

LCRG1 基因启动子关键顺式调节元件的鉴定*

谢海龙^{1)**} 陈主初²⁾ 李金花¹⁾ 曾龙武¹⁾ 谭桂煌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 *LCRG1* 基因(laryngeal carcinoma related gene1, *LCRG1*)是一个新的喉癌候选抑瘤基因, 其转录调控机制一直未被阐明。通过限制性内切酶酶切介导对 *LCRG1* 基因(-169~+127)区域进行剪切体分析, 将 *LCRG1* 基因最小启动子定位于-169~-57。应用连接体扫描突变体分析, 将关键顺式作用元件确定在-137~-122。生物信息学提示该区存在 SP1、E2F1/DP1、EKLF 和 ZF9 转录因子结合位点。利用已知反式作用因子与报告基因质粒进行共转染, 提示 Sp1 为有效的反式作用因子, 且能上调 *LCRG1* 基因的表达。凝胶迁移阻滞实验确定 *LCRG1* 基因关键的顺式作用元件区域具有 Sp1 结合位点。*LCRG1* 基因启动子-137~-122 片段在该基因表达过程中可能起重要作用, 为 *LCRG1* 基因功能研究提供了新的证据。

关键词 *LCRG1* 基因, 喉癌, 最小启动子, 转录调控, 顺式作用元件, 转录因子 SP1

学科分类号 Q74

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00459

基因转录水平调控失调是肿瘤相关基因表达异常的常见机制之一。因此, 研究肿瘤相关基因的转录调控机制, 将增进对肿瘤相关性基因表达改变的分子机制的理解^[1, 2]。*LCRG1*(GenBank 登录号为 AF268387)是一个在喉癌表达下调新基因, 转录调控的机制目前尚不清楚^[3~5]。我们的前期研究发现, *LCRG1* 基因转录所必需的基因启动子序列在-169~+127 范围内^[6]。本研究准备从转录调控机制入手, 应用多种实验方法对 *LCRG1* 基因在转录水平上的表达调控元件进行研究。不仅能加深对 *LCRG1* 这个新基因的认识, 在很大程度上促进对其基因功能研究的开展, 还能为 *LCRG1* 基因与喉癌的相关性提供重要信息, 有助于进一步了解喉癌的发病机制。

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 为南华大学肿瘤研究所保存; DMEM、胎牛血清购自 Hyclone 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 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; 双荧光素酶检测试剂盒购自 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; 实验中所用引物均用 Primer premier 3 软件设计, 由上海英骏技术公司合成。pcDNA3.1-HA(上海市肿瘤研究所李宗海教授惠赠), pcDNA 3.1/SP1(上海市肿瘤研究所朱景德教授惠赠)。逆转录试剂盒购自 Promega 公司; Trizol™ 试剂购自 GIBCOL 公司; rabbit anti-SP1 和 goat anti-rabbit IgG 购自 Santa cruz 公司; ECL 化学发光检测试剂盒、蛋白质浓度测定试剂盒购自 Pierce 公司; TEMED, 尼龙膜, 硝酸纤维素膜购自 Amersham Pharmacia 公司; 核蛋白抽提试剂盒购自 Chemicon 公司。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析。利用 MatInspector 软件对 *LCRG1* 基因核心启动子区域潜在的转录因子结合位点进行预测, 网址为: <http://transfac.gbf.de/cgi-bin/matSearch>。

1.2.2 连接体扫描突变质粒构建^[7~9]。运用连接体

* 国家自然科学基金(30572030)和湖南省重点学科建设专项基金资助项目。

** 通讯联系人。

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

收稿日期: 2008-10-26, 接受日期: 2009-02-08

扫描突变技术构建 *LCRG1* 启动子的突变质粒. 用 PCR 搭桥突变的方法对含有 *LCRG1* 启动子的重组质粒 E296(-169~+127) 进行连接体扫描突变. 得到 17 个用 16 bp 无关序列(含有 *Xba* I、*Pst* I 或

*Bam*H I 限制性内切酶位点, LR1~ LR17, 序列见表 1) 替代的扫描突变质粒, 所有的突变序列都经过生物信息学分析, 不含转录因子结合位点(matrix match=0.8, core match=0.85).

