

· 基础研究 ·

人鸟苷酸结合蛋白 5 基因启动子核心调控区域的鉴定及其转录活性分析

叶婷^{1,2}, 杨康^{1,2}, 王田甜³, 廖玉娇⁴, 杜文倩⁴, 黄敏⁴, 蒋佩文^{1,2}, 李敏惠², 杨平^{1,5}

1. 成都医学院基础医学院, 四川 成都 610500; 2. 成都医学院科研实验中心, 四川 成都 610500;

3. 成都医学院生物科学与技术学院, 四川 成都 610500; 4. 成都医学院药学院,

四川 成都 610500; 5. 成都医学院教务处, 四川 成都 610500

摘要: **目的** 构建人鸟苷酸结合蛋白 5 (guanylate binding protein 5, *GBP5*) 基因启动子不同长度截短片段的荧光素酶报告基因质粒, 通过分析启动子不同截短片段的转录活性, 确定其核心调控区域。 **方法** PCR 扩增 *GBP5* 基因启动子序列, 将启动子序列截短为 5 个不同长度的片段, 连接至载体 pGL3-basic, 构建重组质粒 pGL3-*GBP5*-11 / 21 / 31 / 41 / 51。将各重组质粒转染至 293FT 细胞, 检测荧光素酶活性; 利用 JASPAR 软件预测 *GBP5* 启动子区域的转录因子结合位点, 依据预测结果选取靶向核心调控区域的阴阳转录因子 1 (Yin-Yang transcription factor 1, YY1) 进行转录调控活性验证; PCR 扩增 *YY1* 的 CDS 序列, 构建过表达质粒 pIRES2-EGFP-*YY1*; 将 pIRES2-EGFP-*YY1*、pGL3-*GBP5*-21 (-1 623 ~ +47 bp) 质粒与内参质粒 pRL-CMV 共转染至 293FT 细胞, 检测荧光素酶活性, 分析转录因子 YY1 对 *GBP5* 启动子活性的调控作用。 **结果** 菌落 PCR、双酶切鉴定证明人 *GBP5* 基因启动子报告基因质粒构建正确; JASPAR 软件预测 *GBP5* 启动子区域存在 STAT1、YY1、Foxp3 等多个转录因子结合位点; 双荧光素酶活性检测结果显示, pGL3-*GBP5*-21 (-1 623 ~ +47 bp) 启动子活性最高, 而 pGL3-*GBP5*-41 (-520 ~ +47 bp) 启动子活性明显降低, 提示 *GBP5* 启动子核心区域位于 5'UTR 上游 -1 623 ~ -520 bp 区域; 过表达 *YY1* 能明显激活 *GBP5* 启动子活性, 调控 *GBP5* 表达。 **结论** 人 *GBP5* 基因启动子的核心调控区域位于 *GBP5* 启动子 5'UTR 上游 -1 623 ~ -520 bp 区域, 该区域存在转录因子 YY1 结合位点, *YY1* 过表达能显著影响 *GBP5* 启动子活性。

关键词: 鸟苷酸结合蛋白 5; 启动子; 荧光素酶报告基因; 阴阳转录因子 1

中图分类号: R34 文献标识码: A 文章编号: 1004-5503(2023)02-0138-07

Identification and transcriptional activity analysis of core regulatory region of human guanylate binding protein 5 gene promoter

YE Ting*, YANG Kang, WANG Tian-tian, LIAO Yu-jiao, DU Wen-qian, HUANG Min, JIANG Pei-wen, LI Min-hui, YANG Ping

*School of Basic Medicine, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, Sichuan Province, China

Corresponding author: YANG Ping, E-mail: 920192655@qq.com;

LI Min-hui, E-mail: liminhui@cmc.edu.cn

Abstract: **Objective** To construct luciferase reporter plasmids of truncated fragments of different lengths of human guanylate binding protein 5 (*GBP5*) gene promoter and analyze the transcriptional activity of each fragment to determine the core regulatory region. **Methods** *GBP5* promoter sequence was amplified by PCR, truncated into five fragments of different lengths and connected to pGL3-basic plasmid. The constructed recombinant plasmids pGL3-*GBP5*-11 / 21 / 31 / 41 / 51 were transfected into 293FT cells and detected for luciferase activity. The binding sites of transcription factors in *GBP5* promoter region were predicted by JASPAR software, and Yin-Yang transcription factor 1 (YY1) targeting the core regulatory region was selected and verified for the transcriptional regulatory activity. The CDS sequence of *YY1* was amplified by

