

HIF-1 α 调控 *Snail* 基因启动子活性及作用位点的鉴定

朱光辉,周联明,王时光,刘海军,单远洲
(上海市奉贤区中心医院,上海 201499)

摘要: [目的] 探讨缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)对 *Snail* 启动子活性的作用,并鉴定其作用位点。[方法] 应用 transfac 软件分析 *Snail* 启动子区域潜在的 HIF-1 α 结合位点。通过荧光素酶报告基因载体、电泳迁移率实验(EMSA)和染色质免疫沉淀(ChIP)实验研究 HIF-1 α 是否能够与 *Snail* 启动子区域潜在的位点结合,直接调控 *Snail* 的表达。[结果] 生物信息学分析发现 *Snail* 启动子区域存在 2 个 HIF-1 α 可能的结合位点(-653,-649)和(-543,-538)。双荧光素酶报告基因检测发现 (-543,-538) 位点是 HIF-1 α 特异性结合于 *Snail* 的位点,HIF-1 α 蛋白与之结合后调节 *Snail* 基因转录活性。EMSA 和 ChIP 实验证实了 HIF-1 α 蛋白和 *Snail* 启动子区(-543,-538)结合,直接上调 *Snail* 的表达。[结论] *Snail* 启动子区域存在 HIF-1 α 的结合位点,HIF-1 α 与之结合后直接调控 *Snail* 的表达。
主题词: 缺氧诱导因子-1 α ; *Snail*; 电泳迁移率实验; 染色质免疫沉淀
中图分类号: R73 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2016)11-0911-06
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2016.11.B009

Modulating Effects of HIF-1 α on the Promoter Activity of *Snail* and the Interaction Site Evaluation

ZHU Guang-hui, ZHOU Lian-ming, WANG Shi-guang, et al.
(Shanghai Fengxian District Central Hospital, Shanghai 201499, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effects of HIF-1 α on the promoter activity of *Snail* and to identify the interaction site. [Methods] Transfac software was used to analyze the potential HIF-1 α binding sites in region of *Snail* promoter. Luciferase reporter gene system, EMSA and ChIP were used to identify the interaction of HIF-1 α and *Snail*. [Results] *Snail* promoter region was found to be 2 potential interaction sites: (-653, -649) and (-543, -538). Dual luciferase reporter gene assay clarify (-543, -538) was the site of HIF-1 α specific binding to *Snail*. EMSA and ChIP experiments confirmed that *Snail* promoter region (-543, -538) was the interaction site by HIF-1 α . [Conclusion] *Snail* promoter region has a interaction site by HIF-1 α , and the expression of *Snail* is regulated by HIF-1 α .

Subject words: hypoxia inducible factor-1 α ; *Snail*; EMSA; ChIP

缺氧微环境在肿瘤侵袭转移过程中发挥重要作用^[1]。HIF-1 是缺氧诱导肿瘤侵袭转移的一个关键性核转录因子,它是一个异源二聚体,由一个 α 亚单位和一个 β 亚单位组成。缺氧状态下 HIF-1 α 稳定性增加并移位到细胞核,与 HIF-1 β 亚单位结合成二聚体 HIF-1,与下游基因启动子区域的缺氧反应元件(hypoxia responsive, HRE)结合,调控其转录^[2]。其中,HIF-1 α 对转录因子的调控是缺氧诱导肿瘤上皮

间质转化促进侵袭转移的重要机制^[3]。

Snail 是参与上皮间质转化的一个关键性转录因子^[4]。我们前期研究结果表明,胰腺癌组织中 HIF-1 α 和 *Snail* 的表达上调,并且 HIF-1 α 与 *Snail* 表达呈正相关^[5]。HIF-1 α 阳性表达与淋巴结转移有关,*Snail* 阳性表达与 TNM 分期有关。此外,HIF-1 α 和 *Snail* 的表达是影响胰腺癌患者术后生存时间的独立预后因素。RNA 干扰沉默胰腺癌细胞株 Panc-1 中 HIF-1 α 、*Snail* 表达下调,其体外侵袭迁移能力也下降。但 HIF-1 α 调控 *Snail* 表达的具体分子机制还不明确。本研究拟通过荧光素酶报告基因载体、电泳迁移率实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

