

C/EBP β mRNA 3'非翻译区 肿瘤抑制功能的分子机制*

——同时缺失 3 段短序列降低其肿瘤抑制活性

王海震 王 莹 孙达权 刘定干**

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要 CCAAT/ 增强子结合蛋白 β (C/EBP β) mRNA 的 3'非翻译区(3'UTR), 是先前工作发现的一个具有肿瘤抑制功能的 RNA 调控元件. 应用基因定点突变技术将该 3'UTR cDNA 上的三段核苷酸同时缺失掉, 将缺失突变体稳定转染人肝癌细胞系 SMMC-7721, 并检测了该缺失突变体对 SMMC-7721 细胞系表型的影响, 包括测定稳转细胞系的生长曲线、软琼脂集落形成能力、细胞集落形成能力及裸小鼠成瘤性. 研究发现, C/EBP β 3'UTR 中这三段短序列的同时缺失明显降低了 3'UTR 的肿瘤抑制活性, 使受其稳定转染的细胞系恶性显著增强. 人全基因组基因芯片分析和实时荧光 RT-PCR 分析结果表明, 与回复对照细胞相比, 缺失突变 3'UTR 稳定转染细胞中, 一些癌基因的表达量有所增加, 而一些抑癌基因的表达量有所下降, 这提示上述三段短序列是 C/EBP β 3'UTR 的肿瘤抑制功能所同时需要的.

关键词 C/EBP β , 3'非翻译区, 抑癌作用, 分子机制

学科分类号 Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00144

近年来的研究表明, 真核生物 mRNA 的 3'UTR 在基因表达调控和其 mRNA 定位中发挥着重要作用, 有些真核生物 mRNA 的 3'UTR 还与肿瘤发生和逆转有关^[1~5]. 我们也已发现 C/EBP β (CCAAT/enhancer binding protein- β)的 3'UTR^[6,7]具有肿瘤抑制功能. 此外, 从 20 世纪 90 年代至 21 世纪初, 已报道了 6 种真核生物 mRNA 的 3'UTR 具有抑制肿瘤生长的作用, 除 C/EBP β 3'UTR 外, 它们分别是: α -原肌球蛋白(α -tropomyosin, α -Tm)、阻抑素(prohibitin)、核糖核苷酸还原酶 R1 和 R2 以及 mel-18 基因的 3'UTR^[8~11]. 由于真核生物 mRNA 的 3'UTR 为非蛋白编码序列, 其肿瘤抑制作用可能是通过其自身序列与细胞内蛋白质因子相互作用引起的^[8,12], 但这一过程的具体机制目前仍不清楚. Jupe 在对阻抑素 3'UTR 的研究过程中发现, 该 3'UTR 的表达不但可以改变乳腺癌细胞的形态表型, 而且还能抑制其迁移活性^[13]. 对阻抑素 3'UTR 的深入研究发现, 其肿瘤抑制作用主要集中在该 3'UTR 的某个 / 某些关键核苷酸上. 如将其 3'UTR 上的第 729 位点作 C/T 转换之后, 则该 3'UTR 的肿瘤抑制作用基本消失^[14]. 我们近年

的研究也确定了在 C/EBP β 3'UTR 上存在三个可能的蛋白质结合序列^[15]. 本文研究了 C/EBP β 3'UTR 上三个可能的蛋白质结合序列对其自身抗癌功能的影响, 通过基因定点突变、体外和体内实验、基因芯片以及荧光定量 RT-PCR 等方法, 确定了上述三段序列对 C/EBP β 3'UTR 肿瘤抑制作用的影响.

1 材料与方法

1.1 实验动物和细胞系

人肝癌细胞系 SMMC-7721、回复对照细胞系 CL1(稳转 C/EBP β 3'UTR 的 SMMC-7721)^[12]及恶性对照细胞系 VEC(稳定转染 pCMV-script 空载体的 SMMC-7721)均由本室保存, 细胞置于添加 10%新生牛血清(杭州四季青生物工程材料公司, 超级)、0.3%谷氨酰胺、氨苄西林钠(50 U/ml)、硫酸链霉素

* 国家自然科学基金资助项目(39970172, 30540079, 30670449)和中国科学院上海生命科学研究院创新基金资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 021-54921135, Fax: 021-54921011, E-mail: dgliu@sibs.ac.cn

收稿日期: 2009-03-13, 接受日期: 2009-05-13

(50 mg/L)的 RPMI 1640 培养液中, 在 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱内培养; 裸小鼠(Balb/c *nu/nu*), 4~5 周龄, 购于中国科学院上海实验动物中心, 饲养于中国科学院上海生命科学院 SPF 动物房. 动物实验均遵循国家科委《实验动物管理条例》进行.

