

·基础研究·

鼻咽癌中 EB 病毒启动子 Qp 的突变及其功能学研究

黄宇帆¹, 廖奕佳¹, 刘文举¹, 花文峰¹, 邓海霞¹, 买世娟^{1*}, 谢丹¹, 宗永生²

(华南肿瘤学国家重点实验室//中山大学肿瘤防治中心 1. 实验研究部; 2. 病理科, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】探讨鼻咽癌细胞中启动 EB 病毒核抗原 1(EBNA1 蛋白)表达的 EB 病毒 Q 启动子(Qp)的变异特征, 比较有第 62 225 位点(g→a)和第 62 422 位点(g→c)两个点突变的 Qp 与原型 Qp(B95.8 型)的功能学差异及其生物学意义。【方法】采用 PCR 的方法扩增 29 例鼻咽癌组织石蜡标本和 14 例健康成人外周血标本(总共 43 例)中的 Qp 序列, PCR 产物测序后分析其突变情况, 统计学分析 Qp 中的点突变与鼻咽癌的相关性。把突变型和原型 Qp 分别克隆到荧光素酶报告基因载体上, 检测相对光强度(RLU), 比较突变型与原型 Qp 启动转录的活性。使用染色质免疫共沉淀(ChIP)实验来比较突变型和原型 Qp 与 Sp1 蛋白的亲合力。【结果】通过 PCR 扩增和测序实验, 证实 Qp 的突变与鼻咽癌有密切的相关性($P=0.0395$, < 0.05)。突变型 Qp 启动转录的活性明显高于原型(RLU 之比约为 2.5:1, $P < 0.05$), 并且突变型 Qp 与 Sp1 的亲合力较原型 Qp 增强约 1.52 倍。【结论】在鼻咽癌组织中, 突变型 Qp 可能通过增强与 Sp1 亲和力的机制, 使其启动转录的活性明显增强。Qp 特定位点的突变在 EB 病毒对鼻咽上皮细胞的感染和转化过程中可能起了重要的作用。

关键词: 鼻咽癌; EB 病毒; EB 病毒核抗原 1; 变异型; 启动子

中图分类号: R73-3

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2010)01-0023-05

Variation and Functional Study of Q Promotor of Epstein-Barr Virus in Nasopharyngeal Carcinoma

HUANG Yu-fan¹, LIAO Yi-ji¹, LIU Wen-ju¹, HUA Wen-feng¹, DENG Hai-xia¹,
MAI Shi-juan¹, XIE Dan¹, ZONG Yong-sheng²

(1. Department of Experimental Research, 2. Department of Pathology, State Key Laboratory of Oncology in Southern China

//Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the variation of Q promoter (Qp) in nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells, and to compare the existing two mutant sites [62 225 site(g→a) and 62 422 site (g→c)] Qp in NPC cells with the Qp in B95.8 cell line in the functional and biological difference. 【Methods】 The Qp sequence was amplified in the samples from 29 cases of paraffin-embedded tissues of NPC suffers and 14 cases of peripheral blood of healthy adults by polymerase chain reaction (PCR) method (totally 43 cases). The point mutations on specified sites were analyzed and statistically compared from sequencing results. The sequences of variant and prototype Qp were amplified by PCR and cloned into luciferase reporter vector (pGL3-basic), then transfected into HaCat cells respectively. The transcriptional activity was compared between variant and prototype Qp using luciferase reporter system. The DNA binding affinity of mutant and prototype Qp to Sp1 was compared through chromatin immunoprecipitation (ChIP) method since mutation of nt 62 225 located in a Sp1 binding site. 【Results】 The mutation rate of Qp was significantly higher in NPC compared with healthy controls ($P = 0.0395$, < 0.05), which suggested the variant Qp was closely associated with NPC. The transcription of the luciferase gene promoted by variant Qp was significant more than that of prototype Qp in transient transfection assay (2.5:1, $P < 0.05$). The binding affinity of variant Qp to Sp1 was about 1.52 times higher than that of prototype Qp as determined by quantitative ChIP assay. 【Conclusions】 The transcriptional activity was enhanced in variant Qp in NPC cells compared with prototype, which possibly through the higher binding affinity to Sp1. We suggest that the mutated Qp may play an important role during the EBV infection and transformation of nasopharyngeal epithelium.

