论著

文章编号:1000-5404(2010)10-1020-04

人 NFBD1 启动子区域顺式作用元件 CHR 的定点突变分析

朱 江[1],兰 欢[2],洪苏玲[1],卜友泉[2] (400016 重庆,重庆医科大学:附属第一医院耳鼻咽喉科[1],分子医学与肿瘤研究中心[2])

[摘要] **目的** 对 NFBD1 启动子区域顺式作用元件 CHR 进行定点突变分析,以分析 CHR 在 NFBD1 转录调控中的作用。**方法** 以原有 NFBD1 核心启动子荧光素酶报告基因重组体 NFBD1-PS1-325 为模板,采用 PCR 介导的基因定点突变技术对 NFBD1 启动子区域中的 CHR 位点进行定点突变,构建相应的 CHR 定点突变重组体;采用荧光素酶双报告基因分析技术检测各重组体的启动子活性,分析 CHR 定点突变对 NFBD1 启动子活性的影响;结合阿霉素处理,分析 CHR 在 DNA 损伤后 NFBD1 转录下调中的潜在作用。**结果** CHR 定点突变后能显著降低 NFBD1 的启动子活性;CHR 定点突变后显著减弱了 DNA 损伤后 NFBD1 的转录下调比例。**结论** CHR 参与 NFBD1 的基础转录调控及 DNA 损伤后的转录下调。

[关键词] NFBD1;启动子;转录调控;CHR;顺式作用元件

[中图法分类号] R394-33; R394.3 **[文献标志码]** A

Site-directed mutagenesis of cis-acting element, CHR, in human NFBD1 promoter region

Zhu Jiang[1], Lan Huan[2], Hong Suling[1], Bu Youquan[2] ([1]Department of Otolaryngology, First Affiliated Hospital, [2]Molecular Medicine and Cancer Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] Objective To investigate the role of a cis-acting element, cell cycle genes homology region (CHR), in the transcriptional regulation of human NFBD1 gene (a nuclear factor with BRCT domain 1) by conducting a site-directed mutagenesis analysis on the element in human NFBD1 promoter region. Methods Wild type of NFBD1 promoter reporter, NFBD1-PS1-325, was used as template to make CHR mutant by using PCR based site-directed mutagenesis. Dual luciferase reporter assay was used to determine promoter reporter activity. Adiamycin treatment was employed to investigate the role of CHR in the transcriptional downregulation of NFBD1 after DNA damage. Results Site-directed mutagenesis of CHR caused a significant decrease in NFBD1 promoter activity, and also attenuated the transcriptional down-regulation of NFBD1 after DNA damage. Conclusion CHR element might be involved in both basic transcriptional regulation and transcriptional down-regulation of NFBD1 after DNA damage.

[Key words] a nuclear factor with BRCT domain 1; Promoter; transcriptional regulation; cell cycle genes homology region; cis-acting element

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30801356), the Project of Science and Technology Research of Chongqing Municipal Education Committee (KJ090305), and the Key Project of Chongqing Medical University (XBZD200707). Corresponding author: Hong Sulling, Tel: 86-23-89011020, E-mail: hsl_prof@163.com; Bu Youquan, Tel: 86-23-68485096, E-mail: buyqcn@yahoo.com.cn

NFBD1(a nuclear factor with BRCT domain 1)也称 MDC1(mediator of DNA damage checkpoint protein 1),是一个参与细胞内 DNA 损伤后细胞应答反应的重要分子[1]。大量研究表明,NFBD1 参与 ATM、Chk1 等介导的 DNA 损伤应答通路,在保持基因组稳定性方面起着重要作用,也是细胞抵抗肿瘤发生的一道重要防线,被认为是一个潜在的抗肿瘤治疗新靶点[1-6]。最近的研究还表明,NFBD1 参与细胞周期的调控[7-10]。我们曾对 NFBD1 的启动子进行了系统的鉴定,并对其在 DNA 损伤后的转录调控机制进行了相对系统的研究[11-14]。最近我们对 NFBD1 的核心启动子区域进行分析,发现其中存在一个保守的 CHR(cell cycle genes homology region)顺式作用元件。本研究结合基因定点突变和荧光素酶报告基因分析,分析了该顺式作用元

