

# 猪 *DKK1* 基因启动子区的克隆及其活性分析

胡慧艳<sup>1</sup>, 贾青<sup>1,2,3\*</sup>, 侯胜奎<sup>1</sup>, 刘津<sup>1</sup>, 赵思思<sup>1</sup>, 张伟峰<sup>4</sup>, 张军<sup>5</sup>, 张建亭<sup>6</sup>, 边慧敏<sup>7</sup>

(1. 河北农业大学 动物科技学院, 保定 071000; 2. 国家北方山区农业工程技术研究中心, 保定 071000;

3. 河北省山区农业工程技术研究中心, 保定 071000; 4. 河北工程大学 生命科学与食品工程学院, 邯郸 056000;

5. 唐山市畜牧工作站, 唐山 063000; 6. 安平县畜牧兽医站, 安平 053000; 7. 邢台市畜牧站, 邢台 054000)

**摘要:** 旨在初步探索 *DKK1* 基因转录调控机制, 本研究利用启动子在线预测软件分析了该基因启动子区序列特征, 根据 Ensembl 数据库已公布的猪 *DKK1* 基因的 5'侧翼区序列, 设计特异性 PCR 引物进行扩增、测序, 进而构建启动子区不同缺失片段的 pGL3-*DKK1* 双荧光素酶表达载体, 分别转染 293T 细胞和 HeLa 细胞, 并进行双荧光素酶报告基因检测。结果显示, *DKK1* 基因启动子中含有 1 个 TATA-box、多种转录因子和 1 个 CpG 岛; *DKK1* 基因启动子对 293T 细胞具有偏好性, 其中 p-1 679/+292 bp 启动子片段活性最高, 且显著高于其他缺失片段 ( $P < 0.01$ )。-953~-1 679 bp 为核心启动子区域, -586~-953 bp 区域可能存在负调控元件, 在 -953~-1 679 bp 区域可能存在正调控元件。本试验通过对 *DKK1* 基因进行生物信息学分析并结合不同长度启动子片段双报告基因活性检测, 证实了 *DKK1* 基因的 5'侧翼区序列具有启动子转录活性, 并初步确定了该基因的启动子区域, 找到了启动子的核心区域和主要调控区域, 为进一步研究 *DKK1* 基因转录调控机制奠定基础。

**关键词:** *DKK1* 基因; 启动子; 荧光素酶活性; 报告基因

中图分类号: S828; Q785

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)06-1150-08

## Cloning and Activity Analysis of the Promoter Region of Swine *DKK1* Gene

HU Hui-yan<sup>1</sup>, JIA Qing<sup>1,2,3\*</sup>, HOU Sheng-kui<sup>1</sup>, LIU Jin<sup>1</sup>, ZHAO Si-si<sup>1</sup>, ZHANG Wei-feng<sup>4</sup>,  
ZHANG Jun<sup>5</sup>, ZHANG Jian-ting<sup>6</sup>, BIAN Hui-min<sup>7</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China; 2. National Engineering Research Center for Agriculture in Northern Mountainous Areas, Baoding 071000, China; 3. Engineering Research Center for Agriculture in Hebei Mountainous Areas, Baoding 071000, China; 4. School of Life Science and Food Engineering, Hebei University of Engineering, Handan 056000, China; 5. Tangshan Animal Husbandry Station, Tangshan 063000, China; 6. Anping Animal Husbandry and Veterinary Station, Anping 053000, China; 7. Xingtai Animal Husbandry Station, Xingtai 054000, China)

**Abstract:** To further investigate the transcriptional regulatory mechanism of *DKK1* (*Dickkopf1*) gene, the sequence features were analyzed by promoter online prediction tools, which were based on the 5'-flanking sequence of swine *DKK1* gene published by Ensembl database. Specific primers were designed by Primer Premier 5.0 software to amplify *DKK1* gene. To analyze its transcriptional activity, pGL3-*DKK1* promoter luciferase reporter gene vectors were constructed and transfected into 293T cells and HeLa cells, respectively. The results showed that the promoter region of *DKK1* gene contained a TATA-box, a variety of transcription factors and a CpG island. Meanwhile, the promoter of *DKK1* gene had a preference for 293T cells, and the sequence of

收稿日期: 2017-01-06

基金项目: 河北省现代农业产业技术体系专项 (HBCT2013070202)

作者简介: 胡慧艳 (1989-), 女, 河北灵寿人, 博士生, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: huihuiyan315@163.com

\* 通信作者: 贾青, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: jiaqing@hebau.edu.cn

-1 679/+292 bp had the highest promoter activity, which was obviously higher than that of other fragments ( $P < 0.01$ ). Further analysis revealed that there were core promoter region (-953/-1 679), negative (-586/-953) and positive (-953/-1 679) regulatory regions, respectively. The 5'-flanking sequence of swine *DKK1* was analyzed by bioinformatics combined with the reporter gene activity detection of promoter fragments with different length, this result demonstrated that it had transcriptional activity of promoter, and its promoter region was preliminarily determined, and the core promoter region and the main regulatory region were successfully identified, which laid a foundation for further studying on the transcriptional regulatory mechanism of the *DKK1*.

