论著

文章编号:1000-5404(2014)07-0674-04

肺癌耐药相关基因 CA916798 核心启动子区域的初步鉴定

胡若兰,周向东 (400038 重庆,第三军医大学西南医院呼吸内科)

[摘要] **目的** 对肺癌耐药相关基因 CA916798 的核心启动子区域进行初步鉴定。**方法** 采用 PCR 方法对 CA916798 基因上游不同长度的序列片段 0H ~ 9H 进行扩增,以 pGL3-basic 载体构建基因报告质粒,转染 COS7 细胞,荧光素酶检测序列启动活性,酶切鉴定、测序及数据库比对确定核心启动子的可能存在位置,并采用生物信息学方法对核心启动子区域结合位点进行预测。**结果** 成功构建了启动子荧光素酶报告基因;活性实验表明;9H 组与阴性对照组比较,相对荧光强度差异具有统计学意义($P<0.05$);0H ~ 8H 各组与 9H 组比较,相对荧光强度差异均具有统计学意义($P<0.05$);9H 片段为处于 CA916798 基因片段上游 179 bp 处,长度为 568 bp 的序列区;功能预测显示该区存在多种细胞因子的结合位点。**结论** 9H 序列区域具有较强的启动活性,为基因 CA916798 的核心启动子序列区域。

[关键词] 肺癌耐药;CA916798;启动子
[中图法分类号] R394-33; 394.3; R734.2 [文献标志码] A

Preliminary identification of core promoter region of lung cancer drug resistance-related gene CA916798

Hu Ruolan, Zhou Xiangdong (Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To identify the core promoter region of lung cancer drug resistance-related gene CA916798 preliminarily. Methods The upstream sequence 0H to 9H containing different fragments of CA916798 were amplified by PCR, and then the products were cloned into pGL3-basic plasmid. Then the obtained plasmids were transfected into COS7 cells. Promoter activities were evaluated by luciferase test. The possible position of core promoter was identified by endonuclease digestion, sequencing and BLAST. The binding sites of core promoter region were predicted by bioinformatics. Results Target fragments were successfully cloned. The relative fluorescence intensity of group 9H was significantly higher than negative group ($P<0.05$). As compared with group 0H to 8H, the relative fluorescence intensity were also markedly increased in group 9H ($P<0.05$). 9H fragment was 568 bp, which located at 179 bp upstream of CA916798. The binding sites for several transcriptional factors were detected in the process of function prediction. Conclusion 9H fragment has a strong promoter activity, and the sequence is the major transcriptional locus of CA916798.

[**Key words**] lung cancer drug resistance; CA916798; promoter

Supported by the Starting Fund for Talents Returning from Overseas of Third Military Medical University (2009XHG09). Corresponding author: Zhou Xiangdong, E-mail: xiangdongzhou@126.com

多药耐药(multidrug resistance, MDR)是肿瘤细胞接触一种抗癌药物后导致对多种结构和作用机制不同的抗癌药物产生的耐受性。目前 MDR 已是导致临床肺癌化疗失败的主要原因之一。CA916798 基因为本课题组研究新发现的,与肺癌耐药相关的基因,前期研究已克隆了 CA916798 基因的全长 cDNA,并进行了测序检测[1],目前已上载到 GenBank EST 数据库中,并完成了 CA916798 基因参与 MDR 过程的一些相关研究[2-3]。然而,前期研究中并未涉及 CA916798 基因的转录调节机制以及参与耐药的作用机制,因而本研究着眼于定位 CA916798 基因的核心启动子区域,主要通过构建启动子荧光素酶报告基因重组体的方法,对 CA916798 基因的核心启动子区域进行定位,并通过预测软件对核心启动子区进行结合位点预测,为后续的机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

吸头,200 μL PCR 管(Axygen Scientific 公司),Marker 和质粒抽提试剂盒(北京天根公司),琼脂糖(Sigma),KOD-Plus 酶(日本 Toyobo 公司),引物(上海生工合成),限制性内切酶(美

