

SP1 调控 PIWIL1 基因启动子转录活性研究

叶丽萍 顾彬彬 方从诚 朱 敏 毛鑫礼 王 超

摘要 **目的** 克隆转录因子 SP1 编码序列,构建真核表达质粒 PCDNA3.1-SP1,并研究其对 PIWIL1 基因转录活性的影响。**方法** RT-PCR 法从正常人外周血总 RNA 中钓取 SP1 基因的编码序列,插入至真核表达载体 PCNDNA3.1(+),酶切及测序鉴定重组质粒。Western blot 法分别验证重组表达载体的在 COS-7 细胞中的表达效应。分别将活性最高的 PIWIL1 基因启动子报告基因截短体(即核心启动子区域)、活性最低的 PIWIL1 基因启动子报告基因截短体,与 SP1 重组质粒共转染 COS-7 细胞,利用 Dual-Luciferase reporter assay system 测定不同启动子活性区的 PIWIL1 基因转录活性的改变,同时应用光辉霉素 A 下调 SP1 的表达来进一步验证 SP1 对 PIWIL1 活性的影响。**结果** 酶切及测序鉴定结果显示 SP1 表达质粒构建成功,Western blot 法结果表明重组 SP1 表达载体能有效表达于 COS-7 细胞,过表达 SP1 可明显提高 PIWIL1 不同活性区的启动子的活性($P < 0.05$)。**结论** 外源性 SP1 真核表达载体转染能有效表达于 COS-7 细胞,并对 PIWIL1 的转录活性起着上调的作用,提示 SP1 可能是 PIWIL1 转录活性的正调控元件之一。

关键词 转录因子 SP1 载体构建 启动子 转录调控

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.06.034

Transcription Factor Sp1 Regulates the Promoter Activity of PIWIL1 Gene. Ye Liping, Gu Binbin, Fang Congcheng, et al. Department of Gastroenterology, Taizhou Hospital, The Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 317000, China

Abstract **Objective** To construct the eukaryotic expression vector of PCDNA3.1-sp1 and investigate the effects of SP1 on PIWIL1 transcriptional activity. **Methods** Using the the total RNA of lymphocyte of healthy human peripheral blood as template, the human SP1 CDNA was amplified by RT-PCR and inserted into the eukaryotic expression vector PCDNA3.1+. The recombinant plasmid was identified by sequencing and restriction endonuclease digestion. Western blot confirmed the the expression plasmid PCDNA3.1-SP1 can increase protein level. PCDNA3.1-SP1 was co-transfected into COS-7 cells with the highest activity of PIWIL1 gene promoter and the lowest activity of PIWIL1 gene promoter reporter respectively. The transactivity of PIWIL1 promoter was assayed by luminometer. These results were proven by blocking SP1 using Mithramycin A. **Results** The recombinant plasmid was confirmed by sequencing and restriction, endonuclease digestion, Western blot. Over expression of SP1 can improve the activity of PIWIL1 promoter. **Conclusion** The eukaryotic expression plasmid of PCDNA3.1-SP1 has been successfully constructed, and SP1 can increase PIWIL1 transcription activity.

Key words Transcription factor SP1; Construct expression vector; Promoter; Transcriptional regulation

PIWIL1 为 AGO 蛋白家族中 PIWI 亚族成员之一,可以与一类新的低分子非编码 RNA-piRNA 相互结合,参与哺乳动物的精子发育、干细胞的维持和自我更新、基因沉默等过程^[1,2]。作为一种肿瘤发生、发展可能相关的基因,已有研究发现 PIWIL1 的异常表达与胃癌、食管癌、精原细胞瘤、胰腺癌等肿瘤的发生及预后相关。在胃癌研究中发现 PIWIL1 蛋白显著高于胃炎症黏膜组织,且随着胃癌分期的进展,PIWIL1 蛋白表达逐渐升高^[3-7]。但是关于 PIWIL1 的表达调控机制尚未明确,阐明其表达调控机制对于进一步分析其功能具有重要意义,因此,本研