基金项目: 四川省科技厅项目(2022NSFSC0690, 23NSFSC1243); 四川省发育与再生重点实验室开放项目(SYS20-06); 国家级大学生创新创业项目(202213705004, 202213705001)。

通信作者: 杨平, E-mail: 920192655@qq.com; 李敏惠, E-mail: liminhui@cmc.edu.cn

PCR to construct the overexpression plasmid pIRES2-EGFP-YY1, which was then co-transfected to 293FT cells with plasmids pGL3-GBP5-21 (-1 623 ~ +47 bp) and internal reference plasmid pRL-CMV, and detected for luciferase activity to analyze the regulation of transcription factor YY1 on GBP5 promoter activity. **Results** Colony PCR and double enzyme digestion identification proved that the plasmid of human GBP5 promoter reporter gene was correctly constructed; JASPAR software predicted that there were multiple transcription factor binding sites such as STAT1, YY1 and Foxp3 in GBP5 promoter region. Double luciferase activity assay showed that pGL3-GBP5-21 (-1 623 ~ +47 bp) showed the highest promoter activity, while the promoter activity of pGL3-GBP5-41 (-520 ~ +47 bp) decreased significantly, suggesting that the core region of GBP5 promoter was located at upstream -1 623 ~ -520 bp of 5'UTR; Overexpression of YY1 significantly activated the GBP5 promoter activity and regulated the expression of GBP5. **Conclusion** The core regulatory region of human GBP5 promoter was located in upstream -1 623 ~ -520 bp of the 5'UTR, with a binding site of transcription factor YY1 existing in this region. Meanwhile, overexpression of YY1 significantly effected the activity of GBP5 promoter.

Keywords: Guanylate binding protein 5 (GBP5); Promoter; Luciferase reporter gene; Yin-Yang transcription factor 1 (YY1)

鸟苷酸结合蛋白(guanylate binding protein, GBP)是干扰素刺激基因(interferon stimulate gene, ISG)之一^[1]。人 GBP 家族有 7 个成员:GBP1 ~ 7, 具有多种生物学功能^[2]。研究显示,GBP5 在病原菌引起的炎症反应中起重要作用^[3]。感染后,机体可通过调控 GBP5 的表达,激活 Caspase-1 / 11 依赖的细胞炎症反应,启动抗感染固有免疫应答^[4-6]。同时,GBP5 还具有广谱的抗病毒能力。甲型流感病毒感染宿主细胞后,机体可通过激活转录因子 NF- κ B 调控 GBP5 启动子活性,诱导 GBP5 表达进而发挥其抗病毒生物学效应^[7]。基因的表达是一个涵盖 mRNA 转录、转录后修饰、蛋白质翻译等的复杂过程,而转录因子的调控机制是其中重要环节。目前关于 GBP5 启动子核心区域的定位和相关转录因子的调控机制尚不清晰。基于此,本研究通过构建人 GBP5 启动子荧光素酶报告基因质粒,确定 GBP5 启动子核心区域,筛选出可能调控其启动子活性的转录因子,为进一步探究 GBP5 的生物学功能奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞及质粒 人胚胎肾上皮细胞 293FT 购自美国 Invitrogen 公司;质粒 pGL3-Basic、pGL3-Control 及海肾荧光素酶质粒 pRL-CMV 购自美国 Promega 公司;pIRES2-EGFP 质粒购自南京擎科生物公司。

1.2 主要试剂及仪器 胎牛血清、Opti-MEM 培养基、DMEM 基础培养基购自美国 Gibco 公司;细胞基因组 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、无内毒素小剂量质粒 DNA 提取试剂盒、细胞总 RNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;LipoD293 转染试剂购自美国 SignaGen 公司;E. coli DH5 α 、氨苄青霉素购自生工生物工程(上海)股份有限公司;PCR 反转录及扩增试剂盒、DL15000 和

DL2000 DNA marker、限制性内切酶 Hind III、BamH I 和 Xho I 以及 T4 DNA Ligase 购自日本 TaKaRa 公司;双荧光素酶检测试剂盒购自美国 Promega 公司;蛋白提取裂解液、蛋白酶抑制剂、BCA 蛋白定量试剂盒购自中国 Transgene 公司;兔抗人 GBP5、GAPDH 单克隆抗体以及 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 购自美国 CST 公司;PVDF 膜、ECL 显色液购自美国 Millipore 公司;Universal ProbeLibrary Set(Human Probes #1-#90)(Cat. No. 04683633001)购自美国 Roche 公司;全波长酶标仪(VICTOR-X)购自美国 PerkinElmer 公司;实时定量 PCR 仪(CFX96)购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 生物信息学分析 通过 NCBI 数据库查询获得人 GBP5(ID:115362)基因组全长序列,选取 GBP5 基因 5'UTR 区域上游 2 042 bp(-1 995 ~ +47 bp)启动子序列,利用在线网站 JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>)对 GBP5 启动子区域转录因子结合位点进行预测分析。

