

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00343

BiP 调控 IRE1 α 启动子转录活性及蛋白表达的效应

周菁华, 韩晓凤, 刘艳娜, 张鹏, 郭风劲

重庆医科大学细胞生物学与遗传学教研室, 发育生物学模式动物平台, 重庆 400016

摘要: 正常条件下, 外分泌或者跨膜的蛋白需要在内质网中完成正确的折叠。在营养缺乏、分化或其他应激状态下, 内质网中的蛋白质会发生错误折叠并不断积聚, 形成内质网应激(Endoplasmic reticulum stress), 引发未折叠蛋白反应(Unfolded protein response)。内质网应激条件下, 内质网腔中的分子伴侣结合免疫球蛋白 BiP(Binding immunoglobulin protein)与需肌醇酶 IRE1 α (Inositol-requiring kinase 1)解离并与未折叠蛋白结合从而帮助蛋白形成正确结构; 同时未折叠蛋白通过与跨膜蛋白 IRE1 α 直接结合活化其内切核糖核酸酶结构域, 活化的 IRE1 α 能够剪切 Xbp1 的 mRNA 使其形成有活性的转录因子, 进而起始分子伴侣与未折叠蛋白反应相关蛋白的表达, 使细胞脱离内质网应激状态。文章克隆了 IRE1 α 的启动子, 用荧光素酶报告基因法检测到 BiP 能够上调 IRE1 α 的启动子活性。通过构建 IRE1 α 启动子一系列截短体的报告基因载体, 确定了 IRE1 α 启动子活性的核心区域; 进一步通过逆转录 PCR 和免疫印迹在 mRNA 水平和蛋白水平分别检测 BiP 对 IRE1 α 启动子的调控作用。结果发现在内质网应激条件下, 分子伴侣 BiP 通过上调 IRE1 α 启动子转录活性, 增加 IRE1 α 的表达, 进而提高细胞处理内质网应激时未折叠蛋白的能力, 为揭示内质网应激条件下 BiP 调控 IRE1 α 转录调控机制提供理论依据, 同时为阐明 ER stress 各信号分子之间的作用机制奠定实验基础。

关键词: BiP; IRE1 α ; 内质网应激; 未折叠蛋白反应

The effect on BiP regulation of IRE1 α promoter transcription activity and protein expression

ZHOU Jing-Hua, HAN Xiao-Feng, LIU Yan-Na, ZHANG Peng, GUO Feng-Jin

Department of Cell Biology and Genetics, Core Facility of Development Biology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Usually, secreted or transmembrane proteins complete their three-dimension folding within endoplasmic reticulum (ER). Under the conditions of nutrient depletion, cell differentiation, or other stress statuses, misfolded or unfolded proteins aggregate within ER, and consequently cause ER stress and Unfolded Protein Response (UPR). In response to ER stress, BiP (Binding immunoglobulin protein) dissociates with IRE1 α (Inositol-requiring kinase 1) and binds to unfolded

收稿日期: 2012-08-27; 修回日期: 2012-11-26

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 81171697), 重庆市高等学校优秀人才支持计划(编号: 渝教人 2011-65)和国家人力资源和社会保障部择优项目(编号: 渝人社办[2011] 235 号)资助

作者简介: 周菁华, 硕士, 专业方向: 遗传学。E-mail: jhzhoubelinda@163.com

通讯作者: 郭风劲, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 骨发育遗传学。E-mail: guo.fengjin@gmail.com

网络出版时间: 2012-12-24 13:37:18

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20121224.1337.002.html>

proteins as a molecular chaperone in helping maintain their correct structure. Co-related to BiP's dissociation, IRE1 α oligomerizes and activated its endoribonuclease domain by transautophosphorylation. Activated IRE1 α then, by cleaving mRNA of Xbp1 and activating its transcription activity, triggers UPR. In this paper, in order to determine effect of BiP on transcription activity of IRE1 α , we cloned promoter region of IRE1 α into reporter gene analysis vector and found that BiP could upregulate promoter activity of IRE1 α . Then, we constructed another 6 truncated promoter reporter vectors of IRE1 α and pinpoint the core promoter activity region. Furthermore, both our RT-PCR and Western blot results showed that BiP could upregulate mRNA transcription level and protein expression level of IRE1 α . Base on these findings, we can propose that, in order to alleviate ER stress caused by the misfolded or malfolded proteins, BiP could upregulate expression of IRE1 α by increase its promoter activity. This study may suggest a novel signal pathway on IRE1 α regulation in ER stress.

Keywords: BiP; IRE1 α ; ER stress; unfolded protein response

结合免疫球蛋白(Binding immunoglobulin protein, BiP), 又称糖调节蛋白 78(Glucose-regulated protein 78, GRP78), 属于热休克蛋白 70 kDa(HSP70) 家族成员之一。BiP是定位于内质网(Endoplasmic reticulum, ER)腔内的分子伴侣, 能帮助新合成蛋白质完成进一步的折叠, 或者与未折叠蛋白、错误折叠蛋白结合并通过内质网相关的降解(ER associated degradation, ERAD)实现这些错误折叠蛋白和未折叠蛋白的降解^[1-4]。

IRE1 α (Type I transmembrane protein kinase/endoribonuclease)是一种定位于内质网(ER)膜的具有激酶和核糖核酸内切酶活性的双功能酶。IRE1 α 在哺乳动物中有两种剪切体, IRE1 α 和IRE1 β , 其中IRE1 α 广泛存在于各种细胞中, 而IRE1 β 仅表达于肠中。IRE1 α 是内质网应激的感应分子, 真核细胞处于内质网应激时(ER Stress), 可以诱导IRE1 α 在内质网腔的结构域发生二聚化, 激活胞质的蛋白激酶域(Kinase domain), 进而发生自身磷酸化作用, 进一步激活特定位点羧基末端具有核糖核酸内切酶活性的RNase结构域, 从而剪切XBP1U产生一种重要的转录因子XBP1S。这种非经典的mRNA剪接方式会引起一种叫做未折叠蛋白反应(Unfolded protein response, UPR)的转录过程, 该过程可以缓解内质网应激压力^[5-7]。

