

王志远,刘月环. 基于荧光素酶双报告基因系统体外验证长爪沙鼠 *Cip4* 基因受 RXR 及 T4 调控 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 78–84.

Wang ZY, Liu YH. *In vitro* verification of *Cip4* gene regulation by RXR and T4 in Mongolian gerbils using luciferase double-reporter gene system [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 78–84.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 11. 012

基于荧光素酶双报告基因系统体外验证长爪沙鼠 *Cip4* 基因受 RXR 及 T4 调控

王志远,刘月环*

(浙江省医学科学院,杭州 310013)

【摘要】 目的 探讨核转录因子 TRB、RXR 和激动剂 T4 对长爪沙鼠 *Cip4* 基因表达的调控作用。**方法** 合成长爪沙鼠 *Cip4* 基因启动子区序列,构建报告载体 pGL3-*Cip4*;将转录因子 TRB、RXR 克隆到 pcDNA3.1 表达载体上。将 pGL3-*Cip4*,pcDNA3.1-TRB,pcDNA3.1-RXR 和 pRL-TK(参照质粒)载体共转染到 HEK-293 细胞,构建 *Cip4* 基因的荧光素酶双报告系统。观察质粒用量、TRB 的激动剂甲状腺素 T4 等处理对转录活性的影响。**结果** 以长爪沙鼠 *Cip4* 启动子区为启动序列的双荧光素酶报告基因系统在(启动子+转录因子):pRL-TK=20:1、总质粒量为 2 μg 时转染效率最高,并具有最高的荧光素酶活性。检测结果显示,仅加入 TRB 不改变 *Cip4* 的转录水平($P>0.05$),仅加入 RXR 可以增加 *Cip4* 的转录水平($P<0.05$),RXR 与 T4 共同作用可上调 *Cip4* 的转录水平($P<0.001$)。TRB 与 T4 共同作用可下调 *Cip4* 活性($P<0.05$)。RXR、TRB、T4 共存时,*Cip4* 的转录水平显著下调($P<0.01$)。**结论** 本研究证实了 T4、TRB 及 RXR 共调控长爪沙鼠 *Cip4* 基因的转录,模拟了配体激活型转录因子 TRB/RXR 活化目的基因 *Cip4* 的转录,同时证实了 *Cip4* 的转录活化与 RXR 信号通路密切相关,为揭示甲状腺素在人类 NAFLD 中的作用机制奠定了基础。本报告基因系统可用于配体激活型转录因子调控 *Cip4* 基因表达的机理分析及相关药物的筛选。

【关键词】 非酒精性脂肪性肝病模型;长爪沙鼠;*Cip4* 基因;荧光素酶双报告基因系统;维甲酸 X 受体(RXR);甲状腺素受体 B(TRB)

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 11-0078-07

In vitro verification of *Cip4* gene regulation by RXR and T4 in Mongolian gerbils using luciferase double-reporter gene system

WANG Zhiyuan, LIU Yuehuan*
(Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

【Abstract】 Objective To investigate the regulatory effect of nuclear transcription factors thyroxine receptor (TRB) and retinoic acid receptor X (RXR), as well as the agonist T4, on Cdc42-interacting protein 4 (*Cip4*) gene expression. **Methods** The *Cip4* gene promoter of Mongolian gerbils was cloned into the luciferase-reporter sequence of pGL3 basic to construct a new plasmid pGL3-*Cip4*. Coding sequences of transcription factors TRB and RXR were cloned into pcDNA3.1 eukaryotic expression vectors. pGL3-*Cip4*, pcDNA3.1-TRB, pcDNA3.1-RXR, and pRL-TK (reference

[基金项目] 浙江省自然科学基金(LY16H030011);浙江省科技厅公益技术应用研究计划(2011C37096,2015C37102);浙江省医药卫生平
台骨干人才基金(2015RCA006)。

[作者简介] 王志远(1986—),男,硕士,助理研究员,研究方向:药理学。E-mail: 593984800@qq.com

[通信作者] 刘月环(1974—),女,医学博士后,研究员,研究生导师。E-mail: yuehuanliu@163.com

plasmid) vectors were used to transfect HEK-293 cells to form a luciferase double-reporter system for the *Cip4* gene. Transfection efficiency was optimized by adjusting the ratio of these plasmids. The agonist T4 was used to analyze transcriptional activity. **Results** Transfection efficiency and luciferase activity were the highest when a total amount of 2 μ g plasmid and a ratio of 20:1 between the (promoter + transcription factor) and pRL-TK. RXR could significantly increase *Cip4* gene transcription of ($P < 0.05$), whereas TRB did not alter *Cip4* transcription ($P > 0.05$). Thyroxine T4 could enhance RXR upregulation ($P < 0.001$), while a combination of T4 and TRB downregulated *Cip4* transcription ($P < 0.05$). Levels of *Cip4* transcription were significantly downregulated in the presence of T4, RXR, and TRB ($P < 0.01$). **Conclusions** T4, TRB, and RXR had coregulatory effects on *Cip4* gene transcription in Mongolian gerbils; moreover, they simulated the process of ligand T4 agonizing TRB/RXR to activate *Cip4* gene transcription. These result indicating that *Cip4* transcription was significantly affected by the RXR signaling pathway lay the foundation for revealing thyroxine's mechanism of action in human nonalcoholic fatty liver disease, as well as the study of ligand-agonizing nuclear transcription factor regulation of *Cip4* gene expression and related drug screening.

