

人 *LCRG1* 基因启动子的鉴定与初步分析*

谢海龙^{1)**} 陈主初²⁾ 李金花¹⁾

¹⁾南华大学肿瘤研究所, 衡阳 421001; ²⁾中南大学肿瘤研究所, 长沙 410078

摘要 Laryngeal carcinoma related gene 1(*LCRG1*)是一个喉癌候选抑瘤基因, 为进一步深入研究其转录调控机制, 应用 5'RACE 技术确定了该基因的转录起始位点, 然后在对人 *LCRG1* 基因进行生物信息学分析的基础上, 通过 PCR 定向克隆和酶切亚克隆策略, 构建了 11 种含不同长度 *LCRG1* 启动子荧光素酶报告基因重组体. 启动子活性分析表明, -169~+127 区域的启动子活性最高. 研究提示, *LCRG1* 基因转录所必需的基因启动子序列在-169~+127 范围内.

关键词 *LCRG1*, 喉癌, 启动子, 转录调控

学科分类号 Q74

喉癌是严重危害人类健康的恶性肿瘤, 是由遗传和环境等诸多因素相互作用所致, 涉及到大量相关基因结构和表达调控的改变, 尤其是瘤基因的活化和抑瘤基因的失活起到关键性作用, 但喉癌发病的分子机制至今仍不清楚^[1,2]. 因而分离和鉴定与喉癌发病相关的基因将是阐明其癌变机制与易感性的关键, 对其临床诊断和治疗也有较重要的意义.

我们在 2000 年采用 mRNA 差异显示和 cDNA 文库筛选技术, 克隆了在喉癌组织中表达下调新基因 *LCRG1* (GenBank 登录号为 AF268387)^[3~5]. 将 *LCRG1* 基因转染到喉癌细胞 Hep-2 中, 发现 *LCRG1* 能显著抑制移植瘤的生长^[6]. 研究发现, *LCRG1* 表达水平的改变是喉癌发病的重要因素, 而 *LCRG1* 转录调控的机制目前尚不清楚. 因此, 本研究利用 5'RACE 确定 *LCRG1* 转录起始位点, 克隆人 *LCRG1* 基因 5'调控区并对其功能进行了初步分析.

1 材料与方法

1.1 材料

COS7 细胞株购自美国 ATCC 公司; 人肝癌细胞 7721 为本实验室保存; DMEM、胎牛血清购自 Hyclone 公司; TaKaRa LA Taq[®]、TaKaRa 5'-Full RACE Kit(Code No. D315) 购自 TaKaRa 公司; PCR 产物克隆载体 pCR211TOPO vector 购自 Qiagen 公司; 用于启动子活性分析的 PGL3 系列质

粒及荧光素酶内参照质粒 PRL-TK 购自 Promega 公司; DNA 转染试剂 Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司; 双荧光素酶检测试剂购自 Promega 公司; 质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司; 各种限制性内切酶、DNA 连接酶、胶纯化回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司; 实验中所用引物用 Primer premier3 软件设计, 由上海英俊技术公司合成. pcDNA3.1/Sp1 表达质粒(上海市肿瘤研究所朱景德教授惠赠).

1.2 方法

1.2.1 转录起始点的确定.

a. 已知序列验证. 根据 *LCRG1* 已知序列 (GenBank No. AF268387)设计验证用引物. Trizol 法提取培养正常喉黏膜细胞中的总 RNA. 先用 DNase I 消化总 RNA 中的痕量 DNA: 反应总体积 50 μ l, 总 RNA 10 μ g, DNase I 5U, RNasin 50U, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 10 mmol/L MgCl₂, 37°C 消化 30 min. 苯酚氯仿抽提, 乙醇沉淀, DEPC 处理水溶解, 紫外分光光度计测定 RNA 浓度. 取总 RNA 4 μ g, 按 Reverse Transcription System 提供的操作程序进行逆转录反

* 国家自然科学基金资助项目(30572030).

