

人类原钙粘蛋白基因簇调控元件的克隆 及其对启动子活性的影响

吴海洋, 郭亚, 李伟, 吴强*

(上海交通大学 系统生物医学研究院, 比较生物医学研究中心, 中国上海 200240)

摘要:人类原钙粘蛋白(Protocadherin, Pcdh)基因簇包含 53 个成串排列非常相似的基因, 组成 3 个紧密相连的基因簇(α , β 和 γ)。原钙粘蛋白基因簇 γ 通过启动子选择性表达产生神经元细胞膜表面的分子多样性, 但是, 该多样性产生的分子机制还不清楚。调控元件 HS7L 和 HS5-1aL 作为候选的增强子可能具有调控 *Pcdhy* 基因表达的作用。利用分子克隆的方法, 将调控元件 HS7L 和 HS5-1aL 分别克隆至包含 $\gamma a9$ 、 $\gamma a10$ 、 $\gamma b3$ 、 $\gamma b7$ 和 $\gamma c3$ 启动子的荧光素酶报告基因的下游。通过荧光素酶报告基因试验检测其对该 5 种 *Pcdhy* 启动子活性的影响, 发现 HS7L 对 5 种启动子活性具有增强作用, HS5-1aL 对 $\gamma a10$ 启动子活性具有增强作用。之后, 通过基因沉默绝缘子 CTCF, 发现下调 CTCF 不仅降低 $\gamma b1$ 基因表达, 而且能够显著降低 $\gamma b1$ 启动子报告基因活性。试验结果表明调控元件 HS7L 和 HS5-1aL 能够增强 *Pcdhy* 启动子活性, 推测可能通过 CTCF 介导的增强子-启动子相互作用调控 *Pcdhy* 的细胞特异性基因表达。

关键词:原钙粘蛋白基因簇; 选择性表达; 绝缘子 CTCF; 增强子-启动子相互作用

中图分类号: Q71

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2014)02-0095-05

Cloning and Functional Analysis of the Regulatory Elements in the Human Protocadherin Gene Cluster

WU Hai-yang, GUO Ya, LI Wei, WU Qiang*

(Center for Comparative Biomedicine, Institute of Systems Biomedicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Promoter choice of members of the protocadherin γ (*Pcdhy*) gene cluster in single neurons may generate an enormous diversity on the cell surface of individual neurons in the brain, but the underlying molecular mechanisms are poorly understood. Here, candidate enhancer elements of the human *Pcdhy* cluster, HS7L and HS5-1aL, were cloned into the downstream of the luciferase reporter gene which is under the control of the $\gamma a9$, $\gamma a10$, $\gamma b3$, $\gamma b7$, or $\gamma c3$ promoter. Luciferase reporter gene assay, which was used to characterize the functions of these two elements, revealed that HS7L enhances the promoter activity of all of the five genes; by contrast, HS5-1aL increases the $\gamma a10$ promoter activity. In addition, the insulator CTCF knockdown led to a decrease in the levels of $\gamma b1$ mRNAs and its promoter activity. These results suggested that HS7L and HS5-1aL play an important role in regulating the cell-specific *Pcdhy* expression in the brain by CTCF-mediated long-distance enhancer-promoter DNA looping interactions.

Key words: protocadherin gene cluster; promoter choice; insulator CTCF; enhancer-promoter DNA interaction
(*Life Science Research*, 2014, 18(2): 095-099)

神经元是构成大脑神经网络功能的基本单位, 不同神经元之间相互作用的集合构成了各种高级功能的复杂神经网络, 原钙粘蛋白可能

在复杂神经网络形成中起到关键作用^[1-3]。神经元细胞膜表面蛋白的选择性表达能够产生单个神经元表面分子的多样性, 该多样性能够使神经元联

收稿日期: 2013-12-17; 修回日期: 2013-12-28

基金项目: 国家 973 课题资助项目(2009CB918701); 国家自然科学基金资助项目(31171015; 8126112390)

作者简介: 吴海洋(1989-), 女, 山东曲阜人, 硕士研究生, 主要从事生物化学与分子生物学研究; * 通讯作者: 吴强(1968-), 男, 上海人, 上海交通大学系统生物医学研究院特聘教授, 博士, 主要从事分子细胞生物学和神经生物学研究, Tel: 021-34204300, E-mail: qiangwu@sjtu.edu.cn.

