

人 PRL-3 基因启动子的克隆及转录因子 Snail 结合位点的初步鉴定*

周 军^{1, 2, 3, 4)} 李建明^{1, 2, 3, 4)**} 杨发达^{1, 2, 3, 4)} 柳玉红^{1, 2, 3, 4)} 丁彦青^{1, 2, 3, 4)**}

⁽¹⁾南方医科大学南方医院病理科, 广州 510515; ⁽²⁾南方医科大学基础医学院病理学教研室, 广州 510515;

⁽³⁾广东省分子肿瘤病理重点实验室, 广州 510515; ⁽⁴⁾教育部广东省共建人类重大疾病转录组学和蛋白质组学重点实验室, 广州 510515)

摘要 促肝细胞再生磷酸酶-3 (PRL-3) 是重要的肿瘤转移相关基因, 其转录调控机制一直未被阐明. 应用 TRED 在线分析系统共获得 3 种可能的人 PRL-3 基因启动子区域. 通过与人类基因组序列进行比对, 发现其中 3 号启动子序列距离人 PRL-3 基因距离最近, 位于该基因上游约 1 kb 的 DNA 区域, 与 5' 端非翻译区域邻接. 在线 Consite 分析系统发现, -500 bp 至 -451 bp 之间存在 Snail 结合的核心寡核苷酸序列 CACCTG. 运用分子克隆的方法获得 PRL-3 基因启动子 2 段区域 -699 bp 至 299 bp 及 -642 bp 至 -383 bp 区域, 后者具有 Snail 结合位点核心寡核苷酸序列 CACCTG. 构建具有荧光素酶报告基因的 pGL3 载体并检测其启动子活性. -699~299 bp 区域与 -642~-383 bp 区域的 DNA 片段在 SW480、SW620、CNE2、293A 细胞中均具有启动子活性, 其中含有 Snail 结合位点核心寡核苷酸序列 CACCTG 的短片段活性强于较完整的序列. 染色质免疫沉淀结合 PCR 扩增技术及凝胶迁移阻滞实验确定 PRL-3 基因启动子区域具有 Snail 结合位点. 研究确定, PRL-3 基因的启动子位于转录起始位点上游 700 bp 与下游 300 bp 的 DNA 区域, PRL-3 基因启动子存在转录因子 Snail 结合元件.

关键词 PRL-3, 启动子, Snail, 转录调控

学科分类号 Q7, R3

促肝细胞再生磷酸酶-3(PRL-3)为酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatase)家族成员, 与大肠癌的肝转移关系密切^[1]. 研究证实, PRL-3 在肝癌^[2]、卵巢癌^[3]、大肠癌^[4]、胃癌^[4,5]和乳腺癌^[6]中高表达, 大肠癌细胞转染 PRL-3 后, 其运动、侵袭和转移能力增强, 在裸鼠易形成含丰富毛细血管芽的实性转移瘤^[7]. PRL-3 是一种具有促进细胞生长、浸润和迁移的蛋白酪氨酸磷酸酶^[1]. PRL-3 与肿瘤转移的关系已明确, 但至今仍存在许多待阐明的重要问题. PRL-3 参与的信号通路至今尚不清楚^[8], 作为一种磷酸酶, 其底物至今尚不确定^[8], 尤其重要的是调控 PRL-3 基因表达的机制尚不清楚. 阐明 PRL-3 基因表达调控的机制是阐明 PRL-3 在肿瘤转移中作用的重要基础.

Snail 是一个重要的转录因子^[9], 在肿瘤上皮间叶转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程中起重要作用^[10], 研究发现, Snail 可通过调节 E-Cadherin 的表达参与 EMT 的发生. 作为肿瘤转移发生过程中重要的调节因子^[11], Snail 与 PRL-3

基因表达的关系并不清楚.

本研究拟通过生物信息学的方法初步确定 PRL-3 基因启动子区域, 并对该区域相关转录因子结合位点进行预测, 初步确定是否可能存在 Snail 的结合位点, 然后, 克隆预测的较完整启动子区域及含有 Snail 结合位点核心寡核苷酸序列 CACCTG 的启动子区域, 构建具有荧光素酶报告基因的 pGL3 载体, 转染 SW480、SW620、CNE2、293A 细胞并检测其启动子活性, 并进一步运用染色质免疫沉淀技术结合 PCR 扩增的方法以及凝胶迁移阻滞实验, 验证 PRL-3 基因启动子区域是否具有 Snail 结合位点.

* 国家自然科学基金资助项目(30500241, 30670968 和 30700286).

** 通讯联系人. Tel: 020-61648223

李建明. E-mail: lixinyue@fimmu.com

丁彦青. E-mail: dyq@fimmu.com

收稿日期: 2007-06-07, 接受日期: 2007-11-07

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 材料. 从美国国立生物技术中心数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>) 获得人 PRL-3 基因及其上游 5kb DNA 序列. pGEM®-T 载体、pGL3-Basic、pGL3-Control 载体、pSV-β-Gal 载体购自 Promega 公司. 人大肠癌细胞株 SW480、SW620, 中国人鼻咽癌细胞株 CNE2, 人胚肾上皮细胞株 293A 及 DH5α 大肠杆菌由南方医科大学附属南方医院病理科保存.