【Keywords】 nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) model; Mongolian gerbil; *Cip4* gene; dual-luciferase reporter gene system; retinoic acid receptor X(RXR); thyroxine receptor B(TRB)

CIP4 (CDC42-interacting protein-4) 为甲状腺素受体作用因子 10 (thyroid hormone receptors interactor 10, *TRIP10*) 基因表达的蛋白, 是一种细胞骨架调节蛋白, 由 545 氨基酸残基组成, 广泛存在于脑、气管、肝、肾、结肠、心、肺、前列腺等人体多种器官中, 其表达受全反式维甲酸调节, 作为活化的 CDC42 的下游, *Cip4* 在调节肌动蛋白细胞骨架的形成和重排, 调节细胞间的粘附, 内吞等过程中起着重要的作用, 目前的研究进展包括: (1) 是 EGFR 的上游^[1]; (2) 高糖下 *Cip4* 能诱导腹膜上皮细胞向间质细胞的转分化 (epithelial to mesenchymal transition, EMT)^[2]; (3) 间充质干细胞出现多种分化倾向并能引发肿瘤的转移^[3]; (4) 丢失 *Cip4* 蛋白会造成血小板硬膜化^[4]; (5) *Cip4* 基因敲除小鼠表现出餐后低血糖, 胰岛素抵抗, 葡萄糖, 转铁蛋白吸收下降^[5]; (6) 胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 的大鼠磷酸酶高表达抑制了内脏脂肪组织中 *Cip4* 的表达^[6]。现已知甲状腺素受体 (Thyroxine receptor, TR, 特定组织核受体之一, 是一类配体激活型转录因子) 与配体甲状腺素 (三碘甲状腺原氨酸 T3 或四碘甲状腺原氨酸 T4) 结合后 TR 构象改变, 通过与 RXR (retinoic acid receptor X, 维甲酸 X 受体) 结合成二聚体来调控基因的表达, TR 能够与特定的基因 DNA 序列 (比如甲状腺素应答元件) 结合而发挥生理作用。RXR 是核受体蛋白家族 (此外还包括 TR 及过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) 等数十种) 的核心成员, 在细胞发育和代谢调节上处于核心地位。维甲酸信号转导系统中每两个核受体形成一个同源二聚体 (RXR/RXR) 或异源二聚体 (RXR/RAR 或

PPAR/RXR 或 TR/RXR, 加上各自的配体称为同源或异源四聚体), 作为转录因子与靶基因 DNA 或是其上游的应答元件结合, 从而调控基因的转录和表达, 发挥一系列生物学效应^[7]。

长爪沙鼠在高脂饲料 (与高脂诱导大小鼠模型不同的是不需要加入抑制甲状腺的药物) 喂养 1 周后即可形成单纯性脂肪肝, 2 周形成脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH), 4~12 周即可形成不同程度的肝纤维化, 12~16 周出现肝硬化, 具有成模速度快、死亡率低 (成活率高于 90%)、适于连续观察非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的病理进展的优点^[8], 在长达十多年研究中, 笔者课题组用高通量测序法检测了高脂饲料诱导 4 周 (NAFLD 早期纤维化) 及 8 月龄以上高龄 (中老年) 自发 NAFLD (高脂血症) 长爪沙鼠转录组, 获得了 352 个差异基因和 32 个通路, 总结出 NAFLD 长爪沙鼠模型的 10 大特点^[9]。对测序数据的生信分析表明, 与 *Cip4* 基因相关的通路 (ko04910, 胰岛素信号通路) 显著上调, 高脂诱发 NAFLD 上调大于 3 倍, 这个结果显示出 *Cip4* 基因有可能受甲状腺素及甲状腺素受体变化而发生转录活性变化。另外, 我们也发现 *Cip4* 基因显著上调与 RXR 低表达现象, 但二者究竟有没有互作关系, 目前没有明确的报道。关于 *Cip4* 基因研究较多的是其与 CDC42 的关系, 即 CDC42 是 *Cip4* 上游, 与细胞分裂周期密切相关^[10]。*Cip4* 作为一种受全反式维甲酸调节的甲状腺素受体作用因子, 其转录激活是否可直接基于上述二聚体的结合, 是否需要甲状腺素 T4 作为配体呢? *Cip4* 的表达是否受配体激活型核转录因子及激动剂 T4 的调控, 且是否与 RXR

信号通路相关?