[基金项目] 第三军医大学回国人员启动基金(2009XHG09)
[通信作者] 周向东,电话:(023)68754121,E-mail:Xiangdong Zhou@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140126.1051.008.html(2014-01-26)

国 NEB 公司),胎牛血清(美国 GIBCO 公司),DMEM 培养基(美国 HyClone 公司),0.25% 胰酶消化液(Sigma 公司),24 孔板(康宁公司),荧光素酶活性检测试剂盒(Sigma 公司),PCR 仪(美国 ABI 公司),低温离心机(美国 Sigma 公司),酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司)。

1.2 细胞培养

COS7 细胞从液氮罐中取出快速复苏,培养于 DMEM 培养基中,培养基中含有 100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素双抗,置于 5% CO_2、37 ℃恒温培养箱中培养,根据细胞的生长情况进行传代,调整好细胞状态备用。

1.3 PCR 扩增目的片段

以人肺腺癌细胞 A549 全 DNA 为模板,PCR 扩增目的基因上游 5 000 ~ 6 000 bp 范围内的全长序列片段 HRL,上游引物 5′-GGCGACATTGAGTTCTTTCCGAG-3′,下游引物 5′-GCCCTTT-CAAGAACCCTGGACAC-3′。然后引入 *Kpn* Ⅰ(GGGGTACC)和 *Bgl* Ⅱ(GAAGATCT)酶切位点,约合 500 bp 连续缩短得到各长度基因片段,其引物情况见表 1,总计分为 9 组:0H、1H、2H、3H、4H、5H、6H、7H、8H、9H。PCR 反应条件为:98 ℃预变性 5 min,98 ℃变性 30 s,68 ℃退火 180 s,72 ℃延伸 10 min,扩增完成后,50 μL 酶切产物加入上样孔中,5 V/cm 条件下进行电泳,1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 扩增产物。参照天根公司的普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行样品回收。

表 1 引物及序列

上游引物	序列(5′→3′)
0H-1	GGGGTACCGGCGACATTGAGTTCTTTCCGAG
1H	GGGGTACCCTAGAAAATCGTTGAGTTTG
2H	GGGGTACCATGTTATTAGCATTGTCACC
3H	GGGGTACCAACCTCCGCCTCCTGGGTTC
4H	GGGGTACCCAGGTAAGAACCCTTGCTCC
5H	GGGGTACCGCAGTGAGCCGAGATTGTGC
6H	GGGGTACCAAAACTCAGCAGTGGAAAAG
7H	GGGGTACCGGAGTATAGTGATGCGATCT
8H	GGGGTACCTTCCTCGCCTTGTCCAGTCT
9H	GGGGTACCGGTGAGGTCAGTGGGCCTAG
下游序列	
0H-2	GAAGATCTGCCCTTTCAAGAACCCTGGACAC

1.4 载体质粒构建

双酶切 pGL3-basic 载体和各片段回收产物,反应体系总计为 30.0 μL:目的片段溶液 15.0 μL,*Kpn* Ⅰ 1.0 μL,*Bgl* Ⅱ 1.0 μL,10 × Buffer 3.0 μL,H_2O 20.0 μL。16 ℃反应过夜连接,连接体系为 20 μL,条件为:PGL3-basic 5.0 μL,目的片段溶液 10.0 μL,T_4 DNA Ligase 1.0 μL,10 × Buffer 2.0 μL,H_2O 3.0 μL。构建完成质粒系统。

1.5 质粒回收和 DNA 测序

连接产物加入装有感受态细菌 DH5α(已在冰上解冻)的 EP 管中,冰浴 30 min,42 ℃水浴 90 s,冰浴 2 min;加入 800 μL LB 培养基,37 ℃,150 r/min 振荡培养 1 h;3 000 r/min 离心,弃上清后,吸取 100 μL 加到卡那抗性 LB 平板上,用 L 棒涂匀;平板放入 37 ℃恒温箱中培养过夜。挑取饱满的白斑扩菌,于氨苄抗性液体培养基中,37 ℃,150 r/min 震荡培养过夜。参照天根质粒抽提试剂盒进行质粒抽提回收。然后进行 DNA 测序分析,DNASTAR 软件对检测结果进行读取。