1.1.2 试剂. β- 半乳糖苷酶检测试剂盒、荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司. 脂质体 2000、Opti-MEM® 购自 Invitrogen 公司. rTaq 酶、LA Taq 酶、高保真酶、T4 DNA 连接酶、*Kpn* I、*Xho* I 内切酶、琼脂糖回收纯化试剂盒、DNA 纯化试剂盒、小提质粒试剂盒购自 TaKaRa 公司. 1640 培养基、高糖 DMEM 培养基购自 Hyclone 生物制品公司. 新生牛血清购自杭州四季青生物公司. 中提质粒试剂盒购自 QIAGEN 公司. 兔抗人 Snail 抗体购自美国 Abcam 公司, 染色质免疫沉淀 (CHIP) 试剂盒购自美国 Active Motif 公司, LightShift 化学发光 EMSA 试剂盒购自 PIERCE 公司. EMSA 探针生物素标记 (DNA 3' 末端标记) 试剂盒购自碧云天生物技术研究.

1.2 实验方法

1.2.1 人 PRL-3 基因启动子的生物信息学分析. 应用在线数据库 Transcriptional Regulatory Element Database (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/TRED>) 预测 PRL-3 基因的转录起始位点, 获取转录起始位点上游 700 bp 与下游 300 bp 的 DNA 片段. 将获得的 DNA 片段在 NCBI 上进行比对, 确定相关 DNA 序列在基因组的位置及与 PRL-3 基因转录本的关系. 应用在线 Consite 系统 (<http://mordor.cgb.ki.se/cgi-bin/CONSITE/consite/>) 对获得的启动子区域 DNA 片段潜在的转录因子结合位点进行预测.

1.2.2 人 PRL-3 基因启动子的克隆及其活性检测. 常规细胞培养人大肠癌 SW480 细胞株, 根据生物信息学预测的 PRL-3 基因启动子的 DNA 序列, 应用 Primer5.0 设计 2 对特异性引物, 在正向引物的 5' 端加上限制性内切酶 *Kpn* I 识别位点 GGTACC. 在反向引物的 5' 端加上限制性内切酶 *Xho* I 识别位点 AAGCTT, 其引物对分别为: 正向引物, 5' GGTACCTCCTTGTGCTCCCATATAAGG 3', 反

向引物, 5' AAGCTTACTGCAGAGAAGGCTGGG-G 3'; 正向引物, 5' GGTACCAGGAGGAGGGCT-CTGGGAGA 3', 反向引物, 5' AAGCTTAGGCG-AGGGCAATGGTGAG 3'. 扩增片段大小分别为 999 bp (–699 bp 至 299 bp 区域) 及 259 bp (–642 bp 至 –383 bp 区域). PCR 扩增获得人大肠癌细胞株 SW480 PRL-3 基因启动子区域的 2 个 DNA 片段 (999 bp, 259 bp) 连接到 pGEM®-T 载体并转化到 DH5α 大肠杆菌. 经 PCR 扩增, *Kpn* I、*Xho* I 双酶切及测序鉴定阳性克隆. 将阳性克隆小提质粒、双酶切胶回收纯化 DNA 片段, 连接到 pGL3-Basic 载体并转化到 DH5α 大肠杆菌, PCR 扩增, *Kpn* I、*Xho* I 双酶切及测序鉴定阳性克隆. 阳性克隆中提用于转染细胞. 将构建的载体 pGL3-999 与 pGL3-259 采用脂质体 2000 (按操作说明书进行) 分别转染到人大肠癌细胞株 SW480、SW620, 中国人鼻咽癌细胞株 CNE2 及人胚肾上皮细胞株 293A 细胞, 同时转染 pGL3-basic 为阴性对照质粒, pGL3-control 为阳性对照质粒, pSV-β-Gal 为内对照质粒, 每个质粒单独转染 3 次, 每次转 3 个孔, 转染 48 h 后, 裂解细胞, 收集上清液分别检测 β- 半乳糖苷酶活性及荧光素酶活性, 荧光素酶活性除以 β- 半乳糖苷酶活性为校正后荧光素酶相对活性, 同一细胞的各个质粒间的荧光素酶相对活性进行独立样本 *t* 检验.

1.2.3 人 PRL-3 基因启动子区域 Snail 结合位点初步鉴定.

a. CHIP 结合 PCR 方法鉴定人 PRL-3 基因启动子区域 Snail 结合位点.

根据生物信息学获得的 PRL-3 基因启动子 DNA 序列, 应用 Primer5.0 设计相关的引物, 其引物对为: 正向引物, 5' AGGAGGAGGGCTCTGG-GAGA 3', 反向引物, 5' AGGCGAGGGCAATGG-TGAG 3'. 扩增的片段大小为 259 bp (–642 bp 至 –383 bp).

人大肠癌细胞 SW480 常规培养至约 70%~80% 融合时倾去培养基, 加入含 1% 甲醛的培养基固定细胞, 预冷 PBS 漂洗, 甘氨酸终止固定, 预冷 PBS 漂洗, 剥落细胞, 加入预冷细胞裂解液离心收集细胞核. 重悬细胞核, 用超声 (3W, 5 次, 每次 20 s) (美国 MLTRASONIC PROCESSOR VG 130 超声破碎仪) 将染色质剪切成 500 bp 左右, 每 2 次超声间隔将标本移至冰上静置 30 s. RNase 及蛋白酶 K 处理后, 以 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测染