报告基因检测是研究结构基因旁侧区域潜在的顺式元件(如启动子、增强子和沉默子等)和反式作用因子相互作用关系的一种重要工具^[11]。通常是用萤火虫荧光素酶定量基因表达时,采用第二个报告基因来减少实验误差。目前不少公司可以提供萤火虫荧光素酶检测(一般是 pGL3 质粒作为载体)和海肾荧光素酶检测(一般是 pRL-TK 质粒作为内参)组合的双报告系统。在使用荧光素酶报告基因检测系统结合 pRL 载体系统,即表达第二个报告基因海肾荧光素酶的载体系统,就可以在单管中进行双荧光素酶报告基因的检测,较为灵敏快捷。本研究就是采用荧光素酶双报告基因系统对 *Cip4* 的表达是否受 RXR, TRB(甲状腺素受体 TR 的 B 亚型)调控进行实验。

1 材料和方法

1.1 细胞系

肾细胞系 HEK293(ATCC, 自行培养传代)。

1.2 主要试剂与仪器

TRB 激动剂(TRB 的配体)T4(左旋甲状腺素钠五水合物)(Damas-beta, 货号 P1081372), DMEM(Hyclone, 货号 SH30243.01B), FBS(Gibco, 货号 26400-044), 双荧光素酶检测试剂盒(Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit, Promega, 货号 E1910), 转染试剂 Lipofectamine2000(Thermofisher, 货号 11668030)。移液器(Gilson);离心机(Ependorf, 型号 5424R);恒温振荡器(上海知楚, 型号 ZQWY-200);细胞培养箱(Thermo, 型号 Forma 3111);超速离心机(Beckman, 型号 Avanti J-30I);化学发光分析仪(中生北控, 型号 BK-L96C)。

1.3 实验方法

1.3.1 质粒构建

通过化学合成方法将转录因子 CDS 序列克隆并构建到 pcDNA3.1 表达载体上;将长爪沙鼠 *Cip4* 启动子序列克隆并构建到 pGL3 basic 的载体上(下文质粒中标绿的那部分)。所涉及的转录因子是 TRB 和 RXR, 启动子序列是长爪沙鼠 *Cip4* 基因启动子区, 基因克隆、合成及载体构建均由南京一道基因公司完成, 碱基序列、长度及 GeneBank 号如下。

(1)转录因子 TRB CDS 区:长爪沙鼠 thyroid hormone receptor beta (TRB), transcript variant X1,

mRNA (1428 bp), NCBI 参考序列为 XM_021654936.1, TRB 通过两侧(5' BamHI-3' EcoRI)添加酶切位点引入 pcDNA3.1(+), 碱基序列共 1464 bp, 质粒图谱如图 1 所示。

(2)转录因子 RXR CDS 区:长爪沙鼠全部信息链接见 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=RXR%20Gerbillinae>, 共有三个亚型, 选取肝表达高的 RXR^[12], 即长爪沙鼠 retinoid X receptor alpha (RXRa), transcript variant X1, mRNA, NCBI 参考序列为 XM_021638115.1, 1404 bp, RXR-XM_021638115.1 通过 5' HindIII-3' XhoI 克隆到 pcDNA3.1(+)载体, 碱基序列共 1440 bp, 质粒图谱如图 2 所示。

(3)长爪沙鼠 *Cip4* 启动子:即长爪沙鼠 thyroid hormone receptor interactor 10 (Trip10), Gene ID 为 110545609, 1426 bp, *Cip4* 启动子通过在两侧引入 5' NheI-3' XhoI 酶切位于点, 克隆到 pGL3 basic 载体, 碱基序列共 1438 bp, 质粒图谱如图 3 所示。

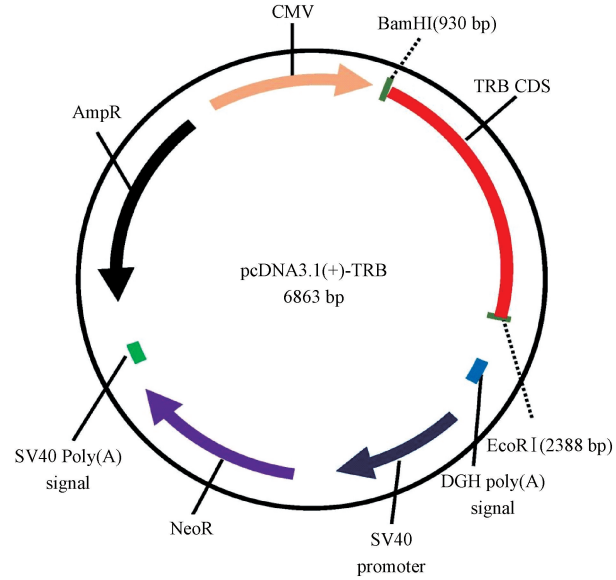


图 1 转录因子 TRB 的质粒示意图
Figure 1 Plasmid map of the transcription factor TRB

1.3.2 TRB 的配体——激动剂甲状腺素 T4 的浓度梯度实验

以 RXR 及 TRB 的表达量为标记, T4 设置梯度浓度为 0.1 μmol/L, 0.01 μmol/L, 0.001 μmol/L, 设置 24 h 与 48 h 两个时间点, 用荧光定量 PCR 法进行检测, RXR 上游引物: 5'-TGCTCATCGCCTCCTTCTCC-3', 下游引物 5'-GCTCCGTCTTGTCCATCTGC-3', 片段长度为 177 bp; TRB 上游引物:

