

NGAL 基因新型 TPA 反应元件结合蛋白的研究*

孟令英^{1)**} 缪成贵^{2)**} 杜则澎²⁾ 蔡唯佳¹⁾ 许丽艳^{1)***} 李恩民^{2)***}

(¹⁾ 汕头大学医学院肿瘤病理研究室, 汕头 515041; (²⁾ 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, 食管癌细胞的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL)基因的过表达具有明显的 12-*O*-十四烷酰佛波醇-13-醋酸酯(12-*O*-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, TPA)诱导性, 在启动子-152~-60 区段存在着一种新型的 TPA 反应元件(TPA response element, TRE), 但是该元件的结合蛋白尚未被鉴定出来. 采用寡核苷酸 DNA 亲和层析法(oligonucleotide trapping)从食管癌细胞中分离纯化了 NGAL 基因 TRE 结合蛋白; 经 SDS-PAGE 进一步分离, 银染显示目标蛋白带. 人工切取各目标蛋白带进行 MALDI-TOF-MS 分析, 通过 Mascot 软件搜索 NCBI 数据库, 根据蛋白质的功能、细胞定位和分子质量大小等指标确定 8 个核蛋白因子: C19、KIAA1949、TDRD1、RXR β 、FAM54A、KLF15、KLF10 和 YY-1. 最后, 利用 RT-PCR 验证了这些核蛋白因子表达的 TPA 反应性, 结果表明 C19、KIAA1949、TDRD1、RXR β 和 KLF15 等编码基因的转录表现出了明显的 TPA 反应性, 提示可能是食管癌细胞中应答 TPA 刺激, 参与 NGAL 基因过表达的转录激活因子.

关键词 NGAL 基因, 寡核苷酸 DNA 亲和层析, MALDI-TOF-MS, TPA 反应元件, TPA 反应元件结合蛋白, TPA 反应性
学科分类号 Q781, R735.1

中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL), 是 1993 年 Kjeldsen 等在中性粒细胞中首先发现的一种 25 ku 糖蛋白, 是脂质运载蛋白(lipocalin)家族成员之一. 近年来的一些研究发现, NGAL 具有多种功能表现形式, 既可以结合调节基质金属蛋白酶 9^[1], 同时还可以结合转运小分子铁化合物^[2,3]. 另外, 在肿瘤组织细胞中, 如肺癌、结肠癌、肝癌、乳腺癌、胰腺癌和食管癌等, 能够检测到 NGAL 基因的过表达^[4~6], 可能主要参与癌细胞的侵袭移动与不良分化^[7,8]. 然而, 迄今为止, 关于 NGAL 基因在肿瘤组织细胞中的过表达调控机制尚不清楚.

为了揭示 NGAL 基因在食管癌等肿瘤组织细胞中的过表达调控机制, 我们曾从食管癌细胞中克隆了 NGAL 基因的转录调控区, 并在此基础上, 联合运用双荧光素酶报告基因检测系统、嵌套缺失和定点突变等技术手段, 同时结合生物信息学分析确定, 在食管癌细胞中 NGAL 基因的表达具有明显的 12-*O*-十四烷酰佛波醇-13-醋酸酯(12-*O*-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, TPA)诱导性, 在启动子区-152~-60 区段存在着一种新型的 TPA

反应元件(TRE)^[9~11], 但是该元件的结合蛋白尚未被鉴定出来. 为此本文综合运用寡核苷酸 DNA 亲和层析和 MALDI-TOF-MS 等实验技术手段, 对上述 NGAL 基因的 TRE 结合蛋白进行了分离纯化鉴定, 同时还研究了 TRE 结合蛋白表达的 TPA 反应性. 这些研究对揭示 NGAL 基因在食管癌等肿瘤组织细胞中的过表达调控机制有重要意义.

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研究所林晨研究员惠赠. 细胞在含 10% 小牛血清的 199 培养基(Invitrogen 公司)中贴壁生长,

* 国家高技术研究发展计划(863)(2006AA02A403), 国家自然科学基金资助项目(30370641, 30570829, 30672376), 广东省自然科学基金重点项目(37788, 5104541, 7118419)和教育部高等学校博士点重点学科专项基金项目(20050560002, 20050560003).

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

许丽艳. Tel: 0754-8900847, E-mail: liyanxu1130@yahoo.com.cn

李恩民. Tel: 0754-8900847, E-mail: nmli@stu.edu.cn

收稿日期: 2007-10-25, 接受日期: 2007-12-04

5% CO₂, 37℃. 用含 0.25%胰蛋白酶和 0.02% EDTA 的消化液消化, 进行细胞传代.

1.2 核蛋白提取

EC109 细胞培养至约 75%满度时, 加入 TPA (Sigma-Aldrich 公司)至终浓度 5 μg/L 继续培养 6 h, 然后按照分子克隆提取核蛋白的方法, 收获细胞, 提取核蛋白. Bradford 法测定蛋白质含量.

1.3 电泳迁移率变动分析

应用 Roche 公司的 Dig Gel Shift Kit 进行电泳迁移率变动分析(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)实验. 寡核苷酸序列为 TRE-1, 5' ⁻¹⁰⁷TTC-CGCAGGAGTTGCTGGCAATTGCC ⁻⁸²3', TRE-2, 5' ⁻⁸²GGCAATTGCCAGCAACTCCTGCGGAA ⁻¹⁰⁷3'. 按照 Dig Gel Shift Kit 说明书, 将合成的单链寡核苷酸退火, 地高辛标记制备探针. 在 20 μl 反应体系下, 核蛋白与探针在含 20 mmol/L Hepes(pH 7.6), 1 mmol/L EDTA (pH 8.0), 1 mmol/L DTT, 10 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 0.2% Tween-20, 30 mmol/L KCl, 1 μl Poly-d[I-C](1g/L), 1 μl poly L-lysine (0.1g/L) 溶液中室温孵育 30 min. 在 0.5×TBE 的电泳缓冲液, 6%非变性聚丙烯酰胺凝胶中, 4℃, 80 V 电泳 100 min, 然后在 4℃ 400 mA 条件下转印至尼龙膜上, 120℃ 干燥 30 min. 最后用碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体孵育 30min, CSPD 化学发光试剂发光, FluorChemTMIS-8900 成像系统拍照. 同时, 为检测滞留带的特异性, 加入未标记寡核苷酸序列作为特异性竞争剂, 加入量是探针的 125 倍.