色质剪切效果. 用蛋白质 G 磁珠清除染色质里非特异性抗体, 在清除了非特异性抗体的染色质里分别加入 1:100 稀释的 Snail 抗体(4 μ l), 阳性对照 RNA pol II 抗体(10 μ l), 阴性对照 IgG 抗体(10 μ l), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 在抗体/染色质复合物里加入蛋白质 G 磁珠. 清洗和洗脱抗体/染色质复合物, 去交联和纯化 DNA. 取 2 μ l 纯化后的 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增体系为 25 μ l, 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 做 1 个循环, 94 $^{\circ}$ C 20 s, 59 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 做 36 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min 做 1 个循环. 取 8 μ l PCR 扩增 DNA 片段用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测. 对 Snail 转录因子结合的 259 bp 的 DNA 片段进行胶回收, 测序. 阳性对照引物为 GAPDH 基因启动子区的特异性序列 (5' TACTAGCGGTTTACGG-GCG 3', 5' TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCG-A 3'), 产物长度为 166 bp. 阴性对照引物为 GAPDH 基因与 CNAP1 基因之间的一个区域 (5' ATGGTTGCCACTGGGGATCT 3', 5' TGCCAAA-GCCTAGGGGAAGA 3'), 产物长度为 174 bp. Input DNA 为清除了染色质里非特异性的抗体后直接进行去交联和纯化的基因组 DNA.

b. 凝胶迁移阻滞实验鉴定人 PRL-3 基因启动子区域 Snail 结合位点.

根据 Consite (<http://mordor.cgb.ki.se/cgi-bin/CONSITE/consite/>) 分析结果, PRL-3 基因启动子 -630 bp 至 -607 bp 区域的 DNA 序列上只有 Snail 转录因子的结合位点, 截取这一区域的 24 bp 序列作为探针. 根据 Consite 软件采用置换突变的方法设计突变体的探针, 设计的探针为: PRL-3 基因启动子 Snail 结合 DNA 序列探针, 正向序列, 5' CTGGGAGAGGTGTCGCCTGTGACT 3', 反向序列, 3' GACCCCTCTCCACAGCGGACACTGA 5'. 突变体探针, 正向序列, 5' CTGGGAGATGTGTC-GCTTGTGACT 3', 反向序列, 3' GACCCCTCTAC-ACAGCGAACACTGA 5'.

人大肠癌细胞株 SW480 常规培养至 80% 融合度时, 用预冷的 PBS 冲洗, 剥落细胞, PBS 冲洗, 离心后加入缓冲液 A, 重悬后加入 1/10 体积的 10% NP-40, 离心去除上清, 加入缓冲液 B, 重悬后离心, 吸取上清至新的离心管中, 进行蛋白质浓度测定(按试剂盒操作说明进行). 单链寡核苷酸探针生物素标记(按试剂盒操作说明进行). 标记探针纯化及效率的检测. 将生物素标记好的单链 DNA 探针正义链和反义链制备双链 EMSA 探针, 将未

标记的单链 DNA 探针正义链和反义链退火成双链 DNA, 制备冷探针(cold-probe), 用于特异性竞争. 配制 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶进行预电泳, DNA-蛋白质结合后进行电泳结合反应, 电泳完后进行电转膜及紫外交联, 用化学发光检测生物素标记的 DNA, 用 X 光片进行显影.

2 结 果

2.1 生物信息学预测结果

运用在线数据库 (transcriptional regulatory element database) 获得 PRL-3 基因 3 个可能的转录起始位点. 获得转录起始位点上游 700 bp 与下游 300 bp 的 DNA 片段. 在 NCBI 上的比对结果显示, 转录起始位点标记为 142111548、142112115 的 DNA 片段位于 PRL-3 基因上游较远的区域. 转录起始位点标记为 142115552 的启动子序列与人 PRL-3 基因距离最近, 位于该基因上游约 1 kb 的 DNA 区域, 并与其 5' 端非翻译区域邻接, 因此, 这一区域可能是 PRL-3 基因的启动子区域. 在线 Consite 分析系统发现, 这一区域存在多个转录因子如 Snail、n-MYC、ARNT、E74A、NF-kappaB、NRF-2 及 AML-1 等的结合位点. 将转录因子得分的门槛值定为 100% 时仍存在一个 Snail 潜在结合位点和一个 bZIP910 潜在结合位点. 在人 PRL-3 基因转录起始位点的 -500 bp 至 -451 bp 之间存在 Snail 结合的核心寡核苷酸序列 CACCTG. 除此之外, 在其他多个区域存在多个类似这一核心序列的 DNA 序列.

2.2 人 PRL-3 基因启动子的克隆及其活性检测结果

将 PRL-3 基因启动子 -699 bp 至 299 bp 的 DNA 片段(图 1)与 -642 bp 至 -383 bp 的 DNA 片段(图 2)构建的 2 个质粒 pGL3-999、pGL3-259 与阴性对照质粒 pGL3-basic、阳性对照质粒 pGL3-control、内对照质粒 pSV- β -Gal 分别用脂质体 2000 瞬时转染到 293A、SW480、SW620、CNE2 细胞, 分别检测其 β -半乳糖苷酶及荧光素酶活性, 用 β -半乳糖苷酶活性校正转染效率. 结果发现, pGL3-259、pGL3-999 质粒在这 4 种细胞株中荧光素酶的相对活性强于阴性对照质粒 pGL3-basic, 弱于阳性对照质粒 pGL3-control (图 3). 两两比较具有显著性差异 ($P < 0.05$). pGL3-259 质粒在 4 种细胞株中荧光素酶的相对活性均强于 pGL3-999 质粒, 其差别具有显著性差异 ($P < 0.05$).

