

信号转导和转录激活因子 3 调节肿瘤 坏死因子 α 表达的结合位点研究*

杨丽萍^{1, 2)} 姚咏明^{2)**} 叶棋浓³⁾ 盛志勇²⁾

⁽¹⁾ 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071; ⁽²⁾ 解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所, 北京 100048;

⁽³⁾ 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

摘要 脓毒症早期内毒素(脂多糖, LPS)可激活丝裂原活化蛋白激酶通路, 诱导肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等多种炎性细胞因子大量生成. TNF- α 作为一种重要的早期炎症介质, 间接激活 Janus 激酶 / 信号转导和转录激活因子(JAK/STAT)通路. STATs 活化后直接进入核内参与 LPS 诱导的基因表达. 本研究拟探讨 STAT3 在 TNF- α 启动子上的作用位点, 为深入认识 JAK/STAT 信号通路在脓毒症发生中的分子基础及其干预途径提供理论依据. a. 将 Flag-STAT3 与全长 TNF- α 启动子报告基因共同转染 COS-7 细胞, 观察 STAT3 作用的剂量 - 效应. 结果证实, STAT3 对 TNF- α 基因的表达不受 LPS 调节, 无论是否有 LPS 刺激, 随着 STAT3 剂量的增加, TNF- α 基因的表达亦随之增加. 在将 200 μ g/L 浓度的 Flag-STAT3 质粒分别与不同长度的 TNF- α 启动子报告基因质粒共同转染 COS-7 细胞并用 LPS 刺激, 观察不同片段的 TNF- α 启动子活性. 结果发现, 95 bp 片段的 TNF- α 缺失突变体作用最为明显, 增加了 6.9 倍. b. 分别构建了 70 bp、75 bp、80 bp 和 85 bp 片段的 TNF- α 缺失突变体——pTNF- α (70 bp)、pTNF- α (75 bp)、pTNF- α (80 bp)和 pTNF- α (85 bp), 将它们与 Flag-STAT3 共同转染 COS-7 细胞并用 LPS 刺激, 观察到 85 bp 片段的活性与 95 bp 片段相似, 当片段到达 80 bp 时, 活性降低到对照水平. 为了进一步了解其精确结合位点, 将 85 bp 片段突变体的 81 和 82 位碱基突变, 检测其对 TNF- α 活性影响, 发现启动子活性下降. c. 为了证明 STAT3 的潜在结合位点在 80 bp 到 85 bp 之间, 且 81 和 82 位这 2 个位点的突变确实改变了 STAT3 对 TNF- α 启动子活性, 进行凝胶迁移阻滞实验, 观察到 TNF- α 启动子 62~85 bp 的野生型 γ -³²P 标记的探针可以与核蛋白 STAT3 结合, 而突变的 62~85 bp 标记的探针不能与核蛋白 STAT3 结合. 上述结果表明, STAT3 对 TNF- α 基因表达的调节不依赖 LPS 的刺激, STAT3 在 TNF- α 启动子的潜在结合位点是在 80 到 85 碱基片段之间.

关键词 信号转导及转录激活因子 3, 肿瘤坏死因子 α , 脂多糖

学科分类号 R374+1.1, R392.3

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00196

近年来的研究提示, 信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription, STAT)与脓毒症(sepsis)病理过程中失控性炎症反应密切相关^[1-2]. 据报道, 腹腔巨噬细胞受到内毒素(脂多糖, lipopolysaccharide, LPS)刺激后, Janus 激酶(Janus kinase, JAK) 2、STAT1 和 STAT3 在 2 h 内被激活, 尤其是 STAT3 反应迅速, 其活性在刺激后 10 min 即非常活跃, 3 h 达到高峰^[3]. 既往研究证实, LPS 刺激单核 / 巨噬细胞可引起肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)迅速合成与释放, 并进一步诱导其他细胞因子的产生. 目前, STAT3 引起 TNF- α 合成和释放的具体作用环节仍

不清楚^[4]. 因此, 本研究拟着手探讨 STAT3 在 TNF- α 启动子的作用位点, 为深入探索 JAK/STAT3 信号通路调控 TNF- α 合成的分子机制提供理论依据.

* 国家自然科学基金(30672178, 81071545)和国家重点基础研究发展计划(973)(2012CB518102)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-66867394, E-mail: c_ff@sina.com

收稿日期: 2011-05-09, 接受日期: 2011-07-14

1 材料与方法

1.1 材料

pc-DNA3 载体购自 Promega 公司；人乳腺 cDNA 文库(Human normal mammary library)购自 Clontech 公司；人全长 TNF- α 启动子的报告基因质粒由北京大学顾军教授馈赠；pRC/CMV-Flag-STAT3 由军事医学科学院沈倍奋院士赠送；大肠杆菌脂多糖购自 Sigma 公司；pGL3-Basic 载体、大肠杆菌 DH5 α 、COS7 细胞、表达 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, β -gal)活性由军事医学科学院实验动物中心保存；限制性内切酶、DNA 连接酶、Taq 酶购自 TaKaRa 公司；DMEM 培养基、Lipofectamine2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司；质粒提取试剂盒和 DNA 回收试剂盒购自 Qiagen 公司；TNT Quick 体外翻译试剂盒、荧光素酶(luciferase)检测试剂盒购自 Promega 公司。