究在前期筛选 PIWIL1 核心启动子的研究基础上,通过对转录因子结合位点进行生物信息学分析,发现 PIWIL1 启动子系列截短体上存在多个 SP1 转录因子结合位点。因此,构建了转录因子 SP1 的表达质粒,以 COS-7 细胞为模型,采用共转染的方法,初步探讨 SP1 对 PIWIL1 基因的转录活化作用,为 PIWIL1 在胃癌中的发生、发展机制研究提供基础。

材料与方法

1. 材料:克隆载体 pGEM-T Easy vector、荧光素酶报告基因载体 pGL3-Basic、内参照质粒 PRL-TK vector、Dual-Luciferase Reporter Assay System 购自 Promega 公司;限制性内切酶 Hind III、EcoR I 购自 NEB 公司;血液 DNA 提取试剂盒、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、离心柱质粒小量制备试剂盒、PCR

产物纯化试剂盒、Gen Clean 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司;SP1 抗体购自 Epitomics 公司;Endo-free plasmid mini kit 试剂盒购自 Omega 公司;Attractene transfection Reagent 购自 Qiagen 公司;光辉霉素 A (mithramycin A) 购自 Sigma 公司;DMEM 培养基、胎牛血清购自 Thermo 公司。截短的 PIWIL1 启动子报告基因、COS7 细胞、PCDNA3.1(+)载体、感受态细胞 DH5 α 为笔者医院公共实验室保存

2. PIWIL1 核心启动子区域鉴定:本实验组成员首先构建了含有 PIWIL1 基因的启动子 1.2kb 长序列的荧光素酶报告载体,通过截短启动子报告基因和瞬时转染方法检测萤火虫荧光素酶强度的方法来筛选 PIWIL1 基因启动子核心区域。结果发现,PGL3-Basic-PIWIL1(-264/-23)截短体活性最高,即为核心启动子区域,而 PGL3-Basic-PIWIL1(-561/-23)截短体活性最低。

3. 利用生物信息学分析核心启动子转录因子结合位点预测:运用 gene-regulation 转录因子预测网站预测启动子-264~-23 区域的转录因子结合位点的情况。

4. 构建人 Sp1 基因真核表达载体:(1)根据 GenBank 所公布的人 SP1 基因序列(序列号:NC_000012.11)设计引物,引物有上海捷瑞生物工程有限公司合成,序列如下:上游:5'-CCCAAGCTTACCATGAGCGACCAAGATCACTCCAT-3'(Hind III);下游:5'-CCGGAATTCTCAGAAGCCATTGCCACTGATAT-3'(EcoR I)。(2)以正常人外周血的总 RNA 为模板,用 RT-PCR 技术钓取 SP1 编码序列,淋巴细胞分离及总 RNA 提取:取正常人新鲜血液 5ml,用 PBS 按 1:1 稀释,然后按 1:1 加入淋巴细胞分离液(动作轻柔),室温下,2500r/min,30min,加减速速度为 3。吸取单个核细胞层悬液至一新离心管,按 1:1 比例加入 PBS 洗涤并离心 1 次(室温 1000r/min,7min),弃上清,沉淀中加入 5ml NH₄Cl 溶液破红,吹打混匀(5min 及 10min 时各混匀 1 次),15min 时加入等量 PBS 混匀终止破红,1500r/min 室温离心 7min。用 PBS 洗涤离心 3 次,第 3 次时移入 1.5ml 离心管,弃上清时留少许 PBS 于管底,用枪头吹打混匀。加 1ml Trizol 试剂,混匀,室温静置 5min。加氯仿 200 μ l,颠倒混匀,室温静置 3min。4℃ 12000r/min 离心 15min。转移上层水相至一新 1.5ml 离心管,加入 0.5ml 异丙醇,轻轻混匀,室温静置 10min。4℃ 12000r/min 离心

