

PGC-1 α 辅助激活人 PEPCK 基因转录

何圣清, 陈燕铭*, 王曼曼, 舒 问, 梁 华, 任琢琢, 曾龙驿, 翁建平
(中山大学附属第三医院内分泌科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】构建人磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)基因启动子荧光素酶报告质粒 PGL3-hPCK-luc, 并探讨过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 辅助激活因子 1 α (PGC-1 α) 在转录因子肝细胞核因子 4 α (HNF4 α) 介导下对人 PEPCK 基因启动子活性的影响。【方法】从人全血基因组 DNA 中克隆 PEPCK 启动子基因片段, 并重组进荧光素酶报告载体 PGL3-basic, 将 pcDNA3.1-PGC-1 α 、pcDNA3.0-HNF4 α 表达质粒与 PGL3-hPCK-luc 按不同组合共转染进人肝癌细胞株 HepG2 细胞或正常人肝细胞株 LO2 细胞, 培养 48 h 后检测细胞裂解液中荧光素酶活性。【结果】通过酶切鉴定及测序证明扩增的人 PEPCK 启动子片段成功插入载体质粒中。转染后人 PEPCK 启动子基因荧光素酶活性较空白对照组增加 60 倍($P < 0.05$); 共转染质粒进 HepG2 细胞或 LO2 细胞后, HNF4 α 均可以增强人 PEPCK 启动子基因荧光素酶活性, 在 HepG2 细胞, 荧光素酶活性是对照组的 2.69 倍($P < 0.05$), 而在 LO2 细胞中, 荧光素酶活性是对照组的 3.64 倍($P < 0.05$); PGC-1 α 可以明显增强 HNF4 α 对人 PEPCK 启动子的激活作用, 在 HepG2 细胞, 荧光素酶活性是 PGL3-hPCK-luc+HNF4 α 组的 2.01 倍($P < 0.05$), 而在 LO2 细胞中, 荧光素酶活性是 PGL3-hPCK-luc+HNF4 α 组的 2.82 倍($P < 0.05$)。而与单一转染组相比, 共转染 pcDNA3.1-PGC-1 α 与 pcDNA3.0-HNF4 α 显著增加了 PEPCK 的 mRNA 和蛋白表达水平($P < 0.05$)。【结论】人 PEPCK 启动子基因报告质粒成功构建, 且转录因子 HNF4 α 可以激活人 PEPCK 启动子活性, 辅助激活因子 PGC-1 α 可以进一步加强 HNF4 α 的作用。

关键词: 糖异生; 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶; 过氧化物酶体增殖物辅助激活因子 1 α ; 基因表达调控

中图分类号: R587.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2011)02-0191-06

PGC-1 α Coactivates Human PEPCK Gene Transcription

HE Sheng-qing, CHEN Yan-ming*, WANG Man-man, SHU Jiong, LIANG Hua, REN Zhuo-zhuo,
ZENG Long-yi, WENG Jian-ping

(Department of Endocrinology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】 The purpose of this study was to construct the human phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) promoter luciferase reporter plasmid PGL3-hPCK-luc, and investigate the effect of the coactivator peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 α (PGC-1 α) on human PEPCK promoter activity in the presence of transcription factor hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α). 【Method】 The PEPCK promoter was cloned from normal human blood genomic DNA, and inserted into the luciferase reporter vector PGL3-basic. Then different combinations of pcDNA3.1-PGC-1 α , pcDNA3.0-HNF4 α , and PGL3-hPCK-luc were cotransfected into human hepatoma cells HepG2 or human hepatic cells LO2. The luciferase activity was detected after culturing cells for 48 hours. 【Results】 It was confirmed that the human PEPCK gene promoter was successfully inserted into the vector by gel electrophoresis and sequencing analysis. The human PEPCK gene promoter luciferase activity was increased 60-fold ($P < 0.05$) than the control group; When cotransfected into HepG2 cells, HNF4 α could enhance the human PEPCK gene promoter luciferase activity. In HepG2 cells it was 2.69 times higher than the control group ($P < 0.05$), and in LO2 cells it was 3.64-fold higher ($P < 0.05$); PGC-1 α could significantly enhance the human HNF4 α activation of PEPCK promoter. The relative luciferase activity was 2.01-fold in HepG2 cells ($P < 0.05$) or 2.82-fold in LO2 cells ($P < 0.05$) higher than the group of PGL3-hPCK-luc plus HNF4 α . Compared with single transfecting group, co-transfecting pcDNA3.1-PGC-1 α and pcDNA3.0-HNF4 α increased the PEPCK mRNA and protein levels significantly ($P < 0.05$). 【Conclusion】 The PEPCK promoter gene reporter plasmid was successfully constructed. The transcription factor