** 通讯联系人.

Tel: 0734-8281510, E-mail: xhl0078@sina.com.cn

收稿日期: 2007-10-30, 接受日期: 2007-12-16

应. CTB117 R780/ CTB117 F393 为引物(表 1)进行 PCR 扩增. 使用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0(Code No. DV805A)切胶回收约 300 bp 片段, 命名为 CTB117-1. 将 CTB117-1 DNA 以 CTB117 R780/ CTB117 F393 为引物(表 1)进行测序.

b. 使用 TaKaRa 5' -Full RACE Kit 进行 5'RACE. 根据已知序列设计 5'RACE 基因特异性引物. 使用 TaKaRa 5' -Full RACE Kit (Code No. D315)对正常喉黏膜总 RNA 进行 CIAP、TAP 处理, 并与 5'RACE 接头连接后, 反转录合成 cDNA, 同时进行 M-MLV(-)与 TAP(-)实验. 以上述 cDNA 为模板, 使用 TaKaRa LA Taq® (Code No. DRR002A), 5'RACE 外侧引物 /CTB117 R780 为引物 (表 1) 进行第一轮 PCR. 再以第一轮 PCR 产物为模板, 5'RACE 内侧引物 /CTB117 R501 为引物(表 1)进行第二轮 PCR 扩增. 使用 TaKaRa

Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0(Code No. DV805A)切胶回收 5'RACE 目的片段, 命名为 CTB117-5P-1、CTB117-5P-2、CTB117- 5P-3. 分别将 CTB117-5P-1、 CTB117-5P-2、 CTB117-5P-3 DNA 与 pMD 18-T 载体(Code No. D101A)连接, 热转化至 *E. coli* Competent Cells JM109 (Code No. D9052)中, 涂布平板, 37℃过夜培养. 挑选阳性菌落植菌, 提取质粒后将质粒 DNA 以 BcaBEST PrimerM13-47 为引物进行测序.

c. 5'RACE 序列验证. 以“已知序列验证”时合成的 cDNA 为模板, 使用 TaKaRa LA Taq® (Code No. DRR002A), CTB117 F24/CTB117 R501 (表 1)为引物进行 PCR 扩增验证 5'RACE 序列. 使用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0 (Code No. DV805A)切胶回收目的片段, 命名为 CTB117-3. 将 CTB117-3 分别使用 CTB117 F24/CTB117 R501 为引物测序.

Table 1 The primer sequences for RACE

Primer	Sequences (5'→3')	Product size /bp
CTB117 R780	5' TTCCTGCGACATTAGTCCCATAC 3'	(24 mers)
CTB117 F393	5' CTAAAGCAGTTCATTCAGCGACA 3'	(24 mers)
CTB117 R501	5' ACACTGCGACGACAACCAACACA 3'	(23 mers)
CTB117 F24	5' ACTGCCCGTAGAGGAAAC 3'	(18 mers)
5' RACE Outer primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA	(23 mers)
5' RACE Inner primer	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG	(34 mers)

1.2.2 生物信息学分析. 通过美国生物技术信息中心的 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) 查找人 *LCRG1* cDNA 序列(GenBank NO.AF268387). 将该序列与人 *LCRG1* 基因(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/>)进行比对, 得出 *LCRG1* 基因外显子和内含子在基因中的构成. 分析表明 *LCRG1* 基因由 8 个外显子组成, 该基因蛋白质编码位于第二外显子, 根据现有的 *LCRG1* 基因 mRNA 序列与 gDNA 序列进行 Blast 分析, 截取第二外显子起始密码子 ATG 前 4 327 bp gDNA 序列, 利用启动子分析软件, 预测启动子区域.

1.2.3 *LCRG1* 基因 5'端区域不同缺失片段启动子的 pGL3 报告基因质粒的构建. 载体质粒 pGL3 basic 不含启动子和增强子, 但含有萤火虫荧光素酶报告基因, 重组体中所含的启动子即是所要研究的 *LCRG1* 5'端启动子片段. 8 个构建的重组体分别命名为 pGL3-E1776 (E1776 为 -1191 ~+585)、

