

食管癌细胞 *NGAL* 基因-152 ~ -60 区段 存在 TPA 反应元件 *

许丽艳^{1,2)} 李恩民^{3)**} 牛永东³⁾ 蔡唯佳²⁾
袁华敏³⁾ 常静霞³⁾ 沈忠英²⁾ 曾毅¹⁾

(¹⁾北京工业大学生命科学与生物工程学院病毒与药理研究室, 北京 100022;

²⁾汕头大学医学院肿瘤病理研究室, 汕头 515041;

³⁾汕头大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 汕头 515041)

摘要 以往研究发现, 在 TPA 诱导永生化食管上皮细胞癌变中中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白 (neutrophil gelatinase-associated lipocalin, *NGAL*) 基因过表达, 但过表达机制不明. 最近研究提示, 食管癌细胞 *NGAL* 启动子及其邻近区域可能存在着 TPA 反应元件. 为了对 *NGAL* 的这一 TPA 反应元件进行更准确定位, 采用 PCR 法结合嵌套缺失实验从食管癌细胞中克隆了 *NGAL* 5' 侧翼区-152~+84、-140~+84、-78~+84、-59~+84、-50~+84、-41~+84、-37~+84、-29~+84 和-10~+84 等片段, 并定向插入 pGLB、pGLP 或 pGLE 等萤火虫荧光素酶报告基因表达载体中, 构建了 pGLB-152、pGLP-152、pGLE-152、pGLB-140、pGLB-78、pGLB-59、pGLB-50、pGLB-41、pGLB-37、pGLB-29 和 pGLB-10 等系列报告基因表达载体. 将上述报告基因表达载体分别同 pRL-TK 共转染食管癌细胞 EC109, 并用 TPA 刺激, 检测 TPA 刺激转染 EC109 的相对荧光素酶活力, 综合判定 *NGAL* -152~+84 区不同长度片段的 TPA 反应性, 对 *NGAL* 启动子区的 TPA 反应元件给予进一步分段定位. 结果表明, *NGAL* 启动子区的 TPA 反应元件位于-152~-60 区段, 而且应答 TPA 刺激的反应能力很强. 生物信息学分析结果显示, *NGAL* 启动子区所存在的 TPA 反应元件很可能是一种新结构类型. 研究说明, *NGAL* 在 DNA 序列上有应答 TPA 刺激的结构基础, 将有助于深入到分子水平揭示 TPA 诱导永生化食管上皮细胞癌变中 *NGAL* 过表达机制, 也有助于进一步认识 TPA 信号细胞内传递途径网络在肿瘤发生发展中的作用.

关键词 中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白基因, 食管癌细胞, 基因表达调控, TPA 反应元件

学科分类号 Q784, R735.1

中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白 (neutrophil gelatinase-associated lipocalin, *NGAL*) 是 lipocalin 家族的一个新成员. *NGAL* 基因全长 5 869 bp, 包括 7 个外显子, 位于染色体 9q34 区域, 单拷贝, 蛋白质编码区长度为 591 bp, 编码 197 个氨基酸^[1]. 近年有研究证明, *NGAL* 编码的蛋白质产物具有保护调节基质金属蛋白酶 -9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9, 即明胶酶 B, gelatinase B) 的活性, 作为小分子铁化合物结合蛋白参与机体铁代谢和天然免疫反应等功能^[2~4]. 我们以往研究发现, 在 TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) 诱导永生化食管上皮细胞癌变过程中 *NGAL* 基因过表达^[5], 但过表达机制不明. 最近我们的研究提示, 食管癌细胞 *NGAL* 5' 侧翼启动子及其邻近区域可能存在着 TPA 反应元件.

为了对 *NGAL* 的这一 TPA 反应元件进行更准确定位, 通过 PCR、嵌套缺失、定向克隆、双荧光素酶报告基因检测系统和生物信息学分析等系列技术手段, 对 *NGAL* 5' 侧翼-152~+84 区不同长度片段的 TPA 反应性进行研究, 发现 *NGAL* 的 TPA 反应元件位于-152~-60 片段内, 应答 TPA 刺激的反应能力很强, 而且很可能是一种新结构类型. 这将有助于深入到分子水平揭示 TPA 诱导永生化食管上皮细胞癌变中 *NGAL* 过表达机制, 同时也有助于进一步认识 TPA 信号细胞内传递途径网络在肿瘤

* 国家自然科学基金面上资助项目 (39900069, 30170428, 30370641, 30570849), 广东省自然科学基金重点项目 (37788, 05104541) 和广东省自然科学基金面上项目 (010431).

** 通讯联系人. Tel: 0754-8900847, 8900247, Fax: 0754-8900247

E-mail: nmli@stu.edu.cn

收稿日期: 2005-08-08, 接受日期: 2005-08-29

发生发展中的作用. 现将有关实验方法与结果报告如下.

1 材料与方法

1.1 细胞与细胞培养

食管癌细胞系 EC109 由中国医学科学院肿瘤医院林晨研究员惠赠. EC109 细胞在 5 % CO₂ 和 37℃ 的条件下, 在含 10%~15% 小牛血清的 199 培养基 (Invitrogen 公司) 中贴壁生长. 细胞用含 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 的消化液消化进行传代.

1.2 细菌菌株、质粒及主要试剂

JM109 细菌菌株、萤火虫荧光素酶报告基因表达载体 pGL3-Basic(pGLB)、pGL3-Promoter(pGLP) 和 pGL3-Enhancer (pGLE)、海肾荧光素酶报告基因表达载体 pRL-TK (内参照质粒)、双荧光素酶报告基因分析系统均购自美国 Promega 公司; 转染试剂 Eugene 6 reagent 购自德国 Roch 公司; 限制性内切酶等分子生物学常规试剂购自北京华美生物工程公司和上海生工生物工程技术服务公司; 质粒提取试剂盒购自德国 QIAGEN 公司.

