DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.19.005
第26卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 19
1708 2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)19-1708-03

缺氧对 Egr-1 启动子辐射诱导活性的影响及机制的初步探讨

王卫东[1],陈正堂[1],李德志[1],刘 昕[2],段玉忠[1] (第三军医大学:[1]新桥医院肿瘤科,全军肿瘤诊治中心,重庆市肿瘤生物技术研究所,重庆 400037,[2]基础医学部分子遗传学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探明缺氧对早期生长反应基因-1(early growth response gene-1, Egr-1)启动子辐射诱导活性的影响及机制。方法 利用基因重组构建 Egr-1 启动子调控的荧光素酶报告质粒,脂质体介导转染肺癌 A549 细胞,在 0.1%、0.5%、1%、2.5%、5%等氧浓度下给转染细胞以 2、4、6、8、10 Gy γ-线照射,观察照射后荧光素酶表达水平及过氧化氢产量变化;观察过氧化氢浓度对 Egr-1 启动子转录活性的影响。结果 成功构建了 Egr-1 启动子报告载体,转染 A549 细胞,发现当氧浓度<2.5%时,Egr-1 启动子活性明显低于常氧对照组($P<0.01$),并随氧浓度的下降而降低。照射后的过氧化氢产量呈现类似的变化特征,结果还表明 Egr-1 启动子的活性与过氧化氢浓度密切相关。结论 缺氧($O_2<2.5\%$)导致 Egr-1 启动子辐射诱导活性下降,可能与氧自由基产量减少有关。

关键词:缺氧;Egr-1;启动子;辐射
中图法分类号:R364.4;R394.2;R703.55 文献标识码:A

Effects of cell hypoxia on radio-inducible activity of Egr-1 promoter and its mechanisms

WANG Wei-dong[1], CHEN Zheng-tang[1], LI De-zhi[1], LIU Xin[2], DUAN Yu-zhong[1] ([1]Cancer Research Center, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037; [2]Department of Molecular Genetics, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of cell hypoxia on radio-inducible activity of early growth response gene-1 (Egr-1) promoter and its mechanisms. Methods The reporter vector of Egr-1 promoter was constructed by inserting the promoter sequence upstream the lucifearase gene in pGL3, which was then transfected into the lung adenocarcinoma A549 cell by liposome. The luciferase activity and H_2O_2 production were detected in the transfected cells exposed to doses of 2, 4, 6, 8, and 10 Gy radiation combined with the oxygen concentrations of 0.1%, 0.5%, 1%, 2.5%, and 5 %. The changes of luciferase activity in the transfected cells exposed to various concentrations of H_2O_2 were observed. Results The reporter vector of Egr-1 promoter was constructed successfully. The radio-inducible activity of Egr-1 promoter decreased significantly in the transfected cells exposed to oxygen concentration below 2.5% in a concentration-dependent manner, as compared with that in the normal control ($P<0.01$). The results showed that H_2O_2 production in the transfected cells exposed to the same intervention demonstrated similar alterations. The results also indicated that the radio-inducible activity of Egr-1 promoter was closely associated with H_2O_2 concentration. Conclusion Cell hypoxia ($O_2<2.5\%$) can lead to decrease in radio-inducible activity of Egr-1 promoter, which might result from the reduction of oxygen free radicals formation following radiation.

Key words: hypoxia; Egr-1; promoter; ionizing radiation

近年来利用早期生长反应基因-1(early growth response gene-1, Egr-1)启动子的辐射诱导特性,调控目的基因表达,进行肿瘤的放射-基因治疗(radiogenetic therapy),显示出良好的应用前景[1~3]。已有的研究中,Egr-1 启动子在活体瘤组织的辐射诱导活性往往低于体外培养细胞[4,5],限制了这一疗法的疗效和应用。

缺氧普遍存在于实体瘤组织[6,7],是影响诸多放射生物效应的重要因素。缺氧对 Egr-1 启动子的辐射诱导活性有何影响?其机制如何?至今尚缺乏有关的实验研究。本研究利用荧光素酶(luciferase, Luc)报告基因,观察不同氧浓度下 Egr-1 启动子辐射诱导活性变化,阐明缺氧对 Egr-1 启动子辐射诱导活性的影响,并初步探明其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

p-600 质粒含有 600 bp 人 Egr-1 启动子序列,由美国 UCLA

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300097)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300097)
作者简介:王卫东(1969-),男,河南省沈丘县人,博士,主治医师,主要从事肿瘤放射生物学方面的研究。电话:(023)68774626
收稿日期:2003-07-15;修回日期:2004-02-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

