



BRD7 调控 Rb/E2F 通路的分子机制研究*

李淑芳^{1,2)} 周 鸣¹⁾ 刘华英¹⁾ 徐晓杰¹⁾ 彭 聪¹⁾

彭淑平¹⁾ 武明花¹⁾ 李小玲¹⁾ 李桂源^{1)**}

(¹⁾中南大学肿瘤研究所, 长沙 410078; ²⁾湖南省人民医院临床医学研究所, 长沙 410005)

摘要 BRD7 是采用 cDNA 代表性差异分析法克隆的一个新的 Bromodomain 基因, 过表达 BRD7 可抑制鼻咽癌细胞的生长和细胞周期进程, 同时发现 BRD7 基因可以调控 Rb/E2F 通路的活性. 该研究旨在进一步探讨 BRD7 调控 Rb/E2F 通路的分子机制. 通过蛋白质印迹和 RT-PCR 实验方法发现, BRD7 能够降低 Rb 的磷酸化水平, 抑制 cyclinD1、cyclinE 的蛋白质表达, 上调 CDK4 抑制子 P19 的 mRNA 表达, 但对 CDK4 和 CDK2 的蛋白质表达没有明显影响; 通过荧光素酶实验从转录调控水平进一步证实了 BRD7 能够明显抑制 cyclinD1 启动子活性; 采用反义核酸技术抑制 COS7 细胞内源性 BRD7 的表达后, 发现 cyclinD1、cyclinE、磷酸化 Rb 的蛋白质表达水平上调, 并且可以促进细胞生长. 这些结果表明: BRD7 参与调控 Rb/E2F 信号通路中重要靶分子的表达, 抑制 Rb/E2F 通路的活性, 从而阻止细胞周期 G1-S 期进程, 抑制鼻咽癌细胞生长.

关键词 BRD7 基因, Rb/E2F 信号通路, 细胞周期调控, cyclin D1, 反义核酸技术

学科分类号 Q74

BRD7 是通过 cDNA 代表性差异分析(cDNA representational difference analysis, cDNA RDA)从鼻咽癌组织中克隆的一个表达下调差异基因, GenBank 登录号为 AF152604^[1,2]. eMotif 和功能预测显示, 该基因是一个包含有一个溴区结构域(Bromodomain)和多个磷酸化功能位点的核转录因子^[3]. 对 BRD7 基因的功能研究表明: BRD7 可与一些核转录调控因子 BRD2、BRD3 发生交互作用^[4]. 而且国外有研究表明, BRD7 与 E1B-AP5、IRF-2(interferon regulatory factor-2)以及 dishevelled-1 存在交互作用^[5~7], 这些研究都提示 BRD7 可能参与了基因转录调控. 对 BRD7 在鼻咽癌中的研究发现: 过表达 BRD7 基因后可以阻止鼻咽癌细胞周期 G1-S 期进程, 抑制鼻咽癌细胞的生长和恶性生物学行为^[8], 提示 BRD7 是鼻咽癌抑瘤基因强有力的候选者. 采用细胞周期特异性的基因芯片筛选 BRD7 转录调控的靶分子, 发现了 13 个差异表达基因, 它们主要涉及 Ras/MEK/ERK 和 Rb/E2F 2 条信号通路, 这些通路都参与调控细胞周期 G1-S 进程; 进一步的实验证实, BRD7 能够抑制 E2F3 的启动子活性并能够下调 DP2 的表达^[9], 因此, 我

们推测 BRD7 可能主要是通过调控 Rb/E2F 通路而抑制细胞周期 G1-S 进程.

为了更深入地探讨 BRD7 调控 Rb/E2F 通路抑制细胞周期 G1-S 进程的分子机制, 本研究主要采用蛋白质免疫印迹(Western blot)、逆转录 PCR(RT-PCR)、荧光素酶报告分析(luciferase reporter assay)、反义核酸技术等方法检测 BRD7 对 Rb/E2F 通路中重要靶分子表达的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞. 鼻咽癌细胞株 HNE1、猴肾上皮细胞株 COS7 均为中南大学肿瘤研究所保存; pcDNA3.1(+)/BRD7/HNE1 和 pcDNA3.1(+)/HNE1 细胞系均由中南大学肿瘤研究所彭聪构建^[10].

*国家自然科学基金重大项目(30330560)和国家自然科学基金(30300175 和 30400238)资助项目.

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

收稿日期: 2007-01-24, 接受日期: 2007-04-02

1.1.2 载体. pD1Luc 质粒由 Strauss (Institute of Cancer Biology, Danish Cancer Societ, Denmark)惠赠. pD1Luc 质粒含 Cyclin D1 启动子, 该启动子调控 Luc 荧光素酶基因表达^[1]. 按常规方法将质粒转化大肠杆菌 TG1 后, 抽提质粒 DNA, 用相应的内切酶酶切消化鉴定后, 以分光光度计测定 DNA 浓度, 置 4℃ 保存, 留待报告基因检测用. pCMV-Myc/BRD7 重组质粒由中南大学肿瘤研究所周鸣构建.

