

羊核因子I/B的3个蛋白质异构体功能差异分析

张潇飞¹ 宋鹤¹ 荣恩光¹ 杨华² 闫晓红¹ 李玉茂¹ 李辉¹ 王宁^{1*}

(¹东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030; ²新疆农垦科学院畜牧兽医研究所, 石河子 832000)

摘要 核因子I/B(nuclear factor I/B, NFIB)是一个重要的转录因子,在细胞增殖、凋亡和组织发育等生物学过程中发挥重要作用。前期研究发现,绵羊NFIB基因存在3个转录异构体(transcript isoform),分别编码3个不同的蛋白质异构体(protein isoform):NFIB-1(48 kDa)、NFIB-2(43 kDa)和NFIB-3(39 kDa)。目前,这些蛋白质异构体之间的功能差异还不清楚。为此,该研究分别设计了羊NFIB基因转录异构体的特异性表达检测引物,采用Real-time PCR开展NFIB基因3个转录异构体的组织表达谱分析;分别构建NFIB基因的3个蛋白质异构体的真核表达载体,转染HaCAT细胞,采用CCK-8、Cell Death Detection ELISA及Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒比较了这3个NFIB异构体对HaCAT细胞增殖和凋亡的影响。结果显示,NFIB基因3个转录异构体在绵羊的皮肤、脂肪、肾脏等多种组织和器官中表达,但它们在不同组织和器官中的相对表达量不同。CCK-8细胞增殖分析显示,与对照相比,NFIB-1具有促进HaCAT细胞增殖的作用($P<0.01$),NFIB-2的作用不明显,而NFIB-3显著抑制HaCAT细胞的增殖($P<0.01$)。Cell Death Detection ELISA及Annexin V-FITC凋亡检测发现,这3个蛋白质异构体在一定程度上均促进HaCAT细胞的凋亡,其中,NFIB-1和NFIB-3促细胞凋亡的作用强于NFIB-2($P<0.01$),但NFIB-1和NFIB-3促细胞凋亡作用的差异不显著。这些结果表明,羊NFIB的3个蛋白质异构体在细胞增殖和凋亡中发挥不同作用。

关键词 羊核因子I/B; 蛋白异构体; 细胞增殖; 细胞凋亡

The Functional Analysis of the Three Different Isoforms of Sheep Nuclear Factor I/B

Zhang Xiaofei¹, Song He¹, Rong Enguang¹, Yang Hua², Yan Xiaohong¹, Li Yumao¹, Li Hui¹, Wang Ning^{1*}

(¹College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

²Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Xinjiang Academy of Agriculture and Reclamation Science, Shihezi 832000, China)

Abstract The nuclear factor I/B (NFIB) is an important transcription factor and plays important roles in cell proliferation, apoptosis and tissue development. Our previous results revealed that sheep *NFIB* gene produces three different transcript isoforms and three protein isoforms (NFIB-1, NFIB-2 and NFIB-3). NFIB-1, NFIB-2 and NFIB-3 have a molecular weight of 48 kDa, 43 kDa and 39 kDa, respectively. To date, their functional differences are not clear. In the present study, the transcript-specific primers were designed and used to measure the abundance of the three different *NFIB* transcript isoforms in various sheep tissues using Real-time PCR. To explore their functional differences, the eukaryotic expression vectors of these three different *NFIB* isoforms were constructed and transfected into HaCAT cells. The CCK-8, Cell Death Detection ELISA and Annexin V-FITC

收稿日期: 2016-03-08 接受日期: 2016-05-12

转基因新品种培育科技重大专项课题(批准号: 2014ZX08009-002、2009ZX08009-160B)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0451-55191770, E-mail: wangning@neau.edu.cn

Received: March 8, 2016 Accepted: May 12, 2016

This work was supported by the Domain-Specific Projects for Transgenic Biological Breeding (Grant No.2014ZX08009-002, 2009ZX08009-160B)

*Corresponding author. Tel: +86-451-55191770, E-mail: wangning@neau.edu.cn

网络出版时间: 2016-06-30 15:22:38 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160630.1522.004.html>

Apoptosis Detection kits were used to investigate their effects on the proliferation and apoptosis of HaCAT cells. The results of tissue expression profiling showed that the three *NFIB* isoforms (NFIB-1, NFIB-2 and NFIB-3) were expressed in various sheep tissues including skin, fat, kidney, and their tissue expression patterns were different in different tissues. The results of CCK-8 assay showed that compared with the empty vector, NFIB-1 overexpression promoted cell proliferation ($P < 0.01$); NFIB-2 had no obvious effect on cell proliferation, and NFIB-3 inhibited cell proliferation ($P < 0.01$). The Cell Death Detection ELISA and Annexin V-FITC Apoptosis assays showed that overexpression of any one of the three NFIB isoforms could induce HaCAT cell apoptosis to some extent. By comparison, NFIB-1 and NFIB-3 were more potent to induce apoptosis than NFIB-2 ($P < 0.01$). However, there was no significant difference in promoting apoptosis of HaCAT cells between NFIB-1 and NFIB-3. These results suggested that the three different sheep NFIB isoforms played different roles in cell proliferation and apoptosis.

Keywords sheep NFIB; protein isoform; cell proliferation; cell apoptosis

核因子I/B(nuclear factor I/B, NFIB)是一个CCAAT盒子结合蛋白,属于转录因子核因子I(nuclear factor I, NFI)家族,NFI家族包括4个成员,分别为NFIA、NFIB、NFIC和NFIK。NFI家族成员的N-端220个氨基酸高度保守,该区域主要是DNA结合和二聚化结构域;C-端是转录激活结构域,该区域富含脯氨酸,序列的保守性较低,这是造成该家族成员功能差异的主要原因^[1-3]。NFI家族各成员的表达模式独特,各成员的组织表达往往存在重叠现象。基因敲除实验证明,NFI家族成员NFIA、NFIB和NFIK在大脑的生长发育中发挥重要作用^[4-8]。敲除NFIA或者NFIB会导致妊娠晚期小鼠神经发育的缺陷,表现为胼胝体发育不全并且偏小,神经胶质细胞的数量减少,胶原纤维酸性蛋白的表达降低5~10倍^[4,9-10]。

NFI家族转录因子的特异性DNA结合序列为TTG GC(N5) GCC AA^[11-12]。NFI家族转录因子的结合序列在基因组中分布很广,目前实验已鉴定出100多个基因的启动子、增强子以及沉默子等区域存在其结合序列^[13]。突变分析证实,NFI家族转录因子对这100多个基因中的大多数基因具有重要的调控作用^[14]。例如,已证实NFIB可结合到*Ezh2*(enhancer of zeste homolog 2)基因的启动子区,抑制*Ezh2*的转录,从而调控小鼠胚胎期神经前体细胞的分化,进而影响小鼠胚胎期外皮的生长发育^[15]。

