

Smad7 基因的克隆、表达及对 *c-myc* 基因的调控

霍艳英 胡迎春 徐勤枝 项晓琼 段瑞峰 李 刚 张开泰 吴德昌

(军事医学科学院 放射医学研究所四室, 中国北京 100850)

摘要: *Smad7* 是 *TGF-β* 家族信号转导通路的抑制分子, 可反馈调节 *TGF-β*/*Smads* 信号转导通路, 从功能推测, *Smad7* 表达紊乱, 可影响细胞对 *TGF-β* 的应答, 从而促进细胞的恶性化进展, 为了深入探讨 *Smad7* 基因功能, 通过设计引物, 用 Touch down 巢式-PCR 法从人胎脑文库中扩增 *Smad7* 基因编码区全长, 回收产物, 克隆并构建真核表达载体, 同融合有报告基因的 *c-myc* 顺式增强子元件共转染 BEP2D 细胞, 结果表明: *TGF-β* 可抑制 *c-myc* 报告基因的活性, *Smad7* 基因可正调控 *c-myc* 报告基因的表达, 并拮抗 *TGF-β* 对该基因的抑制作用。由此得出结论: *Smad7* 基因通过拮抗 *TGF-β* 来调控 *c-myc* 基因。

关键词: *Smad7* 基因; *c-myc* 基因; 克隆; 表达

中图分类号: Q71

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2004)03-0231-06

The Regulation of *C-myc* Gene by Cloned *Smad7* Gene

HUO Yan-ying, HU Ying-chun, XU Qin-zhi, XIANG Xiao-qiong,
DUAN Rui-feng, LI Gang, ZHANG Kai-tai, WU De-chang

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: *Smad7* was identified as a *TGF-β*-inducible antagonist *TGF-β* signaling and might participate in a negative feedback loop to control *TGF-β* signaling. The disorder of its expression should influence cell's responsiveness to *TGF-β* and contribute to the process of cell's malignant transformation. To further investigate the gene function of *Smad7*, the full coding region of *Smad7* was cloned and *Smad7* mammalian expression vector were constructed. Transient co-transfection was performed to examine the regulation of *c-myc* by *Smad7* gene. The results showed that in BEP2D cells, *TGF-β* can inhibit the activity of *c-myc* reporter, when co-transfection with *Smad7*, the reporter's activity increased. The results suggest that *Smad7* can regulate *c-myc* expression by antagonizing *TGF-β*.

Key words: *Smad7* gene; *c-myc* gene; clone; expression

(Life Science Research, 2004, 8(3): 231 ~ 236)

Smad7 是 *Smads* 家族的抑制型 *Smads*, 它作为转化生长因子-β 家族 (*TGF-β*s) 信号的胞内拮

抗因子, 可选择性抑制 *TGF-β* 信号转导通路^[1]. *TGF-β* 信号转导通路的异常同多种肿瘤的发生有

收稿日期: 2003-12-24; 修回日期: 2004-06-23

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 973 项目 (G1998051207)

作者简介: 霍艳英 (1973-) 女, 山西忻州人, 军事医学科学院助理研究员, 博士, 主要从事肺癌发生发展的分子机理研究,

关,如结肠直肠癌、胰腺癌、肺癌、皮肤癌等^[2]。有研究表明,*Smad7*作为 *TGF-β* 信号转导通路的抑制元件,其高表达同胰腺癌有关^[3]。本实验室前期研究结果显示:*Smad7*在永生化人支气管上皮细胞发生恶性转化后表达增高^[4];作为 *TGF-β* 的一个早期应答基因,*Smad7*在恶性化细胞中对 *TGF-β* 的应答降低^[5];研究还发现,恶性化细胞有较强的增殖能力,同时 *TGF-β* 对该细胞的生长抑制作用也发生了减弱^[6]。进一步研究还表明,*Smad7*基因对细胞增殖有明显的促进作用^[7]。前期研究结果提示,*Smad7*基因的高表达可能同肺癌尤其是磷癌的发生有关。虽然研究表明 *Smad7* 基因有很重要的生物学功能,但因其表达及序列的特异性,到目前为止,国外只有几个实验室获得了其编码区克隆,国内还没有,因此成为进一步进行功能研究的一大障碍。为了进一步探讨该基因在肺癌发生中的作用及机制,本文对 *Smad7* 基因进行了全编码区的克隆、表达,并用报告基因表达策略调查了 *Smad7* 基因对 *c-myc* 基因的调控。