1.2 方法

1.2.1 质粒构建与转染. 按照基因定点突变试剂盒 (Gene Tailor Site-Directed Mutagenesis Kit, Invitrogen 公司)操作手册进行, 对克隆质粒 pSP64/0.28(克隆有 C/EBP β 3'UTR 序列)进行缺失突变, 将突变成成功 3'UTR 克隆至真核表达载体 pCMV-script 中, 构建成真核表达质粒 pCMV-N3. 用磷酸钙转染试剂盒 (Invitrogen) 将 pCMV-N3 转染肝癌细胞系 SMMC-7721, 经 G418 药物筛选得到稳定转染细胞系 N3.

1.2.2 细胞生长曲线. 取相等数量的 SMMC-7721、回复细胞 CL1、恶性对照细胞 VEC 及实验细胞 N3 分别于直径为 30 mm 培养皿培养, 按文献[16]所述方法绘制各细胞系生长曲线.

1.2.3 软琼脂集落形成试验. 取经高压灭菌的 0.6% Gibco Bacto-agar/RPMI 1640 培养基铺在 30 mm 培养皿内, 待其凝固. 细胞用胰酶处理取下, 悬于 RPMI1640 培养基, 多次计数后取含 1 000 个细胞的培养基量, 与 0.3% Gibco Bacto-agar/ RPMI 1640 培养基混合, 加至凝固的培养基上, 常规培养 2 周后观察, 显微镜下计数 ≥ 50 个细胞的集落, 每种细胞至少做 4 个重复, 取平均值. (琼脂的制备: 用三蒸水分别制备出 1.2%和 0.6% 2 个浓度的琼脂溶液, 高压灭菌后, 待其温度降到 40℃ 时再与 2 $\times$ RPMI 1640 完全培养基等体积混合).

1.2.4 细胞集落形成试验. 取对数生长期的细胞制成单细胞悬液, 计数后每种细胞接种 3 个 30 mm 培养皿, 每皿 1 000 个细胞, 每皿 2 ml RPMI 1640 完全培养基, 轻轻摇晃培养皿, 使细胞分布均匀, 常规培养 1~2 周, 其间不换液, 待培养皿中出现肉眼可见的克隆时, 吸去培养基, 用 D-Hank's 液轻轻洗 1 次, 然后每皿加入 1 ml 10%甲醇溶液固定细胞 30 s. 吸去甲醇溶液, 每皿加 1 ml 结晶紫染色液, 室温放置 20 min, 吸去染色液, 用蒸馏水洗涤, 将培养皿倒置于吸水纸上吸干水分并拍照.

1.2.5 裸小鼠成瘤试验. 选择 4~5 周龄的 Balb/c *nu/nu* 裸鼠, 雄性. 把对数生长期的实验组细胞及对照组细胞用胰酶取下, 无血清 RPMI 1640 培养液洗涤 3 次, 计数后, 离心收集细胞, 重悬于无血

清 RPMI 1640 培养液. 在每只裸小鼠背部皮下注射 0.15 ml 的细胞悬液, 含 5 $\times 10^6$ 个细胞. 全部操作在 2 h 内完成, 细胞从取出到注射前保持 0~4℃ 低温. 肿瘤的测量使用电子读数游标卡尺. 肿瘤体积的计算公式是 $V=0.5 \times a \times b^2$, (a 表示长径, b 表示短径)^[17, 18], 4 周后处死裸鼠, 剥离肿瘤, 称湿重, 进行统计学分析.

1.2.6 细胞总 RNA 提取和基因芯片检测. 采用 Trizol(Invitrogen 公司)一步法抽提细胞总 RNA, 检测样品溶液浓度和纯度, 以变性琼脂糖凝胶电泳检测样品完整性后, 将样品委托上海康成生物工程有限公司, 进行人细胞全基因组表达谱基因芯片检测分析.

1.2.7 荧光定量 RT-PCR 检测. 采用荧光定量 RT-PCR, 按照 PCR 试剂盒使用说明, 进行基因芯片结果的验证. 细胞总 RNA 按照 TRIzol(Invitrogen 公司)所带说明抽提, 最终将 RNA 溶于 DEPC 处理的三蒸水中, 存于 -70℃, 各基因引物序列见表 1, β -actin 基因作为内参基因.