[基金项目] 国家自然科学基金(30801356);重庆市教委科学技术研究项目(KJ090305);重庆市卫生局课题(07-2-026)

[通信作者] 洪苏玲,电话:(023)89011020,E-mail:hsl_prof@163.com
卜友泉,电话:(023)68485096, E-mail: buyqcn@yahoo.com.cn

件在 NFBD1 的基础转录调控及 DNA 损伤后的转录下调中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人宫颈癌细胞系 HeLa、人非小细胞肺癌细胞系 A549 和人成骨肉瘤细胞系 U2OS 为本实验室保存，HeLa 和 U2OS 采用 DMEM 培养基培养，A549 采用 RPMI1640 培养基培养，两种培养基均添加 10% FBS 和青霉素（1×10^5 U/L）/链霉素（100 mg/L），培养于 CO_2 培养箱。DMEM、RPMI、胎牛血清、Lipofectamine 2000 和反转录试剂购于 Invitrogen 公司，阿霉素购自 Sigma 公司，pGL3-basic vector 和 Dual-Luciferase® Reporter Assay System 购自 Promega 公司，QIAquick® Gel Extraction Kit 和 QIAprep® Spin Miniprep Kit 购自 QIAGEN 公司，Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity 和 GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System 购自 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析　从 GenBank 等国际基因数据库提取 NFBD1 基因的核心启动子序列，用 TFsearch 等软件对启动子区域进行转录因子结合位点分析，寻找潜在的顺式作用元件和转录因子结合位点。

1.2.2 CHR 位点定点突变重组体的构建　主要参照 GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System 操作，稍有改动，具体操作如下。

1.2.2.1 引物设计　采用 Primer3.0 等引物设计软件，结合基因定点突变技术原理，设计用于定点突变的 PCR 引物。上游引物命名为 NFBD1CHR-MF，序列为：GCCTGGGAGACACCACCTATGGTCCCTCTAA GGGG（下划线部分为导入的定点突变序列，即将原有的 TTGAA 序列定点突变为 GGTCC 序列），下游引物命名 NFBD1CHR-MR，序列为：ATAGGTGGTGTCTCCCAGGCTGCTGAGATA。

1.2.2.2 甲基化处理　反应体系为：野生型 NFBD1 启动子荧光素酶报告基因重组体 PS1-325 质粒 DNA 模板 100 ng，甲基化缓冲液 1.6 μl，10 × SAM 溶液 1.6 μl，DNA 甲基化酶（4 U/μl）1.0 μl，灭菌双蒸水补足至 16 μl。反应条件为：37 ℃温育 1 h。

1.2.2.3 突变反应　PCR 扩增反应体系组成为：5 μl 10 × 高保真 PCR 缓冲液、1.5 μl 10 mmol/L dNTPs、1.5 μl 50 mmol/L $MgSO_4$、甲基化的 DNA 模板 2 ~ 5 μl（12.5 ~ 31.25 ng）、0.2 ~ 0.5 μl 高保真 Plantinum *Taq* 酶（5 U/μl）、10 μmol/L 上下游引物各 1.5 μl，灭菌双蒸水补足至 50 μl。扩增程序为：94 ℃变性 2 min，然后用逐步程序 94 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s、68 ℃ 1 min/1 kb DNA 完成 20 个循环，最后于 68 ℃延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物，EB 染色，凝胶成像系统照相。

1.2.2.4 转化　取 2 μl 突变反应液，使用 One-Shot® MAX Efficiency® DH5α™-T1R 感受态细胞进行转化，操作同常规转化。转化后涂氨苄抗性琼脂平板，倒置过夜培养。

1.2.2.5 阳性克隆鉴定　随机挑取多个克隆，小量抽提质粒后直接进行 DNA 测序以验证定点突变情况。

1.2.3 瞬时转染　质粒瞬时转染采用 Lipofectamine 2000 试剂进行，具体操作参见文献[11 - 14]。

1.2.4 荧光素酶报告基因活性检测　采用 Dual-Luciferase® Reporter Assay System 进行荧光素酶报告基因活性检测，具体操作参见文献[11 - 14]。