我们的研究发现 BiP 能够上调 IRE1 α 基因的转录并促进 IRE1 α 的表达。同时本研究在构建 IRE1 α 启动子一系列报告载体基础上, 结合报告基因、RT-PCR、免疫印迹等实验技术, 探讨软骨细胞中BiP对 IRE1 α 启动子转录活性及蛋白表达的调控作用,

为深入研究 BiP、IRE1 α 调控 UPR 反应的分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

pcDNA3.1(-)-BiP为本实验室构建^[8], *E. coli* DH5 α 和C₂₈I₂细胞均为本实验室保存。限制性核酸内切酶、RNAisoTM Plus、反转录酶PrimerScript TR reagent Kit购自TaKaRa公司; 高保真DNA聚合酶KOD-plus-Neo购自日本东洋纺(TOYOBO)公司; *Taq* Plus Mix DNA聚合酶为欣百诺公司产品; T4 DNA连接酶和Dual-Luciferase Reporter Assay System购自美国 Promega 公司; 质粒小量提取试剂盒为OMEGA 公司产品; IRE1 α 抗体为 Santa Cruz 公司产品; Lipofectamine 2000 为 Invitrogen 公司产品; 蛋白裂解液、蛋白浓度测定试剂盒、Western blot 配胶试剂盒、ECL 发光液均购自碧云天生物技术公司; 重组载体测序由北京华大基因有限公司和 Invitrogen 公司完成。

1.2 方法

1.2.1 IRE1 α 启动子及其截短体报告基因重组体的构建

从 GenBank 数据库中获取包含编码人的 IRE1 α 基因序列及其启动子 DNA 序列, 取转录起始位点上游-2 065 bp ~ +252 bp 的 DNA 序列, 采用 vector NTI 8.0 设计两对引物(序列见表 1), 以正常人的肝细胞

L0₂基因组DNA为模板,采用巢式PCR扩增IRE1 α 启动子区域(引物序列如表1所示),将扩增产物经*Kpn*/*Xho*双酶切后定向克隆入pGL3-basic载体。重组载体经酶切和测序鉴定确认正确,命名为pGL3-IRE1 α (-2 065 bp~+252 bp)。再以pGL3-IRE1 α (-2 065 bp~+252 bp)为模板,分别构建IRE1 α 的6个截短体报告基因重组载体(引物序列如表2所示,模式图如图3示)。以上重组载体均经酶切和测序鉴定确认。

1.2.2 荧光素酶报告基因活性分析

将上述构建的IRE1 α 启动子及其截短体报告基因载体pGL3-IRE1 α (-2 065~+252)、pGL3-IRE1 α (-1 267~+252)、pGL3-IRE1 α (-959~+252)、pGL3-IRE1 α (-768~+252)、pGL3-IRE1 α (-614~+252)、pGL3-IRE1 α (-426~+252)、pGL3-IRE1 α (-113~+252)与海肾荧光素质粒pRL-SV40共转染于C₂₈I₂细胞,于37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱培养48 h后收集细胞,进行报告基因活性检测。荧光素酶报告基因活性分析方法是根据Promega公司的Dual-Luciferase Reporter Assay System所推荐步骤进行的。

1.2.3 瞬时转染

细胞瞬时转染采用Invitrogen公司的Lipofectamine 2000,按供应商推荐方法进行实验。转染前1

d,将细胞以 1×10^5 每孔接种至24孔培养板,细胞生长至融合度90%时进行转染。每组设置3个重复孔,同时按照萤火虫荧光素酶:海肾荧光素酶为50:1的比例,共转染入含海肾荧光素酶基因的pRL-SV40(内参)。

1.2.4 荧光素酶报告基因活性检测

转染48 h后收集细胞,采用Promega公司的Dual-Luciferase Reporter Assay System进行荧光素酶报告基因活性检测。细胞先用 $1 \times$ PBS洗3次,24孔板的每孔加入100 μ L $1 \times$ Passive lysis,室温裂解15 min后,收集细胞裂解液用Promega公司的化学发光检测仪GloMaxTM20/20检测荧光素酶活性,取细胞裂解液上清20 μ L,加入荧光素酶检测试剂(LAR)100 μ L,吹打混匀,测量萤火虫荧光素酶活性,并继续Stop&Glo试剂100 μ L。将上述反应淬灭,同时激发海肾荧光素酶反应,测量海肾荧光素酶的活性。

1.2.5 RT-PCR

转染后48 h收集细胞,每60 mm直径的细胞培养皿加2.8 mL RNAisoTM Plus,提总RNA和反转录反应按照TaKaRa公司提供方法进行。RT-PCR扩增的引物见表3。RT-PCR扩增条件:94℃预变性3 min,94℃变性30 s,48℃复性30 s,72℃延伸30 s,扩增30

表1 IRE1 α 启动子报告基因重组体构建引物序列

重组质粒名称	引物	引物序列(5' 3')	长度(bp)
pGL3-IRE1 (-2065 ~ +252)	P1	GAGCAAGATTATGGGCAATGCCAC	2 815
	P2	TGCAGCCTCCCAGTACCAAGAAACC	
	P3	CGGGGTACCGTCCAGGCTTGGAAACAG	
	P4	CCGCTGGAGACTCCCGTCAGGGAAGCTC	

注: P1、P2为第一轮PCR引物; P3、P4为第二轮PCR引物。

表2 构建IRE1 α 启动子截短体报告基因重组载体所有引物

截短体重组质粒名称	引物序列(5' 3')	产物长度(bp)
pGL3-IRE1(-1267 ~ +252)	CGGGGTACCTGCACACAGACTGGACATTTGG CCGCTGGAGACTCCCCTCAGGGAAGCTC	1 519
pGL3-IRE1(-959 ~ +252)	CGGGGTACCCACACCCTCACATAGACCTTGC CCGCTGGAGACTCCCCTCAGGGAAGCTC	1 211
pGL3-IRE1(-768 ~ +252)	CGGGGTACCGCTGGTGGATATGACTTG CCGCTGGAGACTCCCCTCAGGGAAGCTC	1 020
pGL3-IRE1(-614 ~ +252)	CGGGGTACTAGCTGCTGAAACCTTCGCTC CCGCTGGAGACTCCCCTCAGGGAAGCTC	866
pGL3-IRE1(-426 ~ +252)	CGGGGTACCGTCTTTCCAGCCACAGAC CCGCTGGAGACTCCCCTCAGGGAAGCTC	678
pGL3-IRE1(-113 ~ +252)	CGGGGTACCTGCTAGTCAGTTCTGCGTCC CCGCTGGAGACTCCCCTCAGGGAAGCTC	365