Table 1 Primers used for real-time PCR analysis

Genes	Primer sequences	PCR products/bp
CABLES1	5' TTGAAGTTGGACGGAGGAAG 3' 5' AGGAGGTGGAGTCTATGGTA 3'	169
DUSP6	5' GCCAAAGACTCCACCAACTT 3' 5' GCTCCAGTGATCCGAGATG 3'	141
SLC6A6	5' GATCATCATAGCCACTACAC 3' 5' TAGACATTCAGGAGGGACAC 3'	117
SLC25A6	5' GAAAGTCAGGCACAGAGCG 3' 5' TGCACGGAGACACTGAAGC 3'	109
TP53	5' TGCTCAGATAGCGATGGTCT 3' 5' GTTGTAGTGGATGGTGGTAC 3'	162
CSF1R	5' AGGGAATCCCAGTGATAGAG 3' 5' ACAGGGTCCAGTGAGGTGA 3'	129
SLA	5' GAAGACTGTGGACTGGAGG 3' 5' CTCTCGAAGGCCATAGCTG 3'	106
CNKSR2	5' TGAGTTGCGCCAGTCTTAT 3' 5' TCTTGCGAATGGGAGACACT 3'	135
VAV3	5' CATCGCTCGGTATGACTTCT 3' 5' CCTGCCATTACTTCTCTCT 3'	124
β -Actin	5' AACACCCCAGCCATGTACG 3' 5' AATGTCACGCACGATTTCCT 3'	255

2 结 果

2.1 重组表达质粒 pCMV-N3 的构建与转染

我们先前的研究提示, 在 C/EBP β 3'UTR 上的

1~10 bp、130~150 bp 和 249~282 bp 三段核苷酸序列为 C/EBP β 3'UTR 上可能的蛋白质结合位点^[5], 应用定点突变试剂盒将 3'UTR 上的上述三段核苷酸序列缺失掉, 然后将缺失突变的 3'UTR 亚克隆到真核表达载体 pCMV-script 的 *Pst* I / *Eco*R I 位点之间构建重组质粒 pCMV-N3, 重组质粒构建示意图如图 1 所示. 重组质粒经上海桑尼生物科技有限公司测序证明正确. 之后将重组质粒做 EB-氯化铯梯度超离心提纯后按磷酸钙转染试剂盒(Invitrogen 公司)操作指南所述方法转染 SMMC-7721 细胞, 48 h 之后换用含高浓度 G418(2 g/L) 的选择性培养基筛选. 采用高 G418 浓度是为了克服该肝癌细胞系内在的药物抗性^[12]. 经 G418 筛选培养 2~3 周后, 获得稳定转染细胞系. Trizol 抽提细胞总 RNA 后做 RT-PCR, 扩增条带大小与预期值相符, 如图 2 所示.

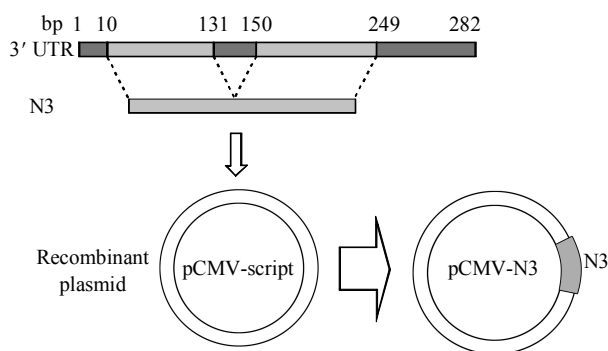


Fig. 1 Construction of the recombinant plasmid pCMV-N3

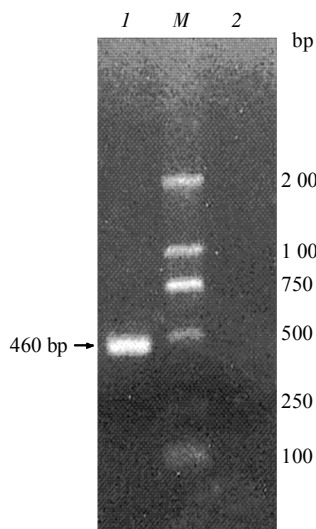


Fig. 2 RT-PCR results showing the expression of the transfected gene in the cells

M: DNA marker; 1: RT-PCR product of N3; 2: RT-PCR result of 7721 as negative control.

2.2 细胞生长曲线

取实验组细胞 N3、恶性对照细胞 VEC、SMMC-7721 及回复对照细胞 CL1 分别绘制其生长曲线, 每个时间点至少做 3 个重复, 最后取其平均值, 由图 3 可见, 实验组细胞 N3 比回复对照细胞 CL1 的生长速度稍快一些, 而 N3 与恶性对照细胞 VEC 和 SMMC-7721 的生长速度相近.

