

Ikaros调控FUT4转录活性及其机制的初步分析

易丽君 胡清华 陈卡 周菁 李红*

(江西省儿童医院中心实验室, 南昌 330006)

摘要 岩藻糖基转移酶IV(fucosyltransferase IV, FUT4)是催化蛋白质岩藻糖基化的关键酶, 参与肿瘤细胞的增殖、迁移和浸润, 但关于FUT4的转录调控机制目前尚不清楚。该文通过对人FUT4基因近端启动子序列进行分析, 构建不同长度启动子删减体的荧光素酶报告基因表达载体, 分析其转录活性。转录因子结合位点在线网站ALGGEN预测FUT4近端启动子序列, 发现转录因子Ikaros在FUT4的启动子区有潜在的结合位点。该研究旨在初步探讨Ikaros调控FUT4转录活性, 进一步完善FUT4的调控机制。荧光素酶活性分析FUT4基因启动子删减体的转录活性和Ikaros对FUT4转录活性的影响。结果显示, FUT4转录起始位点上游1.2 Kb(FUT4-1.2 Kb)在293T细胞中转录活性最高; Ikaros抑制FUT4的转录活性, 且呈现剂量依赖效应; 当Ikaros的DNA结合位点发生缺失性突变时, 能够解除Ikaros对FUT4转录活性的抑制作用。

关键词 岩藻糖基转移酶IV; 转录因子Ikaros; 荧光素酶活性分析

Ikaros Regulates FUT4 Promoter Activity and Its Mechanism

Yi Lijun, Hu Qinghua, Chen Ka, Zhou Jing, Li Hong*

(Department of Central Laboratory, Jiangxi Provincial Children's Hospital, Nanchang 330006, China)

Abstract Fucosyltransferase IV (FUT4) is the key enzyme in the process of the fucosylation. It is involved in the proliferation, migration and infiltration of tumor cells, but the mechanism of transcription regulation of FUT4 remained unclear. In this study, we constructed different recombinant plasmids carrying FUT4 promoter segments with different lengths according to the bioinformatics analysis and identified their transcriptional activities in 293T cell line. It's found that there were potential DNA binding sites in the promoter of FUT4 according to analyses of FUT4 promoter by ALGGEN online. This study aims to explain the regulation of FUT4 by Ikaros to supply the FUT4 regulation mechanism. The transcriptional activities were analyzed by double luciferase method. The effects of Ikaros on FUT4 transcriptional activity were analyzed. The results showed that 1.2 Kb upstream of the FUT4 transcription initiation site (FUT4-1.2 Kb) had the highest transcriptional activity in 293T cells. Ikaros inhibited the transcriptional activity of FUT4 in a dose-dependent manner. When Ikaros DNA-binding sites were deleted, it was possible to remove the inhibitory effect of Ikaros on FUT4 transcriptional activity.

Keywords fucosyltransferase IV; transcription factor Ikaros; luciferase activity assay

淋巴细胞转录因子Ikaros在造血细胞和神经细胞中特异性表达, 通过调节细胞周期影响细胞的增殖和分化, 同时作为肿瘤抑制因子, Ikaros异常会阻滞T、B细胞的发育从而导致肿瘤形成^[1-3]。结构上,

Ikaros通过可变剪切形成不同的亚型(可变剪切体/突变体), 分为功能亚型Ikaros1~3和显性负向(DN)亚型Ikaros4~10, DN亚型的表达能够抑制或削弱Ikaros的功能, 同时抑制功能性Ikaros的表达水平。其中, 临

收稿日期: 2016-10-27 接受日期: 2016-11-25

国家自然科学基金(批准号: 31500653)、江西省科技厅重大项目(批准号: 20133BBG70023)和江西省卫计委科技计划项目(批准号: 20161121)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0791-86805961, E-mail: icemade@hotmail.com

Received: October 27, 2016 Accepted: November 25, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31500653), Science and Technology Projects of Jiangxi Province (Grant No.20133BBG70023) and Project of Health Department of Jiangxi Province (Grant No.20161121)

*Corresponding author. Tel: +86-791-86805961, E-mail: icemade@hotmail.com

网络出版时间: 2016-12-29 15:27:11

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161229.1527.012.html>

床数据结果表明,在DN亚型Ikaros中,Ikaros6在急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)中出现的频率最高,且抑制作用最强。

细胞表面糖蛋白或糖脂含有岩藻糖基化的寡糖链,参与胚胎的发育、受精卵的着床、组织器官形成,且与肿瘤的生长和浸润密切相关。根据催化岩藻糖基化寡糖合成的岩藻糖基转移酶不同,分别命名为FUT1~11(fucosyltransferase 1-11)。在发生多重耐药(multi-drug resistance, MDR)的肝癌细胞和急性早幼粒白血病细胞中,都伴随着岩藻糖基化水平的增加。已有研究表明,FUTs在肿瘤组织中表达水平明显增高,其中,FUT4高水平表达与细胞增殖、MDR及预后密切相关^[4]。

