

抑瘤基因 NGX6 启动子的克隆与功能鉴定*

刘敏姬¹⁾ 王晓艳¹⁾ 沈守荣^{1)**} 李楠¹⁾ 张德才¹⁾ 彭娅¹⁾ 郭勤¹⁾ 李桂源²⁾

(¹⁾中南大学湘雅三医院消化内科, 长沙 410013; (²⁾中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 NGX6 是一个结直肠癌候选抑瘤基因, 其转录调控机制不明. 采用生物信息学技术预测其启动子区, 并构建 NGX6 启动子荧光素酶报告基因重组体 pGL3/Enhancer/1126. 荧光素酶活性检测结果表明该区域具有强启动子活性. 应用 PromoterInspector program, FISTEF, CpGplot 和 MatInspector Professional 软件分析发现, NGX6 基因转录调控区为一个不含 TATA 盒, 而含有 CAAT 盒的 GC 富集区. 凝胶迁移阻滞实验确定 NGX6 基因启动子区域具有 Sp1 特异性结合位点, Sp1 特异性阻断剂光神霉素(mithramycin A)能明显抑制 NGX6 启动子的活性和 NGX6 基因的表达; 封闭内源性 Sp1 能下调 NGX6 基因 mRNA 表达水平.

关键词 NGX6, 转录调控, 启动子, Sp1

学科分类号 Q257, R735

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00102

NGX6 基因是采用定位候选克隆策略克隆的一个新的抑瘤基因^[1], 定位于染色体 9p13.3. NGX6 基因编码 338 个氨基酸, 具有两个跨膜结构域和一个表皮生长因子样结构域(EGF-like domain)^[2]. 氨基酸序列比对结果显示 NGX6 基因编码蛋白与人 M83 蛋白(GenBank accession NM_021259)高度相似, 表明可能属于同一个跨膜糖蛋白超家族^[3]. 前期研究^[4]发现, NGX6 基因的表达与鼻咽癌、肠癌和肺癌的临床分期有关, 且在有转移的结直肠癌组织中表达明显下调. 进一步探索^[5-12]发现, NGX6 基因可能通过 EGFR 信号传导通路、Wnt/ β -catenin 通路和 MPAK/JNK 通路延缓肿瘤细胞的细胞周期由 G1 期向 S 期的进程, 抑制细胞增殖, NGX6 基因还能恢复细胞间隙连接通讯, 抑制肿瘤血管的生成, 进而抑制肿瘤细胞侵袭转移能力. 这些结果表明 NGX6 为一具有潜力的抑癌基因, 但其表达调控机制尚不清楚.

本研究利用生物信息学技术发现, NGX6 基因启动子区为一个不含 TATA 盒, 而含有 CAAT 盒的 GC 富集区, 具有 Sp1、Egr -1、RREB、P53、MYC-MAX 和 AP2 等多个转录因子结合位点. 采用 PCR 技术克隆 NGX6 基因候选启动子, 构建荧

光素酶报告基因重组体. 荧光素酶活性检测结果表明该区域具有启动子活性. 凝胶迁移阻滞实验结果显示转录因子 Sp1 能与 NGX6 基因启动子特异性结合; Sp1 特异性阻断剂光神霉素 A(mithramycin A)能明显抑制 NGX6 启动子的活性和 NGX6 基因的表达; 封闭内源性 Sp1 能下调 NGX6 基因 mRNA 表达水平. 这些研究为寻找结直肠癌新的分子诊治靶标奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

COS7、HT-29、SW480 以及 GES-1 细胞株为中南大学肿瘤研究所提供. pGL3/Control、pGL3/Enhancer、pGEM-T Easy、pSV- β -半乳糖苷酶表达

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2006CB910503), 国家自然科学基金(30770972), 湖南省自然科学基金项目(09JJ3066, 07JJ3075)和中南大学研究生学位论文创新工程(2009bsxt042)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0731-88618457, E-mail: ssr-35403@163.com

收稿日期: 2010-05-01, 接受日期: 2010-07-30

质粒购自 Promega 公司; 核酸分子质量标准 DL2000 Marker、LA Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、*Kpn* I 和 *Nhe* I 购自大连宝生物公司(TaKaRa 公司); Lipofectamine 2000 脂质体购于 Invitrogen 公司; E.Z.N.A 血液基因组 DNA 提取试剂盒购自美国 Omega 公司; 荧光素酶检测试剂盒、 β -半乳糖苷酶检测试剂盒均为 Promega 公司产品; 质粒抽提试剂盒和胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司; 核蛋白抽提试剂盒(NR-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents)和 LightShift 化学发光 EMSA 试剂盒购自 Pierce Biotechnology 公司; 光神霉素 A(mithramycin A)购自 Sigma 公司。

1.2 生物信息学分析

从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>) 数据库获得 NGX6 基因上游 13 kb DNA 序列. 应用在线软件 PromoterInspector(http://www.genomatix.de/cgi-bin/promoterinspector_prof/promoterinspector.pl) 和 FirstEF(<http://rulai.cshl.org/cgi-bin/tools/FirstEF/fef.cgi>) 分析并预测其候选启动子区域. CpGplot (<http://www.ebi.ac.uk/service/tmp/cpgplot>) 在线扫描 NGX6 基因 5' 上游调控区 CpG 岛. MatInspectorProfessional (http://www.genomatix.de/cgi-bin/matinspector_prof/mat_fam.pl) 预测该区域转录因子结合位点.