表 3 RT-PCR 引物信息及反应条件

目的基因	引物	引物序列(5' 3')
<i>IRE1α</i>	正向	AGAGGACAGGCTCAATCAAATGG
	反向	TATCTGCAAAGGCCGATGACAAA
<i>GAPDH</i>	正向	GAGCCAAAAGGGTCATCATCTC
	反向	AAAGGTGGAGGAGTGGGTGTC

个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。

1.2.6 蛋白收集及免疫印迹

转染后 48 h 收集细胞, 每 10 cm 直径细胞培养皿的量加入 1 mL RIPA 裂解液, 于 4℃ 离心 15 min, 取上清。蛋白浓度按照碧云天公司提供的 BCA 蛋白浓度测定方法测定。加入适量的蛋白上样缓冲液, 煮沸 5 min。取 45 μ L 的蛋白样品上样至 8% SDS-PAGE 电泳后转印至孔径为 0.45 μ m 的 PVDF 膜上, TBST 稀释的 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 加入一抗兔抗 IRE1 α 多克隆抗体(1:400 稀释), 4℃ 孵育过夜; TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入山羊抗兔 IgG(1:5000 稀释), 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。用 ECL 发光液进行显影成像。

2 结果与分析

2.1 *IRE1 α* 基因启动子报告基因载体的构建

以正常人的肝细胞 L0₂ 基因组 DNA 为模板, 采用巢式 PCR 扩增 *IRE1 α* 基因启动子区域(图 1 A), 再将该启动子定向克隆入 pGL3-basic 载体, 重组的

pGL3-*IRE1 α* 载体经双酶切(图 1 B)及测序鉴定, *IRE1 α* 启动子报告基因载体构建成功。

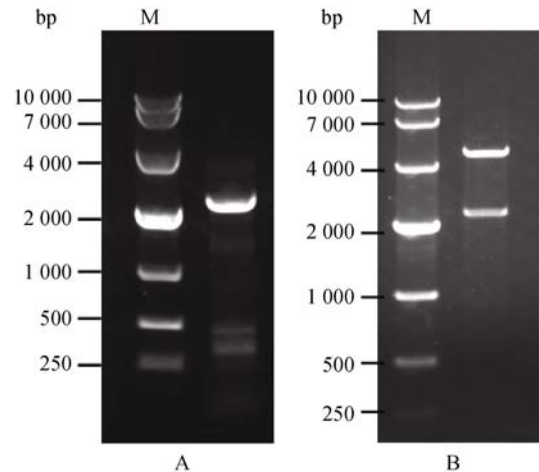


图 1 *IRE1 α* 基因启动子 PCR 及报告基因载体酶切鉴定 M: DNA Marker。A, B 分别为 *IRE1 α* 基因启动子 PCR 和双酶切 (*Kpn* / *Xho*) 鉴定结果。

2.2 *IRE1 α* 基因启动子截短体及报告基因载体的构建

以 *IRE1 α* 启动子重组载体 pGL3-*IRE1 α* (-2065 ~ +252) 为模板, 用 PCR 方法扩增出 *IRE1 α* 启动子各截短体(图 2A), 再将截短体片段定向克隆至 pGL3-basic 载体, *Kpn* / *Xho* 双酶切鉴定重组质粒(图 2B)。

2.3 *IRE1 α* 基因启动子转录活性核心区域的确定

将 *IRE1 α* 基因启动子报告基因重组体质粒转染

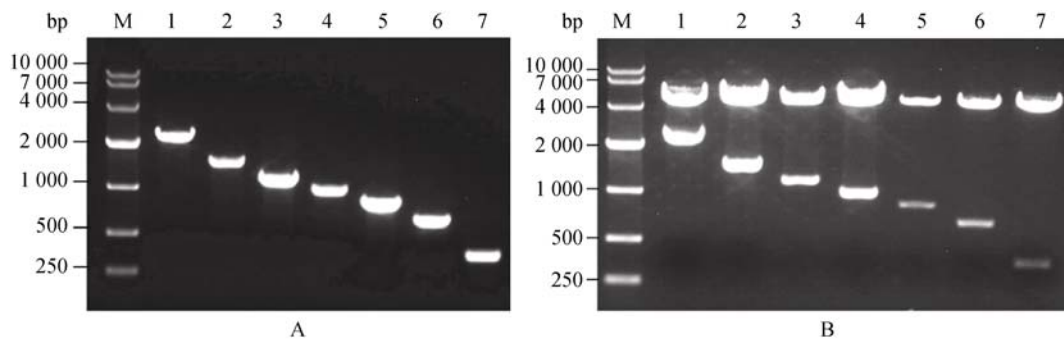


图 2 *IRE1 α* 基因启动子和截短体 PCR 及报告载体酶切鉴定

A: *IRE1 α* 启动子及 6 个截短体 PCR 鉴定。M 为 DNA Marker; 1~7 分别为 *IRE1 α* 启动子区域(-2065 ~ +252)及其截短体 *IRE1 α* (-1267 ~ +252)、*IRE1 α* (-959 ~ +252)、*IRE1 α* (-768 ~ +252)、*IRE1 α* (-614 ~ +252)、*IRE1 α* (-426 ~ +252)、*IRE1 α* (-113 ~ +252) PCR 产物电泳情况。B: pGL3-*IRE1 α* 及截短体报告载体酶切电泳鉴定。M 为 DNA Marker; 1~7 分别为重组载体 pGL3-*IRE1 α* (-2065 ~ +252)、pGL3-*IRE1 α* (-1267 ~ +252)、pGL3-*IRE1 α* (-959 ~ +252)、pGL3-*IRE1 α* (-768 ~ +252)、pGL3-*IRE1 α* (-614 ~ +252)、pGL3-*IRE1 α* (-426 ~ +252)、pGL3-*IRE1 α* (-113 ~ +252) 经 *Kpn* / *Xho* 双酶切鉴定的电泳情况。