FUT4主要在白细胞和上皮细胞中表达,在肿瘤细胞中表达异常,如结肠癌、胰腺癌中FUT4明显升高^[5-6]。前期工作表明,FUT4在儿童ALL中表达水平也显著升高(数据没有显示),但其表达调控机制尚不清楚。本研究以荧光素酶报告基因表达载体PGL4质粒为载体构建FUT4启动子序列的报告基因质粒,同时构建Ikaros的表达载体,初步探讨Ikaros对FUT4启动子转录活性的调控作用,揭示FUT4基因的表达调控机制之一,为进一步研究FUT4基因转录调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

荧光素酶报告基因表达载体PGL4.14购自Promega公司。DNA聚合酶及相关PCR试剂购自天根生化科技(北京)有限公司。人外周血DNA提取试剂盒、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自Omega公司。限

制性核酸内切酶购自NEB公司。Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司。细胞株293T为本实验室储存。

1.2 基因序列的获得

搜索NCBI核酸数据库,获得Ikaros和FUT4全长mRNA序列,对FUT4基因近端启动子序列进行预测,获得长度为2.4 Kb的近端启动子序列。

1.3 引物设计与合成

根据GenBank公布的FUT4基因-2.4~0 Kb区域的核苷酸序列,设计扩增该序列不同长度的PCR引物,引物酶切位点分别为Nhe I和Kpn I,引物序列如表1。引物由金斯瑞生物科技有限公司合成和纯化。

1.4 Ikaros表达载体的构建及鉴定

经典法(Trizol-氯仿法)提取人血细胞中总RNA,1 µg RNA逆转录cDNA,以此为模板,PCR扩增Ikaros的全长。PCR扩增条件为:95 °C变性5 min;95 °C变性30 s,64 °C退火30 s,72 °C延伸2 min,35个循环;72 °C延伸10 min。以1%琼脂糖凝胶电泳进行检测,并回收PCR产物。BamH I和Xho I双酶切PCR产物和pcDNA3.1 vector,回收纯化后,将PCR产物和载体pcDNA3.1大片段进行连接,获得的质粒命名为pcDNA3.1-Ikaros。所构建的质粒采用BamH I和Xho I双酶切鉴定,阳性克隆由广州华大基因公司测序。

1.5 FUT4近端启动子序列质粒的构建及鉴定

按Omega公司外周血DNA提取试剂盒操作说明提取人全血细胞基因组DNA,以此为模板,PCR扩增相应DNA片段。PCR条件为:95 °C变性5 min;95 °C变性30 s,60 °C退火30 s,72 °C延伸2 min,30个循环;72 °C延伸10 min。以1%琼脂糖凝胶电泳进行检测,并回收PCR产物。Kpn I和Nhe I双酶切PCR产物和载体pGL4,回收纯化后,将PCR

表1 引物序列表
Table 1 Primers sequences

引物名称 Name	序列(5'→3')	
	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer
Ikaros	ATG GAT GCT GAT GAG GGT CAA G	TTA GCT CAT GTG GAA GCG GTG
FUT4-0.4 Kb	TCA TTC ATC TCA CTG AAC AGG CAA	GAG GGA GGG AGG GAG TCC
FUT4-0.8 Kb	TCT ATT TCT CCC CTA GTA TCA GTG	GAG GGA GGG AGG GAG TCC
FUT4-1.2 Kb	TTT TCC GAG ACG GAG TCT CGC TTT	GAG GGA GGG AGG GAG TCC
FUT4-1.6 Kb	TGA AGA GGG AGA AGA ATG TGA ATA	GAG GGA GGG AGG GAG TCC
FUT4-2.0 Kb	AAT AAG AAC AAT CCA GTC CCC	GAG GGA GGG AGG GAG TCC
FUT4-2.4 Kb	CCC TCC CCA CTA TCT GTT TCT CTC G	GGT CTC GAG CCT CCT GTA CCT TCC

产物和载体pGL4大片段进行连接,获得的质粒分别命名为pGL4-FUT4-2.4 Kb、pGL4-FUT4-2.0 Kb、pGL4-FUT4-1.6 Kb、pGL4-FUT4-1.2 Kb、pGL4-FUT4-0.8 Kb、pGL4-FUT4-0.4 Kb。所构建的质粒采用*Kpn* I、*Nhe* I双酶切鉴定,阳性克隆由广州华大基因公司测序。

1.6 Ikaros调控FUT4启动子转录活性的检测

pcDNA3.1-Ikaros与各FUT4启动子删减体报告载体共转染293T细胞,以pcDNA3.1和pGL4空载体共转染组为空白对照,以pcDNA3.1空载体和PGL4-FUT4-2.4 Kb共转染组为阴性对照,检测Ikaros对不同长度片段的FUT4基因启动子的转录活性的影响。293T细胞均接种于含有10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中,37℃、5% CO₂培养箱中培养。转染前1 d将其平均接种于24孔板中,调整密度使转染时细胞达到70%~80%汇合。用Lipofectamine 2000脂质体法将重组质粒pcDNA3.1-Ikaros(100 ng)分别与pGL4-FUT4-2.4 Kb、pGL4-FUT4-2.0 Kb、pGL4-FUT4-1.6 Kb、pGL4-FUT4-1.2 Kb、pGL4-FUT4-0.8 Kb、pGL4-FUT4-0.4 Kb质粒转染至细胞,转染48 h后用PBS洗各组细胞2次,裂解细胞后在多功能酶标仪中检测荧光素酶活性。计算萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值,即为报告基因的相对活性,实验重复3次。

