

# JAB1 与糖皮质激素受体的相互作用 及其转录活性的影响\*

李淑蓉\*\* 粟永萍\*\*\* 刘云杰 刘晓宏 楼淑芬 程天民

(第三军医大学全军复合伤研究所, 重庆 400038)

**摘要** 应用酵母双杂交方法筛选到与糖皮质激素受体 (GR) 结合的蛋白 JAB1, 进一步验证 JAB1 与 GR 的结合作用并证明其对 GR 的影响. 构建与 Gal4-BD 融合表达的载体 pGBKT7-GR LBD, 与构建于 pACT2 载体上的人骨髓 cDNA 文库杂交, 在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 选择培养板上培养, 经 X- $\alpha$ -gal 检测, 阳性克隆片段插入 pGEM<sup>®</sup>-T Vector 载体, 测序, 再经酵母双杂交和 GST pull down 蛋白质结合实验验证其结合作用, 应用反映 GR 转录活性的 CAT 报告基因检测 JAB1 对 GR 的调节活性. 结果在人骨髓 cDNA 文库中, 筛选到 42 个 X- $\alpha$ -gal 检测变蓝且含有 pACT2 质粒序列的克隆, 其中有 5 个克隆的序列皆为 Jun 活性区结合蛋白 JAB1 的一部分. 酵母双杂交和蛋白质结合实验表明, JAB1 与 COS7 真核表达的 GR-LBD 在体外有结合作用. JAB1 加强 GR 转录激活的能力.

**关键词** 糖皮质激素受体, JAB1, 转录因子, 酵母双杂交系统

**学科分类号** Q5, R33

已有研究表明, 各种原因所致的应激, 包括生理的和病理的 (烫伤、失血、休克等), 在大鼠、狗和人都引起糖皮质激素受体 (GR) 结合量的减少, 其减少的程度与病情的严重程度平行. 目前已明确烫伤早期 GR 减少及其重要意义, 尤其是 GR 核转位减少, 提示 GR 的转录激活能力减弱<sup>[1-3]</sup>. GR 为核受体超家族的成员之一, 近年来发现, 核受体除了直接与转录起始复合物中的转录因子作用外, 还通过与一类桥梁分子即核受体调节蛋白的相互作用而实现它对靶基因转录的调节. 为了寻找参与 GR 功能活性的重要蛋白质, 我们以人糖皮质激素受体配体结合区 (GR-ligand binding domain, GR-LBD) 为诱饵, 采用酵母双杂交方法从人骨髓 cDNA 文库筛选到 Jun 活性区结合蛋白 JAB1 (Jun activation domain binding protein 1). 本文克隆了 JAB1 cDNA 部分片段, 利用酵母双杂交和蛋白质结合实验进一步验证 JAB1 与 GR 的相互作用, JAB1 对 GR 转录活性的影响, 为进一步阐明 GR 作用的分子机制提供线索.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

酵母双杂交系统 (yeast two-hybrid system 3) 及人骨髓 cDNA 文库购自 Clontech. pGEX-4T-1 载体、GST 融合表达蛋白纯化系统 (Bulk and Redpack GST Purification Modules, MicroSpin GST Purification Module)、Anti-GST Antibody 购自 Amersham