1.3 表达载体 pGLB-152、pGLE-152 和 pGLP-152 的构建与鉴定

采用 PCR 法从食管癌细胞 SHEEC (在 TPA 作用下, 由永生化食管上皮细胞恶变而来)^[8] 中克隆 NGAL 5' 侧翼区 -152~+84 片段^[9]. 通过定向克隆把

上述片段分别插入质粒 pGLB、pGLE 和 pGLP, 构建 pGLB-152、pGLE-152 和 pGLP-152 荧光素酶报告基因表达载体. 采用 *Xho* I + *Bgl* II 双酶切鉴定重组子, 同时进行 DNA 测序.

1.4 pGLB 系列嵌套缺失质粒载体的构建与鉴定

NGAL 5' 侧翼区不同长度片段 pGLB 系列载体构建示意图见图 1. -152~+84、-140~+84、-78~+84、-59~+84、-50~+84、-41~+84、-37~+84、-29~+84 和 -10~+84 等 NGAL 5' 侧翼区不同长度片段通过嵌套缺失实验获得. 实验步骤按嵌套缺失试剂盒操作说明书进行, 略有改动. 具体步骤如下: 取 10 μg pGLB-152 质粒依次进行 *Sac* I 和 *Xho* I 酶切, 用 QIAquick PCR purification kit 回收酶切产物, 通过测定 A₂₆₀ 对回收的酶切产物线型 DNA 分子进行定量. 取 5 μg 线型 DNA 分子在 22℃ 下进行 *Exo* III 特异性切割, 每 30 s 取出 *Exo* III 混合物 1 份 2.5 μl 加至预先配好的 S1 核酸酶使用液中, 冰上放置备用. 完成梯度缺失后, 将剩余的 *Exo* III 混合物从 22℃ 取出, 迅速移至 37℃ 中继续温育 3 min, 再取出 *Exo* III 混合物 1 份 2.5 μl 按上述方法与 S1 核酸酶使用液混合, 室温下由 S1 核酸酶去除单链 DNA, Klenow 补平, T4 DNA 连接酶连接, 常规方法转化, 铺 Amp⁺ 板 (50 mg/L), 次日挑取单克隆, 碱裂解法提取质粒, 按下述方法鉴定嵌套缺失子.

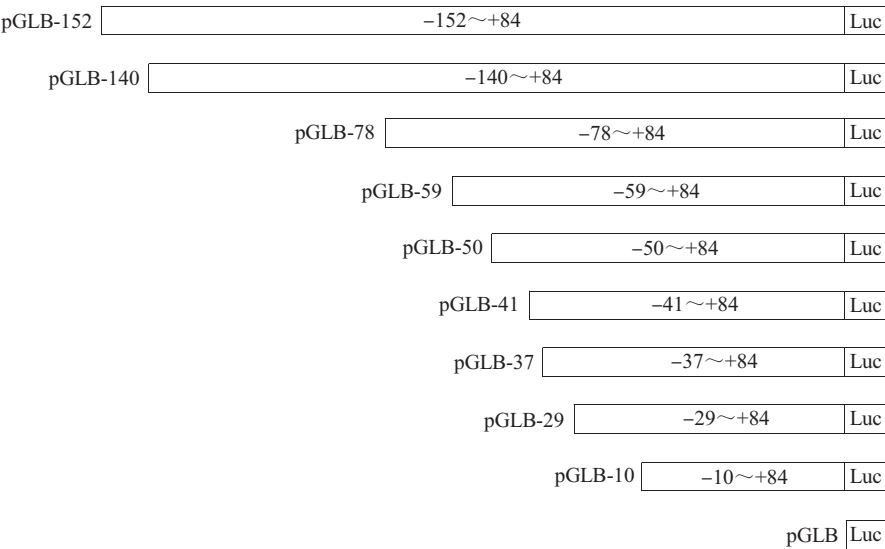


Fig. 1 The map of report gene expression vectors for NGAL 5' flanking region
Illustrated are various deletion constructs tested for the NGAL 5' flanking region from -152 to -10. Each construct is named according to the distance in nucleotides of its upstream end from the transcription start site (+1).

嵌套缺失子的鉴定采用 PCR 和限制性内切酶双酶切相结合的方式. 根据 pGL3-Basic 载体序列合成引物. 引物序列分别为引物 1: 5' GTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA 3', 引物 2: 5' CTAGCAAAATAGGCTGTCCC 3'. 以缺失前的质粒作对照. PCR 反应条件为 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 72℃ 90 s, 30 个循环; 72℃ 10 min. 以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳或非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染确定嵌套缺失子. 对 PCR 法鉴定出的嵌套缺失子通过 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切、非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳以及银染等实验手段给予进一步鉴定.

对鉴定出的嵌套缺失子由上海基康生物技术有限公司进行 DNA 序列测定, 并应用 BLAST 数据库进行比对分析.

1.5 瞬时转染与 TPA 诱导实验

对需转染的各实验质粒 pGLB-152、pGLB-140、pGLB-78、pGLB-59、pGLB-50、pGLB-41、pGLB-37、pGLB-29、pGLB-10、pGLP-152 和 pGLE-152、空载体对照质粒 pGLB、pGLP 和 pGLE 以及内参照质粒 pRL-TK, 用 QIAGEN 公司质粒提取试剂盒提取质粒并测定其含量. 用 Buffer EB (质粒提取试剂盒中提供) 将上述各实验质粒和对照质粒稀释至 100 mg/L, 内参照质粒 pRL-TK 稀释至 20 mg/L, 然后将各实验质粒和对照质粒分别与 pRL-TK 质粒按 50:1 混合, 即 1 μg:0.02 μg. EC109 细胞在转染前 24 h 接种于 24 孔培养板中. 具体转染步骤参照文献[10]进行. 转染后 24 h, 加入 5 μg/L TPA (Sigma 公司) 进行诱导. 继续培养 24 h 后, 收获细胞. 每组实验样品 3 个平行实验孔, 并至少进行 3 次重复实验.

1.6 双荧光素酶活性检测

双荧光素酶活性 (DLR) 检测按照双荧光素酶报告基因分析系统 (Promega 公司) 操作手册及文献[10]所述方法, 在 TD20/20 照度计 (Turner Designs 公司) 上进行.

