

## 三乙烯四胺对 *c-myc* 启动区转录活性的调节作用

邓小红, 殷 菲, 刘建辉\*, 郭莉霞

(重庆工商大学药物化学与化学生物学研究中心, 重庆 400067)

**摘要:** **目的** 探讨三乙烯四胺 (TETA) 如何调节 *c-myc* 基因表达。**方法** 利用圆二色谱分析 TETA 对 *c-myc* 启动区核酸酶超敏元件 III<sub>1</sub> (*c-myc* NHE III<sub>1</sub>) 碱基序列形成的 G-四链体 DNA (G4-DNA) 结构稳定性的影响。同时, 分别构建含 *c-myc* NHE III<sub>1</sub> 的野生型和突变型的 *c-myc* 启动区荧光报告质粒, 并分别转染 HEK293 细胞 24 h 后, 再接种到 96 孔板, TETA 以终浓度 0, 0.1, 1.0, 10 及 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  处理 8 h, 测定荧光素酶活性, 计算 TETA 对其转录活性抑制率。**结果** 圆二色谱实验结果表明, TETA 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  就能够进一步增强 *c-myc* NHE III<sub>1</sub> 在 240 nm 处的负峰和 260 nm 处的正峰的形成, 即增强 G4-DNA 结构的稳定性。报告基因分析结果表明, TETA 能够浓度依赖性地抑制野生型 *c-myc* 启动区荧光素酶基因的表达, 但对突变型 *c-myc* 启动区荧光素酶基因的抑制能力明显下降。在 TETA 1  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  作用时, 对突变型 *c-myc* 启动区荧光素酶基因抑制率仅为 4.3%, 而对野生型的抑制率还高达 30.4%。**结论** TETA 可能通过稳定 *c-myc* NHE III<sub>1</sub> 序列形成的 G4-DNA 结构调节基因的表达。**关键词:** 三乙烯四胺; 基因, *c-myc*; 启动区; 核酸酶超敏元件 III<sub>1</sub>

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2009)05-0375-06

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2009.05.007

收稿日期: 2009-01-19 接受日期: 2009-05-12

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (30600813); 国家自然科学基金资助项目 (30701020); 教育部新世纪优秀人才计划资助项目 (NCET-07-0913); 重庆科委公关项目资助项目 (CSTC, 2008AC5028)

**作者简介:** 邓小红, 女, 在读博士, 主要从事分子生物学与生物化学的研究。

\* 联系作者 E-mail: jhliu@ctbu.edu.cn Tel: (023) 62769652

*c-myc* 是一种重要的转录因子, 参与多种生理功能, 如在 G<sub>1</sub>/S 的过渡、G<sub>2</sub>/M 的转化中都有作用, 与细胞的生长、增殖、分化密切相关。它同时也是一种重要的原癌基因, 是肿瘤发生发展的多种信号通路的关键交汇点, 其表达失调与肿瘤的发生发展密切相关<sup>[1-2]</sup>。

研究表明, 85% ~ 90% *c-myc* 基因的转录是由 *c-myc* 启动区核酸酶超敏元件 III<sub>1</sub> (*c-myc* promoter region nuclease hypersensitive element III<sub>1</sub>, *c-myc* NHE III<sub>1</sub>) 所控制<sup>[3]</sup>。该序列位于 *c-myc* 基因转录起始位点上游约 120 bp 左右, 富含 G-C 碱基, 因此在 K<sup>+</sup> 存在的条件下, 该序列容易通过形成 G-四链体 DNA (G-quadruplex DNA, G4-DNA) 结构而抑制 *c-myc* 基因的转录。鉴于 *c-myc* 是人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 的重要转录因子, 而端粒酶在肿瘤的形成及发展过程中具有十分重要的作用, 因此, *c-myc* NHE III<sub>1</sub> 成为了抗肿瘤药物的潜在作用靶点。目前, 已有多种小分子化合物显示出对 G4-DNA 的稳定作用, 其中包括酰胺蒽醌类化合物<sup>[4-6]</sup> 及卟啉类化合物等<sup>[7-8]</sup>。