Pharmacia 公司. pCMV-Myc 和 pCMV-HA 载体由周度金教授赠送. pMAM-CAT 由 Renoir 博士惠赠, pCMV-hGR $\alpha$  由 Oakley 博士赠送. 细胞转染试剂、CAT-ELISA 购自 Roche 公司. IPTG, Aprotinin 及 PMSF 购自 Sigma 公司, M-PER mammalian rotein extraction reagent 购自 PIERCE 公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 酵母双杂交系统及人骨髓 cDNA 文库的筛选:** 根据 GenBank GR-LBD 序列设计引物, 构建与 Gal4-BD 融合表达载体 pGBKT7-GR LBD, 转化酵母感受态 AH109, 作为酵母双杂交系统中的“诱饵”. 挑取新鲜的 AH109 [pGBKT7-GR LBD] 克隆于 50 ml SD/-Trp, 30 $^{\circ}$ C 过夜, 离心收集细胞, 浓度大于  $1 \times 10^9$ /ml, 与构建于 pACT2 载体上的人骨髓 cDNA 文库 DNA 于 2 L 烧瓶中混合, 加 45 ml  $2 \times$  YPDA/kan, 30 $^{\circ}$ C 过夜低速振荡 (30 ~ 50 r/min), 收集杂交液并铺于 50 个 150 mm 的 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 选择培养板上 (培养基中加 50  $\mu$ mol/L 地塞米松 Dex 或不加两种情况), 另取少量杂交液稀释后涂布于 SD/-Leu、SD/-Trp 和 SD/-Leu/-Trp 培养板, 用以计算筛

\* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G1999054201).

\*\* 第三军医大学基础部神经生物教研室, 重庆 400038.

\*\*\* 通讯联系人.

Tel: 023-68752009, E-mail: suyiping@yahoo.com

收稿日期: 2003-06-16, 接受日期: 2003-07-29

选的克隆数和共转化效率. 30℃培养8~21天. 挑取直径大于2 mm的菌落再在SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-gal (加Dex)选择培养基上进行第二次筛选, X-α-gal检测α-半乳糖苷酶(α-gal)活性, 即MEL基因表达, 显示蓝斑者为阳性克隆.

**1.2.2 酵母质粒的抽提与再扩增及核酸序列分析:** 用酚、氯仿、异戊醇和溶菌酶提取阳性克隆质粒, 根据文库质粒pACT2多克隆位点两侧序列设计引物5' CTATTCgATgAAgATACCCCACCAAACCC 3'和5' gTgAACTTgCggggTTTTTCAGTATCTACgAT 3', PCR扩增插入片段. 电泳回收插入片段并装入pGEM®-T Vector载体, 送大连宝生物公司测序. 测序结果提交GenBank数据库进行同源性比较. 同时阳性克隆质粒电转化入大肠杆菌DH5α, 铺于Amp<sup>+</sup> LB培养板, 筛选仅含文库质粒的转化菌.

**1.2.3 酵母双杂交检测(蛋白质相互作用):** pGBKT7-GR LBD和pACT2-JAB1共转化酵母AH109, 长出的菌落转入相互作用培养基SD/-Leu/-Trp/-His(加和不加Dex两种情况), 同时以试剂盒中所带菌株作阴性和阳性对照, O-硝基苯基β-D-吡喃半乳糖(ONPG)法检测β-gal活性.

**1.2.4 质粒构建:** 把PCR扩增的JAB1 cDNA以酶切位点EcoR I和Xho I插入pACT2, 形成pACT2-JAB1, 与pGBKT7-GR LBD用于酵母双杂交. 把GR LBD cDNA(893 bp)以上游引物5' CTCgAgTggAATgAACCTggAAgCTCgAA 3'(Xho I)和下游引物5' gCggCCgCACTTTTgATgAAAC-AgAAgTT 3'(Not I)从胎肝cDNA文库中PCR扩增GR LBD, 以酶切位点Xho I和Not I插入pCMV-Myc载体, 形成pCMV-Myc-GR LBD, 用于真核表达. 用JAB1上游引物5' gAATTCATggACC-AAgTCTAgTC 3'(EcoR I)和下游引物5' CTCgAgTTTCCCTgCggATATTgTT(Xho I)PCR扩增JAB1 cDNA部分片段, 克隆到pGEX-4T-1, 形成pGEX-4T-1-JAB1, 用于原核表达; 将JAB1 cDNA片段克隆到pCMV-HA, 形成pCMV-HA-JAB1, 用于真核表达.