1.2 不同长度 TNF- α 启动子缺失突变体的构建

1.2.1 TNF- α 启动子全长序列. GGGAAGCAAA-GGAGAAGCTGAGAAGATGAAGGAAAAGTCAG-GGTCTGGAGGGGCGGGGGTCAGGGAGCTCCT-GGGAGATATGGCCACATGTAGCGGCTCTGAG-GAATGGGTTACAGGAGACCTCTGGGGAGATG-TGACCACAGCAATGGGTAGGAGAATGTCCAG-GGCTATGGAAGTCGAGTATCGGGGACCCCCC-CTTAACGAAGACAGGGCCATGTAGAGGGCCCC-CAGGGAGTGAAAGAGCCTCCAGGACCTCCAG-GTATGGAATACAGGGGACGTTTAAGAAGATA-TGGCCACACACTGGGGCCCTGAGAAGTGAGA-GCTTCATGAAAAAATCAGGGACCCACAGAGT-TCCTTGGAAGCCAAGACTGAAACCAGCATTA-TGAGTCTCCGGGTCAGAATGAAAGAAGAAGG-CCTGCCCCAGTGGTCTGTGAATTCCCGGGGGT-TTCACTCCCCGGGGCTCTCCAGGCTTGTCCC-TGCTACCCCCACCCAGCCTTTCCTGAGGCCTC-AAGCTGCCACCAAGCCCCCAGCTCCTTCTCCC-CGCAGACCCAAACACAGGCCTCAGGACTCAA-CACAGCTTTTCCCTCCAACCCCGTTTTCTCTCC-CTCAAGGACTCAGCTTTCTGAAGCCCCTCCCA-GTTCTATCTTTTTCCTGCATCCTGTCTGGAAGT-TAGAAGGAAACAGACCACAGACCTGGTCCCC-AAAAGAAATGGAGGCAATAGGTTTTGAGGGG-CATGGGGACGGGGTTCAGCCTCCAGGGTCCT-ACACACAAATCAGTCAGTGGCCCAGAAGACC-

CCCCTCGGAATCGGAGCAGGGAGGAGGGAGG-ATGGGGAGTGTGAGGGGTATCCTTGATGCTTG-TGTGTCCCCAACTTTCCAAATACCCGCCCCCG-CGATGGAGAAGAAACCGAGACAGAAGGTGCA-GGGCCCACTACCGCTTCCTCCAGATGAGCTTA-TGGGTTTCTCCACCAAGGAAGTTTTCCGCTGG-TTGAATGATTCTTTCCCCGCCCTCCTCTCGCCC-CAGGGACATATAAAGGCAGTTGTTGGCACAC-CCAGCCAGCAGACGCTCCCTCAGCAAGGACA-GCAGAGGACCAGCTAAGAGGGAGAGAAGCA-ACTGCAGACCCCCCTGAAAACAACCCTCAG-ACGCCACATCCCC.

1.2.2 引物设计及 PCR 扩增. 根据 pGL3-Basic 载体的多克隆位点图谱, 设计 TNF- α 启动子 1~70, 1~75, 1~80, 1~85 和 1~85 Δ (81 和 82 位点突变)片段带有 *Kpn* I 酶切位点的上游引物 P5, P6, P7, P8 和 P9. 分别是 P5: 5' CG GGATCC ATG GCG GCG GCG GCG 3'; P6: 5' CG GGATCC ATG GCG GCG GCG GCG 3'; P7: 5' CG GGATCC ATG GCG GCG GCG GCG 3'; P8: 5' CG GGATCC ATG GCG GCG GCG GCG 3'; P9: 5' CG GGATCC ATG GCG GCG GCG GCG 3' 和带有 *Hind* III 酶切位点的下游引物 P10: 5' CG GGATCC ATG GCG GCG GCG GCG 3'. PCR 引物由北京奥科生物公司合成和纯化. PCR 模板为人的全长 TNF- α 启动子的报告基因质粒. PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 52 $^{\circ}$ C 复性 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环.

1.2.3 真核表达载体的酶切鉴定与测序. 将纯化后的上述 PCR 产物经 *Kpn* I 和 *Hind* III 酶切后连接到经同样酶切的 pGL3-Basic 载体中, 转化大肠杆菌 DH5 α , 提取转化质粒. 采用以上两种内切酶进行酶切鉴定, 得到目的基因大小片段的克隆判定为阳性克隆, 然后进行测序.