C₂₈I₂细胞,同时共转染内参pRL-SV40质粒。通过检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶活性的比值,表示不同启动子片段的活性。启动子活性分析表明:(见图 3)与IRE1 α 启动子全长pGL3-IRE1 α (-2065~+252)相比(0.0575),除了截短型报告基因重组体pGL3-IRE1 α (-113~+252)没有启动子活性,IRE1 α 启动子和其他截短型报告基因重组体都具有较高的启动子活性,并且由此提示IRE1 α 基因的核心启动子区域主要位于转录起始位点附近-426 bp~+252 bp的区域。

2.4 BiP 上调 IRE1 α 启动子转录活性

将IRE1 α 启动子报告载体pGL3-IRE1 α (-2065~+252)分别与pcDNA3.1(-)、pcDNA3.1(-)-BiP共转染于C₂₈I₂细胞,同时共转染内参pRL-SV40质粒。又将启动子核心区域pGL3-IRE1 α (-426~+252)分别与pcDNA3.1(-)、pcDNA3.1(-)-BiP共转染于C₂₈I₂细胞,同时共转染内参pRL-SV40质粒。经荧光素酶报告基因活性分析显示:与共转染空载体pcDNA3.1(-)和启动子全长pGL3-IRE1 α (-2065~+252)的值相比(0.017533),在C₂₈I₂细胞中BiP能够上调IRE1 α 启动子的活性(图 4)。

2.5 BiP 上调 IRE1 α 的表达

通过分别转染空载体和BiP表达载体pcDNA3.1(-)-BiP于C₂₈I₂细胞,经RT-PCR反应,结果显示:BiP对IRE1 α 的mRNA水平有上调作用(图 5A);提

取蛋白后经 Western blot 检测,结果显示:BiP 对 IRE1 α 的蛋白表达也有上调作用(图 5B);在 ATDC5 细胞中分别转染空载体和 pcDNA3.1(-)-BiP 后,免疫印迹检测 BiP 在 ATDC5 细胞中也可以上调 IRE1 α 的蛋白表达。

2.6 BiP 不同转染剂量对 IRE1 α 转录活性的影响

将IRE1 α 启动子报告载体pGL3-IRE1 α (-2065~+252)分别与0 μ g、0.1 μ g、0.2 μ g、0.4 μ g pcDNA3.1(-)-BiP共转染于C₂₈I₂细胞,同时共转染内参pRL-SV40质粒。经荧光素酶报告基因活性分析显示:(图 6A)与共转染空载体pcDNA3.1(-)和启动子全长pGL3-IRE1 α (-2065~+252)的值相比(0.015964),IRE1 α 启动子的转录活性随着BiP转染剂量的增加而增加。分别采用不同转染剂量1 μ g、2 μ g、5 μ g的pcDNA3.1(-)-BiP转染C₂₈I₂细胞后,检测BiP过表达对IRE1 α 表达的影响,Western blot结果显示,随着BiP转染剂量的增加,IRE1 α 的表达量也增加(图 6B、图 6C)。以上结果说明,BiP能够通过上调IRE1 α 启动子的转录活性,从而促进和上调IRE1 α 的表达。

3 讨论

在正常的条件下,细胞内所有感受外部信号或细胞通讯的外分泌型或跨膜蛋白,都需要在内质网中形成正确的结构。这些蛋白在分子伴侣的帮助下完成正确折叠,并顺利出胞或到达其它细胞器。错