1.3 NGX6 启动子重组报告基因载体 pGL3/Enhancer/1126 的构建及鉴定

根据生物信息学预测的 NGX6 启动子 DNA 序列, 针对 GenBank 登录的 NGX6 基因序列号 AF188239 的基因组 DNA 序列-357 bp 至+769 bp, 应用 Primer5.0 设计一对特异性引物, 并在 5' 端分别加入 *Kpn* I、*Nhe* I 的酶切位点, 由 TaKaRa 公司合成. 上游引物: 5'AAAGGTACCCGAGCCCA-GAGGGTTTACTT 3'; 下游引物: 5'AAAGCTA-GCGCCTCAATCTTCCCTGCTTC 3'. 以正常人外周血基因组 DNA 为模板, 采用 PCR 技术按以下条件扩增: 94℃ 变性 10 min 后加入 LA Taq DNA 聚合酶, 94℃ 30 s, 58℃ 1 min, 72℃ 2 min, 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min, 1%琼脂糖凝胶电泳分离, 并回收纯化. 应用 T4 DNA 连接酶, 将 PCR 产物克隆入 pGEM-T easy 载体, 将连接产物转化大肠杆菌 JM109, 蓝/白筛选阳性菌落, 提取质粒 DNA, 命名为 pGEM-T easy/1126, 经限制性内切

酶 *Kpn* I、*Nhe* I 双酶切及测序鉴定阳性克隆. 利用插入片段和载体上特异的限制性内切酶位点 *Kpn* I 和 *Nhe* I, 将测序正确的 pGEM-T easy/1126 和荧光素酶报告基因载体 pGL3/Enhancer 均进行双酶切, 胶回收纯化后在 T4 DNA 连接酶作用下进行连接, 构建成 pGL3/Enhancer/1126 重组报告基因载体, *Kpn* I 和 *Nhe* I 双酶切并测序鉴定阳性克隆.

1.4 荧光素酶报告基因活性检测

将 COS7、HT-29 或 GES-1 细胞接种于 12 孔培养板中, 细胞生长至 90%融合度时, 将 pGL3/Enhancer/1126、pSV- β -半乳糖苷酶表达质粒共转染细胞, 以共转染 pGL3/Control 和 pSV- β -半乳糖苷酶表达质粒为阳性对照, pGL3/Enhancer 和 pSV- β -半乳糖苷酶表达质粒为阴性对照. 转染 48 h 后收获细胞, 弃去培养细胞的培养液, 1×PBS 洗细胞 2~3 次, 完全弃去冲洗液, 每孔中加入 100 μ l 1×裂解缓冲液, 室温放置 10~20 min, 反复冻融一次, 将细胞裂解物移入离心管中, 震荡 15 s, 4℃, 12 000 *g* 离心 15 s, 取 20 μ l 细胞裂解物加入 100 μ l 荧光素酶底物, 混匀, 在单光子检测仪上检测. 另外留取 30 μ l 细胞裂解物进行 pSV- β -半乳糖苷酶的活性测量. 每组数据取 3 个平行实验数据值, 所有测得的荧光素酶活性值都用 pSV- β -半乳糖苷酶活性标准化. 所用数值均以($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS 16.0 统计软件分析, $P < 0.05$ 为有显著意义.

1.5 凝胶迁移阻滞实验鉴定 NGX6 基因启动子区 Sp1 及 NF-Y 的结合位点

在上海生工生物技术公司合成如下生物素标记探针: Wt-Sp1(-17/+5), 5' CCGGCCGGGGGGCG-GGGCGTCAC 3'; Mutant-Sp1(-17/+5), 5' CCGGC-CGGCTTGCGCTTCGTCAC 3'; Wt-NF-Y(-36/-18), 5' TACTGACAGGGACCAATCGAGCC 3'; Mutant-NF-Y(-36/-18), 5' TACTGACAGGGACGTCTCG-AGCC 3'. 分别将生物素标记和未标记的单链 DNA 探针正义链和反义链退火制备成双链 EMSA 标记探针和未标记探针. 抽提 HT-29 细胞核蛋白, 将探针与核蛋白室温孵育 20 min. 配制 6%非变性聚丙烯酰胺进行预电泳 30 min 后, 将 DNA-蛋白质结合复合物进行电泳, 电泳完后进行电转膜及紫外光交叉联, 化学发光检测生物素标记的 DNA, X 光片显影.

