

研究报告

几种细胞因子对小鼠核糖体蛋白 L6 表达的调控*

王冀姝 韩 骅**

(第四军医大学医学遗传学与发育生物学教研室, 西安 710032)

摘要 小鼠的核糖体蛋白 RpL6 启动子除了具有看家基因启动子的特点外, 还含有多种转录因子的识别位点. 如 GATA 序列 1, γ 干扰素核心序列, α 干扰素应答序列 2 等, 提示 RpL6 的表达可为细胞外因子所诱导. 为了证实这一点, 分别用促红细胞生成素、 γ 干扰素和 α 干扰素处理 K562 和 Jurkat 细胞, 并用 RNA 印迹和荧光素酶报告试验检测了 RpL6 的 mRNA 水平和启动子活性. RNA 印迹结果显示, 在上述细胞因子作用下, RpL6 的 mRNA 水平均有所提高. 利用荧光素酶报告系统, 用含有不同细胞因子识别位点启动子序列的报告质粒转染 Jurkat 和 K562 细胞, 比较了启动子在细胞因子诱导前后的转录激活活性. 结果显示, 细胞因子诱导后启动子活性明显升高, 且与应答序列的存在与否则有直接关系. 这些结果表明, 细胞因子对 RpL6 转录的提高, 是通过作用于启动子上相应的识别位点提高启动子活性而实现的.

关键词 核糖体蛋白 RpL6, 启动子, 干扰素, 促红细胞生成素, 转录

学科分类号 Q243, Q51

核糖体蛋白 L6 (ribosomal protein L6, RpL6) 是核糖体大亚基的一个组成成分. 同时它还是人类 T 淋巴细胞白血病病毒 (human T cell leukemia virus type I, HTLV-1) 基因组中病毒编码的原癌蛋白 Tax 应答元件结合蛋白^[1], 所以又被称为 Taxreb107 (Tax responsive element binding protein 107). 我们利用核定位信号筛选系统^[2]再次克隆了小鼠 RpL6 的 cDNA 序列^[3], 并且通过筛选噬菌体文库克隆了其基因组基因. 通过 DNA 序列分析和荧光素酶报告实验, 我们鉴定出了 RpL6 启动子序列 (GenBank 登录号 AF374195).

由文献回顾可知, 高等真核生物的核糖体蛋白基因的启动子在结构上具有很大的相似性, 例如具有嘧啶富集的转录起始区域, 往往缺失典型的 TATA box 结构和非甲基化的 CpG 岛. 这种启动子结构往往具有持续激活的特点, 常是一些看家基因的特征^[4]. 但 RpL6 的启动子除了仍然具有核糖体蛋白启动子的共性外, 还有一些特殊转录因子的识别位点如核因子-白介素 6 (NF-IL6), γ 干扰素核心序列 (γ -IFN CS), 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子应答序列 (GM-CSF), 癌蛋白 E2A 核心序列 (E2A CS), α 干扰素应答序列 2 (α -IFN2) 和 CAMP 反应元件 1 (CRE1) 等. 此外, 有研究表明 RpL6 是红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 的应答基因^[5], 并且在肝脏损伤修复时表达上调^[6]. 这些结果提示 RpL6 不仅做为一种看家基因具有组

成性的表达方式, 还可能具有可诱导的表达方式. 为了证实这个问题, 我们选用了 α 干扰素 (interferon, IFN), γ -IFN 和 EPO 做为诱导剂, 研究了 RpL6 对细胞因子的应答反应.

1 材料和方法

1.1 材料

重组人促红细胞生成素注射液 4 000 U/ml (沈阳三生制药股份有限公司). 注射用基因工程干扰素 (IFN α 2a) 600 $\times$ 10⁴ U/ml (辽宁卫星生物制品研究所). 注射用重组干扰素 (IFN γ) 100 $\times$ 10⁴ U/ml (丽珠生物工程制药厂). K562 和 Jurkat 细胞系由本实验室保存.