1 材料与方 法

1.1 *Smad7* 基因全编码区的扩增

用 Touch-down 巢式 PCR 方法从人胎脑文库 [Clontech, Inc.] 中扩增 *Smad7* 基因,引物序列分别为:

API 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
 GSP1 (-): 5'-ATAATTGGTTCGGTTCGGCCACT-3'
 GSP2 (+): 5'-ATGTTCCAGGACCAAACGATC-3'
 GSP2 (-): 5'-CTACCGGCTGTTGAAGATGA-3'
 阳性对照 (+): 5'-GCCTGGTGGCATACTGGGAGGAGA-3'
 阳性对照 (-): 5'-TGTGGCGACTTGTGAAGATGG-3'

用 Advantage-GC 2 PCR kit(Clontech, Inc.) 进行 PCR 扩增。具体如下,取 10 μL 5 × GC2 PCR Buffer, 5 μL GC-Melt, 5 μL 人胎脑文库 cDNA, 1 μL 50 × dNTP 混合物,外引物 API 和 GSP1 (-) 或阳性对照引物各 1 μL(10 μmol/L), 50 × Advantage-GC2 Pol. 混合物 1 μL,用水补足至 50 μL,进行第一轮 PCR 扩增,反应条件为:94 °C 预变性 3 min 后,94 °C 5 s, 72 °C 3 min, 5 个循环;94 °C 5 s, 70 °C 3 min, 5 个循环;94 °C 5 s, 68 °C 3 min, 25 个循环,再于 72 °C 延伸 5 min。取第一轮 PCR 产物 2 μL,用内引物 GSP2 进行第二轮 PCR 扩增,扩增条件为 94 °C 预变性 3 min 后 94 °C 5 s, 72 °C 1 min 30 s, 5 个循环,94 °C 5 s, 70 °C

1 min 30 s, 5 个循环;94 °C 5 s, 68 °C 1 min 30 s, 25 个循环,再于 72 °C 延伸 5 min。取第一和第二轮 PCR 产物各 10 μL,用 1% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察结果。

1.2 PCR 产物的克隆及序列测定

琼脂糖电泳纯化 PCR 产物,将切下的产物片段用 PCR 产物快速纯化回收试剂盒(Promega)回收,将该片段与 PGEM-Teasy 载体(Promega)连接,转化大肠杆菌后挑选阳性克隆,用限制性内切酶 *EcoR* I 鉴定是否有片段插入,选择阳性克隆提取质粒进行序列测定。用 DS gene 1.0 核苷酸和蛋白分析软件包对所得到的序列进行分析。

1.3 *Smad7* 基因真核表达载体的构建

用 *EcoR* I 酶切插入 *Smad7* 基因的 PGEM-Teasy 载体及 PCI. neo 真核表达载体,回收酶切片断,*Smad7* 基因片断同 PCI. neo 真核表达载体片断连接,转化大肠杆菌后挑选阳性克隆,用限制性内切酶 *EcoR* I 鉴定是否有片段插入,用 *Sma* I 酶切鉴定插入方向。