NFIB是NFI家族中的一员,在细胞增殖、分化、凋亡及组织发育中发挥广泛而重要的作用^[16-19]。NFIB基因在小鼠的肺、肝、心、神经等多种组织中存在高度表达^[5],它能够调控肺部多个基因的表达^[4,20]。研究发现,NFIB基因敲除型小鼠在胚胎期18.5 d时肺部细胞增殖标记基因PCNA(proliferating

cell nuclear antigen)、Ki67(nuclear-associated antigen Ki67)、PHH3(phosphohistone H3)的表达量都明显高于野生型小鼠。BrdU染色结果显示,NFIB基因敲除型小鼠肺部的阳性细胞数也多于野生型小鼠,这些数据都提示,敲除NFIB基因可以促进细胞增殖^[16]。NFIB基因敲除小鼠出生后15 min内出现发绀并死亡,原因是由于小鼠肺部细胞分化不完全,肺表皮及肺间质细胞形态异常,小鼠呼吸异常,最终导致死亡^[7,21]。干扰小鼠NFIB基因的表达,会导致端脑和脊髓细胞的有丝分裂后期出现缺陷^[8,22-23]。在小鼠毛囊发育过程中,NFIB促进黑色素干细胞的自我更新和分化^[21]。干扰NFIB基因的表达会显著降低乳腺癌细胞系HCC1954和肺癌细胞系NCI-H446细胞的增殖能力,并促进细胞凋亡^[24-25]。

由于多启动子的使用和mRNA选择性拼接,基因普遍存在多个转录本异构体和蛋白质异构体^[26-27]。多转录本和多蛋白质异构体在基因表达调控和动物生长发育过程中发挥着重要作用^[28-30]。例如,转录因子PAX3在小鼠体内存在的7种蛋白质异构体,它们对细胞增殖、迁移和凋亡存在显著的功能性差异^[31]。目前,已在多种动物中发现,NFI家族成员NFIA、NFIB、NFIC和NFIK的多种类型的转录异构体和蛋白质异构体^[32-33]。研究发现,大鼠NFIB基因存在3个剪接体NFIB-1、NFIB-2和NFIB-3,分别由12、11和9个外显子组成。其中,NFIB-1包含全部的12个外显子,而NFIB-2缺少外显子11,NFIB-3缺少外显子9、10及11^[33]。NCBI数据库显示,人的NFIB基因分别存在4个已被证实的转录本异构体和蛋白质异构体,小鼠NFIB基因也已证实分别有5个转录异构体和蛋白质异构体,但是,NFIB基因的这些蛋白

质异构体之间的功能差异尚未见报道^[14]。

本实验室前期研究发现, 绵羊*NFIB*基因存在3个不同的转录剪接体(JQ348896、JQ348897、JQ348895)^[34], 分别被命名为NFIB-1、NFIB-2和NFIB-3。其中, NFIB-1包含全部完整的8个外显子, 而NFIB-2缺少第7外显子, NFIB-3缺少部分第2外显子。这3个不同的转录剪接体分别编码3个不同的蛋白质异构体, 但是它们的功能差异尚不清楚。本研究开展了羊*NFIB*基因3个转录异构体的组织表达谱分析及其相对应的3个蛋白质异构体对HaCAT细胞增殖和凋亡影响的研究。本研究为进一步深入揭示NFIB蛋白质异构体的功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品 实验用绵羊的各组织样品采自黑龙江省大庆市当地绵羊(德国肉用美利奴羊、东北细毛羊及白头萨福克羊的三元杂交羊)。屠宰后采集绵羊的皮肤组织、脂肪、心、肾、肌肉、胰、肝、骨骼肌、胃、肠和淋巴结共10种组织, 所有组织样置于液氮中冻存备用。所有实验用绵羊均为母羊, 相同条件下饲养, 屠宰时均处于20月龄, 共收集6只绵羊的组织样品。

1.1.2 主要试剂 质粒小量制备试剂盒购自Axygen公司。PureLinkTM RNA Micro Kit、Opti-MEM、Trizol Reagent、Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司。胎牛血清、DMEM-F12购自Gibco公司。FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)、Cell Death Detection ELISA试剂盒购自Roche公司。FITC Annexin V凋亡检测试剂盒购自BD公司。

1.1.3 仪器设备 PCR仪购自Biotetra公司。高速冷冻离心机购自Beckman公司。凝胶成像系统购自UVP公司。Real-time PCR仪购自ABI公司。全自动细胞计数仪购自Invitrogen公司。CO₂细胞培养箱购自Thermo Electron集团。Epoch超微量微孔板分光光度计购自BioTek公司。电泳仪购自上海天能科技有限公司。-20 °C/4 °C冰箱购自海尔集团。生物显微镜购自Leica公司。超净工作台购自上海智城分析仪器制造公司。微量移液器购自德国Eppendorf公司。

1.2 实验方法

1.2.1 组织总RNA的提取及反转录 组织总RNA的提取按照Trizol试剂盒(Invitrogen, Rockville, MD)

说明书操作, 所得总RNA经1%甲醛变性凝胶电泳分析合格后进行反转录。反转录PCR按照Promega Improm-IITM(Promega, Madison, WI, USA)试剂盒说明书两步法进行操作。第一步反应液包含RNA样品1.0 μg、Oligo-dT引物(0.5 μg/μL) 1.0 μL、用核糖核酸酶游离水补至5 μL, 置于70 °C 5 min, 冰浴5 min。第二步反应液总体积为15 μL, 包含ImProm-IITM Buffer 4.0 μL、MgCl₂(25 mmol/L) 2.5 μL、dNTP Mixture(10 mmol/L) 1.0 μL、RNase Inhibitor 0.5 μL、ImProm-IITM Reverse Transcriptase 1.0 μL、核糖核酸酶游离水6.0 μL; 反应条件: 25 °C 5 min, 42 °C 60 min, 70 °C 15 min, 5 °C保温。

1.2.2 基因克隆及表达载体构建 根据全长NFIB基因cDNA(JQ348895)的序列信息, 利用Primer Premier 5设计引物, 上游引物引入*Sal*I酶切位点(F: 5'-GTC GAC CAT GAT GTA TTC TCC CAT CTG TCT C-3'), 下游引物引入*Xho*I酶切位点(R: 5'-TCT CGA GCT AGC CCA GGT ACC AGG ACT GG-3')。以制备的羊组织cDNA为模板, 采用PCR扩增处NFIB的3个转录异构体的全长CDS区序列, 分别由胶回收PCR产物, 酶切后, 插入pCMV-myc Vector(Clontech公司), 获得NFIB的3个异构体表达载体, 分别命名pCMV-myc-NFIB-1、pCMV-myc-NFIB-2和pCMV-myc-NFIB-3。