前期研究表明, 三乙烯四胺 (triethylene tetramine, TETA) 是一种非常有效的端粒酶抑制剂, 它能够通过稳定人端粒 DNA 形成的 G4-DNA 结构抑制端粒酶活性<sup>[9]</sup>。近期, 本实验室研究表明, TETA 也能够增强 NHE III<sub>1</sub> 区形成的 G4-DNA 结构的稳定性, 并抑制 *c-myc* 及其下游 hTERT 基因的表达, 显示出良好的端粒酶抑制活性, 以及抗肿瘤的潜力<sup>[10-11]</sup>。但 TETA 如何抑制 *c-myc* 基因表达还不清楚。

本研究利用圆二色谱法分析 TETA 对 G4-DNA 稳定性的影响, 再通过报告基因法以及基因定点突变技术分析 TETA 在细胞内对 *c-myc* 启动子的调节作用, 为 TETA 抑制 *c-myc* 基因表达提供直接证据, 同时为 TETA 作为一种抗肿瘤药物的应用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

*c-myc* NHE III<sub>1</sub> 寡核苷酸序列(5'-TGGGGAGGG-TGGGGAGGGTGGGGAAGG-3')由大连 TaKaRa 生物公司合成。*c-myc* 启动区质粒 Pbv-Del1 由美国哈佛大学医学院 Dr. Bert Vogelstein 惠赠,限制性内切酶 *Nhe* I 和 *EcoRV* 购自 TaKaRa 公司,*c-myc* 启动子突变体引物由上海生工合成,突变试剂盒购自 Stratagene 公司,Bright-Glo™ 荧光试剂购自 Promega 公司,转染试剂 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司。HEK293 细胞株,购自中国科学院上海生化细胞所。细胞培养液 DMEM、胎牛血清均购自 Hyclone 公司,TETA 购自 Sigma 公司。

### 1.2 圆二色谱分析 G4-DNA 与三乙四胺的作用

将 *c-myc* NHE III<sub>1</sub> 寡核苷酸加入 Tris-HCl 缓冲液(10 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7.4)中,使其终浓度为 10 μmol·L<sup>-1</sup>。实验设 3 组,分别加入 KCl 1 mmol·L<sup>-1</sup>, TETA 5 μmol·L<sup>-1</sup> + KCl 1 mmol·L<sup>-1</sup>, TETA 5 μmol·L<sup>-1</sup>。按照实验设计,先加入 KCl,95℃ 变性 10 min,再加入 TETA(用稀盐酸将 pH 调节到 7.4),缓慢冷却至室温。样品总体积为 200 μL。制备好的样品保存于 4℃。

圆二色性(circular dichroism, CD)的测定用 Jasco J-820 型圆二色谱仪完成。扫描范围 320~200 nm,石英杯径 1 mm,扫描速度 20 nm·min<sup>-1</sup>,每一样品扫描 4 次,室温测定。实验以同种离子条件缓冲液作为参比。G4-DNA 具有明显的 CD 特征,即“平行型”的 G4-DNA 在 260 nm 具有一个正峰,在 240 nm 具有一个负峰,且与峰值的强弱成正比<sup>[12]</sup>。

### 1.3 野生型 *c-myc* 启动区荧光报告质粒的构建

将 *c-myc* 启动区 2500 bp 的 DNA 片段通过 *Nhe* I 和 *EcoRV* 限制性内切酶从 Pbv-Del 1 质粒上酶切下来,再与相同酶切后的 PGL3-basic 质粒相连。连接后产物转化大肠杆菌 DH5α,挑取单克隆,提取其质粒,进行 *Nhe* I 和 *EcoRV* 酶切鉴定,将酶切片段大小相符的质粒送 TaKaRa 公司测序并命名为野生型 *c-myc* 启动区荧光报告质粒。