1.6 Mithramycin A 处理

Mithramycin A 是转录因子 Sp1 的特异性阻断剂, 能特异性地阻断 Sp1 因子介导的转录活性. GES-1 或 COS7 细胞在共转染 pGL3/Enhancer/1126、pSV- β -半乳糖苷酶表达质粒后, 经不同浓度 mithramycin A 处理 24 h 后检测荧光素酶活性.

1.7 干扰 Sp1 的表达对 NGX6 mRNA 表达水平的影响

在上海吉玛公司合成针对靶基因 Sp1 的 siRNA 以及阴性对照, (仅显示正义链序列)Sp1 靶序列分别为: 5' AGCGCTTCATGAGGAGTGA 3', 阴性对照序列为: 5' TTCTCCGAACGTGTCACGT 3'. 将处于对数生长期的 SW480 细胞(5×10^4 个)铺于 6 孔板中, 使用无抗生素的培养基培养 24 h. 待其细胞达到 80%~90% 融合度时, 将 siRNA 转染细胞. 在培养 48 h 后收集转染细胞, 用于以下实验. 每次实验设 3 组: siRNA 组、阴性 siRNA 对照组和空白对照组(无 siRNA), 每组设 4 个平行孔. 抽提 RNA, 紫外分光光度计测定其浓度, 在 IQTM 5 Multicolor Real Time PCR 仪(Bio-Rad 公司)上进行 Sp1 和 NGX6 mRNA 的实时定量检测. 所用引物序列如下: Sp1, 上游引物 5' CACTGTG-AATGCTGCTC 3', 下游引物 5' CATCTGGGC-TGTTTTCTC 3'; NGX6, 上游引物 5' AGAACCC-CCATCCCTT 3', 下游引物 5' CACCTCGTGA-GTCAAGCA 3'; GAPDH, 上游引物 5' GGTCGG-AGTCAACGGATTTG 3', 下游引物 5' GTGATGG-CATGGACTGTGGT 3'.

2 结 果

2.1 生物信息学技术分析 NGX6 基因转录调控区

以 NGX6 基因的 mRNA 在人类基因组中对应的第一个碱基为 +1 (该位碱基的基因组序列号为 35829222), 提取 NGX6 基因 -2 202 bp 至 +13 239 bp 的 15 441 bp 序列, 采用 PromoterInspector 软件分析, 结果表明 -157 至 +91 的 248 bp 区间为 NGX6 基因的候选启动子区; 在线软件 FirstEF 预测 NGX6 基因可能存在 2 个启动子, 分别为 -257 bp 至 +313 bp 区域和 -163 bp 至 +407 bp 区域, 这 2 个启动子绝大部分重叠, 并与 PromoterInspector 预测的启动子区域重叠(图 1). 欧洲分子生物学开放软件包 EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite) 在线扫描 -2 202 bp 至 +13 239 bp 区域, 发现 NGX6 基因 -107 bp 至 +299 bp 为一 CpG 岛(图 2), 这一结果与预测的启动子区也大部分重叠. 根据预测结果设计引物扩增 NGX6 基因 -357 bp 至 +769 bp 的调控区片段.

在线软件 MatInspector 分析此 1 126 bp 的调控区片段的潜在转录因子结合位点, 结果表明: NGX6 基因启动子区为一个不含 TATA 盒, 而含有 CAAT 盒的 GC 富集区. 它含有 Sp1、Egr-1、RREB、P53、MYC-MAX 和 AP2 等多种转录因子结合位点(图 3).

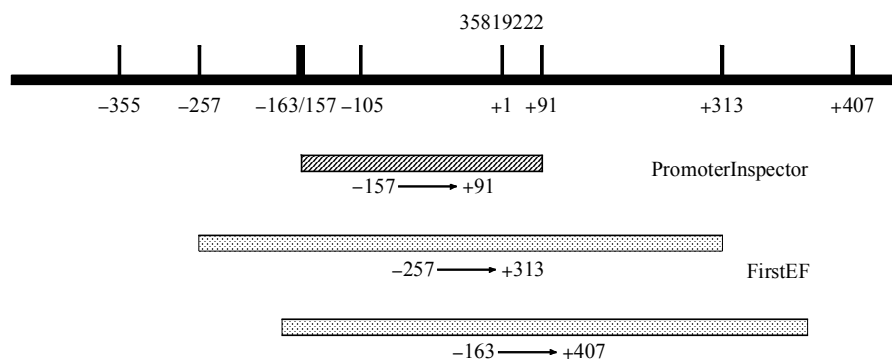


Fig. 1 Bioinformatic analysis of promoter region of NGX6 gene

The first basic group of mRNA is numbered as +1. The region from positions -157 to +91 bp predicted to be the promoter region by the online program PromoterInspector is shown as a hatched box. And the region from positions -257 to +313 bp and -163 to +407 bp predicted to be the promoter region by the other online program FirstEF are shown as dot box.