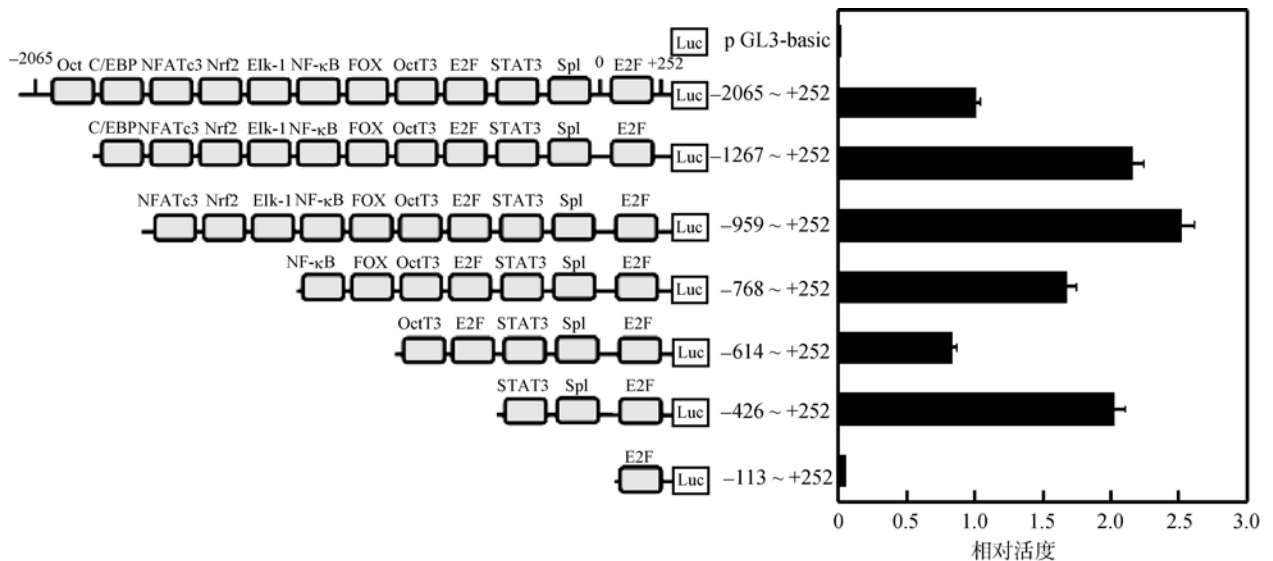


图 3 IRE1 α 启动子及截短体报告载体转录活性分析

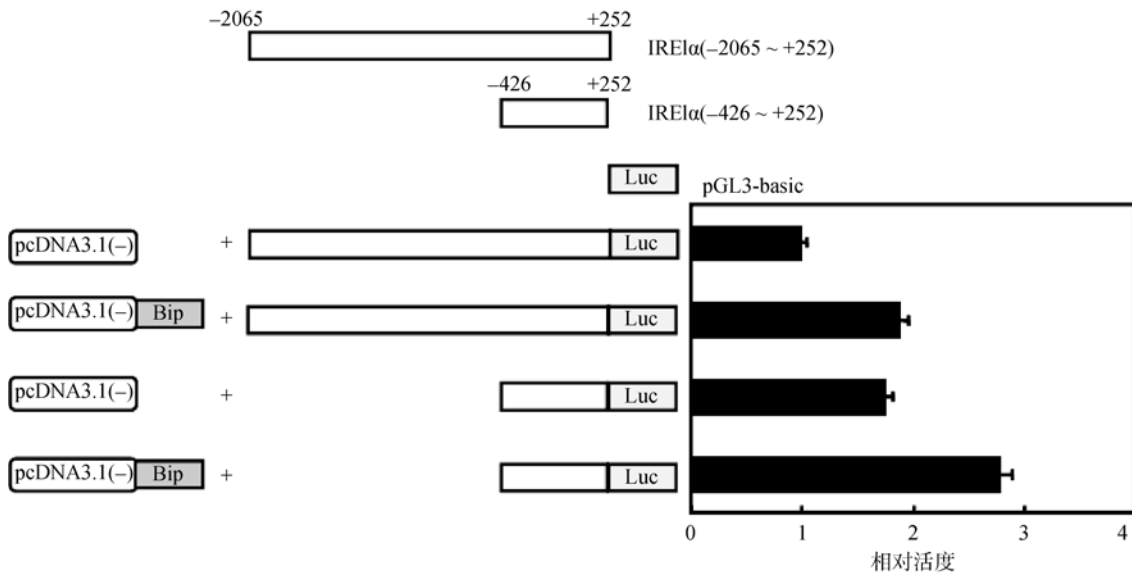


图 4 BiP 上调 IRE1 α 启动子的转录活性

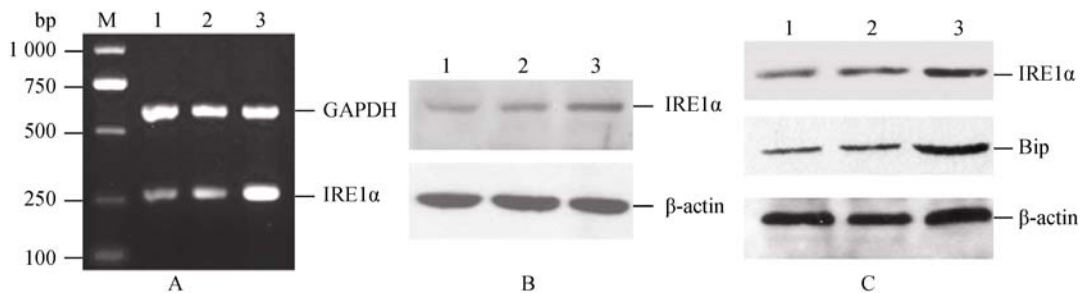


图 5 BiP 上调 IRE1 α 的 mRNA 和蛋白表达

A: BiP 上调 IRE1 α 的 mRNA 水平。M: DNA Marker; 1: 未转染组; 2: 转染 pcDNA3.1(-) 组; 3: 转染 pcDNA3.1(-)-BiP 组。B: C2812 细胞中 BiP 上调 IRE1 α 蛋白表达水平。1: 未转染组; 2: 转染 pcDNA3.1(-) 组; 3: 转染 pcDNA3.1(-)-BiP 组。C: ATDC5 细胞中 BiP 上调 IRE1 α 蛋白表达水平。1: 未转染组; 2: 转染 pcDNA3.1(-) 组; 3: 转染 pcDNA3.1(-)-BiP 组。

误折叠的蛋白则会通过内质网相关的降解(ERAD)途径进行降解。当细胞经历环境压力、营养缺乏或细胞分化时,未折叠或错误的蛋白大量存在于内质网腔,并会使内质网的折叠和降解机制承受很大压力,形成内质网应激。内质网应激会导致未折叠蛋白反应(Unfolded protein response, UPR),从而导致内质网扩大(Expansion)、内质网分子伴侣、内质网相关降解途径有关蛋白或细胞分泌相关蛋白表达的增加。未折叠蛋白反应通过抑制细胞蛋白翻译并激活一系列信号,增加分子伴侣表达,以减轻内质网应激,最终让细胞恢复到正常状态^[5,9,10]。

IRE1 α 是内质网应激的感受器。早期研究表明BiP通过与IRE1 α 的结合与解离控制IRE1 α 的激活与失活:细胞在正常情况下,IRE1 α 处于失活的同源二

聚体状态并与BiP结合;但在内质网应激条件下,分子伴侣BiP与未折叠蛋白结合,使IRE1 α 得以释放。IRE1 α 与BiP解离后,IRE1 α 寡聚化并通过自身磷酸化激活其细胞质中的核糖核酸内切酶结构域^[11-13]。活化状态的IRE1 α 再将转录因子HAC1(酵母,后动物中为XBP1)的mRNA中252 bp的内含子剪切掉,从而激活一系列参与未折叠蛋白反应中蛋白的表达,以缓解细胞压力。最近的研究表明:IRE1 α 能够直接与未折叠蛋白结合,其与BiP结合的位点突变后也同样能起始未折叠蛋白反应。因此BiP与IRE1 α 的解离并非IRE1 α 的活化开关,而是一个伴随的事件^[14-16]。酵母中Hac1蛋白的半衰期只有约2 min,因此IRE1 α 的活性将是决定未折叠蛋白反应持续时间的关键因素^[5]。

