

肿瘤坏死因子 α 调控启动子活性促进 netrin-1 的表达

白久旭, 曹 宁*, 韩敬明, 李 旭, 王东辉

沈阳军区总医院血液净化科, 沈阳 110015

[摘要] **目的** 探讨 TNF- α 对 netrin-1 基因表达的影响, 并对其调控机制作初步研究。**方法** 采用 RT-PCR 和蛋白质免疫印迹法检测 TNF- α 对 netrin-1 表达的影响。用 PCR 反应扩增 netrin-1 启动子序列, 克隆至 pGL3 荧光素酶报告基因载体, 转染 HEK-293A 细胞, 通过检测荧光素酶活性观察 TNF- α 对 netrin-1 转录水平的表达调控。**结果** TNF- α (20 ng/ml) 能上调 netrin-1 的表达。成功构建 pGL3-netrin-1-promoter 荧光素酶表达载体, 并证实构建的报告基因载体启动子具有活性; 发现 TNF- α 可使 netrin-1 启动子活性增加 ($P < 0.05$), 并以剂量和时间依赖方式调节 netrin-1 启动子的活性。**结论** 细胞因子 TNF- α 可能通过调控启动子的活性而调节 netrin-1 的表达。

[关键词] netrin-1; 肿瘤坏死因子 α ; 转录; 启动子

[中图分类号] R 349.62 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)06-0613-04

TNF- α regulates netrin-1 expression through enhancing promoter activity

BAI Jiu-xu, CAO Ning*, HAN Jing-ming, LI Xu, WANG Dong-hui

Department of Blood Purification, General Hospital, PLA Shenyang Military Area Command, Shenyang 110015, Liaoning, China

[Abstract] **Objective** To investigate the regulatory effect of TNF- α on netrin-1 expression and the related mechanism. **Methods** The expression of netrin-1 was examined by RT-PCR and Western blotting analysis in HEK-293 cells treated with TNF- α . The netrin-1 gene promoter was amplified by PCR and was cloned into pGL3 basic vector. Then the purified pGL3-netrin-1-promoter was transfected into HEK-293 cells, the luciferase activity of netrin-1 gene promoter was detected by luminometer, and the regulatory effect of TNF- α on netrin-1 expression was observed. **Results** It was confirmed that TNF- α increased expression of netrin-1. pGL3-netrin-1-promoter vector was successfully constructed as confirmed by sequencing. The pGL3-netrin-1-promoter vector was confirmed to have the promoter activity as confirmed by the luciferase system. The activity of netrin-1 promoter was increased significantly in HEK-293 cells after treated with TNF- α ($P < 0.05$), and the increase was in a time- and concentration-dependent manner. **Conclusion** TNF- α can regulate netrin-1 expression through modulating netrin-1 promoter activity.

[Key words] netrin-1; tumor necrosis factor- α ; transcriptional initiation site

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(6): 613-616]

Netrin-1 是与层粘连蛋白相关的高度保守的小分子分泌蛋白家族成员, 在神经系统中高表达, 在细胞迁移和轴突导向活动中具有重要的作用, 其同源物在多种模式动物中均已发现^[1]。近年来一些体内和体外实验证实 netrin-1 在血管新生、细胞转移、组织形态发生以及炎症反应调节等方面发挥了重要的作用^[2-3]。有研究发现过表达 netrin-1 能够减轻炎症反应, 降低急性肾损伤对肾脏功能的影响^[4-5]。

肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是创伤或感染后机体最早产生的多功能细胞因子之

一, 在组织器官的损伤中起重要作用。研究表明 TNF- α 在体内组织普遍表达, 可以启动和调节与免疫和炎症反应有关的细胞因子及黏附分子等炎性介质的基因表达^[6]。目前, 关于 TNF- α 能否在炎症反应中调节 netrin-1 的表达尚不清楚。本研究拟从基因转录水平研究 TNF- α 与 netrin-1 之间的关系, 为进一步研究 netrin-1 转录调控的具体机制打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料 TRIzol (Invitrogen 公司), SYBR[®]

[收稿日期] 2012-02-05 **[接受日期]** 2012-05-09

[基金项目] 辽宁省科技攻关课题 (2010225036). Supported by Science and Technology Foundation of Liaoning Province of China (2010225036).