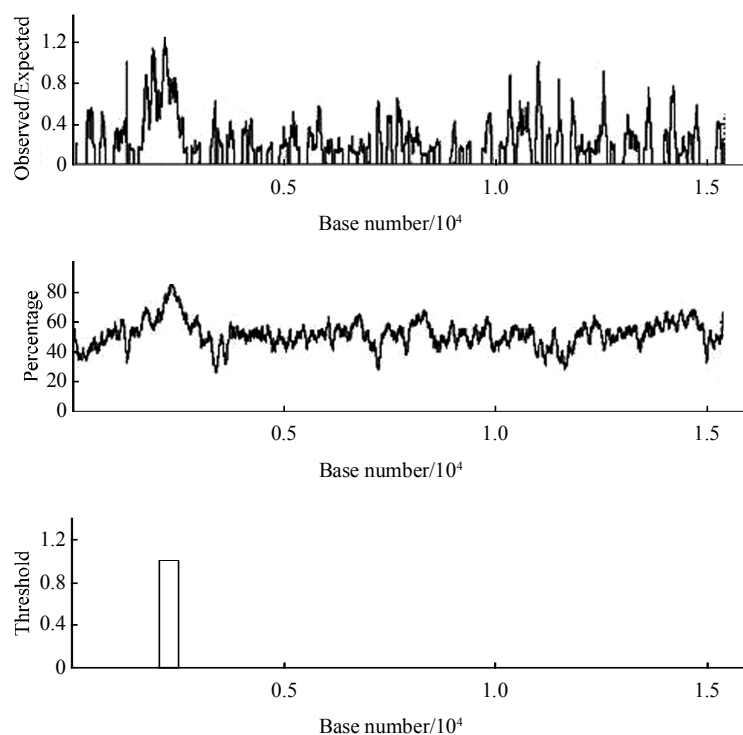


Fig. 2 Bioinformatic analysis of CpG island of NGX6 gene

The first basic group of mRNA is numbered as +1. NGX6 regulatory region of from -107 to +299 bp was predicted to be a CpG island by the online software CpGplot of the European Molecular Biology Open Software Suite.

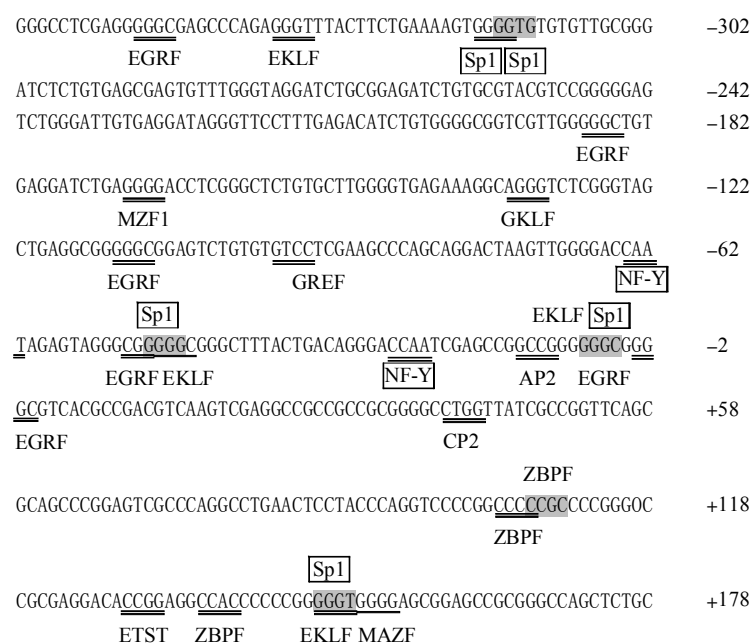


Fig. 3 Analysis of putative binding sites of transcription factors in the regulatory region of NGX6 gene by the online program MatInspector

2.2 pGL3/Enhancer/1126 重组体的构建及鉴定

以 gDNA 为模板, 用 PCR 试剂盒扩增 NGX6 基因的调控序列, 扩增到了 1 126 bp 单一的产物条带(图 4). 胶回收经 *Kpn* I 和 *Nhe* I 双酶切好的线性化插入片段, 连接到经同样双酶切制备好的 pGL3/Enhancer 载体上, 构建成荧光素酶表达载体 pGL3/Enhancer/1126. 挑选阳性克隆, *Kpn* I 和 *Nhe* I 双酶切鉴定, 得到 1 126 bp 目的片段和 5 048 bp 质粒(图 5). 测序证实, pGL3/Enhancer 载体中插入序列完全正确.

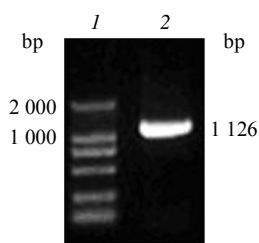


Fig. 4 Amplification of the NGX6 regulatory region by PCR with gDNA as template

1: DL 2000 molecular mass marker; 2: PCR product of the 1 126 bp (–357 to +769) regulatory region of NGX6 gene (The first basic group of mRNA is numbered as +1).