**1.2.5 转染、蛋白质提取及氯霉素酰基转移酶(CAT)检测:** 用2 μg pCMV-Myc-GR LBD质粒与8 μl Dospers转染COS7细胞, pCMV-HA-JAB1、pCMV-GRα与含GRE的pMAM-CAT共转染COS7细胞. 48 h后用M-PER蛋白裂解液裂解细胞, 离心收集细胞总蛋白. ELISA试剂盒检测CAT活性.

**1.2.6 GST-JAB1融合表达及纯化:** 把pGEX-4T-1-

JAB1转化表达菌株BL21, 用0.1 mmol/L IPTG诱导7.5 h, 收集菌体, 超声破碎, 收集包涵体. 用8 mol/L尿素溶解包涵体(GST-JAB1融合蛋白), 再用PBS透析复性. 把经复性的GST-JAB1融合蛋白上样于Bulk and Redpack GST Purification纯化柱, 洗去未结合的杂蛋白, 再用还原性的谷胱甘肽从柱上切下GST-JAB1融合蛋白. 把切下的GST-JAB1融合蛋白用PBS透析, 去除还原性的谷胱甘肽. 对照表达的GST是可溶性蛋白, 存在于菌体超声上清中, 超声上清直接上柱纯化.

**1.2.7 蛋白质结合实验:** 在50 μl谷胱甘肽-Sepharose 4B中加入100 μg GST-JAB1或GST, 洗去未结合的蛋白, 再向柱中加入1 mg转染的pCMV-Myc-GR LBD COS7细胞总蛋白, 洗去未结合的杂蛋白, 用还原性的谷胱甘肽从柱上洗下GST-JAB1/Myc-GR LBD复合物. 洗下的复合物同时做SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和蛋白质免疫印迹.

**1.2.8 蛋白质免疫印迹:** 蛋白质样品经SDS-PAGE, 电转印到PVDF膜上, 封闭过夜, 一抗和二抗分别以1:1 000稀释, DAB显色.

## 2 结 果

### 2.1 GR LBD筛选人骨髓cDNA文库

测序结果表明, 构建的pGBKT7-GR LBD序列完全正确, 融合区域的读码框正确. pGBKT7-GR LBD转化感受态AH109, 在SD/-Trp板上生长良好, 而不能在SD/-His-Trp板上生长, AH109[pGBKT7-GR LBD]转化成功但并未自主激活报告基因.

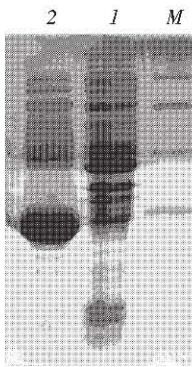
用GR-LBD作为诱饵蛋白筛选人骨髓cDNA文库, 分两次进行, 第一次在所有培养基中加入Dex, 第二次不加. 两次筛选到65个His和Ade阳性克隆, 经α-gal检测获得45个强阳性克隆, 即为His、Ade、Mel三阳性克隆, 经提取质粒、PCR扩增文库插入片段, 共获得42个含pACT2的克隆. 测序结果表明, 其中5个克隆皆为COP9 subunit 5/JAB1 cDNA的部分序列(185~730 bp, 编码第18位至199位氨基酸). 与GenBank号XM\_034280.1完全同源, 由此, 我们利用酵母双杂交系统从人骨髓cDNA文库中筛选到能与GR-LBD有结合作用的蛋白JAB1, 其开放阅读框(ORF)为181个氨基酸.

## 2.2 GR-LBD 与 JAB1 在酵母双杂交系统中的相互作用

把 JAB1 片段克隆到 pACT2, 与 pGBKT7-GR LBD 共转化酵母 AH109, SD/- Leu/- Trp/- His 培养基上生长,  $\beta$ -gal 活性检测结果再一次表明加 Dex 和不加 Dex 时 JAB1 与 GR LBD 都有结合作用. 但不加 Dex 时结合力较弱.