15min。去上清观察有无沉淀;加入 70% 乙醇 1ml,-20℃ 过夜。4℃ 12000r/min 离心 15min,弃上清,风干,加入 20 μ l DEPC 水溶解,测定 RNA 浓度。以 RNA 为模板,根据反转录试剂盒,调取全长 cDNA,以此为模板进行目的基因片段 PCR 扩增。PCR 反应体系按 Taq DNA 聚合酶说明书进行,反应条件为:预变性 95℃ 2min 变性 95℃,50s;退火 68 到 60℃(每 2 个循环降退火温度 2℃),58℃ 退火温度下做 26 个循环;延伸 72℃ 2min。将 PCR 产物进行 1% 凝胶电泳,在大约 2300bp 扩增出特异性条带,条带位置大小与前期设计的相对分子质量大小(2357bp)一致,回收 PCR 产物。取 7 μ l 回收产物加入 1 μ l pGEM-T Easy vector,4℃ 连接过夜,转化感受态 DH5 α ,涂 LB 板培养 16~24h,挑取单个菌落,扩增,测序鉴定。(3)SP1 表达载体构建及验证:取测序正确的 pGEM-SP1 进行 Hind III、EcoR I 37℃ 双酶切 16h,同时 PCDNA3.1(+)载体也行 Hind III、EcoR I 37℃ 双酶切 16h,暴露相同的酶切位点,琼脂糖凝胶电泳,回收目的片段跟线性载体,T4 DNA 连接酶按 DNA 片段:载体=1:3 比例 4℃ 连接 16h,转化 DH-5 α 感受态,LB 培养 1h 后,接种至含有 Amp+抗性的 LB 平板上,次日挑取阳性克隆进行扩增,PCR 鉴定正确后进行摇菌、质粒提取,重组质粒进行酶切鉴定后再送至测序公司测序验证。

5. Western blot 法鉴定过表达载体 PCDNA3.1-SP1:为了验证重组质粒的表达效应,将过表达载体 PCDNA3.1-SP1 转染入 COS-7 细胞,培养 48h 后收取细胞,加入 RIPA 裂解液 200 μ l,冰上裂解 1h 后,4℃ 12000r/min,离心 30 min,收集上清,进行 BCA 蛋白定量后取 20 μ l 加入 5 $\times$ loading buffer 后煮沸,将蛋白样品进行 10% SDS-PAGE 电泳后,在半干转膜装置内 15V、75min 转移至 PVDF 膜上,再用 5% 的脱脂奶粉 PBST 室温封闭 2h。然后分别加入相应的抗体:兔抗 Sp1 的多克隆抗体(1:1000)以及兔抗 GAPDH 的多克隆抗体(1:1000),4℃ 孵育过夜。用 PBST 洗膜 3 次,每次 7min,再分别加入 1:10000 HRP 标记的兔抗的二抗室温反应 1h,PBST 洗膜 5 次,每次 7min。然后 ECL 发光检测,压胶片 2min 后显影,定影,照相。

6. 基因转染、荧光素酶报告基因检测:取对数期 COS-7 细胞,接种于 24 孔板中,培养过夜,待细胞增殖融合到 80%~90% 进行转染,转染方法参照 Attractene Transfection Reagent 说明书将 0.4 μ g 野生型

PGL3 - Basic - PIWIL1 (- 264 / - 23)、野生型 PGL3 - Basic - PIWIL1 (- 561 / - 23) 转染 COS - 7 细胞,同时共转染不同剂量的 SP1 表达载体 (0、0.1、0.2 μg),0.04 μg PRL - TK 为内对照,另一组,将 0.4 μg 核心启动子短载体 PGL3 - Basic - PIWIL1 (- 264 / - 23) 与 SP1 表达载体 (0.2 μg)、内对照 PRL - TK (0.04 μg) 共转染至 COS - 7 细胞,在收集细胞检测荧光素前 24h 加入 SP1 特异性抑制剂——光辉霉素 A (mithramycin A),转染 48h 后,弃去 24 孔板内的细胞培养液,PBS 洗涤 3 次后每孔加入 100 μl 1 × PLB (细胞裂解液),轻微震荡 30min 使细胞充分裂解。在用于生物发光检测的 96 孔板中每孔加入 20 μl 细胞裂解液 (100 μl 分 5 复孔进行检测),再加入 100 μl 的 LAR II,混匀后,在 Fluoroskan Ascent FL 荧光化学发光分析仪器内检测每个样本的生物发光强度,然后再加入 100 μl Stop & Glo 试剂,终止萤火虫荧光素酶活性,活

