

人ACER2基因启动子的鉴定与初步分析

刘竹^{1,2} 艾青^{1,2} 兰欢^{1,2} 吉颖^{1,2} 杨正梅² 何江宜² 郝晓璐² 宋方洲^{1,2} 卜友泉^{1,2*}

¹重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室, 重庆 400016;

²重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016)

摘要 碱性神经酰胺酶2(alkaline ceramidase 2, ACER2)是一个参与脂质类信号分子神经酰胺代谢的酶分子, 在细胞增殖、衰老和凋亡等过程中起重要作用。为了进一步研究ACER2基因的转录调控机制, 该研究克隆鉴定了ACER2基因的启动子。首先, 应用5'RACE(rapid amplification of cDNA ends, cDNA末端快速扩增)技术鉴定了ACER2基因的转录起始位点。然后, 通过PCR定向克隆和定点突变策略, 构建了三个长度不同的覆盖ACER2基因5'端侧翼区起始密码子ATG上游约1.3 Kb区域的一系列ACER2基因启动子荧光素酶报告基因重组体。启动子活性分析表明, ACER2基因启动子定位于转录起始位点附近约670 bp的区域内。转录因子结合位点分析结果表明, ACER2基因启动子含有Sp1、GATA-1和AP-1等潜在的转录因子结合位点, 提示Sp1和GATA-1等转录因子可能参与ACER2基因的转录调控。

关键词 碱性神经酰胺酶2; 神经酰胺; 启动子; 转录调控

神经酰胺是一种重要的脂质类信号分子, 在细胞增殖、生长、迁移、分化、衰老和凋亡等众多生物学过程中起着重要作用。当细胞受到紫外线照射、热击、化疗药物等各种外界条件刺激后, 内源性的神经酰胺合成增加, 进而诱导细胞衰老、生长抑制、细胞凋亡等一系列生物学过程。神经酰胺在细胞内还可以经不同的酶催化而进一步转变为神经鞘氨醇和1-磷酸鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate, S1P)等活性代谢物^[1,2]。

神经酰胺酶能够水解神经酰胺产生脂肪酸和神经鞘氨醇, 后者接着被神经鞘氨醇激酶磷酸化产生S1P^[1,2]。迄今为止, 已经发现有5种不同的人神经酰胺酶, 包括酸性神经酰胺酶(acid ceramidase, AC, 或称ASA1)、中性神经酰胺酶(neutral ceramidase, NC, 或称ASA2)、碱性神经酰胺酶1(alkaline ceramidase 1, ACER1, 或称ASA3)、碱性神经酰胺酶2(ACER2, 或称ASA3L)和碱性神经酰胺酶3(ACER3, 或称PHCA)^[1]。

在这5种神经酰胺酶中, ACER2引起了我们课题组的关注。ACER2基因定位于人类染色体9p22.1, 编码蛋白含275个氨基酸残基, 分子量约31.3 kDa, 其蛋白质亚细胞定位于高尔基体^[3]。已有研究结果表明, ACER2在除胎盘之外的多种正常组织中呈现低水平广泛表达, 外界应激因素如血清饥饿处理可

导致其表达水平显著上调; 基因芯片数据也提示其在肝癌组织中表达水平呈现上调^[3-7]。因此, 研究并阐明ACER2基因的表达调控机制具有重要的生物学意义。然而, 目前关于ACER2调控机制的研究仍鲜有报道, 其启动子区域仍不清楚。本研究即利用5'RACE(rapid amplification of cDNA ends, cDNA末端快速扩增)确定了ACER2的转录起始位点, 对其启动子区域进行了克隆鉴定并对其功能进行了初步分析, 为深入研究其调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人胚肾细胞系HEK293和人宫颈癌细胞系HeLa均为本实验室保存, 均采用DMEM培养基培养, 培养基均添加10%FBS和青霉素(100 U/ml)/链霉素(100 µg/ml), 培养于5%CO₂培养箱。人血液基因组DNA和人正常组织总RNA购自Ambion公司。培养基、胎牛血清和Lipofectamine 2000试剂购自Invitrogen公司; BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit

收稿日期: 2010-12-07 接受日期: 2011-02-09

国家自然科学基金(No.30801356, No.81001097)、重庆市科委自然科学基金(No.2010BB5357)和重庆市教委科学技术研究(No.KJ090305)资助项目