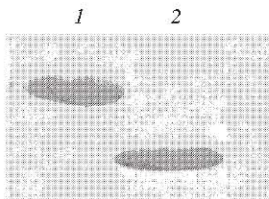
## 2.3 GST-JAB1 融合蛋白的表达与纯化

IPTG 诱导转化 pGEX-4T-1-JAB1 的大肠杆菌 BL21, 裂解菌体, SDS-PAGE 结果表明, pGEX-4T-1-JAB1 在 BL21 中表达 GST-JAB1 融合蛋白(图 1), 其分子质量约 41 ku (与蛋白质免疫印迹结果一致), 除去 GST 分子质量 (29 ku), JAB1 分子质量约为 12 ku, 与预计值基本一致 (12 ku). 表达的 GST-JAB1 以包涵体形式存在, GST 存在于超声上清中. 包涵体中的 GST-JAB1 蛋白经裂解复性后, 上柱纯化, 而 GST 蛋白 (存在于上清中) 直接上柱纯化. 纯化后的蛋白用 GST 抗体检测, 说明其表达 (图 2).



**Fig. 1 The expression of GST and GST-JAB1 protein in BL21, SDS-PAGE analysis and Coomassie brilliant blue stain**

1: GST-JAB1 fusion protein (41 ku); 2: GST protein (29 ku); M: Mid-range protein molecular mass marker.

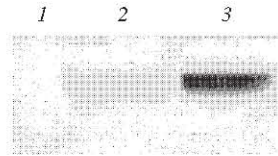


**Fig. 2 The expression of GST and GST-JAB1 protein by anti-GST antibody assay**

1: GST-JAB1 fusion protein. 2: GST protein.

## 2.4 蛋白质相互作用证明

为了进一步确证 GR-LBD 与 JAB1 蛋白在体外有结合作用, 采用蛋白质结合实验. pCMV-Myc-GR LBD COS7 细胞蛋白分别与 GST 和 GST-JAB1 经过谷胱甘肽-Sepharose 4B, 洗下复合物 GST-JAB1/Myc-GR LBD, Myc 抗体检测表明 GST-JAB1 结合 GR-LBD. 由于 GST 与 Myc-GR-LBD 没有结合作用, 因而表明 JAB1 与 GR-LBD 之间有结合作用 (图 3).

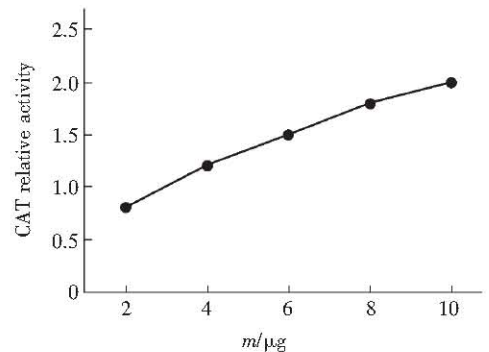


**Fig. 3 The interaction between GR LBD and JAB1 by anti-myc antibody assay in vitro**

1: Myc-GR-LBD + GST; 2: Myc-GR-LBD; 3: Myc-GR-LBD + GST-JAB1.

## 2.5 JAB1 对 GR 介导的转录活性的影响

以 pCMV-HA-JAB1、pCMV-GR $\alpha$  和含 GRE 的 pMAM-CAT 质粒共转染 COS7 细胞, 不同浓度 JAB1 显著加强 GR 介导的转录活性, 随着 JAB1 量的增加, 作用更明显 (图 4).



