

成纤维细胞生长因子 19 转录活性及上游结合元件分析

徐宜兰 陈淑芹 张 菁 白宁宁 方启晨

摘要 **目的** 构建 FGF19 基因启动子区荧光素酶报告基因质粒,并研究分析其启动子区的转录活性和结合元件。**方法** 设计特异性引物 PCR 扩增基因组 DNA,得到长为 3323bp 的 FGF19 基因启动子区片段,将此 PCR 产物插入荧光素酶报告基因载体 pGL3 - Basic Vector,获得全长为 3323bp 的 FGF19 基因启动子区荧光素酶报告基因质粒。在此基础上设计特异性引物,构建 5'端系列缺失荧光素酶报告基因质粒。通过瞬时转染实验检测所构建质粒的相对荧光素酶活性,分析不同启动子区片段对 FGF19 基因转录活性的影响,并用软件预测影响启动子转录活性的关键转录因子。**结果** 构建了 7 个 FGF19 基因启动子区荧光素酶报告基因质粒,经双酶切和测序验证均正确。瞬时转染及荧光素酶报告基因分析实验发现启动子区 -2351 ~ -2316 是调控 FGF19 启动子转录活性的重要序列,且在线软件预测该序列存在潜在的转录因子位点。**结论** FGF19 基因启动子区 -2351 ~ -2316 是调控其启动子转录活性的关键位置。

关键词 FGF19 转录调控 启动子 质粒构建

中图分类号 R5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.06.020

Analysis of Fibroblast Growth Factor19 in Transcriptional Regulation and Identification of Upstream Binding Elements. Xu Yilan, Chen Shuqin, Zhang Jing, et al. Shanghai Diabetes Institute, Department of Endocrinology and Metabolism, Shanghai Jiaotong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai Key Laboratory of Diabetes Mellitus, Shanghai Clinical Center for Diabetes, Shanghai 200233, China

Abstract **Objective** To investigate transcriptional regulation mechanism about FGF19, we constructed a series of plasmids containing the promoter fragments of FGF19 gene. **Methods** In order to get a full length of 3323bp 5' - flanking fragment of FGF19, we designed specific primer to amplify the sequence, and then it was cloned into pGL3 - basic vector. Based on the constructed promoter fragment of 3323bp, several plasmids were established with deletion of 5' terminal. Subsequently, transient transfection experiments were done to localize the core fragment of FGF19 promoter. The online software gene regulation, with the function of predicting transcription factor binding sites, identify latent transcriptional factors. **Results** We successfully cloned 7 promoter plasmids of FGF19 gene verified by restriction endonuclease digestion and sequence analysis. In view of the transient transfection results of dual luciferase reporter plasmids, the key transcriptional regulation fragment was localized between -2351 to -2316 of FGF19 promoter. **Conclusion** The fragment of FGF19 promoter from -2351 to -2316 is the core transcription regulation region and may contain the pivotal binding sites of transcription factors, which act as positive response elements in the promoter of FGF19.

Key words FGF19; Promoter; Transcriptional regulation; Plasmids construction

成纤维细胞生长因子家族共有 18 个家族成员,可参与细胞增殖、胚胎发育和代谢调节等方面^[1,2]。作为成纤维细胞生长因子家族成员之一,成纤维细胞生长因子 19 (fibroblast growth factor19, FGF19) 因其代谢调节作用而渐受关注。FGF19 是成纤维细胞生长因子家族的非典型成员,与成纤维细胞生长因子受体 4 (fibroblast growth factor receptor 4, FGFR4) 结合,

以激素的方式调节肝脏的胆汁酸平衡和糖异生,同时促进糖原和蛋白质合成^[3]。研究报道,FGF19 转基因小鼠脂肪含量减少、棕色脂肪增多和能量消耗增加,同时可对抗高脂饮食诱导的肥胖和糖尿病^[4]。给予小鼠药理学剂量的 FGF19 可观察到代谢率增加,表现为摄食未增多但伴有体重降低^[5]。且长期给予 FGF19 的小鼠棕色脂肪标志基因表达增加,肝脏促进脂肪酸氧化代谢的基因表达也升高,并伴随肝脏的甘油三酯含量降低^[5]。临床研究发现,肝外胆汁梗阻患者血清 FGF19 水平升高,而在炎症性肠病、非酒精性脂肪肝和 2 型糖尿病患者中检测到降低的 FGF19^[6]。因此 FGF19 的表达水平调节,对多个疾病都具有重要意义,且 FGF19 对胆汁酸平衡和糖脂代