大学医学院小儿科 Kathleen M. Sakamoto 教授惠赠。PGL3-basic 是含有 Luc 的报告基因载体(Promega, USA)。A549 细胞(人肺腺癌细胞株)为本科室储备。限制内切酶 *Hind* Ⅲ、*Xho* Ⅰ, T4 DNA 连接酶, 荧光素酶检测试剂盒为 Promega 公司产品。质粒提取试剂盒, DOTAP 阳离子质脂体转染试剂盒为 Roche 公司产品。RPMI1640 细胞培养基为 Hyclone 公司产品。放射源: ^{60}Co γ-线(本校全军复合伤研究所)。

1.2　报告质粒构建

以 *Xho* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ双酶切 p-600 质粒, 酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳和胶回收试剂盒纯化, 获得 Egr-1 启动子 DNA; 用 T4DNA 连接酶连入 pGL3-basic 报告质粒的 *Xho* Ⅰ、*Hind* Ⅲ位点, 构成 pGEL 重组体, 转化大肠杆菌 JM109, 筛选阳性菌落, 酶切鉴定, 扩增, 提取质粒 DNA, 备用。

1.3　细胞培养, 基因转染

人肺腺癌 A549 细胞用 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液培养。7×10^5 细胞数接种 25 ml 培养瓶, 待细胞密度长至约 80% 时, 吸出培养液, 用无血清 RPMI1640 培养液洗细胞 1 遍后, 进行 DOTAP 脂质体介导的 DNA 转染。37 ℃ 5% CO_2 孵育 10 h, 更换含 2% 小牛血清的 RPMI1640 培养液, 继续培养 48 h 后, 进行下一步实验。

1.4　Egr-1 启动子辐射诱导活性的鉴定

取以上转染细胞分别给以 0、2、4、6、8、10 Gy 照射, 剂量率 1.857 Gy/min。用荧光素酶检测试剂盒分析照射后 0.5、3、8、16、24 h 等时相点的 Luc 瞬时表达水平。用荧光素酶标准品绘制标准曲线, 求出样本荧光素酶含量。

1.5　缺氧对 Egr-1 启动子辐射诱导活性的影响

分别在 0.1%、0.5%、1%、2.5%、5% 等氧浓度下给转染细胞以不同剂量的γ-线照射, 检测照射后 3 h Luc 表达水平。照射剂量和剂量率、Luc 检测方法同上。氧浓度通过自制的缺氧箱设定, 其稳定和可靠性经实验验证。缺氧培养 5 h 后给以照射, 照射后 30 min 恢复常氧培养。

1.6　缺氧对照射后过氧化氢(H_2O_2)产量的影响

采用碘化钾比色法测定以上氧浓度下不同剂量照射细胞培养液 H_2O_2 含量, 以反映照射所致氧自由基产量的变化。照射剂量和剂量率同上。

1.7　H_2O_2 浓度对 Egr-1 启动子转录活性的影响

取转染细胞, 1×10^5 细胞数接种 24 孔培养板。待细胞生长至 70% ~ 80% 密度时, 用 PBS 洗 3 遍, 加 1 ml 无血清 RPMI1640, 而后加入不同量的 1 mmol/L H_2O_2, 使浓度依次为 20、40、60、80、100、120 nmol/L, 每个浓度设 3 个复孔。对照孔不加 H_2O_2。继续培养 3 h, 用荧光素酶检测试剂盒分析 Egr-1 启动子活性, 方法同上。

1.8　统计学处理

计量资料数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SAS 6.12 统计软件, 行方差分析。

2　结果

2.1　Egr-1 启动子报告载体构建

将 Egr-1 启动子插入 pGL3 质粒的 Luc 基因上游, 构成 pGEL 报告载体。分别用 *Nhe* Ⅰ、*Nco* Ⅰ 和 *Sma* Ⅰ、*Bcl* Ⅰ 酶切重组载体, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 获得预期大小的 DNA(600、800 bp)片段, 表明质粒构建成功。

2.2　Egr-1 启动子辐射诱导活性鉴定

检测 pGEL 转染细胞在照射后各时相点的 Luc 表达水平, 结果照射后 0.5 h Luc 含量明显升高, 于照射后 3 h 达峰值, 在照射后 24 h 各剂量组均降至照射前水平。随照射剂量的增大, Luc 表达水平亦进一步升高。