### 1.4 突变型 *c-myc* 启动区荧光报告质粒的构建

根据 GenBank 登录号: AC103819 [gi: 22539123]中的 *c-myc* 基因序列,根据其启动子区序列,设计突变引物将 G12→A 为,上游: ATGGG-GAGGGTGAGGAGGGTGGGGAAGGTGGGG, 下游:

TTCCCCACCCTCCTCACCTCCCCATAAGCGCC (下划处为突变位点,即 NHE III<sub>1</sub> 中的 G12 突变为 A)。根据 Stratagene 的突变试剂盒说明,首先以野生型 *c-myc* 启动区质粒为模板进行 PCR 扩增,再将 *Dpn* I 酶加入到扩增产物中,37℃ 作用 1 h 后直接转化到 XL-bule 菌,涂板。37℃ 过夜培养,挑取单克隆菌,提取质粒后,用 *Nhe* I 和 *EcoRV* 进行酶切鉴定,将酶切片段大小相符的质粒送 TaKaRa 公司测序,将突变成功的质粒突变型 *c-myc* 启动区荧光报告质粒。

### 1.5 三乙四胺对 *c-myc* NHE III<sub>1</sub> 的调节作用

将 HEK293 以 1×10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup> 密度接种于 6 孔板中,待其融合度达到 65%~80% 时准备转染。将提取的野生型 *c-myc* 启动区质粒和突变型 *c-myc* 启动区质粒的浓度均调为 0.5 g·L<sup>-1</sup> 后,将此 2 种质粒分别与脂质体 Lipofectamine™ 2000 混合均匀,转染于 HEK293 细胞中,置 37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 后,分别以 1×10<sup>9</sup> L<sup>-1</sup> 密度接种于 96 孔板,每孔 100 μL。待细胞贴壁后 2~4 h,加入稀释的 TETA,使其终浓度分别为 0, 0.1, 1.0, 10 及 100 μmol·L<sup>-1</sup>,继续培养 8 h 后,Veritas Turner Biosystems 上测定细胞的荧光值。将 TETA 0 μmol·L<sup>-1</sup> 浓度组设为对照,抑制率(%)=(对照组荧光值-检测组荧光值)/对照组荧光值×100%。每次设 3 个复孔,实验重复 3 次。

### 1.6 统计学分析

实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 Origin 软件中的 One-Way ANOVA 法对实验数据进行统计分析。

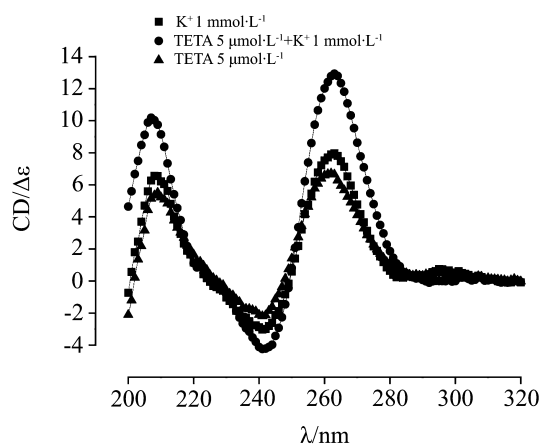
## 2 结果

### 2.1 三乙四胺与 G4-DNA 的作用

从图 1 可以看出,与 K<sup>+</sup> 相类似, TETA 5 μmol·L<sup>-1</sup> 条件下,240 nm 的负峰和 260 nm 正峰都明显形成,表明 TETA 能够稳定 G4-DNA 结构;在 K<sup>+</sup> 1 mmol·L<sup>-1</sup> 同时存在的条件下, TETA 5 μmol·L<sup>-1</sup> 处理能进一步增强 240 nm 负峰和 260 nm 的正峰,说明样品中 G4-DNA 的含量明显增加,这表明 TETA 能够促进 G4-DNA 的形成。