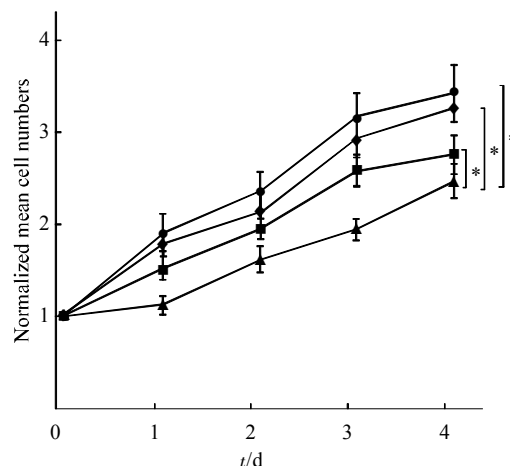


Fig. 3 Growth curves of the 4 cell lines

$\bar{x} \pm s$, $n \geq 3$. * $P < 0.001$. ◆—◆: VEC; ■—■: N3; ▲—▲: CL1; ●—●: 7721.

2.3 软琼脂集落形成能力

恶性细胞在软琼脂中形成集落的能力体现了细胞恶性度的强弱^[9]. 我们发现, 实验组细胞 N3 的软琼脂集落形成能力远大于其回复对照组细胞 CL1, 而与恶性对照组细胞 VEC 和 SMMC-7721 的集落形成能力非常接近, 表明实验组细胞 N3 的恶性度要明显强于回复对照细胞(图 4).

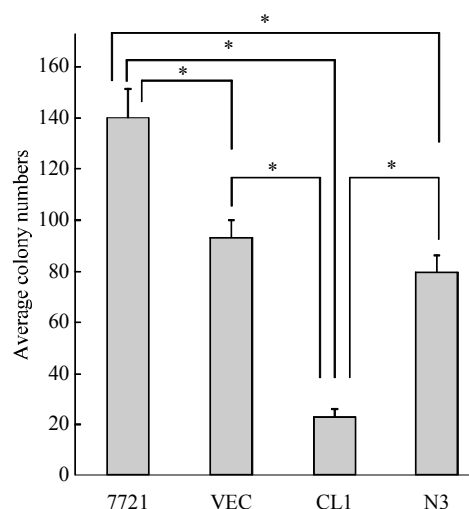


Fig. 4 Clony numbers of the tested cells in soft-agar colony formation ability of the tested cells in soft agar

$\bar{x} \pm s$, $n \geq 4$. * $P < 0.001$.

2.4 细胞集落形成试验

在相同的培养条件下, 恶性细胞的集落形成能力也可体现细胞恶性度的强弱. 由图 5 可见, 实验组细胞 N3 与回复对照组细胞 CL1 相比, 其在相同时间、相同培养条件下形成的细胞集落要大, 并且数量也更多些, 说明其集落形成能力要比 CL1 强, 而其集落形成能力接近恶性对照组细胞 VEC 和 SMMC-7721 细胞.

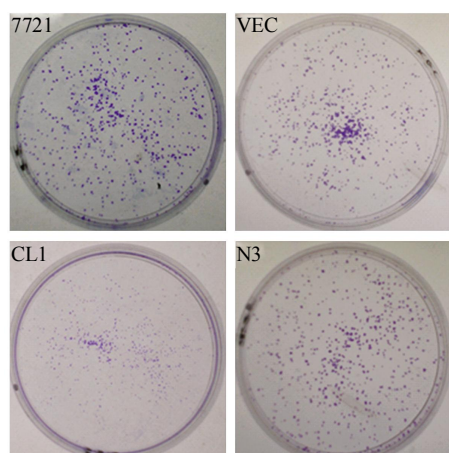


Fig. 5 Colony formation rates of 4 cell lines

2.5 裸小鼠体内成瘤性

实验组和对照组细胞在注射裸鼠 3 天后, 所有的裸鼠都长出了绿豆大小的白色瘤结节. 自接种细胞后 3 天起, 每间隔 3 天测一次小鼠瘤体大小, 结果如图 6 所示. 一个月之后, 处死裸鼠, 剥离肿

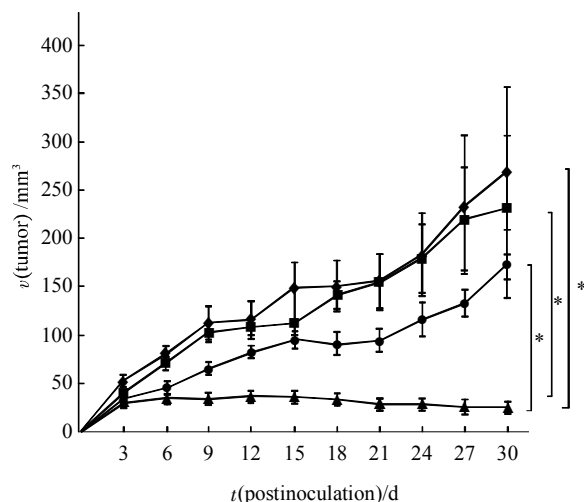


Fig. 6 Growth curves of tumors in nude mice

General growth rules of tumors in nude mice. The tumors were measured with electronic vernier caliper once every three days. $\bar{x} \pm s$, $n \geq 6$. * $P < 0.001$. ◆—◆: 7721; ■—■: VEC; ▲—▲: CL1; ●—●: N3.