*通讯作者。Tel: 023-68485096, E-mail: buyqen@yahoo.com.cn

购自Clontech公司; pTA2载体和各种限制性内切酶购自TOYOBO公司; DNA连接试剂盒和高保真酶购自TaKaRa公司; pGL3-basic vector和Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System购自Promega公司; 质粒纯化试剂盒购自OMEGA公司; PCR产物纯化回收试剂盒和琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒购自TIANGEN公司; KOD-Plus-Mutagenesis Kit购自TOYOBO公司。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 从GenBank数据库获取ACER2的cDNA和基因组序列, 用在线BLAST程序进行序列比对, 得出ACER2基因外显子和内含子的构成。提取ACER2基因起始密码子5'上游约5 000 bp的序列, 用启动子分析软件, 预测启动子区域。用TFsearch等软件对启动子区域进行转录因子结合位点分析, 寻找潜在的转录因子结合位点。采用DNA-MAN软件进行简单的序列比对和限制性酶切位点等序列分析。

1.2.2 转录起始位点的鉴定 人正常睾丸组织总RNA购自Ambion公司, 利用紫外分光光度计定量并计算 D_{260}/D_{280} 比值, 用琼脂糖凝胶电泳检测其质量以确保RNA的完整性。根据已知ACER2 mRNA序列采用Primer Premier 5.0软件设计了两条用于5'-RACE的基因特异性引物(gene-special primer, GSP)。引物序列分别为: 5'-TGC TGA TCG TGT TGT AGA ACT CGG CG-3', GSP1(325); 5'-CAC TGA CCA CCA CCT TGA ACC TAC CC-3', GSP2(601), GSP1和GSP2的核苷酸序列均位于ACER2基因的编码区, 且分别位于第二外显子和第四外显子区域。采用5'RACE方法确定ACER2转录起始位点的位置, 实验方法参照Clontech公司的BD SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit说明书和作者的前期文献进行^[8-10]。用1%琼脂糖凝胶纯化回收5'RACE扩增产物, 与pTA2

载体连接, 用DH5 α 制备感受态进行转化。随机挑取多个克隆过夜培养后用质粒小抽试剂盒提取质粒DNA, 初步筛选为阳性克隆后进行测序, 用ABI 3710 DNA测序仪双脱氧法全自动测序。

1.2.3 启动子报告基因重组体的构建 首先, 采用Primer Premier 5.0软件设计一对携带Sac I/Nhe I限制性酶切位点的引物(序列见表1), 以正常人血基因组DNA为模板, 采用高保真PCR扩增ACER2基因转录起始位点上游区域, 预计片段大小为1 285 bp, 将扩增产物经Sac I/Nhe I双酶切后定向克隆入pGL3-basic载体, 以构建含ACER2基因5'调控序列和荧光素酶报告基因的重组质粒, 重组体经酶切和测序鉴定确认, 根据其长度命名为P1285(-470/+815)。然后, 再以上述构建成功的P1285(-470/+815)重组体作为模板, 采用基因定点突变技术构建两个5'端缩短的删除体。定点突变引物参见表1, 使用TOYOBO公司的KOD-Plus-Mutagenesis Kit试剂盒, 具体方法参照试剂盒说明书, 略有改动。构建的删除体均采用酶切和测序方法鉴定确认, 确认构建成功后分别被命名为P800(+15/+815)和P676(+140/+815)。

1.2.4 瞬时转染 质粒瞬时转染采用Lipofectamine 2000试剂进行, 方法参照试剂使用说明书。转染前1 d, 将细胞以 1×10^5 /孔接种至12孔培养板, 细胞生长密度至80%时进行转染。每组设置3个重复孔, 同时共转染入10 ng pRL-TK质粒(包含海肾荧光素酶基因), 作为内参对照。

1.2.5 荧光素酶报告基因活性检测 转染48 h后, 采用Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System进行荧光素酶报告基因活性检测, 方法参照试剂使用说明书。细胞先用 $1 \times$ PBS洗2次, 加入250 μ l $1 \times$ 细胞裂解液, 室温120 r/min摇15 min, 然后, 收集细胞裂解液, 离心去除细胞碎片。荧光素酶活性采用化学发光检