基金项目: 上海市奉贤区科学技术委员会科学技术发展(奉科 20131304)
通讯作者: 朱光辉,主治医师,博士;上海市奉贤区中心医院普外科,
上海市奉贤区南奉公路 6600 号(201499);E-mail:
zhuzhu19820515@126.com
收稿日期: 2016-03-02; **修回日期:** 2016-04-26

和染色质免疫沉淀 (chromatin immunoprecipitation, ChIP) 实验研究 HIF-1 α 是否能够与 *Snail* 启动子区域潜在的位点结合, 直接调控 *Snail* 的表达。通过本实验研究有助于阐明 HIF-1 α 对 *Snail* 基因表达的调控作用和分子机理, 为进一步研究胰腺癌的靶向治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人胰腺癌细胞株 Panc-1 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。DMEM 培养液、胎牛血清购于 Gibco 公司。胰酶、二甲基亚砜购于杭州四季青公司。质粒中抽试剂盒、割胶纯化试剂盒、PCR 试剂盒购自 Qiagen 公司。Lipofectamine 2000 试剂购于 Invitrogen 公司。双荧光报告基因分析试剂盒、EMSA、ChIP 试剂盒均购于 promega 公司。兔抗人 β -actin、HIF-1 α 抗体, HRP 标记的羊抗兔二抗购