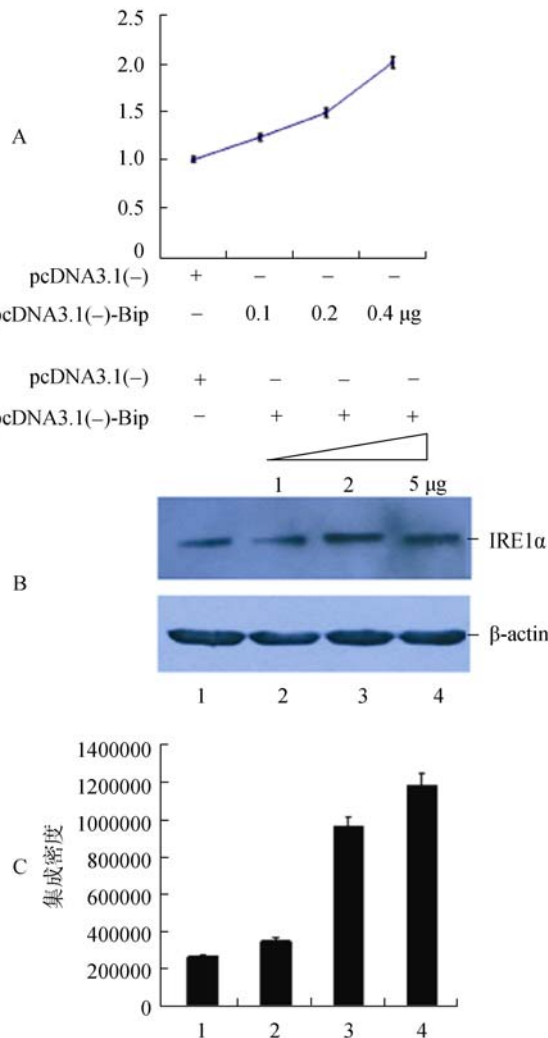


图6 不同转染剂量的pcDNA3.1(-)-BiP对IRE1 α 启动子转录活性及IRE1 α 蛋白表达的影响

A: BiP对IRE1 α 启动子活性的上调作用具有剂量依赖性。pcDNA3.1(-)-BiP分别按0、0.1 μ g、0.2 μ g、0.4 μ g(如图所示)与pGL3-IRE1 α (-2065~+252)报告载体共转染; B: BiP对IRE1 α 蛋白表达的上调作用具有剂量依赖性。1: 转染pcDNA3.1(-); 2: 转染pcDNA3.1(-)-BiP 1.0 μ g; 3: 转染pcDNA3.1(-)-BiP 2.0 μ g; 4: 转染pcDNA3.1(-)-BiP 5.0 μ g。C为B免疫印迹结果的灰度分析直方图。

在骨骼发育过程中,成骨细胞会分泌大量的细胞外基质蛋白,因而需要相应的细胞分泌及蛋白折叠加工功能来与此相适应。内质网应激过程中,未折叠蛋白反应会起始一系列转录事件,这些事件能够提高成骨细胞对于细胞外基质蛋白的处理能力,并对骨的形成有重要的作用。IRE1 α -XBP1通路是骨形成蛋白BMP2诱导的骨细胞分化过程中所必需的,有研究表明:IRE1 α 剪切XBP1U产生XBP1S具有

转录活性,能够与骨形成过程中的重要转录因子Osx的启动子结合,进而促进其转录。因此IRE1 α 在骨形成过程中具有重要的作用^[17-19]。我们最近的研究结果显示:XBP1S通过充当Runx2的辅助因子并影响IHH/PTHrP信号调控了软骨细胞肥大,XBP1S是调控生长板软骨细胞前肥大、肥大和分化的复杂网络中的一个新型调控因子^[20]。

我们在研究BiP调控IRE1 α 作用时,发现在软骨细胞C₂₈I₂中,BiP能够上调IRE1 α 启动子转录活性。为了进一步分析IRE1 α 启动子区域,我们构建了一系列IRE1 α 启动子的截短体报告基因载体。转录因子结合位点分析表明,IRE1 α 启动子的-2065~+252区域和-614~+252区域转录活性明显低于其他区域,提示IRE1 α 启动子的-2065~-1267区域和-614~-426区域可能含有抑制转录活性的组成元件。其中缺失NF- κ B结合位点的启动子序列(-768~-1267)启动子活性显著降低,说明转录因子NF- κ B可能参与IRE1 α 表达的调控。研究表明真核细胞处于内质网应激时,能够激活转录因子NF- κ B,通过抑制NF- κ B信号通路阻止内质网应激的发生;此外,已有研究表明内质网应激引发的NF- κ B信号通路的激活是通过IRE1 α 实现的^[21-23]。同时,研究发现NF- κ B能特异性促进软骨细胞和生长板软骨细胞BMP-2基因的表达,进而通过IRE1 α -XBP1信号通路促进软骨细胞的分化和软骨的发育^[24,25]。IRE1 α 启动子活性分析表明,IRE1 α 启动子核心区域定位于-426~+252区域内,在这一区域内有两个重要的转录因子STAT3和Sp1结合位点。研究表明内质网应激的发生会抑制转录因子STAT3的磷酸化激活^[26-28],而STAT3的活化却伴随着内质网应激反应的减弱;此外,转录因子STAT3还与软骨生长、Trps1调节的软骨细胞的增殖与凋亡相关^[29,31]。研究表明转录因子Sp1参与软骨细胞外基质蛋白胶原II、胶原IX、胶原X、ADAMTS-4的表达调控,是重要的软骨发育调控因子^[32-34]。因此,研究NF- κ B、STAT3、Sp1等一系列转录因子对于IRE1 α 基因转录调控的作用不仅有助于了解内质网应激与软骨细胞的增殖、凋亡及软骨细胞分化的关系,对于研究软骨发育的过程也有重要意义。

