng, LÜ Yang, ZHANG Sai-Nan, SUN Di-Jin,
CHEN Lin, BAI Ci-Xian, NAN Xue, WANG Yun-Fang, PEI Xue-Tao***

(Laboratory of Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, Beijing Institute of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract The transcriptional repressor RE1 silencer transcription factor (NRSF/REST) is an important factor that restricts some neuronal traits in neurons. Since these traits are also present in pancreatic islet cells, NRSF-regulated genes involved in islet function are searched. A NRSE-like motif was analysed in human insulin promoter. The role of NRSE was evaluated by generating a model of insulin-secreting cells that firmly express NRSF. The presence of NRSF led to a decrease in activity of human insulin promoter by stable or transient transfection with human insulin-promoter luciferase. The predicted NRSE-like motif also confers NRSF-dependent transcriptional repression in the context of a surrogate gene promoter. Specific binding activity of NRSF/REST to the NRSE-like motif was confirmed by EMSA. Moreover, the binding activity is competed by consensus NRSE sequence. These data showed that human insulin promoter is regulated by the transcriptional repressor NRSF/REST via the NRSE-like motif.

Key words neuronal restrictive silencer factor(NRSF), neuronal restrictive silencer element(NRSE), insulin, promoter

*This work was supported by grants from The National Basic Research Program of China (2005CB522702), Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA02A100) and The National Natural Science Foundation of China (30470831).

**These authors made an equal contribution.

***Corresponding author . Tel: 86-10-66932240, Fax: 86-10-68104807, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

Received: February 15, 2007 Accepted: April 2, 2007