1.4 目的基因序列的扩增 使用 Primer 5 软件设计引物,引物序列见表 1,引物由南京擎科生物科技有限公司合成。以提取的 293FT 细胞基因组 DNA 为模板,PCR 扩增获得不同长度的 GBP5 启动子片段和 YY1 基因序列,用凝胶回收试剂盒纯化扩增产物。

1.5 人 GBP5 启动子序列重组质粒的构建 利用限制性内切酶 Hind III 和 Xho I 对 pGL3-basic 质粒和目的序列进行双酶切,用 T4 连接酶将目的序列与质粒 DNA 按摩尔比 5 : 1 16 °C 连接过夜,连接产物转化 E. coli DH5 α ,涂布含 100 μ g / mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板,37 °C 恒温培养箱倒置培养 16 h;挑取单个阳性克隆进行菌落 PCR 鉴定。将鉴定正确的质粒转至含 100 μ g / mL 氨苄青霉素的液体培养基中,37 °C 摇菌 12 h;用无内毒素质粒 DNA 提取试剂盒提取质粒,并送至南京擎科生物科技有限公司测序。

表 1 GBP5 不同启动子片段 PCR 引物信息

Tab. 1 Primer sequences of different promoter fragments of GBP5 for PCR

引物	序列(5'→3')	扩增片段大小(bp)	酶切位点(斜体部分)
GBP5-11-L	<u>CCGCTCGAGT</u> ACTGAACCTACTGCGAAAG	2 042	Xho I
GBP5-11-R	CCCAAGCTTAAGAGTCAAAGAACAAGG		Hind III
GBP5-21-L	<u>CCGCTCGAGT</u> TGTTCTATTTCTTACA	1 671	Xho I
GBP5-21-R	CCCAAGCTTAAGAGTCAAAGAACAAGG		Hind III
GBP5-31-L	<u>CCGCTCGAGT</u> ACCTCTTCTCCGATTT	1 180	Xho I
GBP5-31-R	CCCAAGCTTAAGAGTCAAAGAACAAGG		Hind III
GBP5-41-L	<u>CCGCTCGAGC</u> CAAGGACCGAGGAGTGCCA	567	Xho I
GBP5-41-R	CCCAAGCTTAAGAGTCAAAGAACAAGG		Hind III
GBP5-51-L	<u>CCGCTCGAGC</u> CTGTCAAACAGACCA	166	Xho I
GBP5-51-R	CCCAAGCTTAAGAGTCAAAGAACAAGG		Hind III
YY1-L	<u>CCGCTCGAG</u> ATGGCCTCGGCGACACCTT	1 245	Xho I
YY1-R	CCCAAGCTTCACTGTTCTTTTGGC		Hind III

注:下划线部分为添加的保护碱基。

1.6 YY1过表达质粒的构建 用限制性内切酶Hind III和Xho I双酶切目的基因和pIRES2-EGFP质粒,用T4 DNA连接酶连接构建YY1过表达质粒pIRES2-EGFP-YY1,方法同1.5项,经菌落PCR及双酶切鉴定后,提取质粒备用。

1.7 细胞转染 采用LipoD293试剂,具体方法参考试剂说明书进行。提前18~24 h将对数生长期的293FT细胞接种至96孔板中, 2×10^4 个/孔,转染前30~60 min更换新鲜的完全培养基。每组设3个重复孔,按10:1的比例共转染各重组质粒和内参质粒pRL-CMV,同时设阳性对照和阴性对照组,分别以相同的转染比例共转染包含SV40启动子和增强子序列的阳性对照质粒pGL3-Control和缺少真核启动子和增强子序列的阴性对照质粒pGL3-Basic。

提前18~24 h将对数生长期的293FT细胞接种至12孔板中, 3×10^5 个/孔,转染前30~60 min更换为新鲜的完全培养基,用LipoD293试剂将YY1过表达质粒转染至293FT细胞,设转染pIRES2-EGFP空载体质粒的对照组,48 h后观察荧光表达情况。RT-qPCR法检测过表达质粒转染后细胞中YY1 mRNA转录水平。使用Roche在线网站(roche.com)设计引物,引物序列见表2,引物由南京擎科生物科技有限公司合成。采用Taqman探针法,进行qPCR。反应条件为:95 °C 10 min;95 °C 10 s,60 °C 30 s,72 °C 10 s,共40个循环。以GAPDH的表达水平为标准进行相对定量,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析YY1基因的表达倍数变化。