Table 1 The primer sequences for linker scanning mutants

Oligonucleotides	Sequence(5'-3')	Restriction enzyme site
A	ccctatctcggctctattctttg	
B	aggctgcgaatgccatactgttg	
L1	TctagactgcagAGATcggccaggcg	(<i>Xba</i> I / <i>Pst</i> I)
R1	ATCTctgcagtctagaACGCGTAAAGACTCGG	
L2	tctagactgcagAGATgcacctctggcg	(<i>Xba</i> I / <i>Pst</i> I)
R2	ATCTctgcagtctagaTCCCGCCCGTGG	
L3	actagtagatgtcgacaattctccagcggg	(<i>Spe</i> I / <i>Sal</i> I)
R3	gtcgacatctactagtGGGGCCGCCCTGGC	
L4	agatctgcagactgttcccccagcggcc	(<i>Pst</i> I / <i>Spe</i> I)
R4	actagtctgcagatctGCGCCAGAGG	
L5	ctgcagtctagaAGATccccagctcgc	(<i>Pst</i> I / <i>Xba</i> I)
R5	ATCTtctagactgcagCCCCGCTGGAGAAAT	
L6	gcatgctctagaagatggacgtgggtcccg	(<i>Sph</i> I / <i>Xba</i> I)
R6	ATCTtctagagcatgcCTGGCCGCGCTG	
L7	tctagactgcagagatcgcccccagacc	(<i>Xba</i> I / <i>Pst</i> I)
R7	ATCTctgcagtctagaTCTCGGAGACTGG	
L8	ctgcagtctagaagatccgcccacatt	(<i>Pst</i> I / <i>Xba</i> I)
R8	ATCTtctagactgcagGGCGGGACCCACGT	
L9	tctagactgcagagatctgtcccccgcct	(<i>Xba</i> I / <i>Pst</i> I)
R9	ATCTctgcagtctagaGCGGGTTCGGGCG	
L10	tctagactgcagagatcttctccactccccg	(<i>Xba</i> I / <i>Pst</i> I)
R10	ATCTctgcagtctagaGGGAAGGTGGGGC	
L11	tctagactgcagagatcgccgcgagcgg	(<i>Xba</i> I / <i>Pst</i> I)
R11	ATCTctgcagtctagaGAGGGCGGGGACGAG	
L12	agatctgcagactagtctcccgtagagg	(<i>Pst</i> I / <i>Spe</i> I)
R12	actagtctgcagatctCGGGAGTGGAAG	
L13	tctagactgcagagatcgacattcgagc	(<i>Xba</i> I / <i>Pst</i> I)
R13	ATCTctgcagtctagaTCAGCCGCTCGC	
L14	tctagactgcagagatgtccccgccagg	(<i>Xba</i> I / <i>Pst</i> I)
R14	ATCTctgcagtctagaTTTCTCTACGGGC	
L15	tctagactgcagagatgccctgacgcgg	(<i>Xba</i> I / <i>Pst</i> I)
R15	ATCTctgcagtctagaGCAGCTCCGAATGTC	
L16	ggatcctctagaagatcgtcagccagtaacag	(<i>Bam</i> H I / <i>Xba</i> I)
R16	ATCTtctagagatccCGGCCTGGGCGGG	
L17	ggatccctgcagagatggagcagaggtgggag	(<i>Bam</i> H I / <i>Pst</i> I)
R17	ATCTctgcaggatccAGGCCCGCGTCAG	

1.2.3 荧光素酶报告基因表达载体的构建. 研究发现, LR8~LR13 这 6 个连续扫描突变体的活性均升高, 提示这一段 DNA 区域内可能存在负调控元件. 考虑到 LR1~LR7 这 7 个突变体呈活性下调趋势, 设想 *LCRG1* 最小启动子可能位于这一区域. 因此, 我们又针对 LR1~LR7 所在区段, LR8~LR13 的 DNA 区段以及 LR1~LR7 后面的 DNA 区

段重新构建 3 个缺失启动子 / 报告基因载体以确定最小启动子所在区域. 以 pGL3-E296 质粒为模板, 利用 PCR 方法将 112 bp 的启动子片段扩增出来, 其中 PCR 采用两步法, 条件为 94℃ 5 min, 94℃ 60 s, 68℃ 70 s, 72℃ 5 min, 30 个循环. PCR 产物用 *Mlu* I 和 *Xho* I 双酶切后装入 PGL3-Basic 相应的多克隆位点中, 命名为 pGL3-E112. pGL3-E96

方法同缺失子 pGL3-E112, 相关引物及其序列见表 2. pGL3-E180 的构建: 将 pGL3-E296 用 *Mlu* I 和 *Nar* I 双酶切消化后, 加 Klenow 酶, dNTPs 补平, 琼脂糖凝胶电泳后回收纯化载体大片段, 用 T4 DNA 连接酶自连载体大片段, 转化 TOP10 感受态菌, 挑取转化子, 质粒小量制备后用 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 产物中有约 210 bp 片段者为正确的转化子, 将转化子送测序验证. pGL3-E89 (E89 为-169~-78), pGL3-E88(E88 为-78~+8) 和 pGL3-E177 的构建见文献[6].