收稿日期: 2009-03-30

基金项目: 国家重点基础研究计划(973)项目(2006CB910104); 国家自然科学基金(30400493)

作者简介: 黄宇帆, 硕士, E-mail: 001397@sina.com.cn; * 通信作者: 买世娟, 副研究员, 硕士生导师, E-mail: maishj@mail.sysu.edu.cn

Key words: nasopharyngeal neoplasm; Epstein-Barr virus; Epstein-Barr virus nuclear antigen 1; variant; promoter

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(1):23-27]

鼻咽癌是中国南部省份和东南亚其它地区高发发病率的肿瘤之一,其发生发展可能与基因易感性、环境危险因素、特定饮食习惯和 EB 病毒(Epstein-Barr Virus, EBV)感染及突变^[1]等因素有关。EB 病毒在肿瘤细胞中以潜伏感染的形式存在,其基因组在每个细胞周期中复制一次并保持稳定的拷贝数^[2-4]。EB 病毒核抗原 1(Epstein-Barr viral nuclear antigen 1, EBNA1)不仅是 EB 病毒基因组复制和维持拷贝数稳定所必须的,而且是调节自身表达所必须的^[5]。EBNA1 的表达在鼻咽癌中是由 Qp 启动^[6],因此该启动子与鼻咽癌可能存在直接或间接的联系。目前,国内外尚未见关于突变型 Qp 与鼻咽癌相关的报道,并且也未见突变型 Qp 的功能学及机制等问题的报道。本研究中,我们从鼻咽癌组织与健康人外周血标本的 DNA 中用 PCR 方法分别扩增出 Qp 序列并测序,结果发现与 B95.8 原型相比,鼻咽癌中 Qp 启动子有两个位点常发生点突变,即:62 225 位点 g→a 突变,62 422 位点 g→c 突变,而且在病例与健康人标本中的突变率有明显差异。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 永生化的人表皮细胞来源的 HaCat 细胞,购自中山大学实验动物中心。B95.8 细胞和鼻咽癌细胞株 C666-1 由本实验室收藏。

1.1.2 主要试剂 pGL3-basic 载体、T4 连接酶、双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自 Promega 公司;DH5- α 感受态细菌,核酸内切酶 *Bgl* II 和 *Hind* III、*rTaq* 酶、*LATaq* 酶、*pyrobestTaq* 酶(高保真)、DNAmate(核酸共沉剂)、PCR 引物合成、DNAMarker:1 500 bp Ladder 购自 Takara 公司;质粒小提试剂盒,质粒大提试剂盒,凝胶回收试剂盒、石蜡标本 DNA 抽提试剂盒购自 QIAGEN 公司;胎牛血清和 RPMI-1640 培养基购自 Hyclone 公司;优化无血清培养基 Opti-mem 和转染试剂 Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司;其它常用实验耗材购自 BD 公司。ChIP 实验试剂盒(cat#17-295)和 Sp1 抗体(cat#07-645)购自美国 Upstate 公司。广东鼻咽癌患者的石蜡标本来自中山大学附

属肿瘤防治中心病理科,对照组的外周血标本来自广东省的 EB 病毒健康携带者。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HaCat 细胞、B95.8 细胞和 C666-1 细胞用含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 的培养箱内饱和湿度培养。