### 2.2 检测构建的野生型 *c-myc* 启动区荧光报告质粒

从 Pbv-Del 1 质粒上酶切下了 *c-myc* 启动子的全片断,并将其与 PGL3-basic 质粒连接。经过对单



**Fig 1. Influence of triethyl tetramine (TETA) on the stability of G-quadruplex DNA detected by circular dichroism (CD).** *c-myc* nuclease hypersensitive element III<sub>1</sub> (NHE III<sub>1</sub>) oligonucleotides were added into Tris buffers 10 mmol·L<sup>-1</sup> with final 10 μmol·L<sup>-1</sup>. Then, the solutions were heated at 95°C for 10 min and then TETA was added. The CD measurements were performed and scanned from 200 to 320 nm. For each sample, at least four spectrum scans were accumulated in a 1 cm-path length cell at a scanning rate of 20 nm·min<sup>-1</sup>. The scan of the buffer alone was subtracted from the average scan for each sample.

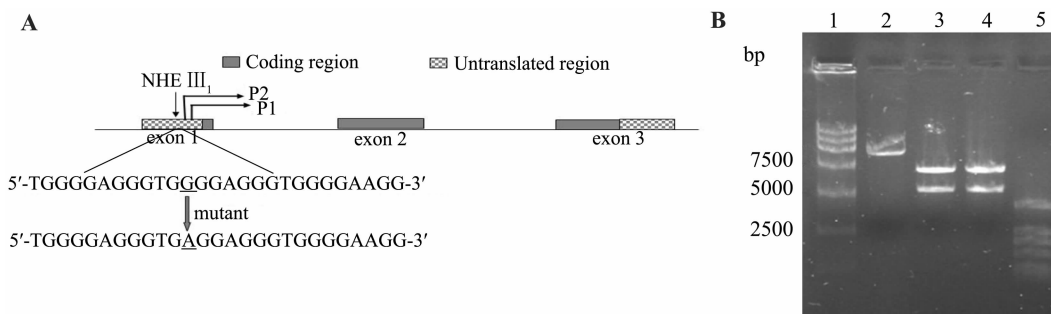
克隆菌株质粒的酶切鉴定,发现从 PGL3-basic 酶切下大小为 2500 bp 的 DNA 片段,连接成功的质粒总大小为 7300 bp 左右,说明成功构建了野生型 *c-myc* 启动区荧光报告质粒(图 2)。

**2.3 检测构建的突变型 *c-myc* 启动区荧光报告质粒**

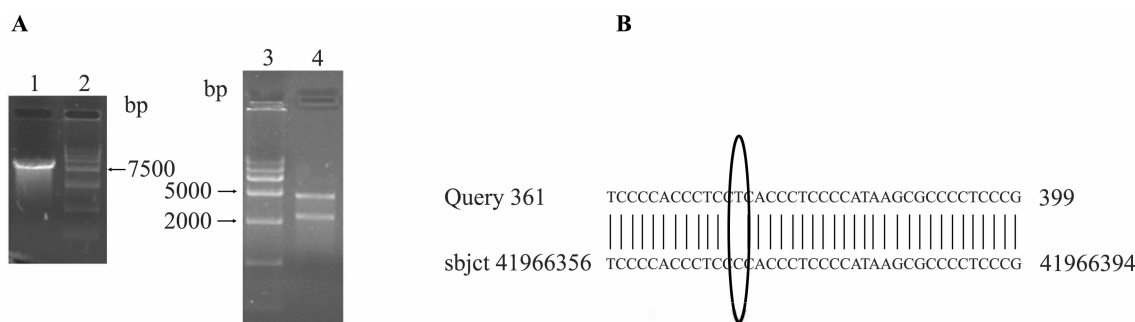
以野生型 *c-myc* 启动区荧光报告质粒为模板进行 PCR 定点突变后,经过测序结果发现,*c-myc* 启动子 NHE III<sub>1</sub> 的 G12→A 突变成功(图 3),说明成功获得了突变型 *c-myc* 启动区荧光报告质粒。