1.3 细胞培养

COS-7 细胞为军事医学科学院实验动物中心保存, 细胞用含有 10% 的新生牛血清和双抗 DMEM 培养基于 CO₂ 培养箱(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)中培养. 转染前 24 h 将细胞接种于灭菌的 24 孔板, 细胞密度大约为 90%.

1.4 转录激活活性检测

蛋白质转录激活活性即为它们对报告基因的转录激活能力. 在每一转染实验中, 同时转染表达某种蛋白质的重组质粒、报告基因质粒和表达 β -半

乳糖苷酶的质粒. 蛋白质转录激活活性即为同一孔中荧光素酶活性与 β - 半乳糖苷酶活性比值. β - 半乳糖苷酶起着校正细胞转染效率的作用.

1.4.1 STAT3 对全长 TNF- α 启动子活性的浓度效应. 将 pcDNA3-Flag-STAT3 按照浓度梯度转染 COS-7 细胞, 同时转染全长 TNF- α 启动子报告基因, 以 8×10^4 个 / 孔密度接种 COS-7 细胞于 24 孔板内, 待细胞生长密度达到 80%~90% 时进行转染. 各组转染的质粒总量为 0.2 μg / 孔, 阴性对照为 pcDNA3 空载体, 质粒 pcDNA3-Flag-STAT3 用量分别为 0.05 μg / 孔、0.1 μg / 孔、0.15 μg / 孔和 0.2 μg / 孔, 各组用 pcDNA3 空载体补平. 所有孔的全长 TNF- α -luciferase 用量为 0.1 μg / 孔,

β -gal 用量为 0.05 μg / 孔, Lipofectamine2000 用量为 1 μl / 孔.

1.4.2 STAT3 对不同长度 TNF- α 启动子缺失突变体浓度效应. 将 pcDNA3-Flag-STAT3 按照 200 μg /L 转染 COS-7 细胞, 同时转染各个片段的 TNF- α 启动子报告基因. 以 8×10^4 个 / 孔密度接种 COS-7 细胞于 24 孔板内, 待细胞生长密度达到 80%~90% 时进行转染. 每个片段的报告基因均以 pcDNA3 空载体为阴性对照; 各个片段的 TNF- α 启动子报告基因用量为 0.1 μg / 孔, β -gal 用量为 0.05 μg / 孔, Lipofectamine2000 用量为 1 μl / 孔, 具体分组设计如表 1.

Table 1 Experimental groups of STAT3 on different length TNF- α promoter deletion mutant activity			
Group	DNA fragment/bp	Promoter reporter gene	Control
1	65	TNF- α -luciferase-65/pcDNA3	pcDNA3-Flag-STAT3
2	95	TNF- α -luciferase-95/pcDNA3	
3	120	TNF- α -luciferase-120/pcDNA3	
4	161	TNF- α -luciferase-161/pcDNA3	
5	615	TNF- α -luciferase-615/pcDNA3	
6	1135	TNF- α -luciferase-1135/pcDNA3	
7	85	TNF- α -luciferase-85/pcDNA3	pcDNA3-Flag-STAT3
8	95	TNF- α -luciferase-95/pcDNA3	
9	70	TNF- α -luciferase-70/pcDNA3	
10	75	TNF- α -luciferase-75/pcDNA3	pcDNA3-Flag-STAT3
11	80	TNF- α -luciferase-80/pcDNA3	
12	85	TNF- α -luciferase-85/pcDNA3	pcDNA3-Flag-STAT3
13	85	TNF- α -luciferase-85 /pcDNA3	
14	85 Δ	TNF- α -luciferase-85 Δ /pcDNA3	

1.5 凝胶迁移阻滞实验

凝胶迁移阻滞实验(electrophoretic mobility shift assays, EMSA)是近年发展起来的研究核酸与蛋白质相互作用的简单、快速、敏感方法. 目前已经成为转录因子研究的经典方法, 其基本原理是, 蛋白质可以与末端标记的核酸探针结合, 电泳时这种复合物比无蛋白质结合的探针在凝胶中泳动的速度慢, 即表现为相对滞后.

1.5.1 探针设计. 应用 γ - ^{32}P 标记 TNF- α 中 62~85 位之间的 DNA 片段. 探针: 野生型 5' CAA-GGAAFTTTT CCGCTGGTTGAA 3' 和 5' TTCAAC CAGCGGA AA ACT T CC TTG 3'; 突变型 5' CAA-TTAAFTTTT CCGCTGGTTGAA 3' 和 5' TTCAAC-CAGC GGAAAACTTAATTG 3'.

1.5.2 EMSA. 收集两个 10 cm 培养皿的 293T 细胞提取核蛋白 STAT3, 然后进行 EMSA 实验. 分组如下: 第一组, 标记的野生型探针和结合缓冲液混合液; 第二组, 核蛋白 STAT3, 标记的野生型探针, 结合缓冲液混合液和抗 STAT3 抗体; 第三组, 核蛋白 STAT3, 标记的野生型探针, 结合缓冲液和 100 倍标记探针的未标记探针混合液; 第四组, 核蛋白 STAT3, 标记的突变型探针和结合缓冲液混合液. 每组体系大小相同, 不足用水补平.