表1 ACER2启动子报告基因重组体构建引物序列

Table 1 The primer sequences for ACER2 promoter reporter construction

重组质粒名称 Constructs	引物序列 Primer sequences	酶切位点 Restriction site
P1285(-470/+815)	F(1613): 5'-ACC GAG CTC ACT TCT CTG GTG TAA GCA CTG GC-3' R(2897): 5'-CTA GCT AGC AAA GCA CAG TCC TGG GGG AGT TG-3'	Sac I site Nhe I site
P800(+15/+815)	F(2097): 5'-CCG CAG CAG CTC TGG GCT CTT CTC A-3' pGL3b-mutationR: 5'-GGT ACC TAT CGA TAG AGA AAT GTT CTG GC-3'	
P676(+140/+815)	F(2222): 5'-GAC AAC TAC ACC ATC GTG CCT GCT A-3' pGL3b-mutationR: 5'-GGT ACC TAT CGA TAG AGA AAT GTT CTG GC-3'	

测仪GloMax-20/20检测,取细胞裂解液上清20 μ l加入荧光素酶检测试剂II(LARII)100 μ l,检测萤火虫荧光素酶活性,并继续加入Stop&Glo[®]试剂,将上述反应猝灭,同时启动海肾荧光素酶反应,检测海肾荧光素酶活性。

2 结果

2.1 ACER2的基因结构

以GenBank数据库中的已报道的ACER2基因的cDNA序列和EST序列为基础,与相应的人基因组序列进行比对分析。结果表明,ACER2基因位于人第9号染色体,有6个外显子和5个内含子组成(图1),翻译起始密码子位于第1个外显子,终止密码子位于第6个外显子。所有内含子都以GT开始,以AG结束,遵守GT/AG剪接规律。



图1 人ACER2基因结构示意图

人ACER2基因的结构系根据已报道的ACER2的cDNA序列以及人类基因组参考序列采用生物信息学分析预测得到。外显子与内含子分别用实心方框与线条表示。转录起始密码子ATG以及终止密码子均以箭头指示。

Fig.1 Schematic representation of human ACER2 gene structure

The genomic organization of human ACER2 gene was predicted based on the reported ACER2 cDNA sequence and human genomic reference sequence by bioinformatic analysis. Exons and introns are indicated by filled boxes and thin lines, respectively. The translation start codon, ATG, and translation stop codon are indicated by arrows.

2.2 ACER2基因的转录起始位点鉴定

采用5'RACE技术,成功鉴定了ACER2基因的转录起始位点。为了获取完整的ACER2 5'端非翻译区序列并避免PCR扩增时基因组DNA的潜在污染,共设计了两条GSP引物,均位于编码区,且分别对应于ACER2基因的第2和第4外显子区域(图2)。首轮PCR采用GSP2引物和接头引物(adaptor primer, AP)以正常睾丸组织制备的5'-RACE cDNA为模板进行扩增,琼脂糖凝胶电泳检测均没有发现明显PCR扩增条带出现,仅有引物二聚体。将首轮扩增产物进行稀释后作为模板,采用内侧GSP1引物和巢式通用

引物(nested universal primer, NUP)进行巢式扩增,琼脂糖凝胶电泳检测发现可以从睾丸组织扩增到明显的PCR产物,共两个扩增条带(图2)。

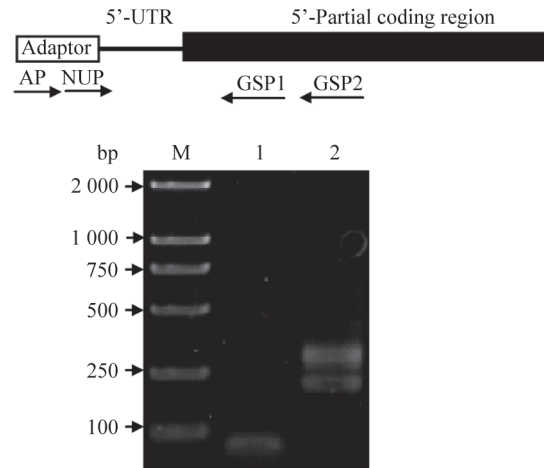


图2 5'-RACE分析ACER2基因转录起始位点

上图为用于RACE分析的引物设计示意图。仅显示了ACER2基因的部分编码区域。下图所示为RACE产物的1.0%琼脂糖凝胶电泳图。RACE分析人睾丸组织总RNA为模板进行,具体见“材料与方法”部分的描述。分别以AP/GSP2和NUP/GSP1引物进行首轮(泳道1)和巢式PCR扩增(泳道2)。分子量标准为DL2 000为(泳道M)。PCR产物被克隆并连接在pTA2载体并进行测序。