于 Abcam 公司。缺氧培养盒 GENbox Jar 2.5L 和产气包、指示条购于法国梅尼埃公司。

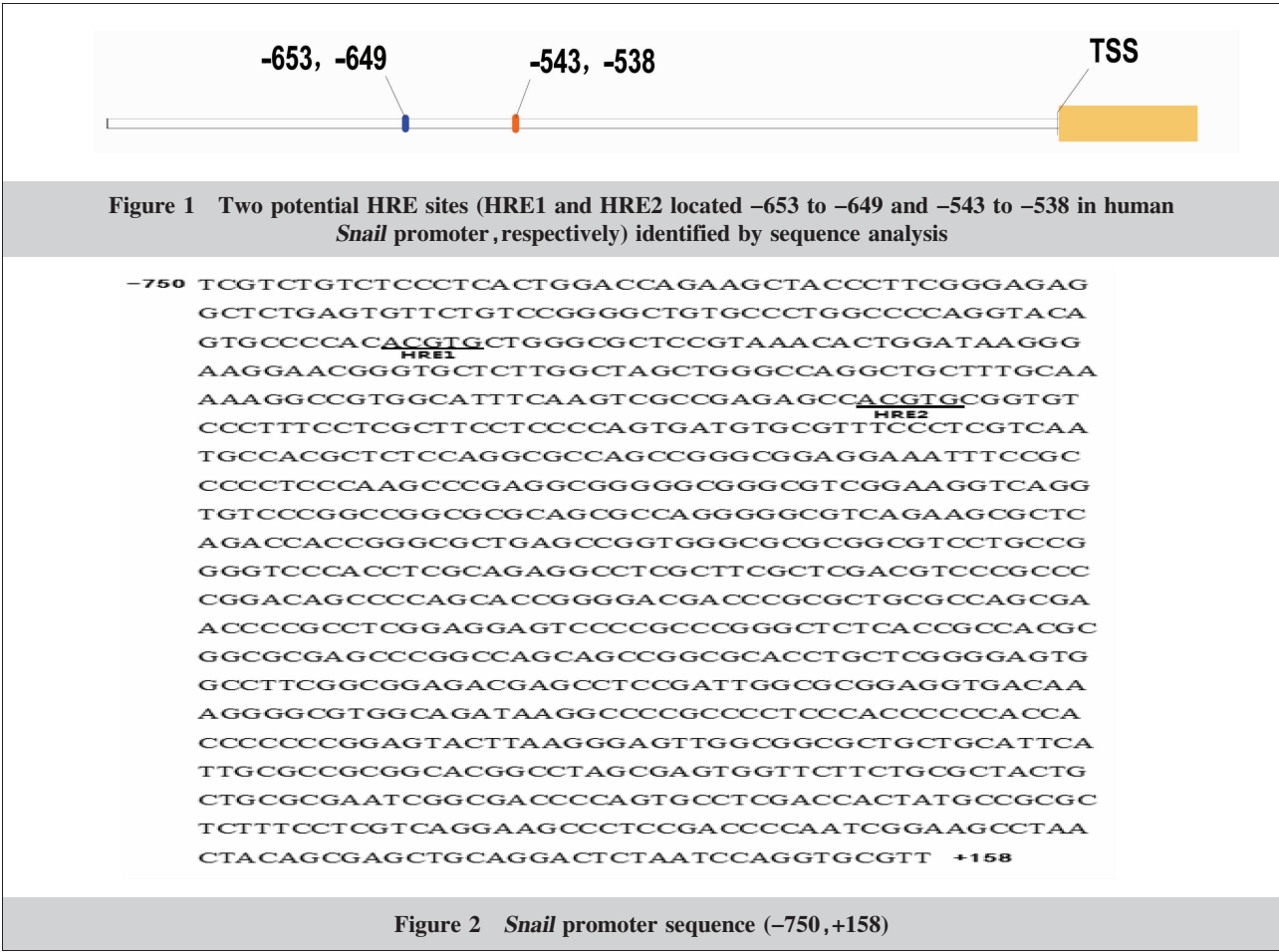
1.2 方法

1.2.1 细胞培养及细胞缺氧模型的构建

Panc-1 及转染后细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养。细胞培养条件为 37 $^{\circ}$ C 恒温、饱和湿度为 5%CO₂、指数生长的细胞为实验对象。细胞缺氧模型采用法国梅尼埃公司的缺氧培养盒, 参照说明书。

1.2.2 *Snail* 启动子区域 HRE 位点分析

应用 transfac (真核生物基因转录调控因子数据库, <http://transfac.gbf.de>) 对人 *Snail* mRNA 全长序列进行分析, 发现 *Snail* 启动子区域存在两个潜在的 HIF-1 α 结合位点 (5'-ACGTG-3')^[6], 命名为 HRE1 (-653, -649) 和 HRE2 (-543, -538)。数字标注的位点即为 HRE (Figure 1)。因此克隆序列为转录起始位点 (transcription start site, TSS) 下游 158bp, 上游 750bp, 全长 908bp (Figure 2)。



1.2.3 荧光素酶报告基因载体的构建

将 *Snail* 启动子片段插入到 pGL4-basic 载体中的荧光素酶报告基因上游, 根据 NCBI GenBank 的序列设计引物序列: forward-primer: 5'-GGGGTAC CGGAAGCTGCTCTCTAGGAGTTAC-3'; reverse-primer: 5'-CCGCTCGAGGATTAGAGTCCTGCAGCTCG-3'。提取 Panc-1 细胞基因组 DNA, 作为 PCR 扩增模板。PCR 扩增条件为预变性 95℃ 5min; 变性 95℃ 30s, 退火 58℃ 30s, 延伸 68℃ 1min, 30 个循环; 68℃ 延伸 10min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。扩增片段通过 Xho I 和 Hind III 酶切消化, 然后插入到同样酶切后的 pGL4-basic 空载体。

1.2.4 脂质体瞬时转染靶细胞 Panc-1 检测启动子荧光素酶活性

试验分组: 空载体 pGL4 组、pGL4-Snail 转染组、pGL4-Snail+HIF-1 α 组。细胞转染前一天接种到 48 孔板中, 质粒转染按 Lipofectamine 2000 使用说明进行。报告基因质粒转染 125ng, HIF-1 α 表达质粒 (pEGFP-N1-HIF1 α) 转染 200ng, 同时转染海洋腔肠荧光素酶 (renilla) 做为内参来校正细胞数和转染效率等, 培养 24h 后收细胞。用双荧光素酶报告基因检测系统检测荧光素酶活性 (活性分析参照检测试剂盒说明)。

1.2.5 *Snail* 启动子区域 HIF-1 α 结合位点突变

按照 Stratagene 公司定点突变试剂盒 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit 的方案操作, 针对 *Snail* 启动子区域的两个 HIF-1 α 结合位点进行突变, 即针对 HRE 核心序列 (ACGTG) 突变, (-653, -649) 位点突变体命名为 PGL4-Snail-mut1, (-543, -538) 位点突变体命名为 PGL4-Snail-mut2 (Figure 3), 测序鉴定。

双荧光素酶报告基因系统检测突变体活性及 HIF-1 α 对其活性影响, 方法同上。依据以上实验结果推断 (-543, -538) 位点发挥功能, 因此 EMSA 和

