

BRD7 基因调控区的克隆与功能研究 *

刘华英 罗晓敏 牛朝霞 周艳宏 周 鸣
彭 聪 向 波 李伟松 李小玲 李桂源 **
(中南大学肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 BRD7 基因是采用 cDNA 代表性差异分析法克隆得到的一个新的 Bromodomain 基因(GenBank 登录号 AF152604). 它在鼻咽癌细胞和组织中表达明显下调, 过表达 BRD7 基因能部分逆转鼻咽癌细胞的恶性表型. 为了揭示 BRD7 基因在鼻咽癌细胞和组织中表达下调的分子机制, 利用生物信息学技术已预测出其启动子区. 荧光素酶活性检测结果表明该区域具有强启动子活性; 转录因子 Sp1 特异性地结合于 BRD7 该启动子区; Sp1 特异性阻断剂 mithramycin A 能明显地抑制 BRD7 启动子的活性和 BRD7 基因的表达.

关键词 BRD7 基因, 启动子, 启动子活性, Sp1 转录因子, mithramycin A

学科分类号 Q74

鼻咽癌的发生是一个多因素、多阶段的过程, 病因学研究表明遗传因素、环境因素和 EB 病毒感染均与鼻咽癌的发生有关^[1]. 统计学资料表明, 10% 的鼻咽癌患者有癌家族史, 提示肿瘤的遗传易感性可能在鼻咽癌的发生发展中起重要作用^[2]. 运用 cDNA 代表性差异分析法(cDNA representational difference analysis, cDNA RDA), 已成功地分离出了多个原代培养的人胚鼻咽上皮细胞与鼻咽癌细胞株 HNE1 中差异表达的基因^[3-5]. BRD7 基因就是采用 cDNA 代表性差异分析法克隆得到的一个新的 Bromodomain 基因(GenBank 登录号 AF152604)^[6]. 它在鼻咽癌细胞和组织中表达明显下调, 过表达 BRD7 基因能部分逆转鼻咽癌细胞的恶性表型^[7]. 余鹰等^[8]利用酵母双杂交技术筛选到多个 BRD7 交互作用蛋白, 如: BRD2、BRD3、 β -I κ B 激酶、KIAA1375、IL-7 和接头相关蛋白复合物 3 δ -1 亚单位(adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit). 其中 β -I κ B 激酶参与 HPK1-MEKK1 信号转导通路, 而 IL-7 是前 B 细胞活化因子, 说明 BRD7 基因很可能是一个潜在的鼻咽癌的抑癌基因. 周洁等^[9]研究表明, BRD7 通过与乙酰化染色质结合, 传递组蛋白乙酰化信号以及参与 ras/MEK/ERK 和 Rb/E2F 两条信号通路而调控一些细胞周期相关基因, 从而抑制鼻咽癌细胞生长和细

胞周期进程. 为了揭示 BRD7 基因在鼻咽癌细胞和组织中表达下调的分子机制, 我们展开了对 BRD7 基因的表达调控机制研究. 利用生物信息学技术已预测出其启动子区, BRD7 启动子是一个不含 TATA 盒, 也不含 CAAT 盒的高 GC 含量区, 有多个 GC 盒, 多种转录因子结合位点, 包括 KLF、Sp1、E2F、MYC-MAX 和 AP2 等结合位点. 通过 PCR 技术从正常人血细胞 DNA 中扩增 1 207 bp (-711 $\rightarrow$ +496)BRD7 基因调控区 DNA 片段, 并构建成荧光素酶表达质粒, 荧光素酶活性检测结果表明, 该区域为 BRD7 基因启动子区, 电泳迁移率实验(EMSA)结果显示转录因子 Sp1 结合于 BRD7 启动子区. Sp1 特异性阻断剂 mithramycin A 能明显地抑制 BRD7 启动子的活性并抑制 BRD7 mRNA 的表达. 这一研究为更好地了解 BRD7 基因在鼻咽癌发生发展中的作用与地位提供一个基础平台, 为寻找新的纠正鼻咽癌相关基因转录调控失调的药物打下基础.

*国家自然科学基金重大项目(30330560), 国家自然科学基金项目(30300175, 30400238, 30400528)和湖南省自然科学基金项目(05JJ300063).

** 通讯联系人. Tel/Fax: 0731-4805383, E-mail: ligy@xysm.net

收稿日期: 2005-12-20, 接受日期: 2006-01-27

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞. 正常肝上皮细胞、正常食道上皮细胞为原代培养胚胎细胞, L-02、BEL-7404、MCF-7、SW480、COS7、HEK293 为中南大学肿瘤研究所细胞库保存.

1.1.2 载体. pGEM-T Easy、pGL3/Enhancer、pGL3/Control 购自 Promega 公司.

1.1.3 试剂盒. 核蛋白抽提试剂盒(NR-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents) 购自 Pierce Biotechnology 公司; 染色质免疫共沉淀试剂盒(ChIP 试剂盒)购自 Upstate 公司; E. Z. N. A 血液基因组 DNA 提取试剂盒购自美国 Omega 公司; 电泳迁移率实验试剂盒(EMSA 试剂盒)、荧光素酶检测试剂盒、逆转录试剂盒均为 Promega 公司产品; Trizol™ 试剂购自美国 GIBCOL BRL 公司; 质粒抽提试剂盒和胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司.

1.1.4 试剂. 核酸分子质量标准 DL2000 Marker、LA Taq DNA 聚合酶、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); 同位素 γ -[³²P]-ATP 购自北京福瑞公司; G250 探针纯化柱购于 Amersham 公司; Lipofectamine 2000 脂质体购于 Invitrogen 公司; mithramycin A 购于 Sigma 公司; Sp1 抗体购自 Upstate 公司.