Fig.2 5'-RACE analysis of the transcription start site of the ACER2 gene

Upper panel shows a schematic representation of the primer design for RACE assays. Only partial of the coding region of ACER2 is shown. Lower panel shows the analysis of RACE products on 1.0% agarose gel. RACE assay was conducted on human testis total RNA as described in Experimental Procedures, and PCR-based amplifications were performed by using AP/GSP2 and NUP/GSP1 for primary (Lane 1) and nested PCR (Lane 2), respectively. DL2 000 was used as molecular markers (Lane M). PCR product was cloned into pTA2 vector and sequenced subsequently.

将正常睾丸组织扩增获得的RACE产物进行纯化回收和克隆测序,结果表明,PCR扩增产物中一条带为非特异性扩增,另外一条带为特异性扩增,长度约为222 bp(包括30 bp的NUP引物序列)。经进一步的序列比对分析,发现ACER2基因的转录起始位点位于起始密码子ATG的上游76 bp处,其首个碱基为鸟嘌呤G,即为ACER2基因的转录起始位点,设定为+1(图3)。

2.3 ACER2基因启动子报告基因重组体的构建

对ACER2基因转录起始位点附近的序列进行

启动子预测和CpG岛预测等分析表明, 在起始密码子ATG上游存在多个可能的启动子区域和一个潜在的CpG岛(图3和图4)。根据上述结果, 首先采用

```

-482 gggactgagg gcaattctct ggtgtaagca ctggcgctcca acgccggagc
-432 cagcaaaatc gctgcaaac ctgggtccag agaggtccag gtctcccgg
-382 gtttcttttt attttaaatt tttttccagg gagagtctg gcgctccttc

-332 aatcggggga ggctgagct ctgagccagg agatggcgct ggcagggcgt
      GATA-1
-282 gggtagcacc atcgaggccc tggccacctg ccgggtgctg ggtagtctgg
-232 aagagtctgg agccoggtct ccgctccag gcgccccacc ctggaccctc
-182 cctccacgcg ggtcccgcgc caccgtgggc gtggcttcca gggggagggg

-132 ccggggaggg tctgcaaac agtaacctcc cgcagggcag gcgagggggg
      Sp1

      c-Ets
-82 gcgagagcgc ggagccagt tgggagggc acatccggcg gttaccgggt
-32 gcttcataaa gccgcttttc ccgctggctg tcGCCGCTT TTGCCTCCGC
+19 AGCAGCTCTG GGCTCTTCTC AGCTGCGCGA GCAGCTGCTC CAATGCCCCG
+69 GAGTGGCCAT GGGCGCCCC CACTGGTGGG ACCAGCTGCA GGCTGGTAGC

      GATA-1 GATA-2
+119 TCGGAGGTGG ACTGGTGC GAACAACCTAC ACCATCGTGC CTGCTATCGC
+169 CGAGTCTTAC AACACGgtgc ggggcccggg agcggggaag gcagggcggg
+219 cagcgggagg gggctgttcc cgcgccgac cgtctggaag ctggacgtgg

      AP-1
+269 gtctctgcgc gcatctgggg gcattctctc caggggctga gtcagtccac
+319 acccctctct cgccgctctc ctttcagttc tccatctgtc ctctctctct
+369 gtccccatc ccgacagctg ggctcactct cctctctgctg tcatttggtt
+419 tgtgatggtc ctattgtctt gtttggcccc caccgctcca ggaaccaggg

      AP-1 AP-4
+469 gctctgtgca gccattctc cttgtttggg tcagctgggg gcggtgaacc
+519 tgccgggaca agtctcttc tcccctggga tctctgtggc gtagcgcact
+569 tgggtcgcac tgtgttttt tgccctgaat acctgctctc ggagtgtgg

      MZF1
+619 gaagagcacg cccccgcag gtccccgcgg ctggggtcac tcccaccagg
+669 cagacttgcc ccacccccaa gaacatgcct ataatggctg agttattttt
+719 ggtcagaatc aagttaatta ctactgtttt tttttcttg ccttttagtgt
+769 cctgtcttgt gcaagccgct aattcaactc ccccaggact gtgctttctc
  