1.4 DNA 亲和层析柱的制备

称取 1.30 g 的 Sepharose 4 Fast Flow(GE 公司)于 15 ml 离心管中, 加预冷的 1 mmol/L HCl 溶液 10 ml, 旋转过夜, 使 Sepharose 充分溶胀, 静置后确定 Sepharose 最终体积. 然后按照 CNBr sepharose 4 Fast Flow 操作手册将单链 ACACACAC 寡核苷酸序列偶联到溶胀好的 Sepharose 珠上, 称之为 Sepharose-(AC)₅ 柱, 最终保存于 20% 乙醇中. 分光光度计法确定 (AC)₅ 的偶联效率.

1.5 寡核苷酸亲和层析法纯化靶蛋白

本方法主要采用两个 Sepharose-(AC)₅ 柱纯化得到靶蛋白. 第一个层析柱的目的是除去与 Sepharose-(AC)₅ 柱非特异性结合的蛋白质, 第二个层析柱是为了得到与 TRE(TG)₅ 特异结合的蛋白质. 纯化过程中所用的寡核苷酸序列为: TRE-3, 5' ⁻¹⁰⁷TTCCGCAGGAGTTGCTGGCAATTG ⁻⁸²GTGTGTGTGT 3', TRE-4, 5' ⁻⁸²GGCAATTGCCAGCA-

ACTCCTGCGGAA ⁻¹⁰⁷GTGTGTGTGT 3', 使用前用一定量的超纯水溶解至一定浓度, 二者等体积混合后, 95℃变性 5 min, 缓慢冷却至室温完成退火, 冰上保存备用, 此双链 DNA 即为 TRE(TG)₅. 具体纯化过程如下: 20 mg 核蛋白用结合缓冲液 (20 mmol/L Hepes pH 7.6, 1 mmol/L EDTA pH 8.0, 1 mmol/L DTT, 10 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 0.2% Tween-20, 30 mmol/L KCl)稀释至 25 ml, 过一支柱床体积为 2.5 ml 的 Sepharose-(AC)₅ 柱, 回收流出液和洗液, 二者合并称之为 F1 液. 在 F1 中依次加入 100 mmol/L PMSF 20 μl, 1 μl Poly-d[I-C] (1 g/L), 1 μl poly L-lysine (0.1 g/L), 120.0 fmol TRE(TG)₅, 轻轻混匀后, 室温孵育 20 min, 使 TRE(TG)₅ 序列与核蛋白中的特异核因子形成 DNA-蛋白质复合物. 然后将此液体过一支新的柱床体积为 1 ml 的 Sepharose-(AC)₅ 柱, 接收流出液 F2, 并用 0.1 mol/L Hepes-KOH 洗层析柱至基线, 留取洗液(W), 最后分别用含 0.2 mol/L、0.4 mol/L、0.6 mol/L、0.8 mol/L 和 1.0 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L Hepes-KOH 各 25 ml 洗脱, 并收集各洗脱组分. 整个纯化过程用 U280 紫外分光光度计监控, 流速 0.5 ml/min, 在 4℃下完成.

将不同盐离子浓度的洗脱组分分别用 Amicon Ultra-15 浓缩柱, 5 000 g, 4℃离心, 浓缩至终体积约 250 μl, 再将这些浓缩液分别转移至 Amicon Ultra-4 中, 加入 0.3 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L Hepes-KOH 3 ml, 7 500 g, 4℃离心, 浓缩并调整盐浓度至 0.3 mol/L. 然后用 EMSA 检测所得不同盐浓度洗脱组分是否含有与寡核苷酸探针相互作用的蛋白质.

1.6 SDS-PAGE 分离及银染分析

用 12% SDS-PAGE 分离 EMSA 检测到阳性蛋白的洗脱组分, 然后按照 Silver staining kit(GE 公司)进行银染, 判定目标核蛋白的带谱情况, 根据其含量及位置关系确定可疑条带.

1.7 MALDI-TOF-MS 鉴定及分析

切取目标蛋白条带, 在上海基康生物技术有限公司进行 MALDI-TOF-MS 分析. 用 Mascot 软件查询 NCBI 数据库, 并结合生物信息学分析确定 TPA 反应元件结合蛋白候选者.

1.8 RT-PCR 检测候选蛋白编码基因表达的 TPA 反应性

从 NCBI 数据库获得候选蛋白编码的 mRNA 序列. 针对编码区序列应用 Primer Premier 5.0 软

件设计引物(序列见表 1), 上海基康生物技术有限公司合成.

Table 1 Primers used in RT-PCR		
Name	Sequence (5'→3')	Length of product/bp
C19-F	GGTGTCTGTCGGTGGGAGTA	564
C19-R	CCATCCCGAGGCTCAGTCAT	
KLF10-F	GCGCTGTCATGTTTGTGGTA	518
KLF10-R	TCTTCACTTTCCGGTCTGTC	
KLF15-F	CCCAGCTCCTGGTCAACATCC	520
KLF15-R	GGTTCAGGGCGCTTTCAGTT	
YY1-F	GGAATACCTGGCATTGACCT	465
YY1-R	CTCTTCTTTTCACTGGTTGTTTT	
KIAA1949-F	CAGCAGGAAGAGGAAGCAGT	618
KIAA1949-R	CCCTATGTTGGAAGATGGTCA	
RXRβ-F	GCAGGAGTAGGAGCCATCTTTG	398
RXRβ-R	GAGAAGCACACGCTCTGGGT	
TDRD1-F	CCAATCACCTCTAGCCACCT	474
TDRD1-R	TAGCCTTTGCTGTTTCTGT	
FAM54A-F	GTTCTTTGGCTTGAGTGAC	663
FAM54A-R	GCTCAACCTTAAGTTGAGTTTA	
GAPDH-F	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	226
GAPDH-R	GAAGATGGTGATGGGATTTC	