1.1.3 主要试剂. Taq DNA 聚合酶、逆转录试剂盒、荧光素酶检测系统试剂盒均购自美国 Promega 公司; RNA 抽提试剂 Trizol 购自 Gibco 公司; DNase I、RNasin 购自华美生物工程公司; 兔抗人磷酸化 Rb 多克隆抗体(Ser780)购自 CST 公司; 兔抗人 cyclinD1、CDK2、CDK4 单克隆抗体、鼠抗人 tubulin 单克隆抗体均购自 Santa Cruze 公司; 兔抗人 cyclinE 多克隆抗体购自 Oncogene 公司; 羊抗兔和羊抗鼠二抗均购自美国 Pierce 公司.

1.1.4 引物.所用引物通过 Primer 3(www.genome.wi.mit.edu)程序设计, 由上海博亚公司合成. 所用引物序列如下: BRD7, 5'CATGGCTGACTTGCA-GAAAA 3'; 3' GCCAAAACTCATGGATGCT 5'; CyclinD1, 5' AACTACCTGGACCGCTTCTCT 3'; 3' GTTTGTTCTCCTCCGCCTCT 5'; P19INK4d, 5' GGGCACTTCCAATCCATCT 3'; 3' GTGGGCAGGAGAAACAAGAA 5'; GAPDH, 5' GTCAGTGGTGGACCTGACCT 3'; 3' CCCC-TCTTCAAGGGGTCTAC 5'; BRD7 ASODN, 5' CGGTCGGACATGGGCAAGAAG 3'; BRD7 SODN, 5' CTTCTTGCCCATGTCCGACCG 3'.

1.2 方法

1.2.1 蛋白质免疫印迹(Western blot).取对数生长期的细胞接种于 50 ml 培养瓶, 用含 10%胎牛血清培养基培养, 待细胞生长至密度为 80%~90%, 换无血清培养基饥饿培养 24 h, 使细胞处于同步化生长. 收集细胞裂解液, 取上清进行 SDS-PAGE, 胶的浓度依所检测蛋白质分子质量的大小而不同, 电泳为稳压, 积层胶为 80 V, 分离胶为 120 V, 电泳完毕后用半干石墨转移装置将蛋白质转移至 PVDF 膜上, 转膜为稳流, 电流大小为 0.65 mA/cm², 时间为 2 h, 转膜完毕后, 在 1×PBS 中加入 5%蛋白干粉进行非特异性封闭, 然后依次孵育一抗(一抗滴度: cyclinD1 1:500; cyclin E 1:500; 磷酸化 Rb 1:1000; CDK2、CDK4 均为 1:800)和二抗

(二抗滴度: 羊抗兔、羊抗鼠二抗均为 1:1 000), 发光显影, 根据暗室中信号强弱来决定压片及显影的时间.

1.2.2 细胞总 RNA 抽提及 RT-PCR.取对数生长期的细胞接种于 50 ml 培养瓶, 用含 10%胎牛血清培养基培养, 待细胞生长至密度为 80%~90%, 换无血清培养基饥饿培养 24 h, 使细胞处于同步化生长. 按照 Trizol 抽提试剂盒流程 (GIBCOBRL 公司) 操作步骤抽提细胞总 RNA, DNase I 消化 RNA 中的痕量基因组 DNA, 然后按照逆转录试剂盒 (美国 Promega 公司) 将 RNA 逆转录成 cDNA, 再取 cDNA 1 μl 进行 PCR 扩增, PCR 反应体系为 25 μl, 反应条件为: 94℃ 5 min, 94℃ 50 s, 55℃ 50 s, 72℃ 50 s, 72℃ 10 min, 以 GAPDH 为内参照, 扩增 32 个循环.

1.2.3 荧光素酶报告分析.取对数生长期 COS7 细胞分别以 1×10⁵ 个 / 孔接种于 24 孔板, 用含 10%胎牛血清培养基培养 24 h, 当细胞融合度达 50%~70%左右, 换无血清培养基饥饿培养 24 h, 使大部分细胞处于同步化生长后, 开始做转染. 根据实验设计将细胞分为 3 组, 第一组共转染 pD1Luc 质粒和 pCMV-Myc/BRD7 质粒作为实验组, 第二组共转染 pD1Luc 质粒和 Pcmv-myc 质粒作为对照组, 第三组不转染任何质粒作为空白对照组, 并以 β-gal 做内对照, 以平衡转染效率. 转染 24 h 后, 收获细胞, 制备细胞裂解液. 在单光子检测仪专用检测管中加入 100 μl 荧光素酶催化底物, 再加入 20 μl 上述细胞裂解液, 混匀, 测定荧光素酶活性, 每次试验都重复 3 次, 所有数据都经过了统计学的分析.