pGL3-E1318 (E1318 为 -1191 ~+127)、pGL3-E458 (E458 为 +127 ~+585)、pGL3-E904 (E904 为 -777 ~+127)、pGL3-E602 (E602 为 -475 ~+127)、pGL3-E481 (E481 为 -354 ~+127)、pGL3-E296 (E296 为 -169 ~+127)、pGL3-E177 (E177 为 -169 ~+8), 所含启动子分别相应于 *LCRG1* 基因序列的 -1191 ~+585, -1191 ~+127, +127 ~+585, -777 ~+127, -475 ~+127, -354 ~+127, -169 ~+127, -169 ~+8. 采用 PCR 方法从人喉正常黏膜基因组 DNA 中获得不同长度 *LCRG1* 基因 5'端片段, 上下游引物的 5'端分别引入 *Mlu* I 和 *Xho* I 酶切位点. 扩增片段用 *Mlu* I 和 *Xho* I 双酶切后, 连接到同样被这两种酶酶切的 pGL3 basic 载体中的多克隆位点内, 构建含 *LCRG1* 基因 5'调控序列和萤火虫荧光素酶报告基因的重组质粒. 重组质粒经酶切和测序进一步鉴定. 构建的重组质粒和相对应的引物(表 2). 另外重组体 pGL3-E89 (E89 为 -169 ~-78) 将全长

pGL3-E177 质粒分别用 *Nru* I 和 *Xho* I 酶切消化后, Klenow 酶补平, 电泳回收并纯化含载体的大片段(~5 K). 自连转化 DH10B 感受态菌, 挑取转化子, 抽质粒 *Sca* I 酶切鉴定, 测序结果正确. 重组体 pGL3-E88(E88 为-78~+8) 将全长 pGL3-E177 质粒分别用 *Nru* I 和 *Mlu* I 酶切消化后, Klenow 酶补平, 电泳回收并纯化含载体的大片段(~5 K). 自连转化 DH10B 感受态菌, 挑取转化子, 抽质粒 *Sca* I 酶切鉴定, 测序结果正确. 重组体 pGL3-E642(E642 为-1191~-549) 将全长 pGL3-E1776 质粒分别用 *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切消化后, Klenow 酶补平, 电泳回收并纯化含载体的大片段(~6 K). 自连转化 DH10B 感受态菌, 挑取转化子, 抽质粒 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定. 切出~670 bp 片段者为缺失子.

Table 2 The primer sequences for reporter plasmid constructs		
Primer	Sequences (5'→3')	Product size /bp
E1776	L acgcgtttgtcccgctctcagcctccc	1776
	R ctcgagaccgcgattccacacacgctc	
E 1318	L acgcgtttgtcccgctctcagcctccc	1318
	R ctcgagctcgctaacccccacctctg	
E 458	L acgcgtggcgaccacgaaaacggtga	458
	R ctcgagaccgcgattccacacacgctc	
E 904	L acgcgtcagtacttgcaccaaggag	904
	R ctcgagctcgctaacccccacctctg	
E 602	L acgcgttctgtctcccttttctactg	602
	R ctcgagctcgctaacccccacctctg	
E 481	L acgcgttagaattccctttgagagga	481
	R ctcgagctcgctaacccccacctctg	
E 296	L acgcgtcggggccacggcgggacgg	296
	R ctcgagctcgctaacccccacctctg	
E 177	L acgcgtcggggccacggcgggacgg	177
	R ctcgagggcgaggagtggaaggag	
LCRG1	L tgtcgagaaatgcaggatgaagt	206
	R tggacagcaccgcaagcctcataa	

1.2.4 瞬时转染. 质粒转染按 Lipofectamine 2000 使用说明进行. 转染前一天, 将 COS7、7721 以 5×10^5 个 / 孔的密度接种于 24 孔组织培养板, 细胞生长至 70%~80% 融合时, 加入 1 μ g 重组质粒、20 ng 的 PRL-TK 及 4 μ l Lipofectamine2000. 同时设立转染 pGL3 basic 阴性对照组和 pGL3 control 阳性对照组.

1.2.5 共转染实验. 为确定转录因子 SP1 对 *LCRG1* 基因启动子活性的调节作用, 将等量的真核表达质粒 pcDNA3.1/Sp1 和 *LCRG1* 基因核心启动子质粒 pGL3-E296 连同 PRL-TK 共转染 COS7 细胞和人肝癌细胞 7 721 细胞株, 检测 SP1 转录因

子对 *LCRG1* 启动子活性的影响(具体方法同瞬时转染).