Table 2 The primer sequences for reporter plasmid constructs

Primer	Sequences (5'→3')	Product size (bp)
E112 L	CGACGCGTGGGCCACGGGCGG	112
R	CCGCTCGAGGGCGGGACCCACG	
E96 L	CGACGCGTCGGCGCCGACCCC	96
R	CCGCTCGAGTTCTCTACGGGCAGTC	

1.2.4 共转染实验. 为确定转录因子 SP1 对 *LCRG1* 基因最小启动子活性的调节作用, 将真核表达质粒 pcDNA3.1/Sp1 和 *LCRG1* 基因最小启动子质粒 pGL3-E112 连同 PRL-TK 共转染 COS7 细胞和人肝癌 7721 细胞株, 检测 SP1 转录因子对 *LCRG1* 最小启动子活性的影响(具体方法同瞬时转染).

1.2.5 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 PhRL-SV40 及 4 μ l Lipofectamine 2000. 同时设立转染 pGL3 basic 阴性对照组和 pGL3 control 阳性对照组.

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 细胞裂解液, 室温放置 15 min 后收集细胞, 冻融后 12 000 r/min 4℃ 离心 5 min. 吸取 20 μ l 上清液加入 100 μ l 萤火虫荧光素酶底物(LAR II), 混合后用化学发光计测定萤火虫荧光素酶发光值, 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 Western blot. 收集细胞, 用 4℃ 预冷的 PBS

(0.01 mol/L, pH 7.2~7.4) 重悬细胞, 每瓶细胞加 400 μ l 裂解液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 100 mg/L PMSF), 于冰上裂解 30 min, 4℃, 12 000 r/min 离心 5 min. 离心后的上清即为细胞总蛋白. BCA 法测定蛋白质的浓度, 50 μ g 细胞总蛋白提取物进行 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将蛋白质电转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 用 TBS 洗 2 次, 加入兔抗 SP1, 4℃ 摇床过夜, TBS 洗 3 次, 再加入二抗, 室温孵育 1 h, TBS 洗 3 次, 用 Pirece 公司的 ECL 试剂盒进行化学发光检测. X 光片压片、显影、定影.

1.2.8 RT-PCR. Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 用 DNase- I 消化 RNA 中的痕量 DNA: 反应体积 100 μ l, 总 RNA 10 μ g、DNase- I 10 U、RNasin 200 U、10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3)、10 mmol/L MgCl₂, 37℃ 30 min. 苯酚和氯仿抽提, 乙醇沉淀后, RNA 溶于 DEPC 处理的水中. 应用逆转录试剂盒 (Promega 公司) 进行逆转录. 将总 RNA 2 μ g 与 1 μ g oligo(dT)15 引物混合, 65℃ 变性 5 min, 冰上 2 min, 20 μ l 反应体系: 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.3), 75 mmol/L KCl, 6 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L dTT, 1 mmol/L dNTP, 15 U AMV 逆转录酶 (Promega 公司), 42℃ 60 min, 然后 95℃ 5 min. 尔后取逆转录产物 3 μ l 进行 PCR 反应, PCR 引物由上海英骏技术公司合成. a. 内对照 GAPDH 的引物, L 5' acccagaagactgtggatgg 3', R 5' aggggtc-tacatggcaactg 3', 扩增目的片段为 590 bp; b. *LCRG1* 基因的引物, L 5' cttgtcccatgtgttggtg 3', R 5' acttca - tccctgcattctcg 3', 扩增目的片段为 326 bp. 每管 PCR 中均同时加入内对照(GAPDH) 和目标片段引物, 反应参数为 94℃ 50 s, 55℃ 50 s, 72℃ 50 s, 25 个循环. PCR 产物点样于 1.5% 琼脂糖凝胶上, 电泳, EB 染色.

1.2.9 人肝癌细胞 7721 核蛋白抽提. 常规培养 7721 细胞至 80% 融合度时, 用预冷的 PBS 冲洗, 剥落细胞, PBS 冲洗, 然后按核蛋白抽提试剂盒抽提核蛋白, 最后收集上清, 吸取 2 μ l 上清采用 Bradford 法测蛋白质浓度, 其余储存于 -80℃ 备用. 探针标记: 采用生物素标记探针 (按 ROCHE 公司试剂盒操作说明标记). 合成冷探针, 用于特异性竞争分析.

1.2.10 电泳迁移率实验(EMSA). 探针设计如下: Sp1 (-143~-129), 5' GGCCCCGCACCCTCTGGG-

CGCAA 3' (标记探针); Sp1 (-143 ~ -129), 5' GGCCCCGCACCCTCTGGGCGCAA 3' (未标记探针); SP1 通用识别序列的 DNA 片段 coreSP1, 5' GCTCGCCCCGCCGCCCGATCGAAT 3' (未标记探针). EMSA(参考 ROCHE 公司试剂盒): 配制 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶进行预电泳, DNA 与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 MatInspector 软件预测

预测结果显示, 突变体 3 区域 16 bp 内可能有 4 个转录因子结合位点, 它们分别是 ZF9、SP1、EKLF 和 RB_E2F1_DP1(结果见图 1).