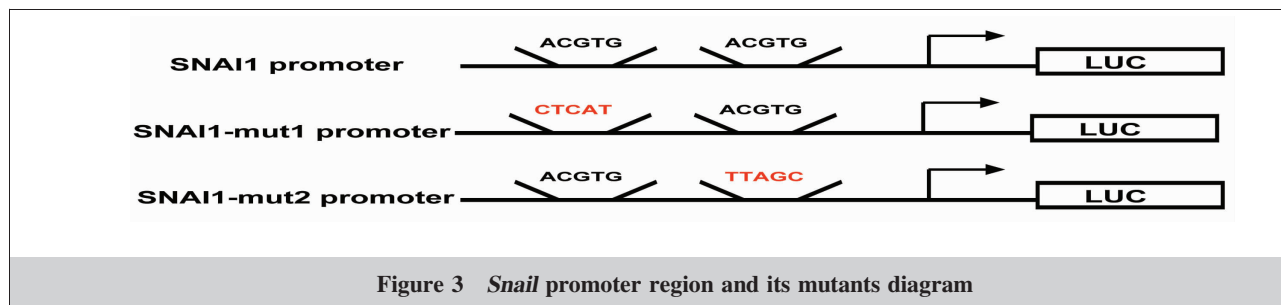
ChIP 试验均针对此核心位点设计引物。

1.2.6 EMSA

Invitrogen 公司订购合成探针, 序列如下: 5'-CGAGAGCCACGTGCGGTGTCCCT T-3'。Panc-1 细胞转染 HIF-1 α 表达质粒 (pEGFP-N1-HIF1 α) 抽提细胞核蛋白。用 1.5 μ l [Gamma 32P]-ATP 标记 3.5pmol EMSA 探针, 0.5 μ l T4 多核苷酸激酶, 37℃ 水浴, 30min。以 1 μ l 0.5mol/L EDTA 终止反应, 添加 100 μ l TE Buffer, 然后将标记好的探针应用 MicroSpin G-25 Columns 纯化标记的探针。用结合缓冲液将蛋白与已标记的探针混匀孵育后冰上 30min。在上述相应的上样体系中额外加入相应的抗体 1/2 μ g, 冰上继续孵育 60min。聚丙烯酰胺凝胶电泳 (270V, 200min)。凝胶真空干燥, 磷屏置于室温压片过夜, 第二天用扫描仪扫片。

1.2.7 ChIP

Panc-1 细胞共转染 HIF-1 α 表达质粒 (pEGFP-N1-HIF1 α) 与 pGL4-Snail。利用 1% 甲醛使细胞中蛋白质与 DNA 交联后, 离心沉淀, 提取细胞核内容物; 用超声波破碎仪断裂染色质, 离心, 收集上清, 用 ChIP 稀释缓冲液 1:10 稀释上清。在液体中加入 100 μ l Protein A Sepharose beads, 4℃ 摇床孵育 1h 后离心, 收集上清加入 2 μ g 的 ChIP 级抗体和兔 IgG 抗体, 4℃ 孵育过夜。用 Protein A Sepharose beads 收集蛋白抗体复合物, 4℃ 2 000rpm 离心 4min, 弃尽上清, 用 ChIP 洗脱缓冲液洗 4 次后, 用 Elution buffer 洗脱。在上述样本中加入蛋白酶 K 充分混匀, 65℃ 水浴过夜。PCR 纯化 DNA, 40 μ l 水洗脱 DNA, PCR 扩增验证样本富集程度, 引物序列: HRE1-forward: 5'-CATCCCTGGAAGCTGCTCTCT-3'; HRE1-reverse: 5'-CTCCAGTGTTTAGCGAGCGC-3'; HRE2-forward: 5'-GCTGGGCCAGGCTGCTTTGCA-3'; HRE2-reverse: 5'-GGACACCTGACCTTCCGACG-3'。反应条件为: 98℃ 预变性 3min, 随后进入循环: 98℃ 20s, 68℃



40s, 72℃ 90s, 共 40 个循环, 最后 68℃ 延伸 5min。扩增产物通过琼脂糖电泳后 EB 染色, 凝胶成像。

1.2.8 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件包进行统计学处理。计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组计量资料之间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