**Key words:** *DKK1* gene; promoter; luciferase activity; reporter gene

*DKK1* (*Dickkopf1*) 基因是 *DKKs* 家族中的一员,它所编码的 *DKK1* 蛋白为分泌型糖蛋白<sup>[1]</sup>。*DKK1* 作为 Wnt/ $\beta$ -catenin 经典信号通路中的拮抗因子之一,能够与细胞膜表面受体 LRP5/6(低密度脂蛋白受体相关蛋白 5,6)相互作用,从而在 Wnt 信号转导通路中起抑制作用<sup>[2]</sup>;另外,当有 Kremen 存在时,还可形成内吞小体即 *DKK1*-LRP-Kremen 三元复合物,使膜表面 LRP6 消除,从而阻断经典的 Wnt 信号转导通路<sup>[3]</sup>。M. D. Phillips 等<sup>[4]</sup>研究发现,*DKK1* 基因能够通过抑制 Wnt 信号对早期心肌细胞增殖起重要的调节作用;该信号转导通路还参与其他多种重要的生物过程<sup>[5]</sup>,当被异常激活时,可致使细胞异常增殖与分化,从而引起肿瘤的发生<sup>[6]</sup>。作为 Wnt 信号抑制剂的 *DKK1* 基因参与骨形成、骨代谢<sup>[7-8]</sup>,在骨髓间充质干细胞、成骨、成脂分化的分子调节机制的研究中发现该基因的高表达有助于促进骨髓间充质干细胞成脂分化,抑制其成骨分化<sup>[9-10]</sup>;同时,*DKK1* 基因也参与胚胎发育、干细胞分化<sup>[11]</sup>、心血管疾病<sup>[12]</sup>、细胞凋亡<sup>[13]</sup>等多个过程。

C. X. Liu 等<sup>[14]</sup>对猪 *DKK1* 基因进行了染色体定位,以及与胴体性状进行了关联分析,不仅发现该基因在猪的脾和淋巴组织中高表达,而且发现肌肉组织的生成与 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的活性密切相关。M. B. Kim 等<sup>[15]</sup>研究发现,经典的 Wnt 信号通路在脂肪形成和肌细胞生成过程中发挥着重要作用,T. Andi 等<sup>[16]</sup>的研究表明,Wnt 信号通路也是毛囊、毛发生成所必须的信号通路,而且皮肤毛囊的密度主要受 Wnt 和 *DKK* 两个因子调控,Wnt 信号若使皮肤中 *DKK1* 异位表达则会致使毛囊发育受阻。S. Sick 等<sup>[17]</sup>采用过表达 *DKK1* 基因制备的转基因小鼠发现皮肤毛囊密度显著降低;而刘薇借助于转基因核移植方法,通过建立 *DKK1* 转基因克隆小型

猪,以实现皮肤特异性过表达 *DKK1* 转基因无毛小型猪<sup>[18]</sup>。由此可知,*DKK1* 基因参与毛囊、毛发生成的功能与该基因的表达量密切相关,然而目前关于 *DKK1* 基因相应的表达调控机制尚不清楚。

由于基因表达量的高低受多个水平的调控,其中转录水平的调控在基因表达中起着重要作用。为探索 *DKK1* 基因的转录调控机制,了解猪 *DKK1* 基因启动子的结构与活性,本研究通过对该基因的 5'侧翼区序列进行特征分析、克隆,构建一系列缺失片段的 pGL3-*DKK1* 重组质粒,分别转染 293T 细胞和 HeLa 细胞,采用双报告基因活性检测方法,鉴定 *DKK1* 基因的 5'侧翼区序列的转录活性,并初步确定该基因的启动子区域,以及启动子的核心区域和主要调控区域,探索其可能的调控作用,为深入揭示 *DKK1* 基因的转录调控机制奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