1.3 统计学分析

数据初步处理采用 Excel 2003 软件，统计分析采用 SPSS 10.5 统计软件进行 *t* 检验。

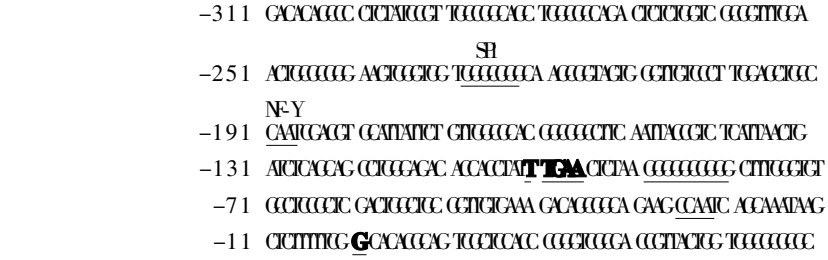
2 结果

2.1 NFBD1 核心启动子区域 CHR 元件的生物信息学分析

首先从 GenBank 等国际基因数据库提取 NFBD1 基因的核心启动子序列，用 TFsearch 等软件对启动子区域进行转录因子结合位点分析，寻找潜在的顺式作用元件。结果发现，除了发现我们已往发现的 Sp1 和 NF-Y 结合位点外，还在转录起始位点上游 100 bp 处发现了一个新的 CHR 顺式作用元件，该元件序列完全吻合在 Plk1、CDC25C 等基因中发现 CHR 保守序列 NRYTTGAANN（其中 N 代表任意碱基，R 代表 G 或 A，Y 代表 T 或 C）（图 1）。

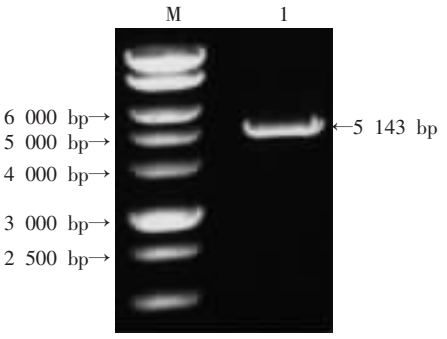
2.2 CHR 位点定点突变重组体的构建

为了进一步探讨上述发现的 CHR 元件在 NFBD1 转录调控中的作用，我们采用基因定点突变技术对其进行定点突变，构建相应的 CHR 位点定点突变重组体。在设计 PCR 引物时，我们参照 Uchiumi（1997）的对 Plk1 基因中 CHR 进行定点突变的方案，将其中的原有的 TTGAA 序列定点突变为 GGTCC 序列。琼脂糖凝胶电泳结果表明，获得的 PCR 产物和原有质粒大小一致，约 5 kb 左右，表明定点突变 PCR 成功（图 2）。进一步将该突变产物进行转化，挑取多个阳性克隆进行 DNA 测序，结果表明，原有的 TTGAA 序列已经被定点突变为 GGTCC 序列。



转录起始位点处标记为 +1 bp，下划线处为重要的顺式作用元件，转录因子标记为黑体

图 1　NFBD1 核心启动子区域顺式作用元件分析



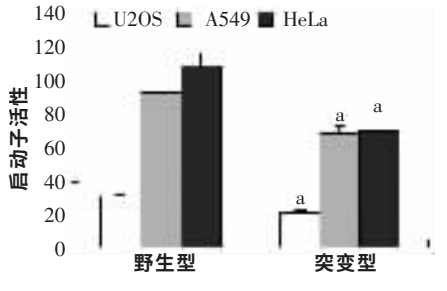
M:DNA 分子量标准;1:定点突变 PCR 产物

图2 定点突变 PCR 检测结果

2.3 CHR 位点定点突变重组体的启动子活性分析

将构建好的 CHR 位点定点突变重组体分别转染 A549、HeLa 和 U2OS 细胞,以构建该突变体使用的野生型 NFBD1 基因启动子荧光素酶报告基因重组体 PS1-325 作为对照,同时转染 pRL-TK 质粒作为内参对照。通过检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶活性的比值,来表示不同启动子片段的活性。启动子活性分析表明,与野生型 NFBD1 基因启动子荧光素酶报告基因重组体 PS1-325 相比,CHR 位点定点突变重组体的启动子活性显著降低(图3,$P<0.01$)。该结果提示,NFBD1 核心启动子区域的 CHR 不仅参与 NFBD1 的基本转录调控,而且其很有可能是作为一个抑制性顺式作用元件而发挥作用的。