收稿日期: 2010-11-08

基金项目: 广东省自然科学基金(9151008901000092)

作者简介: 何圣清, 硕士, 住院医师, E-mail: hsq36023@163.com; * 通信作者: 陈燕铭, 博士, 副教授, E-mail: yanmingch@qq.com

HNF4 α could activate the human PEPCK promoter activity, and the coactivator PGC-1 α could further strengthen the role of HNF4 α .

Key words: gluconeogenesis; phosphoenolpyruvate carboxykinase; peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α ; gene expression regulation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(2): 191-196]

2型糖尿病病程中通常为胰岛素抵抗及胰岛素分泌缺陷相伴随。肝脏是人体储存糖原的重要器官, 肝脏胰岛素抵抗是胰岛素抵抗的重要环节。肝脏胰岛素抵抗指胰岛素抑制肝脏葡萄糖异生的能力降低, 肝脏葡萄糖输出增加, 从而产生高血糖和糖不耐受。磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK) 以及葡萄糖 6 磷酸酶 (Glucose 6 phosphatase, G6Pase) 是糖异生途径的关键酶。这两个酶表达的调节一直是人们研究胰岛素抵抗机制及治疗糖尿病药物靶点的关键。过氧化物酶体增殖物辅助激活因子 1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 是一种受冷刺激诱导且可以介导多种细胞能量代谢的核受体辅助激活因子^[1], 在脂肪和肌肉组织产热、葡萄糖代谢、脂肪酸氧化、线粒体生物合成、肌纤维类型的转化等方面都起重要作用。PGC-1 α 虽然对糖异生基因如 PEPCK、G6Pase 无直接的调节作用, 但是研究证明它作为一种辅助激活因子, 可与相关转录因子如糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR)、叉头转录因子 1 (forkhead transcription factor O1, FOXO1) 结合, 间接调节糖异生^[2]。肝细胞核因子 4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α , HNF4 α) 作为重要的转录因子, 对糖异生基因的表达也有明显的激活作用, 在小鼠肝细胞中证明它与 PGC-1 α 的相互作用可以明显促进糖异生基因表达^[3-4]。为了研究转录因子对 PEPCK 转录的直接影响, 以及为以后研究遗传变异、各种药物及细胞因子对胰岛素抵抗相关基因特别是糖异生基因的调节机制, 本研究构建人 PEPCK 启动子基因荧光素酶报告质粒, 并以此为工具, 进一步研究转录因子肝细胞核因子 4 α 及辅助激活因子 PGC-1 α 对此报告质粒荧光素酶活性的影响。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

1.1.1 细胞、菌株、质粒 HepG2 细胞及 LO2 细

胞分别由中山大学附属第三医院肝病实验室和中心实验室保存, 感受态细胞 DH5 α 购自天根生化公司, PGL3-basic 载体质粒 (接萤火虫荧光素酶报告基因 firefly luciferase) 及 PRL-SV40 内参质粒 (接海肾荧光素酶报告基因) 购自 Promega 公司, 人 PGC-1 α 真核表达质粒 pcDNA3.1-PGC-1 α 由韩国庆熙大学 Youngmi Kim Pak 教授惠赠, 人 HNF4 α 真核表达质粒 pcDNA3.0-HNF4 α 由美国 Illinois 大学 Jongsook Kim Kemper 教授惠赠。