**2.4 三乙烯四胺对 *c-myc* NHE III<sub>1</sub> 的调节作用**

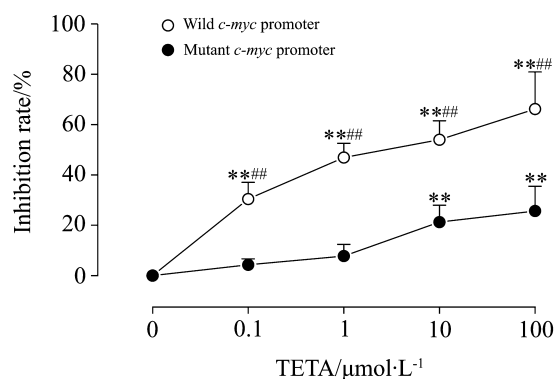
图 4 结果显示,在相同 TETA 浓度条件下,对野生型 *c-myc* 启动区荧光报告质粒荧光值的抑制率都远大于对突变型 *c-myc* 启动区荧光报告质粒荧光值的抑制率。TETA 100 μmol·L<sup>-1</sup> 作用 8 h,对野生型 *c-myc* 启动区荧光报告质粒报告基因的转录抑制率可以达到 66.2%,即使 TETA 浓度低至 1 nmol·L<sup>-1</sup>,也有明显的抑制作用,抑制率也有 30.4%。但是,当 *c-myc* NHE III<sub>1</sub> 启动子形成 G4-DNA 的关键核苷酸突变之后,TETA 对突变型的这种抑制作用明显



**Fig 2. Structure of *c-myc* gene and the location of nuclease hypersensitive element in the promoter region (A) and identification of wild *c-myc* promoter plasmid digested with *Nhe I* and *EcoR V* (B).** P1 and P2: the 2 transcription start sites of *c-myc* gene. Lane 1: DNA marker DL15000; lane 2: wild *c-myc* promoter plasmid; lanes 3 and 4: wild *c-myc* promoter plasmid digested by *Nhe I* and *EcoR V*; lane 5: DNA marker DL2000.



**Fig 3. Identification of mutant *c-myc* promoter plasmid digested with *Nhe I* and *EcoR V* (A) and sequence report (B) (circle hint mutation site).** Lane 1: plasmid of mutant *c-myc* promoter; lanes 2 and 3: marker; lane 4: mutant *c-myc* promoter plasmid digested with *Nhe I* and *EcoR V*.



**Fig 4. Effect of TETA on transcribing activity of *c-myc* NHE III<sub>1</sub>.** After the HEK293 cells were transfected with plasmid of wild and mutated *c-myc* NHE III<sub>1</sub> promoters for 24 h, the cells were replated in 96 well plate, after the cells attached, indicated concentrations of TETA were added, and incubation continued further for 8 h after that, the luciferase activities were detected with its substrate. RLU: relative light unit. Inhibition rate (%) = (RLU control - RLU sample)/RLU control × 100%.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ . \*\*  $P < 0.01$ , compared with control; \*\*\*  $P < 0.01$ , compared with mutant *c-myc* promoter plasmid group with the same TETA concentration.

下降, TETA 0.1 和 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  作用 8 h 的抑制率分别为 4.3% 和 25.7%, 表明 TETA 对 *c-myc* NHE III<sub>1</sub> 启动区的转录活性的抑制作用与其稳定该序列形成的 G4-DNA 结构有关。