1.4 细胞培养与基因转染

人永生化支气管上皮细胞 BEP2D 由美国 Harris CC 馈赠,用 LHC-8 无血清培养液(Biofluids Inc.),37 °C 5% CO₂ 条件下培养。指数生长期的 BEP2D 细胞按每孔 1 × 10⁵ 接种 24 孔板,18 ~ 24 h 之后用脂质体转染法,将 *Smad7* 真核表达载体 PCISmad7. neo 与融合有碱性磷酸酶报告基因的 *c-myc* 顺式增强子元件共转染,转染 24 h 后细胞换液,加入 2 μg/L TGF-β1 (Gibco, Inc),于 48 h 收集培养上清,用 Great EscAPe™SEAP 化学发光检测试剂盒(Clontech, Inc)检测分泌到培养液中的碱性磷酸酶。实验重复 3 次,取平均值,统计学检验用 student *t*-test。

2 结 果

2.1 *Smad7* 基因全编码区的扩增

图 1A 为以人胎脑文库为模板,以 API 和 GSP1 为外引物进行的第一轮 PCR 扩增结果,图 1B 为以 GSP2 为内引物进行的第二轮 PCR 扩增结果。由图 1 可知,经过 Touch-down 巢式 PCR 扩增,我们得到了一条介于 1 kb 和 2 kb 之间的目的片段,该片段同预期的产物长度相吻合。

2.2 PCR 产物的克隆及序列测定

PCR 扩增得到的产物同克隆载体连接后进行克隆及序列测定,结果表明,得到的基因序列为

Smad7 基因编码区全长,该核苷酸序列同 Hayashi H 等^[7]发表的序列同源性为 99.53%。同其相比,有差异的核苷酸及氨基酸位点见表 1,预测的蛋

白结构及功能变化分析见表 2。由结果可知,有差异的 4 个氨基酸基本上不影响蛋白质的整体结构及功能。

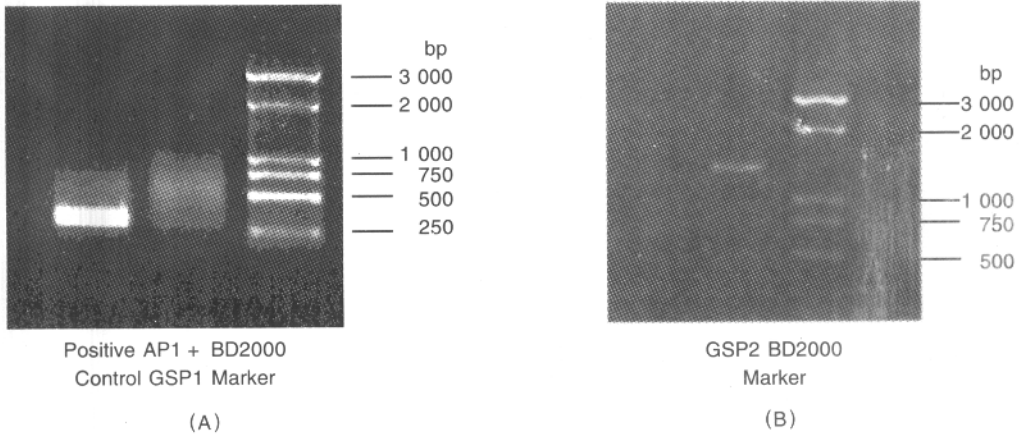


图 1 *Smad7* 基因全编码区 Touch-down 巢式 PCR 扩增产物电泳图谱

(A) 阳性对照和 3' race 扩增结果 ;(B) *Smad7* 全编码区扩增结果

Fig. 1 Touch-down nested-PCR amplification results of the *Smad7* gene full coding region

(A) the PCR products of positive control and 3' race; (B) the nested PCR products of *Smad7* full coding region

表 1 本克隆 (Huo YY) 同 Hayashi H 得到克隆的核苷酸及氨基酸序列差异比较

Table 1 Differentiation comparison of nucleotide and amino acid sequence cloned by Hayashi H and Huo YY