1.1.5 引物. 引物和探针由 TaKaRa 公司合成. 所用引物序列如下: BRD7 (RT-PCR), Forward, 5' CGTGGATCCGAAGAAGTAGAACAGACA 3'. Reverse, 5' ATTCCCGGGGAATTATTTCTGCTTAA 3'. GAPDH (RT-PCR), Forward, 5' TCTAG-ACGGCAGGTCAGGTCCACC 3', Reverse, 5' CC-ACCATGGCAAATTCATGGCA 3'.

1.2 方法

1.2.1 细胞总 RNA 的抽提及 RT-PCR. 培养细胞并按照 TRIzol™ 试剂盒(GIBCOL BRL 公司)操作程序提取细胞总 RNA, DNase I 消化 RNA 中痕量 DNA, 紫外分光光度计测定其浓度, 经 PCR 扩增 GAPDH 检测无特异扩增条带以保证 DNA 消化完全, RT-PCR 反应按照 Promega 公司的逆转录试剂盒进行. 50 μ l PCR 的反应体系中含 KCl 50 mmol/L, MgCl₂ 1.5 mmol/L, dNTP 200 mmol/L, Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8.0, 模板 cDNA 2 μ l, Taq 酶 3U,

待检测基因的引物 0.1 mmol/L. 当 BRD7 基因扩增 5 个循环时, 再加入内对照 GAPDH 的引物 0.1 mmol/L 进行 25 个循环. PCR 反应参数如下: 94°C 5 min; 94°C 50 s, 57°C 50 s, 72°C 50 s, 30 个循环; 72°C 10 min. 1.5%琼脂糖凝胶电泳, 上样量 5 μ l, 溴乙锭染色, 紫外灯下照相. 在确定 Sp1 的特异性阻断剂 mithramycin A 对 BRD7 基因表达的影响时, 培养 HEK293 细胞, 用终浓度为 25 μ mol/L mithramycin A 处理细胞 24 h, 再提取细胞 RNA 并按上述程序进行 RT-PCR.

1.2.2 启动子区域、CpG 岛、转录因子结合位点的预测. 在线软件 PromoterInspector program (http://genomatix.de/cgi-bin/PromoterInspector_pd/promoterinspector.pl) 和 PromoterScan program (<http://bimas.dcrtn.nih.gov/molbio/proscan/>)是预测高 GC 含量启动子的特异性软件, 通过这两个软件预测 BRD7 基因启动子区域. 用 CpGplot of the European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS: <http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot>) 预测 BRD7 基因的 CpG 岛. 通过 MatInspector Professional (http://genomatix.de/cgi-bin/matinspector_prof/mat_fam.pl) 分析与 BRD7 基因启动子区结合的转录因子.

1.2.3 pGL3/Enhancer/1207 的构建及鉴定. 按 E. Z. N. A 血液基因组 DNA 提取试剂盒提取正常人全血 gDNA, 针对 GenBank 登录的 BRD7 基因序列号 AF152604 的基因组 DNA 序列 -711 至 +496 bp, 设计上游引物, 5' aaaggtaccGTAA-AAGGGAAGAAACAGAAGCAAG 3', 下游引物, 5' aaagctagcCAAGGGCTTCTCTACATACTCTTA-AA 3', 以 gDNA 为模板, PCR 扩增 BRD7 基因的调控序列, PCR 条件: 首先 95°C 变性 5 min, 94°C 30 s, 54°C 50 s, 72°C 2 min, 30 个循环, 再 72°C 延伸 10 min. 扩增产物用 T4 DNA 连接酶接入 pGEM-T easy 载体. 经测序证实后用 *Kpn* I 和 *Nhe* I 双酶切, 胶回收 1 207 bp 的目的酶切片段, 连接到同样经 *Kpn* I 和 *Nhe* I 双酶切制备好的 pGL3/Enhancer 线性化载体上, 构建成 pGL3/Enhancer/1207 载体. 挑选阳性重组克隆, *Kpn* I 和 *Nhe* I 进行双酶切鉴定并测序.

1.2.4 BRD7 基因调控区功能分析. 待转染细胞 (COS7, HEK293, SW480, MCF-7)接种于 12 孔培养板中, 当细胞生长至 95% 融合度时, 按 Lipofectamine 2000 脂质体说明书将

pGL3/Enhancer/1207、pSV- β -半乳糖苷酶表达质粒分别共转染入 COS7, HEK293, SW480, MCF-7 细胞, 并以共转染 pGL3/Enhancer 和 pSV- β -半乳糖苷酶表达质粒的相应细胞为阳性对照, 转染 30 h 后, 收获细胞并进行报道基因活性检测. 具体步骤如下: 倒掉细胞培养基, 用 PBS 洗细胞 2~3 次, 加入 100 μ l 1 $\times$ 裂解缓冲液, 室温放置 15~20 min, 再反复冻融一次, 将细胞裂解物移入 Tube 管中, 短暂离心 5~10 s, 取 20 μ l 细胞裂解物加入 100 μ l 底物, 混匀, 置入单光子检测仪测定. 另外余留部分细胞裂解液, 按 pSV- β -半乳糖苷酶分析系统 (Promega 公司) 测量 pSV- β -半乳糖苷酶的活性. 每组数据取 4 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.

1.2.5 提取 MCF-7 细胞核蛋白. 收集 MCF-7 细胞, 预冷 PBS 洗涤细胞 2 次, 4 $^{\circ}$ C 3 000 r/min 离心 10 min, 收集细胞, 然后按核蛋白抽提试剂盒抽提核蛋白, 最后收集上清, 测量核蛋白浓度并保存在 -70 $^{\circ}$ C 备用.