2 结 果

2.1 不同长度 TNF- α 启动子扩增和鉴定

将从全长 TNF- α 启动子进行 PCR 扩增得到的 PCR 产物用 2% 琼脂糖电泳, 可见在 100 bp 附近

有一条带,与预计的目的片段大小位置相符(图 1a). 不同长度 TNF- α 启动子缺失突变体分别经 *Kpn* I /

*Hind*III 双酶切后,分别产生约 70/75/80/85/85 Δ 大小的目的片段,结果如图 1a~d.

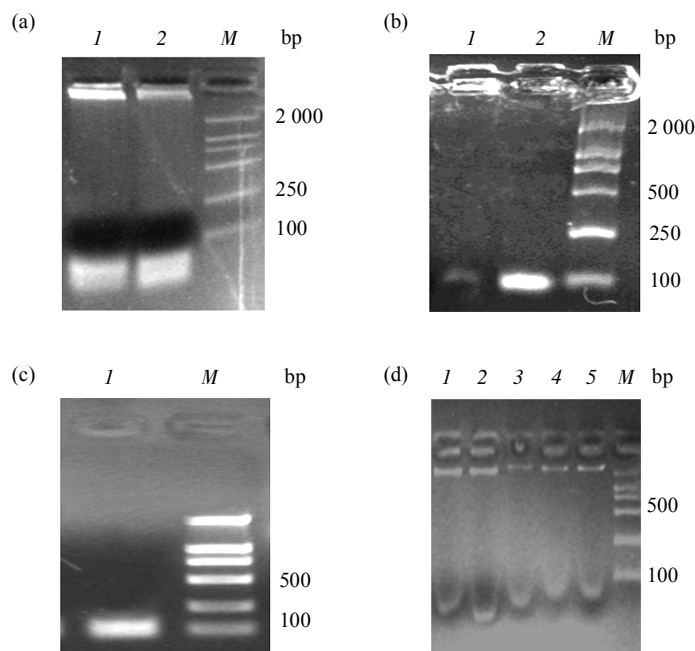


Fig. 1 PCR of different length TNF- α promoter and identification of different TNF- α promoter recombinant vectors

(a) 1: PCR product of 70 bp fragment; 2: PCR product of 85 bp fragment; M: DNA marker. (b) 1: PCR product of 75 bp fragment; 2: PCR product of 80 bp fragment; M: DNA marker. (c) 1: PCR product of 85 Δ bp fragment; M: DNA marker. (d) 1: Double restriction enzyme digestion of pTNF- α (75 bp); 2: Double restriction enzyme digestion of pTNF- α (70 bp); 3: Double restriction enzyme digestion of pTNF- α (80 bp); 4: Double restriction enzyme digestion of pTNF- α (85 bp); 5: Double restriction enzyme digestion of pTNF- α (85 Δ bp); M: DNA marker.

2.2 STAT3 对全长 TNF- α 启动子活性的剂量效应

如图 2 所示,当转染到 COS-7 细胞的 STAT3 质粒从 50 ng/孔增加到 200 ng/孔时, TNF- α 启动子活性值在未加 LPS 刺激时从 5.83 增加到 14.97 倍,在 LPS 刺激后从 6.39 增加到 13.60 倍。

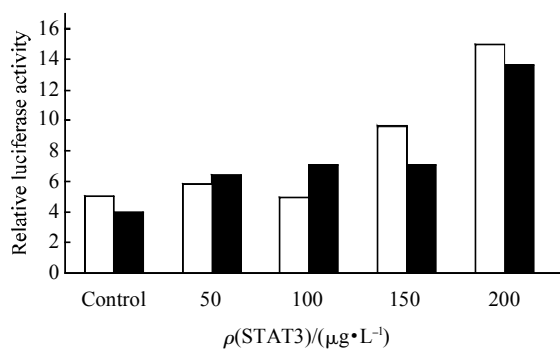


Fig. 2 Dose-dependent response of STAT3 on full length TNF- α promoter activity with or without LPS stimulation
□: -LPS; ■: +LPS.

2.3 STAT3 对不同长度 TNF- α 启动子缺失突变体活性影响

将 200 μ g/L 的 STAT3 质粒分别与不同长度的 TNF- α 启动子报告基因质粒共同转染进入 COS-7 细胞. 结果发现,与各自空载体相比, STAT3 与 95 bp 片段作用最明显, 120 bp 片段次之, 分别增加了 6.90 和 2.80 倍, 161 bp 片段和全长分别增加了 2.01 和 1.53 倍(图 3).

