

转录因子Elk-1调控MAZ基因启动子 转录活性的体外研究

王 博 贾琳娜 王小怡 张 潮 王雪伟 任剑波 高 哲 郭大玮*

(山西医科大学法医学院, 山西医科大学转化医学研究中心, 太原 030001)

摘要 该文旨在探究血清淀粉样蛋白A激活转录因子(serum amyloid A activating transcription factor, *SAF*), 或称*myc*相关锌指蛋白(*myc*-associated zinc finger protein, *MAZ*)基因, 除已证实的转录因子MAZ和Sp1(specificity protein 1)外, 是否存在其他转录因子对MAZ基因启动子的转录激活具有调控作用。在生物信息学预测基础上, 利用凝胶电泳迁移实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)筛查MAZ启动子区的转录因子结合位点。在EMSA筛查出MAZ启动子区包含转录激活因子ETS样蛋白1(ETS-like 1 transcription factor, Elk-1)结合位点后, 通过该实验室构建的由MAZ启动子驱动的双荧光报告系统分析观察过表达转录因子Elk-1后MAZ启动子的转录激活情况。结果显示, 转录因子Elk-1可结合MAZ启动子-525~504 nt区的DNA序列; 过表达Elk-1及Sp1均可使MAZ的两个转录子SAF-1和SAF-3转录水平降低且后一转录子被抑制尤甚。结果提示, Elk-1与Sp1共同参与调控MAZ基因两个转录子SAF-1和SAF-3的转录调控, 在MAZ基因参与的细胞诸多生理疾病过程中, Elk-1可能通过该途径发挥其作用。

关键词 MAZ基因; 转录因子; Elk-1; 凝胶电泳迁移实验; 双色荧光蛋白报告系统

Down-Regulation of Human MAZ Gene Promoter Activity by Transcription Factor Elk-1 *In Vitro*

Wang Bo, Jia Linna, Wang Xiaoyi, Zhang Chao, Wang Xuwei, Ren Jianbo, Gao Zhe, Guo Dawei*

(Department of Forensic Science & Translational Medicine Research Center, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract The aim of this work is to investigate the transcriptional regulation of the *myc*-associated zinc finger protein (*MAZ*), also known as serum amyloid A activating transcription factor (*SAF*), which plays a key role in regulation of variety of inflammation-responsive genes as well as transcription of multiple genes modulating tumor microenvironment. The down-regulation of *MAZ* promoter activity by Sp1 and MAZ were identified. In this study, the transcription factor ETS-like 1 transcription factor (Elk-1) binding site for regulating *MAZ* transcription was identified by PROMO software online and electrophoretic mobility shift assay (EMSA). The expressions of both SAF-1 and SAF-3, the two transcription variants of *MAZ* gene, were analyzed by *MAZ* promoter driving bichromatic fluorescent reporter system when Elk-1 was over-expressed. The results showed that the region between -525 and -504 bp in *MAZ* promoter region could be bound with Elk-1. The expressions of both SAF-1 and SAF-3 were inhibited when Elk-1 was over-expressed. In comparison to transcription factor Sp1, it seems that

收稿日期: 2017-01-23 接受日期: 2017-04-01

国家自然科学基金(批准号: 90608008)和高等学校博士学科点专项科研基金博导类(批准号: 20111417110003)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0351-4135147, E-mail: guo8dawei@aliyun.com

Received: January 23, 2017 Accepted: April 1, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.90608008) and Ph.D. Programs Foundation of the Ministry of Education of China (Grant No.20111417110003)

*Corresponding author. Tel: +86-351-4135147, E-mail: guo8dawei@aliyun.com

网络出版时间: 2017-05-19 16:57:47

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170519.1657.010.html>

Elk-1 is moderate inhibitor for *MAZ* promoter activation. Based on our observations, it is suggested that as a down-regulation transcription factor for *MAZ* promoter activation, Elk-1 may play roles in physiological and pathological procedures in human cells, such as inflammation reaction and tumorigenesis. The hypothesis needs to be confirmed by further analysis *in vivo*.

Keywords *MAZ* gene; transcription factor; Elk-1; EMSA; bichromatic fluorescent reporter

血清淀粉样蛋白A激活转录因子(serum amyloid A activating transcription factor, *SAF*), 或称*myc*相关锌指蛋白(*myc*-associated zinc finger protein, *MAZ*)基因, 定位于染色质16p11.2^[1]。*SAF*作为看家基因参与多种疾病的发生、发展, 如骨关节炎^[2]、动脉粥样硬化^[2]、胰腺癌^[3]、非小细胞肺癌^[4]和乳腺癌^[5]等。目前, 对*MAZ*基因的研究多为其功能产物对靶基因表达的影响, 除Song等^[6]报道的转录因子MAZ和转录因子Sp1(specificity protein 1)可结合*MAZ*启动子区相应的顺式作用元件从而抑制*MAZ*基因表达外, 未见其他转录因子调控*MAZ*基因表达的报道。

目前已知, *MAZ*基因可表达多种功能产物, 其中, 转录因子SAF-1、转录因子SAF-3存在一级结构和功能上的差异, 在基础和炎症刺激条件下两者的表达水平也有所不同^[7]。为了深入探究SAF-1和SAF-3在细胞内表达情况以及是否存在除MAZ和Sp1外的其他转录因子参与*MAZ*基因的表达调控, 本文应用PROMO 3.0.2对*MAZ*启动子区序列进行转录因子结合位点的预测, 并通过EMSA进行初步筛选。我们发现, 转录激活因子ETS样蛋白1(ETS-like 1 transcription factor, Elk-1)可结合*MAZ*启动子区, 而后利用已构建的*MAZ*启动子驱动的双荧光报告质粒观察了转录因子Elk-1对*MAZ*不同长短启动子驱动的SAF-1和SAF-3表达的影响。这为进一步研究*MAZ*基因参与的生理进程和*MAZ*基因异常表达所致疾病的病理机制提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