常规培养 EC109 细胞至约 75%满度时, 加入 TPA 至终浓度 5 μg/L, 分别收集 TPA 刺激 6 h、12 h、24 h、48 h 和无 TPA 刺激的 EC109 细胞, 按照 TRIZOL 试剂盒(Invitrogen 公司)说明书, 提取总 RNA. 取 1 μg RNA 利用 Promega 公司的反转录试剂盒合成 cDNA. 以 2 μl cDNA 为模板进行 PCR 反应: 95℃ 4 min; 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环; 72℃ 10 min; 以管家基因 GAPDH 为对照, 进行琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, FluorChemTMIS-8900 成像系统拍照.

2 结 果

2.1 EC109 中存在 *NGAL* 基因-107~-82 区段结合核蛋白

采用 EMSA 实验研究确定, 在 EC109 细胞中是否存在着 *NGAL* 基因-107~-82 区段 DNA 寡核苷酸序列结合核蛋白及其 TPA 反应性. 从图 1 可见, a. EC109 细胞核提取物能够与 *NGAL* 基因启动子-107~-82 区段寡核苷酸 DNA 序列探针形成明显的 DNA- 核蛋白复合物带(lane 3); b. 预先加入适量的 TPA 诱导 EC109 细胞, 可以使上述 DNA- 核蛋白复合物带明显增强(lane 4); c. 在 EC109 细胞核提取物和 *NGAL* 基因-107~-82 区段寡核苷酸序列探针的混合物中, 同时加入未标记的

NGAL 基因-107~-82 区段寡核苷酸 DNA 序列作为竞争性抑制剂, 上述 DNA- 核蛋白复合物带消失(lane 2). 结果表明, 在食管癌细胞中不但的确存在着某种核蛋白, 能够特异性地结合 *NGAL* 基因启动子-107~-82 区段寡核苷酸 DNA 序列, 而且这种结合反应还具有明显的 TPA 诱导性.

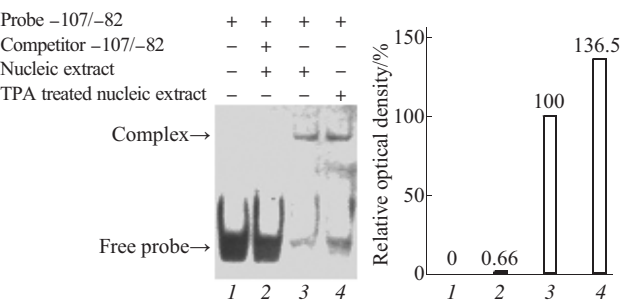


Fig. 1 The interaction between the nucleic proteins from EC109 cells and the -107~-82 segment of *NGAL* promoter region by EMSA

1: Blank control. 2: Nucleic extracts from EC109 cells were incubated with the Dig-labeled probe of *NGAL* promoter (-107~-82), Unlabeled DNA sequence (-107~-82) as a competitor was added to determine the specificity of proteins bound to the probe. 3: The nucleic proteins from EC109 cells were bound to the Dig-labeled probe of the -107~-82 segment. 4: The Nucleic proteins from EC109 cells stimulated by 5 μg/L TPA were bound to the Dig-labeled probe.

2.2 获得 *NGAL* 基因-107~-82 区段结合核蛋白

为了通过 DNA 亲和层析法获得较高纯度的 *NGAL* 基因-107~-82 区段结合核蛋白, 提高筛选的特异性, 降低非特异蛋白的干扰, 首先让 TPA 诱导后的 EC109 细胞核蛋白溶液直接过 Sepharose-(AC)₅ 柱, 收获流出液. 从紫外监控谱图可见, 流出液中存在着大量的蛋白质(图 2a), 这其中含有 *NGAL* 基因-107~-82 区段寡核苷酸 DNA 序列特异性结合核蛋白.

为了获得 *NGAL* 基因-107~-82 区段寡核苷酸 DNA 序列特异性结合核蛋白, 首先将上述流出液与靶双链 DNA 序列 TRE(TG)₅ 预先混合, 并孵育一定时间, 形成 TRE(TG)₅/ 核蛋白复合物, 然后再过一新的 Sepharose-(AC)₅ 柱. 由于 Sepharose-(AC)₅ 柱上的 (AC)₅ 单链可以与 TRE(TG)₅ 上的 (TG)₅ 单链互补结合, 借此可以使 TRE(TG)₅/ 核蛋白复合物结合到 Sepharose-(AC)₅ 柱上. 最后用 0.2~1.0 mol/L 梯度盐离子洗脱液(E0.2M~E1.0M)进行洗脱处理. 由于 TRE(TG)₅- 蛋白质复合物之间的作用力被破坏, 因此 *NGAL* 基因-107~-82 区段的特异性结合核蛋白随洗脱液流出. 从紫外监控谱图可见, 在

E0.2 M 和 E0.4 M 两种洗脱液中, 有明显的蛋白质洗脱峰(图 2b), 提示这两种洗脱液中含有与 TRE (TG)₅ 相互作用的目标核蛋白, 即可能含有 *NGAL* 基因-107~-82 区段寡核苷酸 DNA 序列结合核蛋白。

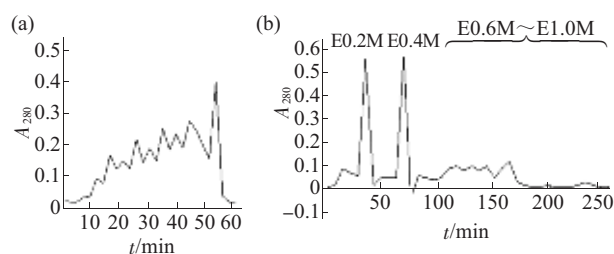


Fig. 2 The scanning graph of the absorbance in 280 nm

(a) The scanning graph of the nucleic proteins through the first Sepharose-(AC)₅ column. (b) The scanning graph of eluting the second Sepharose-(AC)₅ column with 0.1 mol/L Hepes-KOH containing from 0.2 mol/L to 1.0 mol/L NaCl. E0.2M and E0.4M represent eluting peak.