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取和 RNA 印迹: 参照 Gibco/BRL 公司的 Trizol Reagent 说明书提取细胞总 RNA, 即约 10⁷ 的细胞中加入 1 ml Trizol 试剂, 混匀后室温放置 10 min, 加入 200 μ l 氯仿, 14 000 r/min 离心 15 min. 收集上清加入 500 μ l 异丙醇, 混匀 12 000 r/min 离心 10 min. 沉淀用 75% 乙醇洗涤一次. 水 (DEPC 处理) 溶解, 并用紫外分光光度计定量. 5 μ g 总 RNA 在含有甲醛的变性琼脂糖凝胶中进行电泳分离, 然后转移至尼龙膜上, α -³²P-dCTP 标记的全

* 国家自然科学基金资助项目 (39970376).

** 通讯联系人.

Tel: 029-3374487, E-mail: hhanfm@yahoo.com

收稿日期: 2002-01-31, 接受日期: 2002-02-28

长RpL6 cDNA 作为探针进行杂交, 杂交信号用 Phosphor Image Storm 860 进行检测。

1.2.2 细胞培养和转染: Jurkat 细胞及 K562 细胞培养于 RPMI1640 培养液 (添加有 10% 胎牛血清, 2 mmol/L L-谷氨酰胺) 中。将 1×10^5 个细胞接种于培养板中过夜培养, 用 lipofectamin 进行质粒转染, 即取 2 μ g 质粒 DNA 与 15 μ l lipofectamin 溶液混合, 加入细胞的培养上清中。培养 8 h 后换新鲜的培养液继续培养。用细胞因子处理细胞时, 向培养液中加入终浓度为 15×10^4 U/ml 的 α -IFN, 终浓度为 5×10^4 U/ml 的 γ -IFN, 或终浓度为 50×10^4 U/ml 的 EPO, 在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的条件下培养 30 min, 60 min, 120 min 后, 进行荧光素酶的检测或提取 RNA。

1.2.3 质粒的构建: 含有荧光素酶基因的报告质粒 pGL3-basic 来自 Promega 公司。含有 RpL6 启动子片段的报告质粒按常规方法进行构建。

1.2.4 荧光素酶活性检测: 按照上述细胞转染方法转染 60 h 后, 用细胞裂解液 (91 mmol/L K₂HPO₄, 9 mmol/L KH₂PO₄, 10% 甘油, 1 mmol/L DTT, 10% TritonX-100) 裂解细胞, 离心后收集上清, 与荧光素酶底物试剂 (Pikagene) 进行反应, 用 Promega 公司的 Chemoluminator 检测活性。用表达 β -半乳糖苷酶基因的质粒共转染细胞, 用邻硝基苯- β -D-半乳糖苷 (ONPG) 作为底物检测 β -半乳糖苷酶的活性, 作为细胞转化效率的内对照。

2 结 果

2.1 EPO 对 RpL6 mRNA 的诱导作用

Li 等^[5]发现 RpL6 是 EPO 的早期应答基因,

我们通过软件分析发现, 在 RpL6 基因的启动子区域中有 GATA1 识别序列 (tagaaGATAactct, tggGATTaaa), 提示 EPO 可以诱导 RpL6 启动子的活性。为了证实 EPO 对 RpL6 的诱导功能, 我们在 K562 细胞的培养上清中加入 EPO, 孵育 30 min, 60 min 和 120 min 后, 分别提取总 RNA, 进行 RNA 印迹试验, 然后以 RpL6 全长 cDNA 为探针检测 RpL6 mRNA 水平的变化 (图 1)。结果显示, EPO 可以诱导 RpL6 mRNA 水平的上升, EPO 对 K562 细胞 RpL6 mRNA 的诱导在 60 min 后达到最高。这一结果与 Li 等的报道相似。