1.1.1 载体与细胞 载体 pGL3-Basic 和 pRL-TK 由本实验室保存;293T 细胞和 HeLa 细胞购自上海诺百生物科技有限公司。

1.1.2 试剂盒、工具酶及其他试剂 TailGen DNA Kit,金牌超量无内毒素质粒大提试剂盒 GoldHi EndoFree Plasmid Maxi Kit,DM2000 Plus DNA Marker 购自康为世纪公司;Trans5 $\alpha$  Chemically Competent,Trans Taq-T DNA Polymerase 和 T4 DNA Ligase 等常用分子生物学试剂均购自于北京 TransGen 生物技术有限公司;SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒和 SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒购自上海生工生物工程有限公司;限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Hind* III 均购自 TaKaRa 公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒 Dual-Lucifer-

ase Reporter Assay System 购自 Promega 公司; Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent 购自 IVGN 公司; Hyclone SH30023.01B DMEM 培养基购自 Thermo 公司; 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum/FBS) 购自 Biowest 公司。引物合成和测序均由北京华大科技公司完成。

1.1.3 分子生物学分析软件 基因序列数据库: Ensembl 数据库 (<http://www.ensembl.org/index.html>); PCR 引物设计软件: Primer Premier 5.0; 序列分析软件: DNAMAN, BioEdit 7.0; 基因启动子分析软件: Promoter 2.0 Prediction Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>), PromoterScan (<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/>), MethPrimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>), AliBaba 2.1 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html>)。

pub/programs.html)。

## 1.2 试验方法

1.2.1 猪 *DKK1* 基因启动子预测 利用 Promoter Scan 软件预测 *DKK1* 基因核心启动子的位置, 利用 MethPrimer 软件预测基因序列中的 CpG 岛。

1.2.2 猪 *DKK1* 基因启动子不同片段的获取 根据 Ensembl 数据库检索并下载猪 *DKK1* 基因 (ENSSSCG00000010428) 的参考序列, 以 5' UTR 上游序列约 2 500 bp 为模板, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物扩增包含 *DKK1* 基因启动子区片段。根据 pGL3-Basic 质粒的多克隆位点信息, 设计 5 条上游引物和 1 条下游引物, 分别在上下游引物 5' 端加上合适的限制性内切酶切位点, 其中下游引物均为 pGL3+292, 分别扩增 5' 端为 -2 016、-1 679、-953、-586、-215 的片段。构建载体片段的引物序列详见表 1。

表 1 用于扩增猪 *DKK1* 基因启动子不同片段的引物信息

Table 1 The primers used to amplify swine *DKK1* promoter

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence	退火温度/°C Annealing temperature	片段长度/bp Fragments size
pGL3-2016/+292	F: GG <u>GGTACCT</u> GCAAGTGATAGTATGGCACC	64	2 329
pGL3-1679/+292	F: GG <u>GGTACC</u> ATTATCAGCAAGCCAGAGGA	65	1 991
pGL3-953/+292	F: GG <u>GGTACCGG</u> ATCAAACATAGGCGTTCT	65	1 265
pGL3-586/+292	F: GG <u>GGTACCTCTT</u> CTTCTTACCCTCGTT	64	898
pGL3-215/+292	F: GG <u>GGTACCCCAA</u> TACCCAAAGTTCCTC	65	527
pGL3+292	R: CCC AAGCTTGAATTGACGAGAACCGAGT		

下划线字母 GGTACC 和 AAGCTT 分别表示限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Hind* III 的酶切位点

The letters underlined are restriction enzyme digestion sites of *Kpn* I and *Hind* III: GGTACC and AAGCTT

大白猪耳组织 DNA 提取参照基因组提取试剂盒说明书进行。采用 PCR 方法以基因组 DNA 为模板, 扩增猪 *DKK1* 基因启动子区长片段, PCR 反应体系为: 10×buffer 2.5 μL, 2.5 mmol·L<sup>-1</sup> dNTPs 2.0 μL, P-2016/+292 上、下游引物 (10 pmol·μL<sup>-1</sup>) 各 1.0 μL, 模板 DNA 1.0 μL, Trans Taq-T DNA 聚合酶 (5 U·μL<sup>-1</sup>) 0.7 μL, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 25.0 μL。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 退火温度 (表 1) 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 34 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物纯化后经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 送华大科技公司进行测序。采用巢氏 PCR 方法, 以扩增出的猪 *DKK1* 基因启动子区长

片段为模板, 扩增其他不同长度的片段, PCR 各反应体系同上、反应条件见表 1。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 纯化后直接测序。

1.2.3 pGL3-*DKK1* 启动子不同长度片段重组载体的构建 利用 PCR 产物纯化试剂盒对带 *Kpn* I 和 *Hind* III 内切酶位点的 PCR 产物进行纯化, 利用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Hind* III 对 pGL3-Basic 质粒进行双酶切后与 PCR 产物进行连接、转化、菌液 PCR 鉴定、质粒 DNA 提取, 并对质粒 DNA 进行酶切鉴定后, 分别命名: pGL3-2016/+292, pGL3-1679/+292, pGL3-953/+292, pGL3-586/+292, pGL3-215/+292, 送华大科技公司