1.2.3 Real-time PCR检测 根据羊*NFIB*基因3个转录异构体的序列(JQ348896、JQ348897、JQ348895), 利用Primer Premier 5分别设计*NFIB*的3个转录异构体的特异表达检测引物。利用罗氏FastStart Universal SYBR Green Master(Rox)和ABI Prism 7500 sequence detection system进行Real-time PCR分析, 反应采用10 μL体系, 在冰上配制, 反应体系见表1。PCR条件: 50 °C 2 min, 95 °C预变性10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 共40个循环。每个样品设3孔重复。利用2^{-ΔΔC_t}的方法进行计算基因表达量。上述实验均做3次独立重复。

1.2.4 Western blot分析 将HaCAT细胞接种至6孔板中, 待细胞汇合度达70%~80%时, 利用Lipofectamine 2000将NFIB-1、NFIB-2和NFIB-3真核表达载体(pCMV-myc-NFIB-1、pCMV-myc-NFIB-2和pCMV-myc-NFIB-3)及pCMV-myc空载体分别转染HaCAT细胞, 6 h后换液, 48 h后用PBS清洗3次并弃去PBS, 加入RIPA裂解液和蛋白酶抑

表1 实时定量PCR体系
Table 1 Real-time PCR system

试剂组分 Reagent composition	体积 Volume
FastStart Universal SYBR Green Master	5.0 μ L
F (10 μ mol /L)	0.3 μ L
R (10 μ mol /L)	0.3 μ L
cDNA template	1.0 μ L
RNase-free water	3.4 μ L
Total volume	10.0 μ L

制剂PMSF, 其比例为100:1, 混匀后置于冰上裂解细胞30~40 min, 分别获得转染pCMV-myc空载体、NFIB-1、NFIB-2和NFIB-3表达质粒的细胞裂解液。采用10% SDS-PAGE电泳分离蛋白, 电泳完成后采用Mini Trans-Blot系统(BIO-RAD)分离蛋白质, 然后将分离的蛋白质样品转至孔径为0.45 μ m的NC膜, 用含有5%脱脂乳的PBST(含0.05%吐温的PBS)漂洗, 漂洗后室温封闭2 h。然后洗去膜上的封闭液, 将膜孵育在含有一抗的PBST溶液, 4 $^{\circ}$ C过夜。其中GAPDH抗体的稀释度为1:100; myc抗体稀释度为1:500。一抗孵育结束后用PBST洗膜3次, 每次5 min, 然后, 将膜孵育在含辣根过氧化物酶(HRP)标记抗体(稀释度为1:5 000)的PBST溶液中, 置于水平摇床上, 室温孵育1 h。用PBST洗膜3次, 每次5 min, 之后进行常规ECL显色。

1.2.5 细胞培养 HaCAT细胞购买于武汉大学保藏中心, CCTCC编号为: GDC106, 采用完全培养基(D-MEM高糖+10% FBS)进行培养, 置于37 $^{\circ}$ C、CO₂浓度5%、相对湿度90%的细胞培养箱中培养, 每2 d换1次液。

1.2.6 细胞增殖检测 CCK-8(cell counting kit-8)试剂盒中WST-8在电子耦合试剂存在的情况下, 可被线粒体内的脱氢酶还原生成高度水溶性的橙黄色甲臞产物, 颜色深浅与细胞的增殖成正比。具体操作过程如下所示。将HaCAT细胞接种于24孔板上, 接种密度为 5×10^4 /孔(细胞计数器测量细胞个数), 细胞汇合度约30%~40%, 待完全贴壁(4~6 h)后, 将NFIB基因的3个蛋白质异构体的真核表达质粒载体(pCMV-myc-NFIB-1、pCMV-myc-NFIB-2、pCMV-myc-NFIB-3)和空载体(pCMV-myc-Vector)分别转染HaCAT细胞, 转染试剂为Lipofectamine 2000, 质粒质量为0.5 μ g/孔, 转染后细胞培养于Opti-MEM medium中, 4~6 h后换为添加10%胎牛血

清的DMEM培养基。按照CCK-8试剂操作说明, 向24孔板每孔中加入50 μ L CCK-8试剂, CO₂培养箱内继续培养2 h, 选择450 nm波长, 利用酶联免疫检测仪测定各孔的吸光度D值。转染换液后定为0 d, 连续检测2 d、4 d和6 d的细胞吸光度值, 并绘制生长曲线, 细胞培养过程中每2 d换1次液。上述实验均做3次独立重复。

1.2.7 ELISA细胞凋亡检测分析 在凋亡细胞的细胞质中会出现组蛋白联合的DNA片段化(单链及寡聚小体), 使用Cell Death Detection ELISA试剂盒能对此进行分析。具体操作过程如下所示。将HaCAT细胞接种到6孔培养板, 待细胞密度长至80%时, 将3个NFIB异构体的表达质粒(pCMV-myc-NFIB-1、pCMV-myc-NFIB-2和pCMV-myc-NFIB-3)和空载体分别转染细胞, 6 h后弃去培养基, PBS洗后用胰酶消化收集细胞, 计数后接种到96孔培养板, 1×10^4 /孔, 按照Roche的Cell Death Detection ELISA试剂盒检测细胞凋亡。吸光度的检测波长为405 nm, 参考波长为490 nm, 样品吸光度值为 D_{405} 与 D_{490} 的差值。上述实验均独立重复3次。

1.2.8 流式细胞术分析 将HaCAT细胞接种到6孔培养板, 待细胞密度长至70%~80%时, 将3个NFIB异构体的真核表达质粒载体(pCMV-myc-NFIB-1、pCMV-myc-NFIB-2和pCMV-myc-NFIB-3)和空载体(pCMV-myc-Vector)分别转染HaCAT细胞, 6 h后弃去培养基, 换成普通培养基, 培养48 h后收集细胞, 按照BD的FITC Annexin V凋亡试剂盒说明书, 采用流式细胞仪(BD Biosciences)检测细胞凋亡。上述实验均独立重复3次。

1.2.9 数据分析 运用SAS9.2软件(SAS Institute Inc)分析实验数据, 数据统计以mean \pm S.D.表示。样本之间的均数比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