1.8 双荧光素酶活性检测 将重组质粒和对照质粒(pGL3-Basic、pGL3-Control)分别与内参质粒pRL-CMV共转染至293FT细胞72 h后,检测荧光素酶活

性。用全波长酶标仪检测萤火虫荧光素酶(A_{560})和海肾荧光素酶(A_{465})活性,分析启动子不同截短片段的转录活性。

表 2 RT-qPCR 引物序列及探针号

Tab. 2 Primer sequences and probe numbers of RT-qPCR

基因	序列(5'→3')
YY1-L	TGGAGAGAACTCACCTCCTGA
YY1-R	TCTTTAATTTTTCTTGGCTTCATTC
YY1 probe	79#
GAPDH-L	CCGCTCGAGTTGTTTCTATTTCTACA
GAPDH-R	CCCAAGCTTAAGAGTCAAAGAACAAGG
GAPDH probe	9#

1.9 GBP5蛋白表达的检测 采用Western blot法。用LipoD293试剂进行YY1过表达质粒转染,提前将对数生长期的293FT细胞接种至6孔板中, 6×10^5 个/孔,转染前30~60 min更换为新鲜的完全培养基,转染48 h后,提取细胞总蛋白,BCA法定量蛋白质浓度。取等量(50 μg)蛋白,经12% SDS-PAGE分离后,转印至0.45 μm PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭2 h;加入兔抗人GBP5、GAPDH单克隆抗体(均1:1 000稀释),4 °C孵育过夜;TBST洗涤3次,加入HRP标记的山羊抗兔IgG(1:1 000稀释),室温孵育2 h;ECL试剂盒显色,化学发光仪曝光成像。使用Image Lab软件进行图像分析,以GAPDH为内参。

1.10 统计学分析 所有试验均独立重复3次,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用GraphPad Prism 7软件进行统计学分析,多组与对照组的比较采用Dunnnett检验和One-way ANOVA检验,两组间比

较采用非配对 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

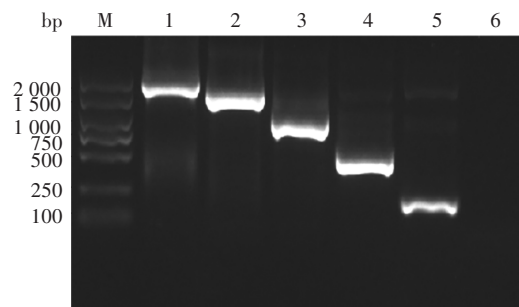
2 结果

2.1 GBP5 启动子区域转录因子结合位点预测分析
通过 NCBI 数据库查询获得人 *GBP5* (ID: 115362) 基因组全长序列,选取 *GBP5* 基因 5'UTR 区域上游 2 042 bp (-1 995 ~ +47 bp) 启动子序列;JASPAR 在线软件预测结果显示,*GBP5* 启动子区域有多个转录因子结合位点,其中 YY1、STAT1 和 FOXP3 的预测评分排序靠前(系统评分值均大于 5),见表 3。

2.2 GBP5 启动子各截短片段重组质粒的鉴定 *GBP5* 启动子不同截短片段 PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析,分别可见 2 042、1 671、1 180、567 和 166 bp 的特异性条带,大小与预期相符,见图 1。双酶切重组质粒质粒 pGL3-*GBP5*-11、pGL3-*GBP5*-21、pGL3-*GBP5*-31、pGL3-*GBP5*-41、pGL3-*GBP5*-51 后,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析,各亚克隆片段大小正确,见图 2。鉴定正确的质粒测序结果经 BLAST 比对,插入片段与设计序列同源性达 100%。以上结果表明重组质粒构建正确。

2.3 GBP5 启动子活性双荧光素酶活性 结果显示,*GBP5* 启动子各质粒的荧光素酶活性均高于阴性对照组,均具有启动子活性。相比阴性对照组,质粒 pGL3-*GBP5*-21 启动子活性最高,而 pGL3-*GBP5*-41 显著降低,差异均有统计学意义(t 分别为 67.59 和 27.84, P 均 < 0.05),见图 3。表明 *GBP5* 基因核心启动子区域为 5'UTR 上游 -1 623 ~ -520 bp,当截短 *GBP5* 启动子 -1 061 ~ -520 bp 区域(转录因子 YY1 结合位点)后,启动子活性明显降低,提示在该区域的 YY1