进行测序。

1.2.4 细胞培养及转染 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中培养,并置于 37 °C 含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。在转染前 1 d,将生长状态良好的细胞接种于 24 孔板,每孔约  $1 \times 10^5$  个细胞,培养过夜,采用 Lipofectamine™ 2000 转染细胞,具体步骤参照产品说明书进行。

1.2.5 荧光素酶报告基因检测 将含不同长度启动子片段的 pGL3-DKK1 质粒分别转染 293T 细胞及 HeLa 细胞,每个样品均设 3 个重复。细胞培养过夜后换液,并继续培养 36 h,裂解细胞,使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒,利用化学发光仪(Pro-mega)测定荧光素酶活性。

1.2.6 数据分析 对各组试验重复数据计算平均值及标准差,采用单因素方差分析检验不同片段酶活性的差异性,Duncan's 检验法进行多重比较。

数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。

## 2 结果

### 2.1 *DKK1* 基因启动子生物信息学分析

利用启动子分析软件对猪 *DKK1* 基因启动子序列特征信号进行了分析,发现该序列具有真核生物启动子典型的 TATA-box,其中在 -1 638 ~ -1 628 bp (GTATAAATAGA) 处存在 TATA-box 特征序列;转录起始位点(TSS)位于 -1 608 bp 处,两者间隔 30 个碱基,相距较近。此外在该启动子区域还发现可能存在的主要转录因子:CTF/NF-1、TFIID、Oct-2、Ig-cd、HNF1、AP-1、AP-2、Sp1、T-Ag、JCV-repeated-sequence、EARLY-SEQ1、CAC-BP 等,而且转录因子 TFIID 和 Sp1 分布较集中。利用 MethPrimer 软件预测发现该基因的 -29 ~ +75 bp 处存在一个 104 bp 的 CpG 岛(图 1)。

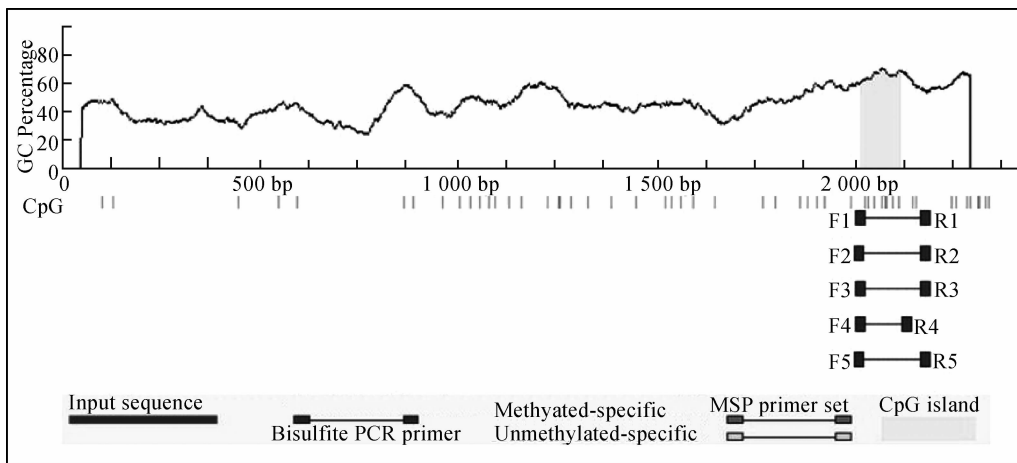


图 1 CpG 岛预测结果

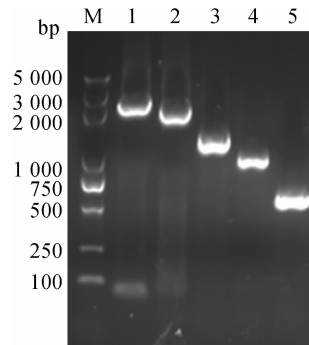
Fig. 1 CpG island predicted by Methprimer software

### 2.2 *DKK1* 基因启动子不同长度片段扩增

通过 PCR 扩增出猪 *DKK1* 基因启动子 5' 端 5 个不同长度片段,PCR 产物分别经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,其结果与预期片段大小一致(图 2)。

