

大鼠谷胱甘肽 S-转移酶 P1 基因增强子及其反式作用因子的研究*

刘东远 廖名湘 方福德

(中国医学科学院基础医学研究所, 中国协和医科大学基础医学院医学分子生物学国家实验室, 北京 100005)

摘要 探讨大鼠谷胱甘肽 S-转移酶 P1 基因上游增强子元件及作用于其上特异性结合蛋白与该基因在癌细胞中高表达的关系, 用荧光素酶报告系统在 HeLa 及 CBRH7919 细胞中确定了增强子元件 I (GPE I) 及增强子元件 II (GPE II) 的活性, 并将 GPE II 的增强子活性部位定位于其上游 84 bp 的 GPE II-1 区域内. 分析对比不同细胞中结合于 GPE I 核心序列 (cGPE I)、GPE II-1 上特异性核结合蛋白, 发现 HeLa, CBRH7919 细胞中存在的 cGPE I 特异性结合蛋白及 GPE II-1 特异性的 64 ku 结合蛋白在正常大鼠肝细胞中则不存在. 因此, 上述反式作用因子可能与 GPE I, GPE II 的增强子活性及该基因在癌细胞中高表达密切相关.

关键词 谷胱甘肽 S-转移酶 P1 基因 增强子 反式作用因子

大鼠谷胱甘肽 S-转移酶 P1 (rat glutathione S-transferase P1, rGSTP1) 基因在正常大鼠肝及正常再生肝几乎不表达, 而在化学致癌物诱导的癌变细胞及肝癌前病变细胞中具有很强的表达^[1], 这种强表达是由其基因转录水平变化决定的^[2]. 对该基因上游调控序列的研究发现在 -2.5 ~ -2.2 kb 之间存在增强子元件^[3,4]. 为进一步了解该区域与 rGSTP1 基因在癌细胞中高表达的关系, 对这一区域及作用于其上的反式作用因子进行了研究.

1 材料与方法

1.1 重组荧光素酶报告质粒的构建

从含有 rGSTP1 基因上游 3.0 kb (-2 900 ~ +59 bp) 片段的质粒 E-CAT 上将 -2.5 ~ -2.2 kb 片段 GPE 用 Sac I, Acc I 双酶酶切下来, 再经 Hae III 酶切将其分为上游 122 bp (GPE II) 及下游 216 bp (GPE II) 两个片段, 然后用 Dde I 将 GPE II 切为上游 84 bp (GPE II-1) 及下游 132 bp (GPE II-2) 的片段 (图 1). 将上述酶切所获得的缺失片段分别插接至带有启动子的荧光素酶表达载体 pGL2-Promoter (Promega) 中, 重组报告质粒分别命名为 pGL2LUCGPE, pGL2LUCGPE I, pGL2LUCGPE II,

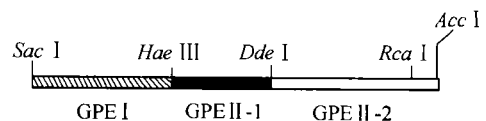


图 1 rGSTP1 基因上游 -2.5 ~ -2.2 kb GPE 区域限制性酶切图谱

1998-12-03 收稿, 1999-06-28 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目 (批准号: 39670173)

pGL2LUCGPE II -1, pGL2LUCGPE II -2.

1.2 细胞转染及酶活性测定

用磷酸钙-DNA 共沉淀法^[5]将 10 μg 待转染的荧光素酶报告质粒与作为细胞转染效率校正标准 β -半乳糖苷酶报告质粒共转染到 6×10^5 个 HeLa 及 CBRH7919 细胞(二乙基亚硝胺诱发的大鼠肝癌细胞系,中国科学院上海生物化学研究所)之中,经 60 h 的培养,裂解细胞.按文献[6]介绍的方法测定荧光素酶及 β -半乳糖苷酶活性.本实验进行 3 次转染,每次转染设 3 组平行对照.测得的荧光素酶活性经 β -半乳糖苷酶活性校正后获得相对荧光素酶活性.以 pGL2-Promoter 相对荧光素酶活性为标准 1,各报告质粒转染所得相对荧光素酶活性与之相比,获得各片段对基因表达活性的增强倍数.对数据进行统计处理,实验数据以均值 \pm 标准差表示.组间差异采用 P 检验.