1.7 细胞增殖与凋亡的测定

pcDNA-Ikaros、pcDNA-Ikaros6分别转染293T细胞,以pcDNA载体作为阴性对照组,检测Ikaros和Ikaros6对293T细胞增殖和凋亡的影响。蛋白质免疫印迹检测凋亡相关蛋白Bcl-2(B cell lymphoma/leukemia-2)和Bax(Bcl-2 associated X protein)蛋白质水平。对数期细胞接种96孔板,分别转染Ikaros表达重组质粒,分别在0、24、48、72 h加入5 mg/mL MTT溶液20 μL,继续培养4 h,轻轻吸去上清,每孔加150 μL DMSO,充分振荡混匀,在酶标仪上测定570 nm处测定吸光度值,实验重复3次。空白对照组为无细胞DMEM培养液。以培养时间为横坐标,吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线,计算细胞增殖率。
$$\text{增殖率}(\%) = (D_{\text{实验}} - D_{\text{空白对照}}) / (D_{\text{对照}} - D_{\text{空白对照}}) \times 100\%$$

慢病毒包装Ikaros6,转染人白血病细胞株Jurkat,以慢病毒空载体作为阴性对照组,嘌呤霉素抗性筛选稳转细胞株,检测Ikaros调控FUT4的表达水平及对Jurkat细胞凋亡的影响。

1.8 统计学处理

采用GraphPad prism 5软件进行数据分析和作图。常规进行方差齐性检验,正态性检验。计量资料实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。单变量两组资料之间的比较采用*t*检验。多组资料之间的比较采用单因素方差分析,方差不齐采用非参数检验。以*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ikaros mRNA全长的PCR扩增

提取人外周血全血总RNA,测定RNA的浓度和纯度。将1 μg RNA逆转录成cDNA,以此为模板进行PCR扩增,1%琼脂糖凝胶电泳后,可见1 560 bp的特异性条带(图1A)。

2.2 FUT4启动子不同片段的PCR扩增与鉴定

以人全血的DNA为模板,以FUT4启动子的不同长度片段引物进行PCR扩增后,进行电泳,可见2 400、2 000、1 600、1 200、800、400 bp特异性扩增条带,扩增出不同长度的FUT4启动子序列,条带分子量大小与预期一致(图2A)。

2.3 重组质粒的鉴定

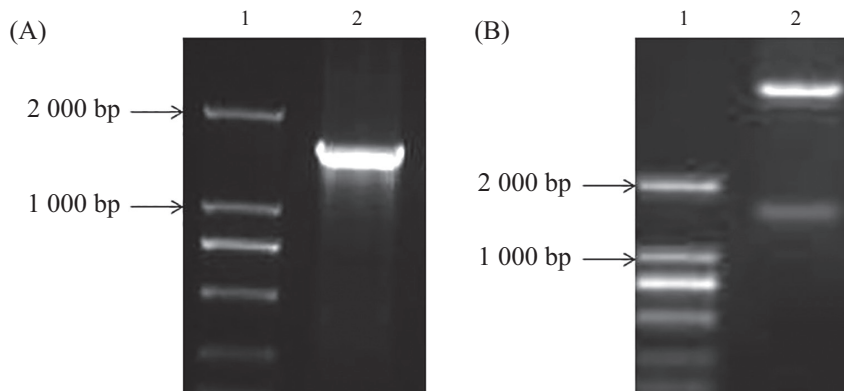
将pcDNA3.1 vector和Ikaros的PCR产物用*Bam*HI和*Xho* I双酶切,纯化后连接,转化筛选阳性克隆,可疑阳性克隆经双酶切鉴定(图1B),最终以测序结果为准。利用*Kpn* I和*Nhe* I内切酶将不同FUT4启动子片段连接到PGL4载体上,酶切鉴定(图2B)可疑阳性克隆,酶切产物电泳分析,有2条电泳带,与预测一致。各重组质粒经华大测序分析,序列结果与Genebank序列一致。

2.4 FUT4启动子转录活性检测

将各FUT4启动子重组质粒100 ng转染入293T细胞,利用荧光素酶检测系统测定荧光值,分析不同启动子片段的活性。不同启动子的删减体缺失片段示意图如图3A所示。启动子活性分析表明,重组质粒pGL4-FUT4-2.4 Kb、pGL4-FUT4-2.0 Kb、pGL4-FUT4-1.6 Kb、pGL4-FUT4-1.2 Kb、pGL4-FUT4-0.8 Kb和pGL4-FUT4-0.4 Kb与pGL4空载体相比,相对荧光值显著增强(*P*<0.05)。而在pGL4-FUT4-1.2 Kb的荧光素酶的相对活性最强(图3B)。结果提示,FUT4启动子在-800~-1 200 bp的转录活性最强,在此附近区域可能含有激活型顺式作用元件。