1.2.6 电泳迁移率实验 (EMSA). 设计探针如下: Sp1 (-223/-198), 5' CGGCCGCGCGCCCCC-CCGCCGCCGC 3'; Mutant Sp1 (-223/-198), 5' CGGCCGCGCGCCCCGAACGCCGCCGC 3'; AP2 (-280/-268), 5' GCCGCCACCCGCAGCCGCCGCCGCAC 3'; Mutant AP2 (-280/-268), 5' GC-CGCCATTTGCAGCCGCCGCCGCAC 3'. 98 $^{\circ}$ C 加热探针 15 min, 自然冷却使其退火, 用 γ 32 P ATP (1.11 $\times$ 10 6 Bq, 1.85 $\times$ 10 6 Bq, 1.11 $\times$ 10 17 Bq/mol) 5' 端标记探针, G25 Sephadex 柱纯化探针, 用作竞争抑制剂冷探针退火后不标同位素.

电泳迁移率实验按 Promega 公司提供的 EMSA 试剂盒操作程序进行. 10 μ l 的总反应体系中使用了 8 μ g 的核蛋白, cpm 值为 20~30 000 的标记探针, 待所有成分加入后, 室温孵育 20 min, 上样于 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶, 0.5 $\times$ Tris-borate-EDTA 电泳缓冲液、250V 电泳 1 h, -70 $^{\circ}$ C 曝光过夜.

1.2.7 Mithramycin A 处理. Mithramycin A 是转录因子 Sp1 的特异性阻断剂, 它能特异性地阻断 Sp1 因子介导的转录活性. HEK293 或 COS7 细胞在共转染 pGL3/Enhancer/1207 和 pSV2 β 2 半乳糖苷酶表达质粒后, 经不同浓度 mithramycin A 处理 24 h, 检测荧光素酶活性.

1.2.8 数据处理. 所有数值均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS10.0 统计软件分析.

2 结 果

2.1 RT-PCR 检测 BRD7 基因在多种细胞中的表达

RT-PCR 是一种半定量的 PCR, 采用以下措施保证其有效性: a. 消化干净总 RNA 中的痕量 DNA; b. 内对照 GAPDH 与目的基因在同一 PCR 试管中扩增; c. 在 GAPDH 与目的基因二者的平台期前结束 PCR. 预实验显示: 目的基因在 32 个循环, GAPDH 在 27 个循环进入平台期. 本实验选择目的基因扩增 30 个循环, GAPDH 25 个循环. 即在目的基因扩增 5 个循环后加入 GAPDH 引物. 实验结果显示, BRD7 基因在乳腺癌 MCF-7 细胞、非洲绿猴肾 COS7 细胞、腺病毒转染人胚肾上皮 HEK293 细胞中高表达, 而在正常食道上皮和结肠癌细胞 SW480 中低表达, 由于正常食道上皮细胞来源受限, 所以选择 MCF-7、COS7、HEK293 和 SW480 作为 BRD7 基因表达研究的实验材料.

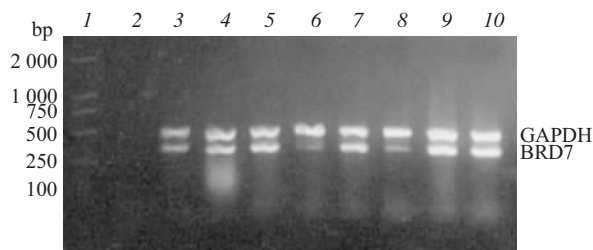


Fig. 1 RT-PCR analysis of BRD7 gene expression in different cultured cell lines

1: DNA molecular mass marker: DL2000; 2: H₂O; 3: L-02; 4: Normal liver epithelia; 5: BEL-7404; 6: Normal esophagus epithelia; 7: MCF-7; 8: SW480; 9: COS7; 10: HEK293.

2.2 生物信息学方法预测 BRD7 基因启动子区及 CpG 岛

以翻译起始密码子为 +1, 在线软件 PromoterInspector 预测 BRD7 基因启动子区位于 -393 bp 至 -141 bp (图 2a); 在线软件 PromoterScan 预测 BRD7 基因启动子区位于 -375 bp 至 +416 bp (图 2a), 这两个预测启动子区大部分重叠. 在线软件 CpGplot of the European Molecular Biology Open Software Suite 预测 BRD7 基因调控区内有一 CpG 岛, 位于 -418 bp 至 -56 bp (图 2b), 这一区域与预测的启动子区也大部分重叠, 在这些预测结果的指导下, 所以我们设计引物扩增 BRD7 基因 -711 bp 至 +496 bp 的调控区片段.