序列位点 (Sequence site)	核苷酸 (Nucleotide)		氨基酸 (Amino acid)	
	Hayashi H	Huo YY	Hayashi H	Huo YY
481/164	A	G	R	K
527/176	A	G	R	K
780/260	T	C		
805/269	A	G	E	K
1163/388	G	A	Q	R
1212/404	C	T		

表 2 本克隆 (Huo YY) 同 Hayashi H 得到克隆预测的蛋白质结构和功能差异比较

Table 2 Differentiation comparison of prognosticated protein structure and function of *Smad7* cDNA which cloned by Hayashi H and Huo YY

差异的氨基酸位点 Differentiation amino acid sites	功能性 Functionality		α -螺旋 + p450 Alpha-helix + p450		结构所在方位 Structural position		立体结构 Steric bulk	
	Hayashi H	Huo YY	Hayashi H	Huo YY	Hayashi H	Huo YY	Hayashi H	Huo YY
164	Base	Base	Alpha-forming	Alpha-forming	External	External	Branched side chain	Linear side chain
176	Base	Base	Alpha-forming	Alpha-forming	External	External	Branched side chain	Linear side chain
269	Acid	Base	Alpha-forming	Alpha-forming	External	External	Branched side chain	Linear side chain
388	Hydrophilic	Base	Alpha-forming	Alpha-forming	External	External	Branched side chain	Branched side chain

2.3 Smad7 基因真核表达载体的构建

EcoR I酶切克隆载体后回收的 Smad7 基因片段同 PCL neo 真核表达载体相应的酶切片段连接,克隆后 EcoR I酶切鉴定结果见图 3A; Sma I

酶切鉴定片段插入方向,结果见图 3B. 图 3A 显示,1 号和 4 号克隆为插入阳性克隆;图 3B 显示,1~4 号克隆为正向插入,5~8 号为反向插入.

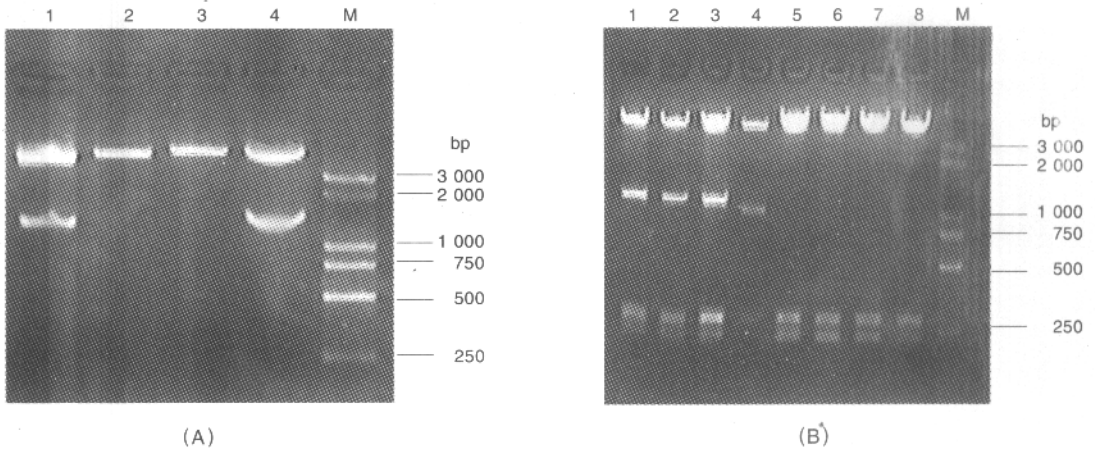


图 2 克隆质粒的限制性内切酶消化图谱

(A) EcoR I酶切鉴定结果;1,4 为阳性质粒,2,3 为阴性质粒;(B) Sma I酶切鉴定 Smad7 插入方向;1~4 是正向插入,5~8 是反向插入