### 2.3 *DKK1* 基因重组载体的构建

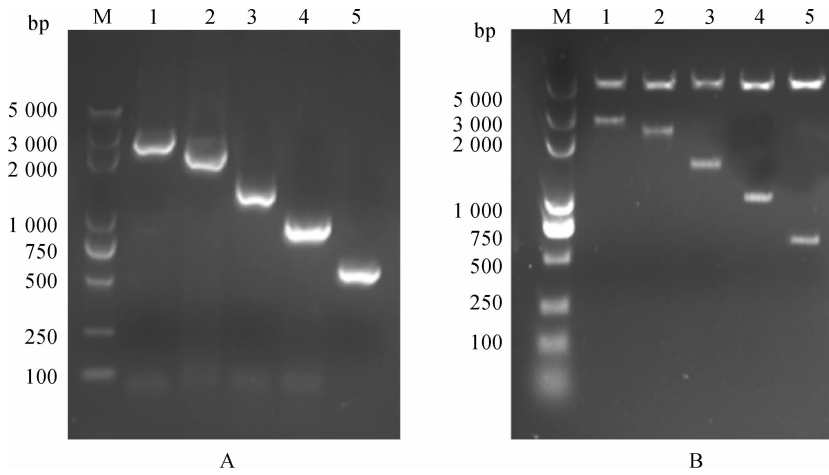
利用 Trans Taq-T DNA 聚合酶,分别以各个重组质粒为模板,与相对应表 1 中引物分别进行 PCR 扩增,经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果均与各预期片段大小一致(图 3A)。经双酶切鉴定,结果显示各重组质粒均产生 pGL3-Basic 载体片段(4 818 bp)及各自相应的片段(图 3B)。经测序、序列比对确定为目的片段,因而,猪 *DKK1* 基因启动子缺失片段的荧光素酶报告基因载体构建成功。



M. DM2000 Plus DNA marker; 1-5. PCR products using primers of pGL3-2016/+292, pGL3-1679/+292, pGL3-953/+292, pGL3-586/+292 and pGL3-215/+292

图 2 *DKK1* 基因不同引物扩增结果

Fig. 2 Products amplified by different primers of *DKK1* gene



M. DNA 相对分子质量标准; 1~5. pGL3-2016/+292、pGL3-1679/+292、pGL3-953/+292、pGL3-586/+292、pGL3-215/+292 PCR 鉴定结果(A)及酶切鉴定结果(B)

M. DM2000 Plus DNA marker; 1-5. Products of PCR (A) and restriction enzyme digestion (B) of the plasmid pGL3-2016/+292, pGL3-1679/+292, pGL3-953/+292, pGL3-586/+292, pGL3-215/+292

图3 重组质粒 PCR 及酶切鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid by PCR and digestion

### 2.4 猪 DKK1 基因启动子不同片段活性分析

由上述所构建的 5 个质粒和 pGL3-Basic 质粒分别与 pRL-TK 共转染 293T 细胞和 HeLa 细胞, 其中 pGL3-Basic 质粒作为阴性对照, 利用双荧光素酶报告基因检测试剂盒测定各个质粒萤火虫荧光素酶和内对照海肾荧光素酶活性, 由图 4 可知, 猪 DKK1 基因启动子不同长度片段荧光素酶的转录活性在两种细胞中的变化趋势几乎相同, 但各个递减片段在两种细胞中所对应的启动子活性存在较大差异, 在 293T 细胞中的启动子活性远远高于在 HeLa 细胞中的活性, 说明 DKK1 基因启动子对 293T 细胞具有偏好性。

猪 DKK1 基因启动子不同片段在 293T 细胞中具有不同的启动子活性, 利用双荧光素酶检测试剂盒分析的启动子活性由强到弱依次为 pGL3-1679/+292 bp、pGL3-2016/+292 bp、pGL3-215/+292 bp、pGL3-586/+292 bp、pGL3-953/+292 bp、pGL3-Basic (图 5), 除 527 和 898 bp 的启动子活性不存在显著差异外 ( $P > 0.05$ ), 其他片段间均呈极显著差异 ( $P < 0.01$ ), 因而推测在 5' UTR 的上游区域可能存在一些重要调控元件, 其中 -586~-953 bp、-1 679~-2 016 bp 区域可能存在负调控元件, -953~-1 679 bp 区域可能存在正调控元件。