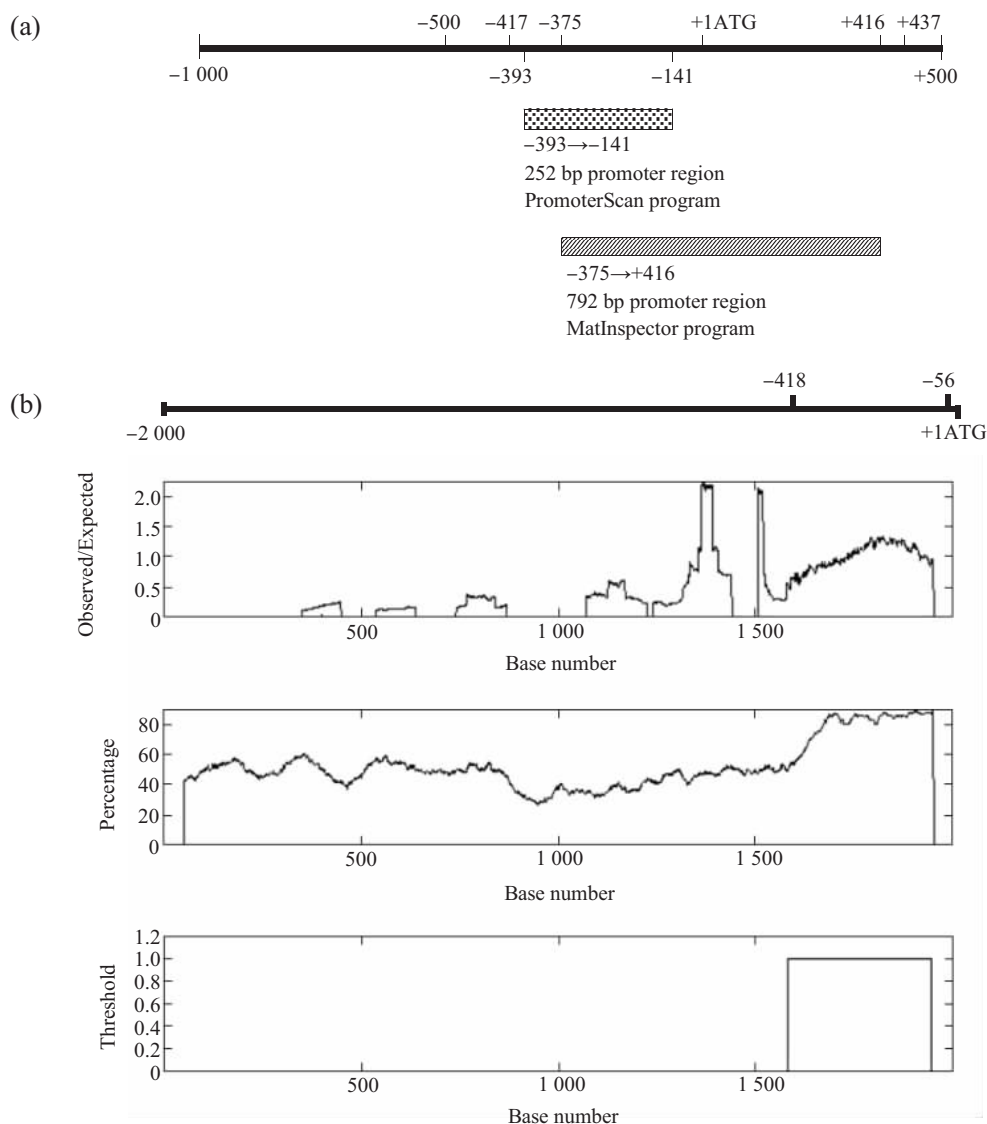


Fig. 2 Bioinformatics analysis of promoter region and CpG island of BRD7 gene

(a) The translation start site is numbered as position +1 and the rest of the sequence is numbered relative to it. The region from positions -393 to -141 bp predicted to be the promoter region by the online program PromoterScan is shown as a black-white square box. And the region from positions -375 to +416 bp predicted to be the promoter region by the online program PromoterInspector is shown as a hatched box. (b) The A of the initiation codon is numbered as +1. BRD7 regulatory region from positions -418 to -56 bp was predicted to be a CpG island by the online program CpGplot of the European Molecular Biology Open Software Suite.

2.3 PCR 扩增 BRD7 基因调控序列并构建 pGL3/Enhancer/1207 载体

以 gDNA 为模板, 用 PCR 试剂盒扩增 BRD7 基因的调控序列, 扩增到了单一的产物条带(图 3), 产物用 T4 DNA 连接酶克隆入 pGEM-T easy 载体. 测序证实此条带产物为 BRD7 基因 -711 bp 至 +496 bp 的调控序列, 而后经 *Kpn* I 和 *Nhe* I 双酶切载体 pGEM-T easy/1207 并回收 1 207 bp 片段(图 4a), 连接到经同样双酶切制备好的 pGL3/Enhancer 线性化载体上, 构建成功光素酶表达载体, 并命名为 pGL3/Enhancer/1207. 挑选阳性重组克隆, 双酶切和测序结果都证实载体

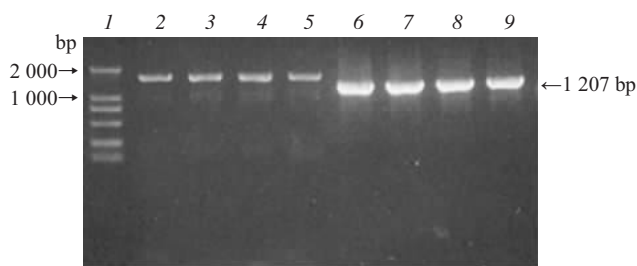


Fig. 3 Amplification of the BRD7 regulatory region by PCR with gDNA as template

1: DL 2000 molecular mass marker; 2,3,4,5: PCR product of the 1 518 bp (-1 012 to +506 bp) regulatory region of BRD7 gene; 6,7,8,9: PCR product of the 1 207 bp (-711 to +496 bp) regulatory region of BRD7 gene. (The A of the initiation codon is numbered as +1).

pGL3/Enhancer/1207构建成功(图 4b).

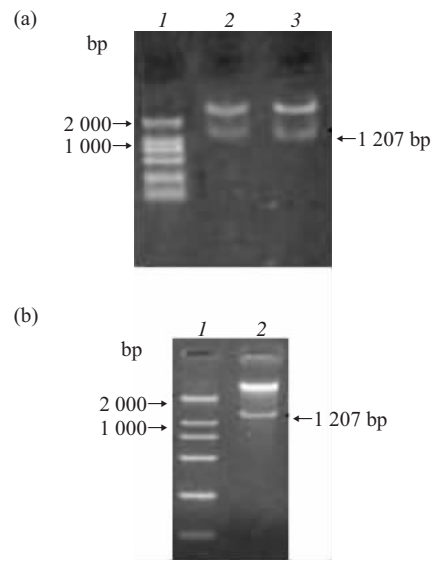


Fig. 4 Verifaton of pGEM-T easy/1207 and pGL3/Enhancer/1207 by enzyme cutting
(a) Enzyme cutting of pGEM-T easy/1207 with *Kpn* I and *Nhe* I . (b) The enzyme cutting of pGL3/Enhancer/1207 with enzyme *Kpn* I and *Nhe* I .