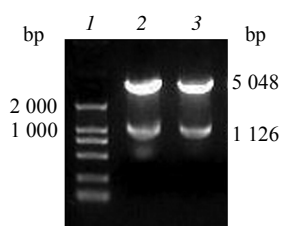


Fig. 5 Verification of pGL3/Enhancer/1126 by enzyme cutting

1: DL 2000 molecular mass marker; 2: Enzyme cutting of pGL3/Enhancer/1126 with *Kpn* I and *Nhe* I.

2.3 pGL3/Enhancer/1126 启动子活性的测定

以 pSV- β -半乳糖苷酶为内对照, pGL3/Control 为阳性对照, pGL3/Enhancer 为阴性对照, 将重组体 pGL3/Enhancer/1126 转染 COS7 细胞、HT-29 细胞以及 GES-1 细胞, 荧光素酶活性检测结果表明: pGL3/Enhancer/1126 具有与 pGL3/Control 同等的活性(图 6).

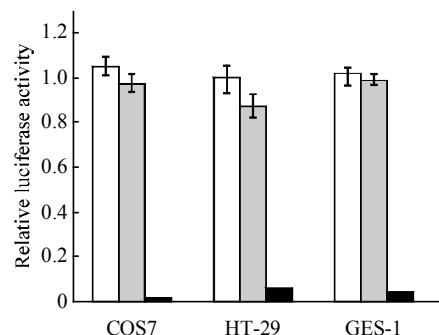


Fig. 6 Identification of the promoter activity of the NGX6 gene regulatory region from positions –357 to +769 bp

pGL3/Enhancer/1126 was transfected into COS7, HT-29 and GES-1 cells. All of the constructs were co-transfected with β -galactosidase vector for internal control. Luciferase activity was measured in cell extracts 48 h after transfection. The luciferase activity of pGL3/Control was used as positive control. Data are analyzed with software SPSS11.0 and represented by the ($\bar{x} \pm s$) of three independent experiments. □: pGL3-Control; ▒: pGL3-Enhancer-1126; ■: pGL3-Enhancer.

2.4 EMSA 凝胶迁移率实验鉴定 NGX6 基因调控区转录因子结合位点

为了验证在线软件 MatInspector 分析结果, 分别选取 NGX6 基因启动子区域具有转录因子 Sp1 (–17/+5) 和 NF-Y (–36/–18) 结合位点的特异性 DNA 序列作为探针, 将生物素标记的探针、未用生物素标记的探针及未用生物素标记的突变型探针分别与 HT-29 细胞的核蛋白结合后进行凝胶迁移率实验. 结果表明, Sp1 生物素标记探针与核蛋白结合形成 DNA-核蛋白复合条带, 而 100 倍未标记探针可完全抑制 Sp1 生物素标记探针与核蛋白的结合(图 7a), 说明 NGX6 基因调控区–17/+5 片段能与

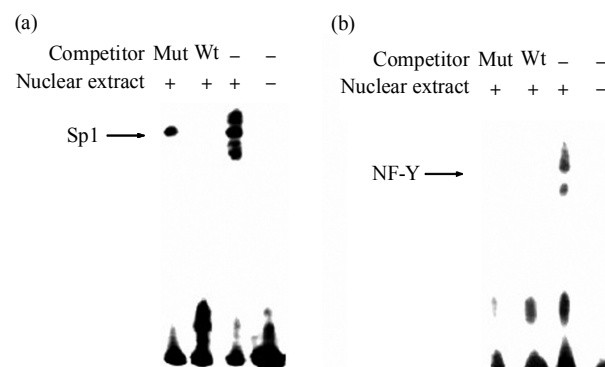


Fig. 7 Transcriptional factor Sp1 binds to the corresponding sites of NGX6 proximate promoter region

(a) Transcriptional factor Sp1 binds specifically to the promoter region of NGX6 gene. (b) Transcriptional factor NF-Y binding to the promoter region of NGX6 gene is non-specific.

转录因子 Sp1 特异性地结合. NF-Y 探针能与核蛋白结合形成 DNA-核蛋白复合条带, 但未标记探针和突变型探针均能抑制生物素标记探针与核蛋白结合(图 7b), 表明转录因子 NF-Y 与 NGX6 基因调控区是非特异性地结合.

2.5 Sp1 特异性阻断剂 mithramycin A 下调 NGX6 基因启动子活性及 mRNA 表达

COS7 或 GES-1 细胞在共转染 pGL3/Enhancer/1126 和 pSV- β -半乳糖苷酶表达质粒后, 经不同浓度 mithramycin A 处理 24 h, 荧光素酶活性检测结果显示: 在 COS7 和 GES-1 中, 25 $\mu\text{mol/L}$ 的 mithramycin A 可完全抑制 NGX6 基因启动子活性(图 8a). 为了确定 mithramycin A 对 NGX6 基因 mRNA 表达水平的影响, 本研究分析了 25 $\mu\text{mol/L}$ 的 mithramycin A 处理前后 GES-1 细胞中 NGX6 基因 mRNA 的表达变化. 结果显示(图 8b): mithramycin A 处理后 GES-1 细胞中 NGX6 基因的 mRNA 水平明显下降. 这一结果表明, mithramycin A 可特异性地抑制 NGX6 基因启动子活性和内源性表达.