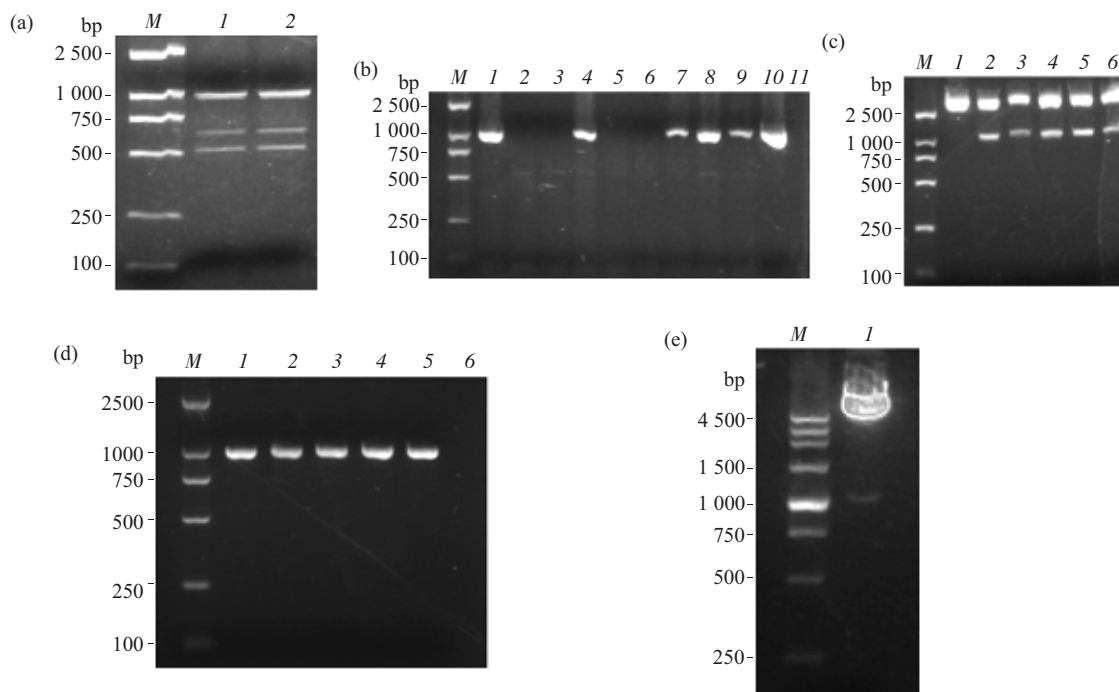


Fig. 1 Cloning and identification of PRL-3 gene promoter between -699 to 299 nt

PRL-3 gene promoter was amplified by PCR with genomic DNA as template (a. *M*: Molecular markers, 1, 2: PRL-3 gene promoter), cloned into T vector and identified by PCR amplification (b. *M*: Molecular markers, 1~10: Positive clones, 11: Negative control) or enzyme digestion (c. *M*: Molecular markers, 1: Clone 1, 2: Clone 4, 3: Clone 7, 4: Clone 8, 5: Clone 9, 6: Clone 10), cloned into pGL3 vector with luciferase report gene and identified by PCR amplification (d. *M*: Molecular markers, 1~5: Positive clones 1~5, 6: Negative control) or enzyme digestion (e. *M*: Molecular markers, 1: Positive clone 1). Sequences of PRL-3 gene promoter between -699 to 299 nt in two vectors were confirmed by DNA sequencing.