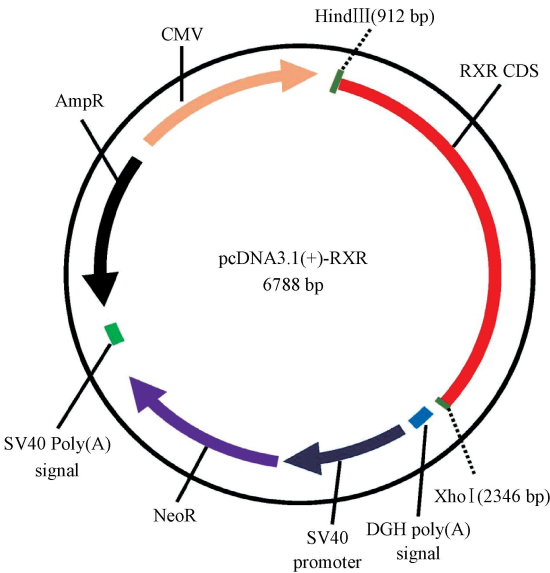


图 2 转录因子 RXR 的质粒示意图

Figure 2 Plasmid map of the transcription factor RXR

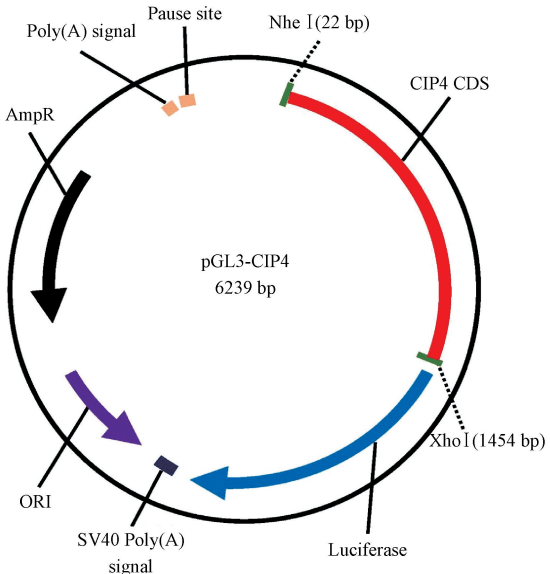


图 3 启动子 Cip4 的质粒示意图

Figure 3 Plasmid map of the Cip4 promoter

5'-GAACAGTCGTCGCCACATCTC-3', 下游引物: 5'-CCTTTACATTTCTTCTCCTCCGTTTG-3', 片段长度为 131 bp。PCR 程序为 95℃ 1 min, 95℃ 15 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 10 min, 40 个循环, 99℃ 度保温。取两个基因与未加 T4 的空白组相比有差异的浓度为 T4 的工作浓度。

1.3.3 质粒转染与荧光素酶活性检测

利用 Lipo2000 转染试剂盒, 将转录因子和重组的质粒利用脂质体转染的方法转染到 HEK293T 细胞中, 用荧光素酶双报告基因法检测 Cip4 与 RXR/

TRB 转录因子二聚体结合情况。

(1) 质粒转染: ①转染前一天 24 孔培养板中接种细胞, 使转染时细胞密度在 70%~80%, 培养基为含 1.3.2 筛选出的工作浓度 (0.01 μmol/L) T4 药物的 DMEM + 10% FBS (每个分组均包括含甲状腺素 T4 与不含甲状腺素 T4, 下同); ②2 μL Lipo2000 转染试剂稀释到 50 μL 无血清 DMEM 培养基中, 质粒稀释到 50 μL 无血清 DMEM 培养基中 (启动子+转录因子; TK=20:1 总质粒量 2 μg), 混合室温孵育 20 min, 补无血清 DMEM 培养液 100 μL; ③吸除皿中培养基, 加入上一步制备的转染复合物 200 μL, 37℃ 培养 5 h; ④吸除培养基, 换 0.5 mL 含有 1.3.2 筛选出的工作浓度 (0.01 μmol/L) T4 药物的完全培养基, 37℃ 培养 48 h; ⑤转染做 5 次重复; ⑥质粒转染组合: 第一次转染分组如表 1 所示, 其中 pcDNA3.1、pGL3 basic 为空载质粒, pRL-TK 为提供海肾荧光素酶检测的内对照质粒, pGL3 basic-Cip4、pcDNA3.1-TRB 分别是报告载体与 TRB 表达质粒, 检测 TRB 对 Cip4 转录活性的影响。以上分组均包括含甲状腺素 T4 和不含 T4 两种处理, 以检测 T4 的激动效果; 第二次转染分组如表 2 所示, 增加了 pcDNA3.1-RXR 表达质粒, 第五组为检测 RXR、TRB 同时存在对 Cip4 转录活性的影响, 其余同上 (亦包括含甲状腺素 T4 和不含 T4 两种处理, 以检测 T4 的激动效果)。