系具有特异性,即自我识别或自我回避^[3]。原钙粘蛋白家族作为钙粘蛋白超家族中的成员,是一类依赖钙离子的细胞表面粘着蛋白^[2,4,5],在神经发育中扮演重要作用^[6-10]。原钙粘蛋白基因家族包含 3 个紧密相连的基因簇:*Pcdh α* 簇、*Pcdh β* 簇和 *Pcdh γ* 簇,在哺乳动物中高度保守^[11-13]。人类 *Pcdh γ* 基因簇由 22 个可变第一个外显子和下游 3 个恒定的外显子组成,单个可变第一个外显子剪接到下游 3 个恒定的外显子可产生 1 种信使 RNA 分子^[2],不同的神经细胞对可变第一个外显子上游启动子的选择性表达产生了神经元表面的分子多样性^[14,15]。

DNA 调节元件与 DNA 酶超敏位点 HSs (DNase I hypersensitive sites) 密不可分,因为 HSs 区域有调节因子结合,导致核小体重建或缺失,继而该区域的 DNA 序列容易被 DNA 酶降解^[16]。真核生物的基因组在调节因子介导的远距离相互作用下形成复杂而高度有序的染色质结构。绝缘子 CTCF (CCCTC-binding factor) 在其中扮演着组织者的角色^[17]。先前研究发现 *Pcdh γ* 每个可变第一个外显子的启动子(除 $\gamma c4$ 、 $\gamma c5$ 外)都含 1 个保守序列元件^[11,14],即 CTCF 结合位点^[18-20],且 CTCF 可以影响 *Pcdh γ* 启动子的活性^[20]。染色质免疫共沉淀结合二代测序技术揭示了两个候选的调控元件,即 HS7L 和 HS5-1aL,但其调控功能还有待确认^[20]。本研究通过分子克隆、荧光素酶报告基因和基因沉默试验,证实了 HS7L 和 HS5-1aL 对 *Pcdh γ* 启动子活性的增强作用,并探讨了绝缘子 CTCF 对 *Pcdh γ* 基因表达的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞株

人胚胎肾细胞系 293T、人神经母细胞瘤细胞系 SK-N-SH 购自上海细胞库。

1.2 主要试剂

萤火虫荧光素酶报告载体 pGL3-Control (E1741) 和 pGL3-basic (E1751)、海肾荧光素酶内参载体 pRL-TK (E2241)、pGEM[®]-T Easy Vector System I (A1360)、双荧光素酶检测试剂盒 (E2940) 和反转录试剂盒 (A3500) 购自美国 Promega 公司; FastStart Universal SYBR Green Master 试剂 (04913914001) 购自瑞士罗氏公司; Lipofectamine[™] 2000 (11668-019) 购自美国 Invitrogen 公司; KOD-Plus (KOD-201) 购自日本 TOYOBO 公

司; 限制性内切酶 *Kpn* I (R0142S)、*Hind* III (R0104S)、*Eco*R I (R0101S)、*Sac* I (R0156V)、*Xba* I (R0145S)、*Sal* I (R0138S) 和 T4 DNA 连接酶 (M0202L) 购自美国 New England Biolabs 公司; 基因组 DNA 纯化试剂盒 (A1120) 购自美国 Promega 公司; FBS (10099-141)、DMEM (10313-021) 购自美国 Gibco 公司。

1.3 仪器

PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司), Eppendorf 5415D 离心机 (德国 Eppendorf 公司), 电泳系统 (美国 Bio-Rad 公司), CO₂ 细胞培养箱 (美国 Thermo 公司), Synergy 2 多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司), ChemiDoc XRS+ 系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.4 方法

1.4.1 序列比对分析

人基因组 DNA 序列信息从 <http://genome.ucsc.edu/> 网站获取。序列同源分析结果通过 Vista 软件得出^[21], 网址为 <http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>。