2.3 EMSA 分析验证

为了进一步确认各洗脱液中确实含有 *NGAL* 基因-107~-82 区段寡核苷酸 DNA 序列结合核蛋白, 将 E0.2M~E1.0M 各洗脱组分进行 EMSA 分析。从图 3 可见, 在 E0.2 M 和 E0.4 M 所对应的 2、3、4 和 5 泳道均出现了明显的 DNA- 蛋白质滞留带, 而其他浓度洗脱液所对应的泳道未出现此种情况。这说明, 目标核蛋白, 即 *NGAL* 基因-107~-82 区段寡核苷酸 DNA 序列结合核蛋白的确存在于 E0.2 M 和 E0.4 M 洗脱液中。

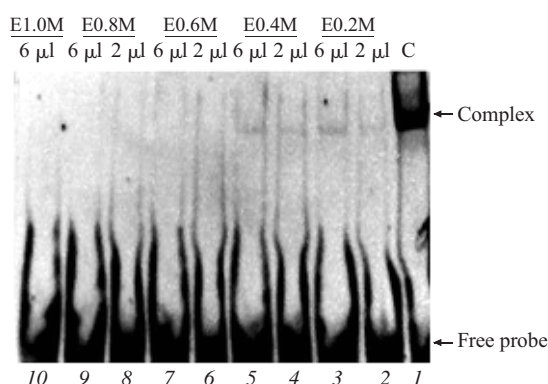


Fig. 3 Analysis of the nucleic proteins bound to the -107~-82 segment of *NGAL* promoter region by EMSA

The various eluants from the second sepharose- (AC)₅ column were incubated with the Dig-labeled probe (-107~-82), respectively. In lane 2, 4, 6 and 8 showed 2 μ l eluants was incubated with the Dig-labeled probe, while in lane 3, 5, 7, 9 and 10, 6 μ l eluant was used. Lane 1, Nucleic extracts from EC109 cells stimulated by 5 μ g/L TPA was added as a control.

2.4 SDS-PAGE 确定肽指纹谱分析目标蛋白带

以 DNA 亲和层析初始流出液等为对照, 对 E0.2M 和 E0.4M 等洗脱液中的蛋白质组分进行 12%SDS-PAGE 电泳分离, 银染显示蛋白质带谱情况。从图 4 可见, 在 E0.2M 和 E0.4M 洗脱液组分中分别含有 13 条和 6 条较明显的蛋白质带。而 E0.2 M/E0.4 M 混合洗脱液中蛋白质组分的 SDS-PAGE 电泳蛋白质带谱情况与 E0.2 M 和 E0.4 M 的相类似。根据蛋白质带的灰度值以及位置情况, 确定进行肽指纹谱分析的目标蛋白带, 即在图 4 中标记为 “+” 的共 11 条蛋白质带, E0.2M 的 5 条, E0.4M 的 6 条。

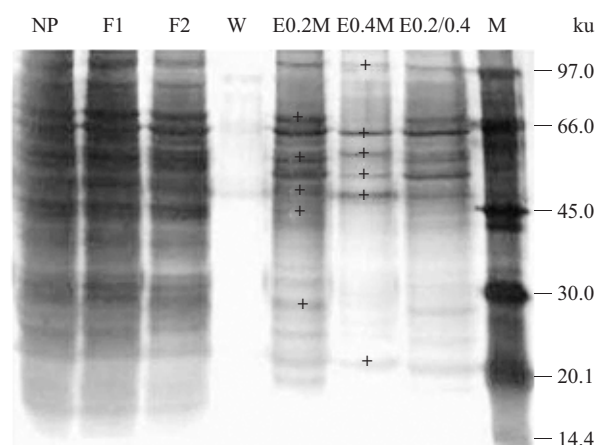


Fig. 4 SDS-PAGE analysis of protein fractions purified by Sepharose-(AC)₅ column

Protein fractions were loaded to an SDS polyacrylamide gel and stained with silver. NP: Nucleic proteins; F1: Effluent from the first sepharose-(AC)₅ column; F2: Effluent from the second sepharose-(AC)₅ column; W: Washings from the second column; E0.2M, E0.4M represent different fractions eluted with 0.1 mol/L Hepes-KOH containing 0.2 mol/L and 0.4 mol/L NaCl. The marker “+” represents protein bands selected to perform MALDI-TOF-MS analysis.

2.5 肽指纹谱分析确定核蛋白因子

切取上述目标蛋白带进行肽质纹谱分析, 结果表明, 共有 8 条蛋白质带获得了质量较好的肽指纹谱, 部分谱图见图 5。通过 Mascot 软件查询 NCBI 数据库, 另外综合考虑蛋白质的功能、分子质量大小、细胞定位以及是否可以与 DNA 相互作用等诸多因素, 最后筛选出 8 个核蛋白因子, 即 C19、KIAA1949、TDRD1、RXR β 、FAM54A、KLF15、KLF10 和 YY-1, 详见表 2 和表 3。而 C19、KLF10 的肽指纹谱图分别为图 5 中的(a)和(b)。