1.2.6 荧光素酶报告基因活性检测. 按 Promega 公司提供的双荧光素酶检测方法进行. 弃去培养液, 用 1 $\times$ PBS 洗涤细胞 2 次, 每瓶加入 200 μ l $\times$ 细胞裂解液, 室温放置 15 min 后收集细胞, 冻融后 12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min. 吸取 20 μ l 上清液加入 100 μ l 荧光素酶底物(LAR II), 混合后用化学发光计测定荧光素酶发光值. 再加入 100 μ l 反应终止液(Stop & GIOR), 测定作为内标的海肾荧光素酶发光值, 两者比值即为荧光素酶的相对活性 RLA (relative luciferase activity). RLA 的数值为 3 次重复实验结果 $\bar{x}\pm s$.

1.2.7 统计学分析. 统计学分析方法采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为显著性差异.

2 结 果

2.1 人喉正常黏膜 LCRG1 基因转录起始位点的确定

使用 TaKaRa 5'-Full RACE 方法, 找到了人喉正常黏膜 *LCRG1* 基因转录起始位点(图 1~3). 图 1 显示验证序列与已知序列大小一致. 图 2 为巢式 PCR 的扩增电泳图, 利用 5'RACE 接头设计的正向内侧引物及特异的反向内侧引物扩增的片段, 长度约为 300 bp, 450 bp 和 600 bp. (见图 3 泳道 1). 将 3 条条带分别进行 T-A 克隆, 并对多个阳性克隆进行测序. 结果显示, 大部分约 450 bp 和 600 bp 5'RACE 接头之后的碱基是 A, 从而确定 *LCRG1* 基因的转录起始点为 A, 将转录起始位点 A 设为 +1, 该转录起始点位于翻译位点前 284 bp 处, 提前 *LCRG1* mRNA (GenBank No.AF268387) 5'端 47 bp, 并发现 AF268387 序列第 4 位缺一个碱基 A(图 4). 图 3 说明得到的 5'RACE 序列为根据已知序列得到的 5'RACE 序列.

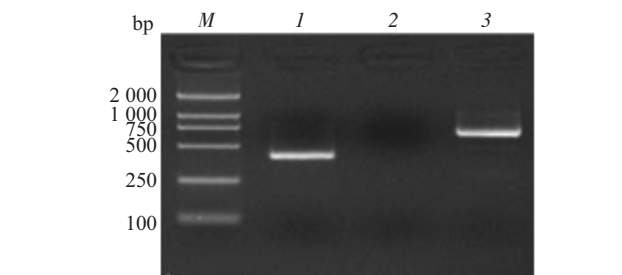


Fig. 1 Validation of *LCRG1* products in 2% agarose gel electrophoresis
M: DL2 000 marker; *1*: Primers using CTB117 R780/CTB117 F393; *2*: Primers using control with M-MLV(-); *3*: Primers using control.

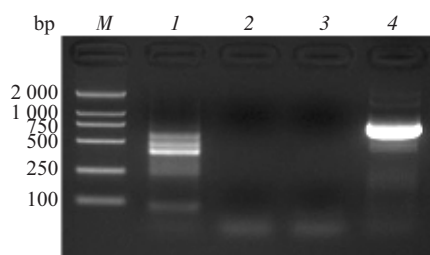


Fig. 2 Analysis of 5'RACE products in 1.5%

agrose gel electrophoresis

M: DL2 000 marker; *I*: Primers using 5' RACE Inner Primer/CTB117 R501; 2: Primers using control with TAP(-); 3: Primers using control with M-MLV(-); 4: Primers using control.