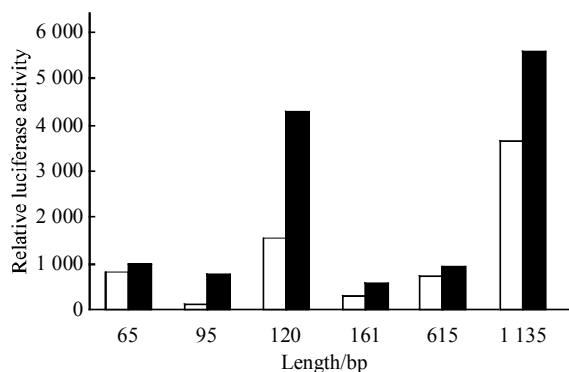


Fig. 3 Effect of STAT3 on different length TNF- α promoter mutant activity
□: pcDNA3; ■: TNF- α promoter.

2.4 STAT3 对重新构建的 TNF- α 启动子缺失突变体活性的影响

为了进一步明确 p38 和 STAT3 蛋白的相互作用是否调节它们共同的下游基因 TNF- α , 我们将这两种质粒和 TNF- α 全长启动子报告基因共同转染 293T 细胞, 转染 4 h 后用 LPS 刺激, 24 h 后收集细胞检测荧光素值。

基于以上结果, 在对 TNF- α 启动子碱基片段进行生物学信息分析后发现, 在 70 bp 与 95 bp 之间可能存在与 STAT3 结合位点相似的序列。因此, 我们重新构建了不同长度的 TNF- α 启动子缺失突变体, 并检测其对 TNF- α 启动子活性的影响。

2.4.1 STAT3 对 70 bp、85 bp 和 95 bp 大小 TNF- α 启动子缺失突变体活性的影响。将 200 ng/孔 STAT3 与 70 bp、85 bp 和 95 bp 大小的 TNF- α 启动子缺失突变体共同转染 COS-7 细胞, 结果显示, 85 bp 的突变体与空载体相比活性增加了 1.88 倍, 95 bp 的突变体与空载体相比增加了 1.60 倍, 而 70 bp 的突变体与空载体相比没有明显变化(图 4)。

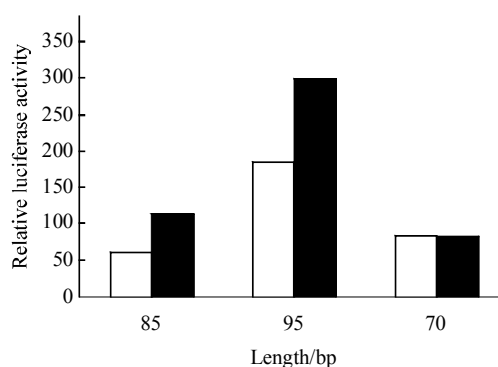


Fig. 4 Effect of STAT3 on 70 bp, 85 bp and 95 bp TNF- α promoter mutant activity
□: pcDNA3; ■: TNF- α promoter.

2.4.2 STAT3 对 75 bp、80 bp 和 85 bp 大小的 TNF- α 启动子缺失突变体活性的影响。将 200 ng/孔 STAT3 与 75 bp、80 bp 和 85 bp 大小的 TNF- α 启动子缺失突变体共同转染 COS-7 细胞, 结果显示, 75 bp 的突变体与空载体相比活性增加了 1.71 倍, 80 bp 的突变体与空载体相比增加了 1.15 倍, 而 85 bp 的突变体与空载体相比增加了 1.67 倍(图 5)。

2.4.3 STAT3 对 85 bp 和 85 Δ bp 大小的 TNF- α 启动子缺失突变体活性的影响。将 200 ng/孔 STAT3

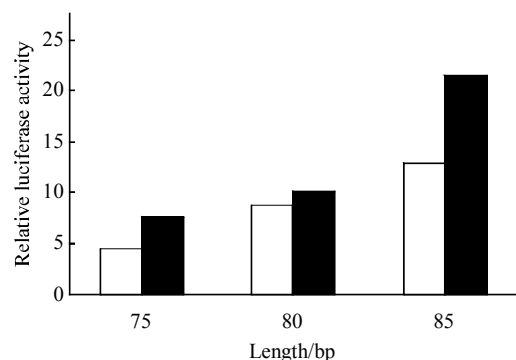


Fig. 5 Effect of STAT3 on 75 bp, 80 bp and 85 bp TNF- α promoter mutant activity
□: pcDNA3; ■: TNF- α promoter.

与 85 bp 和 85 Δ bp 大小的 TNF- α 启动子缺失突变体共同转染 COS-7 细胞, 结果显示, 85 bp 的突变体与空载体相比活性增加了 2.87 倍, 85 Δ bp 的突变体与空载体相比降低了 85.4%(图 6)。

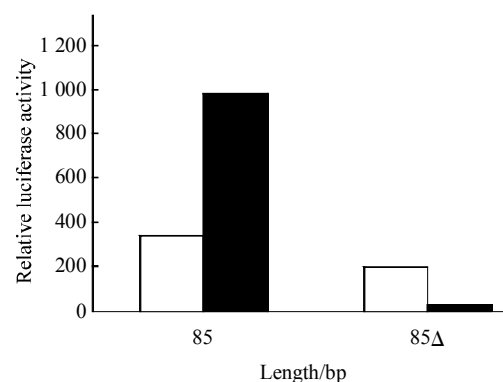


Fig. 6 Effect of STAT3 on 85 bp and 85 Δ bp TNF- α promoter mutant activity
□: pcDNA3; ■: TNF- α promoter.