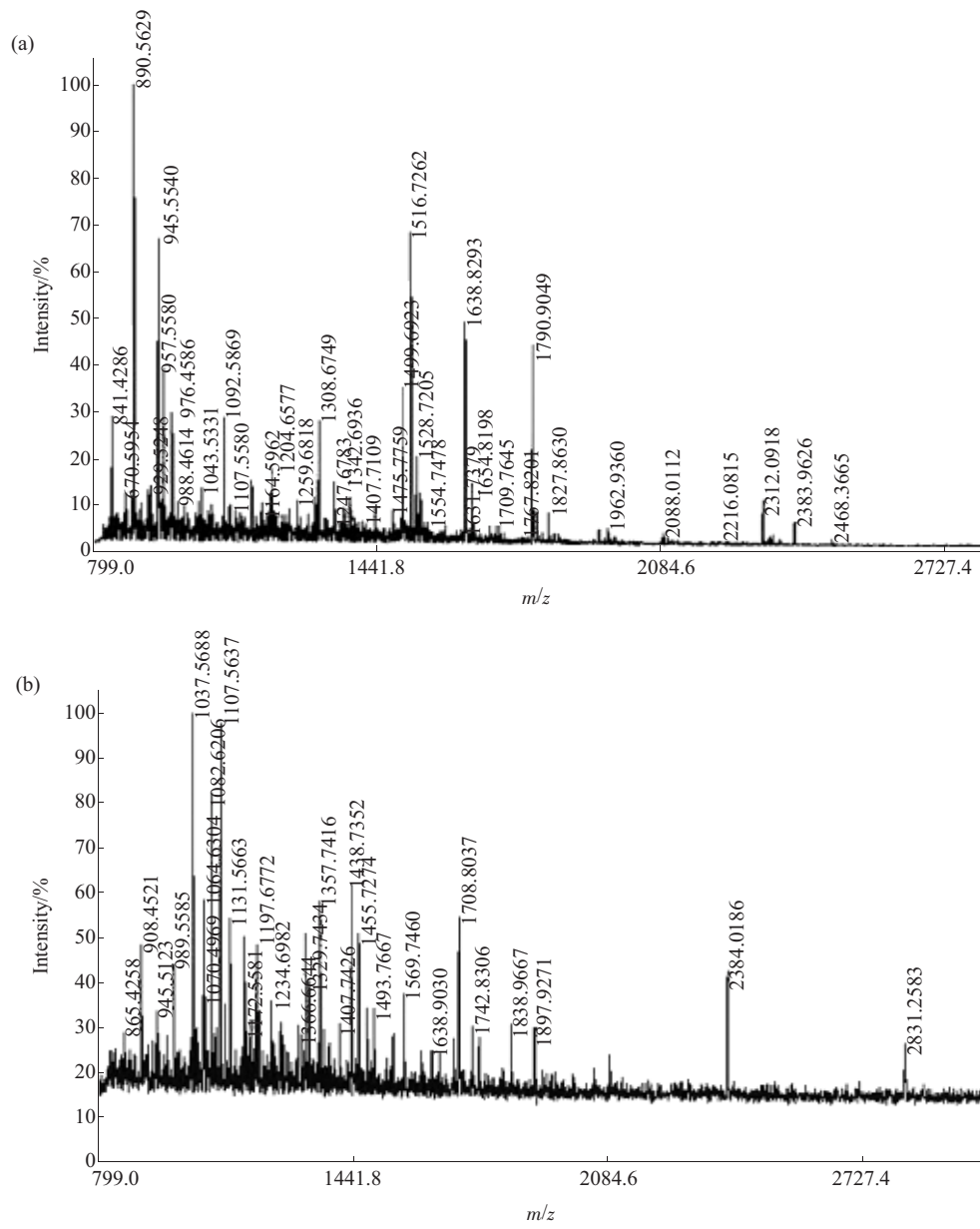


Fig. 5 Analysis of proteins bound to TRE (TG)₅ by MALDI-TOF-MS
(a) C19; (b) KLF10.

Table 2 The selected proteins interacted with TPA response element of *NGAL*

Name	Abbreviation	Protein ID	Amino acid	Protein mass /ku	Peptides matched
Uncharacterized protein C19 or f 21	C19	gi 73620663	679	75.311	17
Protein KIAA1949	KIAA1949	gi 68052323	613	67.902	17
Tudor domain-containing protein 1	TDRD1	gi 17368689	1 189	86.707	14
Retinoid X receptor beta	RXRβ	gi 1350911	533	56.886	13
Protein FAM54A	FAM54A	gi 56404526	385	43.357	11
(DUF729 domain-containing protein 1)					
Krueppel-like factor 10	KLF10	gi 11387050	480	52.521	3
Krueppel-like factor 15	KLF15	gi 20138787	416	43.964	3
YY1 (Yin and yang 1)	YY1	gi 3915889	414	44.685	3
Transcriptional repressor protein					

Table 3 The structure and function of the selected proteins interacted with TPA response element of *NGAL*