2.5 Ikaros调控FUT4转录活性检测

将等量的Ikaros和各FUT4启动子重组质粒共

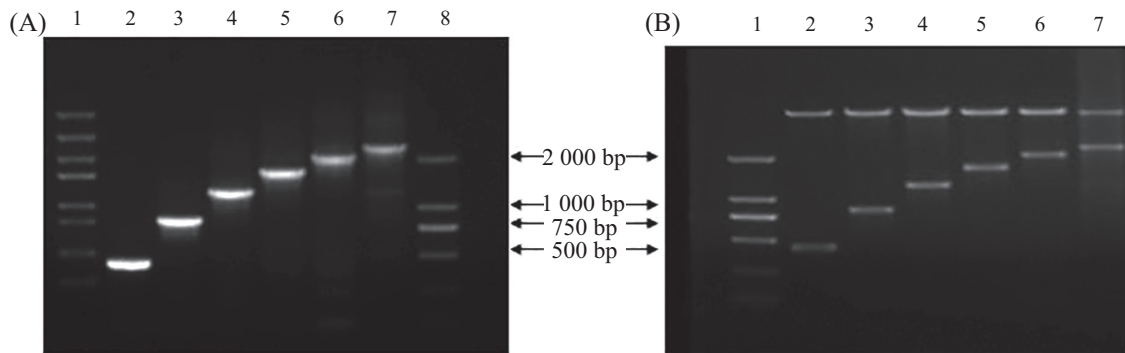


A: *Ikaros*特异性引物PCR扩增产物电泳图; 1: 2 000 bp marker, 2: *Ikaros*特异性PCR产物。B: pcDNA-*Ikaros*阳性重组子*Bam*H I和*Xho* I双酶切鉴定电泳图; 1: 2 000 bp marker; 2: pcDNA-*Ikaros*双酶切产物。

A: agarose gel electrophoresis of PCR products of *Ikaros*; 1: 2 000 bp marker, 2: PCR products of *Ikaros*. B: identification of recombinant plasmid of pcDNA-*Ikaros* double digestion with *Bam*H I and *Xho* I; 1: 2 000 bp marker, 2: the product of pcDNA-*Ikaros* with digestion.

图1 *Ikaros* PCR产物与pcDNA-*Ikaros*重组质粒的鉴定

Fig.1 Identification of PCR product and recombinant plasmid of *Ikaros*



A: *FUT4*启动子各删减体的特异性引物PCR电泳图; 1: 5 000 bp marker, 2: *FUT4*-0.4 Kb PCR产物, 3: *FUT4*-0.8 Kb PCR产物, 4: *FUT4*-1.2 Kb PCR产物, 5: *FUT4*-1.6 Kb PCR产物, 6: *FUT4*-2.0 Kb PCR产物, 7: *FUT4*-2.4 Kb PCR产物, 8: 2 000 bp marker。B: *FUT4*启动子各删减体与荧光报告载体pGL4阳性重组子*Kpn* I和*Nhe* I双酶切鉴定电泳图; 1: 2 000 bp marker, 2: pGL4-*FUT4*-0.4 Kb双酶切产物, 3: pGL4-*FUT4*-0.8 Kb双酶切产物, 4: pGL4-*FUT4*-1.2 Kb双酶切产物, 5: pGL4-*FUT4*-1.6 Kb双酶切产物, 6: pGL4-*FUT4*-2.0 Kb双酶切产物, 7: pGL4-*FUT4*-2.4 Kb双酶切产物。

A: agarose gel electrophoresis of PCR products of *FUT4* different promoter; 1: 5 000 bp marker; 2: PCR products of *FUT4*-0.4 Kb, 3: PCR products of *FUT4*-0.8 Kb, 4: PCR products of *FUT4*-1.2 Kb, 5: PCR products of *FUT4*-1.6 Kb, 6: PCR products of *FUT4*-2.0 Kb, 7: PCR products of *FUT4*-2.4 Kb, 8: 2 000 bp marker. B: identification of recombinant plasmids of *FUT4* different promoter double digestion with *Kpn* I and *Nhe* I; 1: 2 000 bp marker; 2: the products of pGL4-*FUT4*-0.4 Kb, 3: the products of pGL4-*FUT4*-0.8 Kb, 4: the products of pGL4-*FUT4*-1.2 Kb, 5: the products of pGL4-*FUT4*-1.6 Kb, 6: the products of pGL4-*FUT4*-2.0 Kb, 7: the products of pGL4-*FUT4*-2.4 Kb.