**Fig. 4 Effect of JAB1 on relative GR-CAT activity**

## 3 讨论

Claret 等<sup>[4]</sup>以 c-Jun 激活区为诱饵, 用酵母双杂交系统从人淋巴细胞 cDNA 文库中筛选到一种蛋白质, 因这种蛋白质与 c-Jun 激活区结合, 故命名为 c-Jun activation domain-binding protein 1 (JAB1). JAB1 是细胞内 COP9 (constitutive photomorphogenic

9) 多分子信号酶体 (signalosome) 亚单位之一<sup>[5]</sup>. 在植物和动物中, COP9 高度保守. COP9 参与调控 *Drosophila* 幼虫发育、整联蛋白信号、细胞周期及类固醇激素信号等. COP9 在细胞内如同一个十字路口, 不同的信号分子通过 COP9 选择不同的信号传导途径. 目前已发现 JAB1 与 c-Jun、p27Kip1、p53、MIF、rLHR、LFA-1、PR、SRC-1、HIF-1 $\alpha$ 、Smad4 等多种蛋白质相互作用<sup>[6,7]</sup>. JAB1 与 p27Kip1 相互作用且 JAB1 在哺乳动物细胞中的过表达引起 p27Kip1 从胞核移位到胞浆, 通过加速其降解减少 p27Kip1 在细胞中的含量<sup>[6]</sup>. 整合素 LFA-1 能通过 JAB1 激活 AP-1 驱动的转录活性. MIF 在某些炎症条件下起关键作用, MIF 抑制 JAB1 的活性<sup>[8]</sup>; JAB1 诱导 Smad4 遍在蛋白化作用并使其降解而拮抗 TGF- $\beta$  功能<sup>[9]</sup>.

JAB1 与 c-Jun 和 JunD 相互作用, 增强 c-Jun 和 JunD 蛋白与 AP-1 位点 TRE 的亲合力, 通过 c-Jun 和 JunD 有选择地增强反式激活作用, 特异性激活 AP-1 驱动的转录. JAB1 在细胞内增加转录因子 AP-1 对靶基因激活的特异性. JAB1 还可能调节 NF- $\kappa$ B 反式激活作用, 以及增强许多核受体的反式激活作用. GR 抗炎、抗免疫作用的机制之一是抑制炎症细胞因子的释放, 其作用是通过调控前炎症介质转录因子 NF- $\kappa$ B 的活性来实现的. 细胞受刺激后 NF- $\kappa$ B 活性增强, 激活炎症介质基因的转录, 使炎症介质的产生增加. GR 能抑制 NF- $\kappa$ B 的活性, 但由于 GR 和 NF- $\kappa$ B 都是核转录调控因子, 它们可能共同竞争结合某些辅活化子如 JAB1 而起互相抑制作用.

我们首先以 GR LBD 为诱饵, 用酵母双杂交系统从人骨髓 cDNA 文库中筛选到 JAB1, 体外蛋白结合实验证明 JAB1 与 GR 具有结合作用, 并应用反映 GR 转录激活能力的 GRE 报告质粒系统, 证明 JAB1 加强 GR 转录激活能力, 这一结果与 Chauchereau 等<sup>[7]</sup>的一致. 目前已证明 JAB1 是一个

信号转导分子, 但在哺乳动物内的确切功能还不清楚. JAB1 加强 AP-1、NF- $\kappa$ B、GR 等的活性, 即 JAB1 一方面加强致炎因子的活性, 另一方面又增强抗炎因子的活性, 那么它在炎症发生发展过程中起什么作用? JAB1 与致炎和抗炎因子作用的强弱及平衡可能决定了它在炎症中的地位, JAB1 与二者的相互作用关系至少说明它与炎症的发生发展密切相关. 由此推测 JAB1 可能参与了 GR 调节的重要功能, JAB1 与 GR 的相互作用与其他重要前炎症转录因子的关系及在严重创伤早期的意义有待进一步研究.