1.2.4 寡核苷酸脂质体转染.取对数生长期 COS7 细胞分别以 1×10⁴ 个 / 孔接种于 96 孔板, 用含 10%胎牛血清培养基培养 24 h, 当细胞融合度达 40%~60%左右, 换无血清培养基饥饿培养 24 h, 使大部分细胞处于同步化生长. 用 Invitrogen 公司专用转染寡核苷酸脂质体将寡核苷酸转染 COS7 细胞, 实验分为 2 组: 转染 BRD7 反义寡核苷酸实验组与转染 BRD7 正义寡核苷酸对照组, 将转染后每组寡核苷酸终浓度分别设定为 150 nmol/L、200 nmol/L、250 nmol/L、300 nmol/L, 且每个值重复 4 次, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 32 h 后进行 MTT 实验.

取对数生长期 COS7 细胞分别以 5×10⁵ 个 / 孔接种于 6 孔板, 用含 10%胎牛血清培养基培养

24 h, 当细胞融合度达 40%~60%左右, 换无血清培养基饥饿培养 24 h, 使大部分细胞处于同步化生长. 用 Invitrogen 公司专用转染寡核苷酸脂质体分别将正义与反义 BRD7 寡核苷酸转染 COS7 细胞, 使寡核苷酸终浓度达到 300 nmol/L, 于 37℃、5% CO₂ 培箱中培养 24 h 后抽提蛋白质进行蛋白质免疫印迹实验.

1.2.5 四甲基偶氮唑蓝实验(MTT). 将转染寡核苷酸的 96 孔板中每孔加入 MTT 溶液(5 g/L) 20 μl, 温育 4 h, 终止培养, 弃去培养液, 每孔再加入 150 μl DMSO, 震荡 10 min, 使结晶物溶解, 选择 490 nm 波长进行比色, 在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值并记录结果.

2 结 果

2.1 BRD7 抑制视网膜母细胞瘤抑制蛋白的磷酸化

视网膜母细胞瘤抑制蛋白在细胞周期 G1/S 关卡调控中处于中心环节, 它以其磷酸化和去磷酸化的形式决定转录因子 E2F 的活性. 因此本研究首先检测 BRD7 是否能够影响 Rb 的磷酸化水平. 分别收集 pcDNA3.1(+)/BRD7/HNE1 和 pcDNA3.1(+)/HNE1 细胞蛋白裂解液, 用蛋白质印迹检测磷酸化 Rb 的表达, 结果表明, BRD7 能够抑制 Rb 的磷酸化(图 1).

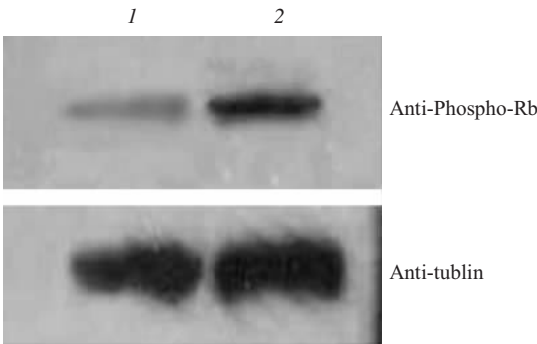


Fig. 1 Westernblot analysis of Phospho-Rb expression in pcDNA3.1 (+) /BRD7/HNE1 and pcDNA3.1(+) /HNE1 cells
1: pcDNA3.1(+)/BRD7/HNE1; 2: pcDNA3.1(+)/HNE1.

2.2 BRD7 对 CDK4、CDK2 的表达没有明显影响

Rb 的磷酸化主要是受 CDKs 来调控. 在 G1-S 期, CDK4 和 CDK2 发挥激酶活性, 使 Rb 磷酸化从而促使细胞周期进程的完成. 前面研究证实了 BRD7 能够抑制 Rb 的磷酸化, 接下来进一步检测

BRD7 对 CDK4、CDK2 表达的影响. 通过蛋白质印迹检测发现 BRD7 并没有影响 CDK4、CDK2 的蛋白质表达(图 2).

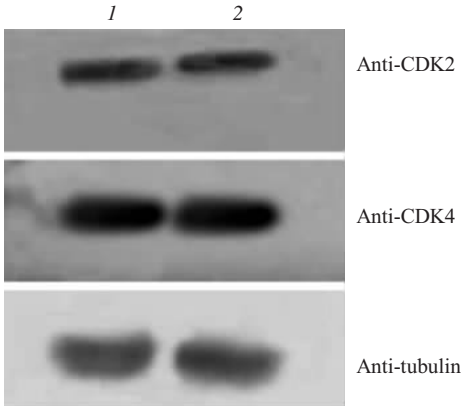


Fig. 2 Westernblot analysis of CDK2, CDK4 expression in pcDNA3.1 (+) /BRD7/HNE1 and pcDNA3.1 (+) /HNE1 cells
1: pcDNA3.1(+)/BRD7/HNE1; 2: pcDNA3.1(+)/HNE1.

2.3 BRD7 引起 CDK4 抑制子 p19^{INK4d} 的累积

p19^{INK4d} 是 CDK 抑制子 INK4 家族中的成员, 它可以特异性地抑制 CDK4/CyclinD1、CDK6/CyclinD1 的磷酸化激酶活性. 分别抽提 pcDNA3.1(+)/BRD7/HNE1 和 pcDNA3.1(+)/HNE1 细胞总 RNA, 然后逆转录成 cDNA, 用 p19^{INK4d} 引物进行扩增, 结果发现, BRD7 可以上调 p19^{INK4d} 的表达(图 3).