图2 *FUT4*启动子各删减体的鉴定

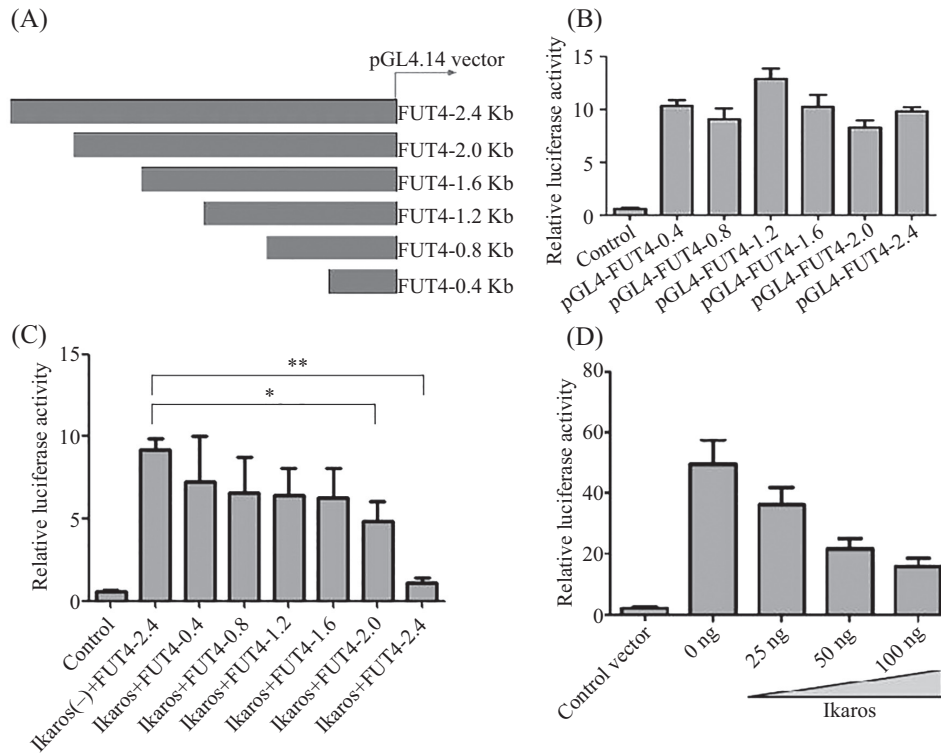
Fig.2 Identification of recombinant plasmids of *FUT4* different promoters

转染入293T细胞, 利用荧光素酶报告系统测定荧光值, 分析Ikaros蛋白质对*FUT4*不同启动子片段的活性的影响。启动子活性分析表明, 与pGL4空载体相比, 各删减体的转录活性水平均降低, 重组质粒pGL4-*FUT4*-2.4 Kb的荧光值显著降低($P < 0.001$), pGL4-*FUT4*-2.0 Kb的荧光值降低($P < 0.05$), 均具有统计学差异。由此表明, Ikaros蛋白能够抑制*FUT4*启动子的转录活性, 且抑制作用最强的是pGL4-*FUT4*-2.4 Kb(图3C), 初步结果表明, Ikaros蛋白质能够抑制*FUT4*的表达, 且可能在*FUT4*转录起始位点: -400 bp和-2.4~-2.0 Kb

有转录调控因子Ikaros的结合位点。

2.6 Ikaros抑制*FUT4*基因表达具有剂量依赖性

实验证明, Ikaros对pGL4-*FUT4*-2.4 Kb的抑制效应最明显, 将不同剂量的pcDNA3.1-Ikaros分别与pGL4-*FUT4*-2.4 Kb共转染入293T细胞, 利用荧光素酶报告系统测定荧光值, 分析不同剂量的Ikaros对*FUT4*的抑制效应。启动子活性分析表明, 不同剂量的Ikaros对*FUT4*的抑制效应不等, 在未达饱和时, 随着Ikaros量的增加, 抑制效果越来越明显(图3D)。实验结果表明, Ikaros抑制*FUT4*启动子的转录活性呈



A: *FUT4*启动子各删减体的结构示意图; B: 转染等量的*FUT4*启动子删减体的荧光报告。重组质粒转染293T细胞, 48 h后测定荧光值, 以空载体作为空白对照, 检测不同删减体的荧光转录活性; C: Ikaros对*FUT4*启动子删减体的转录抑制作用。以空载体作为空白对照, 等量Ikaros与等量*FUT4*各删减体共转染293T细胞, 分别检测相对荧光活性; D: Ikaros对*FUT4*启动子的抑制效应具有剂量依赖性。以空载体作为空白对照, 不等量的Ikaros与等量pGL4-FUT4-2.4 Kb共转染293T细胞, 分别检测各组的相对荧光活性。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: schematic diagram of promoter deletion constructs of the *FUT4* promoter; B: *FUT4* promoter activity analysis of serial *FUT4* promoter deletion constructs. *FUT4* promoter constructs were transfected into 293T cells, the luciferase activities of the deletion constructs were normalized to the control group and presented as a relative level of luciferase activity; C: Ikaros binding represses the transcription of *FUT4*. Ikaros and *FUT4* promoter constructs were transfected respectively into 293T cells, the luciferase activities of the deletion constructs were normalized to the control group and presented as a relative level of luciferase activity; D: Ikaros in a dose-dependent manner and the longest *FUT4* promoter constructs were transfected into 293T cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图3 Ikaros对*FUT4*启动子各删减体转录活性的影响