1.4.2 荧光素酶报告系统中质粒的构建

经 PCR (pGL3F 和 pGL3R 为引物) 将 *Eco*R I、*Xho* I、*Mlu* I 和 *Sac* I 酶切位点序列引入 pGL3-Basic 质粒。以从 HEC-1-B 细胞系中提取的人基因组 DNA 为模板, 使用表 1 所列引物, 通过 PCR 扩增 $\gamma a9$ ($\gamma a9F$ 和 $\gamma a9R$)、 $\gamma a10$ ($\gamma a10F$ 和 $\gamma a10R$)、 $\gamma b3$ ($\gamma b3F$ 和 $\gamma b3R$)、 $\gamma b7$ ($\gamma b7F$ 和 $\gamma b7R$)、 $\gamma c3$ ($\gamma c3F$ 和 $\gamma c3R$)、 $\gamma b1$ ($\gamma b1F$ 和 $\gamma b1R$) 的启动子序列以及 HS7L (HS7LF 和 HS7LR) 和 HS5-1aL (HS5-1aLF 和 HS5-1aLR) 调控元件序列。将 PCR 扩增的各启动子序列经 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切后, 插入 pGL3-Basic 载体的 *Kpn* I 和 *Hind* III 酶切位点之间, 即获得 pGL3- $\gamma a9$ -luc、pGL3- $\gamma a10$ -luc、pGL3- $\gamma b3$ -luc、pGL3- $\gamma b7$ -luc、pGL3- $\gamma c3$ -luc 和 pGL3- $\gamma b1$ -luc 质粒。将 HS7L 或 HS5-1aL 元件分别插入 pGL3- $\gamma a9$ -luc、pGL3- $\gamma a10$ -luc、pGL3- $\gamma b3$ -luc、pGL3- $\gamma b7$ -luc 和 pGL3- $\gamma c3$ -luc 质粒的 *Eco*R I 和 *Sal* I 限制性内切酶识别位点之间, 即获得 pGL3- $\gamma a9$ -luc-HS7L/HS5-1aL、pGL3- $\gamma a10$ -luc-HS7L/HS5-1aL、pGL3- $\gamma b3$ -luc-HS7L/HS5-1aL、pGL3- $\gamma b7$ -luc-HS7L/HS5-1aL 和 pGL3- $\gamma c3$ -luc-HS7L/HS5-1aL 质粒。上述克隆均经 Sanger 测序确定其正确性。

表 1 克隆所用引物
Table 1 Primers for cloning

Primer	Sequence(5'-3')
pGL3F	GAAAGATCGCCGTGTAATTC
pGL3R	CGGGATCCGAGCTCACGCGTCTCGAG- GAATTCTTATCGATTTTACCACATTGTAG
$\gamma a9F$	GGGCTACCGAAATAGAGTGCAAAGTCTACCAAG
$\gamma a9R$	CCCAAGCTTCGCTGCTTCATCAGGTTCTTTC
$\gamma a10F$	GGGCTACCGCTTCAGAGTGAATTATCTCATG
$\gamma a10R$	CCCAAGCTTAAAGTCTCACTGGACACGTTG
$\gamma b3F$	GGGCTACCCGTGACGGGATTGAGCAAGAT
$\gamma b3R$	CCCAAGCTTGTCTCCGAGCAGGACCAACTA
$\gamma b7F$	GGGGTACCCCTGGATGATGGTAATGACTAG
$\gamma b7R$	CCCAAGCTTCTTTCCAGTTGGAGAAAGTGC
$\gamma c3F$	GGGCTACCCAAGCCAGATTTGTTGGTGT
$\gamma c3R$	CCCAAGCTTTCCTCCCTGAGATTTTCGCT
$\gamma b1F$	GGGCTACCGCACTCATGCCAGAGTTTAT
$\gamma b1R$	CCCAAGCTTACCCTGGACTTCTGTGATTTG
HS5-1aLF	GGAATTCATGAGGCCAGGCCAAC
HS5-1aLR	ACCGCTCGACCAGCTTTTCAGAAAGAAACGTT
HS7LF	GGAATTCCTTAAGTGGGAGCCCTGTACTTT
HS7LR	ACCGCTCGACGCTTGGACCTTATCCCTGTTCT

1.4.3 双荧光素酶报告基因活性测定

双荧光素酶报告基因活性测定采用美国 Promega 公司 Dual-Glo 荧光素酶报告基因检测系统。293T 细胞的培养使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液(含 100 kU/L 青霉素和 100 kU/L 链霉素)。以 293T 细胞转染为例,转染前细胞按照 3×10^4 个/孔接种于 96 孔板。转染使用 Lipofectamine 2000 试剂,每孔转染 37 fmol 质粒 DNA (不足 200 ng 用 pGEM-T Easy 质粒补齐),10 ng 内参 pRL-TK 与 25 μ L DMEM 无血清培养基混合,记为 A 液;然后,将 0.4 μ L 脂质体与 25 μ L DMEM 无血清培养基混合,记为 B 液,室温放置 5 min。最后,将 A 液和 B 液 1:1 混合,室温放置 20 min 后,加入 96 孔板中。293T 细胞转染 48 h 后,弃去培养液,每孔加入 50 μ L 裂解液,萤火虫荧光素酶底物反应 10 min 后,吸取 40 μ L 孔细胞转移至白色不透光 96 孔板中,在 Synergy 2 多功能酶标仪中测得每个孔的萤火虫荧光素酶发光值。然后往孔内加入 20 μ L 孔萤火虫荧光素酶的淬灭剂以及海肾荧光素酶的底物,反应 10 min,再测得每个孔的海肾荧光素酶的发光值。数据表述为萤火虫荧光素酶/海肾荧光素酶的数值。每个实验至少重复 3 次。SK-N-SH 细胞中的双荧光素酶报告基因活性测定试验与此类似,不再赘述。