1.7 统计学分析

根据 TD20/20 型照度计配置的软件包计算出各组相对荧光强度 (萤火虫荧光素酶 / 海肾荧光素酶), 以此代表荧光素酶活力. 各组实验数据均计算平均值及标准差. 应用 SPSS 10.0 for Windows 软件包对各组实验数据之间是否有显著性差别进行 *t* 检验或 *F* 检验.

1.8 生物信息学分析

应用转录因子数据库 (<http://www.gene->

[regulation.com](http://www.gene-regulation.com)) 中的软件 AliBaba2.1 分析预测 NGAL 5' 侧翼区 -152~+84 区段潜在的 TPA 反应元件序列及其位点, 和 -152~-60 区段潜在的顺式作用元件序列及其位点. 相关参数设置采取默认值, 即 Pairsim to known sites: 50, Match width in bp: 10, Min num of sites: 4, Min match Conservation: 75%.

2 结 果

2.1 pGLB-152、pGLE-152 和 pGLP-152 的构建与鉴定

pGLB-152、pGLE-152 和 pGLP-152 重组子经 *Xho* I 和 *Bgl* II 双酶切鉴定的实验结果见图 2. 从图 2 可见, 外源片段的长度均约为 240 bp, 与原设计一致.

将通过酶切鉴定获得的重组子 pGLB-152、pGLE-152 和 pGLP-152 的外源片段测序, 利用 NCBI 公共数据库进行 BLAST 同源分析鉴定, 与数据库中的 NGAL 基因序列比对, 一致性均为 100%, 表明表达载体 pGLB-152、pGLE-152 和 pGLP-152 构建成功.

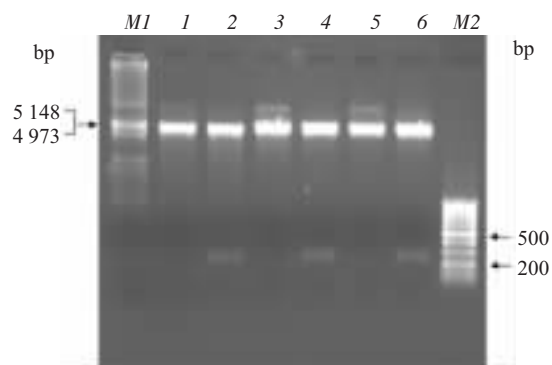


Fig. 2 Agarose analysis of *Xho* I + *Bgl* II digesting product from the pGLB-152, pGLE-152 and pGLP-152 recombination plasmid

M1: λDNA/*Eco*R I + *Hind* III marker; M2: 100 bp DNA ladder; 1: pGLB; 2: pGLB-152; 3: pGLE; 4: pGLE-152; 5: pGLP; 6: pGLP-152.

2.2 pGLB-152、pGLP-152 或 pGLE-152 的表达活性及 TPA 反应性

2.2.1 pGLB-152 的表达活性及 TPA 反应性. pGLB 空白载体上无任何启动子或增强子等基因转录调控元件. 借助于检测 pGLB-152 转染细胞报告基因荧光素酶活力升高程度, 可以衡量 NGAL 5' 侧翼区 -152~+84 片段启动基因表达基础水平. 有关

pGLB-152的实验结果见图 3-A. 在没有 TPA 作用下, 与转染空载体 pGLB 相比, 转染 pGLB-152 的食管癌细胞 EC109 的相对荧光素酶活力极显著升高 (t 检验, $P < 0.01$), 约升高 7.50 倍. 在 5 $\mu\text{g/L}$ TPA 作用下, 与转染空载体 pGLB 相比, 转染 pGLB-152 的食管癌细胞 EC109 的相对荧光素酶活力也极显著升高 (t 检验, $P < 0.01$), 约升高 38.42 倍. 转染 pGLB-152 的食管癌细胞 EC109, TPA 作用(5 $\mu\text{g/L}$)与没有 TPA 作用相比, 前者的相对荧光素酶活力极显著升高 (t 检验, $P < 0.01$), 约升高 3.65 倍. 上述实验结果表明, *NGAL* 5'侧翼区-152~+84 片段是启动子所在部位, 启动基因表达的基础水平很高, 而且具有明显的 TPA 反应性. 这说明在 *NGAL* 5'侧翼-152~+84 区段存在较强的 TPA 反应元件.

2.2.2 pGLP-152 的表达活性及 TPA 反应性. pGLP 空白载体上插有一个强启动子, 即 SV40 大 T 抗原基因启动子. 借助于检测 pGLP-152 转染细胞报告基因荧光素酶活力的变化程度, 可以衡量 *NGAL* 5'

侧翼区-152~+84 片段上所存在的基因转录调控元件影响基因表达的性质与能力. 有关 pGLP-152 的实验结果见图 3-B. 在没有 TPA 作用下, 与转染空载体 pGLP 相比, 转染 pGLP-152 的食管癌细胞 EC109 的相对荧光素酶活力变化并不明显 (t 检验, $P > 0.05$). 在 5 $\mu\text{g/L}$ TPA 作用下, 与转染空载体 pGLP 相比, 转染 pGLP-152 的食管癌细胞 EC109 的相对荧光素酶活力显著升高 (t 检验, $P < 0.05$). 转染 pGLP-152 的食管癌细胞 EC109, TPA 作用(5 $\mu\text{g/L}$)与没有 TPA 作用相比, 前者的相对荧光素酶活力极显著升高 (t 检验, $P < 0.01$). 上述实验结果提示, 在 *NGAL* 5'侧翼区-152~+84 片段上所存在的基因转录调控元件具有明显的 TPA 反应性, 而且应答 TPA 刺激的能力很强.