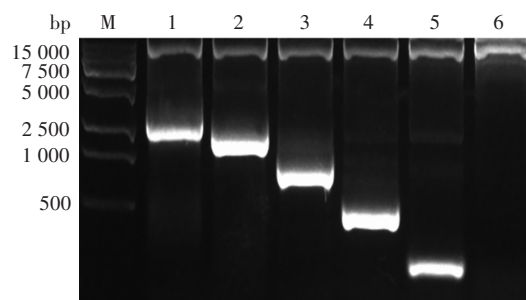
结合位点可能会显著影响 *GBP5* 启动子的活性。



M: DNA marker DL2000; 1 ~ 5: 分别为 2 042、1 671、1 180、567 和 166 bp 的截短片段; 6: 阴性对照。

图 1 *GBP5* 启动子截短片段 PCR 产物电泳图

Fig. 1 Electrophoretic profile of PCR products of *GBP5* promoter truncated fragments



M: DNA marker DL15000; 1 ~ 5: 分别为质粒 pGL3-*GBP5*-11、pGL3-*GBP5*-21、pGL3-*GBP5*-31、pGL3-*GBP5*-41 和 pGL3-*GBP5*-51 双酶切产物; 6: 质粒 pGL3-basic。

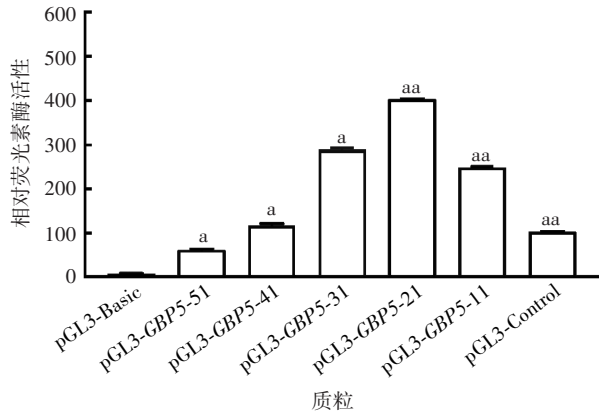
图 2 *GBP5* 启动子各片段重组质粒的双酶切(Hind III / Xho I)鉴定

Fig. 2 Restriction map of recombinant plasmids of *GBP5* promoter fragments (Hind III / Xho I)

表 3 JASPAR 软件转录因子预测结果

Tab. 3 Prediction result of transcription factor by JASPAR

编号	转录因子	评分	起始位点	终止位点	预测序列
MA0137.2	STAT1	7.467 05	191	205	CTCTTCTAGTAACAA
MA0137.3	STAT1	9.108 17	193	203	CTTCTAGTAAC
MA0095.1	YY1	6.224 86	423	428	TCCATA
MA0095.1	YY1	7.219 34	701	706	GCCATT
MA0095.1	YY1	7.027 48	752	757	ACCATG
MA0095.2	YY1	6.322 34	811	822	CAGGATGGTCTA
MA0095.1	YY1	7.219 34	1 353	1 358	GCCATG
MA0095.1	YY1	7.219 34	1 398	1 403	GCCATG
MA0095.1	YY1	6.399 62	1 464	1 469	CCCATC
MA0095.1	YY1	6.224 86	1 468	1 473	TCCATG
MA0850.1	FOXP3	8.977 18	1 620	1 626	GTAAATA
MA0850.1	FOXP3	8.977 18	1 780	1 786	GTAAATA
MA0850.1	FOXP3	11.300 40	1 858	1 864	GTAAACA



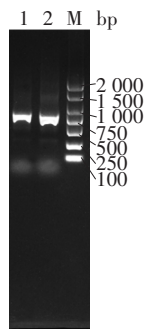
注:与阴性对照组相比,a表示 $P < 0.05$;aa表示 $P < 0.01$ 。

图 3 GBP5 启动子双荧光素酶活性检测

Fig. 3 Double luciferase activity assay of GBP5 promoter

2.4 转录因子 YY1 对 GBP5 启动子活性的影响

2.4.1 YY1 过表达质粒的鉴定 PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析,可见 1 245 bp 的特异性条带,大小与预期相符,见图 4。质粒 pIRES2-EGFP-YY1 的双酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,可见 1 245 bp 的目的基因片段和 5 260 bp 的载体片段,大小均与预期相符,见图 5。