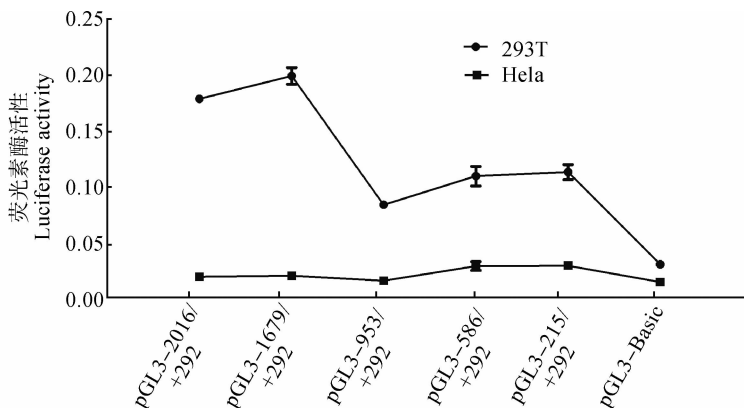
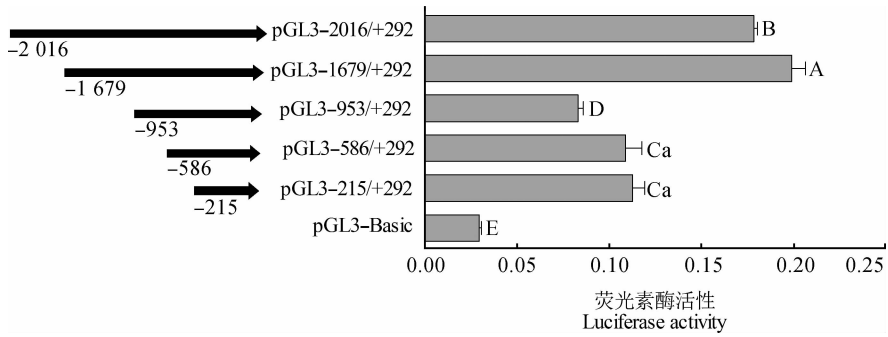


图4 猪 DKK1 基因 5' 调控区不同片段在 293T 和 HeLa 细胞中的启动活性比较

Fig. 4 Activity comparison of different promoter regions of DKK1 in 293T and HeLa cells



相同字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 不同大写字母表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )

The same letters indicate no significant difference ( $P > 0.05$ ); The different capital letter superscripts mean significant difference ( $P < 0.01$ )

图 5 猪 *DKK1* 基因 5' 调控区缺失片段在 293T 细胞中的启动子活性

Fig. 5 Activity analysis of the 5' flanking region of *DKK1* in 293T cells

### 3 讨论

真核生物的基因表达调控是一个极为复杂的过程,涉及转录水平、加工水平、翻译水平及翻译后水平的调控。由于转录水平的调控是基因表达的起始步骤,它决定着基因是否能够被转录以及转录的效率,同时也是顺式作用元件和众多反式作用因子之间相互作用的结果,因而转录水平的调控是基因表达过程中尤为重要的一步,对于真核基因转录水平调控的研究最多的是关于启动子的研究<sup>[19]</sup>。

目前生物信息学分析和表达载体的构建是研究启动子核心区域和调控区域的常用方法,万雷等<sup>[20]</sup>通过构建过表达重组腺病毒载体来研究 *DKK1* 基因的功能。基因启动子的分析通常采用荧光素酶报告系统,如通过构建 pGL3 报告基因载体来检测目的基因启动子活性,该方法是基于高度敏感的化学发光或放射性来检测,不仅简便且灵敏度高<sup>[21]</sup>。本研究首先通过生物信息学分析软件对启动子区序列进行初步预测,再以不含启动子和增强子,而含有荧光素酶基因的 pGL3-Basic 为载体,根据预测结果进一步构建 5' 端不同缺失片段的启动子报告基因表达载体,以表达海肾荧光酶的 PRL-TK 为内参共转染细胞,并采用双荧光素酶检测系统测定两种荧光素酶基因的表达,进而对调控序列做出快速分析。

曹贵玲等采用同源克隆的方法获得了山羊 *DKK1* 基因,该基因包含 4 个外显子和 3 个内含子,与其他哺乳动物有较高的同源性<sup>[22]</sup>。C. X. Liu 等研究表明猪 *DKK1* 基因定位于染色体 14q25-26<sup>[14]</sup>,本试验通过生物信息学分析发现,*DKK1* 基因启动子序列中含真核生物启动子所具有的典型

TATA-box 和多种转录因子,而且转录起始位点 (TSS) 位于 -1 608 bp 处,与 TATA-box 相距较近,两者间隔 30 个碱基;通过荧光素酶活性分析,初步证明了 *DKK1* 基因启动子片段具有转录活性,并且 -1679/+292 bp 的启动子活性最强,结合生物信息学分析结果进一步确定 -953~-1 679 bp 为核心启动子区域。

根据荧光素酶活性检测结果发现,猪 *DKK1* 基因在两种细胞中的启动子活性的强弱并不随着片段长度的增加而增强,即最长的启动子片段并不具有最高的活性,说明在 -2 016~+292 bp 区域中既存在着对该基因的转录起正调控的元件也存在着起负调控作用的因子。通过生物信息学方法对主要的负调控序列 -1 679~-2 016 bp 和 -586~-953 bp 进行分析,发现 -1 679~-2 016 bp 区域存在 CTF/NF-1 及多个 TFIID、NF-1 转录因子结合位点,-586~-953 bp 区域主要含有 GATA-1、Oct-1、Sp1、HOXA4 等多个转录因子结合位点。对正调控区域 -953~-1 679 bp 进行分析,主要转录因子结合位点有 TBP、AP-1、ARP-1、Oct-1、SP1、ATF、C/EBP $\alpha$ 、GATA-1、YY1、C/EBP $\beta$ 、NF- $\kappa$ B、MEB-1、CRE-BP1。

