

hhlim 基因转录调控区域鉴定 及表达调控的初步研究*

郑 斌¹⁾ 温进坤^{1)**} 韩 梅¹⁾ 周爱儒²⁾

(¹⁾河北医科大学基础医学研究所, 石家庄 050017; ²⁾北京大学医学部, 生物化学与分子生物学系, 北京 100083)

摘要 为了研究 hhlim 基因表达调控机制, 对该基因 5' 上游 - 2 537 bp 序列从 5' 端依次进行缺失后, 利用荧光素酶报告基因检测各种不同长度片段在 C2C12 细胞中驱动荧光素酶表达的活性. 结果表明, 在 hhlim 基因 5' 上游 - 2 537 ~ - 1 537 bp 之间存在负调控元件, 在 - 253 ~ - 157 bp 之间含有增强子样序列. 用含有增强子样序列的 DNA 片段做探针, 对未分化型和分化型 C2C12 细胞的核蛋白进行电泳迁移率改变分析 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA). 分析的结果显示, 两种表型细胞中的核蛋白与探针结合所形成滞后带的谱型明显不同. 结果还发现内皮素-1 (ET-1) 和碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 既能显著诱导 C2C12 细胞对 hhlim 的表达, 也能刺激含增强子样序列的调控区域所驱动的报告基因表达. 提示 hhlim 基因转录起始点至 - 2 537 bp 的区域内含负调控元件及增强子样序列, 该基因的表达受 ET-1 和 bFGF 的调节.

关键词 hhlim 基因, 调控序列, 表达调节, 成肌细胞

学科分类号 Q78

LIM 蛋白是一类富含半胱氨酸且分子结构中有一个或多个锌指结构的蛋白质家族, 该家族中的蛋白质分子都含有特征性的氨基酸保守序列, 即 LIM 结构域 (CX₂CX_{17~19}HX₂CX₂CX_{16~20}CX₂C/H/D). 目前发现的 LIM 蛋白已有 60 多种, 它们参与多种基因的转录调控和细胞的发育与分化过程^[1].

近年, 我们用三元递减法从人胎心 cDNA 文库中筛选克隆到一个与心脏生长发育有关的新基因, 因其编码产物与 LIM 蛋白家族高度同源且氨基酸序列中含有典型的 LIM 结构域, 故将其定名为 hhlim^[2]. 为了探讨 hhlim 基因的表达调控机制, 我们将该基因 5' 侧翼区 (长约 2 550bp) 不同长度的片段与报告基因重组后, 转染小鼠成肌细胞 C2C12, 确定其表达调控区域, 并在此基础上, 观察内皮素-1 (ET-1) 和碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 对该基因表达的影响.

1 材料和方法

1.1 材料

脂质体 ESCORT™ IV 为 Sigma 公司产品, 荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司, DMEM 培养基为 Gibco 公司产品, Taqman Gold RT-PCR 和 SYBRGreen 试剂盒为 PE 公司产品, ET-1 和 bFGF 购自北京邦定生物医学公司. PCR 引物由上海生物工程技术有限公司合成. pGL3-Basic 质粒和小鼠成肌细胞 C2C12 为北京大学医学部生物化学与分子生

物学系保存.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 在含 10% 新生小牛血清的 DMEM 中培养的 C2C12 为未分化型细胞 (MB). C2C12 细胞生长至 70% ~ 80% 融合时, 换成含 2% 马血清的 DMEM 培养液, 继续培养至细胞融合后, 作为分化型细胞 (MT).

1.2.2 重组质粒的构建: 以陈光慧教授克隆的 hhlim 基因 5' 侧翼区 DNA 片段 (- 2 537 ~ + 16 bp) 为模板, 应用 PCR 方法扩增、分离其 5' 侧翼区不同长度的片段. 5' 端系列缺失的片段是通过位于 2 553 bp 片段中 - 2 537, - 2 037, - 1 537, - 1 037, - 537, - 468, - 347, - 253 和 - 157 序列为正义链引物而实现的, 反义链引物与扩增 - 2 537 ~ + 16 bp 片段的引物相一致. 在正义链引物和反义链引物的 5' 端分别附加有 KpnI 和 HindIII 酶切位点 (图 1). 扩增产物分别为 2 553 bp、2 053 bp、1 553 bp、1 053 bp、553 bp、484 bp、363 bp、269 bp 和 173 bp. 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离、纯化及 KpnI 和 HindIII 酶切后, 分别克隆

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) 基金资助 (G2000056905 Z).