1.4.4 慢病毒包装与感染

采用 Lipofectamine 2000 试剂,将 CTCF shRNA 质粒或 GFP shRNA 质粒与包装质粒 pPax2 和

pMD2.G^[20]共转染 293T 细胞,转染 18 h 后更换病毒收集培养基(含 10%胎牛血清,11 g/L BSA,100 kU/L 青霉素和 100 kU/L 链霉素)分别于转染后 42 h 和 66 h 收集含病毒颗粒上清,经离心、过滤后分装存放于-80 $^{\circ}$ C 冰箱。SK-N-SH 细胞感染时添加 8 μ g/mL polybrene (Sigma),感染第 3 d 后添加 2 μ g/mL Puromycin (Sigma),每 2 d 更换一次培养液。

1.4.5 实时定量 PCR

细胞经 TRIzol 试剂裂解并提取 RNA,取 1 μ g RNA,经美国 Promega 公司 AMV 试剂逆转录,实时定量 PCR 检测采用瑞士 Roche 公司 FastStart Universal SYBR Green Master 试剂在 ABI 7500 定量 PCR 仪中进行。实时定量 PCR 引物采用 Primer 5 引物设计软件设计,GAPDH 基因作为内参(引物见表 2)。

表 2 实时定量 PCR 所用引物
Table 2 Primers for Real-time PCR

Primer	Sequence(5'-3')
<i>Pcdhyb1F</i>	GGATCTGCTGTGTGATGATCCT
<i>Pcdhye3F</i>	ACCATCAGGTGTATCTCACCAC
<i>Pcdhy-conR</i>	CGACTTCTTCTGTGCCATTG
GAPDH-F	GGAGTCCACTGGCGTCTTCAC
GAPDH-R	GCAGGAGGCATTGCTGATGAT

1.4.6 蛋白免疫印迹

蛋白免疫印迹实验采用 Millipore CTCF 抗体作为一抗,经 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后,与羊抗兔二抗孵育 1 h,图像采集使用 ChemiDoc XRS+ 系统 (Bio-Rad)。

1.4.7 统计学处理

采用 SPSS 软件进行 *t* 检验分析, $n=3$,*t* 值检验后,* $P<0.05$ 为有显著性差异;** $P<0.01$ 为有极显著性差异。

2 结果

2.1 调控元件 HS7L 和 HS5-1aL 的序列保守性分析

基因组调控元件(如增强子和基因座控制区)在不同的物种中具有高度保守性^[22]。本文对人和鼠的 *Pcdhy* 基因簇下游序列进行了 Vista 分析。图 1 中,横坐标代表序列在基因组中的位置,纵坐标代表人与鼠的序列相似性程度。可见,人与鼠的 *Pcdhy* 基因簇除了外显子的序列保守外,内含子及基因间序列同样具有高度的序列相似性。DNA 酶超敏位点 HS16、HS5-1bL/HS17、HS18、HS19-20 能够顺式激活 *Pcdh β* 基因簇的表达,且这些位点的

缺失能够非均一地部分降低 *Pcdhy* 亚型的表达^[23]。调控元件 HS7L 和 HS5-1aL 作为候选的增强子可能具有调控 *Pcdhy* 基因表达的作用^[20]。

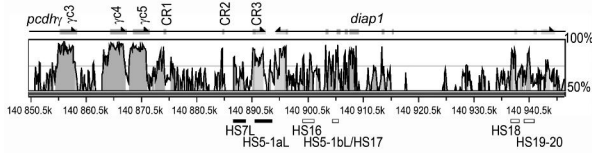


图1 人与鼠 *Pcdhy* 基因簇下游的 DNA 序列保守性分析
Fig.1 Homology analysis of the downstream sequences of the human and mouse *Pcdhy* gene clusters