表 1 TRB 增强 Cip4 启动转录作用的质粒分组
Table 1 Plasmid grouping of TRB on the initiation of Cip4

序号 No.	转染质粒组合 Plasmid groups
1	pcDNA3.1 + pGL3 basic + pRL-TK
2	pcDNA3.1 + pGL3 basic-Cip4 + pRL-TK
3	pcDNA3.1-TRB + pGL3 basic + pRL-TK
4	pcDNA3.1-TRB + pGL3 basic-Cip4 + pRL-TK

表 2 RXR、TRB 对 Cip4 启动作用的质粒分组
Table 2 Plasmid grouping of RXR and TRB on the initiation of Cip4

序号 No.	转染质粒组合 Plasmid groups
1	pcDNA3.1 + pGL3 basic + pRL-TK
2	pcDNA3.1 + pGL3 basic-Cip4 + pRL-TK
3	pcDNA3.1-RXR + pGL3 basic + pRL-TK
4	pcDNA3.1-RXR + pGL3 basic-Cip4 + pRL-TK
5	pcDNA3.1-RXR + pcDNA3.1-TRB + pGL3 basic-Cip4 + pRL-TK

(2) 双荧光素酶检测: ①裂解细胞: 每孔中加入细胞裂解液 200 μL, 室温孵育 10 min, 充分裂解细胞; ②收裂解液 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清作

为待测液;③溶解萤火虫萤光素酶检测试剂和海肾萤光素酶检测缓冲液,并达到室温。海肾萤光素酶检测底物(100×)置于冰浴或冰盒上备用;④按仪器操作说明书开启化学发光仪,取 100 μL 裂解液上清加入 96 孔发光板中,加入 100 μL 萤火虫萤光素酶检测工作液,吹吸混匀;⑤上机测发光值,激发时间 5 s;⑥加入海肾萤光素酶检测工作液 100 μL,吹吸混匀,上机测发光值,激发时间 5 s;⑦在以海肾萤光素酶为内参的情况下,用萤火虫萤光素酶测定得到的 RLU 值除以海肾萤光素酶测定得到的 RLU 值。根据得到的比值来比较不同样品间报告基因的活化程度。

1.4 统计学方法

实验结果所有数据表示方式为平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$),数据采用 SPSS 19.0 软件进行分析,并采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计分析作图。采用 *t* 检验法分析基因表达量。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 T4 浓度影响 RXR、TRB 的表达量

T4 刺激后 RXR、TRB 两个基因表达的 qPCR 结果分析绘制图 4~6,从图上可以看出,0.1 μmol/L,1 μmol/L 的 T4 刺激 HEK293T 在 24 hr 及 48 hr 后,两个基因表达均无差异,而用 0.01 μmol/L 的 T4 刺激 HEK293T 后,TRB、RXR 在两个时间点均表现出一定的差异,RXR 表达量趋于增加,而 TRB 表达量趋于下降,鉴于 RXR 与 TRB 的表达量的差异,从实验的目的出发,选取 0.01 μmol/L 的 T4 作为下一步实验的工作浓度。

2.2 TRB 的启动作用检测

根据计算测定的活性值进行绘图,如图 7 所示,进行统计学分析结果显示,从实验组及对照组的萤光素酶相对活性显示,TRB 的共转没有提高 *Cip4* 启动子序列的转录活性 ($P > 0.05$)。

2.3 RXR 与 TRB 对 *Cip4* 的启动作用

根据计算测定的活性值进行绘图,如图 8 所示,进行统计学分析结果显示,从实验组及对照组的萤光素酶相对活性显示,RXR 的共转提高 *Cip4* 启动子序列的转录活性 ($P < 0.001$),但 RXR、TRB 两个转录因子共转,在甲状腺素 T4 激动的情况下 *Cip4* 活性较 RXR 单独存在的情况下显著下降 ($P < 0.01$)。