2.2.3 pGLE-152 的表达活性及 TPA 反应性. pGLE 空白载体上插有一个强增强子, 即 SV40 大 T 抗原基因的增强子. 借助于检测 pGLE-152 转染细胞报告基因荧光素酶活力的升高程度, 可以衡量 *NGAL*

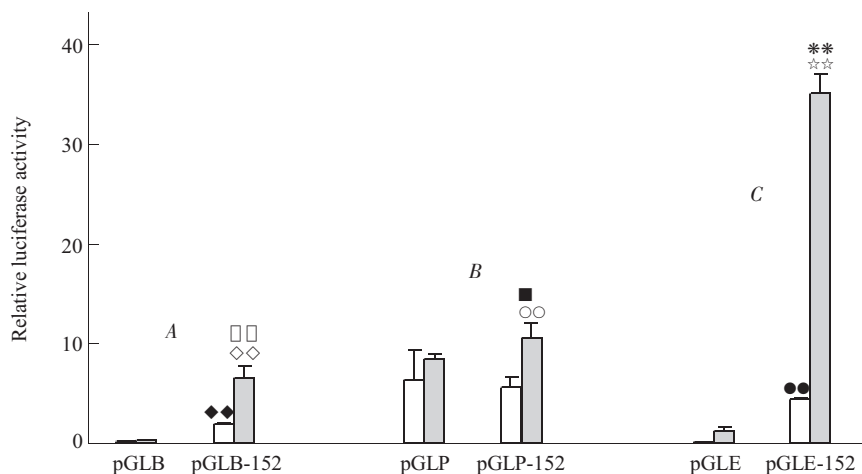


Fig. 3 Responsiveness induced by TPA in esophageal cancer cells EC109 transfected with pGLB-152, pGLP-152 and pGLE-152, respectively

A: The relative luciferase activities of whole cell extracts from EC109 cells transfected with pGLB-152 was significantly higher than that of pGLB by an average of 7.50-fold (t test, ** indicate $P < 0.01$). The relative luciferase activities of the pGLB-152 transfected EC109 cells was obviously higher than that of pGLB by an average of 38.42-fold following TPA induction (t test, □ indicate $P < 0.01$). Relative luciferase activities of whole cell extracts from EC109 cells transfected with pGLB-152 following stimulation with TPA was obviously higher than that of unstimulation by an average of 3.65-fold (t test, ∞ indicate $P < 0.01$).

B: The relative luciferase activities of the pGLP-152 transfected EC109 cells was higher than that of pGLP following TPA induction (t test, ■ indicate $P < 0.05$). Relative luciferase activities of whole cell extracts from EC109 cells transfected with pGLP-152 following stimulation with TPA was obviously higher than that of unstimulation (t test, ∞ indicate $P < 0.01$).

C: The relative luciferase activities of whole cell extracts from EC109 cells transfected with pGLE-152 was significantly higher than that of pGLE by an average of 19.64-fold (t test, •• indicate $P < 0.01$). The relative luciferase activities of the pGLE-152 transfected EC109 cells was obviously higher than that of pGLE by an average of 28.40-fold following TPA induction (t test, ** indicate $P < 0.01$). Relative luciferase activities of whole cell extracts from EC109 cells transfected with pGLE-152 following stimulation with TPA was obviously higher than that of unstimulation by an average of 8.09-fold (t test, ** indicate $P < 0.01$).

In all cases, EC109 cells were transiently transfected with the experiment plasmid for 24 h and then treated for another 24 h with 5 $\mu\text{g/L}$ of TPA or not. Luciferase activity was normalized to the *Renilla* luciferase activity from cotransfected vector pRL-TK. The data were obtained from a single experiment repeated at least three times with similar results. Each bar displays the $\bar{x} \pm s$ of relative luciferase activity from triplicate wells. □: -TPA, ■: +TPA.

启动子元件接受增强子作用的能力, 评价报告基因表达的诱导特性. 有关 pGLE-152 的实验结果见图 3-C. 在没有 TPA 作用下, 与转染空载体 pGLE 相比, 转染 pGLE-152 的食管癌细胞 EC109 的相对荧光素酶活力极显著升高 (t 检验, $P < 0.01$), 约升高 19.64 倍. 在 5 $\mu\text{g/L}$ TPA 作用下, 与转染空载体 pGLE 相比, 转染 pGLE-152 的食管癌细胞 EC109 的相对荧光素酶活力也极显著升高 (t 检验, $P < 0.01$), 约升高 28.40 倍. 转染 pGLE-152 的食管癌细胞 EC109, TPA 作用 (5 $\mu\text{g/L}$) 与没有 TPA 作用相比, 前者的相对荧光素酶活力极显著升高 (t 检验, $P < 0.01$), 约升高 8.09 倍. 上述实验结果表明, *NGAL* 启动子元件接受增强子作用的能力是很强的, 而且表现出明显的 TPA 诱导特性.

2.3 pGLB-152、pGLP-152 和 pGLE-152 三者表达活性及 TPA 反应性的比较

有关实验结果见图 4. 在没有 TPA 作用下, 相对荧光素酶活力最高的是转染 pGLP-152 的食管癌细胞 EC109, 其次是转染 pGLE-152 的, 最低的是转染 pGLB-152 的. 与转染 pGLB-152 的相比, 转染 pGLP-152 或 pGLE-152 的 EC109 食管癌细胞的相对荧光素酶活力, 均表现为极显著升高 (F 检验, $P < 0.01$), 约分别升高 3.03 和 2.40 倍. 但转染 pGLP-152 的与转染 pGLE-152 的二者相比, 没有显著差别 (F 检验, $P > 0.05$). 在 TPA 作用下, 相对荧光素酶活力最高的是转染 pGLE-152 的食管癌细胞 EC109, 其次是转染 pGLP-152 的, 最低的是转染 pGLB-152 的. 转染 pGLE-152 的 EC109 食管癌细胞的相对荧光素酶活力与转染 pGLP-152 或 pGLB-152 的相比, 均极显著升高 (F 检验, $P < 0.01$), 约分别升高 3.23 和 5.17 倍; 另外, 转染 pGLP-152 的 EC109 食管癌细胞的相对荧光素酶活力与转染 pGLB-152 的相比, 也显著升高 (F 检验, $P < 0.05$), 约升高 1.60 倍. 这些实验结果提示, 在体现应答 TPA 刺激时, *NGAL* 的启动子与增强子均发挥作用, 但相比较而言可能以启动子的作用为主.