另外,我们同时进行平行实验,在 U2OS 细胞中转染 CHR 位点定点突变重组体和野生型 NFBD1 启动子荧光素酶报告基因重组体 PS1-325 后,进行阿霉素处理,以诱发 DNA 损伤,再分析各报告基因重组体的启动子活性,结果为:对照 U2OS 细胞中,野生型启动子和突变型启动子的活性分别为 30.5 和 15.8,而 1 μmol/L 阿霉素处理后其活性则分别降低为 21.1 和 14.6。这就说明,阿霉素处理能导致野生型 NFBD1 启动子荧光素酶报告基因重组体 PS1-325 启动子活性的显著降低,但 CHR 定点突变后则显著减弱了 DNA 损伤后 NFBD1 的启动子活性降低比例($P<0.01$)。



a: $P<0.01$,与野生型比较

图3 CHR 定点突变重组体的启动子活性分析

3 讨论

在本研究中,我们发现了 NFBD1 核心启动子区域含有一个高度保守的 CHR 顺式作用元件,并利用定点突变技术对其进行了功能分析。和其他 G_2/M 期基因一样,NFBD1 基因的核心启动子区域同样也含有 CHR 元件,该元件 NFBD1 核心启动子区域的 CHR 不仅参与 NFBD1 的基本转录调控,而且其很有可能是作为一个抑制性顺式作用元件而发挥作用的。CHR 是一个在 G_2/M 期基因中出现的典型的顺式作用元件,如 Plk1、Cdc25C 等基因的启动子区域均含有典型的 CHR 元件,目前认为其主要参与 G_2/M 期基因的转录调控[15-20]。NFBD1 是一个参与 DNA 损伤后的细胞应答通路的重要分子[1]。在2003年,来自美国和英国的3个研究小组同时在同一期 Nature 杂志发表论文,揭示了 NFBD1 在 DNA 损伤检测点(DNA damage checkpoint)信号转导途径中的重要作用[4-6]。大量后续研究进一步验证了 NFBD1 在 DNA 损伤后细胞应答反应中的重要作用[1,3]。但值得注意的是,NFBD1 还参与细胞增殖、细胞周期过程等的调节。我们发现,采用 RNAi 技术抑制 NFBD1 表达后,可导致 HeLa 细胞生长增殖的显著抑制[11]。Coster 等[7]多个研究小组还发现,NFBD1 可以通过与后期促进因子(anaphase-promoting complex,APC)等蛋白质相互作用而参与调节细胞周期进程中的有丝分裂过程[7-10]。因此,本研究不仅确立了 CHR 元件在 NFBD1 转录中的作用,而且也从转录调控角度再次佐证和支持了"NFBD1 参与细胞周期调控"这一新发现。

最近我们还发现,NFBD1 在细胞周期中呈现规律性的表达特征,G_1/S 期降低,G_2/M 期升高,是一个典型的 G_2/M 期基因。已有研究表明,CHR 元件介导 Plk1、Cdc25C 等 G_2/M 期基因的转录调控。然而,CHR 元件是否介导以及如何介导 NFBD1 在细胞周期中的转录调控,仍有待进一步研究。