[作者简介] 白久旭, 硕士. E-mail: baijiuxu@yahoo.com.cn

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 024-28851193, E-mail: cn88860068@sohu.com

Premix Ex TaqTM II (TaKaRa 公司), 反转录试剂盒 (Invitrogen 公司), *E. coli* DH5 α (本实验室保存), 基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司), 高保真酶 PRIME STAR、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Xho* I 和 *Nco* I (TaKaRa 公司), pGL3-Basic 载体、Dual-Luciferase Reporter 1000 Assay System (Promega 公司), 柱式质粒 (小量) 纯化试剂盒、柱式胶回收试剂盒 (Axygen 公司), 脂质体 LipofectamineTM 2000 (Invitrogen 公司), 人胚胎肾 HEK293A 细胞系 (本实验室保存), DMEM 培养基 (Gibco 公司), 胎牛血清 (FBS, 杭州四季青生物工程材料有限公司), TNF- α (Roche 公司), Nerin-1 兔抗人多克隆抗体 (Abcam 公司), β -actin 鼠抗人单克隆抗体 (Sigma 公司), 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG、羊抗小鼠 IgG (北京中杉金桥公司)。

1.2 实时定量 PCR 细胞总 RNA 的提取及反转录按试剂盒说明书进行。按照 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II 说明书在冰上配制 PCR 反应液。在 ABI 7500 荧光实时定量 PCR 仪上机, PCR 条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 45 个循环。

1.3 免疫印迹法分析 用 RIPA 裂解液收取蛋白样品, 加入 5 \times 加样缓冲液, 煮沸 10 min, 进行 SDS-PAGE; 利用半干转膜仪将蛋白转移至 NC 膜, 用 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h, PBST 洗膜 3 次, 每次 5 min; 5% BSA 稀释 Netrin-1 抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBST 洗 3 次, 每次 10 min; 用 5% 脱脂奶粉稀释二抗, 室温孵育 1 h, PBST 洗 3 次, 每次 10 min; 加发光液体, 用 Multimage light cabinet alphasizerTM 1220 凝胶成像系统扫描成像。

1.4 细胞培养和人类基因组 DNA 的提取 HEK-293A 细胞培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养液中, 用基因组 DNA 提取试剂盒提取 HEK-293A 细胞基因组 DNA, 具体步骤按照试剂盒说明书进行。

1.5 PCR 扩增人 netrin-1 基因启动子序列及产物回收纯化 依据 GenBank 分析 netrin-1 启动子序列并设计其引物, 扩增其启动子区 -700~+100 片段, 上游引物: tgg cta gaa cga agc cgc gt 下游引物: ctc ccg ccg agc tcg gag tg, 其酶切位点分别为 *Nhe* I、*Hind* III。引物由生工生物工程技术服务(上海)有限公司合成。以 HEK-293A 细胞基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 netrin-1 启动子片段。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。对 PCR 产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 回收并纯化。

1.6 报告基因 pGL3-netrin-1-promoter 载体的构

建 将回收的 PCR 产物经双酶切后, 从凝胶中回收酶切产物, 与 pGL3-Basic 载体(双酶切)用 T4 DNA 连接酶连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 扩增, 柱式质粒(小量)纯化试剂盒提取质粒后进行 *Nhe* I、*Hind* III 双酶切鉴定。将鉴定正确的质粒送生工生物工程技术服务(上海)有限公司 DNA 测序。

1.7 报告基因载体转染细胞后荧光素酶表达活性测定 将处于对数生长期的 HEK-293A 细胞用胰酶消化后分别接种于 48 孔板中, 培养 24 h, 在细胞融合达 70% 左右时, 加入测序正确的构建好的 pGL3-netrin-1-promoter、pGL3-Basic、内参质粒 pRL-TK 共转染 HEK-293A 细胞, 每种载体平行做 3 孔, 报告基因载体每孔 100 ng, pRL-TK 每孔 5 ng, 具体步骤见 LipofectamineTM 2000 说明书。转染 48 h 后裂解细胞并收取细胞裂解液, 按照 Dual-Luciferase Reporter 1000 Assay System 操作步骤检测荧光素酶活性值。

1.8 细胞因子表达调控 将 HEK-293A 细胞株接种到 48 孔板, 培养 16 h, 汇合度达 50%~70% 后转染。pGL3-netrin-1-promoter、pGL3-Basic、内参质粒 pRL-TK 共转染 HEK-293A 细胞, 转染 24 h 分别加入 TNF- α 5 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml 培养 6 h、12 h、24 h 后分别裂解细胞收取细胞裂解液。每个标本重复测定 3 次。计算每孔标本的平均发光值。以发光值的高低反映荧光素酶活性。