1.1.2 试剂 人血基因组 DNA 提取试剂盒购自 Axygen 公司, 胶回收纯化试剂盒、无内毒素质粒小提试剂盒购自 Omega 公司, Taq DNA 聚合酶、dNTP 购自 Fermentas 公司, T4 连接酶购自 NEB 公司, 转染试剂 Fugene HD 购自罗氏公司, 限制性内切酶 *Mlu* I、*Xho* I、双荧光素酶检测试剂盒 (dual luciferase assay system) 购自 Promega 公司, DMEM 高糖细胞培养基、胎牛血清购自 hyclone 公司。兔抗人 PEPCK 抗体购自 santa cruze 公司, 鼠抗人 GAPDH 抗体购自 abmart 公司, 二抗购自博奥森公司。

1.2 PGL3-hPCK-promoter 报告载体的构建

1.2.1 人 PEPCK 启动子片段的克隆 从 NCBI 中查找人 PEPCK 启动子序列, 并设计引物 (上游 5'-CGACGCGTTCTAAGTGAGTTTGGTCGGAGG-3' 和下游 5'-GAAGATCTCTGCAGAGTGCTGCTAAGG G-3'), 上下游引物 5' 端加酶切位点 *Mlu* I、*Xho* I (下划线部分) 及保护碱基, 由 invitrogen 公司合成。用人全血基因组 DNA 提取试剂盒从正常人外周血中提取全基因组 DNA, 以此为模板, 常规 PCR 扩增 PEPCK 启动子片段 (-1340 ~ +300)。PCR 反应体系为: 10 \times PCR buffer 5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 3 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 1 μ L, 上下游引物各 2.5 μ L, DNA 模板 2 μ L, 1 U/ μ L Taq 聚合酶 2.5 μ L, 加去离子水至总体积为 50 μ L, 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min 后, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 62 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 循环 30 次, 72 $^{\circ}$ C 反应 7 min。2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增片段, 并用胶回收试剂盒纯化扩增产物,

1.2.2 人 PEPCK 启动子片段插入载体质粒 用

限制性内切酶 *Mlu* I、*Xho* I 双酶切扩增产物及 PGL3-basic 载体质粒, T4 连接酶将酶切产物 16℃ 过夜反应连接。连接产物转化入感受态细胞 DH5 α 中, 经氨苄青霉素抗性筛选并行菌落 PCR 挑选出阳性菌, 挑菌培养, 以无内毒素质粒小提试剂盒提取质粒, 酶切电泳并送检测序鉴定。

1.3 细胞培养及瞬时转染

HepG2 细胞及 LO2 细胞均培养于含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中, 待细胞长至 80% 融合时用胰酶消化, 以 2×10^5 细胞/mL 密度接种于 24 孔板中, 继续培养 24 h 后换液, 按照以下组别分组: 组 1, PGL3-hPCK-luc 200 ng; 组 2, PGL3-hPCK-luc 200 ng + pcDNA3.1-PGC-1 α 200 ng; 组 3, PGL3-hPCK-luc 200 ng + pcDNA3.0-HNF4 α 100 ng; 组 4, PGL3-hPCK-luc 200 ng + pcDNA3.1-PGC-1 α 200 ng + pcDNA3.0-HNF4 α 100 ng, 各组分别加内参质粒 PRL-SV40 20 ng, 并用 pcDNA3.1 空质粒恒定质量, 以上各组质粒溶于 25 μ L 无血清 DMEM 培养基中, 加入 1.5 μ L Fugene HD, 室温孵育 15 min, 逐滴加入 24 孔板细胞培养基液面下。继续于 5% 体积分数 CO₂ 培养箱 37℃ 培养 48 h。