1.6 荧光素酶检测

将各组构建的质粒转染 COS7 细胞,分组:1H、2H、3H、4H、5H、6H、7H、8H、9H、阴性对照组(pGL3-basic/空)。同时设置空白孔用于扣除背景,每组设置 3 个复孔,转染时每孔 pGL3-basic 质粒和内参质粒 pRL/TK 的量之比为 10∶1,其中 pGL3-basic 质粒转染 500 ng,内参质粒 pRL/TK 转染 50 ng,脂质体 2000 用 1 μL。转染培养 48 h 后,根据荧光素酶活性检测试剂盒要求,酶标仪中检测荧光活性。

1.7 基因序列定位和功能预测

通过在 NCBI 数据库中对最终明确片段和 CA916798 基因片段分别进行 blast(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/),明确启动区和 CA916798 基因片段之间的位置关系。采用 TRANSFAC(http://www.gene-regulation.com)对定位的启动子区域序列进行潜在的转录因子结合位点的预测。

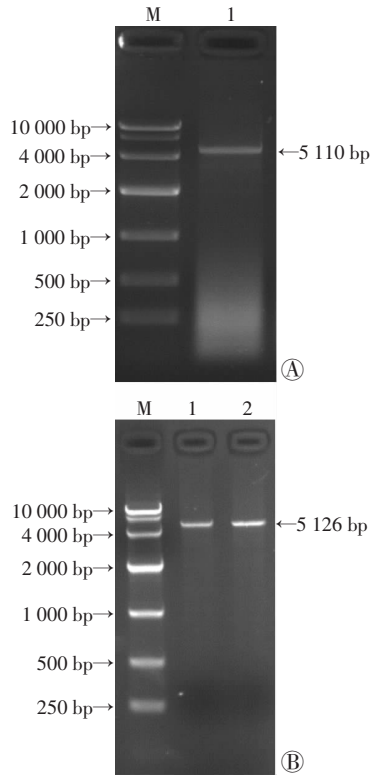
1.8 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;采用 IBM SPSS Statistics 21.0 统计软件进行数据分析;分析方法采用单因素方差分析,由于方差不齐,事后采用 Games-Howell 检验。

2 结果

2.1 上游全片段和 0H 片段 PCR 扩增结果

选取的检测目标区域为 CA916798 基因前端 5 658 bp 范围内的碱基序列,全长 HRL 总计长度为 5 110 bp。引入酶切位点的全长序列分别在头尾加了 8 个碱基,通过 PCR 后凝胶电泳结果,可以看到全长序列片段 HRL 和引入酶切位点的 0H 序列均成功扩增,见图 1。

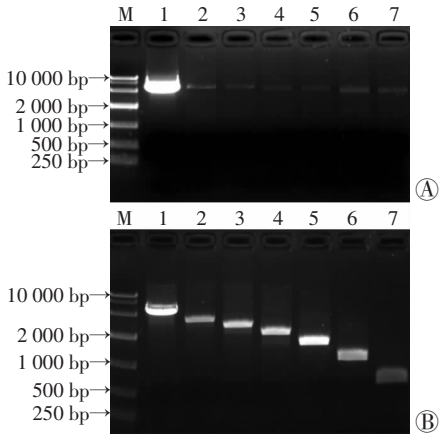


A:扩增的上游全片段;M:标准;1:全长 HRL;B:扩增的 0H 片段;M:标准;1、2:0H

图 1 全序列 PCR 扩增结果

2.2 各小片段扩增结果

PCR结果显示,1H~9H片段均能成功扩增,并且碱基数梯度降低的情况同预期缩短序列目的一致,见图2。

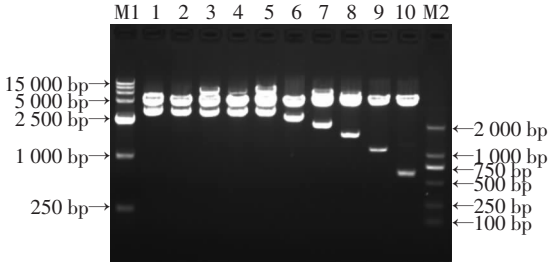


A:扩增的1H~3H片段;M:标准;1:pGL3-basic质粒;2、3:1H;4、5:2H;6、7:3H;B:扩增的4H~9H片段;M:标准;1:pGL3-basic质粒;2~7:分别为4H、5H、6H、7H、8H、9H

