DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.020
第24卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 10
2002年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2002

文章编号:1000-5404(2002)10-1173-03

论著

人肺癌细胞转录因子——C/EBP和HMG样蛋白的EMSA检测

吴国明[1],钱桂生[1],周玉国[2],黄桂君[1],姚 伟[1],陆俊羽[1] (1 第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037;2 重庆市大足县人民医院内科,大足 402360)

提 要:目的 检测人肺癌细胞中是否存在与Na^+/H^+交换蛋白-1(NHE-1)基因转录相关的重要转录因子——C/EBP和HMG样蛋白。方法 采用电泳迁移率改变分析法(EMSA)检测人肺癌细胞株核蛋白中C/EBP和HMG样蛋白的表达及其水平。结果 EMSA检测到A549细胞和转染NHE-1反义载体的A549细胞均有转录因子C/EBP和HMG样蛋白的表达,且后者表达水平高于前者;采用50倍未标记的片段能完全抑制相应转录因子与^{32}P标记的相同片段的结合。结论 A549细胞核蛋白中存在能与C/EBP结合序列和Poly(dA:dT)区结合的转录因子,即C/EBP和HMG样蛋白,后者的表达水平高于前者。特异性竞争抑制试验表明外源性特异DNA片段能抑制相同片段与转录因子的结合。

关键词:Na^+/H^+交换蛋白-1;转录调控;电泳迁移率改变分析
中图法分类号:R394.2;R734.202 文献标识码:A

EMSA analyses of transcription factors, C/EBP and HMG-like protein in human lung cancer cells

WU Guo-ming, QIAN Gui-sheng, ZHOU Yu-guo, HUANG Gui-jun, YAO Wei, LU Jun-yu (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate whether there are C/EBP and HMG-like protein, 2 important transcription factors related to NHE-1 gene expression in lung cancer cells. Methods The important cis-acting elements of NHE-1 gene and the transcription factors binding to them in lung tumor cells were examined with electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and their mutual actions were studied. Results EMSA demonstrated that C/EBP and HMG-like protein were expressed in A549 cells and A549 cells transfected with antisense NHE-1, with the expression level higher in the latter than in the former. Unlabeled synthesized C/EBP combination sequence and Poly (dA:dT) sequence at a dosage of 50 times higher completely inhibited the binding of corresponding transcription factors with 32P labeled homologous fragments. Conclusion EMSA confirms that there are 2 transcription factors, C/EBP and HMG-like protein which can bind with C/EBP combination sequence and Poly(dA:dT) region, in the nuclear proteins of A549 cells and transfected cells. The expression level of HMG-like protein is higher than that of C/EBP. Special competitive inhibition experiment demonstrated that foreign special DNA fragment inhibits the binding of the transcription factors with homologous fragments.

Key words: Na^+/H^+ exchanger-1; transcription regulation; electrophoretic mobility shift assay

研究表明,某个基因表达启动必须经转录因子识别基因调控区域的特异核苷酸序列。因而,采用外源性(如人工合成)的序列相同的寡聚脱氧核苷酸可竞争性结合相应的转录因子,达到抑制基因表达的目的,即转录因子"圈套"(Transcription factor traps)理论[1]。Na^+/H^+交换蛋白-1(Na^+/H^+ exchanger-1, NHE-1)在肿瘤细胞内pH(pHi)的调节中起重要作用,并影响细胞的增殖生长和凋亡。我们采用电泳迁移率改变分析(Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)试验,研究了外源性的DNA片段对人肺癌细胞NHE-1基因转录调控序列与转录因子结合的竞争性抑制作用,为从转录水平特异地抑制肺癌细胞NHE-1基因表达以达到治疗肺癌的目的奠定实验基础。

基金项目:重庆市科委应用基础项目基金资助(2000)
作者简介:吴国明(1961-),男,湖南省浏阳市人,博士,主任医师,教授,主要从事肺癌诊断与治疗方面的研究,发表论文30余篇。电话:68755114-74603,74903
收稿日期:2001-01-10;修回日期:2002-05-16

1 材料与方法

1.1 人肺癌细胞株的培养

采用人肺腺癌细胞株A549细胞。用RPMI1640培养基,在充分湿化、37 ℃、含5%CO_2的全自动孵箱中培养。

1.2 NHE-1基因转录因子结合序列的合成

1.2.1 NHE-1基因调控序列-239~-215片段的合成 根据文献[2]报道及我们的测序结果合成的序列为[3]:

正义序列:5′-GTGAAATCG TTTTGTAAG TAGTCGG-3′(框内部分为C/EBP转录因子结合位点)