SP1SP1SP1

-561 GTCTTGGCGGGATGGGGCGGGGCTATGGGGAGGGGCCAGGGCATGTGCGGGGTGTCTGT

SP1SP1SP1

-500 CCGGGGCCAGGCGGTGTCTTGGGGGGCCAGGGGCAGGGCCTGTGGGGCGGGGCGGGCCTG

SP1SP1

-440 GCTTGTGGGCTGTGCCGGGTGTCCGGGAGGGGCCAGACGGGGTCTTGAGGGGCGGGGC

SP1

-378 CGGGGCTGTGGGGCGGGGCTCTCTGGTCCCGCCCCGCCACATCAGAAACCGCCGTTTGC

SP1

-312 AGGGCAGCCAATGAGGGCGTGGCGCGCGCCGCTTTCGCCGTTACTGGGCGTATGGCGTACA

SP1SP1

-251 GACACGAGGCCGCGCCCGGGAGGCGGTGTTTCATCCGCCCGGAAAAGAGCGCCTGTTGCT

SP1SP1

-190 CGCTGCCCGCGTGTCCCTGGCTCTCTCGGAACCCAGCGCCGAAGGCGAGGTGGGCGCGGG

SP1SP1SP1S

-129 CCGAAGGAGGTCCTGGGAGGTCGCGCGCGCGGAGGGATCTCCGCGGAGCCGTTGGGGCTG

PISP1SP1

-68 TTGGCCTCGGGCTGAGGTGCAA GGACCAGGACTAGGGCGAGG GCA

图 1 PIWIL1 启动 (- 561 / - 23) 核苷酸序列 (包含 - 264 / - 23 区域)

2. SP1 全长编码序列扩增:根据 SP1 编码序列设计引物,以正常人血提取的 RNA 钩取 SP1 序列。扩增序列经琼脂糖凝胶电泳,显示约 2300bp 的特异性条带 (图 2),大小与目的基因相符。并且将 PCR 产物送至上海桑尼生物科技有限公司进行测序比对,克隆序列与目的基因完全一致 (图 3)。

3. 表达质粒 PCDNA3.1 - SP1 构建结果:表达质粒 PCDNA3.1 - SP1 亚克隆后提取纯化质粒,经 Hind III / EcoR I 双酶切后,产生约 2400bp 条带 (图 2),符合预期结果,PCDNA3.1 - SP1 表达载体构建成功。

4. 表达载体 PCDNA3.1 - SP1 鉴定:应用 Western blot 法验证重组载体 PCDNA3.1 - SP1 的表达效应,结果显示 SP1 过表达载体在 COS - 7 细胞有效表达 (图 4)。

化海肾荧光素酶活性,测定海肾荧光素酶活性,将荧光素酶活性除以海肾荧光素酶活性进行标准化,再计算各剂量组的相对荧光素酶活性相对于阴性对照 pGL3 - Basic 的相对荧光素酶活性的值。每组实验重复 3 次,结果取平均值。

7. 统计学方法:采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析,各剂量组的相对荧光素酶活性值以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,统计学分析方法采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. PIWIL1 核心启动子转录因子结合位点预测:运用 gene - regulation 转录因子预测网站笔者发现在这 - 561 / - 23 区域内含有 19 个转录因子 Sp1 的结合位点,其中 - 264 / - 23 区域为 10 个 (图 1)。提示 SP1 可能在 PIWIL1 启动子活性调控中有着一定的作用。