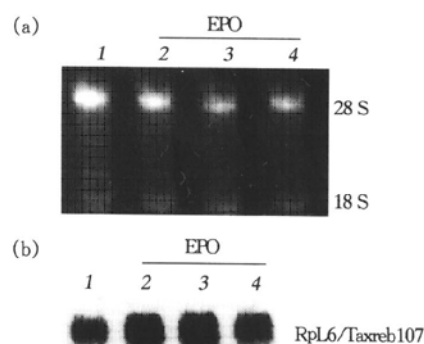


Fig. 1 Induction of RpL6 mRNA after treatment with EPO as detected by Northern blot

EPO was added into the medium of K562 cells, incubated for 30 min, 60 min and 120 min. (a) EB staining of RNA gel; (b) RpL6/Taxreb107 mRNA probed by cDNA. The level of Taxreb107/RpL6 mRNA was examined by Northern blot. 1: 0 min; 2: 30 min; 3: 60 min; 4: 120 min.

2.2 EPO 对 RpL6 启动子的诱导作用

EPO 是否是通过作用于 RpL6 基因启动子上的 GATA1 应答序列而使之转录增加的? 为了探讨这

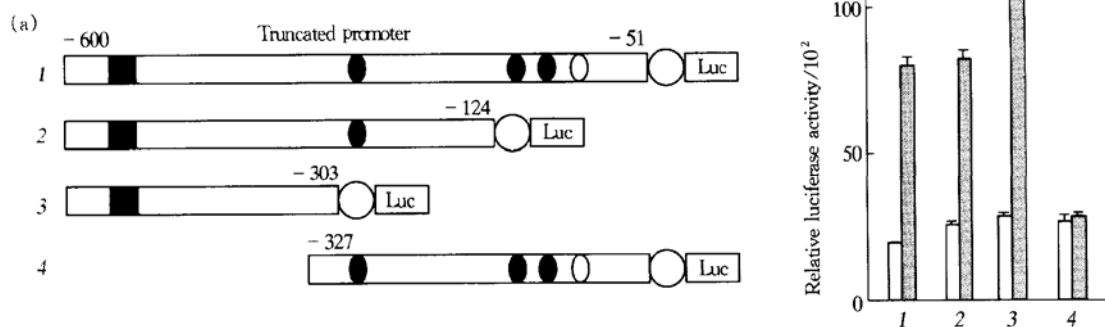


Fig. 2 K562 cells were transiently transfected with reporter plasmids containing different regions of the RpL6 promoter, and cultured in the presence of EPO

Luciferase activity was analyzed in the cell extracts. Compared with control, EPO induced a significant increase of luciferase activity. The induced luciferase expression was abolished only when the promoter truncates lost the region containing the GATA1 site (EPO CS). (a) Schematic representatives of RpL6 promoter (1) and its truncates (2~4). $\square$: α -IFN CS; $\bullet$: γ -IFN CS; $\blacksquare$: EPO CS; $\circ$: SV40 promoter. (b) Reporter assay of RpL6 promoter and truncates as shown in (a). $\square$: untreated; $\blacksquare$: EPO.

一问题, 我们将含有或不含有 GATA1 应答序列的 Rpl6 启动子片段, 插入质粒 pGL3 的荧光素酶基因的上游, 并利用得到的报告质粒转染 K562 细胞, 转染后的 36 h, 在培养上清中加入 EPO 作用 60 min, 然后裂解细胞, 在细胞裂解液上清中检测荧光素酶的表达. 如图 2 所示, 经 EPO 处理后 Rpl6 启动子活性明显升高, 且与 GATA1 应答序列的存在与否有直接关系. 这一结果说明 EPO 处理可直接诱导 Rpl6 启动子的活性, 且这一诱导作用可能是通过 Rpl6 启动子中的 GATA1 识别位点实现的.

