

刘 星,宋艳华,王 芳,等. 兔源 *IL-6* 基因启动子的克隆及转录调控[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):31-34.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.008

# 兔源 *IL-6* 基因启动子的克隆及转录调控

刘 星,宋艳华,王 芳,范志宇,胡 波,魏后军,仇汝龙,徐为中,薛家宾

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中心,江苏南京 210014)

**摘要:**通过体内感染兔出血症病毒后发现白介素 6(Interleukin-6, IL-6) 基因表达水平明显升高。为体外研究 IL-6 启动子的转录调控机制,寻找该基因转录调控的基本转录原件,首先利用染色体步移技术扩增得到兔 *IL-6* 基因的启动子区序列,经测序全长为 763 bp;经同源性分析,与人源 *IL-6* 基因的启动子高度同源;生物信息学分析发现,该启动子序列含有 AP-1、CREB/NF- $\kappa$ B 和 TATA-box 等转录元件。随后将全长和一系列缺失体的 IL-6 启动子基因(-400/+58 bp、-250/+58 bp、-170/+58 bp、-100/+58 bp)定向亚克隆至荧光素酶表达载体 pGL3-Basic 中,构建了含有正确目的基因的报告基因重组体,然后瞬时转录 RK-13 细胞,利用荧光素酶报告基因检测试剂盒检测。结果显示,本试验所克隆的 *IL-6* 基因启动子区具有明显的活性,而且 AP-1、CREB/NF- $\kappa$ B 和 NF- $\kappa$ B 在 *IL-6* 基因的转录调控中有着不可或缺的作用。以上结果为进一步研究兔 *IL-6* 基因的转录调控机制奠定了基础。

**关键词:**兔;*IL-6* 基因;启动子;荧光素酶基因表达载体;转录调控

**中图分类号:** S858.291;Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0031-04

真核生物基因转录调控包括 DNA 水平的调控、转录水平的调控、转录后加工、转运过程、翻译水平以及翻译后蛋白质的加工修饰等,而真核生物的基因表达调控多数发生在转录及以后的水平上,转录水平调控研究主要是启动子区上的基本转录单位<sup>[1]</sup>。白介素 6(Interleukin-6, IL-6) 主要由巨噬细胞、T 细胞、B 细胞等多种细胞产生。它可调节多种细胞的生长与分化,具有调节免疫应答、急性反应及造血功能,并在机体的抗感染免疫反应中起重要作用。同时,IL-6 在多种疾病状况下有明显改变。IL-6 表达失调可引起许多疾病,其临床表现主要为发病时 IL-6 水平增高。IL-6 上升的水平与疾病的活动期、肿瘤的发展变化、排斥反应程度以及治疗效果都密切相关<sup>[2-3]</sup>。

兔体感染兔出血症病毒后能明显上调 *IL-6* 基因的表达水平,该基因水平的升高或许与其致病性相关<sup>[4]</sup>。为了研究兔源 *IL-6* 基因的表达调控,本试验以兔 *IL-6* 为试验对象,通过制备一系列 *IL-6* 基因启动子缺失突变体,利用荧光素酶报告基因系统确定其转录活性,以期寻求该基因启动子区的核心启动子区域,为启动子功能进一步研究奠定基础。同时,也为研究兔出血症病毒调控 *IL-6* 基因表达奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验兔

收稿日期:2016-01-20

基金项目:江苏省自然科学基金(编号:BK20140740);现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-44)。

作者简介:刘 星(1988—),男,江苏南京人,博士研究生,助理研究员,主要从事兔疾病防治与兽医生物技术研究。E-mail: iuxing88610@126.com。

通信作者:王 芳,博士,研究员,主要从事兔重要疫病致病机理及综合防控技术等方面的研究。E-mail:rwangfang@126.com。

选用 2~3 月龄健康易感新西兰兔(未免疫兔出血症及相关疫苗)10 只(由金陵种兔场提供)分为 2 组(攻毒组和对照组),每组 5 只。

### 1.2 种毒

攻毒用毒种为兔出血症病毒皖阜株肝毒,由江苏省农业科学院兽医研究所保存<sup>[5]</sup>。病毒(含量  $10^{5.5}$  LD<sub>50</sub>/mL)攻毒剂量为 1 mL;对照组选用 PBS 作为参照。