THP-1细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库。HeLa细胞及双荧光报告系统的绿色荧光序列由山西医科大学转化医学研究中心崔永萍教授惠赠。重组人Elk-1蛋白购自北京义翘神州公司。Lipofectamine™ 3000 Reagent购自Invitrogen公司。*Elk-1*表达载体pCGN-Elk-1(Plasmid #27156)和*Sp1*表达质粒pN3-Sp1(Plasmid #24543)购自Addgene公司。

流式细胞仪购自美国BD公司。激光共聚焦显微镜购自Olympus公司。

1.2 细胞培养

THP-1细胞以含10%胎牛血清与1%青/链霉素混合液的RMPI1640培养液、HeLa细胞以含10%胎牛血清与1%青/链霉素混合液的DMEM培养液于37 °C、5% CO₂的条件下常规培养。

1.3 核蛋白提取与定量

采用细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒提取THP-1细胞、HeLa细胞的核蛋白, 保存于-80 °C。采用BCA法进行蛋白质定量并利用酶标仪进行检测。

1.4 探针设计与探针突变

利用PROMO 3.0.2对*MAZ*基因SAF-1转录起始点上游-948~1 bp的DNA序列进行转录因子结合位点预测, 筛选出其中32段序列(表1)进行凝胶电泳迁移实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA), 根据实验结果对相应阳性结果探针进行突变(表1)。以Song等^[6]报道的SM探针(5'-ACA CCC CCT CCT GCC CGC CCT CCC TCC CGT-3')作为阳性对照探针。以Canbaz等^[8]报道的WT-2(5'-CGG AGA GGA CAG CGA CAG GAA GGG AGG-3')作为可结合转录因子Elk-1的竞争探针。

1.5 探针标记

应用末端脱氧核糖核酸转移酶对寡核苷酸单链进行生物素标记, 经纯化、变性、退火等操作后可获取的双链生物素标记探针。

1.6 凝胶电泳迁移实验

凝胶电泳迁移实验(EMSA)结合反应体系中包含8 μg细胞核蛋白/10 μg重组蛋白Elk-1, 标记探针0.27 pmol。超迁移实验所用标签抗体与重组蛋白Elk-1优先反应且4 °C过夜。配制4.9%非变性聚丙烯酰胺凝胶, 上样电泳后转印至带正电荷尼龙膜, 经紫外交联、化学发光检测等操作后获取影像结果。

1.7 质粒构建

参考Orengo等^[9]报道的双荧光报告载体的设计思路, 将扩增得到的*MAZ*启动子区目的片段、红

表1 凝胶电泳迁移实验的探针及突变探针

Table 1 The probe and its mutant probe of EMSA

探针名称 Probe name	位置 Site	探针序列(5'→3') Probe sequence (5'→3')	突变探针序列(5'→3') Mutant probe sequence (5'→3')
1	-934~904	GCG GGC GCG CGC TCA GGG ATT AGC CCC GCC C	
2	-907~883	GCC CCG TCC GTG CCC CCG GCG CGC G	
3	-882~853	CGC TCC CCC ATT CTC CCG CTC GGC AAC GAC	
4	-851~822	GCG GCC TTG TGC GCG TGC GCG CGA AAT AAC	
5	-823~796	ACG GCC GCT GGC GGA GGG AGG GGG AGT G	①ACG GCC GCT <u>GCG AGC TCG CGC TAG CGC T</u>
6	-798~769	GTG GAA TCG TTG GCG GGG GGA AGA GGA GAG	
7	-769~740	GAA GCC GCC CTG TCT CCC GCG CGC CCA CCA	
8	-745~715	CCA CCA CCT GCG CCA TCG TCA GCC AAT CAG C	
9	-710~680	GTC TCA GGG GTC TCG CGC TCG GGG CGA CTC G	
10	-682~652	TCG GGC TGC TGG GTG GCT CCC CCG TCC CTC C	
11	-653~623	CCT CCC GCC AGA GTC CCT CTC GCG CCT GCC C	①CCT CCC GCC AGA <u>GCG AGC TCG CGC TAG CGC T</u>
12	-626~603	GCC CCT CCC GCT GGC CAC GCG CGC	
13	-587~560	CGC GCC CGC TCC AGC CTC TTG TGT GTC C	
14	-561~532	CCT CGC GCC CCC CGC CCG CCC TCC CCG CGC	
15	-525~504	TGC TCC GCT TCC CCC ACC CTC C	① <u>GCT CTC</u> GCT TCC CCC <u>ACA CGC T</u> ②TGC TCC GCT <u>CTA GCT CGC GCT A</u> ③ <u>GCT CTC</u> GCT TCC CCC A ④ <u>GCT CTC</u> GCT TCC CC ⑤TGC TCC <u>GAA AAA</u> CCC ACC CTC C
16	-496~475	CCC TCC TGC CCG CCC CGC GCG C	
17	-470~440	TCC CGG GTT CCC CCT CCC CCA CCG CCG CCG C	①TCC CGG GTT CCC <u>CCC AGC TCG CGC TAG CGC T</u> ② <u>CGA GCT CGC GCT AGC TCC CCA CCG CCG CCG C</u>
18	-434~415	CCT CCC GCC CCA GGG TGA GC	
19	-403~380	CCC TCC CTC CCT CCG CCA TGG ATC	
20	-381~358	TCC CAG CAA CTG GAG CAG CTT CAT	
21	-361~336	TCA TCT TCC AGG TAA CAA CTC CCT CC	① <u>TCG CGC TAG CGC TAA CAA CGC GCT AG</u> ②TCA TCT TCC AGG <u>TAA GCT CGC GCT AG</u>
22	-338~307	TCC CCC CGC CCC CAC CCC CCT GCC CAC ACC CC	① <u>GCG AGC TCG CGC TAG CTC CCT GCC CAC ACC CC</u>
23	-308~282	CCC TCC TGC CCG CCC TCC CTC CCG TCC	
24	-284~255	TCC CAC CCC CCC TCC GCG CGC CCG GTG CGC	
25	-254~224	GCG CAG CTG TCC CCC TCC CTC CCT CGC GCC C	①GCG CAG CTG <u>TAA GCT CGC GCT AGT CGC GCC C</u>
26	-226~197	CCC TCC CCC GCC CTC CCC GAG GCG CCG GCT	① <u>CTA GCT CGC GCT AGC TAG CTC GCG CCG GCT</u>
27	-199~170	GCT GGG CGC GCG CGC GGC GGG GGC CGA GGC	
28	-161~129	CGC TCC CCC CAC CCC GCC CCG CCA GGC TCC AA	① <u>TCG CGA GCT CGC GCT AGC TCC CCC GGC TCC AAC</u>
29	-134~103	TCC AAC CGC CGC CGC CGC CGC CGC CGC CGC CC	
30	-106~75	GCC CGG GCC CCC GCC CCC GGC CCC GGC CCC GC	
31	-76~49	GCG GGG CCT CCC GCC CCC ACC CAG GGG G	
32	-54~28	AGG GGG CGT CGC CGC CGC CGT CGC CGC	