2.3 γ -IFN 和 α -IFN 对 Rpl6 表达的影响

在 Rpl6 启动子区域有 3 个 γ -IFN 的应答序列 (caCATGAGTCgc, cgGAGTAAAGaaa, tccCATGATGCccc) 和 1 个 α -IFN2 的应答序列 (ggAAGTGAAtttt). 这些应答序列的存在提示 Rpl6 也可能是 γ -IFN 和 α -IFN 的应答分子. 为了证实这个推测, 我们在 Jurkat 细胞培养液中加入 γ -IFN 和 α -IFN, 培养 30 min, 60 min 和 120 min 后, 分别提取总 RNA, 以 Rpl6 全长 cDNA 为探针检测了 Rpl6 的 mRNA 水平的变化 (图 3). 结果显示这两种干扰素均可诱导 Rpl6 mRNA 的上调. α -IFN 作用于 Jurkat 细胞, 60 min 后 Rpl6 mRNA 水平达到最高, 而 γ -IFN 作用 120 min 后基因转录水平达到最高. 这一结果证实, Rpl6 在淋巴细胞中的表达受到 γ -IFN 和 α -IFN 的诱导.

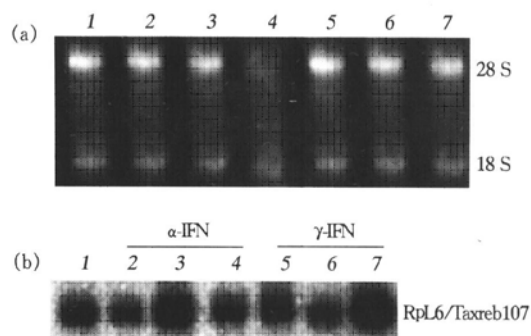


Fig 3 Induction of Rpl6 mRNA after treatment with γ -IFN or α -IFN as detected by Northern blot

γ -IFN (5~7) or α -IFN (2~4) were added into the culture medium of Jurkat cells, incubated for 30 min, 60 min and 120 min, the expression level of Rpl6 mRNA was examined by Northern blot. (a) EB staining of RNA gel; (b) Rpl6/Taxreb107 mRNA probed by a cDNA probe. 1: 0 min; 2 and 5: 30 min; 3 and 6: 60 min; 4 and 7: 120 min.

γ -IFN 和 α -IFN 在淋巴细胞中对 Rpl6 的诱导作用是否也和 EPO 一样是通过作用于启动子而实现的? 我们利用 pGL3 报告系统, 用含有或不含有 γ -IFN 和 α -IFN 应答序列启动子片段的报告质粒转染 Jurkat 细胞, 转染后 36 h, 在培养上清中加入 α -IFN 和 γ -IFN 分别作用 60 min 和 120 min, 然后裂解细胞检测细胞裂解液中荧光素酶的表达. 如图 4 所示, γ -IFN 和 α -IFN 均可诱导 Rpl6 启动子活性明显升高, 且诱导活性与相应的应答序列的存在与否则有直接关系.

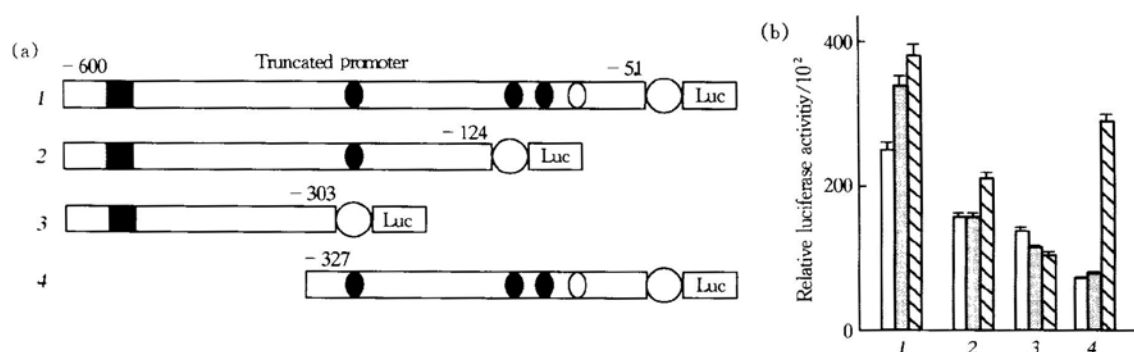


Fig. 4 Jurkat cells were transiently transfected with reporter plasmids containing different regions of the Rpl6 promoter, and cultured in the presence of α -IFN or γ -IFN