1.3 探针的标记

1.3.1 末端补平标记 (1)用 *Bgl* II, *Mlu* I 将 GPE II -1 从 pGL2LUCGPE II -1 上酶切下来并回收.(2)合成寡核苷酸片段(GPE I 核心序列, cGPE I)探针: 5' CCTAGTCAGTCACTA TGATTTCAG3'和 3' CAGTCAGTCGATACTAAGTCGTCC5'.(3)在标记反应管中加入 100 ng 上述回收或合成的片段,按照文献[5]的方法进行 Klenow 合成酶补平标记.

1.3.2 全链探针标记 用 *Bgl* II, *Kpn* I 将 GPE II -1 从 pGL2LUCGPE II -1 上酶切下来,插接至 M13mp19 噬菌体载体多克隆位点区 *Bam*H I, *Kpn* I 之间.利用 M13 正向引物,以重组体 M13GPE II -1 单链为模板,按文献[6]的方法进行探针标记,然后将全链标记的 GPE II -1 探针酶切下来并用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离回收.

1.4 凝胶电泳迁移率变更实验(EMSA)

参照文献[7]的方法制备 HeLa 及 CBRH7919 细胞核蛋白抽提物,按文献[8]的方法从正常大鼠肝组织细胞中提取核蛋白.取 10 μg 核蛋白,按文献[9]的反应条件进行 cGPE I 与核蛋白结合反应,并用 4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离鉴定.

取 10 μg 核蛋白,在 10 mmol/L Na-Hepes (pH = 7.9), 50 mmol/L KCl, 2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 2 mmol/L Tris-HCl (pH = 7.9), 10% 甘油和含鲑精 DNA 的溶液中与 GPE II -1 探针进行结合反应,然后用电泳分离鉴定 GPE II -1 特异性结合蛋白.

1.5 DNA-蛋白质紫外交联实验

取 50 μg 核蛋白,参照文献[6]的方法进行 DNA-蛋白质紫外交联实验.

2 结果

2.1 rGSTP1 基因上游 GPE(-2.2 ~ -2.5 kb)区域增强子活性的确定

将重组报告质粒 pGL2LUCGPE I, pGL2LUCGPE II, pGL2LUCGPE II -1 和 pGL2LUCGPE II -2 及 pGL2-Promoter 转染 HeLa, CBRH7919 细胞并测定荧光素酶活性.结果表明,无论在 HeLa 还是在 CBRH7919 细胞中,GPE I 均能使报告基因表达强度增强 5 ~ 6 倍,是一很强的增强子元件.GPE II 也能增加基因表达强度 3 倍左右,且其增强子活性部位位于 GPE II -1 中,与 GPE I 相比为一弱的增强子元件(图 2).

2.2 结合于 cGPE I 的反式作用因子

GPE I 增强子核心部分(cGPE I)是由两个尾对尾排列的佛波酯应答类似序列(TRE)组

成^[10]. 采用 EMSA 方法比较分析不同细胞结合于 cGPE I 上的反式作用因子,发现 HeLa, CBRH7919 细胞中均存在特异性结合的蛋白质因子,其中结合带 A 为两细胞系共有的特异性结合蛋白,能被特异性的 cGPE I 竞争结合,而不被非特异性 GPE II -1 竞争结合. 在正常大鼠肝细胞中不存在与 cGPE I 结合的反式作用因子(图 3).