基金项目:上海市自然科学基金资助项目 (15ZR1431700)

作者单位:200233 上海交通大学附属第六人民医院内分泌代谢科、上海市糖尿病研究所、上海市糖尿病重点实验室、上海市糖尿病临床医学中心

通讯作者:方启晨,电子信箱:qcfang@sjtu.edu.cn

谢的调节,使其可能成为非酒精性脂肪肝、2型糖尿病等慢性疾病的治疗靶标。目前,有关 FGF19 的转录调控机制尚不完全清楚。本研究目的为构建 FGF19 基因启动子区荧光素酶报告基因质粒,并研究分析其启动子区的转录活性和结合元件,为进一步揭示 FGF19 的转录调控机制及其在代谢性疾病中的作用提供实验基础。

材料与方法

1. 材料:pGL3 - Basic Vector 和 pRL - TK Vector (美国 Promega 公司);人肝癌细胞 HepG2 来自中国科学院;限制性内切酶 Nhe I 和 Hind III (美国 New England Biolabs 公司);PCR 扩增试剂盒 Phanta[®] Super - Fidelity DNA Polymerase、质粒点突变试剂盒(中国诺唯赞生物公司);Lipofectemine 转染试剂(美国 Invitrogen 公司);胎牛血清、胰酶青/链霉素和 MEM 培养基(美国 Gibco 公司);氨苄青霉素(上海生物工程有限公司);琼脂糖粉末(美国 Amesco 公司);血液基因组 DNA 小量抽提试剂盒(上海莱枫生物科技有限公司);质粒小量抽提试剂盒(上海赛百盛基因技术有限公司);质粒中量抽提试剂盒(美国 Promega 公司);双荧光素酶报告基因检测试剂盒(美国 Promega 公司)大肠杆菌 DH5 α 和 JM109;LB broth 和引物(上海生工生物工程有限公司)。

2. FGF19 基因启动子区荧光素酶报告基因质粒的构建:提取人外周血细胞,利用 DNA 抽提试剂盒获得人基因组 DNA。根据 GeneBank 中 FGF19 基因启动子序列和诺唯赞 PCR 扩增试剂盒的引物设计原则设计上下游引物。选择 pGL3 - Basic Vector 的 Nhe I 和 Hind III 作为克隆位点,双酶切 pGL3 - Basic Vector 得到线性化的载体。以人类基因组 DNA 作为模板,利用 PCR 技术扩增人 FGF19 基因启动子区片段,大小为 3323bp,扩增的 PCR 片段两端有与线性化载体末端同源的序列,并与线性化的 pGL3 - Basic Vector 进行重组反应。将重组反应产物转化到大肠杆菌感受态细胞中。涂板后经氨苄青霉素筛选,挑取单克隆菌落摇菌。抽提得到报告基因质粒 p(-2960 ~ +362),并用酶切和测序进行鉴定。在报告基因质粒 p(-2960 ~ +362)基础上,构建 FGF19 基因启动子 5'端系列缺失荧光素酶报告基因质粒:按照引物设计原则分别设计 5'端缺失引物,以得到长度为 2976bp、2870bp、2714bp、2679bp、2256bp、948bp 的目的基因片段,以质粒 p(-2960 ~ +362)为模板,反向 PCR 扩增得到相应长度的线性化产物,线性化产物

的 5'和 3'末端发生同源重组,然后转化重组产物到大肠杆菌感受态细胞中,挑取单克隆菌落并摇菌和中量质粒抽提,得到报告基因质粒 p(-2613 ~ +362)、p(-2507 ~ +362)、p(-2351 ~ +362)、p(-2316 ~ +362)、p(-1893 ~ +362)、p(-585 ~ +362)。