1.2.2 DNA 抽提 使用 QIAGEN 公司的 DNA 抽提试剂盒,按照试剂盒操作手册抽提鼻咽癌石蜡标本、健康成人外周血标本、C666-1 细胞及 B95.8 细胞的 DNA,并测定 DNA 的浓度及纯度。

1.2.3 引物设计 扩增 Qp 序列的上游引物 5' 端加入 *Bgl* II 酶切位点:Qp-S:5' tcAGATCT tataacgcaggctctg3', 下游引物的 5' 端加入 *Hind* III 酶切位点:Qp-A:5' cgcAAGCTTtgaaggatagcatg 3', PCR 产物全长 294 bp。扩增的 Q 启动子序列长 277 bp(nt 62 203 ~ 62 479),包括了 Qp 中-219 ~ +58 的区域。染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)实验所用引物为 ChIP-S1:(5' tataacgcaggctctgttccg 3') 和 ChIP-A1 (5' actttcgttttcgcaaaagcg 3'), PCR 产物长 215 bp,包括了 Q 启动子上两个 Sp1 结合位点。

1.2.4 PCR 扩增和测序 使用 *rTaq* 酶分别扩增来自鼻咽癌石蜡标本和健康成人外周血标本的 DNA,采用 20 μ L 的体系,94 °C 2 min,反应循环 94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s,40 circles,72 °C 10 min,4 °C 停止;PCR 产物经琼脂糖电泳鉴定后送广州英俊生物公司双向测序。

1.2.5 荧光素酶报告基因载体的构建及鉴定 使用 *pyrobest* 高保真酶(Takara 公司)和 Qp-S、Qp-A 引物分别扩增提取自 C666-1 和 B95.8 细胞的 DNA,PCR 产物经琼脂糖电泳并切胶回收和纯化后,经两次酶切(*Bgl* II 和 *Hind* III)后分别同已经相同酶切并纯化后的 pGL3-basic 载体片段混合,在 T4 连接酶的作用下 4 °C 过夜,第 2 天转化 DH5- α 感受态菌,涂布含 100 μ g/mL amp 的半固态 LB 平板。第 2 天挑克隆用 PCR 法初步鉴定,将 PCR 鉴定为阳性的克隆加入 6 mL LB 中 37 °C 摇菌过夜,质粒小提后取 2 μ g 进行 *Bgl* II 和 *Hind* III 酶切鉴定,阳性质粒送广州英俊生物公司测序鉴定,得到正确的重组克隆:pGL3-basic-pQp(来自 B95.8)

和 pGL3-basic-vQp (来自 C666-1), 用质粒大试剂盒大量抽提 pGL3-basic、pGL3-basic-pQp 和 pGL3-basic-vQp 用于后续的实验。

1.2.6 荧光素酶活性检测试验 HaCat 细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于 24 孔板中, 第 2 天生长至 90% ~ 95% 融合时进行转染。每孔同时转染两种质粒, 0.4 μg 的 pGL3-basic 或 pGL3-basic-pQp 或 pGL3-basic-vQp 重组质粒, 以及 10 ng 的 pRL-TK 载体 (Promega 公司)。双荧光素酶活性检测按照双荧光素酶报告基因分析系统 (Promega 公司) 操作手册进行。转染 48 h 后, $1 \times \text{PBS}$ 液洗涤细胞 2 次, 每孔加入 100 μL PLB 裂解细胞。取 20 μL 裂解上清加入 50 μL ARII, 混匀后立即在单管式化学发光分析仪 (SIRIUS Luminometer V3.1) 上检测 Firefly 荧光素酶活性 (F 值), 再加入 $1 \times \text{Stop\&Glo}$ 溶液 50 μL 检测 Renilla 荧光素酶的活性 (R 值)。以 Firefly 活性与 Renilla 活性的比值即相对光强度 (relative light units, RLU) 表示各组转录活性。计算各组 F/R 值。