本研究显示,在软骨细胞C₂₈I₂中,BiP能够上调IRE1 α 启动子转录活性。同时我们用逆转录PCR和免疫印迹方法证明:在mRNA水平和蛋白水平上,BiP

也能促进和上调IRE1 α 的表达;并且随着BiP转染剂量的增加,IRE1 α 启动子的转录活性和蛋白表达量也相应增加。另外,我们发现,用Thapsigargin(毒胡萝卜毒素)处理软骨细胞C₂₈I₂,建立内质网应激模型,BiP同样也能上调IRE1 α 启动子的转录活性,并促进IRE1 α 表达。以上实验结果表明,BiP上调IRE1 α 的表达进而促进未折叠蛋白反应相关基因的表达,从而使细胞更快地对内质网应激做出反应,恢复细胞正常的生物学功能。在软骨细胞分化过程中,产生大量的细胞外基质蛋白会导致内质网应激。BiP作为未折叠蛋白反应的初始感应分子,不仅结合未折叠的蛋白帮助其形成正确构象,同时参与未折叠蛋白反应的3个信号通路的激活^[5,9,10]。本研究结果显示,BiP能够上调IRE1 α 表达,进而促进XBPIU剪切产生XBPIs,最终参与软骨细胞分化的调控。因此,BiP对IRE1 α 表达的影响不仅对于内质网应激有重要的意义,对软骨细胞的分化也具有重要的调控作用。

在软骨发育的过程中,编码细胞外基质(ECM)蛋白如II型胶原、IX型胶原、XI型胶原、COMP、蛋白聚糖的基因突变会导致大量不正常蛋白的合成和聚集,进而使软骨细胞处于内质网应激状态。处于内质网应激状态的软骨细胞虽然能够在应激状态存活下来,但软骨细胞分化会出现异常,软骨内骨形成滞后,最终导致骨发育不良。另外,有研究表明:XBPIs作为调控内质网应激及浆细胞分化的重要转录因子,在人的多种骨髓瘤中是过表达的,并促进和推动多种骨髓瘤的病理发展^[35-37]。因此,本实验为进一步研究真核细胞中未折叠蛋白反应参与调控软骨细胞分化及骨形成过程奠定理论基础,也为软骨发育不良等相关遗传性疾病的发病机制及临床治疗提供一定的实验依据。

参考文献(References):

- [1] Quinones QJ, de Ridder GG, Pizzo SV. GRP78: a chaperone with diverse roles beyond the endoplasmic reticulum. *Histol Histopathol*, 2008, 23(11): 1409-1416. DOI
- [2] Li J, Lee AS. Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. *Curr Mol Med*, 2006, 6(1): 45-54. DOI
- [3] Gonzalez-Gronow M, Selim MA, Papalas J, Pizzo SV. GRP78: a multifunctional receptor on the cell surface. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(9): 2299-2306. DOI
- [4] Otero JH, Lizák B, Hendershot LM. Life and death of a BiP substrate. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, 21(5): 472-478. DOI
- [5] Schröder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res*, 2005, 569(1-2): 29-63. DOI
- [6] Oikawa D, Tokuda M, Hosoda A, Iwawaki T. Identification of a consensus element recognized and cleaved by IRE1 α . *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(18): 6265-6273. DOI
- [7] Sha HB, He Y, Chen H, Wang C, Zenno A, Shi H, Yang XY, Zhang XM, Qi L. The IRE1 α -XBP1 pathway of the unfolded protein response is required for adipogenesis. *Cell Metab*, 2009, 9(6): 556-564. DOI
- [8] 李祥柱, 刘艳娜, 赵文君, 周菁华, 郭风劲. 分子伴侣BiP结构域分析及对肝癌细胞增殖和凋亡的影响. *中国细胞生物学学报*, 2011, 33(11): 1204-1212. DOI
- [9] Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol*, 2004, 14(1): 20-28. DOI
- [10] Wu J, Kaufman RJ. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ*, 2006, 13(3): 374-84. DOI
- [11] Kimata Y, Oikawa D, Shimizu Y, Ishiwata-Kimata Y, Kohno K. A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1. *J Cell Biol*, 2004, 167(3): 445-456. DOI
- [12] Pincus D, Chevalier MW, Aragón T, van Anken E, Vidal SE, El-Samad H, Walter P. BiP binding to the ER-stress sensor Ire1 tunes the homeostatic behavior of the unfolded protein response. *PLoS Biol*, 2010, 8(7): e1000415. DOI
- [13] Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(6): 326-332. DOI
- [14] Leber JH, Bernales S, Walter P. IRE1-independent gain control of the unfolded protein response. *PLoS Biol*, 2004, 2(8): E235. DOI
- [15] Oikawa D, Kimata Y, Kohno K. Self-association and BiP dissociation are not sufficient for activation of the ER stress sensor Ire1. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 9): 1681-1688.
- [16] Gardner BM, Walter P. Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science*, 2011, 333(6051): 1891-1894. DOI
- [17] Murakami T, Saito A, Hino S, Kondo S, Kanemoto S, Chihara K, Sekiya H, Tsumagari K, Ochiai K, Yoshinaga K, Saitoh M, Nishimura R, Yoneda T, Kou I, Furuichi T, Ikegawa S, Ikawa M, Okabe M, Wanaka A, Imaizumi K. Signalling mediated by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in bone formation. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(10): 1205-1211. DOI
- [18] Tohmonda T, Miyauchi Y, Ghosh R, Yoda M, Uchikawa S, Takito J, Morioka H, Nakamura M, Iwawaki T, Chiba K, Toyama Y, Urano F, Horiuchi K. The IRE1 α -XBP1 path-