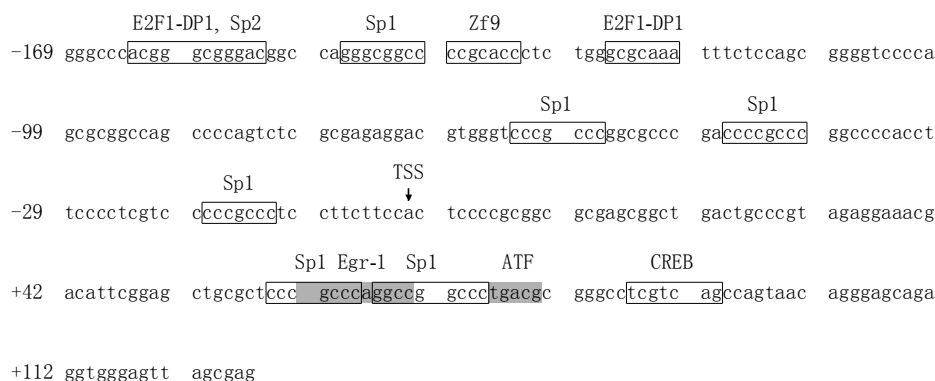


Fig. 1 Analysis of putative binding sites of transcription factors in the regulatory region of *LCRG1* gene (-169 ~ +127) by online program MatInspector

2.2 启动子连续扫描突变体报告基因载体的构建

以 16 bp 为单位, 用搭桥的方法, 以 -169 ~ +127 这一启动子片段为基础, 成功构建了 17 个突变体, 分别命名为 LR1、LR2、LR3、LR4、LR5、LR6、LR7、LR8、LR9、LR10、LR11、LR12、LR13、LR14、LR15、LR16、LR17.

2.3 脂质体法瞬时转染培养细胞及荧光素酶报告基因活性检测分析 17 个突变启动子 / 报告基因质粒对 *LCRG1* 基因启动子的活性变化

在确定该基因的启动子片段后, 针对生物信息学分析的结果, 启动子区域的下游约 40 bp 没有发现转录因子结合位点, 因此, 这一段野生序列不做突变分析. 此外, 考虑到启动子的长度, 我们采用连接体扫描突变(Linker scanning mutagenesis)的方法, 用 16 bp Linker(序列见表 1)顺次替换野生型 E296 启动子序列, 共构建了 17 个突变启动子 / 报告基因质粒 PGL3-LR1 ~ PGL3-LR17, 并通过瞬时转染检测各个突变启动子的活性. 结果发现: LR3 (-137 ~ -122)即突变体 3 在两种细胞中均几乎没有活性, 因此突变体 3 所突变的这 16 bp 所在部位可

以认为是启动子转录所需的关键的调控元件区域(图 2).

2.4 荧光素酶表达载体的构建

成功地构建了一系列包含不同长度 *LCRG1* 启动子序列的荧光素酶表达载体, 分别命名为 pGL3-E112 (-169 ~ -57), pGL3-E96 (-57 ~ +39), pGL3-E180(-53 ~ +127).

2.5 不同表达载体的荧光素酶相对活性

6 种荧光素酶表达质粒在两种细胞中都有表达, 在两种细胞中呈现相似的变化趋势. 我们发现: 在 7721 和 COS7 两种细胞中, pGL3-E112 的活性与已确定的有启动子活性的 pGL3-E296 比较, 活性较 pGL3-E296 高, 而 pGL3-E180 的活性明显下降, 这提示, 决定 *LCRG1* 基因转录活性的关键元件主要分布在 -57 上游, 而所构建的缺失克隆 P96 在两种细胞中几乎均丧失了启动子活性. 根据以上结果, 进一步将 *LCRG1* 基因的最小启动子定位于转录起始点上游 -169 ~ -57. 长度为 112 bp, 包含 *LCRG1* 基因关键的调控元件区域(图 3).