** 通讯联系人. 河北医科大学基础医学研究所生物化学与分子生物学研究室.

Tel: 0311-6265563, E-mail: wjk@hebmu.edu.cn

收稿日期: 2002-04-02, 接受日期: 2002-05-10

到 pGL3-Basic 质粒的 *Kpn* I 和 *Hind* III 位点. 通过酶切分析获得插入 *hhlim* 基因 5' 侧翼区不同长度片段的重组表达质粒 (pF1~ 9).

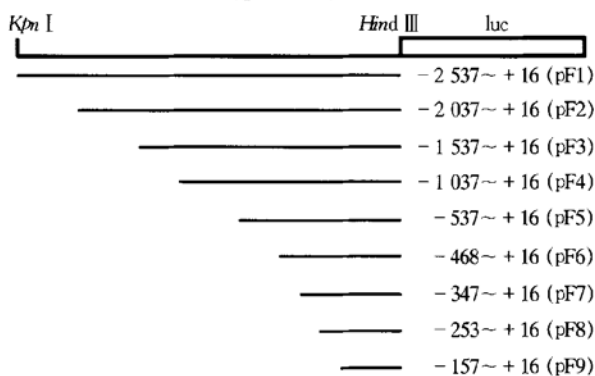


Fig 1 Fragments of *hhlim* 5' flanking sequence extending from + 16 (*Hind*III) to - 2 537 (*Kpn*I), - 2 037 (*Kpn*I), - 1 537 (*Kpn*I), - 1 037 (*Kpn*I), - 537 (*Kpn*I), - 468 (*Kpn*I), - 347 (*Kpn*I), - 253 (*Kpn*I), or - 157 (*Kpn*I) were cloned upstream to the vector pGL3-Basic

1.2.3 细胞转染和荧光素酶活性分析: 在含 10% 新生小牛血清的 DMEM 中培养的 C2C12 细胞生长至 60% 融合后, 用脂质体介导法, 将上述构建的 9 种重组质粒 (1 μ g) 分别与 1 μ g β -半乳糖苷酶表达载体 pCMV β gal 共转染 C2C12 细胞 (每种重组质粒平行转染 6 瓶细胞). 然后将细胞分为两组, 一组继续用含 10% 新生小牛血清的 DMEM 进行培养 (未分化型), 另一组换成含 2% 马血清的培养液诱导细胞分化. 48h 后收集被转染的细胞, 制备裂解液, 以 β -半乳糖苷酶活性为转染效率的内对照, 按 Promega 试剂盒说明书对荧光素酶活性进行测定, 用 SPSS 软件进行配对 *t* 检验.

另取部分细胞, 用 1 μ g pF5 和 1 μ g pCMV β gal 对其进行共转染之后, 换成含 2% 马血清的 DMEM 诱导其分化. 同时加入 ET-1 和 bFGF 分别至终浓度为 1×10^{-4} mol/L 和 4 U/ml, 继续培养 24 h 和 48 h 后收集细胞, 并按上述方法检测荧光素酶活性.

1.2.4 RNA 的提取与 RT-PCR: 用不含血清的 DMEM 对生长至 80% 融合的 C2C12 细胞进行饥饿培养 24 h 后, 换成含 2% 马血清的 DMEM 并加入 ET-1 和 bFGF 分别至终浓度为 1×10^{-4} mol/L 和 4 U/ml. 继续培养 6, 12, 24, 48, 72 h 后, 按异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法^[3]从被 ET-1 和 bFGF 刺

激不同时间的细胞中提取 RNA. 按照 Taqman Gold RT-PCR 试剂盒说明进行反转录后, 用根据 *hhlim* cDNA 序列设计的引物 (上、下游引物分别为 5'-GCTGTCTCAGCACAGACA-3' 和 5'-CAG-AGATGGCACAGCGGA-3') 进行荧光定量 PCR. 根据荧光强度读出 C_t 值, 并计算各时间点细胞中 *hhlim* mRNA 的模板数.