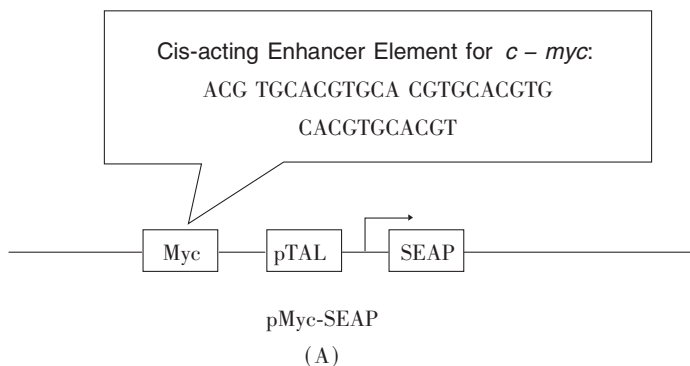
Fig. 2 Restriction endonuclease digestion pattern of cloned plasmids

(A) Cloned plasmids were digested by EcoR I; 1, 4 were positive plasmids and 2, 3 were negative plasmids;(B) Identification of the insertion direction by Sma I. Among them, 1~4 were sense Smad7 plasmids, 5~8 were antisense Smad7 plasmids

2.4 Smad7 基因对 c-myc 报告基因的调控

图 3A 为融合有报告基因碱性磷酸酶的 c-myc 顺式增强子元件载体示意图,图 3B 为转染后培养上清中报告基因活性检测结果.由图 3 可知,在 BEP2D 细胞中,同单独转染 c-myc 相比,c-myc 同 Smad7 基因共转染后,报告基因活性显

著增高($P < 0.05$). TGF- β 1 可明显抑制 c-myc 基因的转录活性,单独转染 c-myc 后,同未加 TGF- β 1 刺激的细胞组相比,加 TGF- β 1 刺激后,报告基因活性显著降低($P < 0.01$),c-myc 同 Smad7 基因共转染后,这种作用部分受到拮抗($P < 0.05$).



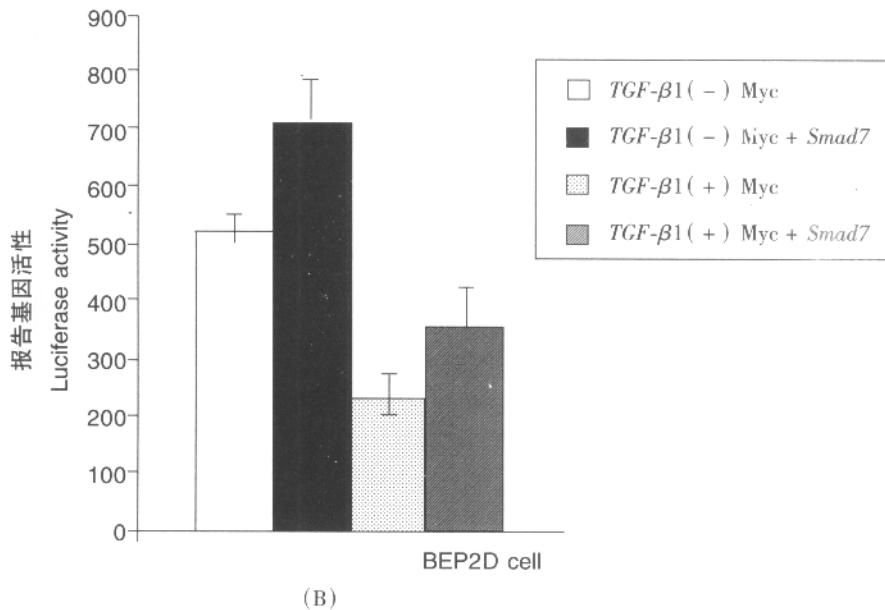


图 3 *Smad7* 基因对 *c-myc* 顺式增强子元件的活性上调作用

(A)为融和有报告基因碱性磷酸酶的 *c-myc* 顺式增强子元件载体示意图 ;(B)为转染后报告基因活性检测结果

Fig. 3 Effect of *Smad7* on *c-myc* cis-acting enhancer element

(A)was alkaline phosphatase construct containing cis-acting enhancer element of *c-myc* ;(B)were transient co-transfection results of *Smad7* and *c-myc* reporter vectors.