表 1 质粒构建所用引物

引物	碱基序列(5'→3')
-2960F	CCTCGATCACCTCAGTGTTC
-2960R	ATGGTCGTGGCCCTAGATCC
-2613F	CTAGCTACACCCTCAGATGGAAGAAGGA
-2613R	ATCTGAGGGTGTAGCTAGCACGCGTAAGAGCTCG
-2507F	CGTGCTAGCAAATCCAGAACAAAGCCAAAGCCAA
-2507R	TCTGGATTGCTAGCACGCGTAAGAGCTCGGTA
-2351F	TCTTACGCGTGCTAGCGCCGCTTAGCCACCCAG
-2351R	GCGCTAGCACGCGTAAGAGCTCGGTACCTATCG
-2316F	TCTTACGCGTGCTAGCGCCGCTTAGCCACCCAG
-2316R	GCGCTAGCACGCGTAAGAGCTCGGTACCTATCG
-1893F	TGCTAGCAGGACAAGCCTGAGAGCAAGCTGAGA
-1893R	AGGCTTGTCTGCTAGCACGCGTAAGAGCTCGG
-585F	TCTTACGCGTGCTAGCGCCAGGCGGACGCGGAG
-585R	GCGCTAGCACGCGTAAGAGCTCGGTACCTATCG

3. 细胞培养和瞬时转染:HepG2 细胞用含 10% FBS 和 1% 抗生素的 MEM 培养液培养,每周传代 2 ~ 3 次。待做转染实验时,选生长状态良好的细胞用胰酶消化,并接种 24 孔板,种板 24h 后观察细胞生长状况良好且细胞密度达到 80% 左右,可进行转染操作,操作步骤按照 Lipofectamine 试剂盒说明书进行。转染了 FGF19 基因启动子荧光素酶报告基因质粒及对照质粒 pRL - TK 后,48h 收细胞并检测荧光素酶活性。

4. 荧光素酶活性检测:按照 Promega 公司的双荧光试剂盒说明书操作,取得转染后的细胞裂解液,TD - 20/20 光度计用来检测荧光素酶活性。使用 LARII 检测液测得萤火虫荧光素酶活性值,再加入 Stop&Glo 测得海肾荧光素酶活性值,两者之比为荧光素酶的相对活性,每次实验取 3 个复孔的平均值。经过 3 次独立的重复实验,取 3 次实验的平均值。

5. 统计学方法:应用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计分析。各组的荧光素酶活性值以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 ANOVA 或 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. FGF19 基因启动子区报告基因质粒的构建:本研究设计特异性引物进行 PCR 扩增获得 FGF19 启动

子区的目的片段,用限制性内切酶双酶切 pGL3 - basic 得到线性化载体,然后重组连接目的片段和线性化载体,构建 FGF19 启动子区序列长度为 3323bp 的质粒 p(- 2960 ~ + 362),在此质粒基础上,设计系列特异性引物构建 5'端系列缺失荧光素酶报告基因

质粒:p(- 2613 ~ + 362)、p(- 2316 ~ + 362)、p(- 1893 ~ + 362)、p(- 585 ~ + 362),构建好的质粒均做双酶切及琼脂糖电泳检验,结果如图 1A 所示,且所有质粒经测序验证均正确。