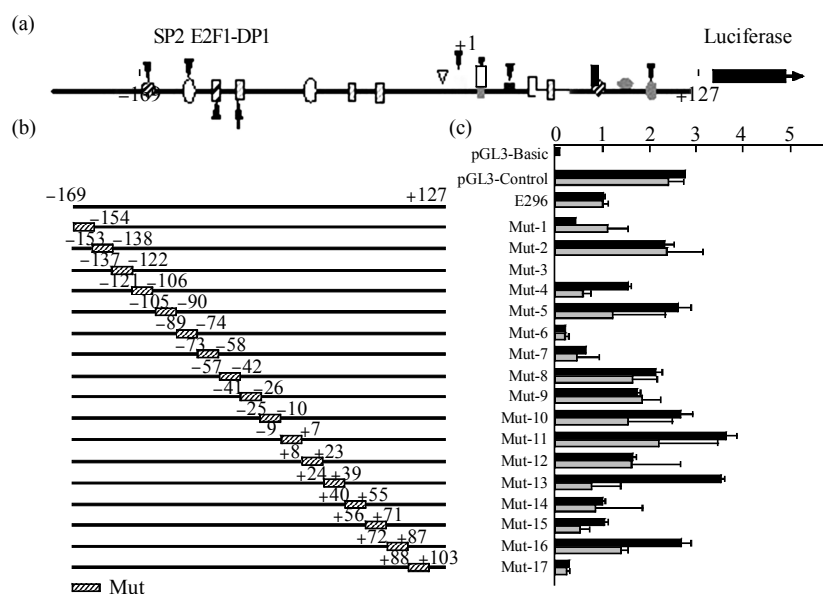


Fig. 2 The key *cis*-elements of the *LCRG1* gene minimal promoter

(a) Analysis of putative binding sites of transcription factors in the regulatory region of *LCRG1* gene (-169~+127) by bioinformatics analysis. (b) The luciferase reporter analysis of each of 16 bp linker scanning constructs of the -169~+127 region. (c) The luciferase reporter analysis of each of 16 bp linker scanning constructs of the -169~+127 region. ■: SMMC7721; □: COS7.

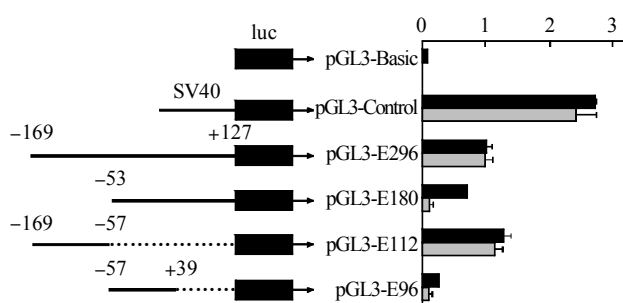


Fig. 3 Luciferase activity of different construct

in 7721 and COS7 cells

■: SMMC7721; □: COS7.

2.6 外源性转录因子 SP1 对 *LCRG1* 基因最小启动子活性的影响

针对外源性转录因子 SP1 对 *LCRG1* 最小启动子活性的上调作用的剂量效应分析, pGL3-E112 用量为 0.4 μg /孔, SP1 真核表达质粒用量为浓度梯度: 0.2 μg /孔, 0.4 μg /孔, 0.6 μg /孔, 0.8 μg /孔, 用校准质粒 pcDNA-HA 补平 DNA 加样量为 1.0 μg /孔. 实验结果显示: 在 7721 细胞中, 外源性的转录因子 SP1 对 *LCRG1* 最小启动子的活性有上调作用, 其上调作用在 0~0.6 μg 范围内随转染剂量的增大而增强. 当 Sp1 的转染剂量增大至 0.8 μg 时, 其上调作用反而下降, 但仍比转染 pGL3-E112 组活性高(图 4).

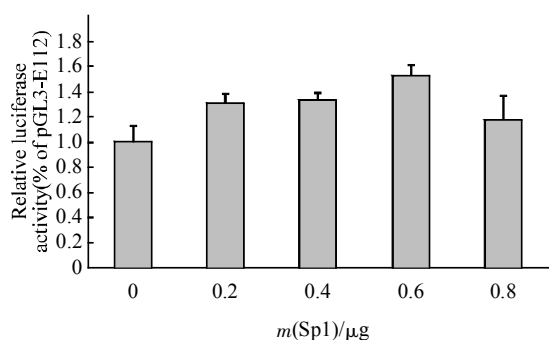


Fig. 4 Transient CO-transfection analysis of the *LCRG1* minimal promoter/PGL3-E112

and pcDNA3.1/Sp1 in 7721 cells

Luciferase activity of PGL3-E112 was regarded as 100%.

2.7 SP1 基因在转染细胞系 pcDNA3.1 (+) /SP1/7721 中的蛋白质表达

Western blot 结果表明, 在转染细胞系 pcDNA3.1(+)/SP1/7721 中 SP1 蛋白表达随 SP1 共转染量的加大而增高(图 5).

2.8 *LCRG1* 基因在转染细胞系 pcDNA3.1 (+) /SP1/7721 中的表达

RT-PCR 结果表明, *LCRG1* 基因在 pcDNA3.1(+)/SP1/7721 细胞中表达增高. 说明外源性 SP1 能上调 *LCRG1* 基因的表达(图 6).