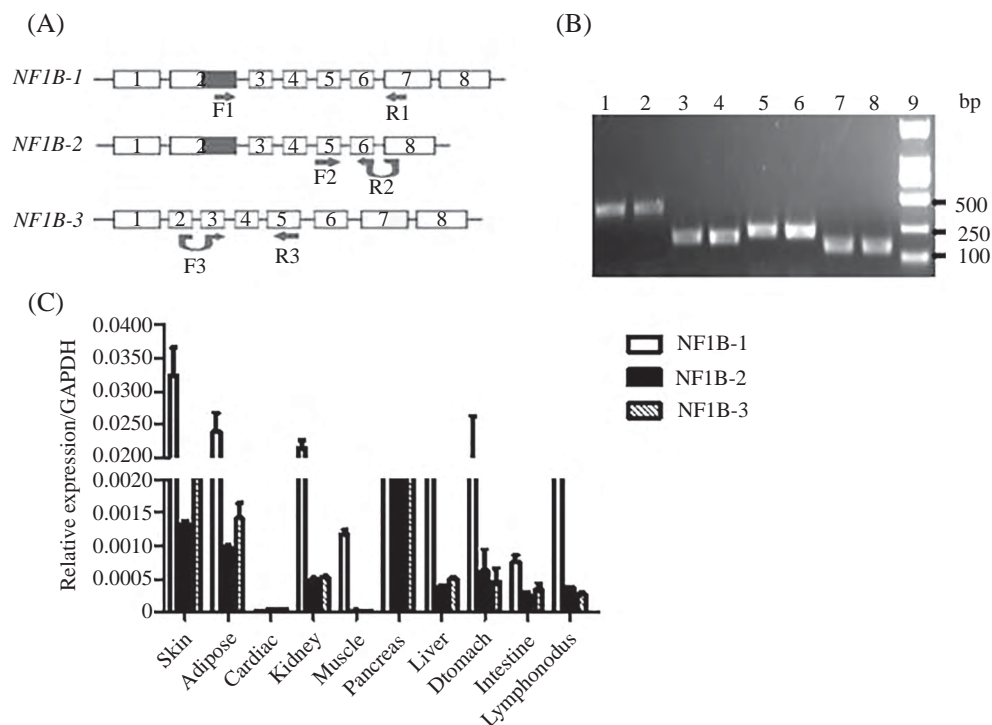
2 结果

2.1 羊NFIB转录异构体的组织表达谱分析

我们前期研究发现, 羊NFIB基因有3个转录异构体(NFIB-1、NFIB-2、NFIB-3), 分别编码3个不同的蛋白质异构体(NFIB-1、NFIB-2及NFIB-3)。其中, NFIB-1转录异构体包含NFIB基因的全部外显子; 而NFIB-2转录异构体缺少第7外显子, NFIB-3转录异构体缺少第2外显子的下游部分序列(图1A)。根据羊NFIB基因3个转录异构体的结构特点, 分别设计这3个转录异构体的特异性表达检测引物(表2和图1A)。NFIB-1的特异性上游引物位于第2外显子, 靠近其3'端, 而下游引物位于第7外显子, 靠近其5'端; NFIB-2的特异性上游引物跨第6和第8外显子, 而下游引物位于第8外显子的3'端上; NFIB-3的特异性上游引物横跨第2和第3外显子, 其下游引物位于第5外显子。

利用这3对NFIB转录异构体的引物进行Real-time PCR扩增, 采用琼脂糖凝胶电泳, 检测这3个NFIB转录异构体的扩增效果和特异性。结果显示, 这3对特异性引物和内参基因GAPDH分别扩增出了预期大小的片段, 且均无杂带(图1B), 对扩增片段进一步做测序分析, 结果与预期完全一致, 说明实验设计的3对引物能够特异性扩增NFIB基因的3个转录异构体。

利用这3对NFIB转录异构体特异性引物开展组织表达谱分析, 结果显示, NFIB基因的3个转录异构体在所检测组织中均有表达, 除了在胰腺中3个转录异构体的表达差异不显著外, 在其余被检测的9种组织中, NFIB-1的表达水平均极显著地高于NFIB-2和NFIB-3($P < 0.01$)(图1C)。NFIB基因3个转录异构体在不同组织中的表达谱不同, 提示它们在不同组织中的作用可能不同。



A: 羊NFIB基因3个转录异构体的表达引物设计模式图。箭头代表引物, 数字框代表外显子。B: 羊NFIB基因3个转录异构体的Real-time PCR分析。1、2泳道: NFIB-1的Real-time PCR产物; 3、4泳道: NFIB-2的Real-time PCR产物; 5、6泳道: NFIB-3的Real-time PCR产物; 7、8泳道: GAPDH基因的RT-PCR产物; 9泳道: Trans2K DNA marker。C: NFIB基因3个蛋白异构体的组织表达谱分析。取6只羊不同组织的材料, 分别提取总RNA, 利用Real-time PCR进行表达分析, GAPDH基因为内参基因。

A: schematic diagram of the locations of the primers used for detection of the three sheep NFIB transcript isoforms. Thick arrows indicate primers; the numbered boxes indicate exons. B: lanes 1 and 2: Real-time PCR products of NFIB-1 transcript; lanes 3 and 4: RT-PCR products of NFIB-2 transcript; lanes 5 and 6: Real-time PCR products of NFIB-3 transcript; lanes 7 and 8: Real-time PCR product of GAPDH gene; lane 9: Trans2K DNA marker. C: sheep tissue expression profiling of the three different NFIB transcript isoforms. The tissue samples were collected from six individual sheep, gene expression was analyzed by Real-time PCR and GAPDH was used as an internal control.

图1 羊NFIB基因3个转录异构体的特异性引物的设计与组织表达谱分析

Fig.1 The transcript-specific primer design and tissue expression profiling of the three sheep NFIB transcript isoforms

2.2 *NFIB*基因3个蛋白质异构体对细胞增殖的影响

为了解*NFIB*基因的3个蛋白质异构体的功能差异,分别扩增*NFIB*基因3个转录异构体的全长CDS,将其插入表达载体pCMV-myc-Vector,获得这3个转录异构体的真核表达载体(pCMV-myc-NFIB-1、pCMV-myc-NFIB-2、pCMV-myc-NFIB-3),测序无误后,将其分别转染HaCAT细胞系,采用Western blot检测3个NFIB蛋白质异构体的表达。结果显示,这3个NFIB蛋白质异构体的真核表达载体均能表达出预期大小的蛋白质分子(图2),表明已成功构建NFIB的3个蛋白质异构体的真核表达载体。此外,利用GFP真核表达质粒转染HaCAT细胞来检测HaCAT细胞的转染效率。显微镜观察显示,转染效率高于50%(图3A),提示可以采用瞬时转染的方法将*NFIB*基因的3个蛋白质异构体的真核表达载体导入细胞来分析比较它们功能的差异。