Gene	Ch.	Localization	Domain and function
C19	19p13.3	Cytoplasm, nucleus ¹⁾	C19 protein contains a HMG-1/Y domain, which bind preferentially to the minor groove of AT-rich regions in double-stranded DNA. It is suggested that this protein could regulate gene expression. ²⁾
KIAA1949	6p21.3	Cytoplasm, nucleus ¹⁾	The KIAA1949 protein contains a TON-B BOX domain and Proline-rich region at C-terminal end, the N-terminus consists of a FMT domain-like region, the C-terminus may have protein-binding ability. ²⁾
TDRD1	10q25.3	Cytoplasm, nucleus ¹⁾	TDRD1 belongs to RNA-binding protein super-family, contains 4 Tudor domains and a zinc finger MYOD domain, the function of these domains are unknown. ²⁾
FAM54A	6q23.3	Cytoplasm, nucleus ¹⁾	FAM54A contains SCAN domain, Spectrin repeat region and unknown function DUF729 domain. A number of C ₂ H ₂ -zinc finger proteins contain the highly conserved SCAN domain, This domain may play an important role in the assembly and function of this newly defined subclass of transcriptional regulators. ²⁾
RXRβ	6p21.3	Nucleus	RXRβ is a member of nuclear receptor, have a variable N-terminal domain (A/B domain), a highly conserved DBD (DNA binding domain), a nonconserved hinge and a moderately conserved C-terminus including the LBD(ligand binding domain). The DBD consists of two Cysteine-rich zinc-finger motifs through which nuclear receptors bind to specific DNA sequences (AGGTCA/GGTTCA). RXRβ forms homodimers or heterodimers with the retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors, increasing both DNA binding and transcriptional function on their respective response elements.
KLF10	8q22.2	Cytoplasm, nucleus	KLF10 belongs to the Krüppel-like family, and is a new member of Sp1-like protein family. The protein contains a 3 zinc finger, Sp1-like DNA binding domain and several proline-rich Src homology-3 (SH3) binding domains at the C-terminal end, which bind to GC rich Sp1-like sequences to regulate gene transcription. KLF10 play an important role in cell proliferation and apoptosis.
KLF15	3q21.3	Nucleus	KLF15 is one of the members of the Krüppel-like family and homologous to KLF10, the protein, as a key regulator of gene expression, can bind to GA element of target genes. It plays a critical role in cell growth and differentiation.
YY1	14q32	Cytoplasm, nucleus	YY1 belongs to GLI-Krüppel-like transcription factors family, the protein contains acid N-terminal region and 4 C ₂ H ₂ zinc finger at the C-terminal end. YY1 could not only regulate the expression of other genes, such as: c-fos, c-myc, surf1, surf2, et al, but as a co-activator could interact with some transcription factors (CREB, Jun, Myb, Fos, MyoD, Sp1). YY1 play fundamental role in embryogenesis, differentiation, replication, and cellular proliferation <i>via</i> direct and indirect activation or repression.

¹⁾ [http:// wolfsort.org](http://wolfsort.org). ²⁾ Predictprotein and Inter Proscan.

2.6 RT-PCR 检验候选蛋白编码基因表达的TPA反应性

为了检验上述 8 个核蛋白因子编码基因在食管癌细胞 EC109 中的表达情况及其 TPA 反应性, 应用相对定量 RT-PCR 法测定了 TPA 刺激不同时间, 各核蛋白因子编码基因在转录水平上的变化. 从图 6 可见: a. 8 个核蛋白因子编码基因在食管癌细胞

EC109 中均有表达, 但程度有所不同; b. 通过比较电泳带的灰度值发现, C19、KIAA1949、TDRD1、RXR beta 和 KLF15 等 5 个编码基因的转录表现出一定的 TPA 反应性, 随着 TPA 诱导时间的延长, 有不同程度表达增强的趋势; c. FAM54A、KLF10 和 YY1 等 3 个基因的转录未明显的 TPA 反应性.

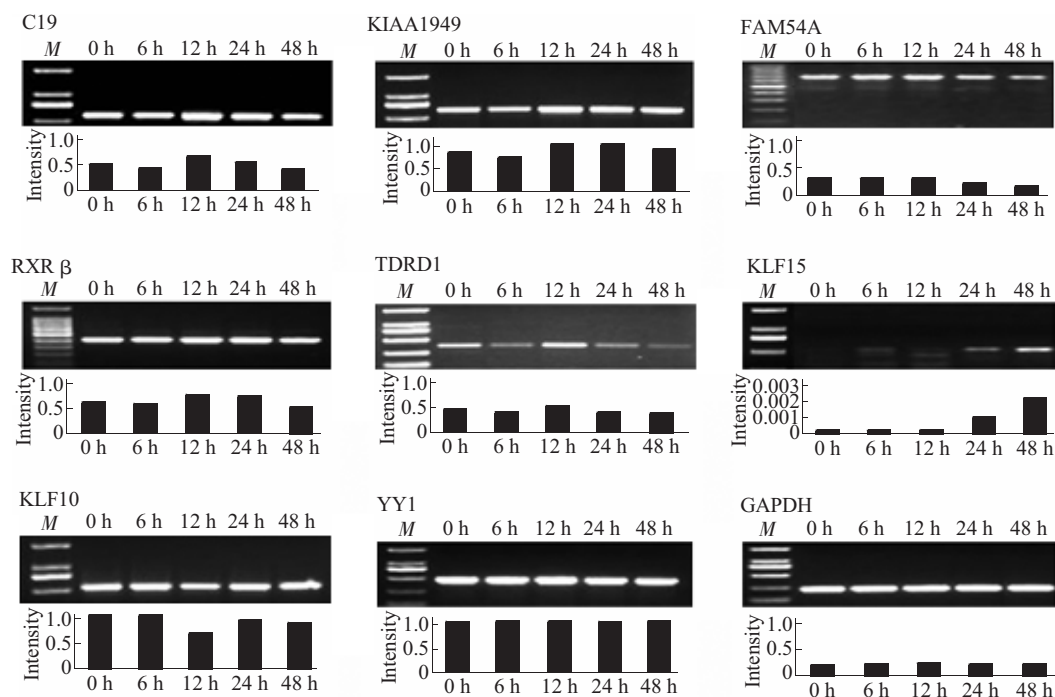


Fig. 6 The TPA-induced expressions of the selected genes were detected by

RT-PCR in EC109 cells following TPA stimulation

There are two parts in every picture, the top panel is the agarose gel electrophoresis of PCR product and the bottom panel is the analysis of gray scale.