Fig.3 Effect of Ikaros on the activities of *FUT4* promoters with different length in the 293T cells

现剂量依赖效应。

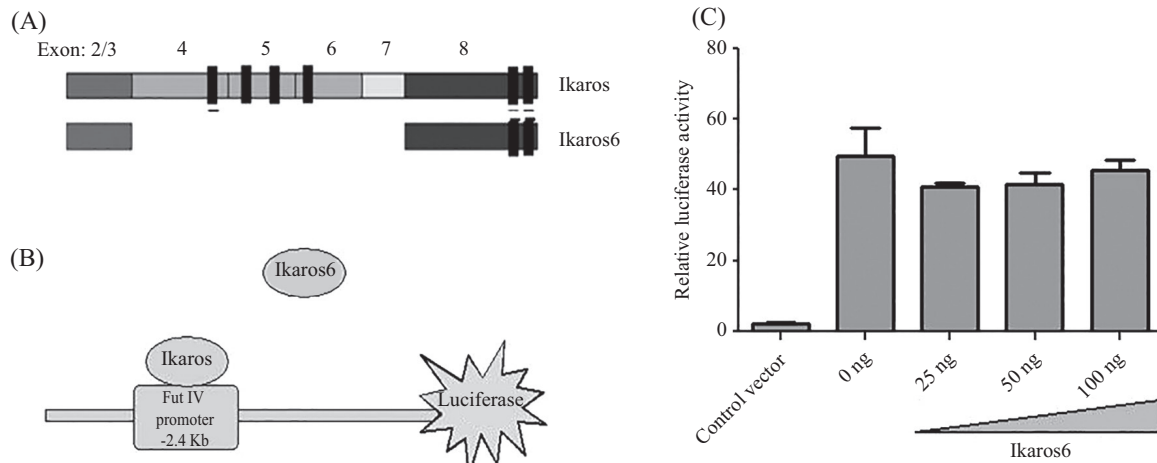
2.7 Ikaros突变体解除Ikaros对*FUT4*启动子的抑制效应

大量研究表明, Ikaros通过可变剪切形成不同的突变体, 在无功能亚型中出现频率最高的为Ikaros6, 本研究构建了Ikaros6的表达载体pcDNA-Ikaros6, 将不同剂量的pcDNA3.1-Ikaros6分别与pGL4-FUT4-2.4 Kb共转染入293T细胞, 利用荧光素酶报告系统测定荧光值, 操作过程同上, 启动子活性分析表明, Ikaros6对*FUT4*启动子的转录活性无影响, 说明当Ikaros发生突变时, 解除了Ikaros对*FUT4*启动子的抑制效应(图4C)。

2.8 Ikaros通过调控*FUT4*基因表达影响细胞增殖和凋亡

通过MTT法检测不同时间点pcDNA3.1-vector、pcDNA3.1-Ikaros、pcDNA3.1-Ikaros6组对293T细胞增

殖的影响。以转染0 h的增殖率为1(100%), 计算不同时间点细胞的增殖率, pcDNA3.1-vector、pcDNA3.1-Ikaros、pcDNA3.1-Ikaros6转染24 h后, 增殖率分别为(78.79±5.8)%、(88.53±11.1)%、(94.51±9.4)%。可能由于转染试剂对细胞造成损伤, 故增殖率低于转染前。转染48 h后, 增殖率分别为(110.43±11.3)%、(132.25±7.8)%、(151.94±5.7)%, 细胞增殖达到高峰期, Ikaros6组增殖率高于其他2组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。转染72 h, 后期因代谢产物的积累和营养缺乏导致细胞生长受抑, 增殖率分别为(65.26±2.69)%、(68.15±3.8)%、(74.77±2.3)%。同一时间点, pcDNA3.1-vector对照组和pcDNA3.1-Ikaros组的增殖率均低于pcDNA3.1-Ikaros6组。但有文献指出, Ikaros转染293T细胞易发生SUMO化修饰, 能够解除Ikaros对细胞增殖抑制的作用, 故相对于对照

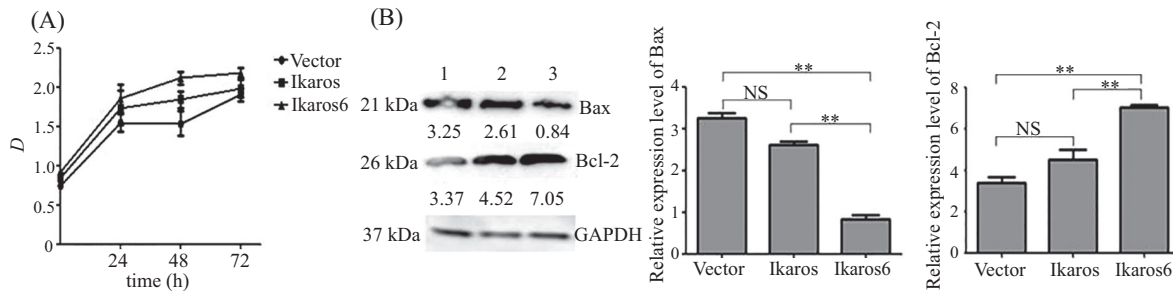


A: Ikaros与其突变体Ikaros6的结构示意图; B: Ikaros和Ikaros6调控FUT4启动子转录活性示意图, 当转录因子Ikaros缺失突变成Ikaros6时, 缺失了DNA的结合位点, 无法结合在FUT4的启动子上; C: 转染不等量的Ikaros6和等量的PGL4-FUT4-2.4 Kb入293T细胞, 荧光值无明显变化, Ikaros6解除了Ikaros对FUT4启动子的转录抑制作用。