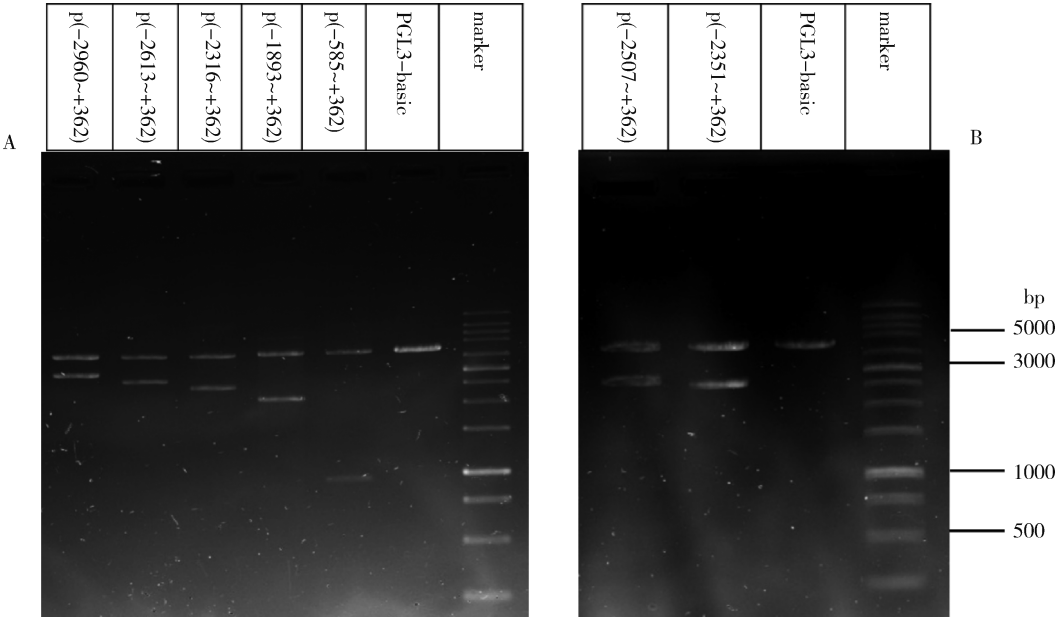


图 1 荧光素酶报告基因质粒的双酶切鉴定结果

A. 初步构建报告基因质粒双酶切电泳结果;B. 5'端截短报告基因质粒双酶切电泳结果

2. FGF19 基因启动子区报告基因质粒的活性分析:将构建的质粒 p(- 2960 ~ + 362)、p(- 2613 ~ + 362)、p(- 2316 ~ + 362)、p(- 1893 ~ + 362)、p(- 585 ~ + 362) 和 pGL3 - basic 瞬时转染 HepG2 细胞,pRL - TK 做为内参质粒,检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的荧光值,两者之比为荧光素酶的相对活性,可代表启动子的活性。结果如图 2 所示,可

见全长质粒 p(- 2960 ~ + 362)和各 5'端系列缺失的质粒的启动子活性大小。质粒 p(- 2613 ~ + 362) 荧光素酶活性最高,是质粒 p(- 2960 ~ + 362) 启动子活性的 1.5 倍,提示 FGF19 启动子区 - 2960 ~ - 2613 间的 347bp 碱基序列存在抑制启动子活性的转录因子结合位点。