2.4 *NGAL* -152 ~ +84 区段潜在的 TPA 反应元件生物信息学分析结果

应用转录因子数据库 (<http://www.gene-regulation.com>) 中的软件 AliBaba2.1, 对 *NGAL* 5' 侧翼 -152 ~ +84 区段潜在的 TPA 反应元件序列及其位点的分析预测结果见图 5. 在 *NGAL* 5' 侧翼 -152 ~ +84 区段贯穿整个序列共存在着 9 个潜在的

两种类型 TPA 反应元件序列, 但这些元件在 TPA 诱导永生化人食管上皮细胞癌变 *NGAL* 过表达中是否真正发挥作用尚需进一步研究.

2.5 pGLB 系列嵌套缺失质粒载体的构建与鉴定

pGLB-152、pGLB-140、pGLB-78、pGLB-59、pGLB-50、pGLB-41、pGLB-37、pGLB-29 和 pGLB-10 等嵌套缺失重组子, 在 PCR 法鉴定获得阳性结果基础上, 通过 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切、非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳以及银染实验鉴定结果见图 6. 各外源片段的大小不一, 依次成梯度分布, 符合原设计思想.

将通过酶切鉴定获得的各重组子 pGLB-152、pGLB-140、pGLB-78、pGLB-59、pGLB-50、pGLB-41、pGLB-37、pGLB-29 和 pGLB-10 等的外

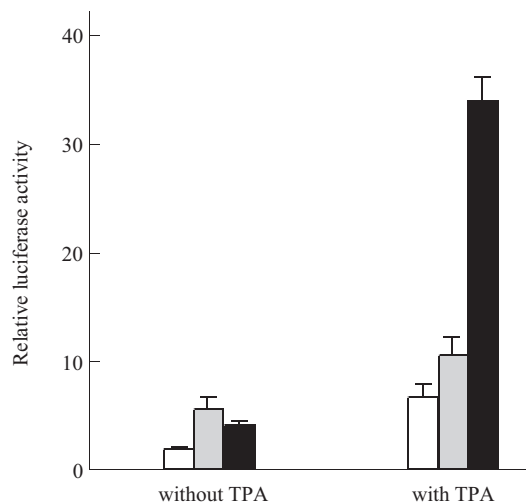


Fig. 4 The comparison of TPA responsiveness among transfected pGLB-152, pGLP-152 and pGLE-152 in EC109 esophageal cancer cells

The relative luciferase activity from cells transfected pGLE-152 and pGLP-152 unstimulated with TPA was obviously increased by an average of 2.40-fold and 3.03-fold, respectively, compared with that from cells transfected pGLB-152 (F test, $P < 0.01$), but the comparison between transfected pGLE-152 and pGLP-152 showed that their relative luciferase activity did not obviously change each other (F test, $P > 0.05$). A comparison of luciferase activities of whole cell extracts from EC109 cells among transfected pGLE-152, pGLB-152 and pGLP-152 stimulated with TPA showed that the pGLE-152 activity was obviously higher than that of pGLB-152 and pGLP-152 by an average of 5.17-fold and 3.23-fold, respectively (F test, $P < 0.01$). Moreover, The relative luciferase activity from cells transfected pGLP-152 stimulated with TPA was increased by an average of 1.60-fold, compared with that from cells transfected pGLB-152 (F test, $P < 0.05$). In all cases, transfection and analysis of relative luciferase activity were carried out based on the same procedure as described in Figure 3. □: pGLB-152, ▒: pGLP-152, ■: pGLE-152.

源片段测序，利用 NCBI 公共数据库进行 BLAST 同源分析鉴定，与数据库中的 *NGAL* 序列比对，一致性均为 100%，表明 pGLB 系列表达载体 pGLB-152、 pGLB-140、 pGLB-78、 pGLB-59、 pGLB-50、 pGLB-41、 pGLB-37、 pGLB-29 和 pGLB-10 等构建成功。

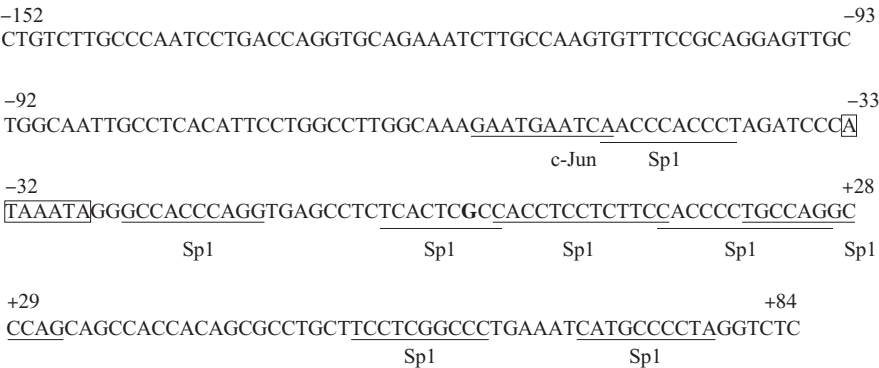


Fig. 5 The sketch map for the putative TPA responsive elements in *NGAL* gene 5' flanking -152~+84 region

A transcription start site (G, +1) , TATA box and TPA responsive elements that were identified by computer analysis are shown in boldface, box and underlined and labeled, respectively.

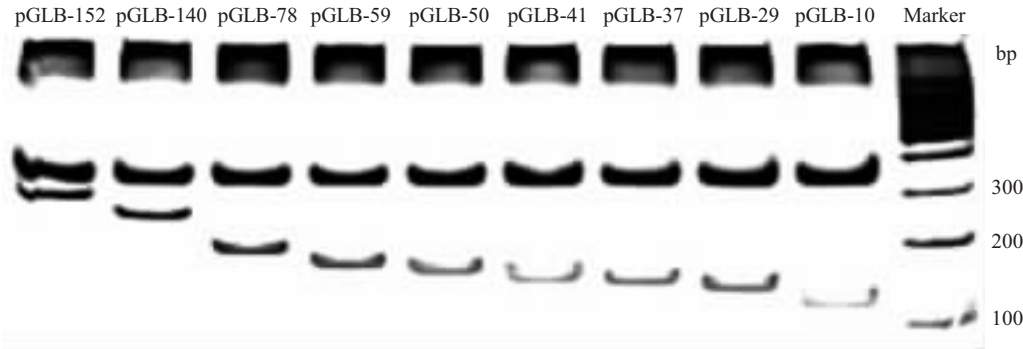


Fig. 6 Identification of A series of pGLB-152 mutant constructs with nested deletions

The nested deletions digested with *Kpn* I and *Hind* III were separated by 12% non-denaturing PAGE and stained with silver. The remained fragments is -140 ~+84 (224 bp), -78 ~+84 (162 bp), -59 ~+84 (143 bp), -50 ~+84 (134 bp), -41 ~+84 (125 bp), -37 ~+84 (121 bp), -29 ~+84 (113 bp), -10~+84 (94 bp), respectively. Each construct is named according to the distance in nucleotides of its upstream end from the transcription start site (+1).