### 1.3 肝脏病理变化分析和 IL-6 mRNA 水平的测定

攻毒后 48 h,利用免疫组化法和苏木精-伊红染色法对攻毒组和对照组兔体肝脏组织进行病理变化分析,以及利用相对定量 Real-time PCR 对 IL-6 mRNA 表达水平进行测定,所用引物见表 1。

### 1.4 *IL-6* 基因启动子的克隆

新西兰兔肝脏组织 DNA 采用苯酚-氯仿法提取<sup>[1]</sup>,用紫外分光光度计(260nm)检测 DNA 的完整性、纯度和浓度。通过对 GenBank 中已收录的人、鼠等物种的 *IL-6* 基因启动子进行同源性比对,采用 Primer Premier 5.0 软件设计兔 *IL-6* 基因启动子克隆引物(表 1),包括:*IL-6* 基因启动子克隆引物 IL-6-Fwd 与 IL-6-Rev1、IL-6-Rev2、IL-6-Rev3;启动子缺失片段引物 IL-6-Fwd-400、IL-6-Fwd-250、IL-6-Fwd-170 和 IL-6-Fwd-100。以兔基因组 DNA 为模板,进行巢式 PCR 反应。反应体系:2 × GC buffer(Mg<sup>2+</sup>) 10 μL, dNTP(2.5 mmol/L)2 μL, LA Taq 酶(5 U/μL)0.2 μL,上下游引物(10 μmol/L)分别 1 μL, DNA 模板 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 4.8 μL。PCR 程序为:95 °C 预变性 4 min;94 °C 变性 30 s, 69 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2.5 min, 34 个循环;72 °C 再延伸 10 min;4 °C 保存。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并纯化回收,与 PMD19-T 载体 16 °C 过夜连接,并转化 TOP10 感受态细胞。挑取白色菌落于液体 LB 培养基中过夜培养后,用质粒提取试剂盒提取质粒 DNA,经质粒 PCR 初步筛选阳性

克隆后,送 TaKaRa 公司测序。

1.5 *IL-6* 基因启动子的生物信息学分析

利用 NCBI 中的 Blast 对克隆所得的兔基因启动子片段和人基因启动子片段进行同源性比对;应用 Promoter 2.0 Prediction 软件预测 *IL-6* 基因的启动子区域。

1.6 *IL-6* 基因启动子缺失片段报告基因重组体的构建

采用 PCR 方法从重组的 *IL-6* 基因启动子载体中克隆

得到 4 个不同长度 *IL-6* 基因启动子缺失片段,上下游引物的 5'端分别引入 *Mlu* I 和 *Bgl* II 酶切位点,引物见表 1。扩增片段分别与 pMD19-T 载体进行连接,测序正确后进行 *Mlu* I 和 *Bgl* II 双酶切,回收酶切片段并连接到同样酶切过的 pGL3-Basic 载体的多克隆位点内,构建含 *IL-6* 基因 5'调控序列的重组质粒。重组质粒经酶切和测序进一步鉴定。

表 1 本研究所用引物

名称	序列(5'→3')	用途
mRNA-IL-6-Fwd	AATGCCGAAGTGGTCGTG	Real-Time PCR
mRNA-IL-6-Rev	AATGCCGAAGTGGTCGTG	Real-Time PCR
mRNA-GAPDH-Fwd	TGTTTGTGATGGGCGTGAA	Real-Time PCR
mRNA-GAPDH-Rev	AATGCCGAAGTGGTCGTG	Real-Time PCR
IL-6-Fwd	TAGGGACTCTCTGGAAGTAACGGTGT	巢式 PCR 扩增 <i>IL-6</i> 启动子基因
IL-6-Rev1	TCTTCTTCTATCAGCCTTGGAAGGT	巢式 PCR 扩增 <i>IL-6</i> 启动子基因
IL-6-Rev2	GATGCTCTCGATGGTTCTGCCTGGC	巢式 PCR 扩增 <i>IL-6</i> 启动子基因
IL-6-Rev3	GCAGCGCCAGCGAGCAGCCGAGGGG	巢式 PCR 扩增 <i>IL-6</i> 启动子基因
IL-6-Fwd-400	AACITGGAGCTGACTTTAGCTTTC	<i>IL-6</i> 启动子缺失体构建
IL-6-Fwd-250	AGCGCTTTTTCCTCAATTTGTGATT	<i>IL-6</i> 启动子缺失体构建
IL-6-Fwd-170	CCCCGGCCCCACCCCCACCT	<i>IL-6</i> 启动子缺失体构建
IL-6-Fwd-100	TCTCAAAATTACAGTCTCAACCC	<i>IL-6</i> 启动子缺失体构建