```

图3 ACER2启动子区的核苷酸序列

潜在的转录因子结合位点的核苷酸序列采用下划线标注。下划线标明的黑体字母为ACER2转录起始位点(+1)。外显子序列以大写字母表示, 内含子序列以小写字母表示, ATG为起始密码子。

Fig.3 Nucleotide sequences of the promoter region of ACER2 gene

The nucleotide sequences of putative transcription factor binding sites are underlined. The underlined bold letter (+1) indicates the transcription initiation site of ACER2 gene. Exon sequences are shown in capital letters, intron sequences are in lowercase letters, ATG indicates start codon.

PCR和酶切定向克隆的方法构建了包含ACER2基因转录起始位点附近1 285 bp区域序列的荧光素酶报告基因重组体, 即P1285(-470/+815)。然后在此基础上, 以P1285(-470/+815)为模板, 进一步采用基因定点突变技术构建了两个5'端缩短的长度分别为800 bp和676 bp的删除体, 分别命名为P800(+15/+815)和P676(+140/+815)(图4)。PCR扩增产物见图5。重组质粒酶切鉴定结果见图6。所有克隆均经测序确认正确无误。

2.4 ACER2基因启动子活性分析

将上述构建的三个ACER2基因启动子报告基因重组质粒分别转染H1299和HEK293细胞, 同时, 共转染内参pRL-TK质粒。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pGL3-basic载体相比(无启动子对照), 上述构建的3个

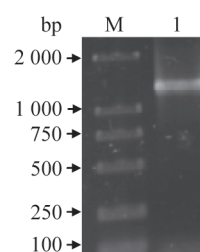


图5 ACER2基因5'-侧翼区的PCR扩增

人ACER2基因5'-侧翼区采用F1613/R2897引物扩增。PCR产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳(1)。分子量标准为DL2 000(M)。

Fig.5 PCR amplification of ACER2 gene 5'-flanking region PCR was performed to amplify the 5'-flanking region of huamn ACER2 gene by using the F1613 and R2897(lane 1). PCR product was separated on 1.0% agarose gel. DL2 000 DNA ladder was used as molecular markers (lane M).

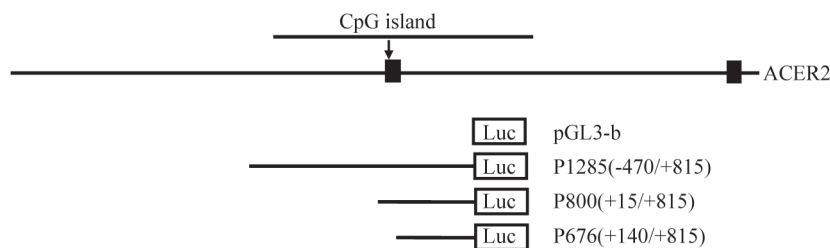


图4 ACER2启动子报告基因重组体示意图

ACER2转录起始位点用箭头指示。CpG岛的位置也在图中标明。重组体以“P片段长度(起始位置/结束位点)”的方式命名。

Fig.4 Schematic diagram of the ACER2 gene promoter reporter constructs

The arrow indicates the ACER2 transcription start site. The positions of the putative CpG islands are also shown. The constructs are named as P length(start position/ end position).

*ACER2*基因启动子报告基因重组质粒P1285(-470/+815)及其相应缩短的删除体P800(+15/+815)和P676(+140/+815)在H1299和HEK293两种细胞系中均具有较高的启动子活性,其中,在HEK293细胞中的活性明显高于H1299细胞系(图7)。3个重组体中,以P1285(-470/+815)的活性为高,而P800(+15/+815)和P676(+140/+815)的活性相对较低。其中,最短的P676(+140/+815)重组体仍具有很高的启动子活性,表明*ACER2*基因的核心启动子区域很可能位于该重组体对应的基因组区域。