表中下划线所指为突变探针的突变序列。

The underlined nucleotides represent the mutated bases of mutant probes.

色荧光蛋白基因 (*Discosoma* sp. red fluorescence protein, *DsRed*) 片段、增强型绿色荧光蛋白基因 (enhanced green fluorescent protein, *EGFP*) 片段连入质粒 pGL3-promoter 并对质粒上部分序列进行适当突变。构建的 MAZ 基因启动子驱动的双色荧光报告质粒以双色荧光 (红色、绿色荧光) 蛋白表达动态反映 SAF-1 和 SAF-3 的表达情况。本文使用的报告质粒共三种, 分别为 pGL3-MAZ-DE①、pGL3-MAZ-ED① 和 pGL3-MAZ-ED②。质粒 pGL3-MAZ-ED① 的基本结构如图 1A 所示, 绿色和红色荧光蛋白表达分别代表 SAF-3 和 SAF-1 的表达情况。质粒 pGL3-MAZ-ED① 和 pGL3-MAZ-ED② 的基本结构分别如图 1B 和图 1C 所示, 两种质粒的绿色荧光蛋白表达均代表 SAF-1 表达情况, 红色荧光蛋白表达均代表 SAF-3 的表达情况。质粒 pGL3-MAZ-ED① 和 pGL3-MAZ-DE① 连入包含 MAZ 启动子区 -596~283 bp 的

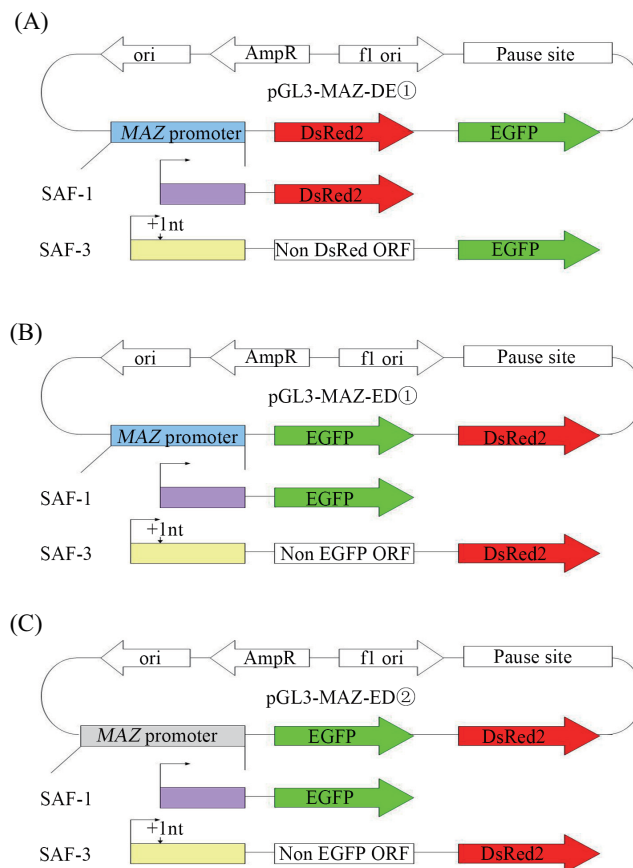
DNA 序列, pGL3-MAZ-ED② 连入包含 MAZ 启动子区 -1 402~283 bp 的 DNA 序列。

1.8 细胞转染及激光共聚焦显微镜观察

实验组将报告质粒 (pGL3-MAZ-ED②) 和 Elk-1 表达质粒 (pCGN-Elk-1) 共转染 HeLa 细胞, pGL3-MAZ-ED② 和 Sp1 表达质粒 (pN3-Sp1) 共转染 HeLa 细胞作为阳性对照, pGL3-MAZ-ED② 和空表达质粒共转染 HeLa 细胞作为阴性对照。转染时使用 5 μ L Lipofectamine™ 3000 Reagent 对 2.2 μ g 报告质粒 (pGL3-MAZ-ED②) 和 0.2 μ g 表达质粒 (pCGN-Elk-1/pN3-Sp1)/空表达载体进行共转染。转染 48 h 后, 激光共聚焦显微镜观察红色或绿色荧光强度。

1.9 流式细胞术及统计学分析

同上述方法对 HeLa 细胞进行转染, 将待转染细胞分为两组。其中, 一组细胞共转染质粒 pGL3-MAZ-ED①, 表达质粒 (pCGN-Elk-1/pN3-Sp1)/空表



A: MAZ 启动子驱动的绿色、红色荧光蛋白表达分别代表 SAF-1 和 SAF-3 的表达; B: MAZ 启动子驱动的绿色、红色荧光蛋白表达分别代表 SAF-1 和 SAF-3 的表达; C: MAZ 启动子驱动的绿色、红色荧光蛋白表达分别代表 SAF-1 和 SAF-3 的表达。

A: the expression of *DsRed* and *EGFP* driven by MAZ promoter, reflecting expressions of SAF-1 and SAF-3 respectively; B: the expression of *EGFP* and *DsRed* driven by MAZ promoter, reflecting expressions of SAF-1 and SAF-3 respectively; C: the expression of *EGFP* and *DsRed* driven by MAZ promoter, reflecting expressions of SAF-1 and SAF-3 respectively.