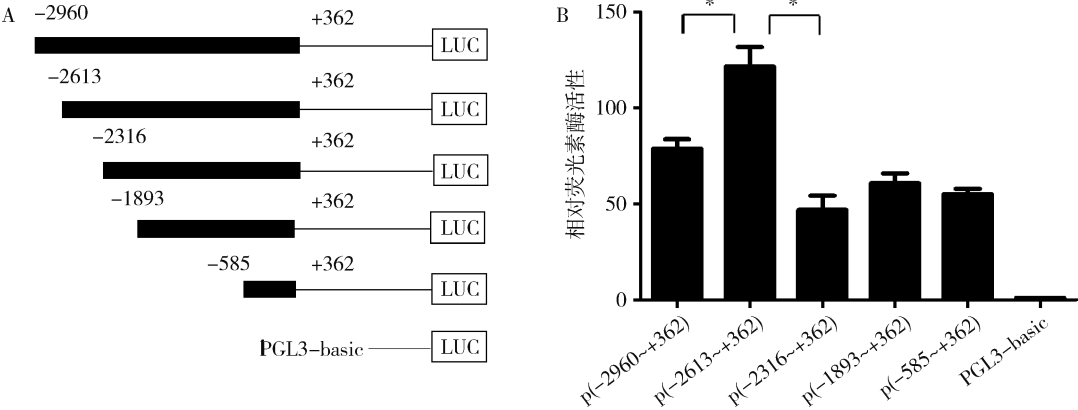


图 2 HepG2 细胞中 FGF19 基因启动子活性分析

A. 荧光素酶报告基因质粒结构示意图;B. 报告基因质粒荧光素酶活性;* $P < 0.05$

另外一方面,与进一步 5'端缺失的质粒相比,质粒 p(-2613 ~ +362) 是 p(-2316 ~ +362) 启动子活性的 2.5 倍。而质粒 p(-2316 ~ +362)、p(-1893 ~ +362) 和 p(-585 ~ +362) 间启动子活性差异无统计学意义。综合分析荧光素酶活性结果, p(-2613 ~ +362) 和 p(-2316 ~ +362) 报告基因质粒间荧光素酶活性差异最为明显,提示 FGF19 启动子区 -2613 ~ -2316 间 297bp 的启动子序列片段,是影响 FGF19 基因转录活性的重要位置。

3. 5'端系列缺失荧光素酶报告基因质粒的转录活性分析及转录因子预测结果:为进一步研究 FGF19 启动子区 -2613 ~ -2316 间 297bp 长度碱基序列对 FGF19 基因转录活性的影响,笔者构建了此 297bp 碱基序列间的 5'端系列缺失荧光素酶报告基因质粒

p(-2507 ~ +362) 和 p(-2351 ~ +362), 同样采用双酶切和琼脂糖电泳鉴定, 结果如图 1B 所示, 且质粒测序结果均正确。瞬时转染 p(-2613 ~ +362)、p(-2507 ~ +362)、p(-2351 ~ +362)、p(-2316 ~ +362) 和 pGL3-basic, 检测荧光强度并分析相应质粒的启动子活性, 结果如图 3 所示。可见 p(-2631 ~ +362) 和 p(-2316 ~ +362) 之间的 5' 端系列缺失质粒转录活性递减, 提示此段 297bp 碱基序列存在可上调启动子活性的转录因子结合位点。其中荧光素酶报告基因质粒 p(-2316 ~ +362) 较 p(-2351 ~ +362) 启动子活性明显降低, p(-2351 ~ +362) 荧光素酶活性是 p(-2316 ~ +362) 的 2.3 倍, 提示启动子区 -2351 ~ -2316 间 35bp 的碱基序列存在可上调 FGF19 基因转录活性的结合元件。

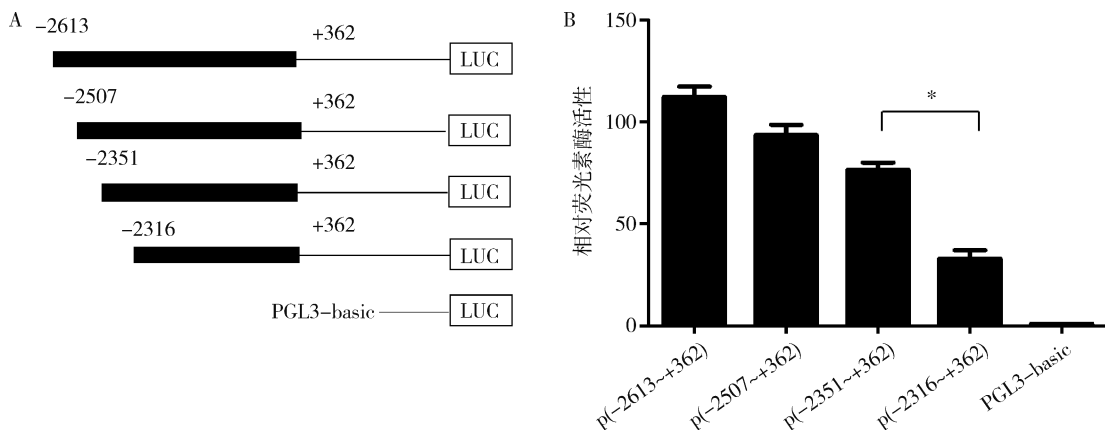


图3 FGF19 基因 5'端系列缺失质粒启动子活性分析

A. 荧光素酶报告基因质粒结构示意图; B. 报告基因质粒荧光素酶活性; * $P < 0.05$

利用在线预测软件 Gene Regulation 对 FGF19 启动子序列结合的转录因子进行预测,结果如图 4 所示。可见质粒 p(-2316 ~ +362) 和 p(-2351 ~ +362) 间 35bp 碱基序列预测到 2 个转录因子结合位