1.4 双荧光素酶报告基因检测

转染后 48 h 的 24 孔板细胞吸出上清液, 余培养基用 PBS 洗两次, 按照双荧光素酶检测试剂盒 (Dual Luciferase Assay System) 的操作说明书, 加入 PLB 裂解液 100 μ L/孔, 室温裂解 15 min, 取 20 μ L 至 96 孔板中, 用 Modulus 双进样口微孔板多功能光度计, 设定检测延迟 2 s, 发光仪测读 10 s, 按序自动加入 Luciferase Assay Reagent II (LAR II) 50 μ L, Stop & Glo™ 试剂 50 μ L, 分别读出载体荧光素酶活性及海参内参质粒 PRL-SV40 荧光素酶活性数值, 两者之比为荧光素酶相对活性。

1.5 RT-PCR 方法检测转染后各组 PEPCK 的 mRNA 表达水平

HepG2 细胞以 1×10^6 细胞/孔密度接种于 6 孔板中, 继续培养 24 h 后换液, 按照以下组别分组: 组 1, 空质粒对照组; 组 2, pcDNA3.1-PGC-1 α 800 ng; 组 3, pcDNA3.0-HNF4 α 400 ng; 组 4, pcDNA3.1-PGC-1 α 800 ng + pcDNA3.0-HNF4 α 400 ng, 各组均以 pcDNA3.1 空质粒恒定质量, 各组质粒按以上质量溶于 100 μ L 无血清 DMEM 培养基中, 加入 6 μ L Fugene HD, 室温孵育 15 min, 逐滴加入细胞培养基液面下。继续于 5% 体积分数

CO₂ 培养箱 37℃ 培养 48 h 后。吸出上清液, 余培养基用 PBS 洗两次, Trizol 法提取细胞样本的总 RNA, 用 Beckman DU800 核酸蛋白分析仪分别在 260 nm 和 280 nm 处读取吸光度 (*D*) 值以鉴定总 RNA 浓度和纯度。取 2 μ g 总 RNA 进行逆转录, 逆转录后的 cDNA 置于 -20℃ 保存。RT-PCR 扩增 cDNA 拷贝。PEPCK 引物 (上游 5'-CAAGACGGTTATCGTCAC CCA-3' 和下游 5'-GAACCTGGCATTG AACGCTT-3'), β -actin 引物 (上游 5'-AGCGAGCA TCCCCAAAGTT-3' 和下游 5'-GGGCACGAAG GCTCATCATT-3'), PCR 反应体系为: 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 0.5 μ L, 上下游引物各 1.5 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 1 U/ μ L *Taq* 聚合酶 1.25 μ L, 加去离子水至总体积为 25 μ L, 扩增条件为 94℃ 预变性 2 min 后, 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 循环 35 次, 72℃ 反应 10 min。取 5 μ L 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。

1.6 Western blot 方法检测 PEPCK 的蛋白表达水平

按照上述细胞实验方案, 转染 48 h 后收集转染后的细胞裂解液, 蛋白质定量, 进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳完毕后转膜, 用脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 洗膜, 加入兔抗人 PEPCK 抗体、鼠抗人 GAPDH 抗体 4℃ 孵育过夜, 辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜, ECL 试剂盒曝光、显影、定影, 用 Bio-Rad2000 图像分析系统扫描 X 线片并分析。

1.7 统计学方法

所有统计在 SPSS 13.0 软件包内完成。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较计量资料用独立样本 *t* 检验。 *P* < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 人 PEPCK 基因启动子片段扩增结果

用 RT-PCR 的方法, 以正常人外周血基因组 DNA 为模板扩增 PEPCK 基因启动子目的片段 1 640 bp (-1340 ~ +300), 电泳鉴定结果 (图 1) 显示于约 1 600 bp 处见一明亮清晰泳带, 与预期位置长度相符。