本研究显示,CHR 定点突变后显著减弱了 DNA 损伤后 NFBD1 的启动子活性降低比例,提示 CHR 很可能也参与介导 DNA 损伤后 NFBD1 的转录下调机制。Badie 等[17]研究发现,Cdk1 等基因中的 CHR 元件也同样介导 Cdk1 基因 DNA 损伤后的转录下调,将 Cdk1 基因中的 CHR 元件突变后,其转录下调能力显著减弱。我们已经发现转录因子 Sp1 参与 DNA 损伤后 NFBD1 的转录下调,但 CHR 元件和 Sp1 结合位点之间是否协同参与 DNA 损伤后 NFBD1 的转录下调则仍不清楚。另一方面,CHR 元件的结合蛋白目前仍不清楚,该结合蛋白的鉴定一直是该领域的一个难题,也是解决上述诸多未知问题的突破口。

综上,本研究对 NFBD1 核心启动子区域中的 CHR 元件进行了定点突变分析,初步确认了该 CHR 元件参与 NFBD1 的基础转录调控及 DNA 损伤后的转录下调。这为进一步研究 NFBD1 的转录调控和鉴定 CHR 元件结合蛋白奠定了坚实的基础。

参考文献：

[1] Stucki M, Jackson S P. MDC1/NFBD1: a key regulator of the DNA damage response in higher eukaryotes[J]. DNA Repair (Amst), 2004, 3(8/9): 953 - 957.
[2] Ozaki T, Nagase T, Ichimiya S, *et al*. NFBD1/KIAA0170 is a novel nuclear transcriptional transactivator with BRCT domain[J]. DNA Cell Biol, 2000, 19(8): 475 - 485.
[3] Lou Z, Minter-Dykhouse K, Franco S, *et al*. MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals[J]. Mol Cell, 2006, 21(2): 187 - 200.
[4] Stewart G S, Wang B, Bignell C R, *et al*. MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint[J]. Nature, 2003, 421(6926): 961 - 966.
[5] Goldberg M, Stucki M, Falck J, *et al*. MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint[J]. Nature, 2003, 421(6926): 952 - 956.
[6] Lou Z, Minter-Dykhouse K, Wu X, *et al*. MDC1 is coupled to activated CHK2 in mammalian DNA damage response pathways[J]. Nature, 2003, 421(6926): 957 - 961.
[7] Coster G, Hayouka Z, Argaman L, *et al*. The DNA damage response mediator MDC1 directly interacts with the anaphase-promoting complex/cyclosome[J]. J Biol Chem, 2007, 282(44): 32053 - 32064.
[8] Rai R, Phadnis A, Haralkar S, *et al*. Differential regulation of centrosome integrity by DNA damage response proteins[J]. Cell Cycle, 2008, 7(14): 2225 - 2233.
[9] Eliezer Y, Argaman L, Rhie A, *et al*. The direct interaction between 53BP1 and MDC1 is required for the recruitment of 53BP1 to sites of damage[J]. J Biol Chem, 2009, 284(1): 426 - 435.
[10] Townsend K, Mason H, Blackford A N, *et al*. Mediator of DNA damage checkpoint 1 (MDC1) regulates mitotic progression[J]. J Biol Chem, 2009, 284(49): 33939 - 33948.
[11] 卜友泉, 杨正梅, 兰欢, 等. siRNA 介导的 NFBD1 表达沉默对 HeLa 细胞增殖与凋亡的影响[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, 24(10): 943 - 949.
[12] Bu Y, Suenaga Y, Ono S, *et al*. Sp1-mediated transcriptional regulation of NFBD1/MDC1 plays a critical role in DNA damage response pathway[J]. Genes Cells, 2008, 13(1): 53 - 66.
[13] 卜友泉, 宋方洲, 易发平, 等. 人 NFBD1 启动子的鉴定与初步分析[J]. 中国生物化学与分子生物学学报, 2007, 23(8): 631 - 637.
[14] 卜友泉, 宋方洲, 易发平, 等. 一个新的人 NFBD1 启动子的鉴定与分析[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(22): 2020 - 2024.
[15] Uchiumi T, Longo D L, Ferris D K. Cell cycle regulation of the human polo-like kinase (PLK) promoter[J]. J Biol Chem, 1997, 272(14): 9166 - 9174.
[16] Muller G A, Heissig F, Engeland K. Chimpanzee, orangutan, mouse, and human cell cycle promoters exempt CCAAT boxes and CHR elements from interspecies differences[J]. Mol Biol Evol, 2007, 24(3): 814 - 826.
[17] Badie C, Itzhaki J E, Sullivan M J, *et al*. Repression of CDK1 and other genes with CDE and CHR promoter elements during DNA damage-induced G(2)/M arrest in human cells[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(7): 2358 - 2366.
[18] Tanaka M, Ueda A, Kanamori H, *et al*. Cell-cycle-dependent regulation of human aurora A transcription is mediated by periodic repression of E4TF1[J]. J Biol Chem, 2002, 277(12): 10719 - 10726.
[19] Zhang J, Wang S, Kern S, *et al*. Nitric oxide down-regulates polo-like kinase 1 through a proximal promoter cell cycle gene homology region[J]. J Biol Chem, 2007, 282(2): 1003 - 1009.
[20] Haugwitz U, Wasner M, Wiedmann M, *et al*. A single cell cycle genes homology region (CHR) controls cell cycle-dependent transcription of the cdc25C phosphatase gene and is able to cooperate with E2F or Sp1/3 sites[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(9): 1967 - 1976.