2.5 STAT3 核蛋白与 TNF- α 启动子区域的 62~85 DNA 片段的凝胶迁移阻滞实验

将体外转染进入 293T 的 STAT3 核蛋白分别与 γ - 32 P 标记的野生型和突变型 62~85 DNA 片段进行 EMSA, 结果发现, STAT3 蛋白与野生型的 62~85 DNA 片段结合, 未与突变型的 62~85 DNA 片段结合(图 7)。

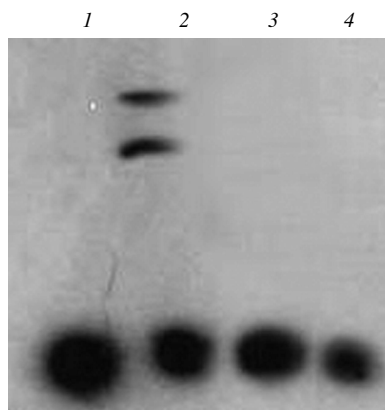


Fig. 7 STAT3 nucleic protein binding to wild 62~85 DNA fragment while without binding to mutant 62~85 DNA fragment tagged with γ - ^{32}P on TNF- α promoter

1: Mutant 62~85 probe without STAT3 nucleic protein; 2: Wild 62~85 probe with STAT3 nucleic protein; 3: 100-fold wild 62~85 probe tagged without γ - ^{32}P with STAT3 nucleic protein; 4: Mutant 62~85 probe with STAT3 nucleic protein.

3 讨 论

TNF- α 是重要的早期炎症介质, 可介导脓毒性休克的发病过程^[5-6]。业已明确, 内毒素刺激单核/巨噬细胞可引起 TNF- α 迅速合成与释放, 并进一步诱导其他细胞因子的产生。炎症反应过程中细胞因子之间存在复杂的网络效应, 例如血小板活化因子可刺激中性粒细胞和血管内皮细胞大量释放 TNF- α 和 IL-1, 后者反过来又进一步促进巨噬细胞、内皮细胞生成血小板活化因子。这些细胞因子相互作用, 导致失控性炎症反应的发生与发展, 严重时可能造成致死性休克乃至死亡。

TNF- α 的基因表达过程非常复杂, 受许多信号转导通路的调控, 当 LPS 刺激机体后, 丝裂原活化蛋白激酶通路和 JAK/STAT 通路被激活^[7-8]。有研究表明, 丝裂原活化蛋白激酶家族的 p38、细胞外信号蛋白调节激酶(extracellular-signal regulated protein kinase, ERK)和 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun amino-terminal kinase, JNK)协同调节作用使 TNF- α 的基因表达水平增加^[9]。作者的资料还证实, JAK/STAT 通路被激活后细胞产生晚期炎症介质——高迁移率族蛋白 B1, 高迁移率族蛋白 B1 又可进一步促进 TNF- α 的释放, 使炎症效应不断放大, 最终造成广泛的细胞与组织损害^[3, 10]。

本组资料中, 我们通过观察 STAT3 对全长

TNF- α 启动子活性的剂量效应证实, STAT3 对 TNF- α 基因的表达不受 LPS 调节, 无论是否有 LPS 刺激, 随着 STAT3 剂量的增加, TNF- α 基因的表达亦随之增强, 这说明与已知的由 LPS 诱导 TNF- α 表达相关的该启动子区域位点有所区别。有学者发现^[11], 激活状态的 STAT3 在人巨噬细胞 TNF- α 合成中并无非常重要的作用, 而我们的观察结果与之不同。作者既往的实验已证实, p38/ERK2 与 STAT3 存在相互作用^[12], 同时有文献报道 p38 通路部分调节 LPS 诱导 TNF- α 的产生, 而作用于 TNF- α 启动子区域的位点包括环腺苷酸应答元件(cAMP responsive element)和 κB3 等^[13]。那么 STAT3 在 TNF- α 启动子区域的作用位点是什么呢? 在进一步实验中, 我们观察了 STAT3 对不同长度 TNF- α 启动子缺失突变体活性的影响, 结果发现, 与各自的空载体相比, STAT3 与 95 bp 片段作用最明显, 120 bp 片段次之, 分别增加了 6.90 和 2.80 倍, 161 bp 片段和全长分别增加了 2.01 和 1.53 倍。其中包含 95 bp 片段的 TNF- α 启动子缺失突变体所在的 TNF- α 启动子区域正是 κB3 的位点所在。这与以前的研究报道相符, 即 TNF- α 启动子区域中 3 个核因子 - κB 位点均参与该基因 LPS 诱导性表达的调节, 其中以 κB3 结合位点作用最强。包含 120 bp 片段的 TNF- α 启动子缺失突变体所在的 TNF- α 启动子区域, 与包含 95 bp 片段缺失突变体所在的 TNF- α 启动子区域不同的是多了一个核因子 - 白细胞介素 6 位点, 此位点是经典的内毒素作用位点^[14]。而且随着突变体片段延长到 161 bp, 启动子的活性降低至 2.01。因此, 包含 95 bp 片段缺失突变体所在的 TNF- α 启动子区域可能存在一个潜在的 STAT3 结合位点。