2.3 结合于 GPE II -1 的反式作用因子

GPE II -1 在 HeLa 及 CBRH7919 细胞中对基因表达均有增强作用. 用 EMSA 方法分析结合于其上的特异性结合蛋白,结果发现不仅在 HeLa, CBRH7919 细胞中,而且在正常大鼠肝细胞中都有特异性结合蛋白与 GPE II -1 结合. HeLa 细胞中带 I ~ IV, CBRH7919 细胞及正常大鼠肝细胞中带 I, II 为特异性结合蛋白,能被特异性的竞争结合物 GPE II -1 竞争掉,而不被非特异性的 cGPE I 所竞争. 其中 CBRH7919 细胞与正常大鼠肝细胞结合带相似(图 4). 但从 DNA-蛋白质紫外交联测定特异性结合蛋白分子量实验可以看到,HeLa, CBRH7919 细胞中均存在一 64 ku 的特异性结合蛋白,而在正常大鼠肝细胞中未见这一结合带(图 5).

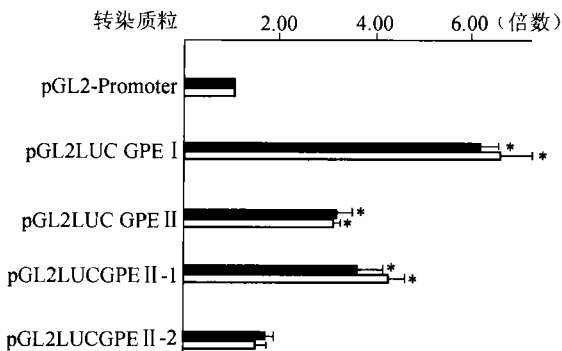


图2 重组报告质粒细胞转染结果示意图
 $\bar{x} + s, n = 3$. ■表示 HeLa 细胞, □表示 CBRH7919 细胞,
 * $P < 0.01$, 与同种细胞 pGL2-Promoter 组相比较

		HeLa					CBRH7919				NRLC
ucGPE I (倍)	0	0	100	300	0	0	100	300	0	0	
uGPE II -1 (倍)	0	0	0	0	300	0	0	0	300	0	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

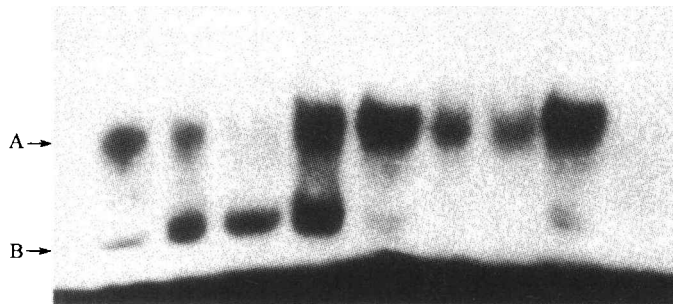


图3 cGPE I 特异性 EMSA 结合图谱

所用细胞类型,非标记竞争结合物类型及非标记竞争结合物过量于标记探针摩尔倍数比标注于图上方. NRLC 为正常大鼠肝细胞,ucGPE I 为非标记 cGPE I (特异性竞争结合物),uGPE II -1 为非标记 GPE II -1(非特异性竞争结合物)

3 讨论

rGSTP1 基因在正常大鼠肝细胞中几乎不表达,而在化学致癌物诱导的肝癌及癌前病变细胞中有强表达,该基因 5'侧上游 -2.5 ~ -2.2 kb 之间的增强子元件与其在癌细胞中的高表达密切相关.