2.2 HS7L 对 *Pcdhy* 启动子活性的影响

为研究 HS7L 是否影响 *Pcdhy* 的启动子活性，将克隆并测序正确的重组质粒（图 2 左）与 pGEM-T Easy 载体，内参载体质粒 pRL-TK 瞬时转染 293T 细胞后，再分别测出萤光虫荧光素酶和海肾荧光素酶的活性，用二者的比值大小衡量 *Pcdhy* 启动子活性强弱。实验结果显示：阴性对照质粒中加入 HS7L 序列后显著提高了 $\gamma a9$ 、 $\gamma a10$ 、 $\gamma b3$ 、 $\gamma b7$ 和 $\gamma c3$ 的启动子活性（图 2 右）。该结果表明，DNA 超敏位点 HS7L 具有增强 *Pcdhy* 启动子活性的作用。

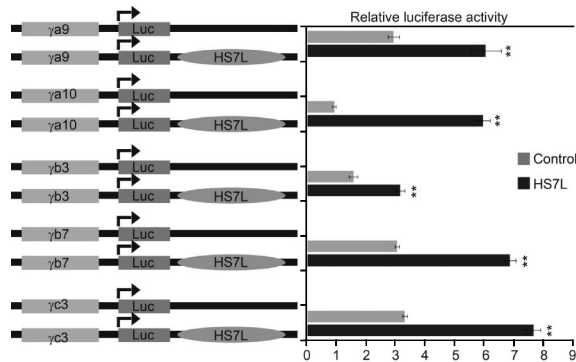


图2 HS7L 对 *Pcdhy* 启动子活性的影响
Fig.2 The effects of HS7L on the human *Pcdhy* promoter activity

2.3 HS5-1aL 对 *Pcdhy* 启动子活性的影响

为了探究 HS5-1aL 对 *Pcdhy* 的启动子活性的影响，构建双荧光素酶报告系统（图 3 左）并转染 293T 细胞，检测双荧光素酶的活性。结果显示 HS5-1aL 对 $\gamma a10$ 有显著的增强作用，但对其他启动子无显著影响（图 3 右）。该结果表明，DNA 超敏位点 HS5-1aL 具有增强部分 *Pcdhy* 启动子活性的作用。

2.4 CTCF 基因沉默对 *Pcdhy* 基因表达和启动子活性的影响

以慢病毒作为载体，通过 shRNA 下调 CTCF

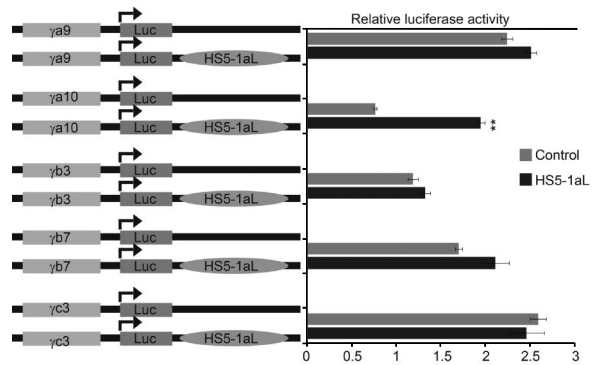


图3 HS5-1aL 对 *Pcdhy* 启动子活性的影响
Fig.3 The effects of HS5-1aL on the human *Pcdhy* promoter activity

后，从 SK-N-SH 细胞中提取蛋白进行蛋白免疫印迹检测，结果显示该 shRNA 能够有效降低 CTCF 蛋白表达（图 4A）。CTCF 分别下调 5 d 和 9 d 后，从 SK-N-SH 细胞中提取总 RNA，经反转录进行实时定量 PCR 分析，发现 $\gamma b1$ 基因表达在下调第 5 d 增加，在下调第 9 d 降低（图 4B）， $\gamma c3$ 无显著性变化（图 4C）。CTCF 下调 5 d 后瞬时转染含 $\gamma b1$ 或 $\gamma c3$ 启动子的双荧光素酶报告基因质粒，发现 $\gamma b1$ 启动子活性显著降低， $\gamma c3$ 无显著性变化（图 4D）。该结果表明，CTCF 对于维持 $\gamma b1$ 基因表达和启动子活性至关重要，调控元件 HS7L 和 HS5-1aL 以及已报道的其他下游调控元件可能通过 CTCF 介导的增强子-启动子相互作用调控 *Pcdhy* 表达。