3 讨论

Smad7 基因是 *TGF-β* 信号转导通路的抑制元件,可以抑制 *TGF-β* 信号在胞浆内的传导^[1]. *TGF-β* 信号转导的基本过程是: *TGF-β* 同受体结合后可使跨膜的 I型和 II型丝氨酸/苏氨酸激酶受体 (TβR- I、TβR- II) 形成异源复合物,启动 *TGF-β* 信号. 活化的 TβR-I 磷酸化下游 Smad(2 和 3)分子,使 Smad2、Smad3 活化并同 Smad4 形成异源复合物,转位到核,调节靶基因的转录应答,从而抑制细胞生长,诱导其凋亡. *Smad7* 可同活化的 *TGF-β* 受体复合物特异并稳定的结合,阻断受体对 Smad2, Smad3 的磷酸化,从而抑制 *TGF-β* 诱导的靶基因的转录活化^[9]. 在肿瘤学方面, *Smad7* 在化学诱导性皮肤癌、肝细胞癌、胰腺癌中高表达;转染 *Smad7* 基因的胰腺癌细胞在软琼脂中的克隆形成增加,裸鼠成瘤能力增强^[3]. 上述资料表明: *Smad7* 可能通过负调控 *TGF-β* 信号转导通路或其它机制在细胞增殖、分化和恶性变中发挥功能. 我们实验室前期研究表明^[4-6],在人支气管上皮细胞恶性转化过程中, *Smad7* 基因的表达增高,该基因对 *TGF-β* 刺激的应答降低. *Smad7* 高表达的细胞增殖能力强,恶性化程

度高, *TGF-β* 对此细胞系的生长抑制能力减弱. 为了进一步验证发生恶性转化的细胞系表现出的这些特征是否由 *Smad7* 高表达引起,它们同 *Smad7* 表达增高的关系如何,我们对 *Smad7* 基因的编码区全长进行了克隆及表达.

Smad7 基因编码区全长于 1997 年由 Hayashi H 等^[8], Nakao A 等^[9]及 Topper JN^[10]等相继克隆到之后,有关它的基因功能研究逐渐成为一大研究热点,但由于其表达特性及序列的特异性,用常规实验方法不易得到该序列,到目前为止,只有上述提到的几个实验室拥有其全编码区克隆,为了进一步研究该基因表达变化同肺癌发生的关系及在肺癌发生中所起的作用,我们从人胎脑文库中对其进行了克隆. 结果表明,经热启动,高退火温度的巢式 PCR 扩增,得到一条同预期长度相吻合的目的条带,克隆及测序验证结果表明,该 DNA 序列长 1 281 bp,是 *Smad7* 基因全编码区,同 Hayashi H 等发表的序列同源性为 99. 53%,其中有 6 个核苷酸碱基不同,其中 4 个碱基可能引起编码的氨基酸改变. 用 DS gene 1. 0 核苷酸和蛋白分析软件包对所得到的序列进行分析结果表明,这些改变基本上不会改变其编码的蛋白质的结构和功能. 通过 *EcoR* I 酶切克隆及表达载体

并将酶切产物连接及克隆转化,得到了 *Smad7* 真核表达载体 PCISmad7. neo, 并用 *Sma* I 酶切鉴定得到了分别为正向和反向插入的表达载体. 为进一步研究 *Smad7* 基因功能同肺癌发生发展的关系等打下了基础.