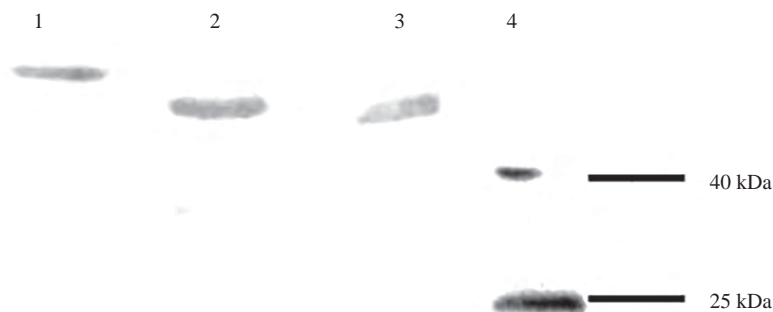
分别将*NFIB*基因的3个蛋白质异构体的真核表达载体(pCMV-myc-NFIB-1、pCMV-myc-NFIB-2、pCMV-myc-NFIB-3)和空载体(pCMV-myc-Vector)转染HaCAT细胞,采用CCK-8试剂盒分析NFIB-1、NFIB-2和NFIB-3对细胞增殖的影响。结果发现,与空载体对照组相比,转染pCMV-myc-NFIB-1组的细胞数量在第6 d时极显著地高于对照组($P<0.01$),pCMV-myc-NFIB-3组的细胞数量在第4 d和第6 d均极显著地低于对照组($P<0.01$),而pCMV-myc-NFIB-2组的细胞数量与对照组相比没有显著差异(图3B)。这些数据说明,NFIB-1促进HaCAT细胞的增殖,NFIB-3却抑制HaCAT细胞增殖,而NFIB-2对细胞增殖没有显著差异。

2.3 3个NFIB蛋白质异构体对细胞凋亡的影响

大量文献已报道*NFIB*与细胞凋亡有关^[40],为了解羊*NFIB*基因的3个蛋白异构体对细胞凋亡的影响,

表2 本研究中用到的PCR引物
Table 2 PCR primers used in this study

引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')	引物长度(bp) Product size (bp)	退火温度(°C) T _m (°C)
NFIB-1-F	TTG GCA TAC TAC GTG CAG GAG C	412	62
NFIB-1-R	TCA TAG TAG TCG GAG AAG ACA TAT CTT GAT		
NFIB-2-F	CGA AAG AGA TCA AGT CAT CTC GAC	182	58
NFIB-2-R	TGG ATG GAT CGT AAG AAG GTA CAT		
NFIB-3-F	CCT GAC CAG AAG GAT TCT GGA CAA	221	61
NFIB-3-R	ACC CCC GAG TTC ATG TCA TGA TAG		
GAPDH-F	CTG ACC TGC CGC CTG GAG AAA	149	59
GAPDH-R	GTA GAA GAG TGA GTG TCG CTG TT		

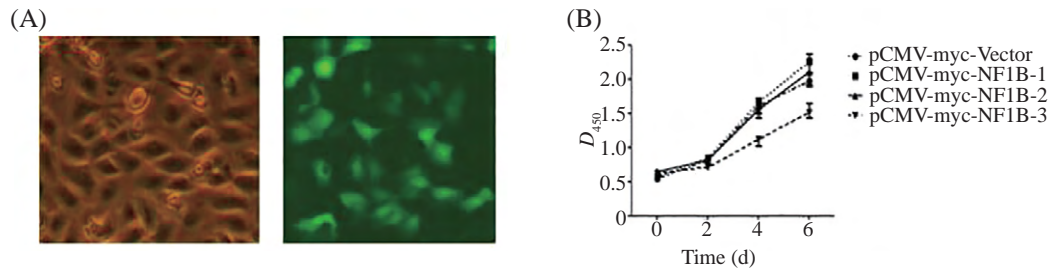


泳道1: 转染NFIB-1的HaCAT细胞裂解液; 泳道2: 转染NFIB-2的HaCAT细胞裂解液; 泳道3: 转染NFIB-3的HaCAT细胞裂解液; 泳道4: 蛋白质标记条带。

Lane 1: lysate of pCMV-myc-NFIB1-transfected HaCAT cells; Lane 2: lysate of pCMV-myc-NFIB 2-transfected HaCAT cells; Lane 3: lysate of pCMV-myc-NFIB3-transfected HaCAT cells; Lane 4: protein marker.

图2 *NFIB*基因3个蛋白质异构体真核表达载体的Western blot鉴定

Fig.2 Identification of the expression of the three different sheep *NFIB* protein isoforms by Western blot analysis with an anti-myc antibody