1.7 细胞培养及转染

用含 10% 胎牛血清、青霉素 100 IU/mL 和链霉素 100 IU/mL 的 DMEM 培养液于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件培养兔肾细胞 RK-13。将 RK-13 在前 1 d 接种于 24 孔板,待细胞达 80%~90% 汇合度时进行转染<sup>[6]</sup>。

按照 Roche 公司转染试剂 FuGENE HD 操作说明配制转染混合物进行转染。24 孔板每孔转染混合物: FuGENE HD 2 μL; DNA 0.5 μg(pGL3-IL-6 重组质粒与 PRL-TK 内参照质粒的质量比为 25:1)。同时设定 pGL3-Basic 载体转染组(阴性对照组),启动子不同片段的荧光素酶表达载体转染组(试验组),每组设置 3 个重复。转染 48 h 后收获细胞。

1.8 荧光素酶报告基因活性检测

双荧光素酶活性检测按照双荧光素酶报告基因分析系统(Promega 公司)操作说明进行。在转染 48 h 后,弃去培养液,用 1×PBS 液洗涤细胞 2 次。每孔加入 100 μL 1×PLB 细胞裂解液,室温孵育 20 min 充分裂解细胞。取 20 μL 裂解液加入 96 孔白板,然后加入 LAR II 100 μL,快速混匀后立即在 BHP9504 微孔板发光分析仪上检测 pGL3 荧光素酶活性(*F* 值);再加入 100 μL 1×Stop&Glo 溶液检测 pRL-TK 荧光素酶活性(*R* 值)。以 pGL3 荧光素酶活性与 pRL-TK 荧光素酶活性的比值即相对荧光强度(relative luciferase activity, RAL)表示各组转录活性。计算各组 *F/R* 值,即荧光素酶的相对活性 RAL。RAL 的数值为 3 次重复试验的结果。

1.9 数据分析

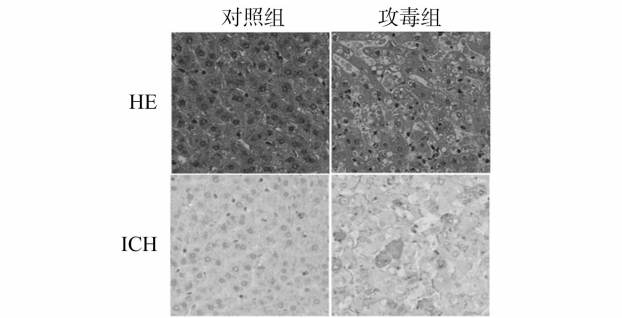
计量数据以“平均值±标准差”表示,运用 SPSS 13.0 统计学软件进行数据分析,统计学分析方法采用 *t* 检验(*P*≤0.05)。

2 结果与分析

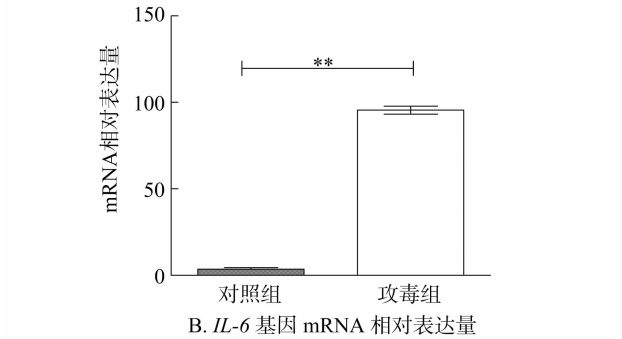
2.1 肝脏组织病理变化及 *IL-6* mRNA 表达水平测定

如图 1-A 所示,相比于对照组,兔出血症病毒感染兔体

48 h 以后,肝脏组织中能够检测到病毒,同时感染组会出现严重的肝损伤,如肝脏细胞的崩解等;同时利用 Real-time PCR 检测,发现 *IL-6* mRNA 水平明显升高(图 1-B)。