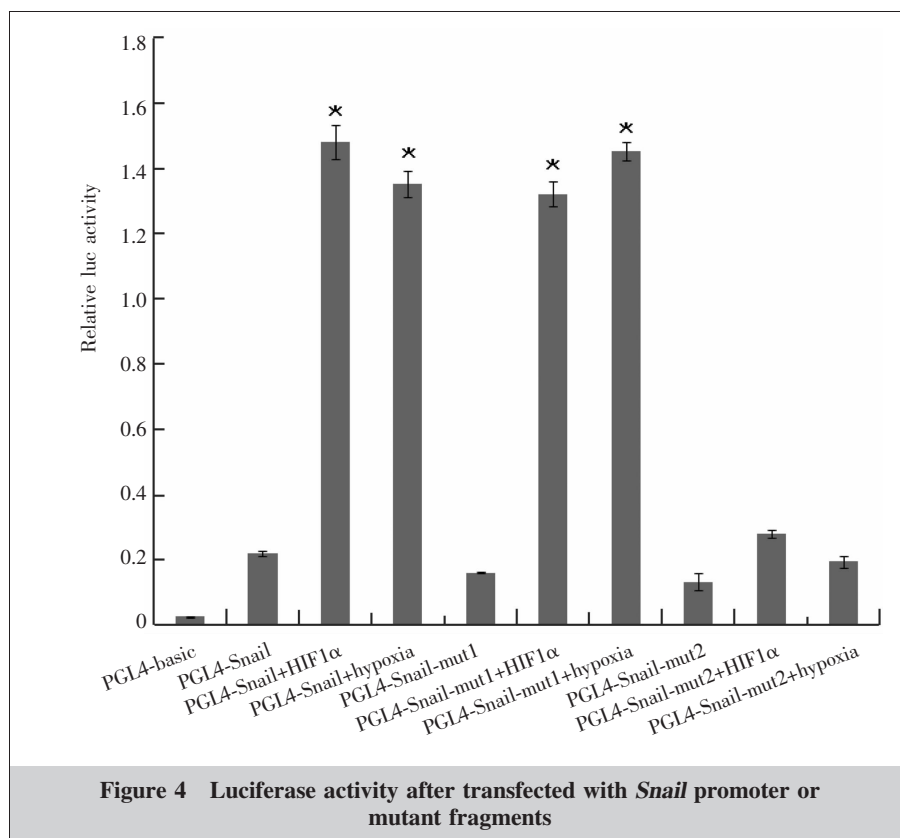
2.1 双荧光素酶报告基因分析系统检测 HIF-1 α 蛋白对 *Snail* 基因启动子区转录活性的影响

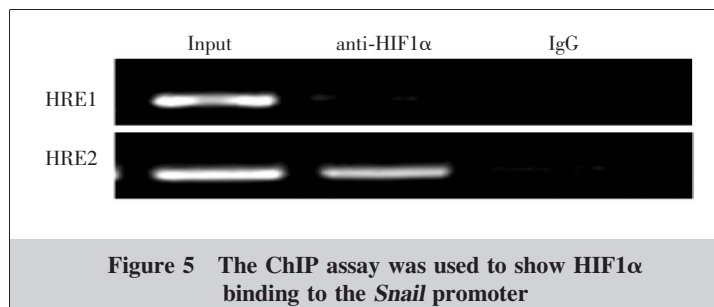
PGL4-*Snail*+HIF-1 α 组和 PGL4-*Snail* 缺氧组荧光素酶活性较 PGL4-*Snail* 常氧组显著提高, 与对照组比高出约 7 倍 (Figure 4)。这提示 *Snail* 启动子区 (-750, +158) 包含 HIF-1 α 特异性结合位点。该区存在两个 HIF-1 α 可能的结合位点 HRE (HRE1: -653, -649; HRE2: -543, -538), 为了明确这两个 HIF-1 α 可能的结合位点哪个发挥作用, 我们构建了这两个结合位点的突变体 (mut1: -653, -649; mut2: -543, -538)。并将这些报告系统的载体分别转染 Panc-1 细胞, 结果显示 PGL4-*Snail*-mut1 +HIF-1 α 组和 PGL4-*Snail*-mut1 缺氧组荧光素酶活性仍较 PGL4-*Snail* 常氧组显著提高, 与对照组比高出约 7 倍。只有 PGL4-*Snail*-mut2 +HIF-1 α 组和 PGL4-*Snail*-mut2 缺氧组荧光素酶活性与 PGL4-*Snail* 常氧组相比没有显著差异。这说明突变了 (-543, -538) 这一位点影响了 HIF-1 α 蛋白与 *Snail* 启动子区的结合, 而突变 (-653, -649) 这一位点则没有这种抑制效应。这些结果表明, *Snail* 的启动子区具有 HIF-1 α 结合位点, 可以被 HIF-1 α 转录激活, 这个结合位点位于 (-543, -538)。