图2 各小片段PCR扩增结果

2.3 酶切鉴定结果

对回收的质粒进行酶切鉴定,见图3。结果显示各序列片段均被正确的构建到质粒中,并成功获得克隆。

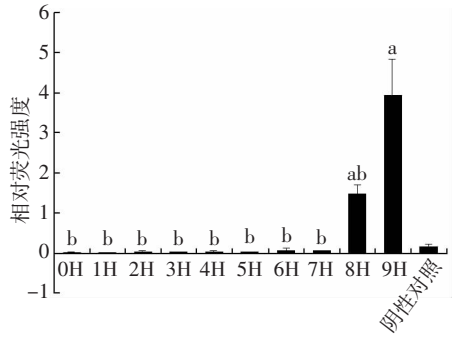


M1:标准;1~10:分别为0H、1H、2H、3H、4H、5H、6H、7H、8H、9H;M2:标准

图3 酶切鉴定结果

2.4 荧光素酶检测结果

荧光素酶检测结果显示,各片段的启动活性情况见图4,8H和9H区与阴性对照组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$);0H~8H各组与9H组比较,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。且9H区为启动活性最好的序列区,因此,9H即为核心启动子存在区域。

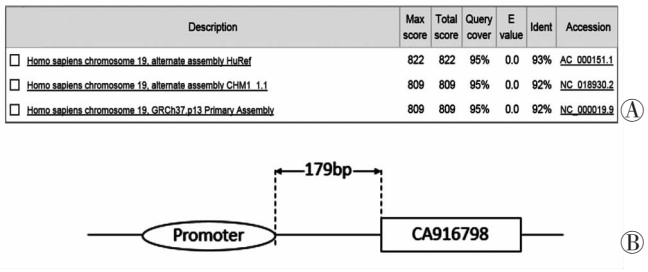


a:$P<0.05$,与阴性对照组比较;b:$P<0.05$,与9H组比较

图4 荧光素酶活性检测结果($n=3$)

2.5 定位和功能预测

采用DNASTAR软件打开9H序列区测序结果,通过在NCBI数据库中对9H片段和CA916798基因片段分别进行blast(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/),明确9H片段所处位置,9H比对结果见图5A。根据具体的比对结果,确定了核心启动子区位于CA916798基因片段上游179 bp处,长度为568 bp的序列区,如图5B所示。



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Homo sapiens chromosome 19, alternate assembly HuRef	822	822	95%	0.0	93%	AC_000151.1
Homo sapiens chromosome 19, alternate assembly CHM1_1.1	809	809	95%	0.0	92%	NC_018930.2
Homo sapiens chromosome 19, GRCh37.p13 Primary Assembly	809	809	95%	0.0	92%	NC_000019.9

Ⓐ

图5 9H片段比对结果(A)和启动子位置示意图(B)

通过TRANSFAC的AliBaba2.1、P-Match、Patch、MatrixCatch等在线软件的预测,表明9H序列区有潜在的与多种细胞因子结合的位点,如低氧诱导因子HIF-1、凋亡因子NIP、转录因子SP1以及NF-κB、c-Rel等。