点,推测转录因子核因子 1(nuclear factor-1,NF-1)和特异性蛋白 1(specificity protein 1,SP1)参与正向调节 FGF19 的转录活性,但具体的调控机制还有待进一步的研究。

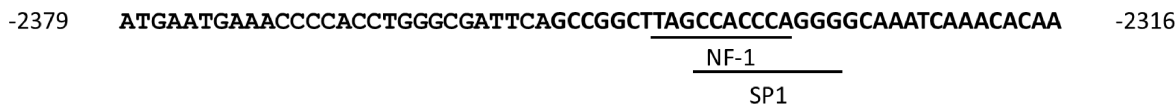


图4 FGF19 基因启动子区-2379~-2316 碱基序列转录因子预测结果

讨 论

肠上皮细胞分泌的细胞因子 FGF19,可抑制肝脏胆汁酸合成关键酶胆固醇-7 α 羟化酶(cholesterol 7- α hydroxylase, CYP7 α 1),抑制胆汁酸的合成以调控其代谢平衡^[7,8]。不同组织内 FGF19 发挥作用时结合的受体类型不同,在肝脏 FGF19 与 FGFR4 结合发挥效应,而在脂肪组织 FGF19 与成纤维细胞生

长因子受体 1c 及其共受体 β -klotho 结合参与脂肪组织的代谢调节^[4,5]。研究发现肝脏胆汁酸的稳态由 FGF19 - SHP - CYP7 α 1 通路参与调节, FGF19 还可通过独立于胰岛素的 Ras - ERK - p90RSK 通路促进糖原合成, 通过 CREB - PGC - 1 α 通路抑制糖异生, 参与维持正常的糖代谢^[9,10]。脂肪组织和肝脏是 FGF19 发挥代谢调节作用的重要靶组织, 研究 FGF19

的转录调控机制及其表达水平,可进一步揭示其靶组织相关代谢疾病,如非酒精性脂肪肝和 2 型糖尿病发生的病理生理基础。

关于 FGF19 转录调节机制,目前研究发现有启动子区和内含子区的转录因子结合元件^[11]。胆汁酸与 FGF19 第 2 个内含子区法尼酯衍生物 X 受体(farnesoid X receptor, FXR)反应元件结合,是 FGF19 调节胆汁酸平衡的关键机制^[12]。固醇调节元件结合蛋白 2 通过抑制 FXR 与 FGF19 基因启动子区 FXR 反应元件的结合负性调节 FGF19 的转录^[13]。此外,内质网应激诱导产生的转录激活因子 4 可通过结合 FGF19 启动子区的氨基酸结合元件,从而调节 FGF19 的转录活性^[14]。

本研究主要构建 FGF19 基因启动子区荧光素酶报告基因质粒(−2960 ~ +362),在此报告基因质粒基础上,构建一系列 5′端系列缺失荧光素酶报告基因质粒,分析不同启动子片段长度所对应的启动子转录活性变化,发现 FGF19 启动子区 −2351 ~ −2316 间的 35bp 碱基序列是调控 FGF19 转录活性的关键区域。软件预测到 2 个转录因子可结合到此碱基序列,其中 SP1 是分布广泛的锌指结构转录因子,可与多个基因富含 GC 的启动子区域结合,参与激活或抑制多个生物过程,包括细胞分化、细胞生长、凋亡和染色体重构等^[15,16];转录因子 NF-1 可参与激活或抑制其靶基因的启动子活性,且有报道称对于同一个靶基因,NF-1 在不同的细胞内表现为正向或负性调控转录活性^[17,18]。本实验预测的转录因子对 FGF19 转录活性调控机制还有待后续的实验来验证。

综上所述,本研究成功构建了 FGF19 基因的启动子报告基因质粒及其 5′端系列缺失质粒,分析了 FGF19 基因转录活性。初步确定(−2613 ~ −2316)是 FGF19 转录调控的重要序列,而(−2351 ~ −2316)间 35bp 是此片段调控启动子活性的关键区域,且在线软件预测到 2 个转录因子结合位点。本研究加深了对 FGF19 转录调控机制的了解,为开展进一步研究奠定基础。