图 1 MAZ 启动子驱动的双荧光报告载体主要结构示意图

Fig.1 Schematic representation of a bichromatic fluorescent reporter vector driven by MAZ promoter

达载体, 流式细胞术可检测绿色荧光蛋白以反映SAF-1的表达情况。另一组细胞共转染pGL3-MAZ-DE①, 表达质粒(pCGN-Elk-1/pN3-Sp1)/空表达载体, 流式细胞术可检测绿色荧光蛋白以反映SAF-3的表达情况。细胞转染48 h进行流式细胞术的荧光检测。流式细胞术检测结果采用SPSS 17.0进行统计学分析, 用均数±标准差表示, 多个样本均数间的比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 表示具有显著差异, $P < 0.01$ 表示具有极显著差异。

2 结果

2.1 EMSA证实MAZ基因启动子区存在除MAZ和Sp1外其他转录因子结合位点

来自MAZ基因启动子区的32个探针经EMSA实验表明, 其中14个探针出现明显DNA-蛋白质结合条带, 分别为探针3、5、11、14、15、17、19、21、22、23、25、26、28、30。其中, 探针3、19、30的结合条带较弱, 探针14潜在顺式作用元件过于复杂, 探针23包含已证实MAZ和Sp1结合位点, 故这5个探针未做进一步研究。将探针5、11、15、17、21、22、25、26、28进行突变, 探针15先突变为突变探针15①、15②。以上突变探针做EMSA以缩小转录因子筛查范围, 结果显示, 突变探针15①、22①、28①仍可结合细胞核蛋白。

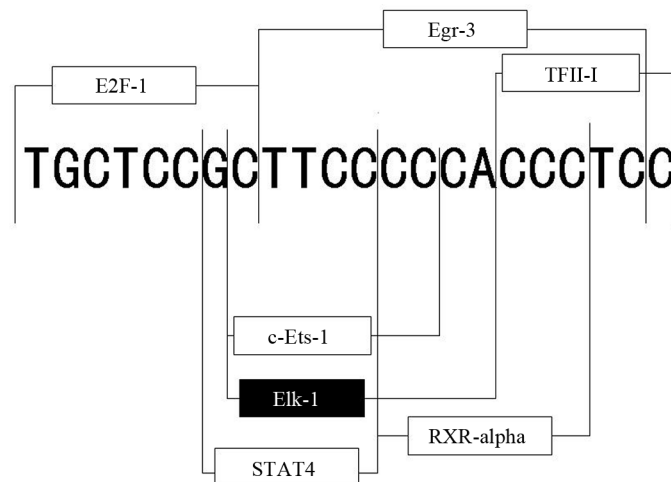
2.2 探针15的CTTCC序列进行突变处理后不能与HeLa细胞核蛋白结合

PROMO软件预测探针15可能包含转录因子

E2F-1(E2F transcription factor 1)、STAT4(signal transducer and activator of transcription 4)、cEts-1(ETS proto-oncogene 1 transcription factor)、Elk-1、RXR-alpha(retinoid x receptor- α)、Egr-3(early growth response 3)和TFII-I(transcription factor II-I)的结合位点(图2)。突变探针15①将预测E2F-1、RXR-alpha、Egr-3、TFII-I结合位点的序列突变仅剩余预测的STAT4、cEts-1、Elk-1结合位点, EMSA实验结果显示, 突变探针15①可结合HeLa细胞核蛋白(图3A, 泳道8)。15②仅包含预测的E2F-1结合位点, EMSA实验结果显示, 突变探针15②未与HeLa细胞核蛋白形成DNA-蛋白质结合条带(图3A, 泳道10)。将探针15做二次突变, 突变探针15③仅包含预测的STAT4、cEts-1、Elk-1结合位点。突变探针15④仅包含预测的STAT4、cEts-1结合位点, 结果显示, 仅探针15③可结合HeLa细胞核蛋白(图3A, 泳道2), 探针15④未见形成DNA-蛋白质结合条带(图3A, 泳道4)。将探针15包含的CTTCC序列突变为AAAAA的突变探针15⑤不能结合细胞核蛋白(图3B, 泳道4), 说明探针15的CTTCC序列对转录因子的识别并结合至关重要。

2.3 探针WT-2可竞争探针15结合THP-1细胞核蛋白

将生物素未标记的WT-2探针用作Elk-1竞争探针, 其可减弱探针15的DNA-蛋白质结合条带, 并且随着竞争探针量的增加, 探针15的DNA-蛋白质结合条带递减(图4A, 泳道3、4、5, 探针WT-2较标记探针15用量分别为900倍、1 125倍、1 350倍)。用

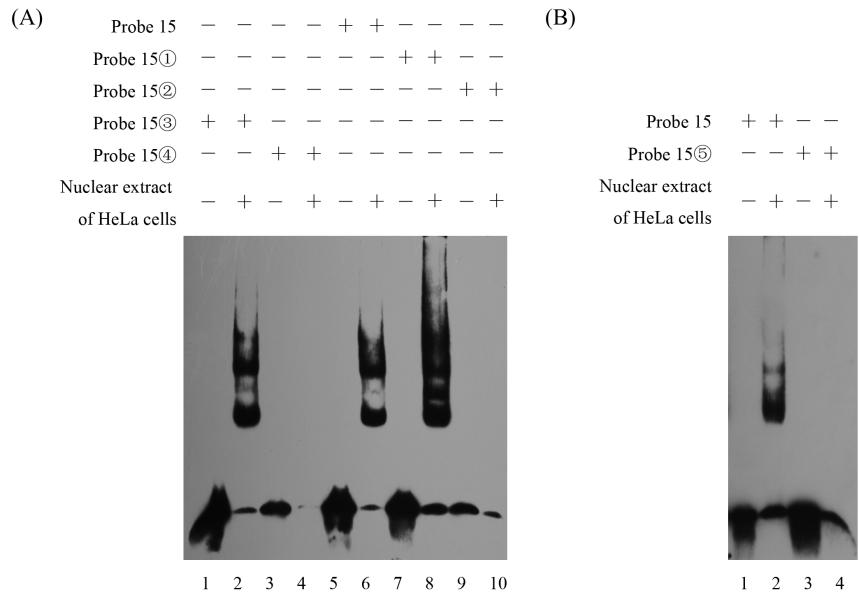


E2F-1: 转录因子E2F-1; STAT4: 信号传导及转录激活因子4; cEts-1: ETS原癌基因1转录因子; RXR-alpha: 维甲类x受体- α ; Egr-3: 早期生长反应因子-3; TFII-I: 转录因子II-I。