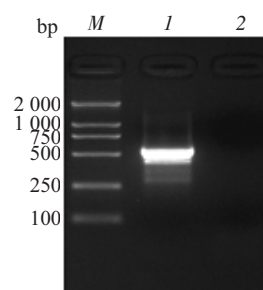


Fig. 3 Validation of 5'RACE products in 1.5%

agrose gel electrophoresis

M: DL2 000 marker; *I*: Primers using CTB117 F24/CTB117 R501; 2: Primers using control.

```

-656 ACAAGCTATCAGCACTTCACTATTTGCTGTCCCTCAGCGGGATCGGGATGCAGCTACGCAGCGGGCCCC -587
-586 TGGCGAGCCGCGGTGTCAGGGCCCTTTCTCCTCTTCCACCGTGGAAGCGAATTCAGTGGCGTCAAGG -517
-516 GCCAAGAGCCAGACCTGAGTTTGTCTCTCACCCCCGATGCTCGTCTCCCTTTTCTCACTGCCTTCCGCC -447
-446 CCCTCTGATCTCGACTTCTCGCAACCTATCCAGGTCTCTCTGGGCCTCTGCCCTGAGTCAGCCCCGAAT -377
-376 CAGACGGGCTTGACTCGCTGAAAGAATTCCTTTGAGAGGAGGCAGATTCCCTCTACATAGACGACAC -307
-306 CCTGACGTCGAGGGGCTTGCCCTCGTCCGTGGGGAAGCCTTCCCGGCCCGCGGCTGGGGCCTGAGGTTG -237
-236 GGCCGATCACCCCTCTACAGTCTAGTTCGGGTCTAGCGGAATGGCTGGGCTCCGAGAAGGGCGCCCG -167
-166 GCCACGGGCGGGACGGCCAGGGCGGCCCGCACCTCTGGGCGCAAATTTCTCCAGCGGGGTCCCCAGC -97
-96 GCGGCCAGCCCCAGTCTCGCGAGAGGACGTGGGTCCCGCCCGGCGCCCGACCCCGCCCGGCCACCTTC -27

-26 CCCTCGTCCCCCGCCCTCTTCTTCCACTCCCCGCGGCGCGAGCGGCTGACTGCCCCGTAGAGGAAACGAC +44
+1(5'RACE)
+45 ATTCGAGAGCTGCGCTCCCGCCAGGCCGCGCCTGACGCGGGCCTCGTCAGCCAGTAACAGGGAGCAGAGG +114
+1 of LCRG1 mRNA sequence
+115 TGGGAGTTAGCGAGGCGACCACGAAAACGGTGAAGGTGCGAACCGACAGCCTCCTCCGAGAAGGGTGAGG +185
  
```

Fig. 4 5'flanking sequence of *LCRG1* gene

2.2 人 *LCRG1* 基因在基因组中的分布

使用 UCSC 软件获得人 *LCRG1* cDNA 在基因组中的分布. 比对结果表明, 该基因位于人第 17 号染色体, 由 8 个外显子和 7 个内含子组成. 翻译起始点位于第 2 个外显子内, 1 外显子为非编码翻译区. 所有内含子都以 GT 开始, 以 AG 结束, 遵守 GTPAG 规律.

2.3 *LCRG1* 启动子的构建

截取第二外显子起始密码子 ATG 前 4 327 bp gDNA 序列用启动子预测软件对其进行分析, 结果显示 5'端以-489/+357 区域存在启动子可能性较大. 根据转录起始位点和生物信息学预测结果, 构建了一系列包含不同长度 *LCRG1*-5'端序列的荧光素报告质粒, 重组质粒酶切结果见图 5.

2.4 *LCRG1* 启动子活性分析

将构建好的重组质粒转染 7721 和 COS7 细胞, 同时转入内参质粒 PRL-TK. 通过检测萤火虫

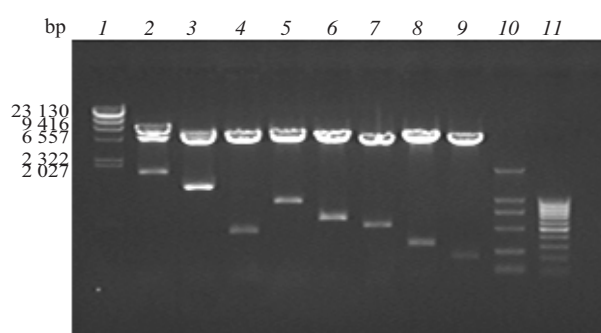


Fig. 5 Identification of recombinant plasmid by restriction enzyme digestion

1: λ -Hin III marker; 2: E 1776; 3: E 1318; 4: E 458; 5: E 904; 6: E 602; 7: E 481; 8: E 296; 9: E 177; 10: DL2000 marker; 11: 100 bp; respectively.

(*phofinus pyralis*) 荧光素酶与海肾(*renilla reniformis*) 荧光素酶活性的比值, 来反映启动子片段的活性. 每次转染均设立阴性和阳性对照组, 转染结果表

明: 构建组与空载体相比都有启动子活性. $-1\ 191\sim+585$ 启动子活性较低, 当删减 $+127\sim+585$ 区域后, $-1\ 191\sim+127$ 区域启动子活性显著升高, 而 $+127\sim+585$ 区域启动子活性很低, 说明 $+127\sim+585$ 区域可能存在负调控元件; $-1\ 191\sim-549$ 区域启动子活性很低这说明 *LCRG1* 启动子位于 $-549\sim+127$ 区域. 而 $-169\sim+127$ 启动子活性较 $-777\sim+127$ 、 $-475\sim+127$ 、 $-354\sim+127$ 区域升高, 其余各组差别不明显; $-169\sim+127$ 启动子活性较 $-169\sim+8$ 、 $-169\sim-78$ 、 $-78\sim+8$ 显著升高, 这进一步说明 $-169\sim+127$ 是 *LCRG1* 启动子核心区域 (图 6).