1.9 统计学处理 采用 *t* 检验或方差分析, 运用 SPSS 10.0 统计学软件进行数据分析。检验水平(α) 为 0.05。

2 结果

2.1 TNF- α 对 HEK-293A 细胞 netrin-1 mRNA 和蛋白表达水平的影响 加入细胞因子 TNF- α (20 ng/ml) 培养 HEK-293A 细胞, 24 h 后收集细胞总 RNA 和总蛋白, 用实时定量 PCR 和蛋白质免疫印迹法检测 netrin-1 mRNA 和蛋白质水平。结果显示 TNF- α 作用细胞 24 h 后能够上调 netrin-1 mRNA 和蛋白水平的表达(图 1)。

2.2 Netrin-1 基因启动子 PCR 产物扩增 以 HEK-293A 细胞基因组为模板, 以 netrin-1 启动子序列设计引物, PCR 扩增出大小约 800 bp 的 DNA 片段, 与预期目的条带大小相符。

2.3 报告基因 pGL3-netrin-1-promoter 载体的构建 将 PCR 产物双酶切后接入 pGL3-basic 载体, 转化 DH5 α , 选取克隆提取质粒, 经 *Nhe* I、*Hind* III

双酶切, 琼脂糖电泳后可见一条约 800 bp 的 DNA 片段, 与 PCR 产物大小相同(图 2)。质粒测序结果证实插入的片段为正确的 netrin-1 启动子序列。

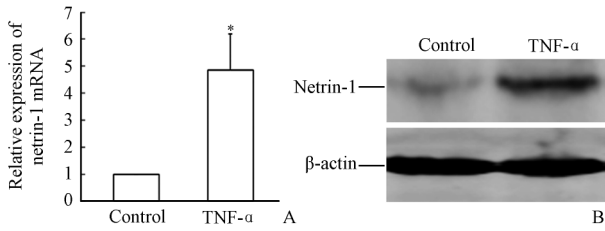


图 1 TNF- α 对 HEK-293A 细胞 netrin-1 mRNA(A)和蛋白(B)表达水平的影响

Fig 1 Effect of TNF- α on netrin-1 mRNA (A) and protein (B) expression in HEK-293A cells

* $P < 0.05$ vs control group; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

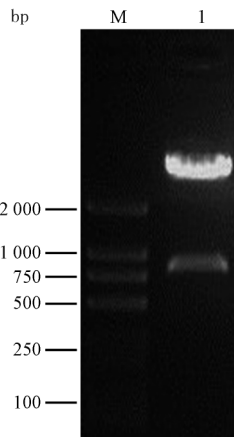


图 2 pGL3-netrin-1-promoter 重组质粒经 *Nhe* I、*Hind* III 双酶切鉴定结果

Fig 2 *Nhe* I and *Hind* III enzyme identification of recombinant plasmid pGL3-netrin-1-promoter

M: DL2000 marker; 1: pGL3-netrin-1-promoter recombinant plasmid digested by *Nhe* I and *Hind* III

2.4 Netrin-1 基因启动子序列的生物信息学分析 采用 TFSEARCH 软件 (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) 对克隆的 netrin-1 启动子区域序列进行分析, 发现该启动子区域存在多种转录因子结合位点, 包括 GATA-2、p300、CdxA、STATx、SRY、HNF-3b、c-Rel、HNF-2、MZF1、Sp1、NF- κ B、Ik-2、Sp1 等。

2.5 pGL3-netrin-1-promoter 载体在 HEK-293A 细胞中的表达 pGL3-netrin-1-promoter 载体转染组的荧光素酶活性比 pGL3-Basic 空载体转染组高 23 ± 3.35 倍, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.6 TNF- α 对 netrin-1 启动子活性的影响 加入细胞因子 TNF- α 培养转染 pGL3-netrin-1-promoter

的 HEK-293A 细胞, TNF- α 以剂量和时间依赖方式上调 HEK-293A 细胞中 netrin-1 基因启动子活性。与对照组相比, 5、10、20 ng/ml TNF- α 使 netrin-1 的荧光素酶相对活性分别增加 1.5、3.2 和 5.8 倍 ($P < 0.05$) (图 3)。和对照组相比, 20 ng/ml 的 TNF- α 刺激细胞 6、12、24 h 后荧光素酶相对活性分别增加 1.2、2.3 和 6.5 倍 ($P < 0.05$, 图 4)。