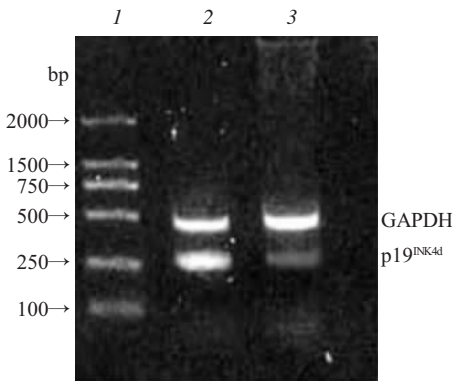


Fig. 3 RT-PCR analysis of p19^{INK4d} expression in pcDNA3.1 (+) /BRD7/HNE1 and pcDNA3.1 (+) /HNE1 cells
1: Marker; 2: pcDNA3.1(+)/BRD7/HNE1; 3: pcDNA3.1(+)/HNE1.

2.4 BRD7 对 cyclinD1、cyclinE 的影响

Cyclin 和 CDKs 是细胞周期调控机制的核心, 它们各自在细胞周期内特定的时间激活, 通过对相

应的底物磷酸化, 驱使细胞完成细胞周期. 在众多的 cyclin 和 CDK 的复合物当中, cyclin D 与 CDK4/6 结合、cyclin E 与 CDK2 的结合是 G1-S 期运行的必要条件. 因此 BRD7 是否能够影响 cyclinD1 和 cyclinE 的表达是本研究进一步考察的目标.

2.4.1 BRD7 对 cyclinD1 表达水平的影响. 抽提 pcDNA3.1 (+)/BRD7/HNE1 和 pcDNA3.1 (+)/HNE1 细胞的总蛋白质与总 RNA, 分别采用蛋白质印迹和 RT-PCR 法从蛋白质水平和 mRNA 水平检测 cyclin D1 的表达, 结果证实, BRD7 能够抑制 cyclin D1 的 mRNA 与蛋白质水平的表达 (图 4).

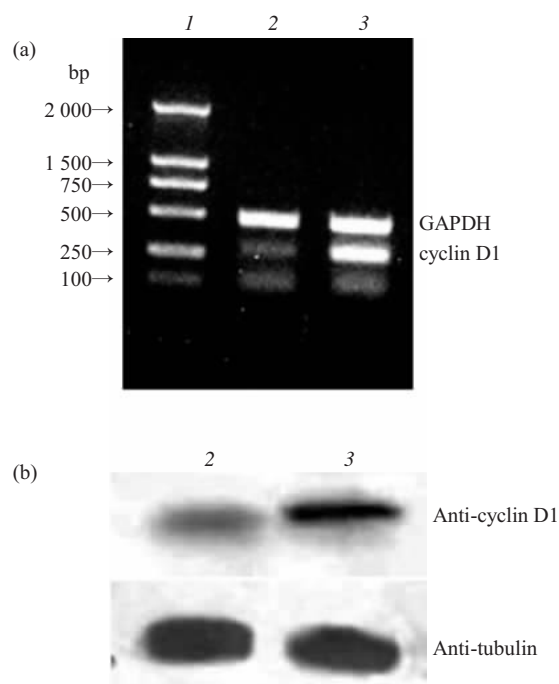


Fig. 4 Detection of cyclin D1 expression in pcDNA3.1 (+) /BRD7/HNE1 and pcDNA3.1 (+) /HNE1 cells

(a) RT-PCR analysis of cyclin D1 expression in pcDNA3.1 (+)/BRD7/HNE1 and pcDNA3.1 (+)/HNE1 cells. (b) Western blot analysis of cyclin D1 expression in pcDNA3.1 (+)/BRD7/HNE1 and pcDNA3.1 (+)/HNE1 cells. 1: Marker; 2: pcDNA3.1 (+)/BRD7/HNE1; 3: pcDNA3.1 (+)/HNE1.

2.4.2 BRD7 对 cyclin D1 转录调节水平的影响. 前期对 BRD7 的功能研究提示, BRD7 可能参与基因转录调控, BRD7 是否能够影响 Cyclin D1 的转录调节水平? 共转染 pD1Luc 质粒和 pCMV-Myc/BRD7 质粒作为实验组, 对照组共转染 pD1Luc 质粒和 pCMV-Myc 质粒, 未转染任何质粒的 COS7 细胞作为空白对照, 并以 β -gal 做为内对

照, 以平衡转染效率. 转染 24 h 后, 收获细胞并进行报道基因活性检测. 该实验重复 3 次, 并用 SPSS 统计学软件进行了分析, 结果表明, BRD7 过表达后可明显抑制 cyclin D1 启动子的活性 (图 5).