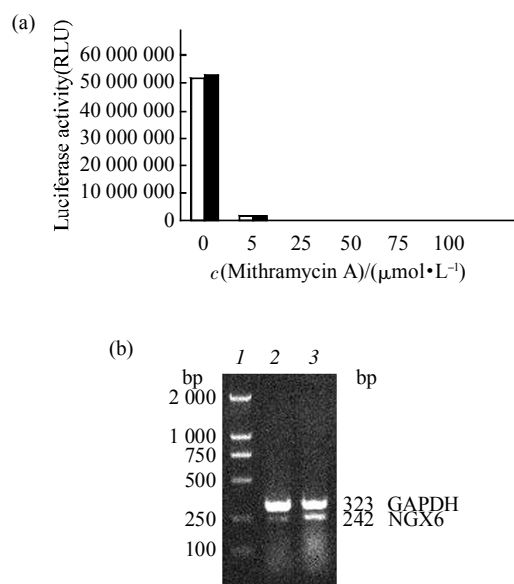


Fig. 8 Mithramycin A down-regulates the promoter activity and the endogenous expression of NGX6 gene

(a) pGL3/Enhancer/1126 was co-transfected with SV40- β galactosidase vector into COS7 and GES-1 cells, respectively. After treated with mithramycin A for 24h, the cells were collected and measured with the luciferase activity. $\square$: COS7; $\blacksquare$: GES-1. (b) Cultured GES-1 cells were treated with 25 $\mu\text{mol/L}$ mithramycin A for 24 h, the total RNA was isolated. The endogenous expression of NGX6 was detected by RT-PCR. 1: DL 2000 molecular mass marker; 2: Mithramycin A (+); 3: Mithramycin A (-).

2.6 封闭内源性 Sp1 的表达可以下调 NGX6 基因 mRNA 的表达

将 siRNA-Sp1 以 100 nmol/L 的浓度转染至 SW480 细胞中, 以通用 siRNA-control 为阴性对照, 如图 9 所示, 与 siRNA-control 和未转基因细胞相比, siRNA-Sp1 转染细胞中 Sp1 和 NGX6 的 mRNA 水平均明显下调, 这一结果提示封闭内源性 Sp1 的表达可以上调 NGX6 基因 mRNA 的表达水平.

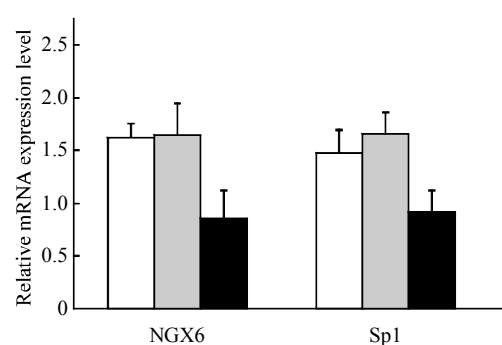


Fig. 9 NGX6 and Sp1 mRNA level was analyzed by real-time PCR

$\square$: SW480; $\blacksquare$: siRNA-control; $\blacksquare$: siRNA-Sp1.

3 讨 论

NGX6 基因是采用 cDNA 代表性差异分析法克隆得到的一个新的基因. 它在多种肿瘤组织中表达下调, 甚至缺失, 且与临床分期相关. 功能研究表明, NGX6 基因的功能与肿瘤特别是鼻咽癌、结肠癌的发生、发展密切相关, 它是一个潜在的候选抑瘤基因.

目前的研究表明, 肿瘤发生、发展过程中基因表达改变的机制复杂多样, 其中一个最重要和直接的机制是转录水平的调节^[13]. 基因转录调控区的单核苷酸多态性已提示可通过对相关基因转录的影响而决定个体对某些疾病的易感性^[14-15]. 前期研究发现位于 NGX6 基因上游调控区的 SNP(rs879284)与鼻咽癌发病存在显著相关性^[16]. 因此, 研究 NGX6 基因表达的转录调控机制, 深入了解 NGX6 基因启动子的转录活性及其影响因素具有重要意义.

本研究采用生物信息学技术发现 NGX6 基因的启动子可能位于 -357/+769 区域. 以正常人外周血细胞 gDNA 为模板, 扩增该片段, 并构建成荧光素酶表达载体 pGL3/Enhancer/1126. 在重组质粒中

荧光素酶的表达受上游启动子序列的调节, 转染后, 荧光素酶活性的高低直接反映了启动子作用的强度. 以在荧光素酶编码序列前连接了一个 SV40 启动子的 pGL3/Control 为阳性对照, 荧光素酶活性检测结果表明, NGX6 基因-357 bp 至 +769 bp 的区域与 SV40 启动子具有同等程度的启动子活性, 提示该区域包含了 NGX6 基因启动子.