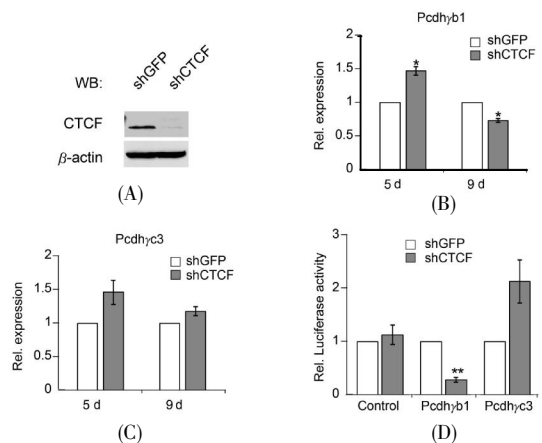


图4 CTCF 基因沉默对 *Pcdhy* 基因表达和启动子活性的影响

(A) 免疫印迹；(B) $\gamma b1$ 实时定量 PCR；(C) $\gamma c3$ 实时定量 PCR；(D) $\gamma b1$ 和 $\gamma c3$ 双荧光素酶报告基因检测。

Fig.4 The effects of CTCF knockdown on the human *Pcdhy* gene promoters

(A) Western blot；(B) Real-time RT-PCR assay of the $\gamma b1$ gene；(C) Real-time PCR assay of the $\gamma c3$ gene；(D) Dual Glo luciferase assay of the $\gamma b1$ or $\gamma c3$ promoter.

3 讨论

人脑中包含超过 1 000 亿个神经元细胞,这些细胞之间互相联系形成约 150 万亿个特异的突触连接,原钙粘蛋白基因簇可能在大脑复杂神经元连接中起到重要作用^[1,3,12]。如此庞大的相互作用网络需要大量的细胞表面分子用以“自我识别”,使神经元能够“自我回避”。最近研究发现,*Pcdh* 在实现神经元的“自我回避”中发挥至关重要的作用^[9],*Pcdh* 是目前脊椎动物中唯一被发现参与该功能的基因。*Pcdh* 能够通过启动子选择性表达产生巨大的分子多样性,该启动子的选择被认为是通过增强子-启动子的相互作用得以实现的^[20]。但是目前,*Pcdh* 的增强子调控元件还未被完全确定^[23,24]。本文对 *Pcdhy* 的增强子调控元件的研究对于探索 *Pcdhy* 如何实现多样性表达的分子机制至关重要。

已有的研究鉴定了 *Pcdhy* 下游调控元件 HS16、HS5-1bL/HS17、HS18 和 HS19-20,但是基因敲除这些元件几乎完全沉默 *Pcdh β* 基因,只能非均一地部分降低 *Pcdhy* 基因的表达^[23]。我们实验室先前发现 *Pcdhy* 下游调控元件 HS7L 和 HS5-1aL 具有增强子特性,即富集 RNA 聚合酶 II^[20]。因此,有必要进一步对该两个调控元件做进一步研究。报告基因是现代分子生物学中用于分析顺式元件与反式作用因子相互作用关系的一种重要工具^[25]。本研究通过分子克隆,将调控元件 HS7L 和 HS5-1aL 分别克隆至包含 $\gamma a9$ 、 $\gamma a10$ 、 $\gamma b3$ 、 $\gamma b7$ 和 $\gamma c3$ 启动子的荧光素酶报告基因的下游。通过荧光素酶报告基因试验检测其对该 5 种 *Pcdhy* 启动子活性的影响,发现 HS7L 对 5 种启动子活性都具有增强作用,而 HS5-1aL 仅对 $\gamma a10$ 启动子活性具有增强作用。这些结果表明,DNA 超敏位点 HS7L 和 HS5-1aL 具有增强 *Pcdhy* 启动子活性的作用。

CTCF 是真核生物中进化上高度保守的锌指蛋白,具有转录激活、抑制、绝缘子、印迹、X 染色体失活、介导形成高度有序的染色质构象以及招募 RNA 聚合酶的功能^[26,27]。先前报道发现:除了 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma c4$ 、 $\gamma c5$ 之外,原钙粘蛋白其他基因的启动子都包含一个 CTCF 识别位点。CTCF 通过结合原钙粘蛋白 α 基因簇中的启动子和增强子,介导二者的相互作用,形成基因表达中枢,从而实现启动子的选择^[20]。因此,CTCF 可能也通过介导增强子-启动子相互作用调控 *Pcdhy* 表达。本研究通过基因沉默转录因子 CTCF,发现下调 CTCF 不仅