Luciferase activity was analyzed in the cell extracts. Compared with control, γ -IFN and α -IFN induced a significant increase of luciferase activity. The induced luciferase expression was abolished only when the promoter truncates lost the region containing the specific sites. (a) Schematic representatives of full length (1) and truncated (2~4) Rpl6 promoter. $\square$: α -IFN CS; $\bullet$: γ -IFN CS; $\blacksquare$: EPO CS; $\circ$: SV40 promoter. (b) Reporter assay of Rpl6 promoter and truncates as shown in (a). $\square$: untreated; $\square$: α -IFN; $\blacksquare$: γ -IFN.

3 讨 论

核糖体是蛋白质生物合成的核心场所. 除了病

毒和哺乳动物成熟红细胞外, 核糖体普遍存在于所有真核和原核细胞中, 构成参与生物体内蛋白质合成的多分子细胞器. 哺乳动物细胞的核糖体是由 4

种 rRNA, 80 余种核糖体蛋白组合而成的。尽管所有的核糖体蛋白都是核糖体的组成成分, 但某些核糖体蛋白分子具有一些特殊的生理功能。例如核糖体蛋白 RpS6, 基因剔除的分析表明^[7], RpS6 缺陷小鼠的肝脏细胞增生功能受到抑制, 证明 RpS6 可能参与了细胞增生和组织修复。而 RpL6 不仅参与了肝脏损伤后的再生^[6], 而且还是一种 EPO 的应答基因^[5]。这些结果表明核糖体蛋白在细胞增殖过程中发挥着重要作用。但核糖体蛋白表达的调控机理目前尚不完全清楚。为了研究 RpL6 的转录调控机制, 我们通过筛选小鼠的噬菌体基因组文库, 获得了小鼠 RpL6 基因的基因组序列 (GenBank 登录号为 AF374195)。利用计算机软件分析发现在第一外显子的上游有启动子结构特点的区域, 并用报告基因实验加以证实 (结果未发表)。RpL6 的启动子除了具有核糖体蛋白启动子的共同特点及管家基因的特点外, 还有一些转录因子的识别序列和细胞因子的应答序列如 GATA, γ -IFN, α -IFN2, EPO 和 NF- κ B 等, 目前尚无研究表明这一特点也存在于其他核糖体蛋白的启动子上。这些应答序列的存在提示 RpL6 可能是一些细胞因子的应答基因, 在这些细胞因子的作用下, RpL6 的表达增高, 促进细胞增生, 参与淋巴细胞的功能活化和红细胞的成熟。为了探讨这些问题, 我们首先利用 RNA 印迹, 证实在 γ -IFN、 α -IFN2 和 EPO 的作用下, Jurkat 和 K562 细胞中 RpL6 的 mRNA 水平增高。同时为了回答这些细胞因子是否是通过作用于 RpL6 基因启动子上的应答序列而使之转录增加的问题, 我们将含有不同应答序列的启动子片段插入报告基因载体中, 转染 Jurkat 和 K562 细胞系。我们发现 γ -IFN、 α -IFN2 和 EPO 作用后, RpL6 启动子的活性明显增高, 且与应答序列的存在与否直接相关。这一结果表明, 细胞因子的确是通过作用于 RpL6 基因启动子上的应答序列而使之转录增加的。