1.2.5 凝胶阻滞分析: 按文献 [4] 报道的方法从分化型和未分化型 C2C12 细胞中提取核蛋白. 各取 10 μ g 按前文方法^[5,6]与末端标记的 *hhlim* 基因 5' 侧翼区 - 293~ + 16 bp 片段进行结合反应, 以 100 倍过量的非标记探针作为特异性竞争结合对照. DNA-核蛋白复合物经 4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分离后, - 70 $^{\circ}$ C 放射自显影显现电泳区带的迁移变化.

2 结 果

2.1 *hhlim* 基因 5' 侧翼区对报告基因表达的影响

用 9 种表达质粒分别转染被马血清诱导或不诱导的 C2C12 细胞, 经 β -半乳糖苷酶活性校正转染效率后, 发现该基因 5' 上游 9 种不同长度的 DNA 片段均可驱动荧光素酶表达 (图 2 和表 1). 在 9 种片段中, 以转录起始点至 5' 上游 - 253 bp (pF8) 驱动荧光素酶基因表达的活性最高, 比 - 2 537 bp (pF1) 高 9.9 倍, 比 - 157 bp (pF9) 高 2.95 倍. 除 - 2 037 bp (pF2) 片段的活性与 - 157 bp (pF9) 相近外, 其他片段均有较高的活性. 两种表型细胞相比, 除 pF2 和 pF8 之外, 其他片段驱动荧光素酶表达的活性在分化型细胞均较未分化细胞有增高趋势.

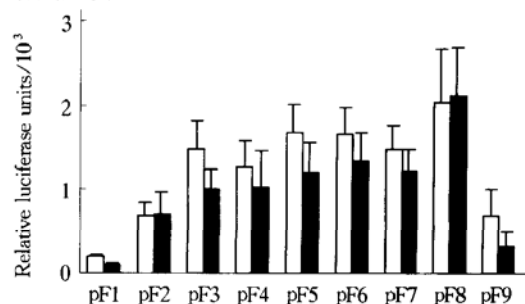


Fig. 2 Luciferase activities in transfected C2C12 cells with different recombinant plasmids
□: MT; ■: MB.

Table 1 Luciferase activities in transfected C2C12 cells with different recombinant plasmids

	pF1		pF2		pF3		pF4		pF5	
	MT	MB	MT	MB	MT	MB	MT	MB	MT	MB
sample 1	0.220	0.110	0.512	0.882	1.612	1.013	1.032	1.202	2.147	0.782
sample 2	0.176	0.076	0.782	0.936	1.127	1.236	1.673	0.687	1.528	1.008
sample 3	0.210	0.120	0.797	0.687	1.832	0.835	1.024	0.934	1.531	1.533
sample 4	0.180	0.080	0.692	0.532	1.204	0.698	1.432	1.336	1.896	1.185
sample 5	0.212	0.140	0.433	0.768	1.375	1.102	0.876	0.454	2.009	0.878
sample 6	0.240	0.090	0.896	0.486	1.864	1.483	1.546	1.459	1.376	1.755
means	0.2063	0.1027	0.6853	0.7152	1.5023	1.0612	1.2638	1.0120	1.7478	1.1902
SD	0.0244	0.0250	0.1789	0.1823	0.3155	0.2813	0.3277	0.3909	0.3108	0.3831

	pF6		pF7		pF8		pF9	
	MT	MB	MT	MB	MT	MB	MT	MB
sample 1	1.832	1.842	1.878	1.481	2.317	2.867	0.773	0.161
sample 2	1.935	1.013	1.587	1.010	2.732	2.48	0.785	0.528
sample 3	1.621	0.983	1.207	1.360	1.869	2.767	0.312	0.384
sample 4	1.329	1.538	1.132	0.920	1.001	1.932	0.423	0.244
sample 5	1.387	1.137	1.633	1.224	2.132	1.523	0.912	0.286
means	1.6208	1.3026	1.4874	1.199	2.0102	2.3138	0.641	0.3206
SD	0.2661	0.3099	0.2543	0.1872	0.4602	0.4690	0.2188	0.1083