E2F-1: E2F transcription factor 1; STAT4: signal transducer and activator of transcription 4; cEts-1: ETS proto-oncogene 1 transcription factor; RXR-alpha: retinoid x receptor- α ; Egr-3: early growth response 3; TFII-I: transcription factor II-I。

图2 PROMO软件预测的探针15转录因子结合位点

Fig.2 The putative transcription factor binding sites (TFBS) in probe 15 is predicted by PROMO software

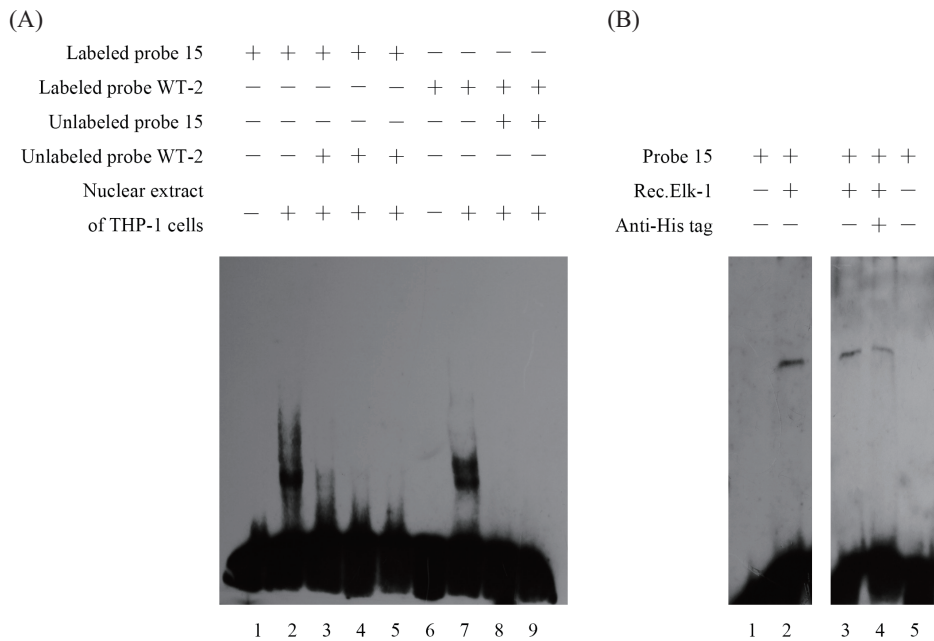


A: 探针15及其突变探针15①、15②、15③、15④与HeLa细胞核蛋白反应的EMSA结果; B: 探针15及突变探针15⑤与HeLa细胞核蛋白反应的EMSA结果。

A: probe 15 and mutant probe 15①, 15②, 15③, 15④ were incubated with HeLa cells nuclear proteins and analyzed via EMSA; B: probe 15 and mutant probe 15⑤ were incubated with HeLa cells nuclear proteins and analyzed via EMSA.

图3 探针15及其突变探针的凝胶电泳迁移实验结果

Fig.3 The EMSA results of probe 15 and its mutant probes



A: 泳道1、6分别仅包含生物素标记的探针15和探针WT-2; 泳道2和6分别为生物素标记的探针15和探针WT-2与THP-1细胞核蛋白结合; 泳道3、4、5除含有生物素标记的探针15和THP-1细胞核蛋白外还包含不同浓度的未标记探针WT-2(较标记探针15用量分别900倍、1 125倍、1 350倍); 泳道8、9除含有生物素标记的探针WT-2和THP-1细胞核蛋白外还包含不同浓度的未标记探针15(较标记探针WT-2用量分别675倍、1 125倍)。B: 探针15可与重组Elk-1蛋白结合形成DNA-蛋白质复合物(泳道2、3)。抗组蛋白标签抗体(anti-His tag Ab)可使DNA-蛋白质结合条带减弱(泳道4)。

A: free probe 15 and probe WT-2 were represented lane 1 and lane 6, respectively. The nuclear proteins of THP-1 cells were incubated with biotin-11-dUTP labeled probe 15 (lanes 2, 3, 4, and 5) or biotin-11-dUTP labeled probe WT-2 (lanes 7, 8 and 9). In addition, lanes 3, 4 and 5 contain differing amounts (900, 1 125, 1 350-fold excess) of unlabeled WT-2 competitor probe respectively. Lane 8 and lane 9 contain differing amounts (675, 1 125-fold excess) of unlabeled probe 15 respectively. B: recombinant Elk-1 protein bind to probe 15 (lane 2 and lane 3). The DNA-protein complexes were been decreased in the presence of the anti-His tag antibody (lane 4).