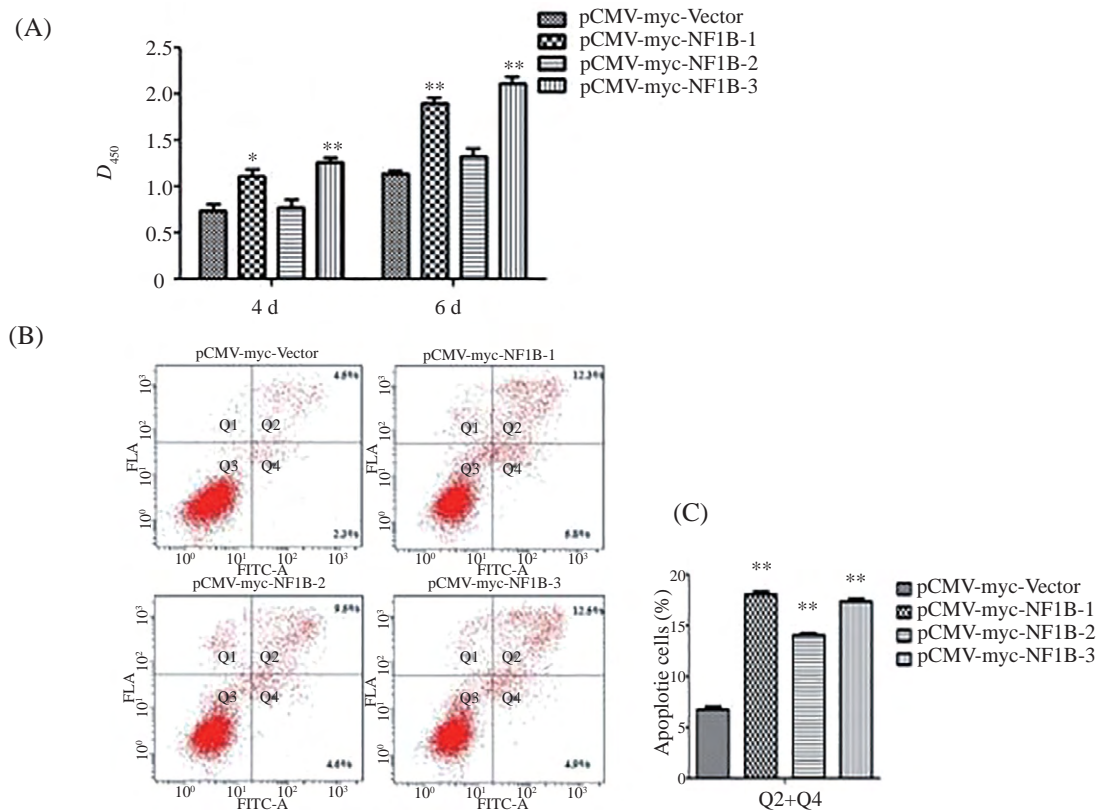


A: HaCAT细胞转染效率的检测。利用GFP表达质粒转染HaCAT细胞, 采用荧光显微镜检测其转染效率(100×)。B: 利用CCK-8检测NFIB基因3个蛋白异构体对HaCAT细胞增殖的影响。

A: detection of transfection efficiency in HaCAT cells. Cells were transfected with a GFP expression plasmid, and the transfection efficiency was examined under fluorescence microscope (100×). B: the effects of overexpression of the three different NFIB isoforms on HaCAT cell proliferation were assayed by CCK-8. The experiments were repeated three times independently.

图3 NFIB基因的3个蛋白异构体对HaCAT细胞增殖的影响

Fig.3 The effects of overexpression of the three different NFIB isoforms on HaCAT cell proliferation



A: 3个NFIB蛋白质异构体对HaCAT细胞凋亡的影响。采用Cell Death Detection ELISA试剂盒分析细胞凋亡, 吸光度值的检测波长为405 nm, 参考波长为490 nm, 样品的吸光度值为 D_{405} 与 D_{490} 的差值。B、C: 采用FITC Annexin V凋亡试剂盒检测细胞凋亡3个NFIB蛋白质异构体对HaCAT细胞凋亡的影响。C是量化分析结果。凋亡率是早、晚期凋亡率细胞之和占总细胞数的百分比。Q1: 坏死细胞; Q2: 晚期凋亡细胞; Q3: 正常细胞; Q4: 早期凋亡细胞。数据是3次独立重复实验数据的平均数, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与pCMV-myc-Vector组比较。

A: the effects of overexpression of the three different NFIB protein isoforms on HaCAT cell apoptosis, the cell death was measured using by Cell Death Detection ELISA kit, and is calculated as absorbance ($D_{405} - D_{490}$). B,C: the effects of overexpression of the three different NFIB protein isoforms on HaCAT cell apoptosis. Cell apoptosis was assayed by FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit. C: quantification of the effects of overexpression of the three different NFIB protein isoforms on HaCAT cell apoptosis. Q1: necrotic cells; Q2: terminal apoptotic cells; Q3: normal cells; Q4: early apoptotic cells. The data were the mean of three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with pCMV-myc-Vector group.

图4 3个NFIB蛋白质异构体对HaCAT细胞凋亡的影响

Fig.4 The effects of overexpression of the three different NFIB protein isoforms on HaCAT cell apoptosis

将NFIB基因的3个蛋白质异构体的真核表达载体 (pCMV-myc-NFIB-1、pCMV-myc-NFIB-2和pCMV-

myc-NFIB-3)和空载体(pCMV-myc-Vector)分别转染 HaCAT细胞, 采用Cell Death Detection ELISA试剂

盒检测3个蛋白异构体对细胞凋亡的影响。结果显示,在转染后的第4 d,与对照相比,NFIB-1过表达组的吸光度值显著高于对照组的吸光度值($P<0.05$),NFIB-3过表达组的吸光度值极显著高于对照组的吸光度值($P<0.01$),但NFIB-2过表达组与对照组之间的吸光度值差异不显著;第6 d时,NFIB-1过表达组的吸光度值极显著高于对照组的吸光度值($P<0.01$);NFIB-3过表达组的吸光度值极显著地高于对照组的吸光度值($P<0.01$);NFIB-3过表达组的吸光度值高于NFIB-1组的吸光度值,是NFIB-1组的吸光度值的1.114倍,但统计学分析差异不显著。NFIB-2过表达组与对照组的吸光度值差异不显著($P>0.05$)(图4A)。这些结果提示,NFIB-2蛋白异构体对细胞凋亡没有明显影响,但是NFIB-1和NFIB-3蛋白异构体均促进细胞凋亡,且NFIB-3促凋亡作用略强于NFIB-1。本研究还采用FITC Annexin V凋亡检测试剂盒,利用流式细胞仪进一步检测NFIB基因的3个蛋白异构体过表达对HaCAT细胞凋亡的影响。结果发现,过表达NFIB-1、NFIB-2和NFIB-3蛋白异构体引起的细胞凋亡率(早期和晚期凋亡细胞之和占总细胞数的比率)分别为18.1%、14.1%和17.4%,与空载体对照组(6.5%)相比,3个蛋白异构体过表达都能引起细胞凋亡($P<0.01$)。另外,NFIB-1和NFIB-3促细胞凋亡作用要显著高于NFIB-2蛋白异构体($P<0.05$),但NFIB-1和NFIB-3的促细胞凋亡作用差异并不显著(图4B和图4C)。

3 讨论

选择性拼接(alternative splicing)是高等生物蛋白质多样性的一个重要原因,它使得一个基因能编码多个蛋白质,而这些蛋白质产物的结构往往不完全相同,致使它们的功能也不完全相同^[35]。选择性拼接是高等生物普遍存在的现象,Modrek等^[35]、Pan等^[36]和Wang等^[37]通过大规模的数据分析发现,在人类基因组中,有90%的基因存在选择性剪接。选择性拼接增加了高等生物基因表达的复杂程度,且它对于高等生物生长发育过程具有重要调控作用^[38];选择性拼接异常会导致疾病的发生和性状的改变。虽然已发现人和小鼠等的NFIB基因存在的多种转录异构体和蛋白质异构体^[33],但NFIB蛋白质异构体的功能差异尚不清楚。本研究发现,羊NFIB基因的3个转录异构体的组织表达谱也不完全相同(图1C);

功能分析显示,这3个蛋白质异构体在HaCAT细胞增殖和凋亡中的作用也不完全相同(图3B、图4A和图4B)。这些结果提示,羊NFIB基因的3个蛋白质异构体的表达调控和功能不完全相同。