降低 $\gamma b1$ 基因表达且能够显著降低 $\gamma b1$ 启动子报告基因活性。该结果表明,CTCF 对于维持 $\gamma b1$ 基因表达和启动子活性至关重要,调控元件 HS7L 和 HS5-1aL 以及已报道的其他下游调控元件可能通过 CTCF 介导的增强子-启动子相互作用调控 *Pcdhy* 表达。该结果为进一步研究 *Pcdhy* 基因表达调控机制奠定了基础。

参考文献 (References):

- [1] 李伟,吴强.原钙粘蛋白分子与神经元的多样性[J]. 科技视界 (LI Wei,WU Qiang. Protocadherins and the diversity of neurons[J]. Science & Technology Vision), 2013, (27): 14.
- [2] WU Q, MANIATIS T. A striking organization of a large family of human neural cadherin-like cell adhesion genes[J]. Cell, 1999, 97(6): 779-790.
- [3] ZIPURSKY S L, SANES J R. Chemoaffinity revisited: dscams, protocadherins, and neural circuit assembly[J]. Cell, 2010, 143(3): 343-353.
- [4] SANO K, TANIHARA H, HEIMARK R L, et al. Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system[J]. The EMBO Journal, 1993, 12(6): 2249-2256.
- [5] KOHMURA N, SENZAKI K, HAMADA S, et al. Diversity revealed by a novel family of cadherins expressed in neurons at a synaptic complex[J]. Neuron, 1998, 20(6): 1137-1151.
- [6] LEFEBVRE J L, KOSTADINOV D, CHEN W V, et al. Protocadherins mediate dendritic self-avoidance in the mammalian nervous system[J]. Nature, 2012, 488(7412): 517-521.
- [7] CHEN W V, ALVAREZ F J, LEFEBVRE J L, et al. Functional significance of isoform diversification in the protocadherin gamma gene cluster[J]. Neuron, 2012, 75(3): 402-409.
- [8] SUO L, LU H, YING G, et al. Protocadherin clusters and cell adhesion kinase regulate dendrite complexity through Rho GTPase[J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2012, 4(6): 362-376.
- [9] 于钰,索伦,吴强. PCDH α 在髓鞘形成和少突胶质细胞发育中的作用[J]. 动物学研究 (YU Y, SUO L, WU Q. Protocadherin alpha gene cluster is required for myelination and oligodendrocyte development[J]. Zoological Research, 2012, 33(4): 362-366.
- [10] GARRETT A M, SCHREINER D, LOBAS M A, et al. Gamma-protocadherins control cortical dendrite arborization by regulating the activity of a FAK/PKC/MARCKS signaling pathway[J]. Neuron, 2012, 74(2): 269-276.
- [11] WU Q, ZHANG T, CHENG J F, et al. Comparative DNA sequence analysis of mouse and human protocadherin gene clusters[J]. Genome Research, 2001, 11(3): 389-404.
- [12] WU Q. Comparative genomics and diversifying selection of the clustered vertebrate protocadherin genes[J]. Genetics, 2005, 169(4): 2179-2188.
- [13] ZOU C, HUANG W, YING G, et al. Sequence analysis and expression mapping of the rat clustered protocadherin gene repertoires[J]. Neuroscience, 2007, 144(2): 579-603.
- [14] TASIC B, NABHOLZ C E, BALDWIN K K, et al. Promoter choice determines splice site selection in protocadherin alpha and gamma pre-mRNA splicing[J]. Molecular Cell, 2002, 10(1): 21-33.
- [15] WANG X, SU H, BRADLEY A. Molecular mechanisms governing *Pcdh*-gamma gene expression: evidence for a multiple promoter and cis-alternative splicing model[J]. Genes & Development, 2002, 16(15): 1890-1905.
- [16] LI Q, HARJU S, PETERSON K R. Locus control regions: coming of age at a decade plus[J]. Trends in Genetics, 1999, 15(10): 403-408.