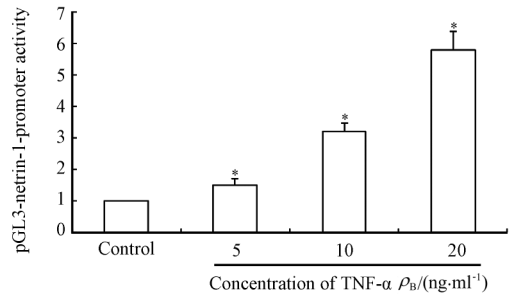


图 3 不同浓度 TNF- α 对 netrin-1 启动子活性的调节

Fig 3 pGL3-netrin-1-promoter activity regulated by different concentrations of TNF- α

* $P < 0.05$ vs control group; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

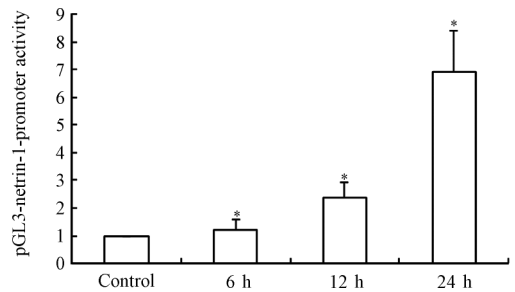


图 4 20 ng/ml 的 TNF- α 在不同时间点 netrin-1 启动子活性的调节

Fig 4 pGL3-netrin-1-promoter activity regulated by 20 ng/ml TNF- α for different time periods

* $P < 0.05$ vs control group; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

Netrins 家族是最早在神经系统中发现的可溶性神经导向因子, 在神经发育所需的轴突导向及细胞迁移中发挥双重导向功能。近年来研究发现该家族及其受体在非神经组织中广泛表达并发挥着重要的作用, 提示 netrins 家族不仅在中枢神经系统的发育过程中提供了迁移信号, 在非神经组织中也参与了细胞的黏附、游走、增殖、分化甚至凋亡的调控^[7-9]。有研究发现 netrin-1 参与炎症的反应和调节, 在缺氧的环境下低氧诱导因子- α (HIF- α) 能诱导 netrin-1 表达而抑制局部的肠道炎症反应^[10]。Netrin-1 作为抗炎反应蛋白能够在急性肺损伤模型中减少肺泡的炎症反应^[11]。TNF- α 是炎症级联反应中起关键作用的细胞因子, 可以促进炎症介质的释放, 包括白细胞介素

(IL)1,IL-6,IL-8 等细胞因子及黏附分子,构成炎症损伤效应^[12-13]。TNF- α 可以通过调控转录因子的表达来调节炎症反应,如TNF- α 能够上调转录因子 ESE-1 参与气管炎症反应^[14]。

荧光素酶报告基因技术是了解基因表达和调控的重要工具,能够准确的反映外周因素对启动子序列的影响。本研究选用不含启动子的荧光素酶报告基因 pGL3-Basic 载体,将 netrin-1 启动子区域-700~+100序列克隆入 pGL3-Basic 中。通过检测荧光素酶的活性间接地反映 netrin-1 的转录表达水平。进一步通过 TNF- α 的刺激研究其对 netrin-1 转录的调控表达机制。本研究首先通过细胞学实验发现 TNF- α 在 mRNA 和蛋白水平上调 netrin-1 的表达,再通过荧光素报告基因实验进一步发现 TNF- α 以剂量依赖和时间依赖的方式上调 HEK-293A 细胞 netrin-1 基因启动子活性,提示 TNF- α 可能主要在转录水平调节 HEK-293A 细胞中 netrin-1 的表达。目前,TNF- α 诱导 netrin-1 表达的机制尚不完全清楚,我们利用生物信息学软件分析 netrin-1 基因启动子区域的结构和功能,发现其启动子序列有 GATA-2、NF- κ B、SP1 等重要转录因子的结合位点。有研究报道转录因子 NF- κ B 在 netrin-1 的转录调控中发挥重要的作用,在肠炎患者中 NF- κ B 激活 netrin-1 的表达影响肠癌发病的进展,通过调控 NF- κ B 抑制 netrin-1 的表达可以作为治疗肠癌的新型药物靶点^[15]。研究发现 TNF- α 能够激活 NF- κ B 从胞质进入细胞核,在核内与多种基因启动子特异性序列结合,并启动转录发挥其调控作用^[16]。TNF- α 调节 netrin-1 的表达很可能是通过激活 NF- κ B 信号转导通路实现的。

NF- κ B 活化是炎症反应激活的信号通路,是启动和控制炎症反应的中枢环节。游离的 NF- κ B 具有向细胞核内移位的能力,进入细胞核内的 NF- κ B 与各种炎症介质和细胞因子靶基因启动子区域的特定序列结合而迅速诱导相应基因的表达,从而启动细胞炎症反应。研究发现炎症性肠病进展到肠癌的过程中,netrin-1 的表达上调,并且其表达可能受到 NF- κ B 的调控^[17]。对于 TNF- α 如何通过 NF- κ B 通路调控 netrin-1 的表达有待于进一步的研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Barallobre M J,Pascual M,Del Río J A,Soriano E. The Netrin family of guidance factors: emphasis on Netrin-1 signalling[J].