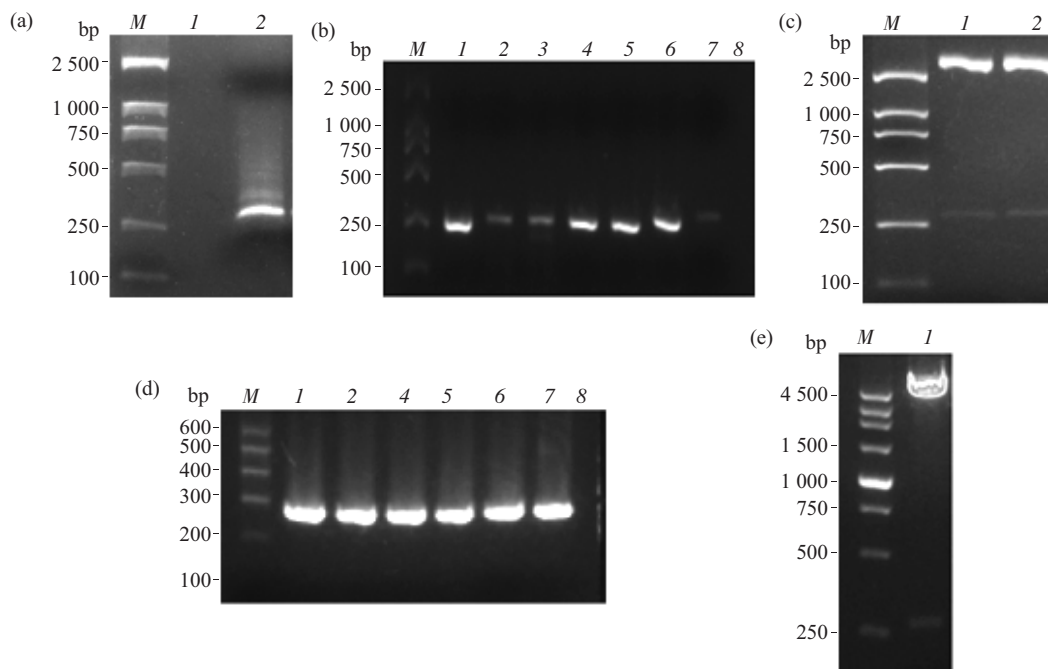


Fig. 2 Cloning and identification of PRL-3 gene promoter between -642 to -383 nt

PRL-3 gene promoter was amplified by PCR with genomic DNA as template (a. *M*: Molecular markers, 1: Negative control, 2: PRL-3 gene promoter), cloned into T vector and identified by PCR amplification (b. *M*: Molecular markers, 1~7: Positive clones, 8: Negative control) or enzyme digestion (c. *M*: Molecular markers, 1: Positive clone 5, 2: Positive clone 6), cloned into pGL3 vector with luciferase report gene and identified by PCR amplification (d. *M*: Molecular markers, 1~7: Positive clones, 8: Negative control) or enzyme digestion (e. *M*: Molecular markers, 1: Positive clone 1). Sequences of PRL-3 gene promoter between -642 to -383 nt in two vectors were confirmed by DNA sequencing.

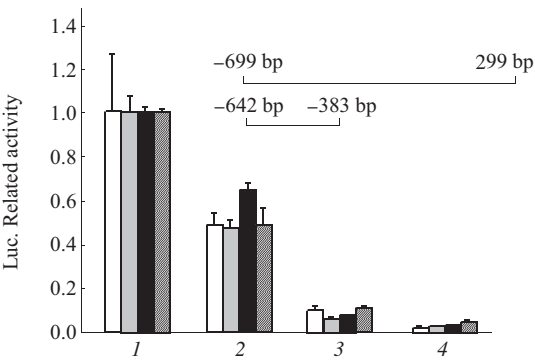


Fig. 3 The luciferase activities of PRL-3 gene promoters
The luciferase activities of two PRL-3 gene promoter between -699 to 299 nt and between -642 to -383 nt in four different cell lines including colorectal carcinoma cell lines SW480 and SW620, nasopharyngeal carcinoma cell line CNE2 and human embryo kidney cell line 293A were analyzed. □:293A; ▤:SW480; ■:SW620; ▨:CNE2. 1: pGL3-control; 2: pGL3-259; 3: pGL3-999; 4: pGL3-basic.

2.3 CHIP 结合 PCR 扩增确定 PRL-3 基因启动子区域存在 Snail 结合位点

应用超声切割 SW480 细胞核染色质，可以获得平均为 300 bp 的有效 DNA 片段。阳性对照抗体为基本转录因子 RNA pol II 抗体，阳性对照 RNA pol II CHIP DNA 模板，应用 GAPDH 基因引物，其扩增产物明显多于用阴性对照 IgG CHIP DNA 模板的扩增产物。阴性对照抗体为 IgG 抗体，阴性对照 IgG CHIP DNA 模板或阳性对照 RNA pol II CHIP DNA 模板，应用阴性对照引物，其扩增产物均较弱，几乎未见。而以 Input DNA 为模板，与阴阳性对照引物扩增后均具有明显的扩增产物。本研究每次实验均设置阴阳性对照，以防止 CHIP 实验操作可能的污染。根据预测的 PRL-3 基因启动子序列，设计 DNA 的相关扩增引物，扩增的片段位于-642~-383 区域，其大小为 259 bp。研究发现，阳性对照 GAPDH 引物与 RNA pol II CHIP DNA 扩增后 DNA 片段具有明显的阳性条带，阴性对照引物与 IgG CHIP DNA 扩增后的 DNA 片段未见明显条带，PRL-3 基因引物与 Snail CHIP DNA，Input DNA 扩增后的 DNA 片段具有 2 条阳性条带，经测序证实大小为 259 bp 的片段为目的片段(图 4)，PRL-3 基因引物与 DEPC H₂O 扩增后没有条带。研究显示，Snail CHIP DNA 富含 PRL-3 基因启动子区的特异性片段。结果表明，PRL-3 基因启动子区域具有 Snail 的结合位点。

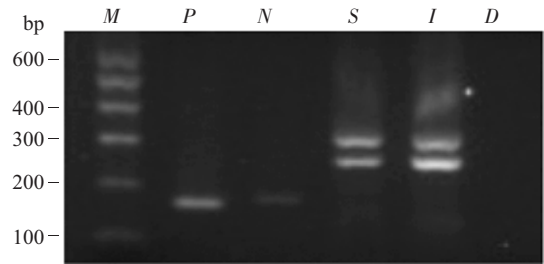


Fig. 4 Snail binds to PRL-3 promoter of SW480 cells
PRL-3 gene promoter obtaining the 5' CACCTG 3' core sequence of Snail binding sites, were validated to bind to Snail by chromatin immunoprecipitation (CHIP) analysis of SW480 cells, and sequence of PRL-3 gene promoter was confirmed by DNA sequencing. GAPDH promoter and a region between GAPDH and CNAP1 genes was performed as positive control and negative controls. M: Molecular markers, P: RNA pol II CHIP DNA, N: IgG CHIP DNA, S: Snail CHIP DNA, I: Input DNA, D: DEPC H₂O.