1,2:目的基因扩增产物;M:DNA marker DL2000。

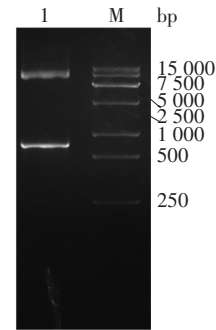
图 4 YY1 的 CDS 序列 PCR 产物电泳图

Fig. 4 Electrophoretic profile of PCR product of YY1 CDS sequence

2.4.2 YY1 过表达质粒的鉴定 RT-qPCR 结果显示,与对照组相比,质粒 pIRES2-EGFP-YY1 转染组细胞 YY1 基因 mRNA 转录水平升高约 20 000 倍,差异有统计学意义($t = 69.39, df = 2, P < 0.001$),表明质粒成功转染 293FT 细胞并过表达目的基因。倒置荧光显微镜下观察可见明显荧光表达,见图 6。表明 YY1 瞬时过表达质粒构建成功。

2.4.3 YY1 过表达质粒对 GBP5 启动子活性及其蛋白表达的影响 双荧光素酶活性分析结果显示,与 pGL3-GBP5-21 组比较,过表达 YY1 可显著激活 GBP5 启动子活性,差异有统计学意义($t = 19.95, df = 2,$

$P < 0.001$),见图 7。Western blot 分析显示,过表达 YY1 可上调 GBP5 蛋白表达水平,见图 8。表明 YY1 是调控 GBP5 表达的潜在转录因子。



1:pIRES2-EGFP-YY1 质粒双酶切产物;M:DNA marker DL15000。

图 5 质粒 pIRES2-EGFP-YY1 的双酶切(Hind III / Xho I) 鉴定

Fig. 5 Restriction map of plasmid pIRES2 - EGFP - YY1 (Hind III / Xho I)

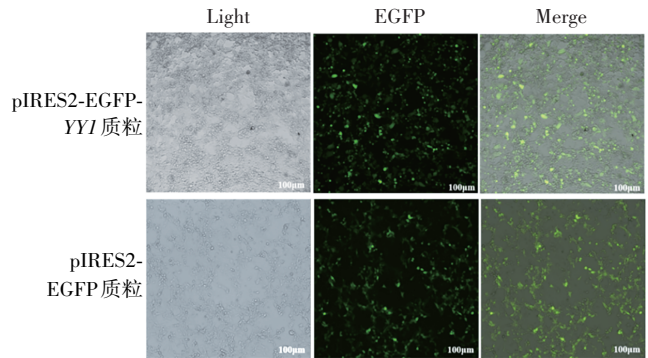
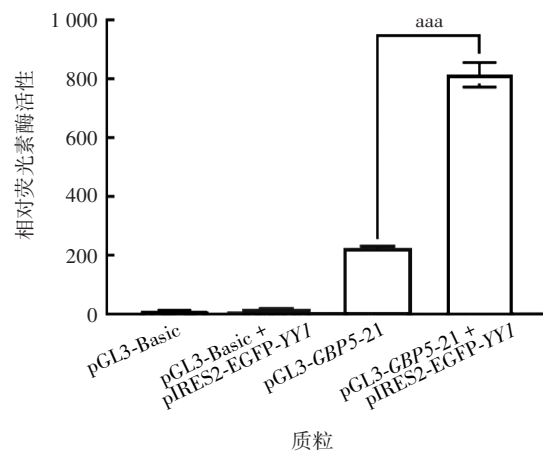


图 6 质粒 pIRES2-EGFP-YY1 与 pIRES2-EGFP 分别转染 293FT 细胞 48 h 的荧光显微镜观察(标尺:100 μm)

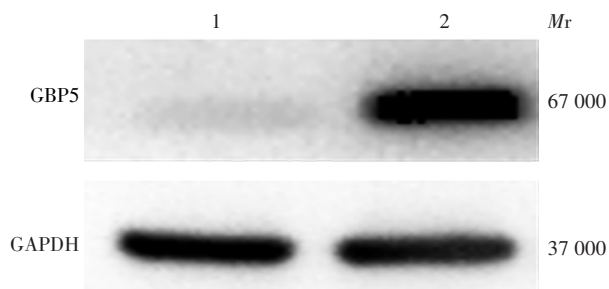
Fig. 6 Fluorescence microscopy of plasmids pIRES2-EGFP-YY1 and pIRES2 - EGFP 48 h after transfection to 293FT cells respectively (Scale bar: 100 μm)



注:aaa表示 $P < 0.001$ 。

图 7 双荧光素酶活性分析过表达 YY1 对 GBP5 启动子活性的影响

Fig. 7 Effect of YY1 overexpression on GBP5 promoter activity analyzed by double luciferase activity



1:质粒pIRES2-EGFP;2:质粒pIRES2-EGFP-YY1。

图 8 Western blot 分析质粒 pIRES2-EGFP-YY1 转染 293FT 细胞 48 h GBP5 蛋白表达水平

Fig. 8 Western blotting of GBP5 protein expression 48 h after pIRES2-EGFP-YY1 transfection to 293FT cells