A.兔体肝脏病理变化(HE: 苏木精-伊红染色法; ICH: 免疫组化法)

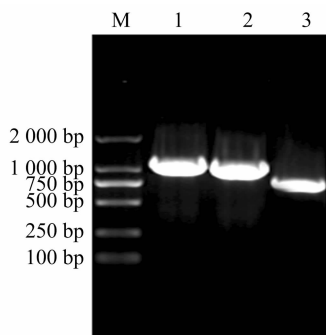


B. *IL-6* 基因 mRNA 相对表达量

图1 兔体肝脏病理及*IL-6*基因 mRNA 相对表达量

2.2 *IL-6* 基因启动子的克隆测序

以兔基因组 DNA 为模板,采用巢式 PCR 扩增,经 3 次 PCR 扩增出约 750 bp 的特异性片段(图 2),将其基因启动子 PCR 扩增产物克隆至 pMD19-T 载体中,筛选阳性重组质粒,经酶切鉴定正确后进行测序。测序结果表明,兔 *IL-6* 基因启动子 PCR 扩增片段长度为 763 bp(图 3-A)。



M—分子量标注 DL 2000; 1—IL-6-Fwd/IL-6-Rev1扩增产物;  
2—IL-6-Fwd/IL-6-Rev2扩增产物; 3—IL-6-Fwd/IL-6-Rev3扩增产物

图2 巢式 PCR 扩增 IL-6 启动子基因

**A**

```

- 714 TGTACCCACATTGCACCTGGAGATTCTAGAGACAACCTGCAGTCAGGACGTTCTGCAACA
- 654 GCTGGTTCACAGCGAGAGCAAGGAAAAAGTACTGCAGAGGGCTTGTAGTGTCTTCTTTCTA
- 594 ACCCAAGGGGGTGGGCTGTAAGGTGGTCTGGGGAACTCAGGCCAGAATATCTTAAGGG
- 534 TTTTTTTACAAACATGAAATAAACTGGAATACTAAATCCTAGCTGGTTTCATCTGGTAATT
- 474 ATTTTTTTAATCATAGTCAGCCTTAGCTTTTCTGTAACCCCAAGCCCTGTAAACTTCGT
- 414 GCATGACTTCAGCTTTACTTTTCTTCTCAAGACATGTCAATGTGCTGAGTCACTAAAAA
- 354 AAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGCAAAAGAGAAAAACAGAAAGT
- 294 GAAGGAAAAATGATCCGGCTTCTGAGGACTAGCCTTGGTAATGACCTAAGTGGCACTTTT
- 234 TTCCCTGGTTGTGATTCTGTGATGCTAAAGGACGTACATTGCACAATCTTAATAAGGT
- 174 TTCCAATCAGCCCCACCCGCTCTGGCCCCACCCCAACCTCCAACAAGATTTATCAAAT
- 114 GTGGGATTTTCCCATGAGTCTCAATATTAGAGTCTCAACCCCCAATAAATATGAGACTGG
- 54 GGATGTCTAAGGCTCAGTCTGCCCTCGAGCCCACCAGGAACGAAAGAGAGCTCCATCTGC
- 4 CCTCCAGGAACCCAGCTATGAACCTCCCTCTCCACAAGTAAGTGAAGGAAATCCCTAGCCT
+ 44 TGGAACTGCCTGGCAGC+ 58
  
```

Regulatory elements identified: AP-1, CREB, NF-IL6, NF-KB, TATA box.