图4 探针15的竞争性EMSA结果及探针15结合重组Elk-1

Fig.4 The results of competitive EMSA of probe 15 and probe 15 bound by recombinant Elk-1 protein

未标记探针15竞争生物素标记WT-2探针(图4A, 泳道8、9, 探针15较标记探针WT-2用量分别675倍、1 125倍)可出现类似结果。

2.4 探针15可结合重组人Elk-1

利用重组人Elk-1与探针15进行EMSA实验, 结果可出现迁移条带(图4B, 泳道2、3)。重组蛋白Elk-1的N-端带有谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferase, GST)标签, GST标签的N-端带有10His标签, 在凝胶电泳迁移过程中出现较用细胞核蛋白形成的DNA-蛋白质结合带有滞后的现象。利用重组蛋白Elk-1、抗His标签抗体、探针15进行的超迁移实验, 虽未出现明显超迁移条带但可见加入抗His标签抗体的DNA-蛋白质结合条带减弱(图4B, 泳道4)。用抗GST标签抗体进行超迁移实验也出现同样的结果。

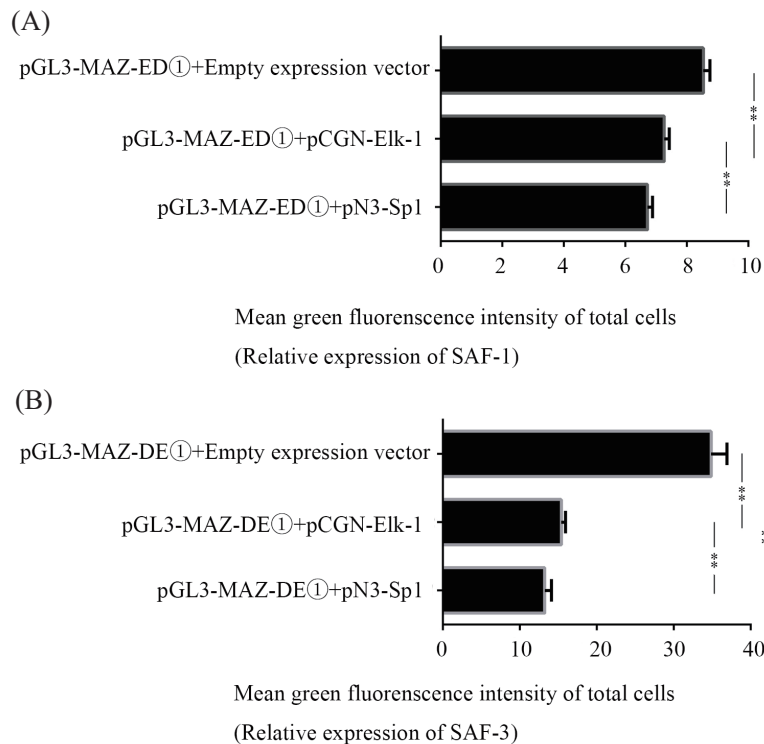
2.5 Elk-1可抑制SAF-1和SAF-3的表达

pCGN-Elk-1/空表达质粒/pN3-Sp1与pGL3-MAZ-ED①共转染HeLa细胞48 h后, 流式细胞术检测绿色荧光蛋白, 以总细胞的绿色荧光平均荧光强度反映SAF-1表达情况(图5A); 另一组pCGN-Elk-1/

空表达质粒/pN3-Sp1与pGL3-MAZ-DE①共转染HeLa细胞48 h后, 流式细胞术检测绿色荧光蛋白, 以总细胞的绿色荧光蛋白平均荧光强度反映SAF-3表达情况(图5B)。流式细胞术数据经统计学分析显示, 实验组pCGN-Elk-1+pGL3-MAZ-ED①与阴性对照组空表达质粒+pGL3-MAZ-ED①存在极显著差异($P<0.01$); 实验组pCGN-Elk-1+pGL3-MAZ-DE①与阴性对照组空表达质粒+pGL3-MAZ-DE①存在极显著差异($P<0.01$)。这说明, 转录因子Elk-1可抑制SAF-1和SAF-3的表达, 且转染同等剂量的pCGN-Elk-1对SAF-3表达的抑制作用强于对SAF-1表达的抑制。激光共聚焦显微镜实验所用报告质粒为pGL3-MAZ-ED②, 红色、绿色荧光分别代表SAF-3和SAF-1的表达情况。结果显示, 过表达Elk-1后, 表达红色、绿色荧光蛋白的细胞数量以及荧光强度较阴性对照组均有减少(图6)。

2.6 Elk-1抑制MAZ表达的作用弱于Sp1对MAZ表达的抑制

流式细胞术结果显示, 实验组 pCGN-Elk-1+



A: 流式细胞术检测的绿色荧光反映SAF-1的相对表达水平的分析, $**P<0.01$; B: 流式细胞术检测的绿色荧光反映SAF-3的相对表达水平的分析, $**P<0.01$ 。

A: flow cytometry analysis of relative expression of SAF-1 was performed by detecting green fluorescence, $**P<0.01$; B: flow cytometry analysis of relative expression of SAF-3 was performed by detecting green fluorescence, $**P<0.01$.

图5 流式细胞术检测转录因子Elk-1对SAF-1和SAF-3表达的抑制作用

Fig.5 SAF-1 and SAF-3 expression status with Elk-1 over-expression assayed by flow cytometry