（**收稿**:2010-01-06;**修回**:2010-01-22）
（编辑 汪勤俭）

（上接 1019 页）

A 颗粒增多,大小混杂,伴融合及覆盖细胞核现象;Auer 小体易见,有柴捆状改变;核畸形变显著,可见类三角形、花蕾样、龟甲状,分叶状胞核等形态变化;染色质变粗,核仁可见,部分不清晰。细胞化学染色 MPO 强阳性。

M3v 的异常早幼粒细胞细胞质大多数缺乏颗粒或颗粒稀疏细小,细胞质染色呈强弱不等嗜碱性染色。MPO 染色 M3v 与典型的 M3 相似,呈强阳性。颗粒稀少的中性粒细胞一般 MPO 阳性低或缺乏,但是白血病性早幼粒细胞的 MPO 却阳性强度极高,这一点可以帮助鉴别颗粒稀少的异型早幼粒细胞。

APL 中的 M3b 型和 M3v 型容易与 AML-M5 中的 M5b 型在骨髓形态学诊断上混淆不清,出现误诊。本组病例 1 和病例 2 即发生的此类错误。异形早幼粒细胞与原始幼稚单核细胞在形态学上有一定的相似性,但仔细观察,两者的特征差异也十分明显。单核细胞外形不规,但少见瘤状突起;细胞质内颗粒细小,分布均匀稀疏,无融合及覆盖细胞核现象;无柴捆状 Auer 小体出现;染色质细致如网;核畸形变明显,但多以折叠扭曲为主。另外,M5b 的 MPO 染色在强度和阳性率均弱于 M3。选用脂酶双染色有助于单核细胞和幼稚粒细胞的鉴别[2]。

胞体大颗粒粗多的原始粒细胞容易被误判为早幼粒细胞,进而将 AML-M2a 误诊为 APL。本组病例 3 即是。要避免这种错误的发生,一是要掌握早幼粒细胞可识别的形态学特征。二是可以借用 MDS 细胞形态学国际工作组(IWGM-MDS)对原始髓细胞的划分原则来区分原始粒细胞和早幼粒细胞[3,4],即不管原始细胞中颗粒的多少,只要没有高尔基器发育,均被认为是原始粒细胞。按照这一原则可以明确原始细胞和早幼粒细胞之间的界限,避免将 M2a 误诊为 APL。

参考文献：

[1] 许文荣,王建中. 临床血液学与检验[M]. 第 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2007: 260.
[2] 熊树民. 血液肿瘤骨髓诊断图谱[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2003: 22.
[3] Mufti G J, Bennett J M, Goasguen J, *et al*. Diagnosis and Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts[J]. Haematologica, 2008, 93(11): 1712 - 1717.
[4] 徐双年,陈洁平,刘建平,等. 三氧化二砷与全反式维甲酸治疗急性早幼粒细胞白血病疗效比较的系统评价[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(21): 2098 - 2102.

（**收稿**:2010-03-30;**修回**:2010-04-15）
（编辑 栾 嘉）