2.4 凝胶迁移阻滞实验鉴定 PRL-3 基因启动子区域 Snail 结合位点

以 PRL-3 基因启动子区域具有 Snail 结合位点的特异性 DNA 序列作为探针，分别以生物素标记的探针、未用生物素标记的探针、未用生物素标记的突变探针与 SW480 提取的核蛋白结合进行凝胶迁移率实验。结果表明，用生物素标记的探针能与 SW480 提取的核蛋白结合，未用生物素标记的探针能抑制用生物素标记的探针与 SW480 提取的核蛋白结合，未用生物素标记的突变探针不能抑制用生物素标记的探针与 SW480 提取的核蛋白结合(图 5)。结果表明，PRL-3 基因的启动子区域具有 Snail 的结合位点。

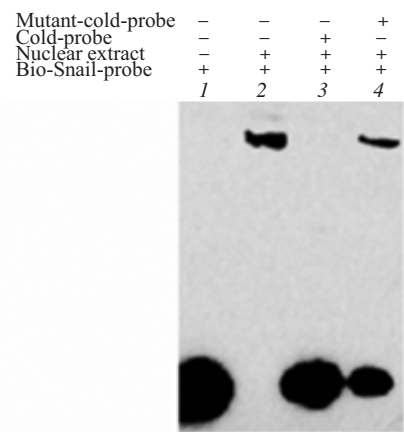


Fig. 5 Preliminary identification of Snail binding sequence in PRL-3 gene promoter
Biotin-labelled DNA probe was incubated with nuclear extracts of SW480 without cold probe (lane 2) or with cold probe (lane 3), or incubated with nuclear extracts of SW480 with mutant cold probe (lane 4). Single biotin-labelled DNA probe was regarded as control (lane 1).

3 讨 论

PRL-3 又称为 PTP4A3, 位于人类第八号染色体上(8q24.3), 从其基因组的结构看, 其邻近区域存在如 PTK2、GPR20 及 TSSK5P1 等基因. PRL-3 基因由 5 个外显子和 4 个内含子构成, 其 5'端和 3'端均存在非翻译区域(UTR, untranslated regions), UTR 的存在可能与 PRL-3 基因的调控有关. 根据 PRL-3 基因和蛋白质的结构特征, 它属于一类新近发现的蛋白质酪氨酸磷酸酶 (protein tyrosine phosphatase, PTP)家族成员, 该亚型只有 3 个成员 RPL-1、PRL-2 及 PRL-3. PRLs 具有 PTP 活性位点标签序列 HCXXGXXR, 因而归属于蛋白质酪氨酸磷酸酶家族. PRLs 含有 C 端 CAAX 序列可进行异戊烯化, PRLs 以异戊烯化依赖方式存在于浆膜和内体结构, 这一生物化学特征提示它们在细胞信号传递中发挥作用. 这 3 种蛋白质分子质量大约为 20 ku, 具有超过 75%的同源性, 在功能上具有相似性^[12~14].

PRL-3 是现已发现与大肠癌转移相关的重要基因. 应用基因表达系列分析技术分析大肠癌肝转移基因表达谱时发现, PRL-3 在 18 例大肠癌肝转移标本中持续高表达^[1]. 进一步发现, 无论具体转移的部位如何, 大多数大肠癌的转移标本中 PRL-3 的转录水平明显增加^[2], 而该基因在正常大肠上皮或者非转移性原发大肠癌中极少表达或不表达^[1,2]. 不同的研究组已经分别证实这一结果^[7,15]. 因此, PRL-3 成为大肠癌转移研究中的“魅力”基因, 是大肠癌转移治疗的重要潜在靶点.

PRL-3 在肿瘤转移的作用与其促进细胞迁移和侵袭有关. 将 PRL-3 转染到上皮细胞, 可引起细胞形态发生改变, 且形态改变与细胞运动能力相关^[16]. PRL-3 表达细胞表现出细胞运动能力增加和体外侵袭能力增强^[16,17]. 另外, PRL-3 可调节肿瘤细胞与细胞外基质的粘附^[16].

PRL-3 促进肿瘤转移与 PRL-3 酶活性有关. 将转染野生型 PRL-3 的细胞经尾静脉注射入裸鼠体内, 1~2 周内即可形成明显的肺转移, 甚至发生由广泛肺转移引起的动物死亡, 如果 PRL-3 失活则不引起明显的转移^[18]. 这一研究提示, PRL-3 酶活化参与肿瘤转移. 目前 PRL-3 的三维空间结构已被阐明^[19,20], 这将对 PRL-3 基因功能的阐明大有帮助.

PRL-3 是重要的肿瘤转移基因^[1], 在肝癌^[2]、卵

巢癌^[3]、大肠癌^[1]、胃癌^[4,5]和乳腺癌^[6]中的作用均得到证实. 有专家认为 PRL-3 的发现将为拮抗肿瘤转移提供重要的靶标^[21]. 然而到目前为止, 仍存在许多待阐明的重要问题. 尤其重要的是调控 PRL-3 基因表达的机制尚不清楚. 阐明 PRL-3 基因表达调控的机制是阐明 PRL-3 在肿瘤转移中作用的重要基础.