1.2.7 染色质免疫共沉淀实验 将 HaCat 细胞以 1×10^6 个/皿的密度接种于 10 cm 培养皿中, 第 2 天生长至 90% ~ 95% 融合时进行转染。每皿分别转染 12 μg 的 pGL3-basic-pQp 或 pGL3-basic-vQp 重组质粒, 培养 48 h, 10 g/L 的甲醛固定 10 min, 冰冷的 PBS 洗涤 2 次后刮下细胞, 收集入 EP 管中。实验按照 ChIP 试剂盒 (UpState 公司: cat#17-295) 操作手册进行。甲醛固定, 超声裂解 (优化后的条件: 12 Khmz, 5 s, once), 抗体沉淀, 尼龙球沉淀, 洗脱, DNA 纯化, PCR 扩增; 其中“pQp + 抗体”和“vQp + 抗体”均加 10 μg Sp1 抗体 (购自 Upstate 公司: cat#07-645) 沉淀, “pQp”和“vQp”未加 Sp1 抗体沉淀 (作为阴性对照); 每个样品纯化得到的 DNA 均溶解于 30 μL 的超纯水中, 将作为后续 PCR 反应的模板。使用 rTaq 酶扩 ChIP 沉淀产物, 采用 20 μL 的体系, 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 反应循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 28 circles, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 停止。PCR 产物上样及电泳: “pQp + anti”、“pQp”、“vQp + anti”和“vQp”各取 7 μL 上样, 而对应的 input 各取 2.5 μL 上样; 在 3% 的琼脂糖中于 0.5 \times 的 TBE Buffer 中 120 V 电压下电泳 30 min, 采用凝胶成像仪采集图片 (见图 3)。补充实验: Sp1 抗体经 Western blotting 证实 HaCat 细胞中只存在一条特异结合带。

2 结 果

2.1 鼻咽癌石蜡标本和健康成人外周血标本 DNA 的 PCR 产物测序结果

由图 1 可见, 与 B95.8 型相比, 来自 C666-1 细胞的 Qp 发生了第 62 225 位点 g \rightarrow a 突变和第 62 422 位点 g \rightarrow c 突变。本实验中我们随机选取 29 例鼻咽癌石蜡标本和 14 例健康成人外周血标本, 提取 DNA 扩增 Qp 序列, PCR 产物测序结果发现, 在鼻咽癌组中两个位点都突变的有 18 例、两位点都未突变有 9 例、单位点突变 2 例, 健康成人组两位点都突变的有 4 例、两位点都未突变的有 8 例、单位点突变 2 例。采用 SAS8.1 统计软件进行病例对照的 χ^2 (chi-square) 检验, 鼻咽癌标本组中两个位点都发生突变的概率明显高于健康人组 ($P=0.0395$), 提示了 62 225 位点 (g \rightarrow a) 和 62 422 位点 (g \rightarrow c) 点突变与鼻咽癌有密切的相关性。

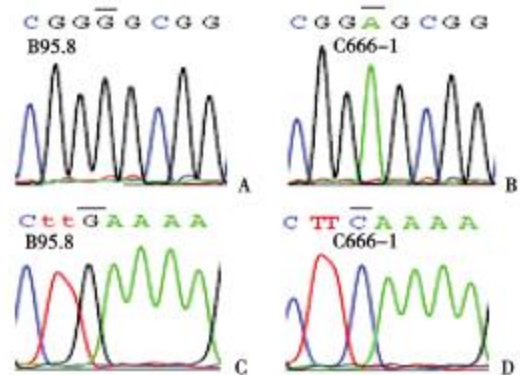


图 1 来自 B95.8 和 C666-1 细胞的 Qp 测序结果
Fig.1 Sequencing of results Qp in B95.8 cells and C666-1 cells

2.2 报告基因重组质粒转染 HaCat 细胞后荧光素酶检测试验

将 pGL3-basic 或 pGL3-basic-pQp 或 pGL3-basic-vQp 重组质粒以及内参照 pRL-TK 共转染 HaCat 细胞, 报告基因相对荧光素酶活性 F/R 值结果显示, 与 pGL3-basic 空载体 (0.028 ± 0.004) 相比, 转染 pGL3-basic-pQp (0.742 ± 0.065) 和 pGL3-basic-vQp (1.893 ± 0.277) 重组质粒的两组细胞荧光素酶活性均明显增强 ($P < 0.05$, t 检验), 提示 pQp 和 vQp 两种启动子均有启动转录的活性。以 pGL3-basic 空载体的转录活性为基准 (设为 1), pGL3-basic-pQp 和 pGL3-basic-vQp 质粒相