3 讨 论

我们以往的研究结果提示, *NGAL* 可能是人类的一个重要的新癌基因, 在食管癌等肿瘤细胞中过表达^[9], 具有促进癌细胞侵袭的功能^[7], 同时还可能在癌细胞的不良分化中发挥重要作用^[8], 但表达调控机制一直不甚明了。

关于 *NGAL* 基因的表达调控机制, Cowland 等^[12]曾研究发现, 在细胞培养液中加入细胞因子 IL-1 β 可诱导 II 型肺泡上皮细胞 *NGAL* 基因的表达上调 10 倍以上。而 Gombart 等^[13]则研究发现, C/EBP ϵ 因子(增强子元件 CCAAT 特异性结合蛋白因子)缺陷鼠中性粒细胞 *NGAL* 基因的转录明显减弱。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* 基因的表达相关。然而, 我们的研究结果表明, 在食管癌细胞中, 在 *NGAL* 基因启动子区存在着一个新型的 TPA 反应元件, *NGAL* 基因的表达与 IL-1 β 和 C/EBP ϵ 等因子的作用没有关系, 控制着食管癌细胞中 *NGAL* 基因转录表达的可能是某种 TPA 反应元件结合蛋白^[11]。

有关 TPA 反应元件结合蛋白, 迄今被研究报道的有 AP-1 复合因子^[14, 15]、GATA 样蛋白^[16]和 Sp1 样蛋白^[17, 18]等 3 种不同类型。而本文从食管癌细胞中所鉴定出来的 8 种 *NGAL* 基因新型 TPA 反应元件结合蛋白中, 只有 KLF10 曾被发现具有结合传统 TPA 反应元件的能力, 是 Sp1 样蛋白家族的一个新的成员^[19], 相关功能详见表 3, 表明在食管癌细胞中存在着 TPA 反应元件结合蛋白诸多的新的结构类型。这可能主要由 *NGAL* 基因新型 TPA 反应元件的结构特点所致。虽然就此尚不能最终断定究竟是这其中的哪一种或哪几种核蛋白因子在食管癌等肿瘤病理过程中实际发挥作用, 但 EMSA 和 TPA 反应性验证实验结果提示, 这些核蛋白不但具有结合 *NGAL* 基因新型 TPA 反应元件的能力, 而且部分核蛋白的转录表达本身还表现出了明显的 TPA 反应性, 据此推测, 这可能正是食管癌等肿瘤细胞中 *NGAL* 基因应答 TPA 刺激过表达调控机制的本质原因之一。

另外, 应该着重指出, 也是十分有趣的是, 依 TPA 反应元件结合蛋白编码基因转录表达本身是否有 TPA 反应性, 本文从食管癌细胞中鉴定出来

的 8 种 *NGAL* 基因新型 TPA 反应元件结合蛋白可被分成两类. 一类有较明显的 TPA 反应性, 而另一类则恰恰相反, TPA 反应性不明显. 这暗示着, 食管癌等肿瘤细胞应答 TPA 刺激, 调控 *NGAL* 基因表达的机制是复杂的. 8 种核蛋白虽然均有能力结合 *NGAL* 基因的新型 TPA 反应元件, 但因为本身 TPA 反应性的差别, 推测在参与调控 *NGAL* 基因转录上可能分别承接着上游不同细胞信号转导通路的作用. 有研究报道, 过氧化物酶体增生生物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) 可以和视黄醇类 X 受体 α (retinoid X receptor alpha) 形成异源复合物, 结合特异性 DNA 元件序列, 调控相应基因的转录表达. 近年有研究发现, 上述过程与 PKC 细胞信号通路衔接, 而且可以被 TPA 激活^[20]. 把上述情况与本文鉴定出来的 *NGAL* 基因新型 TPA 反应元件结合蛋白 RXR β (retinoid X receptor beta) 联系在一起考虑, 我们推测, RXR β 很可能就是食管癌细胞中应答 TPA 刺激的调控 *NGAL* 基因过表达的转录激活因子. 而实际上, 本文鉴定出来的同样表现出明显 TPA 反应性的其他 *NGAL* 基因新型 TPA 反应元件结合蛋白, 如 C19 和 KIAA1949 等, 尽管它们的功能迄今尚未被阐明, 但与 RXR β 一样也可能被 TPA/PKC 或其他 TPA 相关细胞信号通路激活, 并借此调控食管癌等肿瘤细胞中 *NGAL* 基因的转录表达. 与上述情况不同, YY1 和 KLF10 等所承接的则可能是由另外的途径, 比如 cAMP/PKA 或细胞凋亡途径转导来的信号^[21, 22]. 然而, 评判 YY1 和 KLF10 等因子是否参与食管癌等肿瘤细胞中 *NGAL* 基因的转录表达调控, 无论如何都有必要研究清楚它们的肽链修饰情况. 这是因为许多核蛋白因子是以某种特殊的蛋白质修饰形式, 主要是磷酸化形式体现活性, 参与靶基因转录表达调控的. 而这些核蛋白因子修饰形式的产生有些情况是可以被 TPA 作用激活的^[23~25]. 最后需要补充说明的是, 最近我们成功构建了 KLF15、KIAA1949 和 RXR β 等核蛋白因子编码基因的表达载体, 而且实现了在食管癌细胞中的高表达, 检测结果表明, 体现 *NGAL* 基因启动子区新型 TPA 反应元件功能的报告基因的活性明显升高(另文发表). 这提示, 本文所鉴定出来的核蛋白因子不但可以结合 *NGAL* 基因新型 TPA 反应元件, 具有 TPA 反应性, 而且可能在食管癌细胞 *NGAL* 基因的过表达中实际发挥作用.

综上所述, 本文从食管癌细胞中鉴定出多种

NGAL 基因新型 TPA 反应元件结合蛋白是十分有意义的. 这既有助于深入到分子水平揭示为什么食管上皮细胞癌变中 *NGAL* 基因过表达, 同时也有助于进一步认识 TPA 细胞信号传递途径网络在肿瘤发生发展中的作用机制.