### 3 讨论

本研究圆二色谱检测结果表明, TETA 能够稳定 *c-myc* NHE III<sub>1</sub> 启动子序列形成的 G4-DNA 结构, 而且能够进一步增强  $\text{K}^+$  形成的 G4-DNA 结构的稳定性, 提示 TETA 可能对 *c-myc* NHE III<sub>1</sub> 启动子调控的下游基因的表达有一定的抑制作用。为了证实此假说, 进一步构建了 *c-myc* 全长启动子的荧光报告质粒野生型 *c-myc* 启动区, 并以此质粒为模板, 在其启动子的 G4-DNA 区域内设计一突变位点, 用基因定点突变试剂盒将对其形成 G-四链体结构具有重要作用的 G12 突变为 A, 以破坏其 G-四链体结构的稳定性, 从而改变启动子的转录活性。经过 TaKaRa 公司测序, 成功获得突变型 *c-myc* 启动区质粒。报告基因分析的结果表明, TETA 能够浓度依赖性地抑制野生型 *c-myc* 启动区的转录活性; 但对突变型, 这种抑制作用明显下降。上述实验结果表明, TETA 抑制 *c-myc* 基因表达可能与其稳定 *c-myc* NHE III<sub>1</sub> 启动子形成的 G4-DNA 结构有关。

*c-myc* 基因与肿瘤有着密切的联系, 其蛋白的过表达将直接或间接导致肿瘤的发生, 而 *c-MYC* 蛋白的表达水平主要取决于其启动子的转录活性高低。*c-myc* 的启动子属于内启动, 包含在外显子 1 中。研究发现, *c-myc* 启动子中存在一段富含鸟嘌呤的重复序列, 能通过形成 G4-DNA 结构控制 *c-myc* 基因的转录。实验证实,  $\text{K}^+$  离子存在时, *c-myc* NHE III<sub>1</sub> 区碱基能够形成 4 种平行结构的 G4-DNA<sup>[13]</sup>。这些结构均可以采用圆二色谱的方法进行检测, 因为该结构具有典型的 CD 特征: 在 260 nm 处有一正峰, 240 nm 处有一负峰, 峰值的强弱与此结构含量成正比<sup>[12]</sup>。因此, 在本研究中, 利用圆二色谱在体外已经检测到在  $\text{K}^+$  存在的条件下, TETA 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  就能显著增加两峰值, 即能增强 G4-DNA 结构的形成。在细胞水平的研究发现, 当能够提高 G4-DNA 稳定的阳离子卟啉化合物 TMPyP4 作用于肿瘤细胞时, 细胞中 *c-MYC* mRNA 及蛋白水平均被下调; 与之相对应, 当 NHE III<sub>1</sub> 区的 DNA 序列发生 G 突变成 A 时, G4-DNA 的稳定性降低, *c-myc* 启动子的转录活性提高 3 倍<sup>[13-14]</sup>。Lemarteleur 等<sup>[15]</sup> 发现三嗪衍生物 9944, 阳离子卟啉化合物 TMPyP4 等通过 G4-DNA 能够有效地稳定 *c-myc* NHE III<sub>1</sub> 区形成 G4-DNA 结构, 并有可能抑制肿瘤细胞中 *c-myc* 基因的转录, 从而有可能阻止肿瘤细胞周期的进程。我们前期研究发现, TETA 能稳定人端粒 DNA 以及 *c-myc* NHE III<sub>1</sub> 形成的 G4-DNA 结构, 并能抑制 *c-myc* 基因的表达<sup>[10]</sup>。但是, 本实验室还没有获得 TETA 抑制 *c-myc* 表达的直接证据。本研究通过基因定点突变技术和报告基因法对 TETA 调节 *c-myc* NHE III<sub>1</sub> 启动子的转录活性进行了分析, 结果表明, TETA 可能通过 *c-myc* 启动子的 G4-DNA 结构对其启动子的转录活性产生调节作用。

大量的研究结果表明, *c-myc* NHE III<sub>1</sub> 形成的 G4-DNA 在不同条件下有不同的结构, 主要包括篮式结构和椅式结构<sup>[16]</sup>。该突变位点为 G12, 处于形成 G-四链体结构的关键位置, 当其被突变以后, 造成其 G-四链体结构的不稳定, 使得 G4-DNA 松散, 从而可能增加了启动子与转录调节因子作用的机会, 间接提高了其转录活性。因此, 相同 TETA 浓度下, 突变体报告基因表达的抑制率大大低于野生型。但同时发现, 高剂量的 TETA 对含有 *c-myc* NHE III<sub>1</sub> 突变体的报告基因的表达仍有一定抑制作用, 这可能是由于单个位点的突变还不能完全破坏 G4-DNA