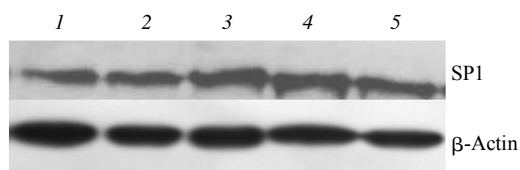


Fig. 5 Expression of SP1 protein in 7721 cells of transfection of pcDNA3.1/Sp1 by Western blot

1: 7721; 2: 7721+0.2 μ g pcDNA3.1(+)/SP1; 3: 7721+0.4 μ g pcDNA3.1(+)/SP1; 4: 7721+0.6 μ g pcDNA3.1(+)/SP1; 5: 7721+0.8 μ g pcDNA3.1(+)/SP1. β -Actin was used as control.

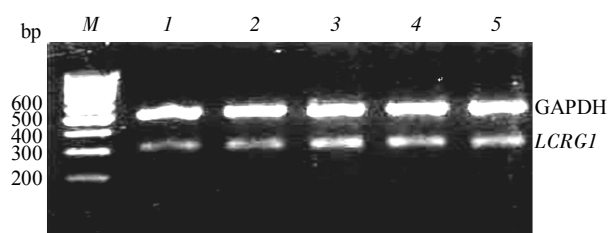


Fig. 6 Transcription factor SP1 up-regulates the endogenous expression of *LCRG1* gene

M: 100 bp marker; 1: 7721; 2: 7721+0.2 μ g pcDNA3.1(+)/SP1; 3: 7721+0.4 μ g pcDNA3.1(+)/SP1; 4: 7721+0.6 μ g pcDNA3.1(+)/SP1; 5: 7721+0.8 μ g pcDNA3.1(+)/SP1.

2.9 电泳迁移率分析确认 *LCRG1* 基因调控区转录因子结合位点

根据连接体扫描突变分析结果, *LCRG1* 基因启动子-137~-127区域的 DNA 序列对保持 *LCRG1* 启动子的活性非常重要. MatInspector 软件预测-137~-127区域可能有 4 个转录因子结合位点, 它们分别是 ZF9、SP1、EKLf 和 RB_E2F1_DP1; 而-137~-127位于 *LCRG1* 基因的最小启动子内, MatInspector 软件预测 *LCRG1* 基因的最小启动子内存在 2 个潜在的 SP1 结合位点, 实验结果显示: 在 7721 和 COS7 细胞中, 外源性的转录因子 SP1 对 *LCRG1* 最小启动子的活性有上调作用, 且 SP1 的上调作用随 SP1 共转染量的加大而增强. 为了证实-137~-127片段中的顺式作用元件可以特异结合核蛋白中的转录因子 SP1, 我们选择合成了 MatInspector 软件预测转录因子 Sp1 结合位点探针 Wt Sp1 (-143~-129)(图 7). EMSA 结果显示: Wt Sp1 探针与核蛋白结合形成 2 条 DNA-核蛋白复合物条带, 并且 20 倍野生型冷探针可以抑制 Wt Sp1 热探针与核蛋白结合, 而 20~50 倍的 SP1core 冷探针均能抑制 Wt Sp1 热探针与核蛋白

结合(图 7). 根据以上结果推测, *LCRG1* 基因调控区-137~-127 能特异性地结合转录因子 Sp1.

Competitor:	-	-	20x	20x	50x
			WT SP1	SP1core	
*Bio-WT SP1-Probe:	+	+	+	+	+
Nuclear extract:	-	+	+	+	+

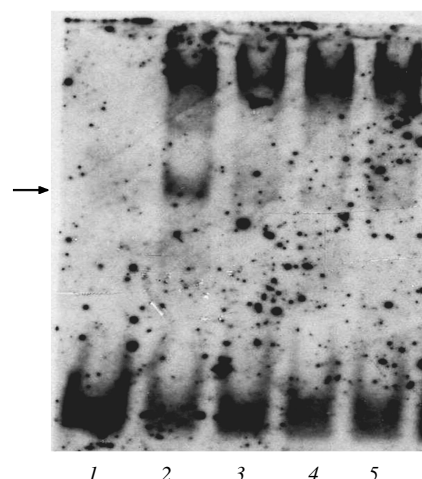


Fig. 7 The binding of transcriptional factor Sp1 to the key region of the *LCRG1* gene promoter

*Bio-WT SP1-Probe: Biotin-labelled DNA probe; Competitor: DNA probe without labeling; 7721 nuclear extracts were incubated with the Biotin-labelled double-stranded oligonucleotides WT SP1 (position -143~-129). 1: No nuclear extracts; 2: WT SP1 without specific competitor; 3: WT SP1 with 20 fold molar excess of WT SP1 competitor; 4: WT SP1 with 20 fold molar excess of SP1core competitor; 5: WT SP1 with 50 fold molar excess of SP1core competitor. The black arrowheads indicate SP1 site-specific complexes.

3 讨 论

研究表明, *LCRG1* 表达下调可能是喉癌发生发展的重要因素之一, 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^[3~5]. 提示转录水平的调控是 *LCRG1* 基因表达调控的重要模式之一.