2.2 荧光素酶报告质粒 PGL3-hPCK-luc 的构建及鉴定

用限制性内切酶 *Mlu* I、*Xho* I 双酶切扩增产

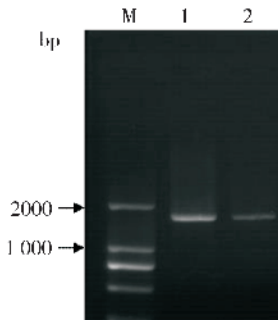


图 1 PEPCK 启动子片段的克隆

Fig. 1 The clone of PEPCK promoter

M: 2 000 bp DNA marker; 1, 2: PCR products; Both are part of PEPCK promoter (1 640 bp)

物及 PGL3-basic 载体质粒, T4 连接酶过夜反应连接。连接产物转入感受态细胞 DH5 α 中并扩增。质粒电泳及双酶切鉴定见两条清晰条带 (图 2), 其中一条位于约 1 600 bp。将重组质粒送 invitrogen 公司测序鉴定, 结果表明重组质粒中插入序列为 1 640 bp, 插入的目的片段与 NCBI 公布的 PEPCK 启动子序列相符, 并方向准确插入 PGL3-basic 载体质粒的多克隆位点 *Mlu* I、*Xho* I 之间。

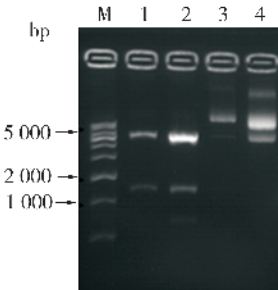


图 2 PGL3-hPCK-luc 重组质粒 *Mlu* I、*Xho* I 双酶切

Fig. 2 PGL3-hPCK-luc plasmid was digested by *Mlu* I and *Xho* I

M: 1kb DNA marker; 1, 2: Both of them show that *Mlu* I and *Xho* I digested recombinant plasmid; 3, 4: Both of them are PGL3-hPCK-luc plasmid

2.3 重组质粒功能鉴定

将构建好的重组荧光素酶报告质粒 PGL3-hPCK-luc 转染进入人肝癌细胞株 HepG2 细胞, 48 h 后检测荧光比值活性。转染质粒 PGL3-hPCK-luc 的实验组是转染空质粒载体 PGL3-basic 的对照组荧光比值的 60 倍 ($P < 0.001$, 图 3)。

2.4 PGC-1 α 及 HNF4 α 对人 PEPCK 启动子活性的影响

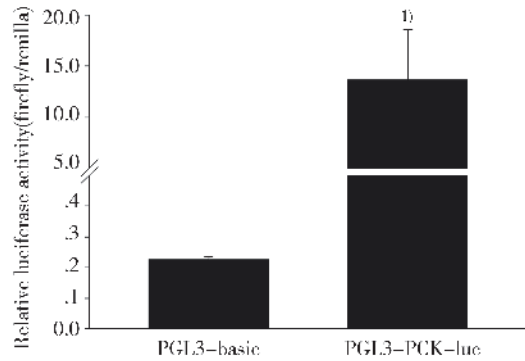


图 3 PGL3-hPCK-luc 转染 HepG2 细胞后荧光素酶相对活性

Fig. 3 The relative luciferase activity after transfecting PGL3-hPCK-luc into HepG2 cell

Compared with the empty plasmid group, transfecting PGL3-hPCK-luc can significantly increase luciferase activity. 1) $P < 0.001$