的高级结构,其真正的原因还有待进一步研究。

#### 4 参考文献:

- [1] Ramiro AR, Jankovic M, Callen E, Difilippantonio S, Chen HT, McBride KM, *et al.* Role of genomic instability and p53 in AID-induced *c-myc*-Igh translocations [J]. *Nature*, 2006, **440**(7080):105-109.
- [2] Hemann MT, Bric A, Teruya-Feldstein J, Herbst A, Nilsson JA, Cordon-Cardo C, *et al.* Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants[J]. *Nature*, 2005, **436**(7052):807-811.
- [3] Grand CL, Han H, Muñoz RM, Weitman S, Von Hoff DD, Hurley LH, *et al.* The cationic porphyrin TMPyP4 down-regulates c-MYC and human telomerase reverse transcriptase expression and inhibits tumor growth *in vivo* [J]. *Mol Cancer Ther*, 2002, **1**(8):565-573.
- [4] Perry PJ, Gowan SM, Reszka AP, Polucci P, Jenkins TC, Kelland LR, *et al.* 1,4- And 2,6-disubstituted amidoanthracene-9,10-dione derivatives as inhibitors of human telomerase[J]. *J Med Chem*, 1998, **41**(17):3253-3260.
- [5] Perry PJ, Reszka AP, Wood AA, Read MA, Gowan SM, Dosanjh HS, *et al.* Human telomerase inhibition by regioisomeric disubstituted amidoanthracene-9,10-diones[J]. *J Med Chem*, 1998, **41**(24):4873-4884.
- [6] Neidle S, Read MA. G-quadruplexes as therapeutic targets [J]. *Biopolymers*, 2000-2001, **56**(3):195-208.
- [7] Maraval A, Franco S, Vialas C, Pratiel G, Blasco MA, Meunier B. Porphyrin-aminoquinoline conjugates as telomerase inhibitors[J]. *Org Biomol Chem*, 2003, **1**(6):921-927.
- [8] Izbicka E, Wheelhouse RT, Raymond E, Davidson KK, Lawrence RA, Sun D, *et al.* Effects of cationic porphyrins as G-quadruplex interactive agents in human tumor cells[J]. *Cancer Res*, 1999, **59**(3):639-644.
- [9] Yin F, Liu J, Peng X. Triethylene tetraamine: a novel telomerase inhibitor[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, **13**(22):3923-3926.
- [10] Yin F, Liu J, Deng XH, Wang J. Effects of triethylene tetraamine on the G-quadruplex structure in the human *c-myc* promoter[J]. *J Biochem*, 2007, **141**(5):669-674.
- [11] Liu J, Guo L, Yin F, Zheng X, Chen G, Wang Y. Characterization and antitumor activity of triethylene tetraamine, a novel telomerase inhibitor[J]. *Biomed Pharmacother*, 2008, **62**(7):480-485.
- [12] Wyatt JR, Davis PW, Freier SM. Kinetics of G-quartet-mediated tetramer formation [J]. *Biochemistry*, 1996, **35**(24):8002-8008.
- [13] Seenisamy J, Rezler EM, Powell TJ, Tye D, Gokhale V, Joshi CS, *et al.* The dynamic character of the G-quadruplex element in the *c-MYC* promoter and modification by TMPyP4 [J]. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**(28):8702-8709.
- [14] Phan AT, Modi YS, Patel DJ. Propeller-type parallel-stranded G-quadruplexes in the human *c-myc* promoter [J]. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**(28):8710-8716.
- [15] Lemarteleur T, Gomez D, Paterski R, Mandine E, Mailliet P, Riou JF. Stabilization of the *c-myc* gene promoter quadruplex by specific ligands' inhibitors of telomerase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **323**(3):802-808.
- [16] Simonsson T, Pecinka P, Kubista M. DNA tetraplex formation in the control region of *c-myc* [J]. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26**(5):1167-1172.