Brain Res Rev,2005,49:22-47.
 [2] Nguyen A,Cai H. Netrin-1 induces angiogenesis via a DCC-dependent ERK1/2-eNOS feed-forward mechanism[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2006,103:6530-6535.
 [3] Tadagavadi R K,Wang W,Ramesh G. Netrin-1 regulates Th1/Th2/Th17 cytokine production and inflammation through UNC5B receptor and protects kidney against ischemia-reperfusion injury[J]. J Immunol,2010,185:3750-3758.
 [4] Wang W,Reeves W B,Pays L,Mehlen P,Ramesh G. Netrin-1 overexpression protects kidney from ischemia reperfusion injury by suppressing apoptosis[J]. Am J Pathol,2009,175:1010-1018.
 [5] Wang W,Reeves W B,Ramesh G. Netrin-1 and kidney injury. I. Netrin-1 protects against ischemia-reperfusion injury of the kidney[J]. Am J Physiol Renal Physiol,2008,294:F739-F747.
 [6] Grund E M,Kagan D,Tran C A,Zeitvogel A,Starzinski-Powitz A,Nataraja S, et al. Tumor necrosis factor-alpha regulates inflammatory and mesenchymal responses via mitogen-activated protein kinase kinase, p38, and nuclear factor kappaB in human endometriotic epithelial cells[J]. Mol Pharmacol,2008,73:1394-1404.
 [7] Wilson B D,Ii M,Park K W,Suli A,Sorensen L K,Larrieu-Lahargue F, et al. Netrins promote developmental and therapeutic angiogenesis[J]. Science,2006,313:640-644.
 [8] Navankasattusas S,Whitehead K J,Suli A,Sorensen L K,Lim A H,Zhao J, et al. The netrin receptor UNC5B promotes angiogenesis in specific vascular beds [J]. Development,2008,135:659-667.
 [9] Hebrok M,Reichardt L F. Brain meets pancreas: netrin, an axon guidance molecule, controls epithelial cell migration [J]. Trends Cell Biol,2004,14:153-155.
 [10] Rosenberger P, Schwab J M,Mirakaj V, Masekowsky E, Mager A, Morote-Garcia J C, et al. K. Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia[J]. Nat Immunol,2009,10:195-202.
 [11] Mutz C, Mirakaj V, Vagts D A, Westermann P, Waibler K, Konig K, et al. The neuronal guidance protein netrin-1 reduces alveolar inflammation in a porcine model of acute lung injury [J]. Crit Care,14:R189.
 [12] Sadis C,Teske G,Stokman G,Kubjak C,Claessen N,Moore F, et al. Nicotine protects kidney from renal ischemia/reperfusion injury through the cholinergic anti-inflammatory pathway[J]. PLoS One,2007,2:e469.
 [13] Obradović D,Kataranovski M,Dincić E,Obradović S,Colic M. Tumor necrosis factor-alfa and interleukin-4 in cerebrospinal fluid and plasma in different clinical forms of multiple sclerosis [J]. Vojnosanit Pregl,2012,69:151-156.
 [14] Wu J,Duan R,Cao H,Field D,Newnham C M,Koehler D R, et al. Regulation of epithelium-specific Ets-like factors ESE-1 and ESE-3 in airway epithelial cells; potential roles in airway inflammation[J]. Cell Res,2008,18:649-663.
 [15] Paradisi A,Maisse C,Bernet A,Coissieux M M,Maccarrone M,Scoazec J Y, et al. NF-kappaB regulates netrin-1 expression and affects the conditional tumor suppressive activity of the netrin-1 receptors[J]. Gastroenterology,2008,135:1248-1257.
 [16] Coward W R,Okayama Y,Sagara H,Wilson S J,Holgate S T,Church M K. NF-kappa B and TNF-alpha: a positive autocrine loop in human lung mast cells? [J]. J Immunol,2002,169:5287-5293.
 [17] Paradisi A,Maisse C,Coissieux M M,Gadot N,Lepinasse F,Delloye-Bourgeois C, et al. Netrin-1 up-regulation in inflammatory bowel diseases is required for colorectal cancer progression [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2009,106:17146-17151.