将载体质粒 PGL3-hPCK-luc、pcDNA3.1-PGC-1 α 、pcDNA3.0-HNF4 α 按不同组合联合内参质粒 PRL-SV40 共转染进 HepG2 细胞后检测荧光比值活性, 各组用 pcDNA3.1 空质粒恒定质量。与仅转染质粒 PGL3-hPCK-luc 相比, 转染 pcDNA3.1-PGC-1 α 对人 PEPCK 启动子活性的无影响。而转染 pcDNA3.0-HNF4 α 实验组的荧光比值是对照组的 2.69 倍 ($P < 0.05$), 将 pcDNA3.1-PGC-1 α 与 pcDNA3.0-HNF4 α 共转染进细胞内发现荧光比值是对照组的 5.43 倍 ($P < 0.05$), 是单转染 pcDNA3.0-HNF4 α 的 2.01 倍 ($P < 0.05$, 图 4)。为了解在正常肝细胞株中 PGC-1 α 与 HNF4 α 对人 PEPCK 启动子的调节作用, 进一步按上述转染质粒组合共转染进正常人肝 LO2 细胞中, 只转染 pcDNA3.0-HNF4 α 实验组的荧光比值是对照组的 3.64 倍 ($P < 0.05$), 将 pcDNA3.1-PGC-1 α 、pcDNA3.0-HNF4 α 共转染进 LO2 细胞内发现荧光比值是单转染 pcDNA3.0-HNF4 α 的 2.82 倍 ($P < 0.05$, 图 5)。

2.5 转染后各组 PEPCK 的 mRNA 表达水平变化

按照上述转染条件及分组转染质粒进 HepG2 细胞后, 应用 RT-PCR 方法检测各组 PEPCK 的 mRNA 水平, 结果显示共转染 PGC-1 α +HNF4 α 后 PEPCK 的 mRNA 表达水平高于单一转染 PGC-1 α 或 HNF4 α 质粒组及空质粒转染对照组 (图 6)。

2.5 转染后各组 PEPCK 的蛋白表达水平变化

按照上述转染条件及分组转染质粒进 HepG2 细胞后, 应用 western blot 方法检测各组 PEPCK 的

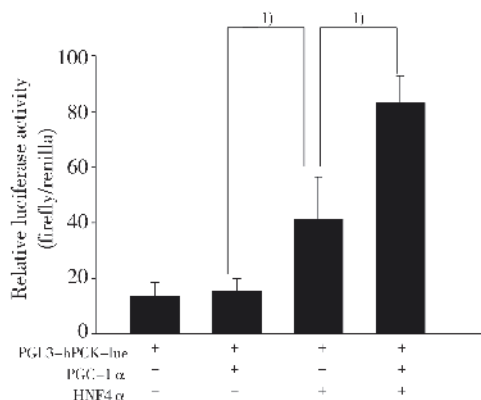


图 4 不同组合重组质粒共转染 HepG2 细胞后荧光素酶相对活性,

Fig.4 The relative luciferase activity after co-transfecting different combinations of the plasmids into HepG2 cells

The total amount of expression vectors added was kept constant by the empty vector pcDNA3.1. 1) $P < 0.05$

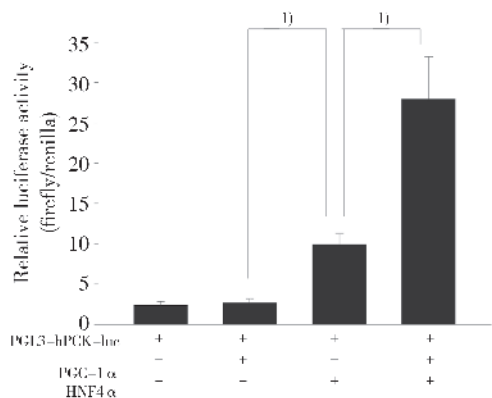


图 5 不同组合重组质粒共转染 LO2 细胞后荧光素酶相对活性

Fig.5 The relative luciferase activity after co-transfecting different combinations of the plasmids into LO2 cells

The total amount of expression vectors added was kept constant by the empty vector pcDNA3.1. 1) $P < 0.05$

蛋白表达水平, 结果显示单转染 HNF4 α 组 PEPCK/GAPDH 相对灰度值为 1.36 ± 0.06 , 明显高于空质粒转染组及单转染 PGC-1 α 组 ($1.11 \pm 0.05, P < 0.05$), 而共转染 PGC-1 α + HNF4 α 后 PEPCK 蛋白表达 (1.61 ± 0.18) 明显高于单一转染 PGC-1 α 或 HNF4 α 质粒组及空质粒转染对照组 ($P < 0.05$, 图 7)。