在线软件 MatInspector 分析这个长度为 1 126 bp 的调控区片段的潜在转录因子结合位点, 结果表明: NGX6 基因启动子区为一个不含 TATA 盒, 而含有 CAAT 盒的 GC 富集区. 它含有多种转录因子结合位点, 如 Sp1, NF-Y, Egr-1, RREB, P53, MYC-MAX 和 AP2 等. EMSA 结果显示 Sp1 转录因子能特异性地与 NGX6 基因调控区-17/+5 片段结合. NF-Y 转录因子虽能与 NGX6 启动子区-36/-18 片段结合, 但未标记探针和突变型探针都能抑制生物素标记探针与核蛋白结合, 说明 NF-Y 转录因子与 NGX6 基因调控区的结合是非特异性的. Sp1(specific protein 1)是一种具有序列特异性的 DNA 结合蛋白^[17], 广泛存在于多种组织和细胞中. 它通过识别 GC 盒(GGGGCGGGGC)及相似序列调节无 TATA 盒的启动子活性, 参与真核生物转录起始的转录因子^[18]. 研究表明, Sp1 的表达与肿瘤的发生、发展和转移密切相关, 它参与多种与生长相关的信号通路, 包括细胞凋亡, 血管生长以及肿瘤的生长^[19]. 采用 Sp1 特异性抑制剂 mithramycin A 处理 GES-1 或 COS7 细胞后, 荧光素酶活性分析显示, mithramycin A 能明显抑制 NGX6 基因启动子活性. 同时, RT-PCR 结果表明 mithramycin A 能下调 NGX6 基因的表达. 将化学合成的靶向 Sp1 的 siRNA 转染至高表达 Sp1 的 SW480 细胞中, 相对于阴性 siRNA 对照组和空白对照组, siRNA 能有效抑制 Sp1 的表达, 进而引起 NGX6 基因 mRNA 表达水平下降. 这些结果证实了转录因子 Sp1 对 NGX6 基因的表达存在正性调控作用. 另一方面我们正在构建 Sp1 表达载体 pCMV-HA/Sp1, 将经过表达转录因子 Sp1 研究其对 NGX6 基因表达的正性调控作用.

在线软件分析发现, NGX6 基因启动子区含有一个约 400 bp 大小的 CpG 岛. CpG 岛(CpG island)是哺乳动物基因组内长 1~2 kb 富集未甲基化的 CpG 二联体的 DNA. 癌细胞在整体低甲基化的水平下, 一些跨越管家基因和肿瘤抑制基因启动子的 CpG 岛区却是高甲基化^[20]. NGX6 基因启动子区含

有一个 400 bp 左右的 CpG 岛, 因此, 对 NGX6 基因调控区 CpG 岛甲基化的探讨是我们研究 NGX6 基因表达调控的下一步目标(此工作目前正在进行). 这些研究为阐明 NGX6 基因的表达调控机制提供了有力的实验依据, 为更好地解析 NGX6 基因在结直肠癌发生发展中的作用与地位奠定基础.

参 考 文 献

- [1] 阳剑波, 唐湘娜, 邓龙文, 等. 鼻咽癌染色体 9p21-22 区域精细缺失图谱的构建. 中华肿瘤杂志, 1999, **21**(6): 419-421
Yang J B, Tang X N, Deng L W, *et al.* Chin J Oncology, 1999, **21**(6): 419-421
- [2] 阳剑波, 宾亮华, 李忠花, 等. 精确定位和克隆 9p21-22 区域内鼻咽癌候选抑瘤基因. 癌症, 2000, **19**(1): 6-9
Yang J B, Bin L H, Li Z H, *et al.* Clin J Cancer, 2000, **19**(1): 6-9
- [3] Ma J, Zhou J, Fan S Q, *et al.* Role of a novel EGF-like domain-containing gene NGX6 in cell adhesion modulation in nasopharyngeal carcinoma cells. Carcinogenesis, 2005, **26**(2): 281-291
- [4] 范松青, 张文玲, 周 鸣, 等. NGX6 基因在多种常见癌组织中的原位表达及其临床意义的研究. 生物化学与生物物理进展, 2008, **35**(9): 1014-1020
Fan S Q, Zhang W L, Zhou M, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2008, **35**(9): 1014-1020
- [5] Li J, Huang Y C, Li W F, *et al.* The effect of NGX6 on cells from human nasopharyngeal carcinoma cell line HNE1. Chin J Biochem Mol Biol, 2002, **18**(4): 398-403
- [6] 王莉莉, 张球红, 马 健, 等. NGX6 基因对高转移鼻咽癌细胞株 5-8F 细胞的影响. 生物化学与生物物理进展, 2005, **32**(7): 618-624
Wang L, Zhang Q H, Ma J, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2005, **32**(7): 618-624
- [7] 李 江, 黄宇琛, 张秋红, 等. 鼻咽癌相关基因 NGX6 对鼻咽癌细胞周期的影响. 生命科学研究, 2002, **6**(4): 300-304
Li J, Huang Y C, Zhang Q H, *et al.* Life Sci Res, 2002, **6**(4): 300-304
- [8] Wang L, Ma J, Li J, *et al.* NGX6 gene inhibits cell proliferation and plays a negative role in EGFR pathway in nasopharyngeal carcinoma cells. J Cell Biochem, 2005, **95**(1): 64-73
- [9] 王晓艳, 沈守荣, 刘华英, 等. 抑瘤基因 NGX6 对人结肠癌细胞 HT-29 生长的影响. 世界华人消化杂志, 2004, **12**(3): 572-579
Wang X Y, Shen S R, Liu H Y, *et al.* World Chin J Digestology, 2004, **12**(3): 572-579
- [10] 王晓艳, 沈守荣, 刘 芬, 等. NGX6 基因对人结肠癌细胞 HT-29 细胞周期的影响. 生物化学与生物物理进展, 2006, **33**(1): 45-50
Wang X Y, Shen S R, Liu F, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2006, **33**(1): 45-50
- [11] 刘 芬, 沈守荣, 李宏韬, 等. NGX6 对 Wnt/Beta-catenin 通路 β -catenin/TCF/LEF 转录活化的影响. 中南大学学报(医学版), 2007, **32**(6): 985-991
Liu F, Shen S R, Li H T, *et al.* J Central South University (Medical