在人类癌症中, 细胞逃逸 TGF β 介导的抗增殖效应常常同肿瘤的发展相关. 在细胞周期的任一期 TGF β 均能诱导抗增殖基因反应. 然而, 只有在 G1 期诱发的抗增殖基因反应能有效抑制细胞周期进程. 在这一期, TGF β 介导的生长终止包括 *c-myc* 表达下调^[11], 见于大多数生长可被 TGF β 抑制的细胞类型中. 作为 TGF β 信号通路的抑制分子, *Smad7* 基因是否通过抑制 TGF β 介导的抗增殖基因反应从而促进细胞增殖还需要进行验证. *Smad7* 基因同 *c-myc* 顺式增强子元件瞬时共转染的结果表明, *Smad7* 过表达可使 *c-myc* 顺式增强子元件的活性增高, 使 TGF β 对 *c-myc* 的抑制作用减弱. 结果证明 *Smad7* 基因过表达确实可通过抑制 TGF β 通路来活化 *c-myc* 转录活性, 从而拮抗 TGF β 介导的抗增殖基因反应, 使细胞增殖能力增强, 向恶性化发展.

参考文献 (References):

- [1] MASSAGUE J, BLAIN S W, LO R S. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders[J]. Cell, 2000, 103: 295-309.
- [2] 霍艳英, 张开泰, 吴德昌. 转化生长因子 - β SMAD 信号在癌症中的作用 [J]. 国外医学肿瘤学分册 (HUO Y Y, ZHANG K T, WU D C. The role of TGF- β SMAD signals in cancer[J]. Guo Wai Yi Xue Zhong Liu Xue Fengce), 2002, 29(3): 163-165.
- [3] KLEEFF J, ISHIWATA T, MARUYAMA H, et al. The TGF- β signaling inhibitor Smad7 enhances tumorigenicity in pancreatic cancer[J]. Oncogene, 1999, 18: 5363-5372.
- [4] 霍艳英, 张开泰, 李邦印, 等. 在 BEP2D 细胞恶性转化过程中 TGF- β 1 对 *Smad7* 表达的调节 [J]. 癌症 (HUO Y Y, ZHANG K T, LI B Y, et al. Regulation of *Smad7* gene by TGF-beta 1 in process of malignant transformation[J]. Ai Zheng) 2002, 21: 117-21.
- [5] HUO Y Y, ZHANG K T, LI B Y, et al. Responsiveness of *Smad7* gene to TGF- β 1 in the tumorigenesis[J]. Chinese Journal of Cancer Research, 2002, 14(3): 170-174.
- [6] 霍艳英, 张开泰, 李邦印, 等. TGF- β 1 在人支气管上皮细胞恶性转化中的作用 [J]. 中华放射医学与防护杂志 (HUO Y Y, ZHANG K T, LI B Y, et al. The mechanism of TGF- β 1 in radiation-induced human bronchial epithelium tumorigenesis[J]. Chinese Journal of Radiological Medicine and Protection), 2002, 22(6): 397-400.
- [7] 霍艳英, 张开泰, 项晓琼, 等. *Smad7* 基因在细胞恶性转化过程中的促增殖作用 [J]. 生命科学研究 (HUO Y Y, ZHANG K T, XIANG X Q, et al. The effect of *Smad7* gene on cell's proliferation in the process of malignant transformation[J]. Life Science Research), 2003, 7: 224-227.
- [8] HAYASHI H, ABDOLLAH S, QIU Y, et al. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling[J]. Cell, 1997, 89[7]: 1165-1173.
- [9] NAKAO A, AFRAKHTE M, MOREN A, et al. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signaling[J]. Nature, 1997, 389: 631-635.
- [10] TOPPER J N, CAI J, QIU Y, et al. Vascular MADs: two novel MAD-related genes selectively inducible by flow in human vascular endothelium[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94: 9314-9319.
- [11] ALEXANDROW M G, MOSES H L. Transforming growth b and cell cycle regulation[J]. Cancer Research, 1995, 55: 1452-1457.