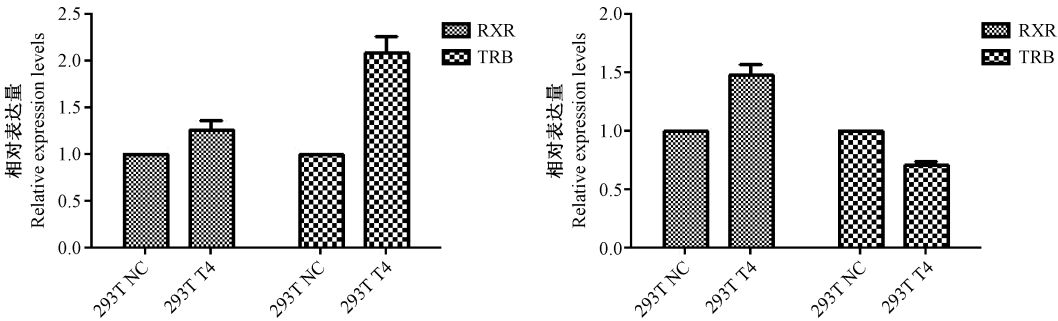


图 4 0.01 μmol/L T4 刺激 24 h(左)或 48 h(右)的 HEK293T 中 RXR 与 TRB 的基因表达量

Figure 4 Expression of RXR and TRB in HEK293T stimulated with 0.01 μmol/L T4 for 24 h (left) or 48 h (right)

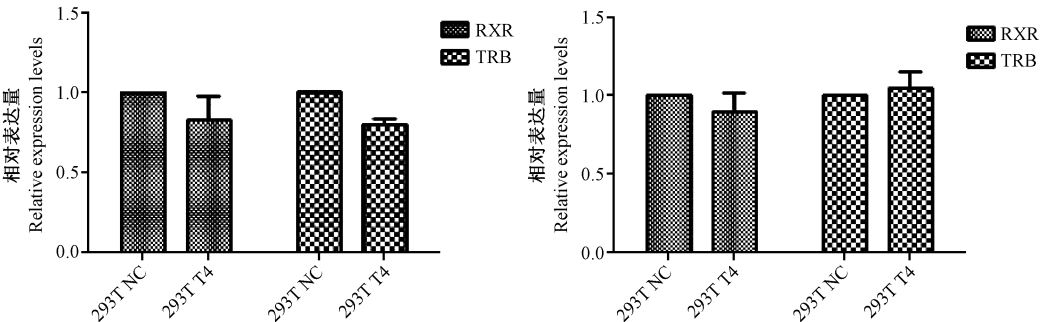


图 5 0.1 μmol/L T4 刺激 24 h(左)或 48 h(右)的 HEK293T 中 RXR 与 TRB 的基因表达量

Figure 5 Expression of RXR and TRB in HEK293T stimulated with 0.1 μmol/L T4 for 24 h (left) or 48 h (right)

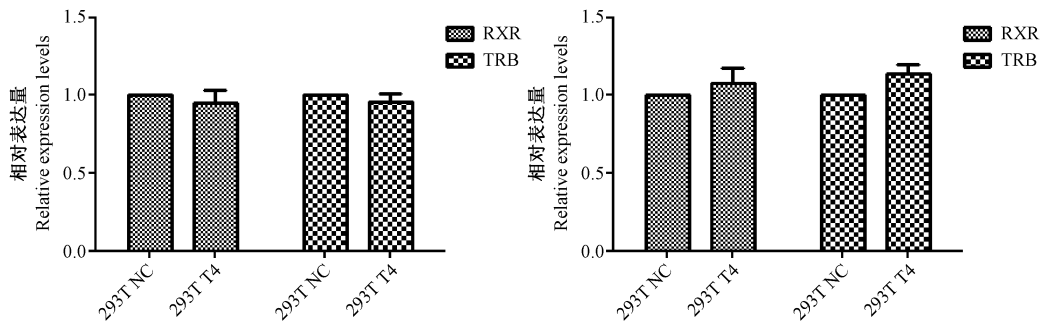
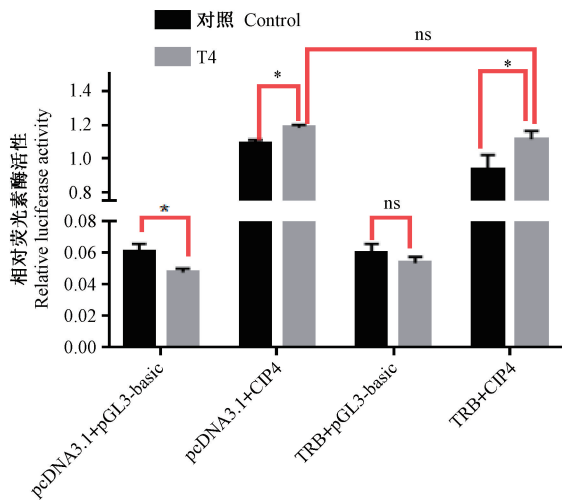


图 6 1 μmol/L T4 刺激 24 h(左)或 48 h(右)的 HEK293T 中 RXR 与 TRB 的基因表达量

Figure 6 Expression of RXR and TRB in HEK293T stimulated with 1 μmol/L T4 for 24 h (left) or 48 h (right)