为了证实上述假设, 我们重新构建了包含 70 bp 和 85 bp 片段的缺失突变体, 并进行了 TNF- α 启动子活性的检测。结果显示, 在加入同等剂量的 STAT3 以后, 包含 85 bp 片段的缺失突变体的活性与 95 bp 片段的活性相差无几, 而包含 70 bp 的突变体活性没有明显改变。因此, 推断这一潜在的 STAT3 位点可以缩短到 85 bp 区域内。为了深入了解其精确结合位点, 笔者又构建了包含 75 bp 和 80 bp 的突变体并进行了活性分析, 发现当启动子区域缩短至 80 bp 片段区域时, STAT3 对 TNF- α 的活性影响降低至对照水平。因此, 该潜在位点可能在 80 bp 到 85 bp 之间区域。随后构建的 85 Δ 缺失突变体活性实验结果又一次证实, 随着将

80~85 之间的碱基 GG 突变为 TT, 它对 TNF- α 启动子的活性开始由原来的增加变为下降. 我们分析了包含 85 bp 的启动子区域 CAAGGAAGTTTC-CGC 后发现, 其与已经报道的 STAT3 潜在作用位点结构相似^[15], 同时与所有 STAT 因子结合到相似的 DNA 元件的结构区域相符, 在 STAT3 中表现为保守的氨基酸序列 TTN5AA, 例如 STAT1 和 STAT3 二聚物结合到急性期蛋白启动子区的 TTCN3GAA. 有鉴于此, 我们应用 EMSA 技术检测 STAT3 蛋白是否与 TNF- α 启动子 62~85 bp 之间的片段结合. 同时将 81 和 82 位碱基突变, 如果此蛋白质不能同突变的片段结合, 则说明从 80 bp 到 85 bp 之间是 STAT3 在 TNF- α 启动子上的潜在结合位点. EMSA 结果证明, STAT3 蛋白与野生型的 62~85 DNA 片段结合, 未与突变型的 62~85 DNA 片段结合.

综上所述, STAT3 在细胞内起着重要的信号传递作用, 负责将细胞外的信号传递到细胞核, 在核内与靶基因的启动子结合, 诱导靶基因的转录. 我们的研究表明, 无论有无 LPS 刺激, 随着 STAT3 剂量的增加, TNF- α 基因表达亦随之增强, 同时, 核内的 STAT3 蛋白与 TNF- α 基因启动子结合, 诱导基因转录, 从 80 bp 至 85 bp 之间的 DNA 片段为 STAT3 在 TNF- α 启动子上的潜在结合位点, 通过与此位点结合调控 TNF- α 的合成与释放. 因此, 本研究初步揭示了 JAK/STAT3 信号转导通路在 TNF- α 合成中的作用机制, 为 TNF- α 的基因表达调控提供了新的理论依据, 具有重要的病理生理意义.