3 讨论

GBP5 作为病原体感染激活的相关效应分子,在机体免疫应答中发挥重要的生物学作用^[8]。研究报道,在弗朗西斯菌感染机体前期,GBP5 通过调控黑色素瘤缺乏因子 2(absent in melanoma 2, AIM2)炎性小体的组装,增强宿主对病原菌的抵抗能力^[9]。GBP5 是干扰素诱导巨噬细胞活化的标志物之一^[10],同时激活表达的 GBP5 也可参与调控干扰素通路、促进 ISG 的表达,从而抑制病毒的复制^[11]。

GBP5 基因启动子功能和特性的确定对进一步深入研究 GBP5 的生物学功能具有重要意义。启动子作为基因表达的“开关”,具有调控基因表达时间及强度的功能,而转录因子则是控制“开关”的把手,调控启动子活性。YY1 属于 GLI-Kruppel 锌指蛋白家族,是一种多功能转录因子,具有双重转录活性,参与调控多种基因的转录表达^[12-15]。由于所处环境和结合蛋白因子的不同,YY1 在调节基因表达时既可作为抑制因子,也可作为激活因子^[16-19]。已有研究发现,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)介导 Src-p38 MAPK-YY1 信号通路的活化,诱导胶质瘤细胞中 GBP1 的表达,促进胶质瘤细胞生长^[20]。目前有关 YY1 结合 GBP5 启动子调控 GBP5 表达的生物学活性尚未见报道。本研究通过构建 GBP5 启动子不同截短片段的荧光素酶报告基因重组质粒,发现 GBP5 核心启动子区域位于 5'UTR 上游-1 623 ~ -520 bp,同时过表达 YY1 后,重组质粒荧光素酶活性明显增强,表明 YY1 能影响 GBP5 的启动子活性,提示 YY1 是调控 GBP5 表达的潜在转录因子。本研究为深入阐明 GBP5 基因的表达调控机制奠定了基础,也为明确 GBP5 的生物学功能提供了实

验依据,后续将进一步探究 YY1 调控 GBP5 表达的相关信号通路。

参考文献

- [1] TRETINA K, PARK E S, MAMINSKA A, *et al.* Interferon-induced guanylate-binding proteins: Guardians of host defense in health and disease [J]. *J Exp Med*, 2019, 216 (3): 482-500.
- [2] TRIPAL P, BAUER M, NASCHBERGER E, *et al.* Unique features of different members of the human guanylate-binding protein family [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2007, 27 (1): 44-52.
- [3] PILLA-MOFFETT D, BARBER M F, TAYLOR G A, *et al.* Interferon-inducible GTPases in host resistance, inflammation and disease [J]. *J Mol Biol*, 2016, 428 (17): 3495-3513.
- [4] RUPPER A C, CARDELLI J A. Induction of guanylate binding protein 5 by gamma interferon increases susceptibility to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-induced pyroptosis in RAW 264.7 cells [J]. *Infect Immun*, 2008, 76 (6): 2304-2315.
- [5] MATTA S K, PATTEN K, WANG Q, *et al.* NADPH oxidase and guanylate binding protein 5 restrict survival of avirulent type III strains of *Toxoplasma gondii* in naive macrophages [J]. *mBio*, 2018, 9 (4): e01393-18. DOI: 10.1128 / mBio.01393-18.
- [6] CERQUEIRA D M, GOMES M T R, SILVA A L N, *et al.* Guanylate-binding protein 5 licenses caspase-11 for Gasdermin-D mediated host resistance to *Brucella abortus* infection [J]. *PLoS Pathog*, 2018, 14 (12): e1007519. DOI: 10.1371 / journal.ppat.1007519.
- [7] FENG J, CAO Z, WANG L, *et al.* Inducible GBP5 mediates the antiviral response via interferon-related pathways during influenza A virus infection [J]. *J Innate Immun*, 2017, 9 (4): 419-435.
- [8] KIM B H, SHENOY A R, KUMAR P, *et al.* A family of IFN-gamma-inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection [J]. *Science*, 2011, 332 (6030): 717-721.
- [9] MEUNIER E, WALLEY P, DREIER R F, *et al.* Guanylate-binding proteins promote activation of the AIM2 inflammasome during infection with *Francisella novicida* [J]. *Nat Immunol*, 2015, 16 (5): 476-484.
- [10] FUJIWARA Y, HIZUKURI Y, YAMASHIRO K, *et al.* Guanylate-binding protein 5 is a marker of interferon-gamma-induced classically activated macrophages [J]. *Clin Transl Immunol*, 2016, 5 (11): e111. DOI: 10.1038 / cti.2016.59
- [11] HAQUE M, SIEGEL R J, FOX D A, *et al.* Interferon-stimulated GTPases in autoimmune and inflammatory diseases: promising role for the guanylate-binding protein (GBP) family [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2021, 60 (2): 494-506.