### 参 考 文 献

- 1 Liu D H, Su Y P, Cheng T M, *et al.* Changes in glucocorticoid and mineralocorticoid receptors of liver and kidney cytosols after pathological stress and its regulations in rats. *Critical Care Medicine*, 2002, **30** (3): 546 ~ 548
- 2 Liu D H, Su Y P, Zhang W, *et al.* Downregulation of glucocorticoid receptors of liver cytosols and the role of the inflammatory cytokines in pathological stress in scalded rats. *Burns*, 2002, **28** (4): 315 ~ 320
- 3 王军平, 栗永萍, 赵景宏, 等. 严重烫伤大鼠肝组织核蛋白中糖皮质激素受体表达的变化及地塞米松对其的影响. *中华创伤杂志*, 2002, **18** (4): 210 ~ 213  
Wang J P, Su Y P, Zhao J H, *et al.* *Chinese Journal of Trauma*, 2002, **18** (4): 210 ~ 213
- 4 Claret F X, Hibi M, Dhut S, *et al.* A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors. *Nature*, 1996, **383** (6599): 453 ~ 457
- 5 Wei N, Tsuge T, Serino G, *et al.* The COP9 complex is conserved between plants and mammals and is related to the 26S proteasome regulatory complex. *Curr Biol*, 1998, **8** (16): 919 ~ 922
- 6 Tomoda K, Kubota Y, Kato J. Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature*, 1999, **398** (6723): 160 ~ 165
- 7 Chauchereau A, Georgiakaki M, Perrin-Wolff M, *et al.* JAB1 interacts with the progesterone receptor and SRC-1. *J Biol Chem*, 2000, **275** (12): 8540 ~ 8548
- 8 Kleemann R, Haussler A, Geiger G, *et al.* Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature*, 2000, **408** (6809): 211 ~ 216
- 9 Wan M, Cao X, Wu Y, *et al.* Jab1 antagonizes TGF-beta signaling by inducing Smad4 degradation. *EMBO Rep*, 2002, **3** (2): 171 ~ 176

## JAB1 Interacts With GR and Enhances GR-mediated Transcription \*

LI Shu-Rong \*\*, SU Yong-Ping \*\*\*, LIU Yun-Jie, LIU Xiao-Hong, LOU Shu-Fen, CHENG Tian-Min

(*Institute of Combined Injury of PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China*)

**Abstract** A glucocorticoid receptor (GR) interacting protein JAB1 was isolated from human marrow cDNA library by two-hybrid screening in yeast using the GR ligand-binding domains (GR-LBD) as bait. To further demonstrate the interaction between GR and JAB1 and the effect of JAB1 on GR, PCR was performed to amplify GR-LBD fragments and it was cloned into the bait vector pGBKT7 to create the plasmid pGBKT7-GR LBD. The plasmid was used as bait to screen a cDNA library constructed in the pACT2 vector. Transformants were plated on SD/ - Ade/ - His/ - Leu/ - Trp. Yeast colonies were assayed for  $\alpha$ -galactosidase activity. The positive colonies were sequenced in which JAB1 cDNA fragments were cloned into the vector pGEX-4T-1 for GST pull analysis. A GRE-driven reporter gene was used for CAT activity assay. The results were as follows: 42 clones turned blue in the yeast  $\alpha$ -galactosidase assay and contained pACT2 sequence in which 5 clones corresponded to a fragment of JAB1 as shown by DNA sequencing. Yeast two-hybrid and GST pull down assay verified that JAB1 interacted with GR-LBD. GR, a GRE-driven reporter gene cotransfected with JAB1, strongly potentiated the transactivation properties of GR. The studies suggest that JAB1 interacts with GR-LBD expressed in COS7 cells *in vitro* and it potentiates the transactivation properties of GR.

**Key words** glucocorticoid receptor, JAB1, transcription factor, yeast two hybrid

---

\* This work was supported by The Special Funds for Major State Basic Research of China (G1999054201).

\*\* Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038.

\*\*\* Corresponding author. Tel: 86-23-68752009, E-mail: suyping@yahoo.com

Received: June 16, 2003 Accepted: July 29, 2003