基因启动子特异的 DNA 序列与特定的转录因子的相互作用, 决定基因表达的时间、空间和数量等特性, 也是基因表达调控的重要组成部分. 因此, 进行基因表达调控的研究就需要确定基因序列中的转录因子结合部位, 本实验中, 我们构建了一系列 16 bp 突变克隆, 涵盖了-169~+127, 通过检测这些突变克隆的启动子活性来分析启动子区域中含有哪些关键顺式作用元件, 即连接体扫描突变方法^[7~9]. 相对于针对转录因子结合位点突变的方法, 用连接体扫描突变的原因是: a. 通过生物信息学

预测的顺式作用元件很大程度上依赖于序列的相似性, 缺少体内实验的结果; b. 新方法还可以发现一些数据库中没有的新的转录因子识别位点. 瞬时转染及荧光素酶报告基因活性检测结果提示: LR3(-137~-122)即突变体 3 在两种细胞中均几乎没有活性, 因此, 突变体 3 所突变的这 16 bp 所在部位可以认为是启动子转录所需的关键的调控元件区域.

我们发现 LR8~LR13 这 6 个连续扫描突变体的活性均升高, 提示这一段 DNA 区域内可能存在负调控元件. 考虑到 LR1~LR7 这 7 个突变体呈现活性下调趋势, 我们设想可能 *LCRG1* 最小启动子位于这一区域. 为了验证 *LCRG1* 基因的最小启动子是否位于 LR1~LR7 这 112 bp 所在的 DNA 区域, 又对这 E296 bp DNA 片段构建了 6 个缺失启动子/报告基因载体, 并通过瞬时转染测定其在两种细胞系中的活性. pGL3-E112 表达活性最高, pGL3-E88 表达活性显著降低. 表明 *LCRG1* 基因最小启动子序列是位于转录起始点上游-169~-57 的 DNA 片段, 长度为 112 bp.

利用 MatInspector 软件对 16 bp 序列潜在的转录因子结合位点进行预测, 生物信息学分析结果提示, 在这 16 bp 区域可能存在 4 个转录因子结合位点, 它们分别是 SP1、E2F1/DP1、EKLf 和 ZF9 结合位点. SP1 蛋白对 GC 盒有很强的亲和力, 被认为是 SP 家族中功能最强的转录激活因子, 参与几乎所有的细胞功能, 包括细胞增殖、凋亡、分化和新生物的转化^[10]. 通常认为, Sp1 以细胞和启动子特异性方式通过调控富含 GC 启动子的基因表达, 参与调节细胞功能如细胞增殖、凋亡、分化和肿瘤形成^[11]. 此外, SP1 还可调节 Bcl-1、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^[10, 12~14]. 在 TATA-less 的启动子中, 往往会发现在转录起始点上游存在一个或者多个 Sp1 结合位点, 这些位点与 Sp1 结合后能够招募与 TATAbox 结合的相同的转录因子复合体与之结合, 从而起始基因的转录^[15]. 生物信息学分析发现: *LCRG1* 最小启动子是一个 TATA-less 的启动子, 在这个启动子上有 2 个 SP1 潜在结合位点. 作为肿瘤转移发生过程中重要的调节因子, 我们推测: *LCRG1* 的表达可能需要 SP1 结合到 *LCRG1* 启动子区域相应的结合位点, 进而调控转录活性. 因此我们将 *LCRG1* 基因最小启动子 pGL3-E112 与外源性的转录因子 Sp1 的真核表达载

体进行共转染, 探讨 Sp1 是否对 *LCRG1* 基因最小启动子的转录起活化作用. 结果发现, 外源性的转录因子 Sp1 能够上调 *LCRG1* 基因最小启动子的活性, 且其上调作用在 0~0.6 μg 范围内随转染剂量的增大而增强. 当 Sp1 的转染剂量增大至 0.8 μg 时, 其上调作用反而下降, 但仍比转染 pGL3-E112 组活性为高, 这可能是转染过程中脂质体的相对剂量较高, 对细胞的毒性作用所致. RT-PCR 结果亦显示: SP1 能上调 *LCRG1* 基因表达, 这些结果初步证实转录因子 SP1 对 *LCRG1* 基因表达的正性调控作用. DNA 凝胶阻滞实验是分析所预测的转录因子的重要方法, 我们选择合成了 MatInspector 软件预测转录因子 Sp1 结合位点探针 Wt Sp1(-143~-129), Wt Sp1 探针与核蛋白结合形成 2 条 DNA-核蛋白复合物条带, 并且 20 倍野生型冷探针可以抑制 Wt Sp1 热探针与核蛋白结合, 而 20~50 倍的 SP1core 冷探针能抑制 Wt Sp1 热探针与核蛋白结合. 根据以上结果推测, *LCRG1* 基因调控区-137 bp 至-127 bp 能特异性地结合转录因子 Sp1. 这提示 SP1 可能通过识别 *LCRG1* 启动子的关键顺式作用元件, 从而增强 *LCRG1* 基因启动子的转录活性. 其他位点和转录因子是否参与 *LCRG1* 的转录调控, 有待进一步研究.