2.3　缺氧对 Egr-1 启动子辐射诱导活性的影响

如表 1 所示, 单纯缺氧培养 Luc 表达水平无明显变化。当氧浓度< 2.5% 时, 照射后 Luc 表达水平明显下降, 并随氧浓度的减少而降低。而当氧浓度≥2.5% 时, Luc 表达与常氧下无差别($P>0.05$)。各剂量组变化趋势相同。

表 1　不同氧浓度下照射后 **A549/pGEL** 细胞 **Luc** 表达量的变化(**ng/L**)

Tab 1　Changes in luciferase expression in A549/pGEL cells exposed to various doses of irradiation combined with various oxygen concentrations (ng/L)

Dosage (Gy)	Oxygen concentration (%, $\bar{x}\pm s$)						
	21	0.1	0.5	1.0	2.5	5.0	10
0		78±7	78±9	76±10	80±9	82±8	79±9
2	16.94±2.43	81±8 **	127±15 **	172±20 *	205±29	203±31	208±26
4	42.70±5.06	117±15 **	210±17 **	389±23 *	475±29	482±30	469±29
6	85.68±8.08	219±19 **	356±20 **	892±31 *	996±48	1 008±53	1 013±58
8	129.74±19.07	348±19 **	516±26 **	1 298±41 *	1 472±51	1 482±50	1 490±53
10	168.36±28.90	514±26 **	925±40 **	2 080±54 **	2 384±78	2 405±84	2 460±82

$F=72.823$, $P=0.001$; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* 21% oxygen concentration

2.4　缺氧对照射所致氧自由基产量的影响

与常氧(21%)下照射后氧自由基产量相比, 当氧浓度< 2.5% 时, 照射所致氧自由基产量明显减少($P<0.05$), 并随氧浓度的下降而进一步减少。当氧浓度大于 2.5% 时, 氧自由基产量不再受氧浓度的影响, 与常氧下无明显差别($P>0.05$)(表 2)。

表 2　不同氧浓度下照射后细胞培养液 H_2O_2 含量变化(**nmol/L**)

Tab 2　Changes of H_2O_2 contents in culture fluid exposed to various doses of irradiation combined with various oxygen concentrations (nmol/L)

Dosage (Gy)	Oxygen concentration (%, $\bar{x}\pm s$)						
	21	0.1	0.5	1.0	2.5	5.0	10
2	16.9 ±2.43	2.24±0.51 **	5.98±0.92 **	10.16±1.56 **	14.59±1.63	15.49±1.72	16.38±2.15
4	42.70±5.06	4.98±0.87 **	12.85±1.85 **	21.91±2.09 **	37.84±3.47	40.03±4.41	43.12±4.89
6	85.68±8.08	9.65±1.95 **	26.61±3.96 **	41.58±4.26 **	76.99±7.55	80.58±8.49	85.06±9.29
8	129.74±19.07	14.09±2.97 **	35.55±4.64 **	65.38±6.28 **	109.76±16.06	118.84±19.28	126.64±20.38
10	168.36±28.90	18.29±3.77 **	40.37±3.89 **	83.60±7.28 **	141.61±22.01	154.85±26.63	165.80±30.38

$F=16.225$, $P=0.006$; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* 21% oxygen concentration

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.5 H_2O_2 浓度对Egr-1启动子转录活性的影响

与对照组(76±9) ng/L相比,H_2O_2 可使pGEL转染细胞的Luc表达水平明显升高($P<0.01$),随 H_2O_2 浓度的升高,Luc表达水平进一步升高,其中120 nmol/L浓度组(1 531±52) ng/L是20 nmol/L组(192±21) ng/L的7.9倍,呈明显的浓度依赖性。

3 讨论

电离辐射可诱导细胞中一系列基因表达,其中一类是Egr-1,为即刻早期基因家族(immediate early genes, IEGs)成员之一,它是细胞对DNA损伤的重要适应性反应机制[8]。启动子的快速、短暂激活是IEGs的共同特征。研究表明,电离辐射通过作用于CArG结构域,诱导Egr-1启动子转录活性增高[9]。

在本实验条件下,照射后0.5 h由Egr-1启动子调控的Luc表达量显著升高,照后3 h Luc表达水平达峰值,在照后24 h时多数剂量组降至照射前水平;随照射剂量的增大,Luc表达量随之升高,呈明显的剂量依赖性。与文献[10]报道相一致,证明了本实验采用的Egr-1启动子具有辐射诱导特性,在受照射后迅速表达升高,能满足对基因表达调控的需要。在照射前Luc有低水平表达,主要是由于培养基内的血清刺激了Egr-1启动子上的血清反应元件所致,因此本实验采用了尽可能低的血清浓度,以减轻血清对Egr-1启动子的影响。