2.4 确定 BRD7 基因调控序列 (−711→+496) 的启动子活性

以报道质粒 pSV-β - 半乳糖苷酶为内对照, 以 pGL3/Control 为阳性对照, 将载体 pGL3/Enhancer/1207 分别转染不同细胞, 荧光素酶活性检测结果表明: pGL3/Enhancer/1207 在 COS7、SW480、MCF-7 细胞中具有与 pGL3/Control 几乎同等的活性(图 5), 有趣的是, pGL3/Control 在 HEK293 细

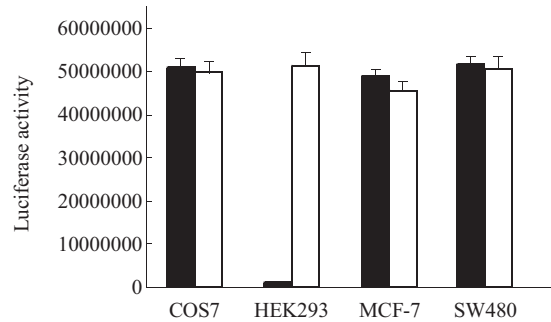


Fig. 5 Identification of the promoter activity of the BRD7 regulatory region from positions −711 to +496bp
pGL3/Enhancer/1207 was transfected into COS7, HEK293, MCF-7 and SW480 cells, respectively. All of the constructs were cotransfected with SV40 β-galactosidase vector for internal control. Luciferase activity was measured in cell extracts 30 h after transfection. The luciferase activity of pGL3/Control was used as positive control. Data are analyzed with software SPSS10.0 and represented by the ($\bar{x} \pm s$) of three independent experiments. ■: pGL3/Enhancer; □: pGL3/1207.

胞中几乎没有活性, 而 pGL3/Enhancer/1207 在 HEK293 细胞中具有与在 COS7、SW480、MCF-7 中同等的活性(图 5). 这些结果说明, BRD7 基因 −711 bp 至 +496 bp 的区域具有与 SV40 启动子同等强度的活性.

2.5 软件 MatInspector 在线分析 BRD7 基因调控区 (−711 至+496bp) 转录因子结合位点

在线软件 MatInspector 分析 BRD7 基因启动子区域, 发现有多种转录因子结合位点, 其中重要的结合位点有: KLF, Sp1, E2F, MYC-MAX 和 AP2 等(图 6).

2.6 EMSA 分析确认 BRD7 基因调控区转录因子结合位点

为了证实软件分析得到的结果, 我们分别合成了转录因子 Sp1 和 AP2 结合位点及突变位点探针: Wt Sp1 (−223/−198), Mutant Sp1(−223/−198); Wt AP2 (−280/−268), Mutant AP2(−280/−268)(图 7a). EMSA 结果显示: Sp1 探针与核蛋白结合形成两条 DNA- 核蛋白复合物条带, 并且 50 倍野生型冷探针就足以抑制 Sp1 热探针与核蛋白结合, 而 100 倍的突变型冷探针不能抑制热探针与核蛋白结合(图 7b 左侧), 这些说明 BRD7 基因调控区 −223 至 −198 bp 能特异性地结合转录因子 Sp1. AP2 探针与核蛋白结合形成两条 DNA- 核蛋白复合物条带, 转录因子能与 BRD7 基因调控区 −280 至 −268 bp 结合, 但不论是野生型冷探针还是突变型冷探针都能抑制热探针与核蛋白结合(图 7b 右侧), 这些说明转录因子 AP2 与 BRD7 基因调控区的结合是非特异性的结合.

2.7 Sp1 特异性阻断剂 mithramycin A 下调 BRD7 基因启动子活性及 BRD7 基因表达

HEK293 或 COS7 细胞在共转染 pGL3/Enhancer/1207 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 HEK293 和 COS7 中, Sp1 特异性阻断剂 mithramycin A 能明显地抑制 BRD7 基因启动子活性(图 8a). 同样, 在确定 mithramycin A 对 BRD7 基因表达的影响时, 培养的 HEK293 细胞经终浓度为 25 μmol/L mithramycin A 处理 24 h 后, RT-PCR 结果表明: mithramycin A 能下调 BRD7 基因的表达(图 8b).