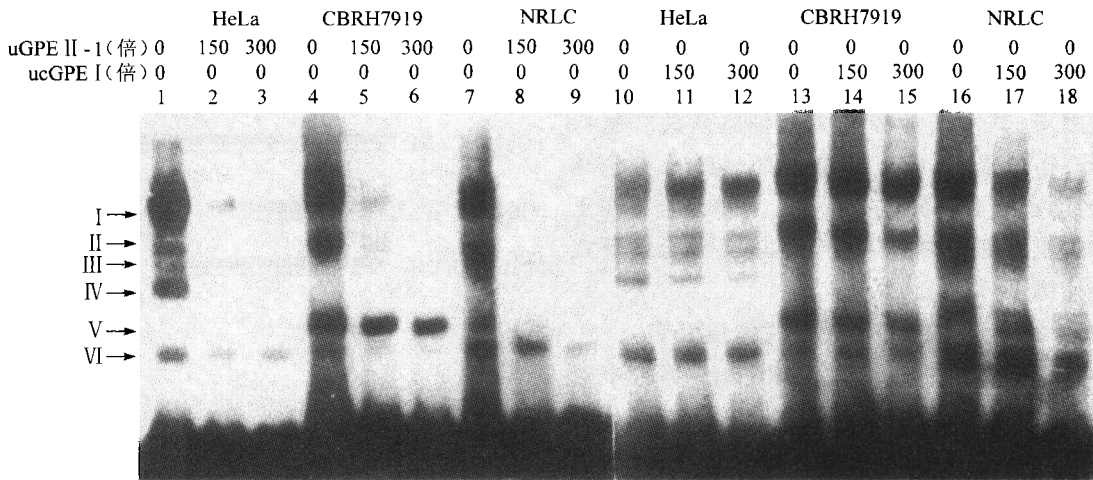


图 4 GPE II -1 特异性 EMSA 结合图谱

说明同图 3

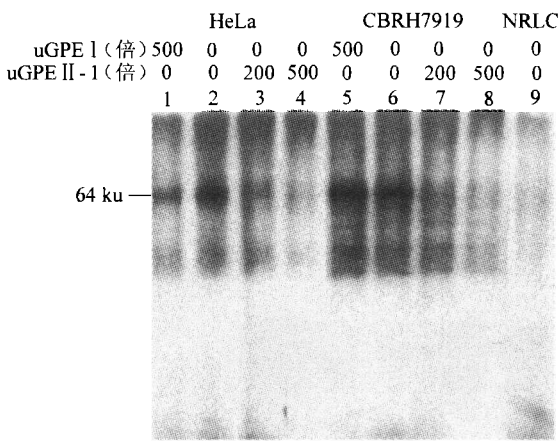


图 5 GPE II -1 DNA-蛋白质紫外交联图谱

说明同图 3

本实验结果表明, -2.5 kb 处的 GPE I 为一强增强子元件. GPE I 序列内存在一有两个尾对尾排列的 TRE 类似序列组成的 cGPE I 元件. 这种由 2 个或 3 个 TRE 类似序列以不同方向排列组成的增强子元件存在于多种 II 相代谢解毒酶基因上游调控序列中, 其中某些与化学诱导激活基因表达相关^[11], 因此一直是研究的热点. 比较正常大鼠肝细胞与化学致癌物诱导肝癌细胞系 CBRH7919 cGPE I 上特异性结合蛋白, 对于揭示 cGPE I 在化学致肝癌细胞中 rGSTP1 基因高表达的作用有积极的意义. 研究表明, CBRH7919 细胞中存在 cGPE I 特异性结合蛋白, 而正常大鼠肝细胞中则不存在, 说明 CBRH7919 细胞中作用于

cGPE I 的反式因子与 rGSTP1 基因高表达密切相关. 能够结合于这种由 2 个或 3 个 TRE 类似序列以不同方向排列组成的增强子元件上的反式作用因子有多种, 如 AP-1^[12], Maf^[13], NF-E2^[14] 及许多未确定的因子等, 本实验观察到的结合于 rGPE I 的反式因子的特点、性质和结构有待于进一步确定.