3 讨论

过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 辅助激活因

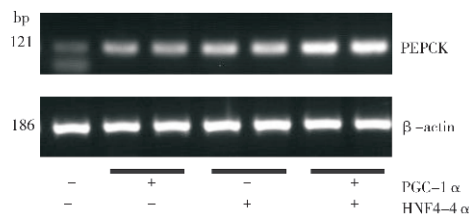


图 6 RT-PCR 方法检测 PGC-1 α 、HNF4 α 单一转染或共转染进 HepG2 细胞后各组 PEPCK 的 mRNA 表达水平
Fig.6 PEPCK mRNA levels were detected by RT-PCR after single transfecting PGC-1 α or HNF4 α or co-transfecting them into HepG2 cells

β -actin was detected as the internal control. This figure showed that co-transfecting PGC-1 α and HNF4 α increased the PEPCK mRNA levels significantly more than the single-transfecting PGC-1 α or HNF4 α group. All groups were transfected with pcDNA3.1 empty vector for constanting plasmid quality

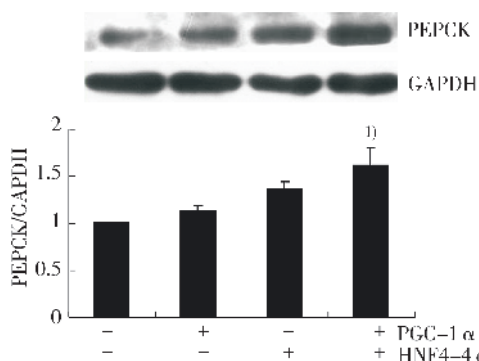


图 7 PGC-1 α 、HNF4 α 单一转染或共转染进 HepG2 细胞后各组 PEPCK 的蛋白表达水平

Fig.7 PEPCK protein levels were detected after single transfecting PGC-1 α or HNF4 α or co-transfecting them into HepG2 cells

1) compared with single transfecting PGC-1 α or HNF4 α , $P < 0.05$

子-1 (PPAR γ -coactivator-1, PGC-1) 是一种多功能的转录调节辅激活因子, PGC-1 家族有 3 个成员: PGC-1 α 、PGC-1 β 、PGC-1 相关协同刺激因子 (PRC)。通常所说的 PGC-1 是指 PGC-1 α 。PGC-1 α 在人类和啮齿类动物的棕色脂肪组织、骨骼肌、肝脏中有较高的表达^[1]。PGC-1 α 有与多种核转录因子的结合位点, 广泛调节能量生成与利用过程, 与糖异生、脂肪酸氧化、线粒体生物合成等有着密切关系。生理条件下, PGC-1 α 促进肝糖异生, 维持内环境稳定, 发生糖尿病时 PGC-1 α 的大量激活导致不受反馈抑制的肝糖异生, 诱发肝内胰岛素抵抗^[5-6]。

糖异生调节的关键酶包括: 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 以及葡萄糖 6 磷酸酶 (G6Pase),

它们在糖异生中的作用失调或表达增加会使肝脏葡萄糖产生增加,从而形成高血糖。其中 PEPCK 有两种同工酶,包括 PEPCK-M 和 PEPCK-C, PEPCK-C 是催化糖异生第一步的关键酶。核转录因子如肝细胞核因子 4 α (HNF4 α)、糖皮质激素受体(Glucocorticoid receptor, GR)、叉头转录因子 1(Forkhead transcription factor 1, FOXO1)、过氧化物酶体增殖物活化受体(PPAR)均能结合在 PEPCK 或 G6Pase 基因转录起始点上游启动子的调节区并影响这些基因的转录水平。HNF4 α 在肝脏高水平表达是核受体超家族配基激活型转录因子中高度保守的成员之一。在 HNF4 α 基因敲除小鼠原代肝细胞中 PGC-1 α 失去了对糖异生基因的激活作用^[7]。PGC-1 α 与 HNF-4 α 相互作用形成复合体,促进 PEPCK 等糖异生限速酶的转录起始,从而可能调节肝脏糖异生的产生效率^[3]。