参 考 文 献

- 1 Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, *et al.* The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (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
- 2 Yang J, Goetz D, Li J Y, *et al.* An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell*, 2002, **10**(5): 1045~1056
- 3 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
- 4 Friedl A, Stoesz S P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in normal and neoplastic human tissues. Cell type-specific pattern of expression. *Histochem J*, 1999, **31**(7): 433~441
- 5 许丽艳, 李恩民, 熊华洪, 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 E M, Xiong H Q, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28** (6): 839~843
- 6 Zhang H, Xu L, Xiao D, *et al.* Upregulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in esophageal squamous cell carcinoma: significantly correlated with cell differentiation and tumor invasion. *J Clin Pathol*, 2007, **60**(5): 555~561
- 7 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 Biochim Biophys Sin*, 2003, **35**(3): 247~254
- 8 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 Y L, Xu L Y, Li E M, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2004, **31**(5): 409~415
- 9 李恩民, 许丽艳, 沈忠英, 等. 食管癌细胞 SHEEC 中 *NGAL* 基因 5'端转录调控区的克隆及其顺式作用元件定位分析. 肿瘤防治杂志, 2003, **10**(3): 235~239
Li E M, Xu L Y, Shen Z Y, *et al.* *Chin J Cancer Prev Treat*, 2003, **10** (3): 235~239
- 10 许丽艳, 李恩民, 沈忠英, 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, Shen Z Y, *et al.* *Chin J Cancer Prev Treat*, 2004, **11** (5): 449~453
- 11 许丽艳, 李恩民, 牛永东, 等. 食管癌细胞 *NGAL* 基因-152~-60 区段存在 TPA 反应元件. 生物化学与生物物理进展, 2006, **33**(2): 140~148

- Xu L Y, Li E M, Niu Y D, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2006, **33** (2): 140~148
- 12 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
- 13 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 and PU.1. Blood, 2003, **101**(8): 3265~3273
- 14 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
- 15 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
- 16 Schnekenburger M, Morceau F, Duvoix A, *et al.* Expression of glutathione S-transferase P1-1 in differentiating K562: role of GATA-1. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, **311**(4): 815~821
- 17 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
- 18 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
- 19 Schuh R, Aicher W, Gaul U, *et al.* A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by Krüppel, a Drosophila segmentation gene. Cell, 1986, **47**:1025~1032
- 20 Tsao W C, Wu H M, Chi K H, *et al.* Proteasome inhibitors induce peroxisome proliferators activated receptor transactivation through RXR accumulation and a protein kinase C-dependent pathway. Exp Cell Res, 2005, **304**(1): 234~243
- 21 Goldman P S, Tran V K, Goodman R H. The multifunctional role of the co-activator CBP in transcriptional regulation. Recent Prog Horm Res, 1997, **52**:103~120
- 22 Jin W, Di G, Li J, *et al.* TIEG1 induces apoptosis through mitochondrial apoptotic pathway and promotes apoptosis induced by homoharringtonine and velcade. FEBS Lett, 2007, **581** (20): 3826~3832
- 23 Cozzi S J, Parsons P G, Ogbourne S M, *et al.* Induction of senescence in diterpene ester-treated melanoma cells *via* protein kinase C-dependent hyperactivation of the mitogen-activated protein kinase pathway. Cancer Res, 2006, **66**(20): 10083~10091
- 24 Su M, Bansal A K, Mantovani R, *et al.* Recruitment of nuclear factor Y to the inverted CCAAT element (ICE) by c-Jun and E1A stimulates basal transcription of the bone sialoprotein gene in osteosarcoma cells. J Biol Chem, 2005, **280**(46): 38365~38375
- 25 Davies M, Robinson M, Smith E, *et al.* Induction of an epithelial to mesenchymal transition in human immortal and malignant keratinocytes by TGF- β 1 involves MAPK, Smad and AP-1 signalling pathways. J Cell Biochem, 2005, **95**(5): 918~931

Study of New TPA Response Element Binding Proteins of *NGAL* Gene*

MENG Ling-Ying^{1)**}, MIAO Cheng-Gui^{2)**}, DU Ze-Peng²⁾, CAI Wei-Jia¹⁾, XU Li-Yan^{1)***}, LI En-Min^{2)***}

¹⁾ Department of Oncologic Pathology, Medical College of Shantou University, Shantou 515041, China;

²⁾ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical College of Shantou University, Shantou 515041, China)

Abstract The previous studies have showed that neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) was overexpressed in the progress of human esophageal epithelial cells and novel 12-*O*-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) response elements (TRE) might be located on the -152~-60 position of the 5' flanking region of the promoter. However, the nucleic proteins bound to the elements have not been identified. In present study, the TRE binding-proteins from EC109 cells following TPA induction were purified by oligonucleotide trapping DNA affinity chromatograph, further separated by SDS-PAGE and stained with silver staining. And then the protein bands were subsequently identified by MALDI-TOF-MS and the resulting spectra were searched to NCBI protein data bank through Mascot. C19, KIAA1949, TDRD1, RXR β , FAM54A, KLF15, KLF10 and YY-1 eight proteins were identified according to their function, localization and molecular mass. Finally, RT-PCR was performed to determine the TPA responsiveness of these nucleic proteins. Results showed that C19, KIAA1949, TDRD1, RXR β and KLF15 proteins have the obvious TPA responsiveness in the transcription level. The results suggest these proteins might respond the stimulation of TPA and regulate the expression of *NGAL* in EC109 cells.

Key words *NGAL* gene, oligonucleotide trapping DNA affinity chromatograph, MALDI-TOF-MS, TPA response element, TPA response element binding proteins, TPA responsiveness

*This work was supported by grants from The Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA02A403), The National Natural Science Foundation of China (30370641, 30570849, 30672376), Guangdong Scientific Fund Key Items (37788, 5104541, 7118419) and Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (20050560002, 20050560003).

**MENG Ling-Ying and MIAO Cheng-Gui contributed equally to this work.

***Corresponding author.

XU Li-Yan. Tel: 86-754-8900847, E-mail: liyanxu1130@yahoo.com.cn

LI En-Min. Tel: 86-754-8900847, E-mail: nmli@stu.edu.cn

Received: October 25, 2007 Accepted: December 4, 2007