GPE II 是一相对弱的增强子元件, 其活性部位存在于其上游的 GPE II -1 中. 用 EMSA 实验比较结合于 GPE II -1 上的特异性结合蛋白发现无论 HeLa, CBRH7919 细胞还是正常大鼠肝细胞中都存在多种特异性结合蛋白, 而且 CBRH7919 细胞与正常大鼠肝细胞结合带相似. 但 DNA-蛋白质紫外交联实验表明, 在 HeLa, CBRH7919 细胞中存在一 64 ku 结合蛋白, 而在正常大鼠肝细胞中则无这一结合带. 两种结合图谱的差异可能是由于蛋白质结合位置差异造成的.

DNA-蛋白质紫外交联实验中以溴化脱氧尿嘧啶(BrdUTP)代替脱氧胸腺嘧啶(dTTP)掺入标记的探针,从而大大增强 DNA-蛋白质结合物对紫外照射的敏感度,使结合于胸腺嘧啶(T)富含区的蛋白质在交联图谱上明显强于结合其他区域的蛋白质^[6]. 因此不同细胞 EMSA 图谱中同一位置的结合带可能因不同蛋白质结合位置的不同而在紫外交联时产生结合强度的差异,结合于 GC 富含区的蛋白质又因交联能量低未在交联图谱中显现. 因此可以认为 HeLa, CBRH7919 细胞这种结合于 T 富含区的 64 ku 特异性蛋白因子在正常大鼠肝细胞中不存在,与 GPE II -1 增强子活性及 γ GSTP1 基因在癌细胞中的高表达密切相关.

参 考 文 献

- 1 Sato K. Glutathione transferases as preneoplasia and neoplasia. *Adv Cancer Res*, 1989, 52: 105
- 2 Imai T, Masui T, Ichinose M, et al. Reduction of glutathione S-transferase P-form mRNA expression in remodeling nodules in rat liver revealed by in situ hybridization. *Carcinogenesis*, 1997, 18(3): 545 ~ 551
- 3 Sakai M, Okuda A, Muramatsu M. Multiple regulatory elements and phorbol 12-O-tetradecanoate 13-acetate responsiveness of the placental glutathione transferase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(24): 9456 ~ 9460
- 4 刘东远,全 硕,王 娟,等. 大鼠谷胱甘肽 S-转移酶 P 基因上游顺式调控元件的搜寻. *中国医学科学院学报*, 1998, 20(5): 357 ~ 362
- 5 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990. 788 ~ 790
- 6 Ausubel F M, Brent R, Kingston R E. *Short Protocol in Molecular Biology*. 2nd ed. New York: Green Publishing Associates and John Wiley & Sons, 1992. 9 ~ 21
- 7 Dignam J D, Lebovitz R M, Roeder R G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acid Res*, 1983, 11(5): 1475 ~ 1489
- 8 方福德,周 吕,丁 廉,等主编. *现代医学实验技术全书*. 北京:北京医科大学,协和医科大学联合出版社,1996. 917 ~ 919
- 9 Okuda A, Imagawa M, Maeda Y, et al. Structure and functional analysis of an enhancer GPE I having a phorbol 12-O-tetradecanoate 13-acetate responsive element-like sequence found in the rat glutathione transferase P gene. *J Biol Chemistry*, 1989, 264(28): 16919 ~ 16926
- 10 Okuda A, Imagawa M, Sakai M, et al. Functional cooperativity between two TPA responsive elements in undifferentiated F9 embryonic stem cells. *EMBO J*, 1990, 9(4): 1131 ~ 1135
- 11 Daiswal A K. Antioxidant response element. *Biochem Pharm*, 1994, 48(3): 439 ~ 444
- 12 Herschman H P. Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu Rev Biochem*, 1991, 60: 281 ~ 319
- 13 Kataoka K, Noda M, Nishizawa M. Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(1): 568 ~ 572
- 14 Igarashi K, Kataoka K, Itoh K, et al. Regulation of transcription by dimerization of erythroid factor NF-E2 P45 with small Maf proteins. *Nature*, 1994, 367(10): 568 ~ 572