反义序列:5′-CCGACTACTTACAAAACGATTTCAC-3′

1.2.2 NHE-1基因调控序列Poly(dA:dT)片段的合成 根据我们的测序结果合成以下序列[3]:

正义序列:5′-TTTTTTTTTTTTTTTTT-3′

反义序列:5′-AAAAAAAAAAAAAAAAA-3′

1.3 寡核苷酸探针的标记

参照文献[4]略加改进进行。

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

1.4 肿瘤细胞核蛋白的提取及浓度测定

1.4.1 A549 细胞及转染 NHE-1 反义载体的 A549 细胞(反义组)核蛋白的提取 参照文献[5]进行。

1.4.2 核蛋白浓度的测定 采用 Bradford 法略加改进进行[6]。

1.5 肺癌细胞核蛋白中 C/EBP 和 Poly(dA:dT)DNA 结合活性

1.5.1 结合反应 将下列试剂加入 0.5 ml Ep 管内(总体积约 20 μl):DNA 结合反应液 15 μl;核蛋白提取物 5 μg。冰浴 15 min,加入已标记的寡核苷酸双链 1 μl,25 ℃孵育 30 min,加入 4 μl 加样缓冲液,混匀,加样。

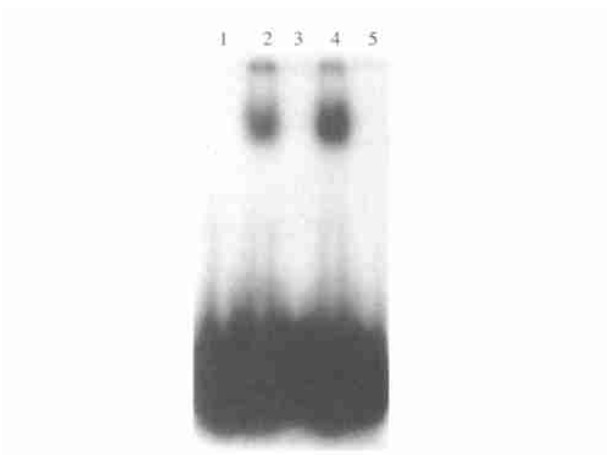
1.5.2 特异性竞争抑制实验 将下列试剂加入 0.5 ml Ep 管内:DNA 结合反应液 15 μl;核蛋白提取物 5 μg。冰浴 15 min,加入 50 倍未标记的同样的寡核苷酸双链,25 ℃孵育 20 min,加入已标记的寡核苷酸双链 1 μl,25 ℃孵育 30 min,加入 4 μl 加样缓冲液,混匀,加样。

1.5.3 电泳及放射自显影 按文献[7]介绍的方法进行。

2 结果

2.1 Poly(dA:dT)序列的 EMSA 结果

结果见图 1。第 2 和第 4 泳道可见部分标记的 Poly(dA:dT)探针被阻滞,其泳动速率明显减慢;而第 3 和第 5 泳道则未见 Poly(dA:dT)探针被阻滞,结果表明 A549 细胞和反义组细胞核蛋白中均存在与 Poly(dA:dT)序列结合的转录因子,而采用 50 倍未标记的特异性序列可以完全抑制其转录因子与 Poly(dA:dT)序列的结合。



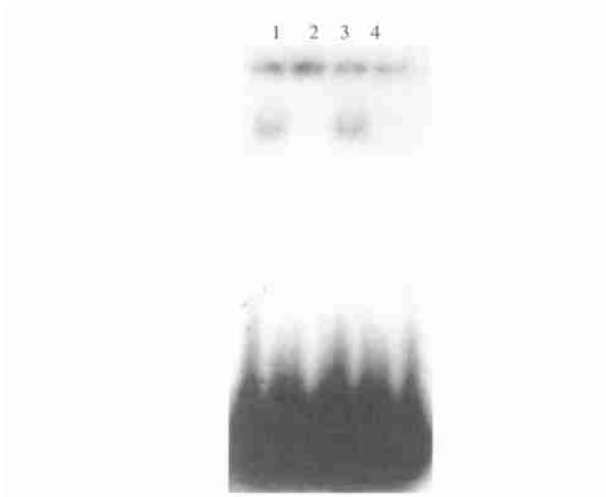
1: C/EBP probe for control; 2: Nuclear protein of A549 group+ Poly(dA:dT) probe; 3: Nuclear protein of A549 group+ Poly(dA:dT) probe+ unlabled Poly(dA:dT) sequence of 50 times; 4: Nuclear protein of antisense group+Poly(dA:dT) probe; 5: Nuclear protein of antisense group+ Poly(dA:dT) probe+unlabled Poly(dA:dT) sequence of 50 times