与 RpL6 的功能相适应, RpL6 启动子具有组成性转录活性 (未发表的结果), 以维持 RpL6 基

因的持续性表达。RpL6 基因的诱导性表达至少可能有两个方面的意义。a. 在细胞蛋白质合成量需要增加时, 核糖体蛋白的表达增加可能增加核糖体的数量, 进而提高蛋白质的合成效率; b. 这种诱导性表达可以满足某些核糖体蛋白的其他功能。如 RpL6 除了参与核糖体的形成外, 同时它还是人类 T 淋巴细胞白血病病毒 (human T cell leukemia virus type I, HTLV-1) 基因组中, 病毒编码的原癌蛋白 Tax 应答元件的结合蛋白^[1], 所以又被称为 Taxreb107 (Tax responsive element binding protein 107)。我们以往的研究发现, RpL6 的表达可以被 HTLV-1 编码的癌蛋白 Tax 所诱导 (未发表的结果)。Tax 对 RpL6 的诱导可能对 Tax 激活的病毒基因组转录有一定的辅助作用, 因为病毒启动子上的 RpL6 识别位点对 Tax 全功能的发挥有辅助作用^[1]。

参 考 文 献

- 1 Morita T, Sato T, Nyunoya H, *et al.* Isolation of a cDNA encoding DNA-binding protein (TAXREB107) that binds specifically to domain C of the tax-responsive enhancer element in the long terminal repeat of human T-cell leukemia virus type I. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1993, **9** (2): 115~121
- 2 王冀妹, 陈萍, 孙强, 等. 核定位信号筛选系统的构建. *中国生物化学与分子生物学学报*, 2000, **16** (3): 301~305
Wang J S, Chen P, Sun Q, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 2000, **16** (3): 301~305
- 3 王冀妹, 孙强, 李荣, 等. 利用核定位筛选系统初步筛选小鼠胚胎核定位蛋白基因. *生物化学与生物物理学报*, 2000, **32** (6): 569~573
Wang J S, Sun Q, Li R, *et al.* *Acta Biochim Biophys*, 2000, **32** (6): 569~573
- 4 Mager W H. Control of ribosomal protein gene expression. *Biochim Biophys Acta*, 1988, **949** (1): 1~15
- 5 Li R, Madden H, Sytkowski A J. Identification of TAXREB107 as an erythropoietin early response gene. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1999, **15** (4): 375~379
- 6 Xu W, Wang S, Wang G, *et al.* Identification and characterization of differentially expressed genes in the early response phase during liver regeneration. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **278** (2): 318~325
- 7 Volarevic S, Stewart M J, Ledermann B, *et al.* Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. *Science*, 2000, **288** (5473): 2045~2047

Regulation of Ribosomal Protein RpL6 Expression by Erythropoietin, α -Interferon and γ -Interferon*

WANG Ji-Shu, HAN Hua**

(Department of Medical Genetics and Developmental Biology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract Mouse ribosomal protein (Rp) L6 promoter contains several transcription binding sites, in addition to common features shared by other Rp promoters, suggesting that RpL6 promoter might be induced by some extracellular elements. To access this question, Jurkat and K562 cells were cultured with α -IFN, γ -IFN or EPO and looked at RpL6 expression by Northern hybridization as well as reporter assay. Treatment with these cytokines upregulated RpL6 mRNA was detected by Northern hybridization. Reporter vectors with promoter fragments containing different transcription factor binding sites were constructed and transiently transfected to Jurkat and K562 cells cultured with α -IFN, γ -IFN or EPO. Luciferase activity was examined in the cell lysates. The promoter activity of RpL6 was elevated significantly after cytokine treatment. These results suggest that cytokines may increase the transcription level of RpL6 gene via induction of the RpL6 promoter.

Key words ribosomal protein L6, promoter, interferon, erythropoietin, transcription

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (39970376).

** Corresponding author. Tel: 86-29-3374487, E-mail: huahan@fmmu.edu.cn

Received: January 31, 2002 Accepted: February 28, 2002