2.2 HIF-1 α 蛋白与 *Snail* 基因启动子区其结合位点存在结合

应用 ChIP 技术检测共转染 HIF-1 α 表达质粒 (pEGFP-N1-HIF1 α) 与 PGL4-*Snail* 的 Panc-1 细胞内 HIF-1 α 与对应 DNA 序列的结合情况。设计的两条引物分别针对两个潜在的 HIF-1 α 结合位点。针对 (-543, -538) 位点设计的引物扩增后, 在对应位置检测到特异结合条带的出现, 而针对 (-653, -649) 位点设计的引物扩增后则没有检测到相应条带 (Figure 5)。用未经抗体沉淀的 Input DNA 扩增的产物电泳条带最强, 而模板为阴性抗体所得 DNA 的扩增产物少, 电泳条带最弱。提示 *Snail* 基因启动子区 HIF-1 α 结合位点 (-543, -538) 是一个有功能的反应元件。

EMSA 研究 HIF-1 α 蛋白与 *Snail* 基因启动子区 HIF-1 α 结合位点体外的结合情况。合成放射性同位素 ([Gamma 32P]-ATP) 标记的 *Snail* 探针, 该探针序列包含了 *Snail* 启动子区 HIF-1 α 结合位点 (-543, -538)。选用转染 HIF-1 α 表达质粒的 Panc-1 细胞作为实验样品。lane 3 为核抽提物与推测探针反应物中, 加入 HIF-1 α 抗体 (1 μ g) 后, 观察到 supershift 现





象;lane 4 为加入 HIF-1 α 抗体(2 μ g)后, supershift 现象更为明显;而加入非相关性抗体 IgG(2 μ g)时,无 supershift 现象(lane 5);lane 2 为核蛋白与标记探针形成阻滞条带;而加入 50 倍的冷探针可使阻滞条带消失(lane 1);加入非特异性竞争物 PolydI-dc,条带仍然存在(lane 6)。这一结果提示 *Snail* 启动子区(-543, -538)位点是 HIF-1 α 的特异性结合位点(Figure 6)。

ChIP 和 EMSA 实验结果明确了 HIF-1 α 蛋白结合于 *Snail* 基因启动子区 HIF-1 α 结合位点(-543,-538)。

3 讨 论

HIF-1 是以异源二聚体蛋白形式存在的转录因子,包括氧敏感的 HIF-1 α 和持续组成表达的 HIF-1 β ,它是缺氧的一个标志物。缺氧条件下,肿瘤细胞内许多基因的转录和表达发生变化,对缺氧作出应答反应,被称为缺氧反应基因。缺氧反应基因中受 HIF-1 α 调控的基因称为 HIF-1 α 的靶基因,这些靶基因的启动子或增强子内含有一个或多个 HRE,其典型的核苷酸序列为 5'-ACGTG-3' 是 HIF-1 α 的 DNA 结合位点,活化的 HIF-1 与之结合,形成 HIF-1、p300/CBP 环腺苷酸反应元件结合蛋白(CREB),以及其他转录因子的起始复合物,从而启动靶基因的转录^[7]。目前已发现的 HIF-1 α 靶基因多达 100 余条,它们参与肿瘤的侵袭转移进程^[8]。

本研究中,我们通过生物信息学技术在 *Snail* 启动子区域找到 2 个可能的 HIF-1 α 特异性结合位点,分别位于(-653,-649)和(-543,-538)。我们克隆了 *Snail* 的一段启动子序列(-750,+158),并构建了分别针对两个结合位点的突变体 mut1(-653,-649)和 mut2(-543,-538)。经双荧光素酶报告基因分析系统检测发现,PGL4-*Snail*+HIF-1 α 组和 PGL4-*Snail* 缺氧组荧光素酶活性较 PGL4-*Snail* 常氧组显著提高,提示 *Snail* 启动子区(-750,+158)包含 HIF-1 α 结合位点。该区存在两个 HIF-1 α 可能的结合位点 HRE(HRE1:-653,-649;HRE2:-543,-538),为了明确这两个 HIF-1 α 可能的结合位点哪个发挥作用,我们构建了这两个结合位点的突变体(mut1:-653,-649;mut2:-543,-538)。并将这些报告基因的载体分别转染 Panc-1 细胞,结果显示 PGL4-*Snail*-mut1+HIF1 α 组和 PGL4-*Snail*-mut1 缺氧组荧光素酶活性仍较 PGL4-*Snail* 常氧组显著提高,与对