参考文献

- 1 Fernandes - Freitas I, Owen BM. Metabolic roles of endocrine fibroblast growth factors [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2015, 25:30 - 35
- 2 Imamura T. Physiological functions and underlying mechanisms of fibroblast growth factor (FGF) family members: recent findings and implications for their pharmacological application [J]. *Biol Pharm Bull*, 2014, 37(7):1081 - 1089
- 3 Potthoff MJ, Kliewer SA, Mangelsdorf DJ. Endocrine fibroblast growth factors 15/19 and 21: from feast to famine [J]. *Genes Dev*,

- 2012, 26(4):312 - 324
- 4 Tomlinson E. Transgenic mice expressing human fibroblast growth factor - 19 display increased metabolic rate and decreased adiposity [J]. *Endocrinology*, 2002, 143(5):1741 - 1747
- 5 Fu L, John LM, Adams SH, *et al.* Fibroblast growth factor 19 increases metabolic rate and reverses dietary and leptin - deficient diabetes [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(6):2594 - 2603
- 6 Schaap FG, van der Gaag NA, Gouma DJ, *et al.* High expression of the bile salt - homeostatic hormone fibroblast growth factor 19 in the liver of patients with extrahepatic cholestasis [J]. *Hepatology*, 2009, 49(4):1228 - 1235
- 7 Liu WY, Xie DM, Zhu GQ, *et al.* Targeting fibroblast growth factor 19 in liver disease: a potential biomarker and therapeutic target [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2015, 19(5):675 - 685
- 8 Rysz J, Gluba - Brzozka A, Mikhailidis DP, *et al.* Fibroblast growth factor 19 - targeted therapies for the treatment of metabolic disease [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2015, 24(5):603 - 610
- 9 Potthoff MJ, Boney - Montoya J, Choi M, *et al.* FGF15/19 regulates hepatic glucose metabolism by inhibiting the CREB - PGC - 1alpha pathway [J]. *Cell Metab*, 2011, 13(6):729 - 738
- 10 Kir S, Beddow SA, Samuel VT, *et al.* FGF19 as a postprandial, insulin - independent activator of hepatic protein and glycogen synthesis [J]. *Science*, 2011, 331(6024):1621 - 1624
- 11 Degirolamo C, Sabba C, Moschetta A. Therapeutic potential of the endocrine fibroblast growth factors FGF19, FGF21 and FGF23 [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(1):51 - 69
- 12 Holt JA, Luo G, Billin AN, *et al.* Definition of a novel growth factor - dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis [J]. *Genes Dev*, 2003, 17(13):1581 - 1591
- 13 Miyata M, Hata T, Yamazoe Y, *et al.* SREBP - 2 negatively regulates FXR - dependent transcription of FGF19 in human intestinal cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 443(2):477 - 482
- 14 Shimizu M, Li J, Maruyama R, *et al.* FGF19 (fibroblast growth factor 19) as a novel target gene for activating transcription factor 4 in response to endoplasmic reticulum stress [J]. *Biochem J*, 2013, 450(1):221 - 229
- 15 Safe S, Kasiappan R. Natural products as mechanism - based anticancer agents: Sp transcription factors as targets [J]. *Phytother Res*, 2016, 30(11):1723 - 1732
- 16 Koizume S, Miyagi Y. Diverse mechanisms of Sp1 - dependent transcriptional regulation potentially involved in the adaptive response of cancer cells to oxygen - deficient conditions [J]. *Cancers (Basel)*, 2015, 8(1)
- 17 Gao B, Kunos G. Cell type - specific transcriptional activation and suppression of the alpha1B adrenergic receptor gene middle promoter by nuclear factor 1 [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(48):31784 - 31787
- 18 Harris L, Genovesi LA, Gronostajski RM, *et al.* Nuclear factor one transcription factors: Divergent functions in developmental versus adult stem cell populations [J]. *Dev Dyn*, 2015, 244(3):227 - 238

(收稿日期:2016 - 11 - 23)

(修回日期:2016 - 11 - 30)