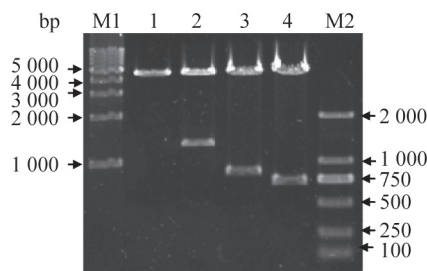


图6 *ACER2*启动子重组质粒酶切鉴定

P1285(-470/+815) (2)、P800(+15/+815) (3)和P676(+140/+815) (4)采用*Sac I/Nhe I*双酶切, pGL3-basic为阴性对照(1)。分子量标准为1 Kb ladder (M1)和DL2 000 (M2)。

Fig.6 Identification of the *ACER2* promoter reporter constructs

Recombinant plasmids were prepared and digested with *SacI/NheI* for P1285(-470/+815) (lane 2), P800(+15/+815) (lane 3), and P676(+140/+815) (lane 4). *Sac I/Nhe I*-digested pGL3-basic vector was used as a negative control (lane 1). 1 Kb ladder (lane M1) and DL2 000 (lane M2) were used as molecular markers.

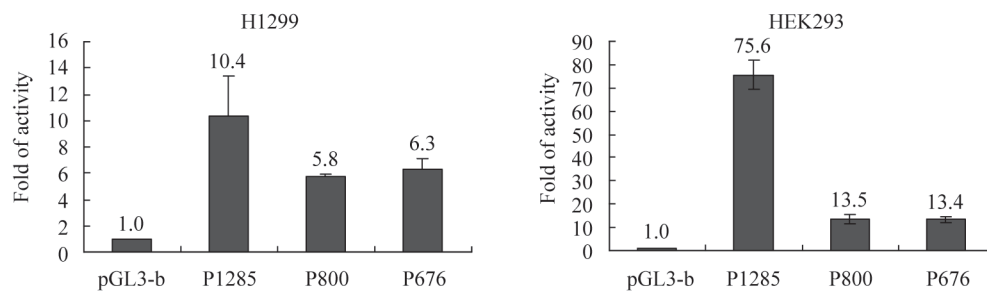


图7 *ACER2*基因启动子报告基因重组体活性分析

各报告基因重组体与pRL-TK瞬时转染入H1299与HEK293细胞系,每组3个重复。荧光素酶活性检测参见“材料与方法”部分。启动子活性表示为各重组体与pGL3-basic的倍数比。结果显示为三个重复实验的平均值与标准差。

Fig.7 Luciferase assay of the *ACER2* promoter reporter constructs

H1299 and HEK293 cells were transiently co-transfected in triplicate in 12-well plates with the indicated luciferase reporter constructs together with the Renilla luciferase reporter plasmid (pRL-TK). The luciferase activities were measured by as described in Materials and Methods. Promoter activities are shown as fold induction compared to the activity of cells transfected with the pGL3-basic vector. The results are presented as the mean±S.D. of triplicates from a representative experiment.

3 讨论

神经酰胺是一种参与细胞增殖、凋亡等多种生物学过程的重要脂质类信号分子,细胞内神经酰胺的水平受多种因素调节,研究并阐明其调节机制不仅具有重要理论意义,而且具有潜在应用价值。*ACER2*基因是近年来克隆的一个新的神经酰胺酶,其研究报道相对较少。

Xu等^[3]最早对*ACER2*基因进行克隆鉴定和初步的功能分析,认为*ACER2*通过水解神经酰胺而调节神经鞘氨醇和S1P的水平,进而参与细胞增殖的调节。研究结果表明,高水平的*ACER2*外源性表达可以导致神经鞘氨醇的积聚而诱发细胞生长停滞,而低水平的*ACER2*外源性表达可以导致S1P水平的升高并促进无血清培养基中的细胞增殖; siRNA介导的*ACER2*表达下调则明显增强血清饥饿引起的生长阻滞和凋亡,血清饥饿又可上调*ACER2*的mRNA水平和酶活性。此外还发现*ACER2*在肝癌和结肠癌中的表达水平上调,这与Graveel等^[4]较早的研究结果一致。最近, Mao等^[7]还发现, *ACER2*的表达上调可介导4-羟苯基维甲酰胺(N-[4-hydroxyphenyl]retinamide, 4-HPR)药物的抗肿瘤作用。4-HPR处理可引起*ACER2*的表达上调; *ACER2*过表达可增强4-HPR引发肿瘤细胞死亡的效果,而干扰*ACER2*表达则减弱4-HPR的抗肿瘤效应。这些结果强烈提示, *ACER2*的表达变化在细胞增殖、凋亡和肿瘤发生等生物学过程中具有重要作用。