放射-基因治疗是近年来提出的一种肿瘤治疗新策略,Egr-1启动子广泛应用于肿瘤的放射-基因治疗,并取得初步的成效。鉴于实体瘤组织是一缺氧微环境,为阐明缺氧对Egr-1启动子放射诱导活性的影响,我们观察了在不同氧浓度下Egr-1启动子的放射诱导活性,结果显示,当氧浓度<2.5%时,Egr-1启动子的放射诱导活性降低,且随氧浓度的下降而逐步降低。当氧浓度≥2.5%时,Egr-1启动子的放射诱导活性不再受氧浓度的影响,与常氧情况下无明显差别。这一结果初步探明了活体瘤组织内Egr-1启动子辐射诱导活性低于体外培养细胞的原因。

已有的研究表明,放射通过刺激氧自由基的产生而诱导Egr-1启动子转录活性升高[9]。本研究检测了不同氧浓度下照射后细胞培养液的 H_2O_2 产量,结果表明,当氧浓度<2.5%,H_2O_2 产量显著降低,并随氧浓度的减少而进一步降低;其变化特征与Egr-1启动子相一致。进一步观察了 H_2O_2 浓度对Egr-1启动子转录活性的影响,结果表明,Egr-1启动子活性与 H_2O_2 浓度密切相关。以上结果提示缺氧导致Egr-1启动子放射诱导活性降低可能与氧自由基产量减少有关。

近期文献[11,12]报道,缺氧可诱导Egr-1基因在内皮细胞、单核巨噬细胞表达增加。但在本实验中,单纯缺氧未能诱导Egr-1启动子转录活性增加,原因可能与细胞类型不同有关,具体机制尚有待研究。

本实验初步阐明了缺氧对Egr-1启动子辐射诱导活性的影响特征及其机制,为进一步改善肿瘤放射-基因治疗的疗效提供了理论基础。

参考文献:

[1] Manome Y, Kunieda T, Wen P Y, *et al*. Transgene expression in malignant glioma using a replication-defective adenoviral vector containing the Egr-1 promoter: activation by ionizing radiation or uptake of radioactive iododeoxyuridine[J]. Hum Gene Ther, 1998, 9(10): 1409-1417.

[2] Advani S, Chmura S J, Weichselbaum R R. Radiogenetic therapy: on the interaction of viral therapy and ionizing radiation for improving local control of tumors[J]. Semin Oncol, 1997, 24(6): 633-638.

[3] 历兴君, 夏爱娣, 陈诗书, 等. EGR启动子在肿瘤基因治疗中的应用[J]. 生命科学, 2002, 14(1): 53-55.

[4] Takahashi T, Namiki Y, Ohno T. Induction of the suicide HSV-TK gene by activation of the Egr-1 promoter with radioisotopes[J]. Hum Gene Ther, 1997, 8(7): 827-833.

[5] Mauceri H J, Hanna N N, Wayne J D, *et al*. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene therapy targeted by ionizing radiation selectively damages tumor vasculature[J]. Cancer Res, 1996, 56(19): 4311-4314.

[6] Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects[J]. J Natl Cancer Inst, 2001, 93(4): 266-276.

[7] Nordsmark M, Alsner J, Keller J, *et al*. Hypoxia in human soft tissue sarcomas: adverse impact on survival and no association with p53 mutations [J]. Br J Cancer, 2001, 84(8): 1070-1075.

[8] 蒙国照, 吴名耀. 即刻早期基因Egr-1与肿瘤研究[J]. 国外医学分子生物学分册, 2001, 23(3): 178-180.

[9] Datta R, Taneja N, Sukhatme V P, *et al*. Reactive oxygen intermediates target CC(A/T)6GG sequences to mediate activation of the early growth response 1 transcription factor gene by ionizing radiation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(6): 2419-2422.

[10] Datta R, Rubin E, Sukhatme V P, *et al*. Ionizing radiation activates transcription of the EGR gene via CArG elements[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89(21): 10149-10153.

[11] Yan S F, Lu J, Zou Y S, *et al*. Hypoxia-associated induction of early growth response-1 gene expression[J]. J Biol Chem, 1999, 274(21): 15030-15040.

[12] Lo L W, Cheng J J, Chiu J J, *et al*. Endothelial exposure to hypoxia induces Egr-1 expression involving PKCalpha-mediated Ras/Raf-1/ERK1/2 pathway[J]. J Cell Physiol, 2001, 188(3): 304-312.

(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net