瘤, 称湿重. 结果表明, 实验组细胞 N3 所生成的肿瘤要远大于回复对照组细胞 CL1 所形成的肿瘤, 两者差异显著, 而其与恶性对照组细胞 VEC 及 SMMC-7721 所形成的肿瘤大小相接近, 两者差异不显著, 如图 7 所示.

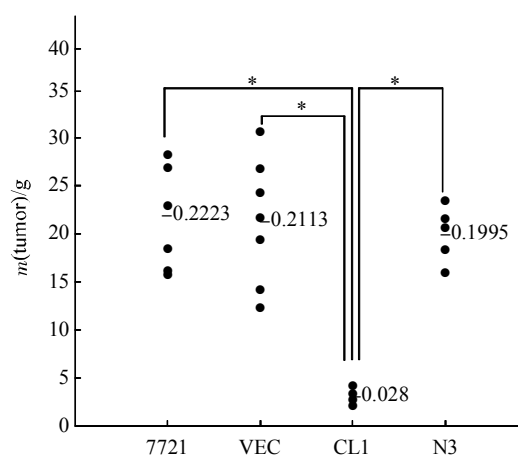


Fig. 7 Weights of dissected tumors

Horizontal lines represent mean values. Some tumors' weights are very similar and therefore their dots overlap. $\bar{x} \pm s$, $n \geq 6$. * $P < 0.001$.

2.6 基因芯片分析结果

为进一步确定 C/EBP β mRNA 3'UTR 上述核苷酸片段缺失所引起的细胞基因表达的变化, 取经相同条件培养的 N3 细胞与 CL1 细胞进行人细胞全基因组表达谱基因芯片检测分析, 结果如表 2 所示. 与回复对照细胞 CL1 相比, N3 细胞内一些基因的表达水平发生改变. 在表达差异大于 2.0 倍的基因中, 有一些肿瘤抑制基因 (如 p53 和 DUSP6) [20~23], 其表达水平分别下降至对照细胞的 41.5% 和 43.5%, 而一些与肿瘤发生有关的基因 (如 CSF1R 和 VAV3) [24~26] 表达水平有所提高, 其表达水平比对照细胞分别提高了 4.323 和 3.21 倍.

2.7 荧光定量 RT-PCR 分析结果

以上芯片分析结果用荧光定量 RT-PCR 进行了验证. 取表达上调的基因 SLC25A6、CSF1R、SLA、VAV3 和 CNKSR2 以及表达水平下调的基因 DUSP6、SLC6A6、TP53 和 CABLES1 作为目标基因, 分别设计针对这些基因的特异引物进行荧光定量 RT-PCR 检测, 结果如表 3 所示, 上述几种基因表达的荧光定量 RT-PCR 分析结果与基因芯片分析结果基本一致, 证实了芯片分析的可靠性.

Table 2 Genes whose expression levels changed significantly in N3 cells compared with that of CL1 cells

GenBank accession No.	Genes	Fold change N3/CL1	Description
Up-regulated genes			
NM_001636	SLC25A6	2.873	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier: adenine nucleotide translocator), member 6
NM_005211	CSF1R	4.323	Colony stimulating factor 1 receptor
NM_005748	SLA	2.096	Srt-like-adaptor
AB020700	CNKSR2	2.015	mRNA for KIAA0902 protein
NM_006113	VAV3	3.210	Homo sapiens vav 3 oncogene
NM_021005	NR2F2	3.318	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2
NM_000565	IL6R	2.816	Interleukin 6 receptor
NM_004613	TGM2	2.774	Transglutaminase 2
Down-regulated genes			
NM_001946	DUSP6	0.435	Dual specificity phosphatase 6
AB209172	SLC6A6	0.488	Solute carrier family 6
NM_000546	TP53	0.415	Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)
NM_138375	CABLES1	0.491	Cdk5 and Abl enzyme substrate 1
NM_016619	PLAC8	0.497	Placenta-specific 8
NM_005959	MT2A	0.491	Metallothionein 2A
NM_138967	SCAMP5	0.476	Secretory carrier membrane protein 5
NM_033515	ARHGAP18	0.441	Rho GTPase activating protein 18