2.2 ET-1 和 bFGF 对 hhlml 调控区的激活作用

用在分化型 C2C12 中表达活性较高的 pF5 转染 C2C12 细胞, 在用马血清诱导被转染细胞进行分化的同时, 加入对心肌细胞生长和发育起重要调节作用的 ET-1 和 bFGF, 观察两种因素对报告基因表达的影响. 如图 3 所示: 荧光素酶活性在被

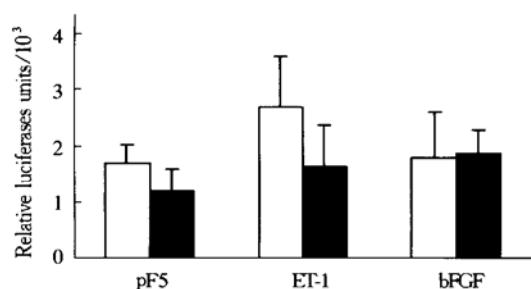


Fig. 3 Luciferase activities in transfected C2C12 (MT) cells with pF5 following stimulation by ET-1 and bFGF for different time

□: 24 h; ■: 48 h.

ET-1 刺激的细胞中显著升高 (达未刺激细胞的 1.6 倍), 至 48 h, 其活性仍高于对照细胞; bFGF 虽然也能促进荧光素酶表达, 但荧光素酶活性升高的幅度在 24 h 低于被 ET-1 刺激的细胞, 在 48 h,

略高于被 ET-1 刺激的活性。

2.3 ET-1 和 bFGF 对 hhlml 表达的影响

图 4 是 ET-1 和 bFGF 刺激分化型 C2C12 细胞不同时间后, hhlml 基因表达活性的变化. 从图 4 可见, 处于分化过程中的 C2C12 细胞被 ET-1 和 bFGF 刺激后, hhlml 表达活性分别于 12 h 和 6 h 开始升高, 24 h 和 48 h 达到高峰, 在该时间点,

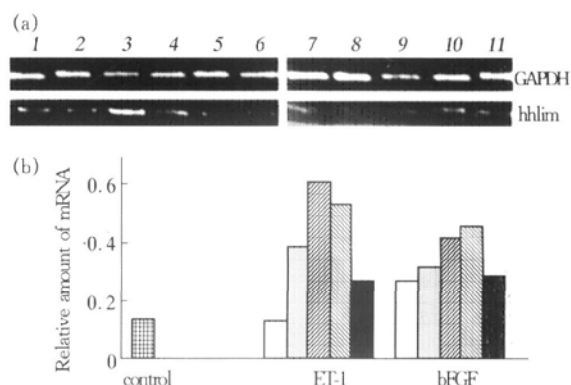


Fig. 4 hhlml mRNA expression in C2C12 cells (MT) treated by ET-1 and bFGF for different time

(a) RT-PCR product. 1~5: C2C12(MT) cells treated by ET-1 for respectively 72, 48, 24, 12 and 6 h; 6: control; 7~11: C2C12(MT) cells treated by bFGF respectively for 6, 12, 24, 48 and 72 h. (b) relative amount of mRNA. □: 6 h; □: 12 h; ▨: 24 h; ▩: 48 h; ■: 72 h.