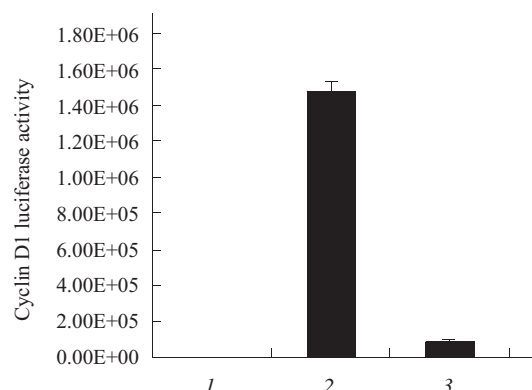


Fig. 5 pCMV-Myc/BRD7 reduced cyclinD1 promoter activity in COS7 cells detected by luciferase assay

COS7 cells were transiently cotransfected with cyclin D1 luciferase reporter plasmid and pCMV-Myc/BRD7 or pCMV-Myc, 30 h after transfection, BRD7 promoter activity was detected by luciferase assay. 1: COS7; 2: pCMV-Myc/COS7; 3: pCMV-Myc/BRD7/COS7.

2.4.3 BRD7 对 cyclinE 表达水平的影响. cyclin E 是另一种 G1 期细胞周期蛋白, 它与 CDK2 结合形成复合物, 并与 cyclin D1-CDK4/6 复合物共同作用于 Rb 蛋白, 使 Rb 发生磷酸化, 促进细胞通过 G1-S 期调控点. 既然 BRD7 能够下调 cyclin D1 的表达, 那么它是否也同样能下调 cyclinE 的表达? 分别抽提 pcDNA3.1 (+)/BRD7/HNE1 和 pcDNA3.1 (+)/HNE1 细胞的总蛋白质, 用蛋白质印迹检测, 结果证实 BRD7 确实能够下调 cyclin E 的蛋白表达水平 (图 6).

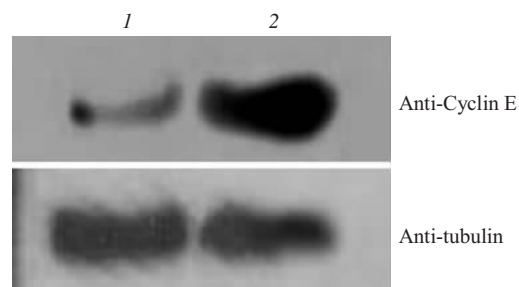


Fig. 6 Western blot analysis of cyclin E expression in pcDNA3.1 (+) /BRD7/HNE1 and pcDNA3.1 (+) /HNE1 cells

1: pcDNA3.1 (+)/BRD7/HNE1; 2: pcDNA3.1 (+)/HNE1.

2.5 反义核酸技术抑制内源性 BRD7 表达后对 Rb/E2F 通路中关键靶分子及细胞生物功能的影响

2.5.1 抑制 BRD7 的内源性表达后可以促进 cyclin D1、cyclin E 和磷酸化 Rb 的累积. 上述实验已经证实过, 表达 BRD7 后可以抑制 cyclin D1、cyclin E 的表达以及 Rb 的磷酸化, 从而促进细胞周期 G1-S 期的进程. 内源性 BRD7 是否也能够影响到上述蛋白质的表达? 采用转染 BRD7 反义寡核苷酸来抑制细胞内源性 BRD7 的表达, 然后用蛋白质印迹来检测 cyclin D1、cyclin E、磷酸化 Rb 的表达水平. 结果显示, 抑制内源性 BRD7 后可以上调 cyclin D1、cyclin E、磷酸化 Rb 的表达(图 7), 从反向证实了 BRD7 对 cyclin D1、cyclin E 和 Rb 磷酸化的抑制.

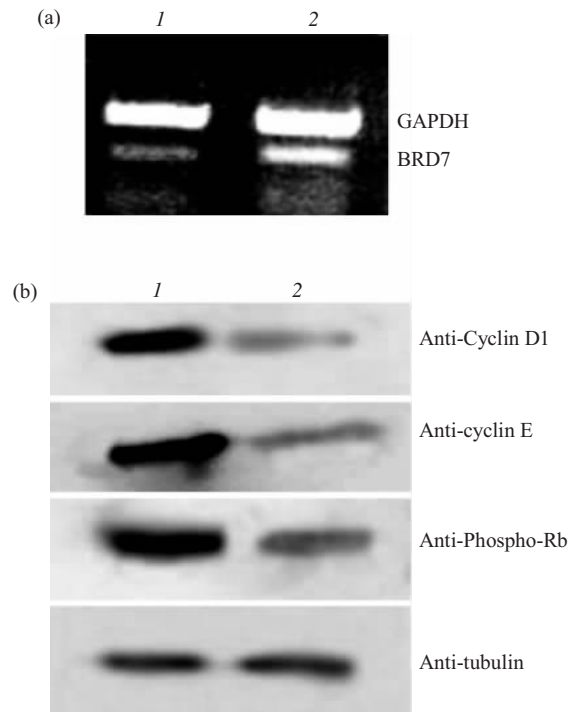


Fig. 7 Effects of silencing endogenous BRD7 expression on cyclin D1, cyclin E, Phospho-Rb protein expression level
(a) COS7 cells were transfected with BRD7 S-ODN or BRD7 AS-ODN, then total RNA was isolated. The endogenous expression of BRD7 was detected by RT-PCR. (b) Westernblot analysis of cyclin D1, Cyclin E, Phospho-Rb expression resulting from silencing of endogenous BRD7 relative to control treatment. 1: BRD7 AS-ODN; 2: BRD7 S-ODN.