锌指转录因子 Snail 属于转录抑制因子 Snail 超家族. 其家族成员有: Snail、E12/E47、ZEB1、SIPI、Slug. 在结构特征上, Snail 家族具有相似的结构, 由一个高度保守的 C 端及一个高度可变的 N 端构成, 各成员间结构上的不同主要表现在中间 P-S 富集区域^[22]. 其中 C 端均包含 4 或 5 个 C₂H₂ 型的锌指 DNA 结合区域, 每个锌指包含 2 个 β 链和一个 α 螺旋, 而 α 螺旋的 N 端结合在 DNA 的大沟上, 2 个保守的 C₂H₂ 与锌离子协调作用^[23]. Snail 是一个重要的转录因子^[9], 在肿瘤上皮间叶转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 过程中起重要作用^[10], 研究发现, Snail 可通过调节 E-cad 的表达参与 EMT 的发生. 这一结论已经在多种肿瘤中如结肠癌^[24]、乳腺癌^[25]、胰腺癌^[26]、恶性黑色素瘤^[27]及口腔鳞癌^[28]等获得证实. Snail 通过结合到 E-cad 启动子的 E- 盒元件而直接抑制 E-cad 的转录.

作为肿瘤转移发生过程中重要的调节因子, Snail 参与 PRL-3 基因表达及其转录调控的关系并不清楚.

本研究应用 TRED 在线分析系统对人 PRL-3 基因的启动子区域进行预测, 共获得 3 种可能的启动子区域, 通过与含 PRL-3 基因的基因组序列进行比对, 我们发现它们均位于 PRL-3 基因上游区域. 一般认为基因的启动子区域位于该基因上游约 3~5 kb 的区域, 特别是该基因上游 1 kb 左右的区域. 由于其中 3 号启动子序列距离人 PRL-3 基因距离最近, 位于该基因上游约 1 kb 的 DNA 区域, 它们与 5'端非翻译区域邻接. 为确定这一区域可能存在的转录调控元件, 我们进一步应用在线 Consite 分析系统发现, 在该区域存在多个转录因子如 Snail、n-MYC、ARNT、E74A、NF-kappaB、NRF-2 及 AML-1 等的结合位点. 在人 PRL-3 基因启动子区域的 -500 bp 至 -451 bp 之间存在 Snail 结合的核心寡核苷酸序列 CACCTG, 另外, 在其他多个区域存在多个类似这一核心序列的 DNA 序列.

为证实这一区域具有调控基因转录的启动子活性, 以人大肠癌细胞株 SW480、SW620, 中国人鼻咽癌细胞株 CNE2, 人胚肾上皮细胞株 293A 为研究对象, 将部分启动子区域 DNA 片段转染到相关启动子活性检测的荧光素酶报告基因载体, 我们选取了较完整的序列(-699 bp~299 bp 区域)以及其中含有 Snail 结合位点核心寡核苷酸序列 CACCTG 的短片段(-642 bp~-383 bp)进行了克隆和活性分析, 证实它们在 4 种不同的细胞株中均具有启动子活性, 其中含有 Snail 结合位点核心寡核苷酸序列 CACCTG 的短片段活性强于较完整的序列。

应用染色质免疫沉淀技术结合 PCR 扩增的方法对人大肠癌细胞株 SW480 细胞进行分析, 发现 Snail 可与人大肠癌细胞株 SW480 细胞 PRL-3 基因启动子区域的多个 DNA 片段结合, 其中包括含有 Snail 结合位点核心寡核苷酸序列 CACCTG 的短片段。运用凝胶迁移阻滞实验发现 PRL-3 基因启动子区域具有 Snail 结合位点。研究初步揭示 Snail 参与 PRL-3 基因的转录调控, 其细节有待进一步的研究。