机制可能与影响肿瘤细胞生长周期发生变化,活化线粒体介导的凋亡途径诱导细胞发生凋亡相关。本实验结果显示对于胰腺癌临床治疗来说,BENS 和 TBP 是很有潜力的抗肿瘤药物。

参考文献 (References):

- [1] CASERO R A, WOSTER P M. Recent advances in the development of polyamine analogues as antitumor agents[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, 52(15): 4551-4573.
- [2] AGOSTINELLI E, MARQUES M P, CALHEIROS R, *et al.* Polyamines: fundamental characters in chemistry and biology[J]. *Amino Acids*, 2010, 38(2): 393-403.
- [3] BIRKHOLTZ L M, WILLIAMS M, NIEMAND J, *et al.* Polyamine homeostasis as a drug target in pathogenic protozoa: peculiarities and possibilities[J]. *Biochemistry*, 2011, 438 (Pt 2): 229-244.
- [4] ALLEN W L, M C LEAN E G, BOYER J, *et al.* The role of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in determining response to chemotherapeutic agents in colorectal cancer cells [J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2007, 6(1):128-137.
- [5] CASERO R A, MARTON L J. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyper proliferative diseases[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2007, 6(5): 373-390.
- [6] CHATURVEDI R, D E SABLET T, PEEK R, *et al.* Spermine oxidase, a polyamine catabolic enzyme that links *Helicobacter pylori* cagA and gastric cancer risk[J]. *Gut Microbes*, 2012, 3(1): 48-56.
- [7] 张贺吉,王凯,韩钰,等. 四丁基丙二胺对人 MG63 骨髓瘤细胞增殖、凋亡和迁移能力的影响[J]. *中国药理学通报*(ZHANG He-ji, WANG Kai, HAN Yu, *et al.* Effects of polyamine analog tetrabutyl propanediamine on proliferation, apoptosis and migration of human MG63 myeloma cells[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*), 2012, 28(1):974-977.
- [8] 杨建林,韩钰,王凯,等. 新多胺类似物 TBP 对膀胱移行细胞癌 T24 细胞凋亡及迁移能力的影响[J]. *中国肿瘤临床*(YANG Jian-lin, HAN Yu, WANG Kai, *et al.* Effects of the new polyamine analog tetrabutyl propanediamine on the apoptosis and migration of human bladder carcinoma T24 cells[J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*), 2012, 23(39):1869-1872.
- [9] 王芳妹,杨子剑,韩梅,等. 阿司匹林对人慢性粒细胞白血病细胞株 K562 的生长抑制作用[J]. *湖南师范大学自然科学学报*(WANG Fang-mei, YANG Zi-jian, HAN Mei, *et al.* The inhibitory effects of Aspirin on the growth of CML K562 cells[J]. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*), 2013, 36(5): 75-80.
- [17] LEE B K, IYER V R. Genome-wide studies of CCCTC-binding factor (CTCF) and cohesin provide insight into chromatin structure and regulation[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(37): 30906-30913.
- [18] GOLAN-MASHIACH M, GRUNSPAN M, EMMANUEL R, *et al.* Identification of CTCF as a master regulator of the clustered protocadherin genes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40 (8): 3378-3391.
- [19] KEHAYOVA P, MONAHAN K, CHEN W, *et al.* Regulatory elements required for the activation and repression of the protocadherin-alpha gene cluster[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(41): 17195-17200.
- [20] GUO Y, MONAHAN K, WU H, *et al.* CTCF/cohesin-mediated DNA looping is required for protocadherin alpha promoter choice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(51): 21081-21086.
- [21] FRAZER K A, PACHTER L, POLIAKOV A, *et al.* VISTA: computational tools for comparative genomics[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(Suppl 2): 273-279.
- [22] LOOTS G G, LOCKSLEY R M, BLANKESPOOR C M, *et al.* Identification of a coordinate regulator of interleukins 4, 13, and 5 by cross-species sequence comparisons[J]. *Science*, 2000, 288(5463): 136-140.
- [23] YOKOTA S, HIRAYAMA T, HIRANO K, *et al.* Identification of the cluster control region for the protocadherin-beta genes located beyond the protocadherin-gamma cluster[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(36): 31885-31895.
- [24] RIBICH S, TASIC B, MANIATIS T. Identification of long-range regulatory elements in the protocadherin-alpha gene cluster[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(52): 19719-19724.
- [25] 杨宇,李江江,王项,等. 报告基因及其应用研究进展[J]. *生命科学研究* (YANG Yu, LI Jiang-jiang, WANG Xiang, *et al.* Progresses on reporter gene and its application[J]. *Life Science Research*), 2011, 15(3):277-282.
- [26] PHILLIPS J E, CORCES V G. CTCF: master weaver of the genome[J]. *Cell*, 2009, 137(7): 1194-1211.
- [27] CHERNUKHIN I, SHAMSUDDIN S, KANG S Y, *et al.* CTCF interacts with and recruits the largest subunit of RNA polymerase II to CTCF target sites genome-wide[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2007, 27(5): 1631-1648.

(上接第 99 页)