应启动转录的活性分别为 26.7 ± 2.3 和 68.1 ± 9.8 ; 并且 pGL3-basic-vQp 质粒启动转录的活性又明显高于 pGL3-basic-pQp 质粒组 ($P < 0.05$, t 检验), 提示 62 225 位点 (g→a) 和 62 422 位点 (g→c) 有突变的 Qp 启动转录的活性与原型相比明显增强(图 2)。

2.3 染色质免疫共沉淀实验

根据文献报道, Qp 上有两个 Sp1 结合位点, 而第 62225 位点正位于其中一个 Sp1 结合位点上。因此, 为了探究突变型 Qp 启动转录的活性增强的机制, 我们采用染色质免疫共沉淀来检测突变型 Qp 与细胞 Sp1 的亲合力是否改变。本实验的结果(图 3)显示: Qp 能与 HaCat 细胞中的 Sp1 蛋白特异地结合, 见图 3 中 ChIP-P1 引物组的泳道 1 和 3 均分别扩出了各自的目的带; 用 Quantity One 4.62 软件做灰度分析, 图 3 中泳道 3 目的带的灰度比泳道 1 增强了 1.52 倍, 提示了 vQp 与 Sp1 的亲合力比 pQp 明显增强。

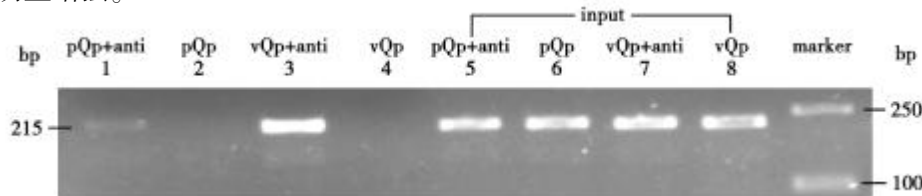


图 3 转染 pGL3-basic-pQp 和 pGL3-basic-vQp 重组体的 HaCat 细胞进行 ChIP 实验的 PCR 产物电泳图

Fig.3 Electrophoretogram of the PCR products for chromatin immunoprecipitation (ChIP) of HaCat cells

Lane 1: HaCat cells transfected with pGL3-basic-pQp were carried on ChIP assay with addition of anti-Sp1; Lane 2: HaCat cells transfected with pGL3-basic-pQp were carried on ChIP assay without addition of anti-Sp1; Lane 3: HaCat cells transfected with pGL3-basic-vQp were carried on ChIP assay with addition of anti-Sp1; Lane 4: HaCat cells transfected with pGL3-basic-vQp were carried on ChIP assay without addition of anti-Sp1; Lane 5, 6, 7 and 8 were the inputs corresponding to Lane 1, 2, 3 and 4. The PCR products is 215bp in length.

3 讨论

3.1 突变型 Qp 与鼻咽癌的相关性研究

本研究通过 PCR 的方法分别扩增了鼻咽癌石蜡组织标本和健康成人外周血标本中的 EB 病毒 Qp 序列并进行测序, 研究分析发现 Qp 的突变与鼻咽癌存在密切的相关性。在鼻咽癌中常可检出 Qp 上第 62 225 位点 (g→a) 和第 62 422 位点 (g→c) 的点突变, 其中第 62 225 位核苷酸位于 Qp 上的一个 Sp1 结合位点内, 第 62 422 位点是 Qp 的转录起始位点; 统计结果发现突变型 Qp 与鼻咽癌存在相关性 ($P = 0.0395$, < 0.05), 提示了 EB 病毒 Qp 的突变在鼻咽癌的发生发展过程中可能起了一定的作用。