**B**

Sequence alignment of IL-6 promoter with human IL-6 promoter. The alignment shows high homology between the two sequences, particularly in the regulatory regions (AP-1, CREB, NF-IL6, NF-KB, TATA box).

A. 兔 IL-6 启动子基因序列; B. 兔 IL-6 启动子基因序列与人 IL-6 启动子基因序列同源性分析

图3 兔 IL-6 启动子基因序列分析

## 2.3 IL-6 基因启动子的生物信息学分析

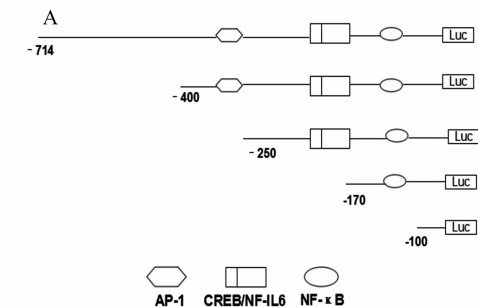
经 Blast 序列比对发现,克隆得到的 IL-6 基因 5'侧翼序列与 GenBank 公布的人 IL-6 基因启动子相似性达 90% 以上。此序列包括转录起始位点 (+1) 上游 714 bp;在线预测软件分析表明,IL-6 基因启动子具有典型的真核生物启动子元件,如 AP-1、CREB/NF-IL6、NF-κB 和 TATA-box 等 (图 3-B)。

## 2.4 IL-6 基因启动子缺失片段报告基因重组体的构建和活性分析

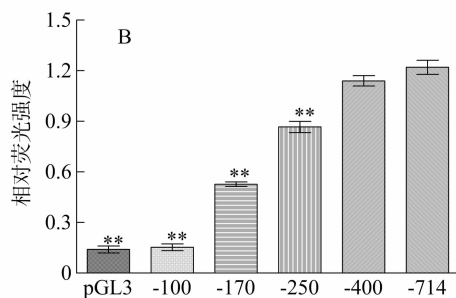
如图 4-A 所示,以含有 IL-6 基因启动子序列的 PMD19-T 载体为模板,克隆得到启动子的不同长度缺失片段。不同长度的启动子 PCR 产物经 Mlu I 和 Bgl II 双酶切

后,与同样进行双酶切的 pGL3 - Basic 载体进行连接,构建启动子报告基因重组体,经测序正确。

将构建好的 *IL-6* 基因启动子缺失片段重组质粒分别转染至 RK-13 细胞中,同时转入内参质粒 pRL-TK,通过检测萤火虫荧光素酶与海参荧光素酶活性的比值,来反映不同启动子片段的活性。每次转染均设阴性对照组。启动子活性分析(图 4)表明,与转染 pGL3 - Basic 对照组相比,*IL-6* 基因启动子报告基因重组质粒 pGL3 - *IL-6* 启动子活性最高。pGL3 - 100 活性最低。而 pGL3 - 400、pGL3 - 250、pGL3 - 170 和 pGL3 - 100 活性依次降低(图 4 - B)。以上结果表明,AP-1、CREB/NF-IL6 和 NF- $\kappa$ B 几个转录元件在 *IL-6* 基因的转录调控中均有着重要作用。



A. *IL-6* 基因启动子缺失重组体构建示意



B. *IL-6* 基因启动子重组质粒的活性测定结果

图4 *IL-6* 基因启动子缺失重组体构建及其重组质粒的活性测定

### 3 讨论

白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)是具有多种生物学活性的细胞因子,也是机体复杂的细胞因子网络中的关键因子,具有调节其他细胞因子的作用<sup>[1]</sup>,在发生炎症、坏死或由于肿瘤细胞抗原刺激免疫细胞分泌 IL-6 增高等情况下,血清中 IL-6 增加,过量表达 IL-6 往往与某些疾病相关。在兔出血症病毒感染兔体后,会引起 *IL-6* 基因的表达量明显升高,这或许与兔出血症病毒的致病性有关<sup>[4,7]</sup>。