2.6 pGLB 系列嵌套缺失质粒的表达活性及 TPA 反应性

从图 7 可见：在没有 TPA 作用条件下，pGLB-152 和 pGLB-140 两种质粒的表达活性最高，均极显著高于 pGLB 系列其他质粒和 pGLB 空载体 F test，约平均升高 10.0 倍. pGLB-152 和 pGLB-140 两种质粒之间相比表达活性没有明显差异. pGLB 系列其他质粒之间及其与 pGLB 空载体相比表达活性均没有明显差异. 在 TPA 作用条件下，pGLB-152 的表达活性最高，pGLB-140 的其次，

两者均极显著高于 pGLB 系列其他质粒和 pGLB 空载体 F test，约平均升高 22.2 倍. pGLB-152 和 pGLB-140两种质粒之间相比表达活性有明显差异 F test，pGLB-152 的表达活性是 pGLB-140 的 1.4 倍. pGLB-78 的表达活性与 pGLB-59、pGLB-50、pGLB-41、pGLB-37、pGLB-29、pGLB-10 以及 pGLB 空载体等的相比，前者显著或极显著 F test 高于后者，约平均升高 4.2 倍. 但后者之间相比均没有明显差异($P>0.05$). 在同一质粒条件下，有 TPA 作用与没有 TPA 作用两种情况之间相比，只

有 pGLB-152 和 pGLB-140 两种质粒, 有 TPA 作用的表达活性均明显高于没有 TPA 作用的 F test, pGLB-152 和 pGLB-140 分别升高 3.2 倍 (38.88/12.29) 和 2.0 倍 (27.49/13.57). 上述结果表明, *NGAL* 启动子区的基因表达调控元件位于 -152~-60 区段, 而且表现出明显的 TPA 反应性.

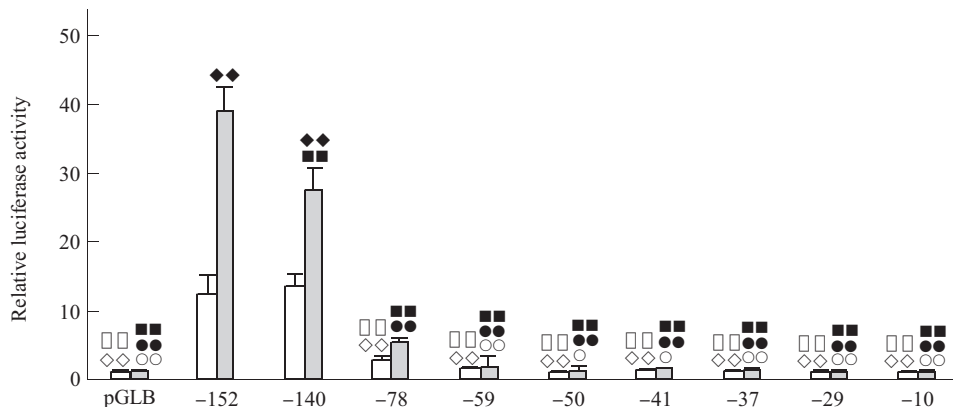


Fig. 7 The relative luciferase activity of a series of pG2B-152 mutant constructs transfected EC109 cells stimulated with TPA or not

□ and ○ indicate $P < 0.01$ (F test) without TPA stimulation, compared with pGLB-152 and pGLB-140, respectively. ○ or ○, ● and ■ indicate $P < 0.05$ or $P < 0.01$ (F test) with TPA stimulation, compared with pGLB-78, pGLB-140 and pGLB-152, respectively. ♦♦ indicate $P < 0.01$ (t test) with TPA stimulation, compared with unstimulation. In all cases, transfection and analysis of relative luciferase activity were carried out based on the same procedure as described in Figure 3. □: -TPA, ■: +TPA.

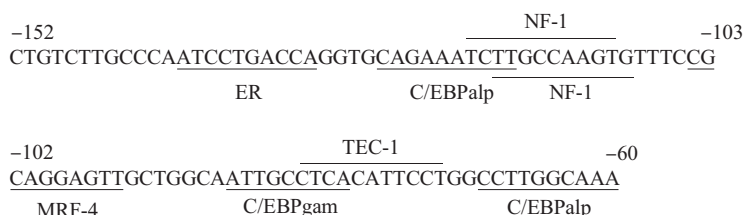


Fig. 8 The sketch map for putative TPA responsive elements in *NGAL* 5' flanking -152~-60 region

3 讨 论

我们以往研究发现, *NGAL* 在 TPA 诱导永生化人食管上皮细胞癌变中显著过表达^[7], 具有促进癌细胞侵袭的功能^[11], 同时还可能在癌细胞的不良分化中发挥作用^[12]. 这些研究结果提示, *NGAL* 可能是人类的一个重要的新癌基因, 但在食管癌等肿瘤细胞中过表达调控的机制不明.

近年, Cowland 等^[13]研究发现, 在 II 型肺泡上皮细胞 A549 培养液中加入细胞因子 IL-1 β 可诱导 *NGAL* 表达上调 10 倍以上. 而 Gombart 等^[14]则研究发现, C/EBP ϵ 因子(增强子元件 CCAAT 特异性结

2.7 *NGAL* -152 ~ -60 区段潜在的顺式作用元件生物信息学分析结果

从图 8 可见, 在 *NGAL* 5'侧翼区-152~-60 区域内共存在 8 个潜在的顺式作用元件. 这些元件均未见是否有 TPA 反应性方面的报道.