- [12] Cancer Discovery Editorial Staff. YY1 facilitates enhancer-promoter contacts to promote gene expression [J]. *Cancer Discov*, 2018, 8 (2): 135.
- [13] YANG P, LI J, PENG C, *et al*. TCONS_00012883 promotes proliferation and metastasis via DDX3 / YY1 / MMP1 / PI3K-AKT axis in colorectal cancer [J]. *Clin Transl Med*, 2020, 10 (6): e211. DOI: 10.1002 / ctm2.211.
- [14] VERHEUL T C J, VAN HIJFTE L, PERENTHALER E, *et al*. The why of YY1: Mechanisms of transcriptional regulation by Yin Yang 1 [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 592164.
- [15] KHACHIGIAN L M. The Yin and Yang of YY1 in tumor growth and suppression [J]. *Int J Cancer*, 2018, 143 (3): 460-465.
- [16] ZHANG X C, LIANG H F, LUO X D, *et al*. YY1 promotes IL-6 expression in LPS-stimulated BV2 microglial cells by interacting with p65 to promote transcriptional activation of IL-6 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 502 (2): 269-275.
- [17] WU S, WANG H, LI Y, *et al*. Transcription factor YY1 promotes cell proliferation by directly activating the pentose phosphate pathway [J]. *Cancer Res*, 2018, 78 (16): 4549-4562.
- [18] WATERS M R, GUPTA A S, MOCKENHAUPT K, *et al*. RelB acts as a molecular switch driving chronic inflammation in glioblastoma multiforme [J]. *Oncogenesis*, 2019, 8 (6): 37.
- [19] MORALES-MARTINEZ M, VALENCIA-HIPOLITO A, VEGA G G, *et al*. Regulation of Krüppel-Like Factor 4 (KLF4) expression through the transcription factor Yin-Yang 1 (YY1) in non-Hodgkin B-cell lymphoma [J]. *Oncotarget*, 2019, 10 (22): 2173-2188.
- [20] LAN Q, WANG A, CHENG Y, *et al*. Guanylate binding protein-1 mediates EGFRvIII and promotes glioblastoma growth in vivo but not in vitro [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (9): 9680-9691.

收稿日期:2022-06-11 编辑:王佳凤

(上接第 132 页)

- [17] GAO Q, BAO L, MAO H, *et al*. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2 [J]. *Science*, 2020, 369 (6499): 77-81.
- [18] WANG H, ZHANG Y, HUANG B, *et al*. Development of an inactivated vaccine candidate, BBIBP-CorV, with potent protection against SARS-CoV-2 [J]. *Cell*, 2020, 182 (3): 713-721.
- [19] LI H Y, WANG Z Y, PEI X F. Laboratory diagnosis of virus infection [M]. Beijing: People's medica publishing house, 2015: 54-56. (in Chinese)
李洪源, 王志玉, 裴晓方. 病毒学检验 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 54-56.
- [20] AWADASSEID A, WU Y, TANAKA Y, *et al*. Current advances in the development of SARS-CoV-2 vaccines [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17 (1): 8-19.
- [21] ZHANG J, HE Q, AN C, *et al*. Boosting with heterologous vaccines effectively improves protective immune responses of the inactivated SARS-CoV-2 vaccine [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2021, 10 (1): 1598-1608.
- [22] LI J X, ZHU F C. Inactivated SARS-CoV-2 vaccine (BBV152)-induced protection against symptomatic COVID-19 [J]. *Lancet*, 2021, 398 (10317): 2134-2135.
- [23] DELRUE I, VERZELE D, MADDER A, *et al*. Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges [J]. *Expert Rev Vaccin*, 2012, 11 (6): 695-719.
- [24] KOZLOVSKAYA L I, PINIAEVA A N, IGNATYEV G M, *et al*. Long-term humoral immunogenicity, safety and protective efficacy of inactivated vaccine against COVID-19 (CoviVac) in pre-clinical studies [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2021, 10 (1): 1790-1806.
- [25] OFFERSGAARD A, DUARTE HERNANDEZ C R, PIHL A F, *et al*. SARS-CoV-2 production in a scalable high cell density bioreactor [J]. *Vaccines (Basel)*, 2021, 9 (7): 706.

收稿日期:2022-07-16 编辑:何巍