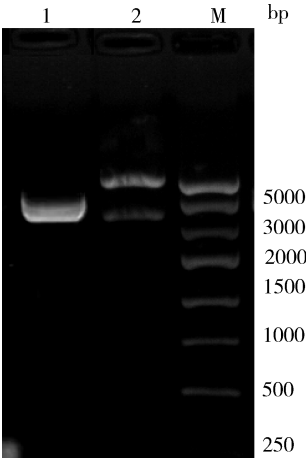


图 2 SP1 PCR 产物、重组表达载体酶切电泳图
1. SP1 PCR 产物;2. PCDNA3.1 - SP1 经 Hind III / EcoR I 双酶切;M. 标志物

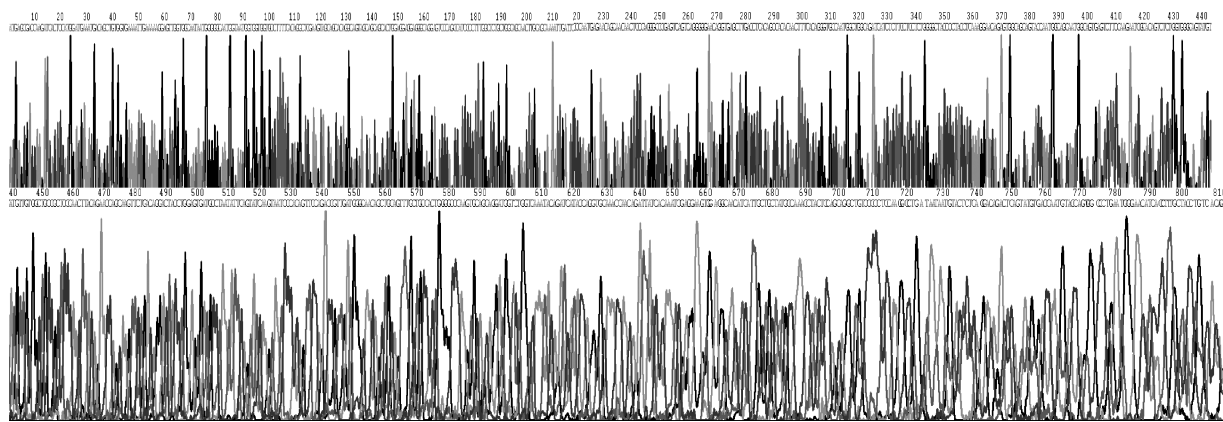


图3 SP1 序列部分测序结果

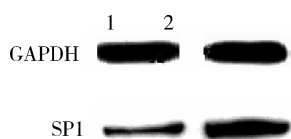


图4 Western blot 法检测 Sp1 在 COS-7 蛋白质的表达

1. COS-7 细胞; 2. 转染过表达载体
pcDNA3.1 - Sp1 的 COS-7 细胞

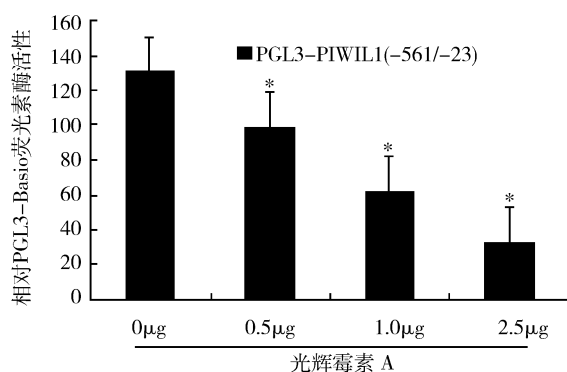


图6 加入光辉霉素 A, PCDNA3.1 - SP1 与 PIWIL1 核心启动子的荧光素酶报告质粒转染 COS-7 细胞 荧光素酶活性表达
与 0 μg 相比, * $P < 0.05$