2.5.2 抑制内源性 BRD7 表达可促进细胞生长. 分别将 BRD7 反义寡核苷酸与正义寡核苷酸转染入 COS7 细胞, 转染 32 h 后利用 MTT 实验检测细胞的增殖情况. 结果表明: 抑制 BRD7 内源性表达后明显促进细胞的生长, 且随 BRD7 反义寡核苷酸浓

度的增高而增殖能力增强, 而对照组细胞却无明显改变(图 8). 从而反向证实 BRD7 可抑制细胞的生长和增殖.

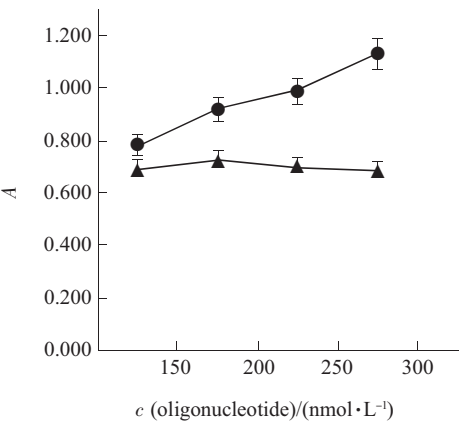


Fig. 8 Effect of BRD7 AS-ODN on COS7 cell on proliferation

MTT experiment revealed that the silence of endogenous BRD7 in COS7 cell accelerated the cell growth in parallel with the control cells.
●—●: BRD7 AS-ODN; ▲—▲: BRD7 S-ODN.

3 讨 论

肿瘤的基本特征之一是细胞恶性增殖, 其机制主要表现为细胞增殖过度, 凋亡减少. 对肿瘤和细胞周期研究的进展表明: 肿瘤是一类细胞周期病. 细胞周期是一高度有序的分子事件, 各时相严格按照 G1-S-G2-M 的顺序进行. G1-S 是控制细胞周期进程最关键的一个环节, 因为在 G1 期中存在一限制点(restriction point, R 点), 在 R 点之前, 细胞周期的运行依赖于细胞外生长因子, 而一旦细胞周期跨过 R 点, 细胞周期即为一自主性的过程, 不再依赖外界生长因子的存在, 所以 G1-S 对于细胞周期的运行和完成是至关重要^[12,13].

3.1 BRD7 对细胞周期的抑制作用

前期研究工作表明: 过表达 BRD7 基因可抑制鼻咽癌细胞的生长和增殖, 细胞流式分析发现, BRD7 能够抑制细胞周期 G1-S 期进程^[8]; 在本研究中, 通过反义核酸技术抑制 COS7 细胞内源性 BRD7 的表达后, 发现可加速细胞生长, 从反向证实 BRD7 能够抑制细胞生长, 与前期实验结果相一致.

3.2 BRD7 参与 Rb/E2F 通路的调节

细胞周期 G1-S 期进程主要受到 2 条信号传导通路的调控, 即胞浆的 Ras/MEK/ERK 信号通路和胞核的 Rb/E2F 信号通路. 而 Rb/E2F 信号通路直接

调控着 G1-S 进程, 它是 Ras/MEK/ERK 通路的下游调控通路.

E2Fs 是 Rb/E2F 通路中的一个末端分子, 它是一个重要的细胞周期调控因子. E2F 与其二聚体伙伴(dimerization partner protein, DP) 结合形成有功能的异二聚体后, 结合到靶基因启动子中特殊的 DNA 序列(5' TTTSSCGC 3', S = C 或 G) 上, 调节基因转录. 前期有研究表明, BRD7 能够下调 E2F3 和 DP2 的表达, 而且还能抑制 E2F3 的启动子活性, 但是 BRD7 不直接作用于 E2F3 启动子区, 且发现 BRD7 能够特异性地结合乙酰化的组蛋白 H3, 提示 BRD7 可能通过参与核内组蛋白乙酰化信号传递来间接调控基因转录^[9].

E2F 的活性是通过与 Rb 家族的不同成员结合来调控的, 视网膜母细胞瘤抑制蛋白(PRb)为 Rb/E2F 通路的调控中心, 它以其磷酸化和去磷酸化的形式决定着转录因子 E2F 的活性, 在细胞周期 G1/S 关卡调控中处于中心环节^[14], 研究发现, BRD7 能够抑制 Rb 的磷酸化水平, 而且采用反义核酸技术从反向也证实了这一结果.

Rb 的磷酸化主要受 CDKs 来调控的, 在 G1-S 期主要是由 CDK4 和 CDK2 分别与 cyclinD1 和 cyclinE 结合形成复合物, 从而发挥激酶活性使 Rb 磷酸化, 促进细胞周期进程的完成. 该研究证实了 BRD7 基因对 CDK2 和 CDK4 的蛋白质表达水平没有影响. 在细胞周期的整个过程中, 细胞中某一 CDK 的含量是比较恒定的, 即活化 CDK 与非活化 CDK 的总量不变, 改变的只是活化 CDK 与非活化 CDK 的比例^[15].