为进一步研究探讨辅助激活因子与转录因子对糖异生关键酶的影响,本研究应用 PCR 方法从正常人外周血基因组中成功扩增出 PEPCK 基因启动子目的片段 1 640 bp(-1340 ~ +300),酶切及测序证明此片段准确插入载体。双荧光素酶报告检测是目前研究启动子活性及转录因子功能的常用方法。利用构建的报告质粒转染进入肝癌细胞株后检测重组质粒的荧光素酶活性,发现其荧光素酶活性较对照空质粒显著增加,证明重组的 PGL3-hPCK-luc 具有启动子活性,能够激活启动子下游荧光素酶表达。

利用重组的荧光素酶报告质粒 PGL3-hPCK-luc 与转录因子(HNF-4 α)及辅助激活因子(PGC-1 α)共转染进入肝癌细胞 HepG2 细胞及正常人肝细胞 LO2 细胞中,HNF-4 α 与 PEPCK 启动子报告质粒共转染组显著增加了转染后荧光素酶的表达,证明转录因子 HNF-4 α 可以激活人 PEPCK 启动子活性,这与既往研究认为 HNF-4 α 过表达增加糖异生的作用一致。加入辅助激活因子(PGC-1 α)与转录因子(HNF-4 α)共转染后,发现荧光素酶活性进一步增加,这表明 PGC-1 α 可以进一步增强 HNF-4 α 的作用,与文献报道的小鼠肝细胞的实验结果相符^[3],进一步证实在人的肝细胞中 PGC-1 α 与糖代谢的密切关系。同时,为区别肝肿瘤细胞株的糖代谢与人正常的肝细胞株的糖代谢不同的影响,本研究在人正常肝细胞株 LO2 中进行了研究,也得到了同样的结果。同时,本研究检

测了转染后细胞 PEPCK 的 mRNA 及蛋白的表达水平,显示 PGC-1 α 明显增加了 HNF-4 α 刺激的 PEPCK 基因及蛋白表达,间接反映糖异生能力及生糖作用增强。糖异生限速酶基因启动子活性改变对肝脏糖异生的直接效应仍有待进一步探索。

综上所述,本研究成功构建了人 PEPCK 启动子荧光素酶报告质粒 PGL3-hPCK-luc,并证实其具有启动子活性,揭示了 PGC-1 α 在转录因子 HNF-4 α 介导下对糖异生关键限速酶(PEPCK)基因启动子的辅助激活功能,可能在 2 型糖尿病及胰岛素抵抗的发病机制研究中发挥着重要的作用,为深入探讨肝脏糖异生的遗传机制及研发治疗药物提供必要的工具。

参考文献:

- [1] Wu Z, Puigserver P, Andersson U, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1 [J]. *Cell*, 1999, 98(1):115-124.
- [2] Lin J, Handschin C, Spiegelman B M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators [J]. *Cell Metab*, 2005, 1(6): 361-370.
- [3] Yoon J C, Puigserver P, Chen G, et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1 [J]. *Nature*, 2001, 413 (6852): 131-138.
- [4] Yamamoto T, Shimano H, Nakagawa Y, et al. SREBP-1 interacts with hepatocyte nuclear factor-4 alpha and interferes with PGC-1 recruitment to suppress hepatic gluconeogenic genes [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(13): 12027-12035.
- [5] Koo S H, Satoh H, Herzig S, et al. PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR-alpha-dependent induction of TRB-3 [J]. *Nat Med*, 2004, 10 (5):530-534.
- [6] Leone T C, Lehman J J, Finck B N, et al. PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis [J]. *PLoS Biol*, 2005, 3(4): e101.
- [7] Rhee J, Inoue Y, Yoon J C, et al. Regulation of hepatic fasting response by PPARgamma coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(7): 4012-4017.

(编辑 孙慧兰)