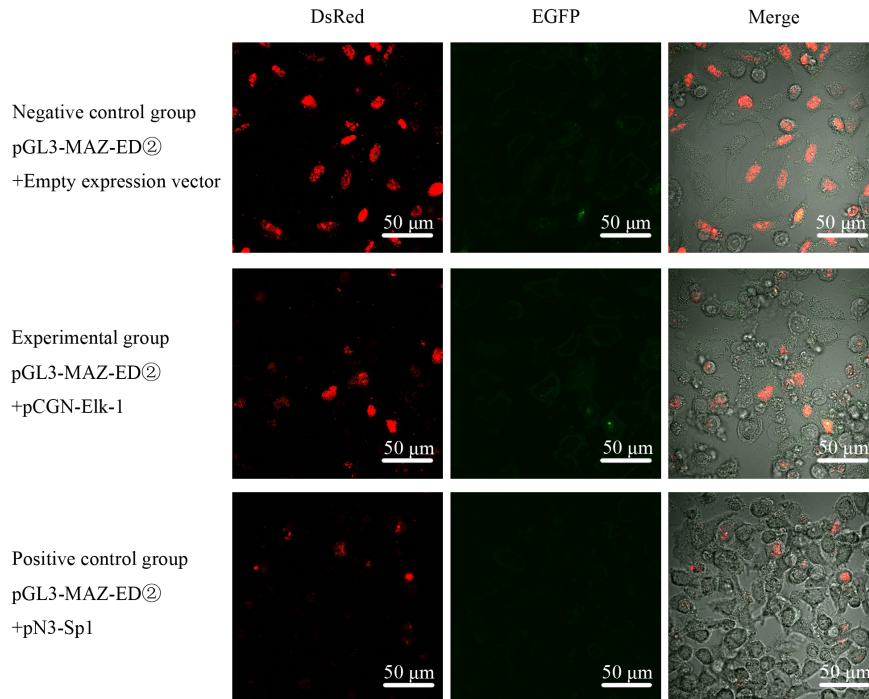


图6 激光共聚焦显微镜检测转录因子Elk-1对SAF-1和SAF-3表达的抑制作用

Fig.6 Observation of SAF-1 and SAF-3 signal with Elk-1 over-expression under laser confocal scanning microscopy

pGL3-MAZ-ED①与阳性对照组 pN3-Sp1+pGL3-MAZ-ED①存在极显著差异($P<0.01$)(图5A); 实验组 pCGN-Elk-1+pGL3-MAZ-DE①与阳性对照组 pN3-Sp1+pGL3-MAZ-DE①存在极显著差异($P<0.01$, 图5B)。这说明, Elk-1对MAZ基因表达的抑制作用不及Sp1对MAZ表达的抑制。激光共聚焦显微镜实验结果显示, 阳性对照组(pN3-Sp1+pGL3-MAZ-ED②)较实验组pCGN-Elk-1+pGL3-MAZ-ED②检测到红色绿色荧光强度和含红色绿色荧光细胞数少(图6)。

3 讨论

近年来, MAZ基因异常表达参与乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌和非小细胞型肺癌等肿瘤的进程屡见报道。转录因子MAZ含锌指蛋白结构域, 在许多炎症反应基因的表达和肿瘤微环境调节基因表达调控过程中MAZ起重要作用。Ray等^[5]发现, 在乳腺癌细胞中SAF-1和Ras涉及一个正反馈调控网络, 两者表达水平增高导致血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)基因表达增加进而促进肿瘤组织的血管生成。在非小细胞肺癌中, MAZ抑制锌指转录因子4(GATA binding protein 4, GATA4)基因表达作用的减弱以及Myc对GATA4启动子作用的增加导致GATA4表达的增加, 结果致使癌

细胞转移活力增加^[4]。由此, 对于MAZ基因表达的研究显得尤为重要。MAZ作为看家基因, 启动子区具有典型特征: G+C含量(88.4%)高; 高频率的CpG双核苷酸, 尤其在翻译起始点上游的0.5 Kb区域; 缺乏典型的TATA盒和CAAT盒^[1]。据Song等^[6]报道, MAZ和Sp1可各自识别并结合富含GC的GGGAGGG和GGGCGG序列, 前者可招募组蛋白脱乙酰基酶抑制其自身表达, 后者通过招募DNA甲基转移酶下调MAZ基因表达。多启动子启动转录及选择性剪接作用导致MAZ基因在同一开放阅读框下表达不同的产物, 其中SAF-1和SAF-3的反式激活能力: SAF-3>SAF-1; 在炎症条件下, SAF-1的表达无明显变化, SAF-3的表达增加^[7]。不同功能产物影响MAZ自身的表达, 这使得调控MAZ表达的机制十分复杂。本文通过PROMO在线软件和EMSA体外筛选MAZ启动子区-948—1 nt序列中转录因子结合位点, 发现MAZ基因启动子区存在可与THP-1细胞核蛋白结合并形成明显的DNA-蛋白质复合物的转录因子结合位点。根据PROMO软件转录因子结合位点的预测结果对相应DNA序列进行突变, 结果仍有突变探针可结合THP-1细胞核蛋白。为了深入研究何种转录因子参与MAZ基因表达调控, 我们重点关注-525~-504 bp序列(探针15)。在探针15相应突变探针的

EMSA实验中, 我们所使用的细胞核蛋白为HeLa细胞核蛋白。PROMO软件预测探针15可能存在转录因子E2F-1、STAT4、cEts-1、Elk-1、RXR-alpha、Egr-3和TFII-I的结合位点, 而对探针15进行一系列突变发现, 改变PROMO预测的Elk-1结合位点序列的探针则不能与HeLa细胞核蛋白形成DNA-蛋白质复合物, 这提示结合探针15的可能为转录因子Elk-1。以下三个实验结果证实, 转录因子Elk-1可结合MAZ基因启动子区-525~504 bp序列: (1)利用Canbaz等^[8]报道的可结合Elk-1探针WT-2可竞争性抑制探针15和THP-1细胞核蛋白结合; (2)人重组蛋白Elk-1可结合探针15(两个批次购买均有阳性结果); (3)标签抗体可使DNA-重组Elk-1结合条带减弱。本文又进一步探究可结合MAZ启动子区的Elk-1如何调控MAZ基因的表达, 在HeLa细胞中过表达Elk-1后检测可反映SAF-1和SAF-3表达情况的双色荧光报告系统SAF-1和SAF-3表达的变化。所用到的MAZ启动子驱动不同转录本实时表达的双色(红色绿色)荧光报告系统是参照Orengo等^[9]报道的双色荧光报告系统的原理构建的, 且利用RT-qPCR在RNA水平证实, 所构建的双色荧光报告质粒可反映SAF-1和SAF-3的表达情况(相关数据另文报道)。细胞学实验结果显示, Elk-1可抑制SAF-1和SAF-3的表达, 且Elk-1对SAF-3的抑制作用更强。而相比已证实的Sp1可抑制MAZ表达, Elk-1对MAZ表达的抑制作用不及Sp1。由于Elk-1可抑制MAZ表达且对SAF-1和SAF-3的抑制程度存在差异, 这为未来探究MAZ基因异常表达导致肿瘤等疾病的有效治疗方案提供了理论基础和方向。然而, 本文并未对除探针15外的其他EMSA阳性结果探针进行深入研究。MAZ启动子区-525~-504 bp(探针15)包含ETS家族成员可共同识别的核心序列, 尚不能排除Elk-1外的其他ETS家族成员结合该DNA序列。目前, 对于Elk-1可调控MAZ基因的表达的研究也仅限于体外实验, 在体内, Elk-1是否调控MAZ基因表达以及调控的机制、不同组织Elk-1对MAZ基因表达的影响是否存在差异, 这些问题有待我们进一步探究。