然而, *ACER2*基因表达调控的详细分子机制仍

不清楚, 其启动子区域仍不清楚。鉴于此, 我们对ACER2基因的转录起始位点及其启动子区域进行了鉴定与初步分析。启动子活性分析表明, ACER2基因启动子区域定位于转录起始位点附近约676 bp的区域内。转录因子结合位点分析表明, ACER2启动子区域含有多个潜在的Sp1、GATA-1、AP-1等转录因子结合位点^[10,11]。目前, 已有研究结果表明, Sp1参与细胞增殖、细胞凋亡以及癌变过程的基因表达调控, 在大量细胞增殖、凋亡和肿瘤相关基因的启动子区域均发现有典型的Sp1结合位点^[10-12]。譬如我们课题组最近就发现Sp1参与NFBD1基因的表达调控, 凝胶阻滞迁移率分析和染色质免疫共沉淀分析也证实Sp1确实和NFBD1基因启动子区域结合; 对Sp1结合位点进行定点突变后, 则导致相应启动子活性显著降低; 进一步采用RNA干扰技术抑制细胞内源Sp1表达后, 则导致NFBD1靶基因表达水平显著降低, 并显著提高化疗药物对细胞的生长抑制和促凋亡作用^[10]。此外, 不少研究结果也表明, 转录因子GATA-1和AP-1也同样参与细胞增殖、细胞凋亡以及癌变过程的基因表达调控^[13,14]。启动子活性分析结果也表明, P1285(-470/+815)的活性明显高于P800(+15/+815)和P676(+140/+815)的活性, 说明-470 bp~+15 bp区域内含有重要的激活性转录因子结合位点。而该区域中恰恰含有Sp1和GATA-1等转录因子的结合位点, 再次提示Sp1和GATA-1可能在ACER2基因的转录调控中具有重要作用。因此, 在下一步的研究工作中, 很有必要通过凝胶阻滞迁移率分析、染色质免疫共沉淀和RNA干扰等实验确认上述转录因子在ACER2基因转录调控以及其在细胞增殖、细胞凋亡以及肿瘤发生发展中的作用。

值得注意的是, 我们还发现, ACER2基因启动子区域含有一个典型CpG岛区, 这就提示ACER2基因的表达调控可能还涉及表观遗传修饰如甲基化修饰的调节。启动子区CpG岛的甲基化修饰在肿瘤相关基因表达调控中的作用已得到广泛的研究和认可^[15,16]。因此, ACER2基因启动子区的CpG岛在细胞增殖、细胞凋亡和肿瘤发生发展过程中是否受到甲基化修饰的调控, 非常值得进一步深入研究。

总之, 本研究首次鉴定了ACER2基因的转录起始位点和启动子区域, 这对进一步详细研究ACER2基因的核心启动子、调控区中的各种顺式作用元件和与之发生相互作用的反式作用因子, 及阐明

ACER2基因的表达调控机制奠定了坚实的基础。

参考文献(References)