P19^{INK4d} 是 CDK 抑制子 INK4 家族中的成员, 它可以特异性地抑制 CDK4/cyclin D1、CDK6/cyclin D1 的磷酸化激酶活性. 周洁博士等^[9]通过细胞周期特异性的基因芯片筛选 BRD7 转录调控的靶分子时, 发现了 BRD7 能够上调 P19^{INK4d} 的表达, 但基因芯片是一个高通量的筛选过程, 可能存在一定程度的假阳性. 我们进一步用 RT-PCR 法检测 BRD7 对 P19^{INK4d} 表达, 证实 BRD7 可以上调 P19^{INK4d} 的表达, 这与前期研究结果相一致. p19^{INK4d} 除能够特异性地抑制 CDK4/cyclinD1、CDK6/cyclinD1 的磷酸化激酶活性外, 目前它还被认为通过减弱 Mdm2 介导的降解 p53 基因而参与了 P53 途径, 从而促进细胞的凋亡^[16]. 因此我们推测 BRD7 是否也能通过上调 P19 的表达而促进细胞的凋亡. 关于 BRD7 促细胞凋亡的功能, 目前正在研究中.

CyclinD1 是 Rb/E2F 通路中的一个上游分子, 而且是一个至关重要的分子, 它与 CDKs 结合并使其活化, 从而使非活化状态的 Rb 发生磷酸化, 促进细胞进入 S 期^[17]. 在本研究中, 利用 RT-PCR 和蛋白质印迹分别从 mRNA 和蛋白质水平证实了 BRD7 可下调 cyclin D1 的表达, 荧光素酶报道分析实验发现, BRD7 还能够较强地抑制 cyclin D1 的启动子活性. 采用 BRD7 的反义寡核苷酸抑制内源性 BRD7 表达后, 用蛋白质印迹检测发现 cyclin D1 的表达上调, 从反向证实了 BRD7 对 cyclin D1 调控. 但至于 BRD7 究竟是以一种什么样的机制来调控 cyclin D1, 是通过直接作用还是间接作用来影响 cyclin D1 启动子的活性, 尚有待于进一步研究证实.

CyclinE 也是一种 G1 期的周期蛋白, 它与 CDK2 结合, 在 G1 晚期发挥作用, 促进细胞进入 S 期, cyclin E 是细胞周期 G1→S 期转换中的主要限速因子之一. 在本研究中发现, BRD7 可以下调 cyclin E 的表达, 并且用反义核酸技术从反向证实了 BRD7 对 cyclin E 的调控.

综上所述, BRD7 参与调控 Rb/E2F 信号通路中关键靶分子的表达, 抑制 Rb/E2F 通路的活性, 从而阻止细胞周期 G1-S 期的进程(图 9). 但是

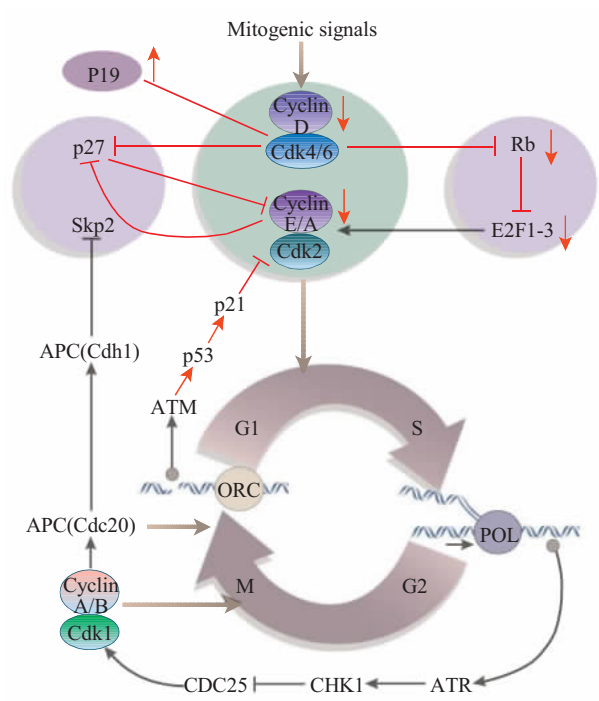


Fig. 9 BRD7 inhibits cell cycle G1/S progression by regulating some important molecules in Rb/E2F pathway
BRD7 could inhibit the phosphorylation of Rb, decrease the expression of cyclinD1 and cyclinE, up-regulate the expression level of P19.

BRD7参与 Rb 信号通路的功能并不只局限于抑制细胞周期的进程, 还可能参与了细胞内其他的生化事件, 如细胞凋亡等, 这有待于进一步的研究和探索. 因此, 目前只能说 BRD7 通过调控 Rb 信号通路中一些重要信号分子的转录而参与包括细胞周期在内的分子事件.