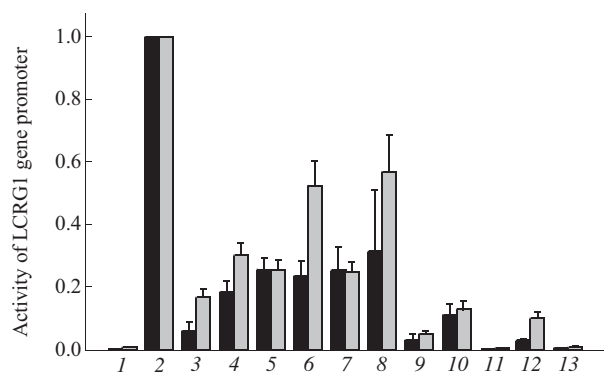


Fig. 6 Transient transfection analysis of the *LCRG1* promoter/PGL3 basic constructs in 7721 and COS7 cell

1: pGL3-basic; 2: pGL3-control; 3: E1776; 4: E1318; 5: E904; 6: E602; 7: E481; 8: E295; 9: E458; 10: E177; 11: E88; 12: E89; 13: E642; ■: 7721; □: COS7.

2.5 SP1 转录因子对 *LCRG1* 启动子活性的影响

将等量的真核表达质粒 pcDNA3.1/Sp1 与 *LCRG1* 基因的核心启动子质粒 pGL3-E296 进行共转染, 结果表明: 在人肝癌细胞 7721 细胞中 SP1 转录因子能增强 *LCRG1* 启动子活性, 但 $P > 0.05$ 没有统计学意义, 而在 COS7 细胞中 SP1 转录因子能增强 *LCRG1* 启动子活性, 且 $P < 0.05$ 有统计学意义 (图 7).

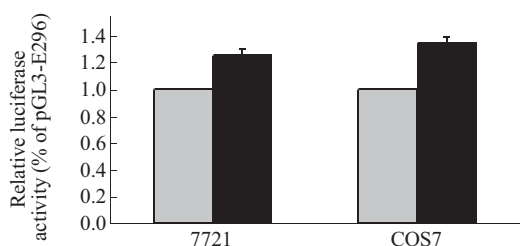


Fig. 7 Transient co-transfection analysis of the *LCRG1* promoter/pGL3-E296 and pcDNA3.1/Sp1 in 7721 and COS7 cells

□: 296; ■: 296+sp1.

3 讨 论

我们在 2000 年采用 mRNA 差异显示和 cDNA 文库筛选技术, 克隆了在喉癌组织中表达下调新基因 *LCRG1* (GenBank 登录号为 AF268387)^[3~5]. 生物信息学研究表明: *LCRG1* 定位在 17q12~21.1 上, 位于 D17S800~D17S930 之间, 正好位于 17q21.1 上喉癌的高频 LOH 区域^[9]. 由含有 8 个外显子和 7 个内含子组成.

通过 RT-PCR 检测发现 *LCRG1* 在喉癌 Hep-2、鼻咽癌 CNE2 和 HONE、结肠癌 SW620 和 HT29 及肝癌细胞系中表达缺失; RT-PCR 和 RNA 印迹发现其在 12/30 (40%) 的喉癌组织中表达缺失和下调^[4,5]. 将 *LCRG1* 基因转染到喉癌细胞 Hep-2 中, 发现增加 *LCRG1* 表达能使喉癌细胞生长速度减慢, 集落形成率降低, 裸鼠接种实验也进一步表明, *LCRG1* 能显著抑制移植瘤的生长^[9]. 这说明 *LCRG1* 基因可能是喉癌在该区段的候选抑瘤基因.