人和小鼠等动物NFIB基因的敲除和干扰研究都发现,NFIB与细胞增殖和凋亡有关^[24,39]。本研究发现,羊NFIB基因的3个蛋白质异构体对HaCAT细胞的增殖作用不同,NFIB-2蛋白质异构体对HaCAT细胞的增殖没有明显作用,而NFIB-1蛋白质异构体和NFIB-3蛋白质异构体的作用相反,其中,NFIB-1蛋白异构体极显著地促进HaCAT细胞增殖,NFIB-3蛋白异构体极显著地抑制HaCAT细胞增殖(图3B)。我们前期曾采用相同方法,比较了这3个蛋白异构体对羊胚胎成纤维细胞增殖的影响,其结果与本研究成果一致(未发表)。这些结果提示,NFIB基因的3个蛋白异构体在细胞增殖中发挥不同的调控作用。有报道,NFIB不仅调控增殖,它也对细胞凋亡发挥作用^[24-25]。与文献报道相一致,本研究利用Cell Death Detection ELSA和Annexin V FITC凋亡试剂盒检测均证实,NFIB-1和NFIB-3蛋白质异构体促进细胞凋亡。Cell Death Detection ELISA没有检测出NFIB-2蛋白质异构体具有促进细胞凋亡的作用,但是FITC Annexin V凋亡检测发现,NFIB-2蛋白质异构体也具有促进细胞凋亡的作用,产生这一差异可能是由于两种凋亡检测方法的敏感性不同引起的。

本研究发现,NFIB-1蛋白质异构体既促进HaCAT细胞的增殖又诱导HaCAT细胞凋亡。NFIB-1蛋白质异构体是全长的NFIB,它含有最多的结构域。在线软件The NEW Scansite 3(<http://scansite.mit.edu/>)和NCBI Conserved Domain Search(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析显示,与NFIB-1相比,NFIB-2蛋白异构体缺失部分CTF_NF1结构域,CTF_NF1结构域是富含脯氨酸的转录激活区域;NFIB-3缺失MH1结构域,MH1结构域是一个小的DNA结合域,能直接或者间接结合DNA^[40],该结构域也存在于SMAD家族蛋白质的N-端。有文献报道,结合免疫球蛋白(binding immunoglobulin protein, Bip)既有促进人肝癌细胞系(SMMC-7721)的增殖作用又有诱导该细胞凋亡的作用,全长的Bip具有ATPase功能域和peptide-binding结构域,这2个结构域对细胞增殖和凋亡的作用不同^[41]。推测NFIB-1蛋白质异构体既促进HaCAT细胞的增殖又能诱导

HaCAT细胞凋亡的原因之一可能是它既拥有促进细胞增殖的结构域又拥有诱导细胞凋亡的结构域。另外一个可能的原因是, 作为转录因子, NFIB-1蛋白质异构体既有参与促进细胞增殖的靶基因, 也有参与引起细胞凋亡的靶基因。这样的例子如*c-myc*基因, 许多研究已证实, *c-myc*既能促进细胞增殖又诱导细胞凋亡^[42-43]。NFIB-1蛋白质异构体在HaCAT细胞中既促进细胞增殖又能诱导细胞凋亡的作用机制还需要进一步深入探究。

有研究报道, 干扰NFIB基因可抑制肺癌细胞(NCI-H446)的增殖, 促进细胞凋亡^[24]; 特异性敲除NFIB基因能促进肺间质细胞增殖^[16]。根据我们的研究结果和相关文献报道, 可以看出, NFIB基因的功能是多样性的, 其具体作用可能取决于细胞类型和细胞背景(cellular context)等。

参考文献 (References)