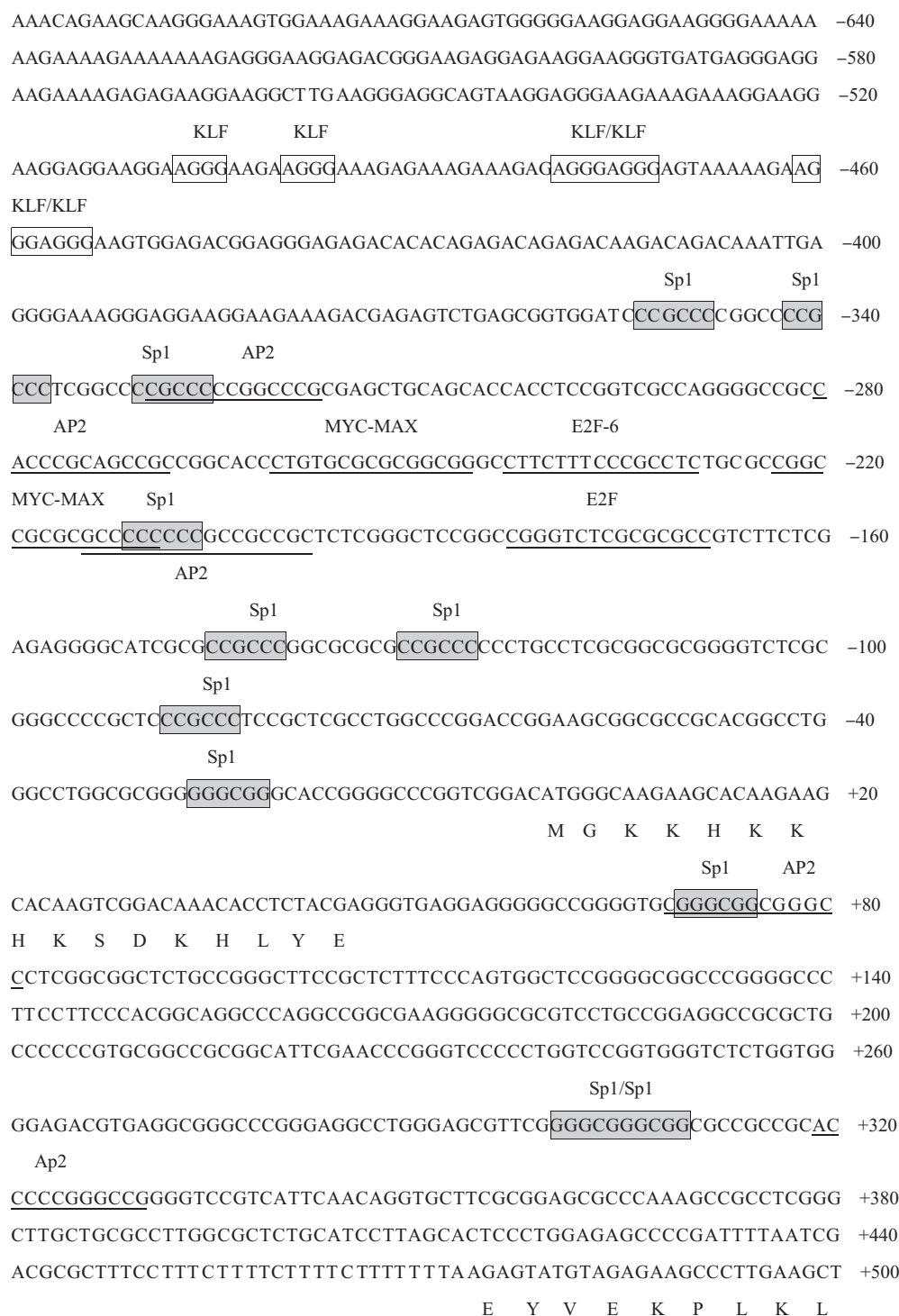


Fig. 6 Analysis of putative binding sites of transcription factors in the regulatory region of BRD7 gene (-699 to +500) by online program MatInspector

The A of the initiation codon (ATG) is numbered as +1. The sequences showing different transcription factor binding sites of BRD7 gene are underlined or shown as hatched boxes or histograms.

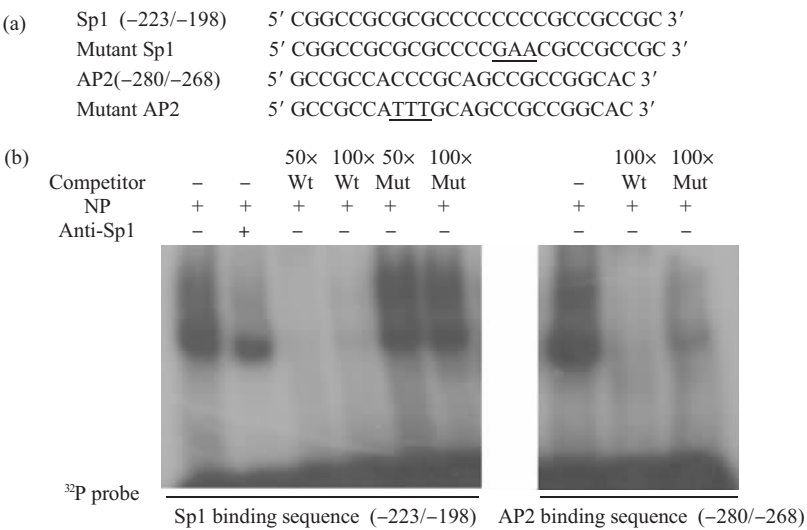


Fig. 7 Transcription factors Sp1 binds to the corresponding site of BRD7 regulatory region
(a) The sense sequences of oligonucleotides used in electrophoretic mobility-shift assay were shown. (b) Left: Transcriptional factor Sp1 binds specifically to the promoter region of BRD7 gene. Right: The binding of transcriptional factor AP2 with the promoter region of BRD7 gene is non-specific.