本研究主要利用基因步移技术克隆获得 *IL-6* 的启动子,为进一步分析 *IL-6* 基因的转录调控奠定基础。目前在研究真核生物启动子的结构与功能时,主要应用的是瞬时转染法,瞬时转染分析是将构建好的外源 DNA 与双报告基因的重组质粒通过脂质体导入(转染)到特定细胞并使之表达,通过检测报告基因的表达活性来确定所导入各片段的活性,从而确定目的基因转录起始所必需的核心启动子区。本研究克隆得到兔 *IL-6* 基因启动子与人 *IL-6* 基因启动子高度保守,尤其是 AP-1、CREB/NF-IL6 和 NF- $\kappa$ B 等几个转录调

控元件几乎一致,进一步证实了我们克隆得到的该基因序列的准确性<sup>[8]</sup>。经缺失体构建及启动子活性分析表明,兔 *IL-6* 启动子活性的调控与 AP-1、CREB/NF-IL6 和 NF- $\kappa$ B 有关<sup>[9-12]</sup>。AP-1 和 CREB/NF-IL6 及 NF- $\kappa$ B 等元件已经报道在人 *IL-6* 启动子活性调控中也有着重要作用<sup>[13]</sup>。因此,该研究为深入了解 *IL-6* 调控机制,进一步探究兔出血症病毒致病机制奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] Liu X, Fan B, Bai J, et al. The N - N non - covalent domain of the nucleocapsid protein of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus enhances induction of IL - 10 expression [J]. J Gen Virol 2015, 96: 1276 - 1286.
- [2] Legerlotz K, Jones E R, Screen H R, et al. Increased expression of IL - 6 family members in tendon pathology [J]. Rheumatology, 2012, 51: 1161 - 1165.
- [3] Murakami M, Arima Y, Hirano T. IL - 6 signal transduction and its physiological roles [J]. Nihon Rinsho, 2012, 70 ( Suppl 8 ): 192 - 206.
- [4] Teixeira L, Marques R M, Aguas A P, et al. Regulatory T cells are decreased in acute RHDV lethal infection of adult rabbits [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2012, 148: 343 - 347.
- [5] Song Y, Wang F, Fan Z, et al. Identification of novel rabbit haemorrhagic disease virus B - cell epitopes and their interaction with host histo - blood group antigens [J]. J Gen Virol, 2016, 97 ( 2 ): 356 - 365.
- [6] Zhu J, Wang B, Miao Q, et al. Viral genome - linked protein ( VPg ) is essential for translation initiation of rabbit hemorrhagic disease virus ( RHDV ) [J]. PLoS One, 2015, 10: e0143467.
- [7] Marques R M, Costa E S A, Aguas A P, et al. Early inflammatory response of young rabbits attending natural resistance to calicivirus ( RHDV ) infection [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2012, 150: 181 - 188.
- [8] Meszaros E C, Dahoud W, Mesiano S, et al. Blockade of recombinant human IL - 6 by tocilizumab suppresses matrix metalloproteinase - 9 production in the C28/I2 immortalized human chondrocyte cell line [J]. Integr Mol Med, 2015, 2: 304 - 310.
- [9] Baris S, Akyurek O, Dursun A, et al. The impact of the *IL - 1 $\beta$* , *IL - 1Ra*, *IL - 2*, *IL - 6* and *IL - 10* gene polymorphisms on the development of Behcet's disease and their association with the phenotype [J]. Med Clin, 2015.
- [10] Kasperska - Zajac A, Grzanka A, Damasiewicz - Bodzek A. IL - 6 transsignaling in patients with chronic spontaneous urticaria [J]. PLoS One, 2015, 10: e0145751.
- [11] Mekuria S L, Debele T A, Chou H Y, et al. IL - 6 antibody and RGD peptide conjugated poly ( amidoamine ) dendrimer for targeted drug delivery of hela cells [J]. J Phys Chem B, 2016, 120: 123 - 130.
- [12] Onuora S. Cytokines in disease: Genetic variation affects IL - 6 response in synovial fibroblasts [J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12: 2 - 22.
- [13] Zhu J, Jiang L, Liu Y, et al. MAPK and NF - kappaB pathways are involved in bisphenol A - induced TNF - alpha and IL - 6 production in BV2 microglial cells [J]. Inflammation, 2015, 38: 637 - 648.