照组比高出约 7 倍。只有 PGL4-Snail-mut2+HIF1 α 组和 PGL4-Snail-mut2 缺氧组荧光素酶活性与 PGL4-Snail 常氧组相比没有显著差异。这说明突变 (-543, -538) 这一位点影响了 HIF-1 α 蛋白与 *Snail* 启动子区的结合, 而突变 (-653, -649) 这一位点则无抑制效应。这提示 *Snail* 启动子区 (-543, -538) 位点是 HIF-1 α 特异性结合位点, HIF-1 α 蛋白通过与之结合调节 *Snail* 基因转录活性。最近有研究表明, HIF-1 α 与靶基因特异性位点结合调控其转录是通过靶基因表观遗传修饰如组蛋白乙酰化实现的^[9-12], 我们推测 HIF-1 α 对 *Snail* 的直接调控也存在 *Snail* 基因的组蛋白乙酰化, 这需要进行进一步的实验证明。

缺氧诱导上皮间质转化促进肿瘤的侵袭转移。*Snail* 是参与上皮间质转化的一个关键性转录因子^[4]。我们的实验结果证明 *Snail* 是 HIF-1 α 的一个靶基因, 这为进一步研究胰腺癌的靶向治疗奠定基础, 为阐述胰腺癌侵袭转移的分子机制提供新的思路。

参考文献:

- [1] Koch CJ, Evans SM. Optimizing hypoxia detection and treatment strategies[J]. *Semin Nucl Med*, 2015, 45(2): 163-176.
- [2] Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(5): 378-389.
- [3] Guan X. Cancer metastases: challenges and opportunities [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(5): 402-418.
- [4] Chou YS, Yang MH. Epithelial-mesenchymal transition-related factors in solid tumor and hematological malignancy [J]. *J Chin Med Assoc*, 2015, 78(8): 438-445.
- [5] Zhu GH, Cen G, Huang C, et al. Clinical significance of expression of HIF-1 α and EMT-related factors in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2011, 19(19): 2022-2030. [朱光辉, 岑刚, 黄陈, 等. HIF-1 α 和 EMT 相关蛋白在胰腺癌组织中的表达及临床意义[J]. *世界华人消化杂志*, 2011, 19(19): 2022-2030.]
- [6] Vriend J, Reiter RJ. Melatonin and the von Hippel-Lindau/HIF-1 oxygen sensing mechanism: a review[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1865(2): 176-183.
- [7] Dyson HJ, Wright PE. Role of intrinsic protein disorder in the function and interactions of the transcriptional coactivators creb-binding protein (CBP) and p300 [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(13): 6714-6722.
- [8] Unwith S, Zhao H, Hennah L, et al. The potential role of HIF on tumour progression and dissemination[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(11): 2491-2503.
- [9] Tudisco L, Della Ragione F, Tarallo V, et al. Epigenetic control of hypoxia inducible factor-1 α -dependent expression of placental growth factor in hypoxic conditions[J]. *Epigenetics*, 2014, 9(4): 600-610.
- [10] Watson CJ, Collier P, Tea I, et al. Hypoxia-induced epigenetic modifications are associated with cardiac tissue fibrosis and the development of a myofibroblast-like phenotype[J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(8): 2176-2188.
- [11] Poljaková J, Groh T, Gudino ZO, et al. Hypoxia-mediated histone acetylation and expression of N-myc transcription factor dictate aggressiveness of neuroblastoma cells [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(4): 1928-1934.
- [12] Wang JQ, Wu KJ. Epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition by hypoxia in cancer: targets and therapy[J]. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(10): 1272-1278.

郑重申明

本刊作者谨防商务网站虚假征稿

《肿瘤学杂志》官网网址为: <http://www.chinaoncology.cn> 请作者直接点击进入网页, 注册并登录采编系统进行投稿。如有疑问请致电 0571-88122280, 88122282, 13758247950, 13757142507 查询。本刊邮箱为 zlxzz04@126.com 不再接受邮件投稿, 所有稿件均通过采编系统管理, 作者可通过采编系统查阅稿件审理进展。通过百度、谷歌等搜索后出现的注有《肿瘤学杂志》字样的代理征稿等相关信息, 本刊均未同其签订过委托、授权或合作协议, 敬请作者谨防上当!