5. SP1 对胃癌细胞 PIWIL1 基因启动子活性的影响: 探讨转录因子 SP1 对 PIWIL1 转录活性影响, 将 SP1 表达载体 PCDNA3.1 - SP1 与 PIWIL1 启动子的报告基因载体 PGL3 - Basic - PIWIL1 (- 266/ - 23)、PGL3 - Basic - PIWIL1 (- 561/ - 23) 及内参照质粒 PRL - TK 共转染至 COS-7 细胞, 利用荧光素酶报告基因检测 SP1 对 PIWIL1 转录活性的影响。结果显示: 不论核心启动子区域, 还是无活性区域, 过表达 SP1 均可显著增强其启动子活性 ($P < 0.05$, 图 5), 反之, 在加入了光辉霉素 A 的实验组中, 光辉霉素 A 抑制了 SP1 的结合, PIWIL1 启动子活性呈下降趋势 (图 6)。

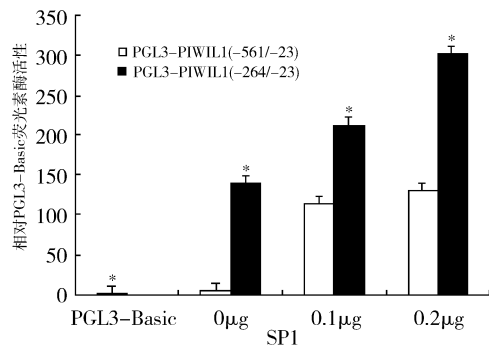


图5 PCDNA3.1 - SP1 与不同活性的 PIWIL1 启动子的 荧光素酶报告质粒共转染 COS-7 细胞荧光素酶活性表达
与同浓度 PGL3 - PIWIL1 (- 561/ - 23) 组比较, * $P < 0.05$

讨 论

PIWIL1 属于 AGO 蛋白家族中的 PIWI 亚族, PIWI 亚族蛋白与一类低分子非编码 RNA - piRNA 结合, 在沉默转录子、维持生殖细胞和干细胞功能、翻译及 mRNA 稳定等生物学过程中发挥重要作用^[8]。PIWIL1 作为 PIWI 亚族的家族成员之一, 被发现在宫颈癌、结肠癌、食管癌、胃癌、胶质瘤、胰腺癌等恶性肿瘤中存在异常表达^[9]。且大量的临床研究还认为 PIWIL1 的表达与肿瘤的预后密切相关, 如研究发现胰腺癌患者的肿瘤相关死亡风险与 PIWIL1 mRNA 水平呈正相关^[6]。Wang 等^[3]通过 COX 比例风险回归模型多因素分析认为 PIWIL1 可作为胃癌预后的独立预测因子。并且陆续有研究发现 PIWIL1 的表达, 核增殖标记基因 Ki67 存在相关, 抑制 PIWIL1 可导致细胞周期停滞在 G₂/M 期, 从而抑制肿瘤的生长^[10, 11]。

在前期 PIWIL1 核心启动子筛选鉴定结果中, PIWIL1 (- 264/ - 23) 片段荧光素酶活性最高, 即为核

心启动子区域,而 PWIL1(- 561/ - 23) 片段基本无活性,PWIL1(- 561/ - 264) 片段可能存在负调控序列。为了进一步筛选出调控 PIWIL1 转录活性的调控元件,笔者对 PIWIL1 启动子片段进行了转录因子结合位点分析,结果发现无活性区及核心启动子区均存在多个 SP1 结合位点,提示 SP1 可能参与了 PIWIL1 的转录调控。SP1 属于 Sp1/Krüppel 样因子(SP1 - like and Krüppel - like factors,SP1 / KLFs) 家族成员之一,可与靶基因的富含 GC 的区域结合,从而调控其下游基因的转录^[12, 13]。SP1 基因位于人染色体 12q13.1,可编码含 758 氨基酸的核蛋白^[14]。已有大量研究证明,在肿瘤的发生、发展中,SP1 参与癌基因、抑癌基因、细胞周期调控分子、生长相关信号转导通路分子的调节从而影响肿瘤的生长、分化、转移等^[15]。