Table 3 Real-time RT-PCR analysis of some up-regulated genes and down-regulated genes described in Table 2

Cells	Genes	Fold change	Genes	Fold change	Genes	Fold change
N3/CL1	SLC25A6	3.29 ± 1.05	DUSP6	0.48 ± 0.16	CSF1R	5.41 ± 0.93
	TP53	0.52 ± 0.14	VAV3	2.75 ± 0.31	CABLES1	0.51 ± 0.09
	SLC6A6	0.63 ± 0.07	SLA	2.67 ± 0.61	CNKSR2	2.69 ± 0.69

3 讨 论

迅速增殖是肿瘤细胞的主要特征之一，遏制肿瘤细胞迅速增殖是控制肿瘤发生的重要途径^[27, 28]。近年来的研究表明，真核生物 mRNA 的 3'UTR 作为与细胞内反式作用因子(主要是蛋白质)相互作用的主要元件，不但在基因表达调控和 mRNA 定位中发挥着重要作用，而且其调控功能可能还涉及细胞整体的正常增殖。早已发现，3'UTR 内部的突变可以引起疾病，即破坏细胞的正常生长(如强直性肌营养不良^[29]就是一个经典的例子)。而从 20 世纪 90 年代开始，发现了一批 3'UTR，其单独(不包括编码区)在恶性细胞中表达时能引起细胞恶性表型的逆转(回复)，即肿瘤恶性表型的抑制。然而，虽然这些 3'UTR 作用的存在无可置疑，但直到现在，它们的这种抗(抑)癌基因样的功能还没有得到满意的阐明。

Susan Davis 等^[30]在研究人原肌球蛋白 I (tropomyosin I，TPM1)的过程中发现，经表达纯化的 TPM1 3'UTR RNA 在体外可与 PKR(protein kinase RNA-activated)结合并激活 PKR。而 PKR 除可以磷酸化翻译起始因子 2 α (eIF-2 α)从而阻断 GDP-GTP 循环进而阻止蛋白质合成以外，还具有抑制细胞增殖和抑制肿瘤发生的作用^[31, 32]，由此推断，TPM1 的 3'UTR 的肿瘤抑制作用可能是通过激活 PKR 来完成的。另外，随着对 miRNA 研究的深入，现已明确 miRNA 的调控作用是通过其与靶 mRNA 的 3'UTR 进行序列互补配对完成的^[33~36]。Zhu 等^[37]的研究表明：TPM1 的 3'UTR 内存在一个微小 RNA-21(mir-21)作用的靶位点，mir-21 即通过与这个靶位点结合起调控作用。这一调控发生在翻译水平上，mir-21 与 TPM1 3'UTR 的结合只改变 TPM1 的蛋白表达量，而不改变其 mRNA 的转录水平，而 miRNA21 在肿瘤细胞内高表达，是一

个癌基因, 因此, Zhu 等认为 TPM1 3'UTR 的肿瘤抑制作用可能是通过对抗 miRNA21 来发挥的。

本文中, 我们发现, 将 C/EBP β 3'UTR 上三个短序列片段同时缺失之后, 导致这个 3'UTR 的肿瘤抑制功能明显降低。同时, 基因表达芯片分析又表明, 如 p53 等肿瘤抑制基因的表达显著降低, 而一些与细胞恶变有关的基因则被调高表达, 这也印证了上述细胞和动物水平的工作结果。总之, 我们的研究结果说明, 这 3 个短序列片段是 C/EBP β 3'UTR 的肿瘤抑制功能所必需的。Jupe 等在对阻抑素 3'UTR 肿瘤抑制作用的研究中发现, 阻抑素 3'UTR 的肿瘤抑制作用主要集中在该 3'UTR 的某个 / 某些关键核苷酸上^[14]。如果将其 3'UTR 上的第 729 位核苷酸作 C/T 转换, 则该 3'UTR 的肿瘤抑制作用基本消失。这与我们的研究结果相互印证, 提示真核生物 mRNA 的 3'UTR 抗癌基因功能确实与其某些特定的核苷酸序列有关。

我们和国际科学家都认为, 因为真核生物 mRNA 的 3'UTR 为非蛋白编码序列, 其肿瘤抑制作用很可能是通过其自身序列与细胞内因子相互作用引起的^[18-12]。事实上, 我们已发现, C/EBP β 3'UTR 能与包括细胞角蛋白及波形蛋白等细胞骨架蛋白在内的多种细胞蛋白发生相互作用^[38]。之所以选取文中所述的三段序列进行定点突变, 是因为先前工作提示它们可能是与细胞蛋白的结合位点。显然, 发现在与 C/EBP β 3'UTR 的相互作用中起关键作用的细胞蛋白质因子, 将意味着关于 C/EBP β 3'UTR 的肿瘤抑制功能分子机制的工作取得了突破。目前, 鉴定缺失突变体和细胞蛋白相互作用性质的工作正在进行中。