转录因子不仅能够控制基因的表达,而且是调节各种生理活动的关键环节,其中 Sp1 作为基本转录因子,其结合位点分布广泛。研究发现,Sp1 不仅可以通过 C 末端的结构域与 TFIID 相互作用,而且多种转录因子如 TBP、YY1 也可参与 Sp1 的转录活性调节<sup>[23]</sup>,W. Y. Lui 等<sup>[24]</sup>研究结果显示,Sp1 能够与人的 *KCTD10* 基因启动子区结合,进而调控该基因的表达。此外,Sp1 对转录调控区的 GC 盒有很

强的亲和力,参与细胞的分化、增殖及凋亡过程<sup>[25]</sup>。GATA-1 属于锌指蛋白,可通过与启动子中(A/T)GATA(A/G) 模序结合后激活基因的转录,在细胞分化和增殖中扮演重要角色<sup>[26]</sup>。存在于负调控区域的转录因子结合位点中,HOXA4 是同源异型基因(HOX)家族中的成员之一,在动物胚胎期和胎儿的皮肤及毛囊中广泛表达<sup>[27]</sup>。目前关于 *DKK1* 转基因获得的无毛小鼠是受人皮肤特异性的 K14 启动子调控,使得皮肤特异性过表达 *DKK1* 基因从而导致小鼠毛发发育受阻。但是关于该基因转录调控方面的研究较少,因此不能有效解析 *DKK1* 基因启动子区转录调控元件在毛囊、毛发生成过程中的具体作用。

本研究通过预测与试验分析,初步在细胞水平上证明猪 *DKK1* 基因 5'侧翼区具有启动子活性,由于基因的转录往往受到多种调控元件的协同作用,但具体是通过哪些顺式作用元件或反式作用因子发挥作用,仍需通过点突变、电泳迁移率变动分析与染色质免疫沉淀等方法进一步研究转录因子与 *DKK1* 基因启动子区的作用机制。

#### 4 结 论

本试验通过对 *DKK1* 基因进行生物信息学分析并结合不同长度启动子片段双报告基因活性检测,证实了 *DKK1* 基因的 5'侧翼区序列具有启动子转录活性,并初步确定了该基因的启动子区域,找到了启动子的核心区域和主要调控区域,为进一步研究 *DKK1* 基因转录调控机制奠定基础。

#### 参考文献(References):

- [ 1 ] BROTT B K, SOKOL S Y. Regulation of Wnt/LRP signaling by distinct domains of Dickkopf proteins [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(17): 6100-6110.
- [ 2 ] CAI T, SUN D Q, DUAN Y, et al. WNT/ $\beta$ -catenin signaling promotes VSMCs to osteogenic transdifferentiation and calcification through directly modulating Runx2 gene expression[J]. *Exp Cell Res*, 2016, 345(2): 206-217.
- [ 3 ] MAO B Y, WU W, DAVIDSON G, et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/ $\beta$ -catenin signalling[J]. *Nature*, 2002, 417(6889): 664-667.
- [ 4 ] PHILLIPS M D, MUKHOPADHYAY M, POSCABLO C, et al. *Dkk1* and *Dkk2* regulate epicardial

specification during mouse heart development[J]. *Int J Cardiol*, 2011, 150(2): 186-192.