本研究成功构建的外源性 PCDNA3.1 - SP1 表达质粒能够在 COS - 7 细胞中稳定表达,并且将其分别与 PIWIL1 核心启动子的报告基因 PGL3 - Basic - PWIL1(- 264/ - 23)、PWIL1 无活性区的报告基因 PGL3 - Basic - PIWIL1(- 561/ - 23) 共转染 COS - 7 细胞,结果显示了 SP1 过表达载体可明显上调 PIWIL1 的核心启动子及无活性区的活性,并且呈现出剂量依赖的特点,在添加了光辉霉素 A 实验组中,光辉霉素 A 改变了富含 GC 区域的结构,抑制了 SP1 的结合,使 PIWIL1 的转录活性呈下降趋势。这些数据均表明,SP1 结合位点是 PIWIL1 启动子区域的重要顺式作用元件,SP1 很可能通过与结合位点结合参与了 PIWIL1 转录调控,上调了 PIWIL1 核心启动子的活性。但对于 SP1 是否直接与其结合位点结合则有待证实,因此,在下一步的研究工作中,很有必要通过 RNA 干扰、凝胶阻滞迁移率分析和染色质免疫共沉淀等实验确认 SP1 在 PIWIL1 基因转录调控以及对肿瘤细胞增殖、细胞凋亡、细胞周期进程中的作用。

总之,本研究成功构建了 SP1 真核表达载体,初步明确了 SP1 结合位点为 PIWIL1 启动子区域的重要顺式元件,SP1 可能通过参与 PWIL1 的转录调控而调节了肿瘤的发生与发展,这为进一步深入研究并阐明 PIWIL1 在肿瘤的发生、发展过程中的表达调控及

相关分子机制奠定了基础。

参考文献

- Hock J, Meister G. The Argonaute protein family. [J]. Genome Biol, 2008, 9(2): 210
- Meister G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles [J]. Nat Rev Genet, 2013, 14(7): 447 - 459
- Wang Y, Liu Y, Shen X, *et al.* The PIWI protein acts as a predictive marker for human gastric cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2012, 5(4): 315 - 325
- He W, Wang Z, Wang Q, *et al.* Expression of HIWI in human esophageal squamous cell carcinoma is significantly associated with poorer prognosis[J]. BMC Cancer, 2009, 9: 426
- Qiao D, Zeeman A M, Deng W, *et al.* Molecular characterization of hiwi, a human member of the piwi gene family whose overexpression is correlated to seminomas [J]. Oncogene, 2002, 21(25): 3988 - 3999
- Grochola LF, Greither T, Taubert H, *et al.* The stem cell - associated Hiwi gene in human adenocarcinoma of the pancreas: expression and risk of tumour - related death[J]. Br J Cancer, 2008, 99(7): 1083 - 1088
- 毛鑫礼,朱洪源,虞朝辉,等. 胃癌组织芯片中 Argonaute 蛋白表达分析[J]. 中华消化杂志, 2009, 11: 751 - 754
- Sato K, Siomi MC. Piwi - interacting RNAs: biological functions and biogenesis[J]. Essays Biochem, 2013, 54: 39 - 52
- Suzuki R, Honda S, Kirino Y. PIWI expression and function in cancer[J]. Front Genet, 2012, 3: 204
- Liu X, Sun Y, Guo J, *et al.* Expression of hiwi gene in human gastric cancer was associated with proliferation of cancer cells [J]. Int J Cancer, 2006, 118(8): 1922 - 1929
- Yang L J, Chen Y, Ma Q, *et al.* Effect of betulinic acid on the regulation of Hiwi and cyclin B1 in human gastric adenocarcinoma AGS cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31(1): 66 - 72
- Pearson R, Fleetwood J, Eaton S, *et al.* Kruppel - like transcription factors: a functional family[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(10): 1996 - 2001
- Swamynathan SK. Kruppel - like factors: three fingers in control[J]. Hum Genomics, 2010, 4(4): 263 - 270
- Wierstra I. Sp1: emerging roles - beyond constitutive activation of TATA - less housekeeping genes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 372(1): 1 - 13
- Li L, Davie JR. The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology[J]. Ann Anat, 2010, 192(5): 275 - 283

(收稿日期:2014 - 07 - 13)

(修回日期:2015 - 03 - 23)

欢迎订阅

欢迎赐稿