合蛋白因子) 缺陷鼠中性粒细胞 *NGAL* 的转录减弱. 这些实验结果提示, IL-1 β 和 C/EBP ϵ 等因子的作用分别与 II 型肺泡上皮细胞和中性粒细胞中 *NGAL* 的表达相关. 然而, 我们最近的研究结果表明, 在食管癌细胞中, *NGAL* 的转录与 IL-1 β 和 C/EBP ϵ 等因子的作用均没有关系(另文发表). 这提示在食管癌等肿瘤细胞中可能存在着另外一种机制控制着 *NGAL* 的转录.

pGLB、pGLP 和 pGLE 是三种不同性质的萤火虫荧光素酶报告基因表达载体. pGLB 空白载体上无任何启动子或增强子等基因转录调控元件. 把

NGAL 5'侧翼-152~+84 区间内不同长度片段 DNA 插入 pGLB, 主要目的就是要考查 *NGAL* 启动子区各片段 DNA 启动基因表达的基础水平. pGLP 空白载体上插有一个强启动子, 即 SV40 大 T 抗原基因启动子. 把 *NGAL* 5'侧翼-152~+84 区段 DNA 插入 pGLP, 主要目的就是要考查 *NGAL* 的这一区段 DNA 上所存在的基因转录调控元件在调节基因转录时所发挥作用的性质与能力. pGLE 空白载体上插有一个强增强子, 即 SV40 大 T 抗原基因的增强子. 把 *NGAL* 5'侧翼-152~+84 区段 DNA 插入 pGLE, 主要目的就是要考查 *NGAL* 启动子接受增强子作用的能力, 评价 *NGAL* 表达的可诱导特性. 从本文研究所获得的各项实验结果来看, *NGAL* 5'侧翼区-152~+84 区片段: a. 启动基因表达的基础水平是很高的; b. 所存在的基因转录调控元件具有明显的 TPA 反应性; c. 接受增强子作用的能力很强, 且表现出明显的 TPA 诱导特性. 在上述实验结果基础上, 本文进一步研究发现 *NGAL* 的 TPA 反应元件实际上存在于其 5'侧翼-152~-60 区段内. 这一方面说明 *NGAL* 的启动子区具有应答 TPA 刺激的结构基础, 另一方面也提示 TPA 是导致食管癌细胞 *NGAL* 过表达的一种调控因素. 推测 TPA 可能是通过细胞内信号传递途径激活了某种 TPA 反应元件结合蛋白, 导致 *NGAL* 过表达.

关于 TPA 反应元件, 较早就有研究报道, 但效应细胞种类不同, TPA 反应元件的序列会有很大变化. 迄今被研究报道的 TPA 反应元件主要有三种类型: a. AP-1 复合因子结合型^[15,16], 元件典型序列为 TGA(C/G)TCA; b. GATA 家族蛋白结合型^[17], 元件典型序列为 GATA box; c. Sp1 样家族蛋白结合型^[18,19], 元件典型序列为 GGGGCGGGGC. 生物信息学分析发现, 在 *NGAL* -152~+84 区段存在 9 个 TPA 反应元件, 但全部分布于-59~+84 片段内, 其中 8 个是 Sp1 样家族蛋白结合型, 1 个是 AP-1 复合因子结合型. 综合本文嵌套缺失 pGLB 系列质粒表达活性与 TPA 反应性实验结果可见, 实际上存在于-59~+84 片段内 9 个潜在的 TPA 反应元件, 在 TPA 诱导永生化食管上皮细胞癌变 *NGAL* 表达上调中可能均不发挥作用, 而真正发挥作用的 TPA 反应元件存在于 *NGAL* 5'侧翼-152~-60 区段内, 而且很可能是一种新结构类型形式. 另外, 联合运用定点突变、双荧光素酶报告基因检测系统和凝胶滞留等实验手段研究证明, *NGAL* 的 TPA 反应元件位于其 5'侧翼-95/-94 左右, 而

EC109 食管癌细胞核内的确存在着某种核蛋白因子能够与 *NGAL* 这一区域的相应片段(-107~-82) 相结合(另文发表).

总之, 在 *NGAL* 启动子区发现存在 TPA 反应元件是十分有意义的. 这既有助于深入到分子水平揭示为什么 TPA 诱导永生化食管上皮细胞癌变中 *NGAL* 表达上调, 同时也有助于进一步认识 TPA 信号细胞内传递途径网络在肿瘤发生发展中的作用机制.

参 考 文 献

- 1 许丽艳, 李恩民, 熊华淇. *NGAL* 的结构与功能研究进展. 生命科学, 2002, **14** (1): 27~29
Xu L Y, Li E M, Xiong H Q. Life Science, 2002, **14** (1): 27~29
- 2 Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, *et al.* The high molecular weight urinary matrix metallo- proteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. J Biol Chem, 2001, **276** (40): 37258~37265
- 3 Tschesche H, Zolzer V, Triebel S, *et al.* The human neutrophil lipocalin supports the allosteric activation of matrix. Eur J Biochem, 2001, **268** (7): 1918~1928
- 4 Yang J, Goetz D, Li J Y, *et al.* An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. Mol Cell, 2002, **10** (5): 1045~1056
- 5 Goetz D H, Holmes M A, Borregaard N, *et al.* The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. Mol Cell, 2002, **10** (5): 1033~1043
- 6 Flo T H, Smith K D, Sato S, *et al.* Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. Nature, 2004, **432** (7019): 917~921
- 7 许丽艳, 李恩民, 熊华淇, 等. *NGAL* 基因在永生化食管上皮细胞恶性转化中过表达的研究. 生物化学与生物物理进展, 2001, **28** (6): 839~843
Xu L Y, Li N M, Xiong H Q, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2001, **28** (6): 839~843
- 8 Shen Z, Cen S, Shen J, *et al.* Study of immortalization and malignant transformation of human embryonic esophageal epithelial cells induced by HPV18E6E7. J Cancer Res Clin Oncol, 2000, **126** (10): 589~594
- 9 许丽艳, 李恩民, 沈忠英, 等. *NGAL* 基因 5'侧翼区转录调控元件萤火虫荧光素酶报告基因表达载体的构建与鉴定. 癌变·畸变·突变, 2004, **16** (1): 5~8
Xu L Y, Li E M, Shen Z Y, *et al.* Carcinogenesis, Teratogenesis and Mutagenesis, 2004, **16** (1): 5~8
- 10 许丽艳, 李恩民, 蔡唯佳, 等. *NGAL* 基因 5'侧翼区转录调控元件的分段定位鉴定. 肿瘤防治杂志, 2004, **11** (5): 449~453
Xu L Y, Li E M, Cai W J, *et al.* Chin J Cancer Prev Treat, 2004, **11** (5): 449~453
- 11 李恩民, 许丽艳, 蔡唯佳, 等. SHEEC 食管癌细胞中 *NGAL* 基因的功能. 生物化学与生物物理学报, 2003, **35** (3): 247~254
Li E M, Xu L Y, Cai W J, *et al.* Acta Bichim Biophys Sin, 2003, **35** (3): 247~254
- 12 林珏龙, 许丽艳, 李恩民, 等. 封闭 *NGAL* 基因表达对 SHEEC 食