参 考 文 献

- Zhu S, Yoon K, Sterneck E, *et al.* CCAAT/enhancer binding protein-beta is a mediator of keratinocyte survival and skin tumorigenesis involving oncogenic Ras signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(1): 207~212
- de Moor C H, Meijer H, Lissenden S. Mechanisms of translational control by the 3' UTR in development and differentiation. *Semin Cell Dev Biol*, 2005, **16**(1): 49~58
- Kuersten S, Goodwin E B. The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nat Rev Genet*, 2003, **4**(8): 626~637
- Chabanon H, Mickleburgh I, Hesketh J. Zipcodes and postage stamps: mRNA localization signals and their trans-acting binding proteins. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2004, **3**(3): 240~256
- Rastinejad F, Blau H M. Genetic complementation reveals a novel regulatory role for 3' untranslated regions in growth and differentiation. *Cell*, 1993, **72**(6): 903~917
- 刘定干, 野田亮, 王 达, 等. 具有抗癌基因活性的一个 cDNA 克隆. *中国科学 (B 辑)*, 1991, **7**: 730~737
- Liu D G, Ye T L, Wang D, *et al.* Science in China(Series B), 1991, **7**: 730~737
- 刘定干, 李载平, 审良静男, 等. 回复系 RR 中一种与回复相关的蛋白表达增强. *中国科学 (B 辑)*, 1995, **7**: 372~378
- Liu D G, Li Z P, 审良静男, *et al.* Science in China(Series B), 1995, **7**: 372~378
- Rastinejad F, Conboy M J, Rando T A, *et al.* Tumor suppression by RNA from the 3' untranslated region of alpha-tropomyosin. *Cell*, 1993, **75**(6): 1107~1117
- Fan H, Villegas C, Huang A, *et al.* Suppression of malignancy by the 3' untranslated regions of ribonucleotide reductase R1 and R2 messenger RNAs. *Cancer Res*, 1996, **56**(19): 4366~4369
- Ishiwatari H, Nakanishi K, Kondoh G, *et al.* Suppression of tumor growth by the 3' untranslated region of mel-18 in 3Y1 cells transformed by the E6 and E7 genes of human papillomavirus type 18. *Cancer Lett*, 1997, **117**(1): 57~65
- Jupe E R, Liu X T, Kiehlbauch J L, *et al.* Prohibitin in breast cancer cell lines: loss of antiproliferative activity is linked to 3' untranslated region mutations. *Cell Growth Differ*, 1996, **7**(7): 871~878
- Liu D G, Jiang Q H, Wei Y Y, *et al.* Gene expression profile favoring phenotypic reversion: a clue for mechanism of tumor suppression by NF-IL6 3'UTR. *Cell Res*, 2003, **13**(6): 509~514
- Manjeshwar S, Lerner M R, Zang X P, *et al.* Expression of prohibitin 3' untranslated region suppressor RNA alters morphology and inhibits motility of breast cancer cells. *J Mol Histol*, 2004, **35**(6): 639~646
- Manjeshwar S, Branam D E, Lerner M R, *et al.* Tumor suppression by the prohibitin gene 3' untranslated region RNA in human breast cancer. *Cancer Res*, 2003, **63**(17): 5251~5256
- 孙 丽. C/EBP β 抑制恶性细胞增殖以及在 ES 细胞分化过程中的功能研究: [学位论文]. 上海: 中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所, 2007
- Sun L. The study of C/EBP β in tumor suppression and murine ES cell differentiation: [Thesis]. Shanghai: Institute of Biochemistry and Cell Biology of CAS, 2007
- Liu D G, Noda M, Wang D, *et al.* A cDNA clone with antioncogene activity. *Sci China B*, 1991, **7**: 730~737(Chinese); *Sci China*, 1992, **35**: 822~833(English)
- Sun L, Fu B B, Liu D G. Systemic delivery of full-length C/EBP β /liposome complex suppresses growth of human colon cancer in nude mice. *Cell Res*, 2005, **15**: 770~776
- Ramesh R, Saeki T, Templeton N S, *et al.* Successful treatment of primary and disseminated human lung cancers by systemic delivery of tumor suppressor genes using an improved liposome vector. *Mol Ther*, 2001, **3**: 337~350
- Michael R, Meredith V, Albert B. An essential role for p120-catenin in Src- and Rac1-mediated anchorage-independent cell growth. *J Cell Biol*, 2009, **184**(3): 437~450
- Campisi J. Cancer and ageing: rival demons?. *Nat Rev*, 2003, **3**: 339~349
- Vijg J, Suh Y. Genetics of longevity and aging. *Annu Rev Med*, 2005, **56**: 193~212
- Lawrence A. Does p53 affect organismal aging?. *J Cell Physiol*,