转录因子Elk-1是ETS结构域转录因子家族的TCF亚家族成员之一, 可与血清效应因子(serum response factor, SRF)在*c-fos*等基因的血清效应元件(serum response element, SRE)上形成三元复合物, 并通过三元复合物形式调控靶基因的转录激

活。Elk-1可发生两种形式的改变, 一是在一些因素刺激下可由丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)作用发生磷酸化改变而活化, 二是Elk-1发生类泛素化修饰(SUMOylation)而失活, 两种形式的改变导致Elk-1调控的靶基因表达也发生变化进而影响相应疾病的进展。有研究在特发性肺间质纤维化的肺组织中, 缺少Elk-1会导致整合素 $\beta 6$ (integrin $\beta 6$, *ITGB6*)基因表达增加, 进而加剧肺间质的纤维化^[10]。在肝癌细胞中, 精子相关抗原9(sperm-associated antigen 9, SPAG9)诱导的肿瘤细胞转移和侵袭依赖Elk-1的表达^[11]。除此以外, Elk-1还参与结肠癌^[12]、膀胱癌^[13]、乳腺癌^[14]等肿瘤和遗传性痉挛性截瘫^[9]等疾病的进程。

综上所述, 本文研究并首次报道了Elk-1可结合MAZ启动子区-525~-504 bp的DNA序列; Elk-1在体外实验中可抑制MAZ基因的表达, 抑制SAF-3表达作用强于抑制SAF-1; Elk-1对MAZ表达的抑制作用较Sp1对MAZ的抑制作用弱。这为MAZ异常表达所致疾病的病理机制和有效治疗方案的研究提供了理论基础。

致谢——

承蒙山西医科大学转化医学中心崔永萍教授、流式细胞分析室窦岩老师及基础医学院生理系激光共聚焦显微镜室老师的大力协助, 使本文得以完成, 在此表示衷心感谢!

参考文献 (References)

- 1 Song J, Murakami H, Tsutsui H, Tang X, Matsumura M, Itakura K, *et al.* Genomic organization and expression of a human gene for Myc-associated zinc finger protein (MAZ). *J Biol Chem* 1998; 273(32): 20603-14.
- 2 Ray BK, Shakya A, Ray A. Vascular endothelial growth factor expression in arthritic joint is regulated by SAF-1 transcription factor. *J Immunol* 2007; 178(3): 1774-82.
- 3 Zhu X, Luo W, Liang W, Tang F, Bei C, Ren Y, *et al.* Overexpression and clinical significance of Myc-associated zinc finger protein in pancreatic carcinoma. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 7493-501.
- 4 Castro IC, Breiling A, Luetkenhaus K, Ceteci F, Hausmann S, Kress S, *et al.* Myc-induced epigenetic activation of GATA4 in lung adenocarcinoma. *Mol Cancer Res* 2013; 11(2): 161-72.
- 5 Ray A, Ray BK. Induction of Ras by SAF-1/MAZ through a feed-forward loop promotes angiogenesis in breast cancer. *Cancer Med* 2015; 4(2): 224-34.
- 6 Song J, Ugai H, Kanazawa I, Sun K, Yokoyama KK. Independent repression of a GC-rich housekeeping gene by Sp1 and MAZ

- involves the same cis-elements. *J Biol Chem* 2001; 276(23): 19897-904.
- 7 Ray A, Dhar S, Shakya A, Ray P, Okada Y, Ray BK. SAF-3, a novel splice variant of the SAF-1/MAZ/Pur-1 family, is expressed during inflammation. *FEBS J* 2009; 276(15): 4276-86.
- 8 Canbaz D, Kırımtay K, Karaca E, Karabay A. SPG4 gene promoter regulation via Elk1 transcription factor. *J Neurochem* 2011; 117(4): 724-34.
- 9 Orengo JP, Bundman D, Cooper TA. A bichromatic fluorescent reporter for cell-based screens of alternative splicing. *Nucleic Acids Res* 2006; 34(22): e148.
- 10 Tatler AL, Habgood A, Porte J, John AE, Stavrou A, Hodge E, *et al.* Reduced Ets domain-containing protein Elk1 promotes pulmonary fibrosis via increased integrin $\alpha\beta6$ expression. *J Biol Chem* 2016; 291(18): 9540-53.
- 11 Yan Q, Lou G, Qian Y, Qin B, Xu X, Wang Y, *et al.* SPAG9 is involved in hepatocarcinoma cell migration and invasion via modulation of ELK1 expression. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 1067-75.
- 12 Hollander D, Donyo M, Atias N, Mekahel K, Melamed Z, Yannai S. A network-based analysis of colon cancer splicing changes reveals a tumorigenesis-favoring regulatory pathway emanating from ELK1. *Genome Res* 2016; 26(4): 541-53.
- 13 Kawahara T, Shareef HK, Aljarah AK, Ide H, Li Y, Kashiwagi E, *et al.* ELK1 is up-regulated by androgen in bladder cancer cells and promotes tumor progression. *Oncotarget* 2015; 6(30): 29860-76.
- 14 Booy EP, Henson ES, Gibson SB. Epidermal growth factor regulates Mcl-1 expression through the MAPK-Elk-1 signalling pathway contributing to cell survival in breast cancer. *Oncogene* 2011; 30(20): 2367-78.