- 管癌细胞微丝骨架的影响. 生物化学与生物物理进展, 2004, **31** (5): 409~415
- Lin J L, Xu L Y, Li E M, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2004, **31** (5): 409~415
- 13 Cowland J B, Sorensen O E, Sehested M, *et al.* Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is up-regulated in human epithelial cells by IL-1 β , but not by TNF- α . J Immunol, 2003, **171** (12): 6630~6639
- 14 Gombart A F, Kwok S H, Anderson K L, *et al.* Regulation of neutrophil and eosinophil secondary granule gene expression by transcription factors C/EBP $\{\epsilon\}$ and PU.1. Blood, 2003, **101** (8): 3265~3273
- 15 Heinrich R, Livne E, Ben-Izhak O, *et al.* The c-Jun dimerization protein 2 inhibits cell transformation and acts as a tumor suppressor gene. J Biol Chem, 2004, **279** (7): 5708~5715
- 16 Humbert O, Achour I, Lautier D, *et al.* hMSH2 expression is driven by AP1-dependent regulation through phorbol-ester exposure. Nucleic Acids Research, 2003, **31** (19): 5627~5634
- 17 Schnakenburger M, Morceau F, Duvoix A, *et al.* Expression of glutathione S-transferase P1-1 in differentiating K562: role of GATA-1. Biochem Biophys Res Commun, 2003, **311** (4): 815~821
- 18 Kim E, Muga S J, Fischer S M. Identification and characterization of a phorbol ester-responsive element in the murine 8S-lipoxygenase gene. J Biol Chem, 2004, **279** (12): 11188~11197
- 19 Torgeman A, Mor-Vaknin N, Zelin E, *et al.* Sp1-p53 heterocomplex mediates activation of HTLV-I long terminal repeat by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate that is antagonized by protein kinase C. Virology, 2001, **281** (1): 10~20

There are TPA Response Elements in -152 ~ -60 Position of *NGAL* Gene 5' Flanking Region in The Esophageal Cancer Cells EC109*

XU Li-Yan^{1,2)}, LI En-Min^{3)**}, NIU Yong-Dong³⁾, CAI Wei-Jia²⁾,
YUAN Hua-Min²⁾, CHANG Jing-Xia²⁾, SHEN Zhong-Ying²⁾, ZENG-Yi¹⁾

¹⁾Department of Virology and Pharmacology, College of Life Science and Bioengineering,
Beijing University of Technology, Beijing 100022, China;

²⁾Institute of Oncologic Pathology, Medical College of Shantou University, Shantou 515041, China;

³⁾Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical College of Shantou University, Shantou 515041, China)

Abstract Overexpression of the neutrophil gelatinase-associated lipocalin (*NGAL*) gene is related to malignant transformation of human immortalized esophageal epithelial cell induced by 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate (TPA). However, the mechanisms of the transcriptional activation of this gene remain unclear. The recent study indicated that there might be TPA response elements in the 5' flanking promoter region and the sequences surrounding it. In order to locate the position of TPA response elements, the *NGAL* fragments for -152~+84, -140~+84, -78~+84, -59~+84, -50~+84, -41~+84, -37~+84, -29~+84 and -10~+84 were obtained from esophageal cancer cells by PCR and nested deletion and cloned into pGL3-Basic (pGLB), pGL3-Enhancer (pGLE) and pGL3-promoter (pGLP) vector which are luciferase reporters, respectively. The constructed recombinant expression plasmids pGLB-152, pGLP-152, pGLE-152, pGLB-140, pGLB-78, pGLB-59, pGLB-50, pGLB-41, pGLB-37, pGLB-29 and pGLB-10 were adopted to cotransfect with pRL-TK into EC109 esophageal cancer cells stimulated with TPA (5 μ g/L) respectively or not. Relative luciferase activity of whole cell extracts from cells was measured with Dual Luciferase Report Gene Assay System (DLR) to verify the position of TPA response elements. Results showed that the TPA response elements of *NGAL* are located on -152~-60 region and have a strong response to TPA stimulation in the esophageal cancer cells. The analysis by bioinformatics showed that the potential TPA responsive element in -152~-60 position of *NGAL* is a new sequence. This suggested that there is the structural character responding to TPA induction in the gene. These results will help to clarify the molecular mechanisms of *NGAL* overexpression in malignant transformation of human immortalized esophageal epithelial cell induced by TPA.

Key words neutrophil gelatinase-associated lipocalin gene, esophageal cancer cells, gene expression regulation, TPA response element

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (39900069, 30170428, 30370641, 30570849), Guangdong Scientific Fund Key Items (37788, 05104541) and The Natural Science Foundation of Guangdong Province (010431) .

**Corresponding author . Tel: 86-754-8900847, 8900247, Fax: 86-754-8900247, E-mail: nmli@stu.edu.cn

Received: August 8, 2005 Accepted: August 29, 2005