图 1 Poly(dA:dT)序列的 EMSA 结果

Fig 1 EMSA results of Poly(dA:dT) sequence

2.2 C/EBP DNA 结合序列的 EMSA 结果

结果见图 2。第 1 和第 3 泳道可见部分标记的 C/EBP 探针被阻滞,其泳动速率明显减慢;而第 2 和第 4 泳道则未见 C/EBP 探针被阻滞,结果表明 A549 细胞和反义组细胞核蛋白中均存在 C/EBP 转录因子,而采用 50 倍未标记的特异性序列可以完全抑制 C/EBP 转录因子与相应 DNA 序列的结合。另外,从被阻滞的探针量上比较,A549 细胞和反义组细胞中与 Poly(dA:dT)序列结合的转录因子表达水平高于 C/EBP 转录因子。



1: Nuclear protein of A549 group+ C/EBP probe; 2: Nuclear protein of A549 group+ C/EBP probe+ unlabled C/EBP sequence of 50 times; 3: Nuclear protein of antisense group+ C/EBP probe; 4: Nuclear protein of antisense group+C/EBP probe+ unlabled C/EBP sequence of 50 times

图 2 C/EBP 序列的 EMSA 结果

Fig 2 EMSA results of C/EBP sequence

3 讨论

Harel-Bellan 等[8]应用人工合成的热休克基因增强子序列中 14 bp 的特异性碱基序列,抑制了人 T 淋巴细胞热休克基因的表达。最近,潘德顺等[9]以野生型和突变型促红细胞生成素(EPO)基因 3′-增强子序列,转入培养的大鼠肺微血管内皮细胞,发现缺氧能诱导血管内皮细胞生长因子(VEGF)转录增加,野生型 EPO 基因 3′-增强子片段能阻断缺氧的诱导作用,而突变型片段则无此作用。提示在 VEGF 基因序列中可能存在 EPO 3′-增强子片段,而人工合成的同源片段能竞争性抑制 VEGF 基因的转录表达。夏若寒等[10]发现,氯化钴可诱导内皮细胞株 ECV-304 的 COX-2 和 TXS 基因转录明显增强,野生型 EPO 3′端增强子片段可阻断该作用,而点突变片段则无此作用。上述结果表明,采用与增强子相同序列的外源性 DNA 片段可阻断相应转录因子与该增强子的结合,从而抑制基因表达。

研究表明,NHE-1 在肿瘤细胞 pHi 的调节中起重要作用,而细胞 pHi 参与细胞增殖生长及凋亡的调控。Kolyada 等[2]发现人肝癌细胞株(HepG2)和鼠血管平滑肌细胞株(VSM A7r5)的 NHE-1 基因正调控序列位于 −252 位点下游,该片段的转录活性为全长的 198% ~ 214%;−239 ~ −215 序列(含 C/Enhanced binding protein, C/EBP 结合序列)对 HepG2 和 VSM A7r5 的 NHE-1

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

基因转录起重要作用, 缺失该片段则几乎丧失转录功能。而 Wang 等[11,12] 发现 NHE-1 基因 5′端调控序列的 Poly (dA·dT)区对 NHE-1 的转录也起重要作用, 与该序列结合的转录因子为高泳动组(High mobility group, HMG)样蛋白。我们依据对人肺癌 NHE-1 基因部分正调控序列的测序结果, 人工合成了其同源双链 DNA, 以验证人肺癌细胞 NHE-1 基因的 Poly (dA·dT)和 C/EBP 元件是否仍然与转录因子有特异性结合作用。我们采用 EMSA 的方法, 发现在 A549 细胞和转染细胞的核蛋白中确实存在能与 C/EBP 序列及 Poly (dA·dT)序列特异性结合的转录因子, 而采用 50 倍剂量的相同序列即能够抑制 C/EBP 及 HMG 样蛋白与调控序列中相应片段的特异性结合, 表明在转录水平竞争性抑制 NHE-1 基因的表达是一种可尝试的新策略。此外, 实验表明 A549 细胞和转染细胞中, Poly(dA·dT)结合序列的表达水平要高于 C/EBP 结合序列, 因而推测在 A549 细胞中 HMG 样蛋白对 NHE-1 基因的转录调控作用要强于 C/EBP 结合序列。

参考文献:

[1] Carter G, Lemoine N R. Antisense technology for cancer therapy: does it make sense[J]? Br J Cancer, 1993, 67(5): 869—876.

[2] Kolyada A Y, Johns C A, Madias N E. Role of C/EBP proteins in hepatic and vascular smooth muscle transcription of human NHE1 gene[J]. Am J Physiol, 1995, 269(6 Pt 1): C1 408—1 416.

[3] 吴国明, 黄桂君, 钱桂生, 等. 人肺癌细胞 NHE-1 基因部分正调控序列的克隆[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(2): 125—127.

[4] 金冬雁, 黎孟枫 译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992. 556—558.