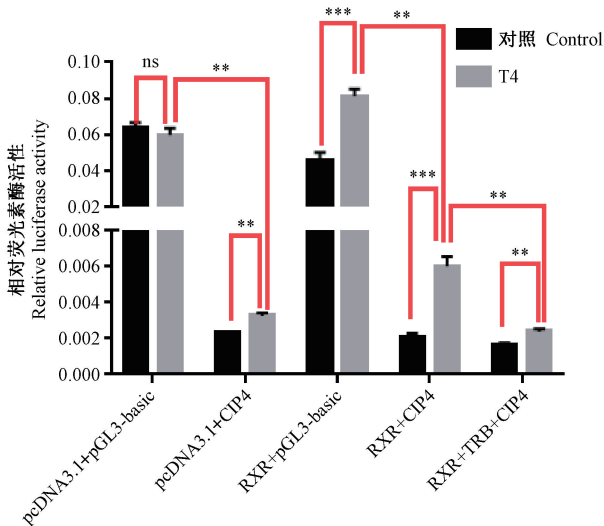


注:各组质粒组合均含 pRL-TK。* $P < 0.05$;“ns”表示差异无显著性。

图 7 TRB 与 *Cip4* 启动子双荧光素酶检测结果

Note. pRL-TK was used in all groups. * $P < 0.05$, and “ns” means non-significant difference.

Figure 7 Detection of double luciferase reporter for TRB and *Cip4* promoter



注:各组质粒组合均含 pRL-TK。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;“ns”表示差异无显著性。

图 8 TRB、RXR 与 *Cip4* 启动子双荧光素酶检测结果

Note. pRL-TK was used in all groups. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, and “ns” means non-significant difference.

Figure 8 Detection of double luciferase reporter for TRB, RXR, and *Cip4* promoter

3 讨论

报告基因系统是把编码序列和基因表达调节序列相融合形成嵌合基因,通过检测其表达产物(精确定量荧光信号)来标定目的基因表达的调控情况^[13]。该技术具有实时定量性、操作简单、灵敏度高、特异性强等优点,因此在启动子活性分析、基因转移及表达分析、信号转导通路研究、大分子互作等生物医学领域都有广泛的应用^[14]。

本研究是在获得长爪沙鼠 *Cip4* 基因启动子序列的基础上,将 *Cip4* 基因启动子序列以化学合成的方式插入到荧光素酶报告基因载体 pGL3-basic 中,然后和以相同方式构建在 pCDNA3.1 上的长爪沙鼠两个转录因子 TRB、RXR、TK 的质粒共转染 HEK293 细胞检测其荧光素酶活性,并将这个组成

型 *Cip4* 基因启动子全长荧光素酶报告质粒与 T4 共孵育,确定了 T4、TRB 与 RXR 对 *Cip4* 基因的启动及调控作用。研究结果表明:单纯加入 TRB (T4 受体)并不能改变 *Cip4* 的转录水平 ($P > 0.05$),但单纯加入 RXR,可以明显改变 *Cip4* 的转录水平 ($P < 0.05$),在 T4 的作用下是可以明显上调 *Cip4* 的转录水平 ($P < 0.001$),这证实了 RXR 可以优先与 *Cip4* 结合^[15-16],同时表明 T4 对 *Cip4* 有本底调控作用或存在其他不依赖 TRB (或称为非经典)的调控途径。TRB 是在启动子区与 *Cip4*-RXR 复合物结合的一个转录因子,TRB 受 T4 的激动后,*Cip4* 活性变化明显 ($P < 0.05$),这符合配体激活型转录因子的特征^[15]。如果有 RXR、TRB 共同存在的情况下,*Cip4* 的转录水平是受到更严格的下调(共调节) ($P <$

0.01)^[17-18]。现已知代谢性疾病中,核转录因子中 RXR、PPAR、TRB 等转录因子在靶基因转录激活中所起的作用是不相同的,一般情况下 RXR 和 PPAR 是占主要地位(核心地位)的核转录因子,其数量在正常与应激情况下都占多数^[19-20]。本研究中 T4 浓度选择亦是考虑二种转录因子对 T4 的激动出现表达量差异时(即对二种受体转录因子效应不同,类似于依赖或不依赖型途径)的最佳浓度为首选^[21],T4 主要是 TRB 的激动剂,因此选择了 0.1 μmol/L。

荧光素酶报告系统实验是检测转录因子与其价靶启动子中的特异性序列结合的重要手段,也是目前配体激活型转录因子(如 miRNA,激动剂,抑制剂及其他环境影响要素等)的作用研究中常用的方法^[22-23]。本研究提供了 T4、TRB 及 RXR 调控长爪沙鼠 *Cip4* 基因转录表达的证据,间接模拟了配体激活型转录因子 RXR-TRB 异源二聚体在配体 T4 存在对 *Cip4* 的转录活化现象^[24],也证实了 *Cip4* 的转录活化与 RXR 信号通路密切相关。对单一靶基因的转录调控方式,所建立双荧光素酶报告基因系统也适用于其他受核转录因子调控的基因。另外本研究中用甲状腺素作为激动剂(配体)的实验为揭示长爪沙鼠 NAFLD 模型的特色及甲状腺素在人类 NAFLD 发病机制的研究奠定基础。