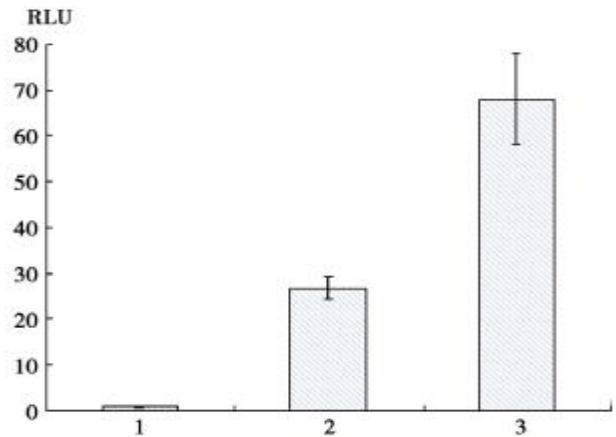


图 2 pGL3-basic、pGL3-basic-pQp 和 pGL3-basic-vQp 转染 HaCat 细胞后的相对荧光素酶活性

Fig.2 Relative light units of HaCat cells transfected with pGL3-basic, pGL3-basic-pQp or pGL3-basic-vQp

Lane 1: pGL3-basic transfected group; Lane 2: pGL3-basic-pQp transfected group; Lane 3: pGL3-basic-vQp transfected group; RLU: relative light units

3.2 突变型 Qp 可能会上调 EBNA1 的表达

EBNA1 是唯一在每个鼻咽癌细胞中均有表达的 EB 病毒潜伏期蛋白, 对于维持 EB 病毒的稳定感染有重要的作用。在鼻咽癌中, EBNA1 的表达由 Qp 启动^[7]。我们克隆了原型和突变型 Qp 并重组到荧光素酶报告质粒 pGL3-basic 上, 通过检测相对荧光素酶活性, 发现突变型 Qp 启动转录的活性与原型相比明显增强。这提示突变型 Qp 有可能通过上调 EBNA1 蛋白的表达来促进病毒在鼻咽上皮细胞中的稳定感染, 从而有助于鼻咽癌的发生发展进程。

3.3 突变型 Qp 增强了与 Sp1 的亲合力可能是其上调 EBNA1 表达的机制

与细胞管家基因的启动子相似, Qp 的 TATA 序列含量少, 主要靠富含 CpG 序列的启动元件发

挥作用, 其活性受普遍存在的细胞转录因子 Sp1 的调控^[7-9], Qp 的 CpG 岛通过与不受甲基化影响的细胞因子(如 Sp1 等)结合来使自身处于未甲基化状态^[10]。CpG 序列在 EB 病毒基因表达调控中起非常重要的作用, 甲基化状态是其表达调控的机制之一^[11]。Qp 内 CpG 序列的低甲基化与 Qp 的持续活性存在较强的相关性; 并且通过将 Qp 内 CpG 序列甲基化的实验发现 Qp 的活性明显受到抑制, 从而揭示出 CpG 序列的低甲基化状态是保持 Qp 活性所必须的^[7]。Qp 内存在两个 Sp1 结合位点^[7], 当这些位点与 Sp1 结合后就会阻止邻近的序列被甲基化^[12-13]。本研究发现在鼻咽癌标本中, 第一个 Sp1 位点存在 g→a 的点突变, 因此, 为了进一步研究突变型 Qp 启动转录的活性增强的机制, 我们进行染色质免疫共沉淀实验来探究突变型 Qp 与 Sp1 蛋白亲和力是否改变, 结果发现突变型 Qp 与 Sp1 蛋白的亲和力明显强于原型。这部分解释了本研究中突变型 Qp 启动转录的活性增强的原因; 即突变 Qp 与 Sp1 的亲和力增强, 其 CpG 岛更多地处于未甲基化状态, 于是就具有更强的启动转录的活性。因此具有更强启动转录活性的突变型 Qp 能更有效地启动 EBNA1 的表达, 使含该突变型 Qp 的 EB 病毒的潜伏感染状态更加稳定, 从而促进了 EB 病毒的转化过程。