参 考 文 献

- Saha S, Bardelli A, Buckhaults P, *et al.* A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. *Science*, 2001, **294** (5545): 1343~1346
- Bardelli A, Saha S, Sager J A, *et al.* PRL-3 expression in metastatic cancers. *Clin Cancer Res*, 2003, **9**(15): 5607~5615
- Polato F, Codegani A, Frusci R, *et al.* PRL-3 phosphatase is implicated in ovarian cancer growth. *Clin Cancer Res*, 2005, **11**(19): 6835~6839
- Li Z, Zhan W, Wang Z, *et al.* Inhibition of PRL-3 gene expression in gastric cancer cell line SGC7901 via microRNA suppressed reduces peritoneal metastasis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **348**(1): 229~237
- Miskad U A, Semba S, Kato H, *et al.* Expression of PRL-3 phosphatase in human gastric carcinomas: close correlation with invasion and metastasis. *Pathobiology*, 2004, **71**(4): 176~184
- Radke I, Gotte M, Kersting C, *et al.* Expression and prognostic impact of the protein tyrosine phosphatases PRL-1, PRL-2, and PRL-3 in breast cancer. *Br J Cancer*, 2006, **95**(3): 347~354
- Kato H, Semba S, Miskad U A, *et al.* High expression of PRL-3 promotes cancer cell motility and liver metastasis in human colorectal cancer: a predictive molecular marker of metachronous liver and lung metastases. *Clin Cancer Res*, 2004, **10**(21): 7318~7328
- Sager J A, Benvenuti S, Bardelli A. PRL-3: a phosphatase for metastasis?. *Cancer Biol Ther*, 2004, **3** (10): 952~953
- Nieto M A. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, **3**(3): 155~166
- Huber M A, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol*, 2005, **17**(5): 548~558
- Peinado H, Ballestar E, Esteller M, *et al.* Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/Histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 Complex. *Mol Cell Biol*, 2004, **24**(1): 306~319
- Diamond R H, Cressman D E, Laz T M, *et al.* PRL-1, a unique nuclear protein tyrosine phosphatase, affects cell growth. *Mol Cell Biol*, 1994, **14**(6): 3752~3762
- Cates C A, Michael R L, Staybrook K R, *et al.* Prenylation of oncogenic human PTP (CAAX) protein tyrosine phosphatases. *Cancer Lett*, 1996, **110**(1~2): 49~55
- Zeng Q, Si X, Horstmann H, *et al.* Prenylation-dependent association of protein-tyrosine phosphatases PRL-1, -2, and -3 with the plasma membrane and the early endosome. *J Biol Chem*, 2000, **275**(28): 21444~21452
- Peng L, Ning J, Meng L, *et al.* The association of the expression level of protein tyrosine phosphatase PRL-3 protein with liver metastasis and prognosis of patients with colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2004, **130**(9): 521~526
- Wu X, Zeng H, Zhang X, *et al.* Phosphatase of regenerating liver-3 promotes motility and metastasis of mouse melanoma cells. *Am J Pathol*, 2004, **164**(6): 2039~2054
- Zeng Q, Dong J M, Guo K, *et al.* PRL-3 and PRL-1 promote cell migration, invasion, and metastasis. *Cancer Res*, 2003, **63** (11): 2716~2722
- Guo K, Li J, Tang J P, *et al.* Catalytic domain of PRL-3 plays an essential role in tumor metastasis: formation of PRL-3 tumors inside the blood vessels. *Cancer Biol Ther*, 2004, **3**(10): 945~951
- Kozlov G, Cheng J, Ziomek E, *et al.* ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignments of the human phosphatase PRL-3. *J Biomol NMR*, 2002, **24**(2): 169~170
- Kim K A, Song J S, Jee J, *et al.* Structure of human PRL-3, the phosphatase associated with cancer metastasis. *FEBS Lett*, 2004, **565**(1~3): 181~187
- Stephens B J, Han H, Gokhale V, *et al.* PRL phosphatases as potential molecular targets in cancer. *Mol Cancer Ther*, 2005, **4**(11): 1653~1661
- Mirna A, Perei-Mireno, Mario F, *et al.* Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *Journal of Cell Science*, 2003, **116**(Pt10): 1959~1967
- Neito M A. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002, **3**(3): 155~166
- Liu Y N, Lee W W, Wang C Y, *et al.* Regulatory mechanisms controlling human E-cadherin gene expression. *Oncogene*, 2005, **24** (56): 8277~8290
- Come C, Magnino F, Bibeau F, *et al.* Snail and slug play distinct roles during breast carcinoma progression. *Clin Cancer Res*, 2006, **12**(18): 5395~5402
- 殷涛, 王春友, 刘涛, 等. 胰腺癌组织中 Snail 与 E-钙黏素蛋白

- 的表达及临床意义. 中华医学杂志, 2006, **86**(40): 2821~2825
- Yin T, Wang CY, Liu T, *et al.* Natl Med J China, 2006, **86**(40): 2821~2825
- 27 Nyormoi O, Bar-Eli M. Transcriptional regulation of metastasis-related genes in human melanoma. Clin Exp Metastasis, 2003, **20** (3): 251~263
- 28 Yokoyama K, Kamata N, Hayashi E, *et al.* Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells *in vitro*. Oral Oncol, 2001, **37**(1): 65~71

Cloning of Human PRL-3 Gene Promoter and Preliminary Identification of Its Snail Binding Site*

ZHOU Jun, LI Jian-Ming**, YANG Fa-Da, LIU Yu-Hong, DING Yan-Qing**

(Department of Pathology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract PRL-3 is a key gene related to metastasis of colorectal carcinoma. However, it is known little about the possible regulatory mechanisms of PRL-3 gene expression. There were three possible promoter regions predicted by TRED, a promoter prediction software, which were all located in the upstream regions of PRL-3 gene. One of PRL-3 gene candidate promoters was located in the region of about -1kb upstream proximal to 5' UTR of PRL-3 gene. Many possible transcription factor binding sites such as Snail, n-MYC, ARNT, E74A, NF-kappaB, NRF-2 and AML-1 were predicted in the region by Consite, a promoter analysis web system. Interestingly, a 5' CACCTG 3' core sequence and other related sequences of snail binding sites were found in promoter region of PRL-3 genes. Two PRL-3 gene promoters between -699 to 299 nt and between -642 to -383 nt were cloned into pGL3 vector with luciferase report gene. Both of them had promoter activities in four different cell lines including colorectal carcinoma cell lines SW480 and SW620, nasopharyngeal carcinoma cell line CNE2 and human embryo kidney cell line 293A. Interestingly, the luciferase activities of the short DNA fragmentations with Snail binding site's core sequence 5' CACCTG 3' were higher than that of the longer one. PRL-3 promoter obtaining the 5' CACCTG 3' core sequence of Snail binding sites, was validated to bind to snail by chromatin immunoprecipitation (CHIP) analysis and electrophoretic mobility shift assay (EMSA) in SW480 cells. The data suggested that Snail was involved in regulation of PRL-3.

Key words PRL-3, PRL-3 promoter, promoter activity, Snail, regulatory elements

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30500241, 30670968 and 30700286).

**Corresponding author. Tel: 86-20-61648223

LI Jian-Ming. E-mail: lixinyue@fimmu.com

DING Yan-Qing. E-mail: dyq@fimmu.com

Received: June 7, 2007 Accepted: November 7, 2007