- Sciences), 2007, **32**(6): 985-991
- [12] 王晓艳, 沈守荣, 刘 芬, 等. 结肠癌中 NGX6 抑制 EGFR/K-ras/JNK/c-Jun/cyclin D1 信号通路的研究. 生物化学与生物物理进展, 2008, **35**(5): 570-576
- Wang X Y, Shen S R, Liu F, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2008, **35**(5): 570-576
- [13] 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
- [14] Cuenca J, Perez C A, Aguirre A J, *et al.* Genetic polymorphism at position-308 in the promoter region of the tumor necrosis factor (TNF): implications of its allelic distribution on susceptibility or resistance to diseases in the Chilean population. Biol Res, 2001, **34**(3-4): 237-241
- [15] Tayeb M T, Clark C, Sharp L, *et al.* CYP3A4 promoter variant is associated with prostate cancer risk in men with benign prostate hyperplasia. Oncol Rep, 2002, **9**(3): 653-655
- [16] 熊 炜, 曾朝阳, 李小玲, 等. NGX6 基因单核苷酸多态及与鼻咽癌的相关性. 中国生物化学与生物物理学报, 2002, **34**(4): 512-515
- Xiong W, Zeng Z Y, Li X L, *et al.* Chin J Biochem Mol Biol, 2002, **34**(4): 512-515
- [17] Kadonaga J T, Carner K R, Masiarz F R, *et al.* Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. Cell, 1987, **51**(6): 1079-1090
- [18] Chae Y M, Park K K, Magae J, *et al.* Sp1-decoy oligodeoxynucleotide Inhibits glucose-induced mesangial cell proliferation. Biochem Biophys Res Commun, 2004, **319**(2): 550-555
- [19] Safe S, Abdelrahim M. Sp1 transcription factor family and its role in cancer. Eur J Cancer, 2005, **41**(16): 2438-2448
- [20] Larsen F, Gundersen G, Lopez R, *et al.* CpG islands as gene markers in the human genome. Genomics, 1992, **13**(4): 1095-1107

Cloning and Identification of Promoter of Suppressed-tumor Gene NGX6*

LIU Min-Ji¹⁾, WANG Xiao-Yan¹⁾, SHEN Shou-Rong^{1)**}, LI Nan¹⁾,
ZHANG De-Cai¹⁾, PENG Ya¹⁾, GUO Qin¹⁾, LI Gui-Yuan²⁾

¹⁾ Department of Gastroenterology, The Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China;

²⁾ Cancer Research Institute, Xiangya Medical School of Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract Transcriptional regulation mechanisms have not been clearly illuminated for NGX6 gene, which is a candidate of tumor suppressor gene in colorectal cancer. pGL3/Enhancer/1126 vector, a recombinant reporter gene vectors of the transcription regulatory region of NGX6 gene, was constructed based on bioinformatic techniques and identified by luciferase assay system. No canonical TATA boxes, but several CAAT and GC boxes were observed in the transcription regulatory region by the online analysis programs PromoterInspector program, FistEF, CpGplot and MatInspector Professional. Transcriptional factor Sp1 was validated to bind to NGX6 promoter by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Inhibition of the Sp1 binding to NGX6 promoter by mithramycin A significantly reduced the promoter activity. The endogenous expression of NGX6 in mRNA level was down-regulated by mithramycin A and blocking with Sp1.

Key words NGX6 gene, transcription regulate, promoter, Sp1

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00102

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2006CB910503), The National Natural Science Foundation of China (30770972), Hunan Provincial Natural Sciences Foundation (09JJ3066, 07JJ3075) and Postgraduate Thesis Creation Project of Central South University (2009bsxt042).

**Corresponding author.

Tel: 86-731-88618457, E-mail: ssr-35403@163.com

Received: May 1, 2010 Accepted: July 30, 2010