- 1 Nebl G, Cato AC. NFI/X proteins: A class of NFI family of transcription factors with positive and negative regulatory domains. *Cell Mol Biol Res* 1995; 41(2): 85-95.
- 2 Osada S, Daimon S, Ikeda T, Nishihara T, Yano K, Yamasaki M, *et al.* Nuclear factor 1 family proteins bind to the silencer element in the rat glutathione transferase P gene. *J Biochem* 1997; 121(2): 355-63.
- 3 Osada S, Matsubara T, Daimon S, Terazu Y, Xu M, Nishihara T, *et al.* Expression, DNA-binding specificity and transcriptional regulation of nuclear factor 1 family proteins from rat. *Biochem J* 1999; 342(Pt 1): 189-98.
- 4 Steele-Perkins G, Plachez C, Butz KG, Yang G, Bachurski CJ, Kinsman SL, *et al.* The transcription factor gene Nfib is essential for both lung maturation and brain development. *Mol Cell Biol* 2005; 25(2): 685-98.
- 5 Chaudhry AZ, Lyons GE, Gronostajski RM. Expression patterns of the four nuclear factor I genes during mouse embryogenesis indicate a potential role in development. *Dev Dyn* 1997; 208(3): 313-25.
- 6 Robinson GW, Kang K, Yoo KH, Tang Y, Zhu BM, Yamaji D, *et al.* Coregulation of genetic programs by the transcription factors NFIB and STAT5. *Mol Endocrinol* 2014; 28(5): 758-67.
- 7 Gründer A, Ebel TT, Mallo M, Schwarzkopf G, Shimizu T, Sippel AE, *et al.* Nuclear factor I-B (Nfib) deficient mice have severe lung hypoplasia. *Mech Dev* 2002; 112(1/2): 69-77.
- 8 Barry DA, Wissmeier L, Parlange JY, Sander GC, Lockington DA. Comment on "An analytic solution of capillary rise restrained by gravity" by N. Fries and M. Dreyer. *J Colloid Interface Sci* 2009; 338(1): 293-5.
- 9 Shu T, Butz KG, Plachez C, Gronostajski RM, Richards LJ. Abnormal development of forebrain midline glia and commissural projections in Nfia knock-out mice. *J Neurosci* 2003; 23(1): 203-12.
- 10 das Neves L, Duchala CS, Tolentino-Silva F, Haxhiu MA, Colmenares C, Macklin WB, *et al.* Disruption of the murine nuclear factor I-A gene (Nfia) results in perinatal lethality, hydrocephalus, and agenesis of the corpus callosum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(21): 11946-51.
- 11 Goyal N, Knox J, Gronostajski RM. Analysis of multiple forms of nuclear factor I in human and murine cell lines. *Mol Cell Biol* 1990; 10(3): 1041-8.
- 12 Kruse U, Sippel AE. Transcription factor nuclear factor I proteins form stable homo- and heterodimers. *Febs Lett* 1994; 348(1): 46-50.
- 13 Grabowska MM, Elliott AD, de Graff DJ, Anderson PD, Anumanthan G, Yamashita H, *et al.* NFI transcription factors interact with FOXA1 to regulate prostate-specific gene expression. *Mol Endocrinol* 2014; 28(6): 949-64.
- 14 Gronostajski RM. Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. *Gene* 2000; 249(1/2): 31-45.
- 15 Piper M, Barry G, Harvey TJ, McLeay R, Smith AG, Harris L, *et al.* NFIB-mediated repression of the epigenetic factor Ezh2 regulates cortical development. *J Neurosci* 2014; 34(8): 2921-30.
- 16 Hsu YC, Osinski J, Campbell CE, Litwack ED, Wang D, Liu S, *et al.* Mesenchymal nuclear factor I B regulates cell proliferation and epithelial differentiation during lung maturation. *Dev Biol* 2011; 354(2): 242-52.
- 17 de Jong RN, van der Vliet PC. Mechanism of DNA replication in eukaryotic cells: Cellular host factors stimulating adenovirus DNA replication. *Gene* 1999; 236(1): 1-12.
- 18 Gründer A, Qian F, Ebel TT, Mincheva A, Lichter P, Kruse U, *et al.* Genomic organization, splice products and mouse chromosomal localization of genes for transcription factor nuclearfactor one. *Gene* 2003; 304: 171-81.
- 19 Mellas RE, Kim H, Osinski J, Sadibasic S, Gronostajski RM, Cho M, *et al.* NFIB regulates embryonic development of submandibular glands. *J Dent Res* 2015; 94(2): 312-9.
- 20 Santoro C, Mermod N, Andrews PC, Tjian R. A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: Cloning and expression of multiple cDNAs. *Nature* 1988; 334(6179): 218-24.
- 21 Chang CY, Pasolli HA, Giannopoulou EG, Guasch G, Gronostajski RM, Elemento O, *et al.* NFIB is a governor of epithelial-melanocyte stem cell behaviour in a shared niche. *Nature* 2013; 495(7439): 98-102.
- 22 Hurley JH, Ren X. The circuitry of cargo flux in the ESCRT pathway. *J Cell Biol* 2009; 185(2): 185-7.
- 23 Deneen B, Ho R, Lukaszewicz A, Hochstim CJ, Gronostajski RM, Anderson DJ. The transcription factor NFIA controls the onset of gliogenesis in the developing spinal cord. *Neuron* 2006; 52(6): 953-68.
- 24 Moon HG, Hwang KT, Kim JA, Kim HS, Lee MJ, Jung EM, *et al.* NFIB is a potential target for estrogen receptor-negative breast cancers. *Mol Oncol* 2011; 5(6): 538-44.
- 25 Dooley AL, Winslow MM, Chiang DY, Banerji S, Stransky N, Dayton TL, *et al.* Nuclear factor I/B is an oncogene in small cell lung cancer. *Genes Dev* 2011; 25(14): 1470-5.
- 26 Faycal CA, Gazeri S, Eymin B. RNA splicing, cell signaling, and response to therapies. *Curr Opin Oncol* 2016; 28(1): 58-64.
- 27 Lin JC. Impacts of alternative splicing events on the differentiation of adipocytes. *Int J Mol Sci* 2015; 16(9): 22169-89.

- 28 Sveen A, Kilpinen S, Ruusulehto A, Lothe RA, Skotheim RI. Aberrant RNA splicing in cancer; expression changes and driver mutations of splicing factor genes. *Oncogene* 2015; 35(19): 2413-27.
- 29 Lowen M, Scott G, Zwollo P. Functional analyses of two alternative isoforms of the transcription factor Pax-5. *J Biol Chem* 2001; 276(45): 42565-74.
- 30 Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, Ogawa S, Katsumata T, Yamaguchi A. *et al.* Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 1999; 274(11): 6972-8.
- 31 Wang Q, Kumar S, Slevin M, Kumar P. Functional analysis of alternative isoforms of the transcription factor PAX3 in melanocytes *in vitro*. *Cancer Res* 2006; 66(17): 8574-80.
- 32 Kruse U, Sippel AE. The genes for transcription factor nuclear factor I give rise to corresponding splice variants between vertebrate species. *J Molecul Biol* 1994; 238(5): 860-5.
- 33 Osada S, Imagawa M, Nishihara T. Organization of gene structure and expression of nuclear factor 1 family in rat. *DNA Seq* 2005; 16(2): 151-5.
- 34 荣恩光, 于磊, 杨华, 张永胜, 马春萍, 李辉. 中国美利奴羊(新疆军垦型)核因子I/B基因的克隆及表达. *中国农业科学* (Rong Enguang, Yu Lie, Yang Hua, Zhang Yongsheng, Ma Chunping, Li Hui. Characterization of tissue expression and cloning of nuclear gactor I/B gene in Chinese merino [Xinjiang Junken Type] *Scientia Agricultura Sinica*) 2012; 21: 4475-83.
- 35 Modrek B, Lee C. A genomic view of alternative splicing. *Nature Genetics* 2002; 30: 13-9.
- 36 Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet* 2008; 40(12): 1413-5.
- 37 Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, Mayr C, *et al.* Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 2008. 456(7221): 470-6.
- 38 邵伟, 樊玉杰, 徐永镇. SR蛋白家族在RNA剪接中的调控作用. *生命科学* (Shao Wei, Fan Yujie, Xu Yongzhen, Function of SR protein family in pre-mRNA splicing. *Chinese Bulletin of Life Sciences*) 2010; 22(7): 710-6.
- 39 Zhang Q, Cao LY, Cheng SJ, Zhang AM, Jin XS, Li Y. p53-induced microRNA-1246 inhibits the cell growth of human hepatocellular carcinoma cells by targeting NFIB. *Oncol Rep* 2015. 33(3): 1335-41.
- 40 陈兵, 易斌, 鲁开智. Smad蛋白家族调控细胞分化的研究进展. *医学研究生学报* (Chen Bing, Yi Bin, Lu Kaizhi. Advances in researches on Smad proteins in cell differentiation. *J Med Postgra*) 2013; 26(5): 544-7.
- 41 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* (Li Xiangzhu, Liu Yanna, Zhao Wenjun, Zhou Jinghua, Guo Fengjin, Analysis on molecular chaperone Bip domain and influence on proliferation and apoptosis in hepatoma cells. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2011; 33(11): 1204-12.
- 42 Topham C, Tighe A, Ly P, Bennett A, Sloss O, Nelson L. *et al.* MYC Is a major determinant of mitotic cell fate. *Cancer Cell* 2015; 28(1): 129-40.
- 43 McMahon SB. MYC and the control of apoptosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014; 4(7): a014407.