[5] Kamogawa Y, Minasi L A, Carding S R, *et al*. The relationship of IL-4 and IFN gamma-producing T cells studied by lineage ablation of IL-4-producing cells[J]. Cell, 1993, 75(5): 985—995.

[6] 颜子颖, 王海林 译著. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 北京科学出版社, 1998. 332.

[7] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. 538—545.

[8] Harel-Bellan A, Brini A, Ferris D F, *et al*. *In situ* detection of a heat-shock regulatory element binding protein using a soluble short synthetic enhancer sequence[J]. Nucleic Acid Res, 1989, 17: 4 077—4 087.

[9] 潘德顺, 于江州, 郝天玲, 等. Epo 3′-端增强子对内皮细胞缺氧时血管内皮生长因子基因转录的影响[J]. 同济医科大学学报, 1998, 27 (5): 333—335, 344.

[10] 夏若寒, 郝天玲, 于江州, 等. 缺氧诱导因子-1 和红细胞生成素 3′-增强子调节内皮细胞环氧合酶和血栓素合酶基因转录[J]. 中国应用生理学杂志, 2000, 16(1): 48—51.

[11] Yang W, Wang H, Fliegel L. Regulation of Na^+/H^+ exchanger gene expression. Role of a novel poly(dA. dT) element in regulation of the NHE1 promoter[J]. J Biol Chem, 1996, 271(34): 20 444—20 449.

[12] Wang H, Yang W, Fliegel L. Identification of an HMG-like protein involved in regulation of Na^+/H^+ exchanger expression[J]. Mol Cell Biochem, 1997, 176(1—2): 99—106.

(编辑　王　红)

(上接 1172 页)

40 例正常早孕者血清平均浓度为(18.26±7.70)μmol/L, 经统计学处理 $t=3.89$, $P=0.002$, 正常早孕者显著高于自然流产者。

表 1　不同孕龄血清 NO 平均浓度及其与孕龄的相关性(μmol/L, $\bar{x}\pm s$)

孕龄	<56 d	56~69 d	>70 d	r
正常早孕组				
例数	26	9	5	0.760
NO 浓度	4.08±4.85	24.46±6.08	28.80±6.08	$P=0.000$
自然流产组				
例数	16	10	18	0.197
NO 浓度	8.90±4.15	10.67±7.89	14.74±9.57	$P=0.069$

2.3　流产类型与血清 NO 水平

自然流产组 44 例中, 先兆流产 20 人, 平均血清 NO 浓度(14.63±9.23)μmol/L, 难免流产、不全流产、稽留流产共 24 人, 平均血清 NO 浓度(8.70±4.77)μmol/L。前者血清 NO 水平显著高于后者, $t=2.98$, $P=0.01$, 且与正常早孕妇女较接近。

3　讨论

NO 是一种重要的调节生命活动的小分子, 广泛存在于人体组织细胞和血管内皮细胞中。妊娠期胎盘和脐带是 NO 的主要来源。有研究表明, NO 是维持妊娠的重要调节因子, 其水平降低时, 可引起一系列的病理生理过程[2]。NO 水平降低后胎盘绒毛血管阻力增加, 致使胎儿——胎盘之间的氧和营养物质交换障碍, 影响胚胎的生长发育, 严重时造成胚胎死亡; 梗塞部份的绒毛坏死, 血管破裂, 形成胎盘后血肿; 改变了子宫的静息状态, 敏感性增加, 遇到刺激时子宫即发生收缩等。上述病理变化使 NO 合成再度减少以致形成恶性循环, 最终导致流产发生。本研究结果显示: ① 正常妊娠组中孕龄与 NO 浓度呈正相关, ② 虽然自然流产组的平均孕龄大于对照组, 但血清 NO 水平却明显低于对照组, ③ 研究组中先兆流产者血清 NO 水平显著高于难免流产、稽留流产和不全流产者。这些结果进一步说明 NO 对维持正常妊娠和胚胎存活生长具有重要的作用, 自然流产的发生与血清 NO 降低可能有关, NO 的合成减少可能是自然流产的原因之一。

NO 的降低是流产的直接原因还是其他病因通过 NO 降低而导致流产, 还需进一步研究。

关键词: 一氧化氮; 流产; 早期妊娠
中图法分类号: R714.210.2　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Learmont J G, Poston L. Nitric oxide is involved in flow-induced dilation of isolated human small fetoplacental arteries[J]. Am J Obstet Gynecol, 1996, 174(2): 583—588.

[2] Yallampalli C, Izumi H, Byam-Smith M, *et al*. An L-arginine-nitric oxide-cyclic guansine monophosphate system exists in the uterus and inhibit contractility during pregnancy[J]. Am J Obstet Gynecol, 1994, 170(1): 175—185.

(编辑　陈聪连)

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