参 考 文 献

- 1 余 鹰, 谢 奕, 李桂源, 等. 应用混合探针文库筛选法克隆多个肿瘤差异表达基因. 癌症, 2000, **19** (7): 709~712
Yu Y, Xie Y, Li G Y, *et al.* Chin J Cancer, 2000, **19** (7): 709~712
- 2 余 鹰, 谢 奕, 李桂源, 等. 一个新鼻咽癌抑瘤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): 319~323
Yu Y, Xie Y, Li G Y, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2000, **27** (3): 319~323
- 3 湛凤凰, 江 宁, 曹 利, 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, Cao L, *et al.* Chin J Med Genet, 1998, **15** (6): 341~344
- 4 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.* Sci China (Ser C), 2002, **32** (2): 153~158
- 5 Staal A, Enserink J M, Stein J L, *et al.* Molecular characterization of celtix-1, a bromodomain protein interacting with the transcription-factor interferon regulatory factor 2. J Cell Physiol, 2000, **185** (2): 269~279
- 6 Hyshkowska J, Rusch A, Wolf H, *et al.* Regulation of transcription by the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1B-AP5 is mediated by complex formation with the novel bromodomain containing protein BRD7. Biochem J, 2003, **371** (Pt 2): 385~393
- 7 Kim S, Lee J, Park J, *et al.* BP75, bromodomain-containing M(r) 75 000 protein, binds dishevelled-1 and enhances Wnt signaling by inactivating glycogen synthase kinase-3 beta. Cancer Res, 2003, **63** (16): 4792~4795
- 8 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): 4~10
Yu Y, Zhu S G, Zhang B C, *et al.* Chin J Cancer, 2001, **20** (6): 4~10
- 9 Zhou J, Ma J, Li G Y, *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 Physiology, 2004, **200** (1): 89~98
- 10 彭 聪, 谭 琛, 李小玲, 等. 新基因 BRD7 对鼻咽癌蛋白质表达谱影响的初步研究. 生物化学与生物物理进展, 2003, **30** (5): 721~725
Peng C, Tan C, Li X L, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2003, **30** (5): 721~725
- 11 HMüller, J Lukas, A Schneider, *et al.* Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, **91** (8): 2945~2949
- 12 Zetterberg A, Larsson O, Wiman K G. What is the restriction point?. Curr Opin Cell Biol, 1995, **7** (6): 835~842
- 13 Blagosklonny M V, Pardee A B. The restriction point of the cell cycle. Cell Cycle, 2002, **1** (2): 103~110
- 14 Ritety D J, Liu C Y, Lee W H, *et al.* Mutations of N-terminal regions renders the Retinoblastoma protein insufficient functions in development and tumor suppression. Mol Cell Biol, 1997, **17** (12): 7342~7352
- 15 曾益新. 肿瘤学. 第二版. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 158~165
Zeng Y X. Oncology. 2nd. Beijing: People Health Press, 2001. 158~165
- 16 Tao W, Levine A J. P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleocytoplasmic shuttling of Mdm2. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, **96** (12): 6937~6941
- 17 Sherr C J. Cdk inhibitors: positive and negative regulators of G1-Phase progression. Genes Dev, 1999, **13**: 1501~1502

The Molecular Mechanisms of BRD7 Gene in Regulating of Rb/E2F Pathway*

LI Shu-Fang^{1,2)}, ZHOU Ming¹⁾, LIU Hua-Ying¹⁾, XU Xiao-Jie¹⁾, PENG Cong¹⁾,
PENG Shu-Ping¹⁾, WU Ming-Hua¹⁾, LI Xiao-Ling¹⁾, LI Gui-Yuan^{1)**}

¹⁾Cancer Research Institute, Central South University Xiang-Ya School of Medicine, Changsha 410078, China;

²⁾Clinic Medical Research Institute, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410005, China)

Abstract BRD7 is a novel bromodomain gene isolated by cDNA representational difference analysis (GenBank accession number: AF152604). Ectopic expression of BRD7 inhibited NPC cell growth and cell cycle progression. Previous studies demonstrated that BRD7 gene could regulate the activity of Rb/E2F pathway. In order to further explore the molecular mechanisms of BRD7 regulating Rb/E2F pathway, Westernblot and RT-PCR analysis were carried out. Results showed that BRD7 could inhibit the phosphorylation of Rb, decrease the expression of cyclin D1 and cyclin E, up-regulate p19 in RNA level, but had no effects on the expression of CDK4 and CDK2. Luciferase reporter assay suggested that BRD7 repressed cyclin D1 promoter activity. Furthermore, an antisense nucleic acids technology was performed to silence the endogenous BRD7 gene in COS7 which resulted in the upregulation of cyclin D1, cyclin E, phosphorylated Rb, and acceleration of the cell growth. As a result of this research, BRD7 inhibits G1-S phase progression in cell cycle via regulating the important molecules involved in Rb/E2F pathway.

Key words BRD7 gene, Rb/E2F pathway, cell cycle regulation, cyclin D1, antisense nucleic acids technology

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

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

Received: January 24, 2007 Accepted: April 02, 2007