其表达活性分别比对照细胞高出 4.5 倍和 3.38 倍。

2.4 hhlml 调控区与 C2C12 细胞核蛋白的相互作用

电泳迁移率改变分析 EMSA 表明, 从分化型和未分化型 C2C12 细胞中提取的核蛋白都可与 hhlml 基因上游 -293~+16 bp 片段相结合, 在 4% PAGE 上出现迁移率变慢的 DNA-蛋白质复合物区带。从图 5 可见, 来自未分化型细胞的核蛋白出现一条滞后带, 而分化型细胞为两条滞后带。以 100 倍过量未标记的相同片段作为竞争物加入反应体系时, 可消除滞后带, 提示两类细胞的核蛋白中均含有与 -293~+16 bp 片段特异性结合的蛋白质因子, 但蛋白质因子的种类和 (/ 或) 与顺式元件的相互作用方式可能不同。

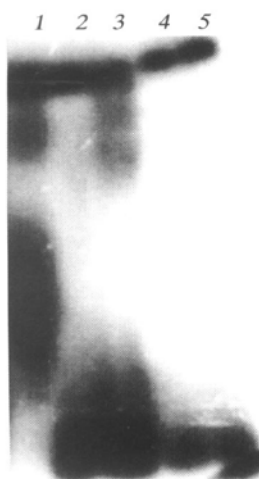


Fig. 5 EMSA using nuclear protein from C2C12 (MB) / (MT) and hhlml gene promoter region (-293~+16 bp)

1, 3: probe binding to C2C12 (MB) / (MT) nuclear extracts;
2, 4: probe protein binding competed by -293/16 bp fragment;
5: the free probe.

3 讨 论

为了研究 hhlml 基因的表达调控机制, 我们克隆了该基因 5' 上游 2 537 bp 的调控序列, 对其从 5' 端进行系列缺失及与荧光素酶报告基因重组后, 分别转染未分化型和被马血清诱导分化的 C2C12 细胞。荧光素酶活性分析结果表明, 本文所检测的 hhlml 基因 5' 上游各种不同长度的片段均可驱动报告基因表达。在 9 种片段中, 以 -2537~+16 bp (最长片段) 驱动荧光素酶表达的活性最低。从 5' 端缺失 500 bp 后, 荧光素酶活性升高 3 倍, 在此基础上, 再从其 5' 端删除 500 bp (-1 537~+16 bp) 后, 其驱动报告基因表达的活性进一步

升高, 分别比 pF1 升高 6 倍, 比 pF2 升高 1 倍。由此提示, -2 537~-1 537 bp 的序列中存在抑制 hhlml 基因转录的调控元件 (沉默子)。在 9 种不同长度的片段中, 以 -253~+16 bp 指导报告基因表达的活性最高, 从其 5' 端删除 96 bp 后, 荧光素酶活性骤减为 -253~+16 bp 的 1/3, 表明在这 96 bp 的序列中存在增强子样调控元件。计算机检索表明, -253~-157 bp 的序列中存在 3 个 NKx2.5 和 1 个 GATA 结合位点。以往研究已经证实, 与这两种位点相互作用的转录调控因子和心肌的发育与分化密切相关。除 -2 037~+16 bp (pF2) 和 -253~+16 bp (pF8) 外, 其他片段在分化型细胞中驱动荧光素酶表达的活性均较未分化细胞有增高趋势。用从两种表型细胞提取的核蛋白与含有 -253~-157 bp 的 DNA 片段进行 EMSA 分析的结果显示, 两种细胞所形成 DNA-核蛋白复合物区带的谱型明显不同, 这可能是相同片段在不同表型细胞中驱动报告基因表达活性不同的原因。

目前对 hhlml 的功能还不十分清楚。有研究发现将其导入原代培养的心肌细胞可加快心肌生长速度; 此外, 在自发性高血压大鼠和心肌肥厚大鼠的心肌细胞中该基因表达增高。这些都提示该基因可能参与心肌肥厚的发生过程^[2]。已经证明, bFGF 和 ET-1 在心肌的生长和发育中起着重要的调节作用, 二者均能引起心肌细胞肥大, 并限制核周区域肌原纤维的生长^[7,8]。但这些因子是否通过影响 hhlml 基因的表达而加速心肌肥大尚未见报道。本文结果表明, ET-1 和 bFGF 作用于被 pF5 转染的细胞后能显著诱导 hhlml 基因转录调控区所驱动的报告基因表达; 同时发现, 这两种因素作用于被马血清诱导的 C2C12 细胞后, hhlml 基因的表达出现类似的变化趋势。由此说明, hhlml 基因表达受 ET-1 和 bFGF 的调节。该基因所含有的各种顺式作用元件与转录因子相互作用的多样性和复杂性目前正在进一步研究之中。