- 1 Mao C, Obeid LM. Ceramidases: Regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1781(9): 424-34.
- 2 孙天玮, 徐 婷, 董 蕾, 刘仁萍, 吴永尧. 神经酰胺生物学功能和药理功能研究进展. *湖北民族学院学报(医学版)* 2008; 25(1): 59-62.
- 3 Xu R, Jin J, Hu W, Sun W, Bielawski J, Szulc Z, *et al.* Golgi alkaline ceramidase regulates cell proliferation and survival by controlling levels of sphingosine and S1P. *FASEB J* 2006; 20(11): 1813-25.
- 4 Graveel CR, Jatkoa T, Madore SJ, Holt AL, Farnham PJ. Expression profiling and identification of novel genes in hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 2001; 20(21): 2704-12.
- 5 Mao Z, Sun W, Xu R, Novgorodov S, Szulc ZM, Bielawski J, *et al.* Alkaline ceramidase 2 (ACER2) and its product dihydrosphingosine mediate the cytotoxicity of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide in tumor cells. *J Biol Chem* 2010; 285(38): 29078-90.
- 6 Sun W, Hu W, Xu R, Jin J, Szulc ZM, Zhang G, *et al.* Alkaline ceramidase 2 regulates beta1 integrin maturation and cell adhesion. *FASEB J* 2009; 23(2): 656-66.
- 7 Sun W, Jin J, Xu R, Hu W, Szulc ZM, Bielawski J, *et al.* Substrate specificity, membrane topology, and activity regulation of human alkaline ceramidase 2 (ACER2). *J Biol Chem* 2010; 285(12): 8995-9007.
- 8 卜友泉, 罗绪刚, 李素芬, 鲁 成, 李英文, 邝 霞, 等. 鸡含锰超氧化物歧化酶cDNA克隆及全序列分析. *中国生物化学与分子生物学学报* 2001; 17(4): 463-7.
- 9 卜友泉, 宋方洲, 易发平, 马永平. 人NFBD1启动子的鉴定与初步分析. *中国生物化学与分子生物学学报* 2007; 23(8): 631-7.
- 10 Bu Y, Suenaga Y, Ono S, Koda T, Song F, Nakagawara A, *et al.* Sp1-mediated transcriptional regulation of NFBD1/MDC1 plays a critical role in DNA damage response pathway. *Genes Cells* 2008; 13(1): 53-66.
- 11 Black AR, Black JD, Azizkhan-Clifford J. Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol* 2001; 188(2): 143-60.
- 12 Pan Q, Yang S, Wei Y, Sun F, Li Z. SP1 acts as a key factor, contributes to upregulation of ADAM23 expression under serum deprivation. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 401(2): 306-12.
- 13 Kobayashi M, Yamamoto M. Regulation of GATA1 gene expression. *J Biochem* 2007; 142(1): 1-10.
- 14 Imler JL, Wasylyk B. AP1, a composite transcription factor implicated in abnormal growth control. *Prog Growth Factor Res* 1989; 1(2): 69-77.
- 15 Schinke C, Mo Y, Yu Y, Amiri K, Sosman J, Grealley J, *et al.* Aberrant DNA methylation in malignant melanoma. *Melanoma Res*

2010; 20(4): 253-65.

Histone acetylation, DNA methylation and anti-cancer drug dis-

16 Ganesan A, Nolan L, Crabb SJ, Packham G. Epigenetic therapy:

covery. *Curr Cancer Drug Targets* 2009; 9(8): 963-81.

Cloning and Preliminary Identification of Human *ACER2* Promoter

Zhu Liu^{1,2}, Qing Ai^{1,2}, Huan Lan^{1,2}, Ying Ji^{1,2}, Zheng-Mei Yang², Jiang-Yi He², Xiao-Lu Hao²,
Fang-Zhou Song^{1,2}, You-Quan Bu^{1,2*}

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

²Molecular Medicine and Cancer Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract Alkaline ceramidase 2, *ACER2*, is a ceramide-hydrolyzing enzyme which plays an important role in cell proliferation, senescence, and apoptosis etc. To further investigate its transcriptional regulatory mechanism, *ACER2* gene promoter has been cloned and identified in the present study. At first, the transcriptional start sites for *ACER2* gene have been identified by 5' RACE (rapid amplification of cDNA ends) and bioinformatic analysis. Furthermore, three overlapping genomic fragments from the 5'-flanking region of *ACER2* gene have been cloned into pGL3-basic vector to construct *ACER2* promoter reporters. Luciferase reporter assay indicated that *ACER2* promoter region is mainly located in a 670 bp region nearby the transcriptional start site. Transcriptional factor binding analysis indicated that, *ACER2* gene promoter contains several putative binding sites for transcriptional factors such as Sp1 and GATA-1. These results suggested that transcriptional factors such as Sp1 and GATA-1 might be involved in the transcriptional regulation of *ACER2* gene.

Key words *ACER2*; ceramide; promoter; transcriptional regulation

Received: December 7, 2010 Accepted: February 9, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30801356, No.81001097), the Natural Science Foundation Project of CQ CSTC (No.2010BB5357) and CQEC (No.KJ090305)

*Corresponding author. Tel: 86-23-68485096, E-mail: buyqcn@yahoo.com.cn