A: the structure diagram of Ikaros and its mutant Ikaros6; B: the diagram of Ikaros and Ikaros 6 regulating *FUT4* promoter transcription activity, when the transcription factor Ikaros deletion mutation which lack DNA binding sites, it can not be combined in the *FUT4* promoter; C: transfection of Ikaros6 and an equal amount of PGL4-FUT4-2.4 Kb into 293T cells showed no significant change in fluorescence, and Ikaros6 isoform abrogates its repressor role in *FUT4* transcription.

图4 Ikaros6对FUT4启动子删减体的转录活性无抑制作用

Fig.4 Non-DNA-binding Ikaros6 isoform abrogates its repressor role in *FUT4* transcription



A: MTT法检测不同时间段Ikaros及其突变体Ikaros6对细胞增殖的影响; B: 免疫蛋白印迹法检测细胞凋亡相关蛋白Bax和Bcl-2的表达水平; 1: pcDNA vector, 2: pcDNA-Ikaros, 3: pcDNA-Ikaros6. ** $P < 0.01$, NS: 差异无显著性。

A: Ikaros and its mutant Ikaros6 on cell proliferation were detected in different time by MTT assay; B: Bax and Bcl-2 were detected by Western blot; 1: pcDNA vector, 2: pcDNA-Ikaros, 3: pcDNA-Ikaros6. ** $P < 0.01$, NS: not significance.

图5 Ikaros对293T细胞增殖和凋亡的影响

Fig.5 Effect of Ikaros isoforms on the proliferation and apoptosis of 293T cells

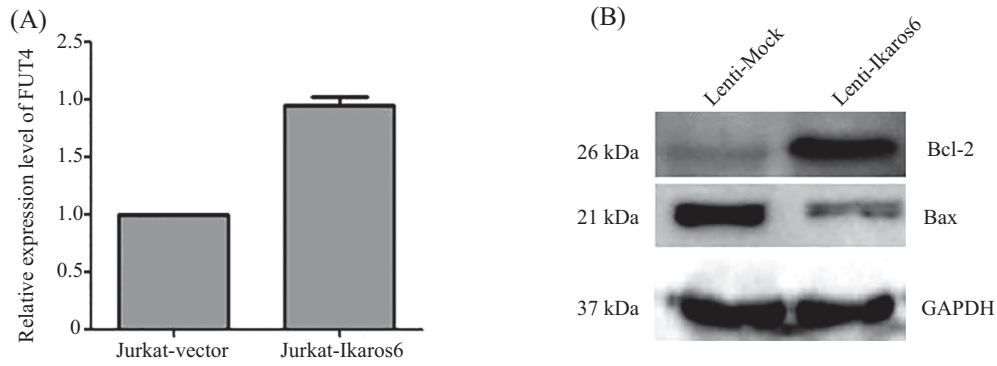
组, Ikaros组增殖率高于对照组, 由此可见, 相比于Ikaros, 显性负向型IK6促进293T细胞增殖(图5A)。

293T细胞经瞬时转染48 h后, 收获细胞, 提取蛋白质, 用Western blot检测细胞凋亡相关蛋白的水平。pcDNA3.1-vector、pcDNA3.1-Ikaros、pcDNA3.1-Ikaros6组Bax相对水平分别为 3.25 ± 0.13 、 2.61 ± 0.08 、 0.84 ± 0.09 , Bcl-2相对水平分别为 3.37 ± 0.30 、 4.52 ± 0.48 、 7.05 ± 0.10 , 由此可见, Ikaros6组抗凋亡蛋白Bcl-2的相对水平高于对照组, 促凋亡蛋白Bax的相对水平低于对照组, 差异有统计学意义(图5B)。

多项研究表明, 显性负向型Ikaros6的表达抑制了功能型Ikaros的表达, Jurkat细胞株仅表达功能型Ikaros, Ikaros6转染Jurkat, FUT4的表达水平升高(图6A), 且Ikaros6呈现抗凋亡的作用(图6B)。

3 讨论

基因表达调控机制是当前基因组学研究的热点之一, 对FUT4基因表达的调控机制目前还不甚清楚。有研究表明, FUT4基因表达受其启动子区甲基化调控。本文从基因启动子水平初步分析了Ikaros



A: Ikaros在白血病细胞株Jurkat中调控FUT4的表达。建立Ikaros突变体Lenti-Ikaros6稳转细胞株, Lenti-Mock作为对照组, 分别检测FUT4的表达水平。B: 免疫蛋白印迹法检测细胞凋亡相关蛋白Bax和Bcl-2在白血病细胞株Lenti-Mock和Lenti-Ikaros6中的表达水平。

A: Ikaros regulates the expression of *FUT4* in Jurkat cell line. Lenti-Ikaros6 and Lenti-Mock were constructed and selected, the relative expression level of *FUT4* was detected. B: Bax and Bcl-2 were detected by Western blot in Lenti-Mock and Lenti-Ikaros6 Jurkat stable cell lines.