参 考 文 献

- 1 Bach I. The LIM domain: regulation by association. *Mech Dev*, 2000, **91** (1~2): 5~17
- 2 陈光慧, 周子振, 张继峰, 等. 应用三元递减法筛选特异性心脏生长相关基因. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, **16** (3): 295~300
Chen G H, Zhou Z Z, Zhang J F, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 2000, **16** (3): 295~300
- 3 Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162** (1): 156~159

- 4 Bae S C, Lee K S, Zhang Y W, *et al.* Intimate relationship between TGF-beta/BMP signaling and runt domain transcription factor, PEBP2/CBF. *J Bone Joint Surg Am*, 2001, 83-A (Suppl 1): S48~ 55
- 5 Wen J K, Han M, Zheng B, *et al.* Comparison of gene expression patterns and migration capability at quiescent and proliferating vascular smooth muscle cells stimulated by cytokines. *Life sciences*, 2002, 70 (7) : 799~ 807
- 6 韩 梅, 温进坤. 外源 E2F 和 CArG 顺式作用元件对血管平滑肌细胞表型相关基因表达的影响. *中国生物化学与分子生物学报*, 2001, 17 (5): 626~ 630
- Han M, Wen J K. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2001, 17 (5): 626 ~ 630
- 7 Hasegawa T, Kimura A, Miyatake M, *et al.* Basic fibroblast growth factor increases regional myocardial blood flow and salvages myocardium in the infarct border zone in a rabbit model of acute myocardial infarction. *Angiology*, 1999, 50 (6): 487~ 495
- 8 Mebazaa A, de Keulenaer G W, Paqueron X, *et al.* Activation of cardiac endothelium as a compensatory component in endotoxin-induced cardiomyopathy: role of endothelin, prostaglandins, and nitric oxide. *Circulation*, 2001, 104 (25): 3137~ 3144

Identification of hhlmi Gene Regulatory Region and Study of hhlmi Gene Expression Regulation*

ZHENG Bin¹⁾, WEN Jin-Kun^{1)**}, HAN Mei¹⁾, ZHOU Ai-Ru²⁾

(¹⁾Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;

²⁾Department of Biochemistry and Molecular Biology, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China)

Abstract In order to study the mechanism of hhlmi gene transcriptional regulation, a series of deleted fragments of 5' flanking region extending from + 16 to - 2 537 bp were subcloned into the pGL3-Basic vector respectively to identify the specific functional regions by detecting the luciferase activities. The results indicated that there was a silencer in the distal region of - 2 537~ - 1 537 bp and an enhancer in proximal fragment of - 253~ - 157 bp, respectively. Electrophoretic mobility shift assay showed that the patterns of shifted bands were different between the nuclear protein from differentiated C2C12 myotubes and undifferentiated C2C12 myoblasts when they bound to the region including the region of - 253~ - 157 bp of hhlmi gene. In addition, the results also showed that ET-1 and bFGF could not only significantly induce the hhlmi gene expression in C2C12 cells but also activate the luciferase gene transcription promoted by - 253~ - 157 bp regulatory region. It was suggested that hhlmi gene was regulated by ET-1 and bFGF.

Key words hhlmi gene, regulatory elements, gene regulation, C2C12 cell

* This work was supported by a grant from The Special Funds for Major State Basic Research of China (G2000056905-Z).

** Corresponding author. Tel: 86-311-6265563, E-mail: wjk@hebmu.edu.cn

Received: April 2, 2002 Accepted: May 10, 2002