对 *LCRG1* 基因在喉癌组织中表达下调的可能分子机制进行了初步探讨. RNA 印迹表明 *LCRG1* 基因在喉癌组织中无缺失与重排, PCR-SSCP 分析也未发现其编码区存在突变. 因而基因缺失、基因重排、编码区突变不是 *LCRG1* 基因在喉癌中表达下调的机制. *LCRG1* 表达下调可能是喉癌发生发展的重要因素之一^[5], 但 *LCRG1* 自身调控机制尚不清楚.

为了深入研究 *LCRG1* 转录调控的过程, 有必要明确 *LCRG1* 基础转录的启动子部位, 启动子中存在着哪些顺式作用元件及所结合转录因子. 本研究采用 5' RACE 方法, 确定了喉正常黏膜中 *LCRG1* 转录起始位点碱基是 A, 位于翻译位点前 284 bp 处, 提前 *LCRG1*/mRNA (AF268387) 5' 端 47 bp, 并发现 AF268387 序列第 4 位缺一个碱基 G. 利用启动子分析软件对 *LCRG1* 基因进行生物信息学的初步分析表明, *LCRG1* 基因 5' 上游序列的一个显著特点是 GC 含量高, 具有一个 GC 盒但无典型的 TATA, 启动子内存在着数个潜在转录因子结合位点.

在生物信息分析的基础上, 我们对 *LCRG1* 基因 5' 上游序列片段 $-1\ 191\sim+585$ (1 776 bp) 进行了克隆和功能分析. 结果显示, 不同长度的人 *LCRG1* 基因 5' 上游序列片段驱动的荧光素酶报告载体的活性存在差异: $-1\ 191\sim+585$ 启动子活性较低, 当删减 $+127\sim+585$ 区域后, $-1\ 191\sim+127$

区域启动子活性显著升高, 而+127~+585 区域启动子活性很低, 说明+127~+585 区域可能存在负调控元件; -1 191~-549 区域启动子活性很低, 说明 *LCRG1* 启动子位于-549~+127 区域. -169~+127 启动子活性较-777~+127、-475~+127、-354~+127 区域升高, 其余各组差别不明显; -169~+127 启动子活性较-169~+8、-169~-78、-78~+8 显著升高, 进一步说明-169~+127 是 *LCRG1* 启动子核心区域. 有意思的是本研究还发现 *LCRG1* 在 COS7 细胞较 7721 高, 但各组趋势一致, 可能 COS7 细胞含有病毒强启动子对其活性有影响. 对这一区域进行转录因子结合位点预测发现: 该区存在着 5 个 SP1 的结合位点, 2 个 SP2 的结合位点及其他多种核转录因子如 ZF9、EKLF、E2F2-DP1 等的结合位点.

其中转录因子 SP1 (transcription factor sp1) 是一种 DNA 结合蛋白, SP1 能特异性地识别 GC 盒从而参与多种基因的转录调控, 参与调节细胞功能如细胞增殖、凋亡、分化和肿瘤形成^[7, 8]. 受 SP1 蛋白调节的基因有血管内皮生长因子 VEGF、胰岛素样生长因子结合蛋白、成纤维细胞生长因子受体、类上皮生长因子受体等. 此外, SP1 还可调节 bcl1、bax 等细胞凋亡相关蛋白的启动子, 通过调控细胞凋亡影响肿瘤细胞的生存和转移潜能^[8~11]. *LCRG1* 启动子核心区域含有 SP1 结合位点, 当转染真核表达质粒 pcDNA3.1/Sp1 后, 可以增强 *LCRG1* 启动子的活性. 鉴于 *LCRG1* 基因具有 SP1 结合位点, 又有研究表明, *LCRG1* 可能通过去磷酸化 GMP 合成酶和角蛋白 7 等蛋白质参与调节细胞生长、凋亡、分化和肿瘤形成^[12, 13]. 提示 SP1 可能通过与 *LCRG1* 启动子区域结合位点相结合, 对 *LCRG1* 的表达进行调节参与喉癌的分子发病过程. 但这一预测及 SP2、ZF9、EKLF、E2F2-DP1 等转录因子的作用, 尚需要进一步实验 (如共转染、EMSA 等) 加以证实.

总之, 本研究初步探讨了 *LCRG1* 5' 上游序列不同区域活性的差异. 确定了 *LCRG1* 的核心启动子区域, 为阐明 *LCRG1* 基因的表达调控机制提供

了有力的实验依据.