- way is essential for osteoblast differentiation through promoting transcription of *Osterix*. *EMBO Rep*, 2011, 12(5): 451–457. [DOI](#)
- [19] Saito A, Ochiai K, Kondo S, Tsumagari K, Murakami T, Cavener DR, Imaizumi K. Endoplasmic reticulum stress response mediated by the PERK-eIF2(α)-ATF4 pathway is involved in osteoblast differentiation induced by BMP2. *J Biol Chem*, 2011, 286(6): 4809–4818. [DOI](#)
- [20] Liu Y, Zhou J, Zhao W, Li X, Jiang R, Liu C, Guo FJ. XBP1S Associates with RUNX2 and Regulates Chondrocyte Hypertrophy. *J Biol Chem*, 2012, 287: 34500–34513. [DOI](#)
- [21] Carrasco DR, Sukhdeo K, Protopopova M, Sinha R, Enos M, Carrasco DE, Zheng M, Mani M, Henderson J, Pinkus GS, Munshi N, Horner J, Ivanova EV, Protopopov A, Anderson KC, Tonon G, DePinho RA. The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis. *Cancer Cell*, 2007, 11(4): 349–360. [DOI](#)
- [22] Kaneko M, Niinuma Y, Nomura Y. Activation signal of nuclear factor-kappa B in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26(7): 931–935. [DOI](#)
- [23] Kitamura M. BiPhasic, bidirectional regulation of NF-kappaB by endoplasmic reticulum stress. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(9): 2353–2364. [DOI](#)
- [24] Tonnesen MF, Grunnet LG, Friberg J, Cardozo AK, Billstrup N, Eizirik DL, Størling J, Mandrup-Poulsen T. Inhibition of nuclear factor-kB or Bax prevents endoplasmic reticulum stress- but not nitric oxide-mediated apoptosis in INS-1E cells. *Endocrinology*, 2009, 150(9): 4094–4103. [DOI](#)
- [25] Feng JQ, Xing L, Zhang JH, Zhao M, Horn D, Chan J, Boyce BF, Harris SE, Mundy GR, Chen D. NF-kB specifically activates BMP-2 gene expression in growth plate chondrocytes in vivo and in a chondrocyte cell line in vitro. *J Biol Chem*, 2003, 278(31): 29130–29135. [DOI](#)
- [26] Mao WK, Iwai C, Liu JH, Sheu SS, Fu M, Liang CS. Darbeopetin alfa exerts a cardioprotective effect in autoimmune cardiomyopathy via reduction of ER stress and activation of the PI3K/Akt and STAT3 pathways. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 45(2): 250–260. [DOI](#)
- [27] Hosoi T, Sasaki M, Miyahara T, Hashimoto C, Matsuo S, Yoshii M, Ozawa K. Endoplasmic reticulum stress induces leptin resistance. *Mol Pharmacol*, 2008, 74(6): 1610–1619. [DOI](#)
- [28] Shin DY, Chung J, Joe Y, Pae HO, Chang KC, Cho GJ, Ryter SW, Chung HT. Pretreatment with CO-releasing molecules suppresses hepcidin expression during inflammation and endoplasmic reticulum stress through inhibition of the STAT3 and CREBH pathways. *Blood*, 2012, 119(11): 2523–2532. [DOI](#)
- [29] Kimura K, Yamada T, Matsumoto M, Kido Y, Hosooka T, Asahara S, Matsuda T, Ota T, Watanabe H, Sai Y, Miyamoto K, Kaneko S, Kasuga M, Inoue H. Endoplasmic reticulum stress inhibits STAT3-dependent suppression of hepatic gluconeogenesis via dephosphorylation and deacetylation. *Diabetes*, 2012, 61(1): 61–73. [DOI](#)
- [30] Krejci P, Prochazkova J, Bryja V, Jelinkova P, Pejchalova K, Kozubik A, Thompson LM, Wilcox WR. Fibroblast growth factor inhibits interferon γ -STAT1 and interleukin 6-STAT3 signaling in chondrocytes. *Cell Signal*, 2009, 21(1): 151–160. [DOI](#)
- [31] Suemoto H, Muragaki Y, Nishioka K, Sato M, Ooshima A, Itoh S, Hatamura I, Ozaki M, Braun A, Gustafsson E, Fässler R. Trps1 regulates proliferation and apoptosis of chondrocytes through Stat3 signaling. *Dev Biol*, 2007, 312(2): 572–581. [DOI](#)
- [32] Magee C, Nurminskaya M, Faverman L, Galera P, Linsenmayer TF. SP3/SP1 transcription activity regulates specific expression of collagen type X in hypertrophic chondrocytes. *J Biol Chem*, 2005, 280(27): 25331–25338. [DOI](#)
- [33] Goto T, Matsui Y, Fernandes RJ, Hanson DA, Kubo T, Yukata K, Michigami T, Komori T, Fujita T, Yang L, Eyre DR, Yasui N. Sp1 family of transcription factors regulates the human $\alpha 2$ (XI) collagen gene (COL11A2) in Saos-2 osteoblastic cells. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(5): 661–673. [DOI](#)
- [34] Renard E, Porée B, Chadjichristos C, Kypriotou M, Maneix L, Bigot N, Legendre F, Ollitrault D, De Crombrughe B, Malléin-Gérin F, Moslemi S, Demoor M, Boumediene K, Galéra P. Sox9/Sox6 and Sp1 are involved in the insulin-like growth factor-I-mediated upregulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes. *J Mol Med (Berl)*, 2012, 90(6): 649–666. [DOI](#)
- [35] Rajpar MH, McDermott B, Kung L, Eardley R, Knowles L, Heeran M, Thornton DJ, Wilson R, Bateman JF, Poulosom R, Arvan P, Kadler KE, Briggs MD, Boot-Handford RP. Targeted induction of endoplasmic reticulum stress induces cartilage pathology. *PLoS Genet*, 2009, 5(10): e1000691. [DOI](#)
- [36] Cameron TL, Bell KM, Tatarczuch L, Mackie EJ, Rajpar MH, McDermott BT, Boot-Handford RP, Bateman JF. Transcriptional profiling of chondrodysplasia growth plate cartilage reveals adaptive ER-stress networks that allow survival but disrupt hypertrophy. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24600. [DOI](#)
- [37] Tsang KY, Chan D, Cheslett D, Chan WC, So CL, Melhado IG, Chan TW, Kwan KM, Hunziker EB, Yamada Y, Bateman JF, Cheung KM, Cheah KS. Surviving endoplasmic reticulum stress is coupled to altered chondrocyte differentiation and function. *PLoS Biol*, 2007, 5(3): e44. [DOI](#)