图6 Ikaros调控FUT4的表达及抗凋亡作用

Fig 6 Ikaros regulates the expression of *FUT4* and its antiapoptotic effect

调控FUT4基因转录活性的分子机制。FUT4合成产物LeY是肿瘤的一个相关抗原, 抑制FUT4的表达能够抑制鳞癌细胞的增殖, 化疗药物与FUT4抑制剂的联合使用, 能够加强对肿瘤细胞的增殖抑制作用^[7]。Ikaros影响细胞的增殖和凋亡, 异常表达时, 发挥抗凋亡的作用, 同时在真核细胞中, Ikaros能够抑制FUT4的表达, 当转染Ikaros6时, 其干扰了功能型Ikaros的表达, 从而解除了Ikaros对FUT4的抑制作用。

本研究通过构建FUT4启动子不同删减体的荧光素酶报告基因载体, 荧光素酶活性分析各删减体的转录活性, 在FUT4基因转录起始位点上游-0.8~1.6 Kb的转录活性最强, 与杨雪松等^[8]的研究结果一致。

Ikaros属于锌指结构家族的成员, 由IKZF1基因编码, 具有C2H2结构, 含有8个外显子, 4~6号外显子编码N-端的4个DNA结合结构域, 具有DNA结合能力, 8号外显子编码C-端蛋白质结构域, 用于形成同二聚体或异二聚体。多项研究表明, Ikaros发生缺失突变是ALL预后不良的独立危险因素。本实验室已成功构建Ikaros的表达载体和FUT4启动子删减体的荧光报告基因载体。两者共转染结果表明, Ikaros对不同删减体均有抑制作用, 但在-2.0 Kb和-2.4 Kb的抑制效应显著, 可以推测, 在FUT4转录起始位点上游-0.4 Kb、-1.6~2.0 Kb、-2.0~2.4 Kb可能有潜在的Ikaros DNA结合位点, 且通过对抑制作用最强的删减体分析, Ikaros对FUT4的抑制作用呈现剂量依赖效应。

本研究初步分析了Ikaros对FUT4基因转录活性的调控作用, 对FUT4启动子区功能分析的结构表明, FUT4启动子区含有多个潜在的Ikaros转录因子的结

合位点, 提示Ikaros可能参与FUT4基因表达的调控。FUT4基因转录活性具体受到哪些转录因子的影响及结合位点, 有待对其启动子区进一步进行凝胶迁移实验和染色质免疫共沉淀实验的分析。

参考文献 (References)

- 1 Meyer C, Zur Stadt U, Escherich G, Hofmann J, Binato R, Barbosa TC, *et al*. Refinement of IKZF1 recombination hotspots in pediatric BCP-ALL patients. *Am J Blood Res* 2013; 3(2): 165-73.
- 2 Sellars M, Kastner P, Chan S. Ikaros in B cell development and function. *World J Biol Chem* 2011; 2(6): 132-9.
- 3 Ma S, Pathak S, Mandal M, Trinh L, Clark MR, Lu R. Ikaros and aiolos inhibit pre-Bcell proliferation by directly suppressing c-Myc expression. *Mol Cell Biol* 2010; 30(17): 4149-58.
- 4 Cheng L, Luo S, Jin C, Ma H, Zhou H, Jia L. FUT family mediates the multidrug resistance of human hepatocellular carcinoma via the PI3K/Akt signaling pathway. *Cell Death Dis* 2013; 4: e923.
- 5 Yang X, Zhang Z, Jia S, Liu Y, Wang X, Yan Q. Overexpression of fucosyltransferase IV in A431 cell line increases cell proliferation. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(9): 1722-30.
- 6 Zhang ZB, Sun P, Liu J, Fu L, Yan J, Liu Y, *et al*. Suppression of FUT1/FUT4 expression by siRNA inhibits tumor growth. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783(2): 287-96.
- 7 李洪艳, 佟少明, 邹伟, 燕秋. FUT4-siRNA增强5-aza-dC对鳞癌细胞增殖和迁移的抑制. *中国生物化学与分子生物学报* (Li Hongyan, Tong Shaoming, Zou Wei, Yan Qiu. FUT4-siRNA increased 5-aza-dC induced inhibition on proliferation and migration in squamous carcinoma cells. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*) 2015; 31(8): 836-42.
- 8 杨雪松, 刘帅, 燕秋. 人FUT4基因近端启动子结构的初步分析. *中国生物化学与分子生物学报* (Yang Xuesong, Liu Shuai, Yan Qiu. Structural analysis of human *FUT4* Promoter. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*) 2012; 28(4): 365-9.