3 讨论

本研究截取CA916798上游约合6 000 bp范围的基因序列作为研究区域,PCR技术扩增各长度的基因片段,并引入双酶切位点,构建质粒载体系统。实验中通过凝胶电泳证实了截断基因片段的反转录和质粒构建的准确性,转染COS7细胞进行荧光素酶活性检测,明确了9H序列区具有最好的启动活性,即确定为CA916798基因的核心启动子存在区域。另外,从结果中可以看到,随着序列的延长,启动能力表现出下降的现象,这在其他基因启动子检测的研究中也有类似的结果,说明在核心启动子上游不同区段可能存在各种调控元件,共同作用于目的基因的转录表达[4]。测序结果显示在9H片段中,可能存在TATA盒和GC盒类结构,说明其与反式作用因子具有潜在的结合能力[5-6]。在对序列进行潜在结合位点的预测的研究中发现并印证了前述想法,一些与低氧、肿瘤、炎症等相关过程的因子可能与9H区域之间存在结合位点。

目前尽管对肺癌的化学治疗取得了一定进展,但过去25年其5年生存率仍未见显著提高,约为15%[7]。化疗是肺癌治疗的主要手段之一,肺癌细胞对化疗的耐受是肺癌患者低生存率的主要原因之一。可见,肺癌耐药机制的研究,对临床实践具有积极的意义。CA916798基因为本课题组新发现的肺癌耐药相关基因,研究已经证实CA916798对肺癌的多药耐药具有重要作用[8]。既往研究还显示在A549细胞中CA916798可能会受到PI3K/AKT-mTOR通路的调控

影响[9]，这条通路同时也会参与调节细胞的生长、增殖和存活等生命过程。同时，癌症在发生和发展的过程中，往往也伴随着局部低氧和炎症反应等，而 PI3K/AKT 也参与到细胞氧化水平变化[10]和炎症反应[11]等过程。本研究定位的启动子核心区域，功能预测显示也具有潜在参与类似过程的作用元件。前述证据信息均对本次启动子核心区的鉴定结果起到了证据支持的作用，说明本实验研究方法的适用性和结果的合理性。

综上，本研究结合 PCR 方法、质粒转染克隆以及荧光素酶检测等方法，对肺癌耐药相关基因 CA916798 的核心启动子序列进行定位，并对核心启动子区进行了功能预测研究，为后续调控机制的研究奠定了基础。

参考文献：

[1] 周向东，刘凌志，钱桂生，等. 一条新的人肺腺癌耐药相关基因全长 cDNA 片段的克隆及序列分析[J]. 癌症，2002，21(4)：341－345.

[2] 王海晶，杨和平，周向东. MDR 相关新基因 CA916798 真核表达载体的构建及其对 H446 细胞增殖的影响[J]. 第三军医大学学报，2007，29(24)：2315－2318.

[3] 王海晶，杨和平，周向东. RNA 干扰 CA916798 基因真核表达载体的构建与鉴定[J]. 第三军医大学学报，2008，30(1)：23－26.

[4] 杨丽霞，黄朝峰. RORγt 基因启动子的鉴定和特征分析[J]. 免疫学杂志，2013，29(1)：28－32.

[5] Marshall L J, Moore L D, Mirsky M M, *et al*. JC virus promoter/enhancers contain TATA box-associated Spi-B-binding sites that support early viral gene expression in primary astrocytes[J]. J Gen Virol, 2012, 93(Pt 3): 651－661.

[6] Deng G F, Qin J M, Sun X S, *et al*. Promoter analysis of mouse Scn3a gene and regulation of the promoter activity by GC box and CpG methylation[J]. J Mol Neurosci, 2011, 44(2): 115－121.

[7] McWilliams A, Lam B, Sutedja T. Early proximal lung cancer diagnosis and treatment[J]. Eur Respir J, 2009, 33(3): 656－665.

[8] Wang H J, Yang H P, Zhou X D, *et al*. CA916798 regulates multidrug resistance of lung cancer cells[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2011, 12(12): 3403－3408.

[9] Wang Y L, Zhu B J, Qi Z Z, *et al*. Akt1 enhances CA916798 expression through mTOR pathway[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e62327.

[10] Qi H, Han Y, Rong J. Potential roles of PI3K/Akt and Nrf2-Keap1 pathways in regulating hormesis of Z-ligustilide in PC12 cells against oxygen and glucose deprivation[J]. Neuropharmacology, 2012, 62(4): 1659－1670.