参 考 文 献

- [1] Andrejko K M, Chen J, Deutschman C S. Intrahepatic STAT3 activation and acute phase gene expression predict outcome after CLP sepsis in the rat. *Am J Physiol*, 1998, **275** (6 Pt 1): G1423-G1429
- [2] Liu H, Yao Y M, Wang S B, *et al.* Inhibition of Janus kinase 2 and signal transduction and activator of transcription 3 protect against cecal ligation and puncture-induced multiple organ damage and mortality. *J Trauma*, 2009, **66**(3): 859-865
- [3] Liu H, Yao Y M, Yu Y, *et al.* Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway in regulation of expression and inflammation-promoting activity of high mobility group box protein 1 in rat peritoneal macrophages. *Shock*, 2007, **27**(1): 55-60
- [4] 姚咏明, 盛志勇. 脓毒症信号转导机制的现代认识. *中国危重病急救医学*, 2003, **15**(1): 3-6
- [5] Yao Y M, Sheng Z Y. *Chin Crit Care Med*, 2003, **15**(1): 3-6
- [6] Pålsson-McDermott E M, O'Neill L A. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*, 2004, **113**(2): 153-162
- [7] Jiang Y, Liu A N, Zhang L, *et al.* Activation of p38 mitogen-activated protein kinase induced by lipopolysaccharide and its role in TNF- α gene expression. *J Med Coll PLA*, 1999, **14**(2): 138-143
- [8] Cano E, Mahadevan L C. Parallel signal processing among mammalian MAPK. *TIBS*, 1995, **20**(3): 117-122
- [9] Claudia N, Ariane N, Serge H, *et al.* Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling. *J Immunol*, 2003, **170**(6): 3263-3272
- [10] 姜 勇, 刘爱华, 秦清和, 等. 丝裂原活化蛋白激酶通路对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞肿瘤坏死因子- α 基因表达的协同调节作用. *中华医学杂志*, 2002, **82**(20): 1410-1414
- [11] Jiang Y, Liu A H, Qin Q H, *et al.* *Natl Med J China*, 2002, **82**(20): 1410-1414
- [12] Yao Y M, Sheng Z Y, Huang L F. The effect of a novel cytokine, high mobility group box-1 protein, on the development of traumatic sepsis. *Chin J Integr Med*, 2009, **15**(1): 13-15
- [13] Prêle C M, Keith-Magee A L, Murcha M, *et al.* Activated signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) is a poor regulator of tumour necrosis factor- α production by human monocytes. *Clin Exp Immunol*, 2007, **147**(3): 564-572
- [14] 杨丽萍, 姚咏明, 李杰萍, 等. STAT3 与 MAPK 蛋白协同调节肿瘤坏死因子- α 转录活性. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(8): 1003-1011
- [15] Yang L P, Yao Y M, Li Y P, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(8): 1003-1011
- [16] 史 须, 卜 夏, 黄家强, 等. NF- κ B 结合位点在 LPS 诱导人 TNF- α 基因转录中的调节作用. *中国生物化学与分子生物学报*, 2001, **17**(5): 651-655
- [17] Shi X, Bo X, Huang J Q, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 2001, **17**(5): 651-655
- [18] Faisst S, Meyer S. Compilation of vertebrate-encoded transcription factors. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20**(1): 3-26
- [19] Zhang Q, Wang H Y, Marzec M, *et al.* STAT3- and DNA methyltransferase 1-mediated epigenetic silencing of SHP-1 tyrosine phosphatase tumor suppressor gene in malignant T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(19): 6948-6953

Potential Binding Site of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 on Regulation of Tumor Necrosis Factor- α Expression*

YANG Li-Ping^{1,2)}, YAO Yong-Ming^{2)*}, YE Qi-Nong³⁾, SHENG Zhi-Yong²⁾

¹⁾ Laboratory Animal Center, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China;

²⁾ Burns Institute, First Hospital Affiliated to the Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China;

³⁾ Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract At the early stage of sepsis, it is clear that tumor necrosis factor alpha (TNF- α) will be excessively produced after mitogen-activated protein kinase is activated by lipopolysaccharide (LPS). TNF- α , which is an important early inflammatory cytokine, activates indirectly signal transducer and activator of transcription (STAT3) pathways. Activated STATs enter into the nucleus to take part in the gene expression induced by LPS. The present study was performed to explore the potential sites of STAT3 binding to TNF- α promoter. The purpose is to provide the theory basis of understanding molecular mechanism and intervention pathway of JAK/STAT signal pathway in the development of sepsis. In the present study, dose-dependent response of STAT3 on TNF- α expression was observed after Flag-STAT3 and full length TNF- α promoter reporter gene were co-transfected into COS-7 cells. The results indicated that TNF- α gene expression was enhanced along with increased doses of STAT3 with or without LPS. Flag-STAT3 (200 μ g/L) and TNF- α promoter reporter gene of different length were co-transfected into COS-7 cells respectively, and LPS was added into cells 4 hours later. Compared to the controls, fold activity value of pTNF- α (95 bp) was found to be the raised 6.9-fold. Then, pTNF- α (70 bp), pTNF- α (75 bp), pTNF- α (80 bp) and pTNF- α (85 bp) deletion mutants were constructed and co-transfected with Flag-STAT3 (200 μ g/L) to COS-7 cells induced by LPS. Data showed that fold activity value of pTNF- α (85 bp) was similar to that of pTNF- α (95 bp), and fold activity value of pTNF- α (80 bp) decreased to the control levels. 81 base and 82 base in the TNF- α promoter were mutated and then the activity results proved that the two sites were important to the TNF- α gene expression induced by STAT3. The potential binding site of STAT3 on TNF- α promoter was identified to be between 80 bp and 85 bp. Furthermore, the results of EMSA showed that it was wild probe tagged with γ -³²P of the TNF- α promoter 62~85 bp could bind to nucleic protein STAT3, but not mutant 62~85 bp probe. These data suggested that the effect of STAT3 on TNF- α gene expression did not depend on LPS, and the potential binding site of STAT3 on TNF- α promoter might be between 80 and 85 base radical fragment.

Key words signal transducer and activator of transcription 3, tumor necrosis factor- α , lipopolysaccharide

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00196

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30672178, 81071545) and National Basic Research Program of China (2012CB518102).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-66867394, E-mail: c_ff@sina.com

Received: May 9, 2011 Accepted: July 14, 2011