## Regulative effect of triethylene tetramine on transcription of *c-myc* promoter

DENG Xiao-Hong, YIN Fei, LIU Jian-Hui\*, GUO Li-Xia

(Research Center for Pharmaceutical Chemistry & Chemical Biology, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China)

**Abstract:** **AIM** To explore effects of triethylene tetramine (TETA) on the transcription of *c-myc* promoter. **METHODS** Circular dichroism (CD) was collected to identify the in-

fluence of TETA on the stability of G-quadruplex formed by *c-myc* promoter region nucleic hypersensitive element III<sub>1</sub> (*c-myc* NHE III<sub>1</sub>) sequence. Furthermore the wild and mutant re-

porter gene plasmids containing *c-myc* NHE III<sub>1</sub> sequence were constructed, the 2 plasmids were transfected into HEK293 cells respectively for 24 h. The transfected cells were replated into 96 wells plate, and treated with different concentrations of TETA (0, 0.1, 1, 10 and 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for about 8 h, the luciferase activity was determined with its substrate BrightGlo. The inhibition rate of TETA on the reporter gene was calculated by the luciferase activity. **RESULTS** TETA 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  will be able to further enhance absorption at 240 nm (the negative peak) and 260 nm (positive peak). So the TETA maybe assistant the G4-DNA structures formation and increase the stability in the *c-myc* NHE III<sub>1</sub> region. Furthermore, from the results of reporter gene analysis, TETA could inhibit the expression of reporter gene in a dose-dependent manner, but for the mutated sequence, the inhibition of TETA on the expression of reporter gene was

decreased significantly. With TETA 1  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  treated, inhibition rate of mutant-type report gene expression was only 4.3%, while the inhibition rate of wild-type was as high as 30.4%. **CONCLUSION** TETA has negative regulatory effect on *c-myc* promoter through enhancing the stability of G-quadruplex formed by the sequence of nuclease hypersensitive element III<sub>1</sub>.

**Key words:** triethylene tetramine; gene, *c-myc*; promoter region; nuclease hypersensitive element III<sub>1</sub>

**Foundation items:** The project supported by National Natural Science Foundation of China(30600813); National Natural Science Foundation of China(3070120); Program for New Century Excellent Talents in University (NCEF-07-0913); Chongqing Science & Technology Commission (CSTC, 2008AA5028)

\* Corresponding author.

(本文编辑 乔虹)

## 《中国药理学与毒理学杂志》征稿及征订启事

《中国药理学与毒理学杂志》(CJPT)是新闻出版署正式批准,由中国药理学会、中国毒理学会及军事医学科学院毒物药物研究所共同主办的学术期刊。主要刊登实验药理学与实验毒理学各分支学科的研究论著、综述、短讯及新技术方法。投稿请登录 [www.cjpt.ac.cn](http://www.cjpt.ac.cn) 在线投稿;通过本刊网站还可以免费阅读全文。

CJPT被美国《化学文摘》(CA)、《生物医学文摘》(BA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘》(EM)、波兰《哥白尼索引》(IC)收录;为中国科学引文数据库来源期刊、中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、2008年北大图书馆《中文核心期刊要目总览》(第5版)药学类核心期刊;被中国学术期刊综合评价数据库、数字化期刊全文数据库(万方数据)、中国核心期刊(遴选)数据库、中国期刊全文数据库(中国知网)、中文科技期刊数据库(维普资讯)收录。

CJPT为双月刊,国内外公开发行。国内统一刊号 CN11-1155R,国内邮发代号:82-140,国外邮发代号:BM-1051。国内每期定价为15.0元,全年定价90.0元。可以通过邮局订阅,也可以直接联系编辑部补订。

地址:北京市海淀区太平路27号毒物药物研究所《中国药理学与毒理学杂志》编辑部,邮编100850

电话:(010)68276743,66931617

E-mail: [cjpt@nic.bmi.ac.cn](mailto:cjpt@nic.bmi.ac.cn)