参考文献:

- [1] Hu J, Troglio F, Mukhopadhyay A, et al. F-BAR-containing adaptor *Cip4* localizes to early endosomes and regulates Epidermal Growth Factor Receptor trafficking and downregulation [J]. Cell Signal, 2009, 21(11): 1686-1697.
- [2] Zhang J, Bi M, Zhong F, et al. Role of *Cip4* in high glucose induced epithelial-mesenchymal transition of rat peritoneal mesothelial cells [J]. Ren Fail, 2013, 35(7): 989-995.
- [3] Koshkina NV, Yang G, Kleinerman ES. Inhibition of Cdc42-interacting protein 4 (*Cip4*) impairs osteosarcoma tumor progression [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2013, 13(1): 48-56.
- [4] Chen Y, Aardema J, Kale S, et al. Loss of the F-BAR protein *Cip4* reduces platelet production by impairing membrane-cytoskeleton remodeling [J]. Blood, 2013, 122(10): 1695-1706.
- [5] Feng Y, Hartig SM, Bechill JE, et al. The Cdc42-interacting protein-4 (*Cip4*) gene knock-out mouse reveals delayed and decreased endocytosis [J]. J Biol Chem, 2010, 285(7): 4348-4354.
- [6] Jun HS, Hwang K, Kim Y, et al. High-fat diet alters PP2A, TC10, and *Cip4* expression in visceral adipose tissue of rats [J]. Obesity (Silver Spring), 2008, 16(6): 1226-1231.
- [7] 马雄. 代谢性核受体:非酒精性脂肪性肝病治疗的新靶点

- [J]. 国际消化病杂志, 2008, 28(2): 91-93.
- [8] Liu Y, Yu C, Li Y. A new model: genetic characterizations of nonalcoholic fatty liver disease in mongolian gerbil [J]. Hepatology Intrenational, 2017, 11(Suppl 1): S1-S1093.
- [9] 刘月环. 长爪沙鼠高脂血症模型的建立及脂代谢相关基因的表达研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [10] Wang L, Rudert WA, Grishin A, et al. Identification and genetic analysis of human and mouse activated Cdc42 interacting protein-4 isoforms [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 293: 1426-1430.
- [11] 刘相连, 乔芳, 黄德玉, 等. 转录因子研究方法进展 [J]. 生理科学进展, 2017, 48(1): 73-76.
- [12] 黄玥晔, 曲伸. 甲状腺激素受体已成为非酒精性脂肪性肝病的新靶点 [J]. 国际内分泌代谢杂志, 2014, 34(1): 43-45.
- [13] Wu GQ, Wang X, Zhou HY, et al. Evidence for transcriptional interference in a dual-luciferase reporter system [J]. Sci Rep, 2015, 5: 17675.
- [14] 杨宇, 李江江, 王项, 等. 报告基因及其应用研究进展 [J]. 生命科学研究, 2011, 15(3): 277-282.
- [15] Cave MC, Clair HB, Hardesty JE, et al. Nuclear receptors and nonalcoholic fatty liver disease [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1859(9): 1083-1099.
- [16] 王水良, 傅继梁. 核受体的研究进展 [J]. 遗传学报, 2004, 31(4): 420-429.
- [17] 裘佳. 甲状腺激素受体 Q 1 与类胰岛素生长因子结合蛋白 6 相互作用及其成骨细胞分化的调节 [D]. 中国医学科学院北京协和医学院, 2010.
- [18] Giudici M, Goni S, Fan R, et al. Nuclear receptor coregulators in metabolism and disease [J]. Handb Exp Pharmacol, 2016, 233: 95-135.
- [19] Adams AC, Astapova I, Fisher FM, et al. Thyroid hormone regulates hepatic expression of fibroblast growth factor 21 in a PPAR-dependent manner [J]. J Biol Chem, 2010, 285: 14078-14082.
- [20] Fuchs CD, Claudel T, Scharnagl H, et al. FXR controls CHOP expression in steatohepatitis [J]. FEBS Lett, 2017, 591(20): 3360-3368.
- [21] Øvrevik J, Låg M, Lecureur V, et al. AhR and Arnt differentially regulate NF-κB signaling and chemokine responses in human bronchial epithelial cells [J]. Cell Commun Signal, 2014, 12: 48.
- [22] Zhong D, Zhang Y, Zeng YJ, et al. MicroRNA-613 represses lipogenesis in HepG2 cells by downregulating LXRα [J]. Lipids Health Dis, 2013, 12: 32.
- [23] Gramec Skledar D, Tomašić T, Sollner Dolenc M, et al. Evaluation of endocrine activities of ellagic acid and urolithins using reporter gene assays [J]. Chemosphere, 2019, 220: 706-713.
- [24] Fuchs CD, Traussnigg SA, Trauner M. Nuclear receptor modulation for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease [J]. Semin Liver Dis, 2016, 36(1): 69-86.