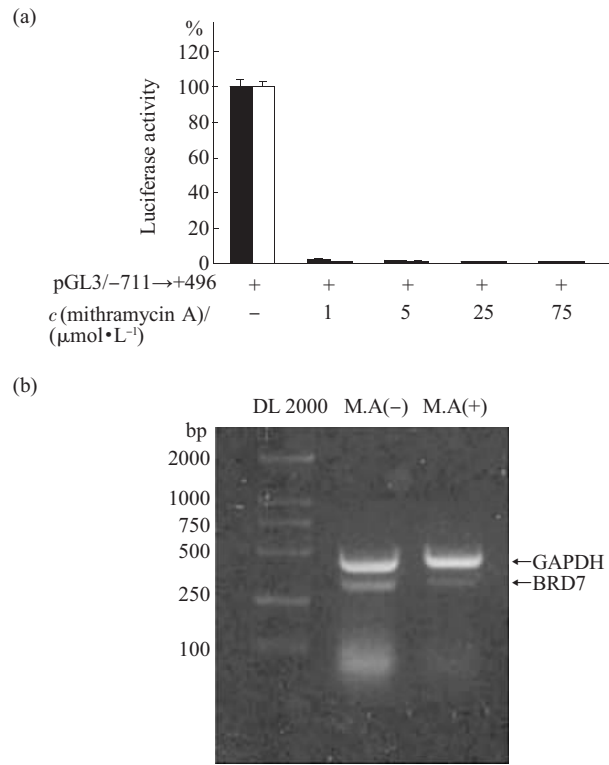


Fig. 8 Mithramycin A, a specific inhibitor of Sp1, down-regulates the promotor activity and the endogenous expression of BRD7 gene
(a) pGL3/Enhancer/1207 was co-transfected with SV40 β-galactosidase vector into HEK293 and COS7 cells, respectively. After treated with mithramycin A for 24 h, the cells were collected and measured with the luciferase activity. ■: COS7; □: HEK293. (b) Cultured HEK293 cells were treated with 25 μmol/L mithramycin A for 24 h, then total RNA was isolated. The endogenous expression of BRD7 was detected by RT-PCR.

3 讨 论

BRD7 基因是采用 cDNA 代表性差异分析法克隆得到的一个新的 Bromodomain 基因^[6]. 它在鼻咽癌细胞和组织中表达明显下调, 功能研究表明, BRD7 基因的功能与鼻咽癌的发生发展有着密切的关系, 它很可能是一个潜在的鼻咽癌的抑瘤基因^[7,9]. 为了揭示 BRD7 基因在鼻咽癌细胞和组织中表达下调的分子机制, 我们展开了 BRD7 基因转录调控机制研究. RT-PCR 结果显示, BRD7 基因在乳腺癌 MCF-7 细胞、非洲绿猴肾 COS7 细胞、腺病毒转染人胚肾上皮 HEK293 细胞中高表达, 而在正常食道上皮和结肠癌细胞 SW480 中低表达, 这些结果显示 BRD7 基因的表达具有组织特异性, 因此, 研究 BRD7 基因的表达调控更重要. 生物信息学预测结果为其表达调控研究提供了一个很好的切入点, 不同软件预测 BRD7 基因启动子区域大部分重叠, 而且在 BRD7 基因调控区内有一个 CpG 岛, 这一 CpG 岛区域与预测的启动子区域也大部分重叠, 这些预测结果为我们提出 BRD7 基因启动子区可能就位于该区段的假说提供了十足的信心, 所以设计引物扩增-711 bp 至 +496 bp (以翻译起始密码子为 +1) 的 BRD7 基因调控区片段. 以正常血 gDNA 为模板, PCR 扩增这一片段并构建成荧光素酶表达载体 pGL3/Enhancer/1207. pGL3/Control 载体在荧光素酶编码序列前连接了一个 SV40 启动

子, 在转染实验中与分析启动子同条件转染, 作为阳性对照. 荧光素酶活性检测结果表明, pGL3/Enhancer/1207 在 COS7、SW480、MCF-7 细胞中具有与 pGL3/Control 几乎同等的活性. 有趣的是, pGL3/Control 在 HEK293 细胞中几乎没有活性, 这可能是 HEK293 细胞中存在某种或某些抑制 SV40 启动子活性的分子, 而 pGL3/Enhancer/1207 在 HEK293 细胞中具有与在 COS7、SW480、MCF-7 中同等的活性. 这些结果说明 BRD7 基因 -711 bp 至 +496 bp 的区域包含 BRD7 基因启动子, 而且这一区域启动子活性没有组织特异性, 但并不能说明 BRD7 基因启动子活性没有组织特异性, 因为 BRD7 基因的表达具有组织特异性(图 1), 调控 BRD7 基因启动子活性组织特异性的序列可能存在于 -711 bp 至 +496 bp 的区域之外. 进一步生物信息学分析发现, -711 bp 至 +496 bp 片段内有多种转录因子结合位点, 如: KLF, Sp1, E2F, MYC-MAX 和 AP2 等, EMSA 结果显示 Sp1 转录因子能特异性地与 BRD7 基因调控区 -223 至 -198 bp 结合. AP2 转录因子虽能与该调控区结合, 不论是野生型冷探针还是突变型冷探针都能抑制热探针与核蛋白结合(图 7b), 说明 AP2 转录因子与 BRD7 基因该调控区的结合是非特异性的结合. Sp1 (specific protein 1) 转录因子是一种含有锌指结构、具有序列特异性的 DNA 结合蛋白. 最初发现 Sp1 转录因子能与病毒 SV40 基因调控序列 GC 盒结合并选择性促进 SV40 启动子转录活性. 它广泛存在于多种组织和细胞中, 主要识别 GGGGCGGGGC 及相似序列(即 GC 盒), 而 GC 调控序列又广泛存在于多种组织和细胞基因中, 因此 Sp1 作为细胞内信号传导的靶分子, 在调节相关靶基因转录调控中具有重要作用^[10,11]. mithramycin A 是转录因子 Sp1 的特异性阻断剂^[11], 它能特异性地阻断 Sp1 因子介导的转录活性. HEK293 或 COS7 细胞在共转染 pGL3/Enhancer/1207 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 HEK293 和 COS7 中, Sp1 特异性阻断剂 mithramycin A 能明显地抑制 BRD7 基因启动子活性(图 8a). 同样, RT-PCR 结果表明: mithramycin A 能下调 BRD7 基因的表达(图 8b). 这些结果从反面证实转录因子 Sp1 对 BRD7 基因表达的正性调控作用, 另一方面我们正在构建 Sp1 表达载体 pCMV-HA/Sp1, 从正面研究转录因子 Sp1 对 BRD7 基因表达的正性调控作用.