综上所述, 我们的研究发现在鼻咽癌细胞中 EB 病毒的 Q 启动子存在有两个位点的碱基突变, 其中第一个位点的突变使 Qp 与 Sp1 的结合力增强, 并可能通过降低 Qp 的甲基化水平使 Qp 的转录活性增强, 促进 EBNA1 等病毒蛋白的表达, 从而有助于 EB 病毒在鼻咽上皮的潜伏感染。另外, 鼻咽癌中 EB 病毒 Qp 上的第二个突变位点(第 62 422 位点, g→c)是 Qp 的转录起始位点, 这个突变是否能引起 Qp 转录起始位点的改变或其它功能的改变, 以及其在 EB 病毒感染和鼻咽癌发病中的意义还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 买世娟, 张晓实, 李大疆, 等. EBNA1 基因在广东地区人群中的变异特征及与鼻咽癌的相关性 [J]. 科学通报, 2004, 49(22): 2369-2372.
- [2] Cickusi E, Mustedanagi-Mujanovi J, Iljazovi E, et al. Association of Hodgkin's lymphoma with Epstein Barr virus infection [J]. Bosn J Basic Med Sci, 2007, 7(1): 58-65.
- [3] Kelly GL, Milner AE, Baldwin GS, et al. Three restricted forms of Epstein-Barr virus latency counteracting apoptosis in c-myc-expressing Burkitt lymphoma cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(40): 14935-14940.
- [4] 宗永生, 钟碧玲, 张敏, 等. B 病毒在鼻咽癌变过程中作用的研究 [J]. 中山医科大学学报, 2002, 23(3): 161-164.
- [5] Lindner SE, Sugden B. The plasmid replicon of Epstein-Barr virus: mechanistic insights into efficient, licensed, extrachromosomal replication in human cells [J]. Plasmid, 2007, 58(1): 1-12.
- [6] Bell AI, Groves K, Kelly GL, et al. Analysis of Epstein-Barr virus latent gene expression in endemic Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma tumour cells by using quantitative real-time PCR assays [J]. J Gen Virol, 2006, 87(Pt10): 2885-2890.
- [7] Qian T, Keith D, Robertson Angela M, et al. The Epstein-Barr virus major latent promoter qp is constitutively active, hypomethylated, and methylation sensitive [J]. J Virol, 1998, 9(9): 7075-7083.
- [8] Tang H, Goldberg E. Homo sapiens lactate dehydrogenase c (Ldhc) gene expression in cancer cells is regulated by transcription factor Sp1, CREB, and CpG island methylation [J]. J Androl, 2009, 30(2): 157-167.
- [9] Chang LK, Chung JY, Hong YR, et al. Activation of Sp1-mediated transcription by Rta of Epstein-Barr virus via an interaction with MCAF1 [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(20): 6528-6539.
- [10] Mudduluru G, Allgayer H. The human receptor tyrosine kinase Axl gene-promoter characterization and regulation of constitutive expression by Sp1, Sp3 and CpG methylation [J]. Biosci Rep, 2008, 28(3): 161-176.
- [11] Bakos A, Banati F, Koroknai A, et al. High-resolution analysis of CpG methylation and in vivo protein-DNA interactions at the alternative Epstein-Barr virus latency promoters Qp and Cp in the nasopharyngeal carcinoma cell line C666-1 [J]. Virus Genes, 2007, 35(2): 195-202.
- [12] Butta N, Larrucea S, Alonso S, et al. Role of transcription factor Sp1 and CpG methylation on the regulation of the human podocalyxin gene promoter [J]. BMC Mol Biol, 2006, 7(17): 1-12.
- [13] Senigl F, Plachý J, Hejnar J. The core element of a CpG island protects avian sarcoma and leukosis virus-derived vectors from transcriptional silencing [J]. J Virol, 2008, 82(16): 7818-7827.