[11] Kim B H, Cho J Y. Anti-inflammatory effect of honokiol is mediated by PI3K/Akt pathway suppression[J]. Acta Pharmacol Sin, 2008, 29(1): 113－122.

（收稿：2013-10-21；修回：2014-01-14）

（编辑 邓强庭）

（上接 673 页）

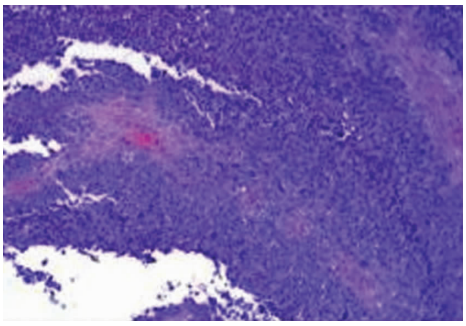


图 2 筛窦原发性黑色素瘤组织病理学观察 （HE×40）

2 讨论

单侧鼻塞、肿块和鼻衄是鼻腔鼻窦黏膜黑色素瘤最为常见的临床表现，但这些症状非特异性，往往难以和鼻息肉、鼻窦炎及其他常见肿瘤相鉴别，尤其是肿瘤未着色时。发生于鼻窦者因位置深在，临床症状出现较晚，并且鼻内镜检查往往显示不佳，直至出现剧烈疼痛甚至面部变形时方就诊，此时肿瘤多已侵犯多个鼻窦，且有颅内转移可能，预后差。因而对鼻腔鼻窦黏膜黑色素瘤的早期、准确诊断显得尤为重要。

鼻腔鼻窦黏膜黑色素瘤含有顺磁性的黑色素，在磁共振成像中特征性的表现为 T_1WI 高信号及 T_2WI 低信号[3]，而鼻窦其他恶性肿瘤及炎性病变在 T_1WI 多表现为等或偏低信号，在 T_2WI 多表现为不同程度的高信号，因而可以进行有效的诊断及鉴别。但在某些病例中，出血以及其他类黑色素物质使得鉴别诊断较为困难。另外，无色素或含微量黑色素者在磁共振成像中并无典型的信号改变，可能表现为其他更为常见的病变。本例磁共振表现即不典型，难以定性。此时，需结合免疫组织化学染色，临床上常用一组抗体诊断，包括 S-100、EMA、HMB-45、CK、Desmin、NSE 等。大多数肿瘤细胞 S-100、HMB-45、波形蛋白、Ki-67 和 p53 呈阳性表达，CK、CD45、CD68 呈阴性表达[4]。本例免疫组化 EMA(＋)，S-100(＋)，Ki-67(＋60%)，CD(－)，CK(－)，支持黑色素瘤的诊断。

鼻腔鼻窦黏膜黑色素瘤临床少见，确诊需依靠组织病理学，但 MRI 可清晰显示肿瘤的部位、范围及信号特征，了解其对重要结构的侵犯，可进一步提高诊断的准确率，辅助确定治疗方案和判断预后。

参考文献：

[1] Ziolkowska M, Bien S, Klimas A, *et al*. The epidemiology and clinical characteristics of malignant melanoma localized in nasal cavity and paranasal sinuses—analysis of 6 cases[J]. Otolaryngol Pol, 2008, 62(4): 500－503.

[2] Dwivedi R, Dwivedi R, Kazi R, *et al*. Mucosal melanoma of nasal cavity and paranasal sinus[J]. J Cancer Res Ther, 2008, 4(4): 200－202.

[3] Xu Q G, Fu L P, Wang Z C, *et al*. Characteristic findings of malignant melanoma in the sinonasal cavity on magnetic resonance imaging[J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125(20): 3687－3691.

[4] 庄严阵，张志阳，廖永强. 食管原发性恶性黑色素瘤一例[J]. 中华病理学杂志，2009，38(1)：60－61.

（收稿：2013-12-12；修回：2014-01-10）

（编辑 张 维）