BRD7 基因调控区内存在一个 CpG 岛, 对 BRD7 基因调控区 CpG 岛甲基化的探讨将是我们研究 BRD7 基因表达调控的又一目标^[12]. 这些研究为深入探讨 BRD7 基因的调控机制、进一步寻找调控 BRD7 基因表达的相关分子作铺垫, 为更好地了解 BRD7 基因在鼻咽癌发生发展中的作用与地位打基础, 为寻找新的针对纠正鼻咽癌相关基因转录调控失调的药物提供一个基础平台.

参 考 文 献

- Muir C, Waterhouse J, Mack T, *et al.* Cancer incidence in five continents. In: International Agency for Research on Cancer. IARC Scientific Publication No. 88, 1987, 5. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 1987. 1~970
- Huang D P, Lo K W, Choi P H, *et al.* Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 3 in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 1991, **54** (1): 91~99
- 李忠花, 曹利, 李桂源, 等. 鼻咽癌细胞中表达上调的新基因 NAG23(FBXO30)的克隆与分析. *癌症*, 2001, **20** (9): 906~910
Li Z H, Cao L, Li G Y, *et al.* *Chinese Journal of Cancer*, 2001, **20** (9): 906~910
- 湛凤凰, 江宁, 李桂源, 等. cDNA 代表性差异表达分析法分离鼻咽癌上皮细胞株 HNE1 表达差异 cDNA 序列的初步研究. *中华医学遗传学杂志*, 1998, **15** (6): 341~344
Zhan F H, Jiang N, Li G Y, *et al.* *Chin J Med Genet*, 1998, **15** (6): 341~344
- 余鹰, 张必成, 李桂源, 等. 两个鼻咽癌负相关新基因的分离与特性. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, **16** (5): 637~643
Yu Y, Zhang B C, Li G Y, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 2000, **16** (5): 637~643
- 余鹰, 谢奕, 李桂源. 一个新鼻咽癌抑癌候选基因的克隆及其功能初步分析. *生物化学与生物物理进展*, 2000, **27** (3): 319~324
Yu Y, Xie Y, Li G Y, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2000, **27**(3): 319~323
- 余鹰, 朱诗国, 张必成, 等. BRD7 基因转染对鼻咽癌细胞生长的抑制作用. *癌症*, 2001, **20** (6): 569~574
Yu Y, Zhu S G, Zhang B C, *et al.* *Chinese Journal of Cancer*, 2001, **20** (6): 569~574
- 余鹰, 朱诗国, 张必成, 等. 应用酵母双杂交系统筛选 BRD7 相互作用的蛋白质. *中国科学 C 辑*, 2002, **32** (2): 153~158
Yu Y, Zhu S G, Zhang B C, *et al.* *Science in China (Series C)*, 2002, **32** (2): 153~158
- Zhou J, Ma J, Zhang B C, *et al.* BRD7, a novel bromodomain gene, inhibits G1-S progression by transcriptionally regulating some important molecules involved in ras/MEK/ERK and Rb/E2F pathways. *J Cell Physiol*, 2004, **200** (1): 89~98
- Gazzoli I, Kolodner R D. Regulation of the human MSHb gene by the Sp1 transcription factor and alteration of promoter activity and expression by polymorphisms. *Mol Cell Biol*, 2003, **23** (22): 7992~8007

- 11 Rance J B, Follows G A, Cockerill P N, *et al.* Regulation of the human endothelial cell protein C receptor gene promoter by multiple Sp1 binding sites. *Blood*, 2003, **101** (11): 4393~4401
- 12 Murumagi A, Vahamurto P, Peterson P. Characterization of regulatory elements and methylation pattern of the autoimmune regulator (AIRE) promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278** (22): 19784~19790

Cloning and Functional Characterization of The Regulation Region of Human BRD7 Gene*

LIU Hua-Ying, LUO Xiao-Min, NIU Zhao-Xia, ZHOU Yan-Hong, ZHOU Ming,

PENG Cong, XIANG Bo, LI Wei-Song, LI Xiao-Ling, LI Gui-Yuan**

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

Abstract BRD7, a novel bromodomain gene, has been cloned by cDNA RDA (cDNA Representational Difference Analysis). The GenBank accession number is AF152604. Previous studies showed that BRD7 gene was down-regulated in nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells and tissues. Over expression of BRD7 in NPC cells can inhibit cell proliferation and cell cycle progression from G1 to S phase, and can partly inhibit the aberrant growth of NPC cells. In order to explore the molecular mechanisms that involved in the down-regulation of BRD7 gene in NPC cells, bioinformatic approaches were adopted and a putative promoter region was found. The luciferase expression vectors containing BRD7 promoter region were further constructed. Transient transfection results suggested that the analyzed sequence contained BRD7 promoter. Transcriptional factor Sp1 is responsive to this region. Inhibition of the Sp1 binding to BRD7 promoter by mithramycin A significantly reduced the promoter activity and the endogenous expression of BRD7 in mRNA level.

Key words BRD7 gene, BRD7 promoter, promoter activity, transcriptional factor Sp1, mithramycin A

*This work was supported by grants from Key Program of The National Natural Science Foundation of China (30330560), The National Natural Science Foundation of China (30300175, 30400238, 30400528) and Natural Science Foundation of Hunan Province (05JJ300063).

**Corresponding author. Tel: 86-731-4805383, E-mail: ligy@xysm.net

Received: December 20, 2005 Accepted: January 27, 2006