- 2002, **192**: 23~33
- 23 Furukawa T, Sunamura M, Motoi F, *et al.* Potential tumor suppressive pathway involving DUSP6/MKP-3 in pancreatic cancer. *Am J Pathol*, 2003, **162**: 1807~1815
 - 24 Eva S. The role of CSF-1 in normal physiology of mammary gland and breast cancer: An Update. *Exp Biol Med*, 2004, **229**(1): 1~11
 - 25 Barry M. CSF-1 and its receptor in breast carcinomas and neoplasms of the female reproductive tract. *Mol Reprod Dev*, 1997, **46**(1): 71~74
 - 26 Kiwon L, Yin L, Jun Q, *et al.* Vav3 oncogene activates estrogen receptor and its overexpression may be involved in human breast cancer. *BMC Cancer*, 2008, **8**(158): 158 doi: 10.1186/1471-2407-8-158
 - 27 Hanahan D, Weinberg R A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, **100**(1): 57~70
 - 28 Finger E C, Turley R S, Dong M, *et al.* TbetaR III suppresses non-small cell lung cancer invasiveness and tumorigenicity. *Carcinogenesis*, 2008, **29**(3): 528~535
 - 29 Junghans R P. Dystrophin myotonia: why focus on foci?. *Eur J Hum Genet*, 2009. [Epub ahead of print]
 - 30 Susan D, Julia C W. *In vitro* activation of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR by RNA from the 3' untranslated regions of human α -tropomyosin. 1996, **93**(1): 508~513
 - 31 Koromilas A E, Roy S, Barber G N, *et al.* Malignant transformation by a mutant of the IFN-inducible dsRNA-dependent protein kinase. *Science*, 1992, **257** (5077): 1685~1689
 - 32 Meurs E F, Galabru J, Barber G N, *et al.* Tumor suppressor function of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**(1): 232~236
 - 33 Soraya Y, I-hung Shih, David P. Bartel. MicroRNA-Directed Cleavage of *HOXB8* mRNA. *Science*, 2004, **304**(5670): 594~596; DOI: 10.1126/science.1097434
 - 34 Lai E C. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet*, 2002, **30**(4): 363~364
 - 35 Robins H, Press W H. Human microRNAs target a functionally distinct population of genes with AT-rich 3' UTRs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(43): 15557~15562
 - 36 de Moor C, Meijer H, Lissenden S. Mechanisms of translational control by the 3'UTR in development and differentiation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2005, **16**(1): 49~58
 - 37 Zhu S M, Si M L, Wu H L, *et al.* MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (*TPM1*). *J Biol Chem*. 2007, **282** (19): 14328~14336
 - 38 Liu D G, Sun L. Direct isolation of specific RNA-interacting proteins using a novel affinity medium. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**(15): e132

Molecular Mechanism of Tumor Suppression Activity of C/EBP β mRNA 3'UTR: Simultaneous Deletion of 3 Short Sequences in The 3'UTR Reduces Its Tumor Suppression Activity*

WANG Hai-Zhen, WANG Ying, SUN Da-Quan, LIU Ding-Gan**

(Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract The 3' untranslated region of CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β) is a regulation element with tumor suppression activity found in previous study. Here, it is reported that deletion of 3 short sequences in this 3'UTR reduces the tumor suppression activity of it, as demonstrated by slowed-down cell growth, reduced colony formation ability in soft agar and in ordinary culture conditions, as well as the decreased tumorigenicity in nude mice. The cDNA array and real-time RT-PCR analysis showed that the loss of tumor suppression activity for the mutated 3' UTR was due to the change of the gene expression profile of the transfected cells, i.e. the up-regulation of several genes related with malignant phenotype and the down-regulation of some genes related with tumor suppression, compared with the revertant control cells. These results indicate that those short sequences are simultaneous necessary for the tumor suppression activity of the C/EBP β 3'UTR.

Key words C/EBP β , 3'UTR, tumor suppression activity, molecular mechanism

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00144

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (39970172, 30540079, 30670449) and The Creation Foundation of Shanghai Institutes for Biological Sciences, The Chinese Academy of Sciences.

**Corresponding author.

Tel: 86-21-54921135, Fax: 86-21-54921011, E-mail: dgliu@sibs.ac.cn

Received: March 13, 2009 Accepted: May 13, 2009