总之, 本实验对 *LCRG1* 基因启动子关键的转录因子和顺式序列进行了系统的分析, 获得了一些有价值的有关该基因转录调控机制的新信息, 为进一步深入研究这一基因转录调控的分子机制打下了扎实的基础.

参 考 文 献

- 1 Joensuu E I, Abdel-Rahman W M, Ollikainen M, *et al.* Epigenetic signatures of familial cancer are characteristic of tumor type and family category. *Cancer Res*, 2008, **68**(12): 4597~4605
- 2 Chan D W, Lee J M, Chan P C, *et al.* Genetic and epigenetic inactivation of T-cadherin in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer*, 2008, **123**(5): 1043~1052
- 3 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
- 4 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
- 5 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

- 6 谢海龙, 陈主初, 李金花. 人 *LCRG1* 基因启动子的鉴定与初步分析. 生物化学与生物物理进展, 2008, **35**(6): 684~690
Xie H L, Chen Z C, Li J H. Prog Biochem Biophys, 2008, **35**(6): 684~690
- 7 Cai L, Zhu J D. The tumor-selective over-expression of the human Hsp70 gene is attributed to the aberrant controls at both initiation and elongation levels of transcription. Cell Res, 2003, **13**(2): 93~109
- 8 Mangan J K, Tantravahi R V, Rane S G, *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor-induced upregulation of Jak3 transcription during granulocytic differentiation is mediated by the cooperative action of Sp1 and Stat3. Oncogene, 2006, **25**(17): 2489~2499
- 9 Zhu J D, Fei Q, Wang P, *et al.* Transcription of the putative tumor suppressor gene HCCS1 requires binding of ETS-2 to its consensus near the transcription start site. Cell Res, 2006, **16**(9):780~96
- 10 Suske G. The Sp-family of transcription factor. Gene, 1999, **238**(2): 291~300
- 11 Rieber M, Strasberg Rieber M. Unequal nuclear Sp1/GC box DNA binding activity distinguishes proliferating from differentiated senescent or apoptotic cells. Int J Cancer, 1999, **83**(3): 359~364
- 12 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
- 13 Li L, He S, Sun J M, *et al.* Gene regulation by Sp1 and Sp3. Biochem Cell Biol, 2004, **82**(4): 460~471
- 14 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
- 15 O'Leary K A, McQuiddy P, Kasper C B. Transcriptional regulation of the TATA-less NADPH cytochrome P-450 oxidoreductase gene. Arch Biochem Biophys, 1996, **330**(2): 271~280

Characterization of Key Regulatory Elements of *LCRG1* Promoter*

XIE Hai-Long^{1)**}, CHEN Zhu-Chu²⁾, LI Jin-Hua¹⁾, ZENG Long-Wu¹⁾, TAN Gui-Huang¹⁾

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

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

Abstract *LCRG1* (laryngeal carcinoma related gene1, *LCRG1*), a new candidate tumor suppressor gene of laryngeal carcinoma. However, it is known little about the possible regulatory mechanisms of *LCRG1* gene expression. Restriction endonuclease digestion was used to obtain a set of the 5', or 3' deletion mutants from the region (−169~+127) of the *LCRG1* gene. It has been found that the minimal promoter of the *LCRG1* gene is mapped at the region from −169~−57. Linker scanning mutational analysis in the region (−169~+127) of the *LCRG1* gene was used to identify the crucial *cis*-elements within the promoter region, The key *cis*-elements are within the region from −137~−122. SP1, E2F1/DP1, EKLF and ZF9 transcription factor binding site sites were predicted in the region by bioinformatics analysis. Co-transfection with each of a panel of the expression plasmids of the known transcription factors with the relevant reporter construct indicates Sp1 is potent transcription factor for enhancement of the promoter activity, SP1 can also up-regulate the endogenous expression of *LCRG1* gene. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was applied to verify that the key *cis*-elements of *LCRG1* gene exist sequence of Sp1 binding sites. The findings, which showed that the key *cis*-elements within the region from −137~−122 play an important role in expression of the *LCRG1* gene, provide a novel evidence for further study of the function of *LCRG1* gene.

Key words *LCRG1* gene, laryngeal carcinoma, minimal promoter, transcriptional regulation, *cis*-elements, transcription factor Sp1

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00459

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30572030) and The Construct Program of The Key Discipline in Hunan Province.

**Corresponding author.

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

Received: October 26, 2008 Accepted: February 8, 2009