参 考 文 献

- 1 Manjarrez M E, Ocadiz R, Valle L, *et al.* Detection of human papillomavirus and relevant tumor suppressors and oncoproteins in laryngeal tumors. *Clin Cancer Res*, 2006, **12**(23): 6946~6951
- 2 Järvinen A K, Autio R, Haapa-Paananen S, *et al.* Identification of target genes in laryngeal squamous cell carcinoma by high-resolution copy number and gene expression microarray analyses. *Oncogene*, 2006, **25**(52): 6997~7008
- 3 李友军, 田芳, 陈主初, 等. 喉癌差异表达 cDNA 序列的分离与初步鉴定. *生物化学与生物物理学报*, 2000, **32**(2): 153~157
Li Y J, Tian F, Chen Z C, *et al.* *Acta Biochim Biophys Sini*, 2000, **32**(2): 153~157
- 4 李友军, 谢海龙, 陈主初, 等. 喉癌相关基因 *LCRG1* 的克隆和表达分析. *生物化学与生物物理学报*, 2001, **33**(3): 315~319
Li Y J, Xie H L, Chen Z C, *et al.* *Acta Biochim Biophys Sini*, 2001, **33**(3): 315~319
- 5 Li Y, Chen Z. Molecular cloning and characterization of *LCRG1* a novel gene localized to the tumor suppressor locus D17S800-D17S930. *Cancer Lett*, 2004, **209**(1): 75~85
- 6 Li Y J, Zhang X P, Chen Z C, *et al.* *LCRG1* suppresses tumor growth *in vivo* by liposome-mediated gene transfer. *Chin J Cancer Research*, 2002, **14**(2): 113~117
- 7 Yu B, Datta P K, Bagchi S. Stability of the Sp3-DNA complex is promoter-specific: Sp3 efficiently competes with Sp1 for binding to promoters containing multiple Sp-sites. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**(18): 5368~5376
- 8 Suske G. The Sp-family of transcription factors. *Gene*, 1999, **238**(2): 291~300
- 9 French S W, Malone C S, Shen R R, *et al.* Sp1 transactivation of the TCL1 oncogene. *J Biol Chem*, 2003, **278**(2): 948~955
- 10 Li L, He S, Sun J M, *et al.* Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem Cell Biol*, 2004, **82**(4): 460~471
- 11 Grinstein E, Jundt F, Weinert I, *et al.* Sp1 as G1 cell cycle phase specific transcription factor in epithelial cells. *Oncogene*, 2002, **21**(10): 1485~1492
- 12 Zhang X, Xiao Z, Chen Z, *et al.* Comparative proteomics analysis of the proteins associated with laryngeal carcinoma-related gene 1. *Laryngoscope*, 2006, **116**(2): 224~230
- 13 章晓鹏, 肖志强, 李萃, 等. 应用磷酸化蛋白质组学方法初步研究喉癌相关基因 *LCRG1* 的功能. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32**(6): 508~516
Zhang X P, Xiao Z Q, Li C, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32**(6): 508~516

Cloning and Identification of Promoter of Human *LCRG1* Gene*

XIE Hai-Long¹⁾**, CHEN Zhu-Chu²⁾, LI Jin-Hua¹⁾

¹⁾Institute of Cancer Research, Nanhua University, Hengyang 421001, China;

²⁾Institute of Cancer Research, Central South University, ChangSha 410078, China)

Abstract Laryngeal carcinoma related gene 1 (*LCRG1*) is a candidate tumor suppressor gene of Laryngeal carcinoma. To further investigate its transcriptional regulation, the transcriptional start sites for *LCRG1* gene have been identified by 5' RACE (rapid amplification of cDNA ends) based on the bioinformation analysis of *LCRG1*. Then eleven luciferase expression vectors which contained potential human *LCRG1* gene promoter were constructed. Luciferase reporter assay indicated that *LCRG1* promoter region was mainly located in -169~+127 region nearby the major transcriptional start site. These results suggested that the region (-169~+127) includes an essential promoter for human *LCRG1* gene transcription.

Key words *LCRG1*, Laryngeal carcinoma, promoter, transcriptional regulation

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30572030).

**Corresponding author.

Tel: 86-734-8281510, E-mail: xhl0078@sina.com.cn

Received: October 30, 2007 Accepted: December 16, 2007