- [ 5 ] NALESSO G, SHERWOOD J, BERTRAND J, et al. WNT-3A modulates articular chondrocyte phenotype by activating both canonical and noncanonical pathways[J]. *J Cell Biol*, 2011, 193(3): 551-564.
- [ 6 ] DESERT R, MEBARKI S, DESILLE M, et al. "Fibrous nests" in human hepatocellular carcinoma express a Wnt-induced gene signature associated with poor clinical outcome[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 81: 195-207.
- [ 7 ] LI J, SAROSI I, CATTLEY R C, et al. *Dkk1*-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia[J]. *Bone*, 2006, 39(4): 754-766.
- [ 8 ] JIN H T, WANG B L, LI J, et al. Anti-*DKK1* antibody promotes bone fracture healing through activation of  $\beta$ -catenin signaling[J]. *Bone*, 2015, 71: 63-75.
- [ 9 ] 刘亚龙, 武宇赤, 刘国栋, 等. *DKK1* 在大鼠骨髓间充质干细胞成骨、成脂分化早期的差异性表达[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(11): 1290-1297.  
LIU Y L, WU Y C, LIU G D, et al. Differential expression of *DKK1* during early osteogenic and adipogenic differentiation in rat bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2014, 20(11): 1290-1297. (in Chinese)
- [10] 李哲海. *Dkk1* 在骨髓间充质干细胞成骨、成脂分化的分子调节机制的实验研究[D]. 长沙: 中南大学, 2014.  
LI Z H. Regulate of the adipogenic and osteogenic differentiation of BMSCs by Sh-RNA-*DKK1* [D]. Changsha: Central South University, 2014. (in Chinese)
- [11] KATOH M, KATOH M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(14): 4042-4045.
- [12] GARCIA-MARTÍN A, REYES-GARCIA R, GARCÍA-FONTANA B, et al. Relationship of Dickkopf1 (*DKK1*) with cardiovascular disease and bone metabolism in Caucasian type 2 diabetes mellitus[J]. *PLoS One*, 2015, 10(1): e0117687.
- [13] NIEHRS C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators[J]. *Oncogene*, 2006, 25(57): 7469-7481.
- [14] LIU C X, GAO H, ZHAI S L, et al. Molecular characterization, chromosomal localization, expression profile and association analysis with carcass traits of the porcine *dickkopf homolog1* gene[J]. *Mol Biol*

- Rep*, 2011, 38(3): 1929-1934.
- [15] KIM M B, SONG Y, KIM C, et al. Kirenol inhibits adipogenesis through activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 445(2): 433-438.
- [16] ANDI T, REDDY S T, GADDAPARA T, et al. WNT signals are required for the initiation of hair follicle development[J]. *Dev Cell*, 2002, 2(5): 643-653.
- [17] SICK S, REINKER S, TIMMER J, et al. WNT and DKK determine hair follicle spacing through a reaction-diffusion mechanism [J]. *Science*, 2006, 314(5804): 1447-1450.
- [18] 刘 薇. DKK1 转基因体细胞克隆西藏小型猪的制备[D]. 广州: 南方医科大学, 2013.  
LIU W. Generation of DKK1 transgenic Tibet minipigs by somatic cell nuclear transfer (SCNT) [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2013. (in Chinese)
- [19] 周纬男, 史铭欣, 乔书培, 等. 鸡 *Perilipin1* 基因启动子的克隆及分析[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(2): 249-259.  
ZHOU W N, SHI M X, QIAO S P, et al. Promoter cloning and analysis of chicken *Perilipin1* gene[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(2): 249-259. (in Chinese)
- [20] 万 雷, 黄宏兴, 黄 红, 等. 过表达 DKK1、Sost 重组腺病毒载体的构建及其对 MG63 细胞和相关蛋白的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2016, 33(4): 578-584.  
WAN L, HUANG H X, HUANG H, et al. Construction of DKK1, Sost overexpressing recombinant adenovirus vector and effect of overexpression on MG63 cells and related proteins [J]. *Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine*, 2016, 33(4): 578-584. (in Chinese)
- [21] ANNICOTTE J S, SCHOONJANS K, HABY C, et al. An E-box in pGL3 reporter vectors precludes their use for the study of sterol regulatory element-binding proteins[J]. *Biotechniques*, 2001, 31(5): 993-994, 996.
- [22] 曹贵玲, 张渝洁, 李 标, 等. 山羊 *Dkk1* 基因的结构、启动子区的多态性及其与生产性状的关联分析[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(11): 1394-1400.  
CAO G L, ZHANG Y J, LI B, et al. Genomic structure, polymorphism in promoter region and their associations with production traits of *Dkk1* gene in goats[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2010, 41(11): 1394-1400. (in Chinese)
- [23] JOKELA T A, MAKKONEN K M, OIKARI S, et al. Cellular content of UDP-N-acetylhexosamines controls hyaluronan synthase 2 expression and correlates with O-linked N-acetylglucosamine modification of transcription factors YY1 and SP1 [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(38): 33632-33640.
- [24] LUI W Y, SZE K L, LEE W M. Nectin-2 expression in testicular cells is controlled via the functional cooperation between transcription factors of the Sp1, CREB, and AP-1 families[J]. *J Cell Physiol*, 2006, 207(1): 144-157.
- [25] EMILI A, GREENBLATT J, INGLES C J. Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein [J]. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(3): 1582-1593.
- [26] CHOI M, WANG S E, KO S Y, et al. Overexpression of human GATA-1 and GATA-2 interferes with spine formation and produces depressive behavior in rats[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109253.
- [27] PACKER A I, JANE-WIT D, MCLEAN L, et al. *Hoxa4* expression in developing mouse hair follicles and skin[J]. *Mech Dev*, 2000, 99(1-2): 153-157.

(编辑 郭云雁)