

转录因子Sp1和Sp3对Jurkat T细胞端粒酶活性的调节作用

肿瘤细胞中特异表达端粒酶的特性已成为肿瘤防治研究的重要靶向,该酶由模板RNA、端粒相关蛋白(TP1)和端粒酶逆转录酶(hTERT)构成。其中,hTERT是公认的催化亚单位,是限速酶,研究该酶的转录调控方式对研究肿瘤的发生发展具有重要的意义[1]。然而,目前这方面的研究甚少。hTERT基因启动子上有多个GC盒,是与Sp转录因子家族特异性结合单元[2]。Sp家族成员中,Sp1和Sp3在大多数情况下两者功能相反,其中Sp3被认为是Sp家族中主要起抑制作用的转录因子[2][3]。已知Sp1是一强大的hTERT基因正调控转录因子[4][5][6]。那么,Sp3是否hTERT负调控转录因子呢?目前尚未见报道。为比较Sp1和Sp3对hTERT基因的转录调节作用,本研究将Sp1和Sp3表达载体转入人白血病Jurkat T细胞,以观察转录因子Sp1和Sp3对端粒酶活性和hTERT基因转录的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和载体 Jurkat T细胞由第一军医大学南方医院血液科冯晓勤博士惠赠,pCMV-Sp1、pCMV-Sp3表达载体由Guntram Suske教授惠赠。

1.1.2 试剂 端粒酶检测试剂盒(Telo PCR ELISA)、逆转录试剂盒(Titan One Tube RT-PCR)、无DNA酶的RNA酶购自Roche;脂质体Lipofectamin、TRIzol总RNA提取试剂盒和RPMI-1640基础培养基为Gibco公司产品;鼠Sp1单克隆抗体、兔Sp3多克隆抗体由美国Santa Cruz生物技术公司生产;羊抗鼠和羊抗兔辣根过氧化物酶标记IgG购自Sino-American Biotechnology Co.。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和载体转染 Jurkat T细胞置于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液中,5% CO₂、37℃孵箱中培养。将培养至对数生长期的细胞[(2~3)×10⁶细胞/ml]接种于35 mm 6孔组织培养皿中,与终浓度为5 μg/ml的Lipofectamin包裹的表达载体或空载体在室温下、无血清RPMI-1640培养液中转染1 h,然后加含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液,于5% CO₂、37℃恒温箱中继续培养36 h。

1.2.2 细胞抽提液制备和端粒酶重复序列扩增(TRAP)按端粒酶检测试剂盒说明进行。收集细胞并用预冷的PBS洗涤1次,3 000×g低温离心10 min,加入预冷的裂解液冰上孵育30 min后,16 000×g低温离心20 min,上清用于端粒酶活性测定或冻存于-80℃备用。取3 μl上清于含dNTP、生物素标记的TS引物、Taq酶、CX引物的50 μl反应体系中25℃逆转录30 min后,94℃灭活端粒酶5 min,然后进行TRAP。反应条件为:94℃ 30 s、50℃ 30 s、72℃ 90 s,共30个循环,72℃延伸10 min。PCR产物用15%非变性聚丙烯酰胺凝胶分离,并通过银染显示DNA梯度。为证明端粒酶产物的特异性,设立无DNA酶的RNA酶对照组。

1.2.3 TRAP产物定量测定 采用端粒酶PCR ELISA法定量测定端粒酶活性。取5 μl扩增产物加20 μl变性剂室温下变性10 min,然后与地高辛标记的端粒重复序列特异性探针杂交。由于扩增产物5'端标记有生物素,可以将杂交物固定在链亲合素被覆的微滴平板上。37℃、300 r/min振荡2 h后,洗涤3次。然后用过氧化物酶标记的地高辛抗体(二抗)及TMB底物检测扩增产物在450 nm处的相对D(λ)值。

1.2.4 RNA抽提和逆转录PCR 载体转染的细胞用TRIzol裂解后按说明提取总RNA,hTERT mRNA水平用RT-PCR方法检测。取1 μg总RNA加入50 μl Titan One Tube RT-PCR反应体系,50℃、30 min反转录合成第一链cDNA,94℃、2 min灭活反转录酶后进行PCR扩增。扩增条件为:94℃ 30 s、64℃ 30 s、68℃ 45 s,共30个循环,72℃延伸产物10 min。引物序列如下,hTERT[7]上游:5'-CGGAAGAGTGTCTGGAGC AA-3',下游:5'-GGATGAAGCGGAGTCTGGA-3'(126 bp);hGAPDH上游:5'-TCCTCTGACTTCAACAGCG ACACC-3',下游:5'-TCTCTCTTCTCTGTGCTCTT GC-3'(208 bp)。扩增产物用2%琼脂糖凝胶电泳,EB染色,用BIO-PROFIL/BIO-CAPT/BIO-ID⁺⁺图像分析软件(VILBER LOURMAT公司)定量,用峰线下面积(AUP)表示条带强度。

1.2.5 Western blotting 载体转染的细胞用TRIzol裂解后按说明提取总蛋白,Sp1和Sp3蛋白表达水平用Western blotting检测。取等量蛋白样本按1:1比例与2×凝胶上样缓冲液混合,煮沸3 min。变性蛋白用7.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电

泳, 并转移到硝酸纤维素膜上。用丽春红S染色后铅笔标记蛋白Marker, 然后用含1%蛋白干粉的0.02 mol/L PBST液(PBS+0.05%吐温-20)室温下封闭膜2 h, 洗膜5次后室温下与1 μg/ml Sp1或Sp3一抗孵育2 h, 再与1:200过氧化物酶标记的相应二抗37 °C孵育20 min, DAB显色、照像, 并用BIO-PROFIL/BIO-CAPT/BIO-ID++图像分析软件定量。

1.3 统计方法

采用SPSS 7.5统计软件进行 One Way ANOVA分析。

2 结果

2.1 转染Sp1或Sp3表达载体的Jurkat T细胞分别高效表达Sp1或Sp3蛋白

2.1.1 转染Sp1表达载体的Jurkat T细胞高效表达Sp1蛋白 Western blotting表明, 正常细胞和载体转染的细胞, 用Sp1单克隆抗体在相对分子质量95 000和105 000处均能检测到双条带(图1A), 它们是Sp1翻译后的多肽被修饰的结果[8]。其中, 正常细胞与空载体转染的细胞Sp1蛋白表达水平相似, 而Sp1表达载体转染的细胞Sp1蛋白表达水平明显升高(图1A)。半定量分析表明, 与正常细胞对照组比较, Sp1表达载体转染组Sp1蛋白表达水平升高了59.6%($P<0.01$, 图1B)。

2.1.2 转染Sp3表达载体的Jurkat T细胞高效表达Sp3蛋白 Western blotting表明, 正常细胞和载体转染的细胞, 用Sp3多克隆抗体在相对分子质量115 000和68 000~70 000处各检测到双条带(图2A)。其中, 115 000处的双条带与Sp3一样是翻译后修饰的结果[9], 而68 000~70 000处的双条带是转录起始位点不同引起的[10], 只有115 000 Sp3才有生物学活性。正常细胞和空载体转染的细胞Sp3蛋白表达水平相似, 而Sp3表达载体转染的细胞Sp3蛋白表达水平明显升高(图2A)。半定量分析表明, 与正常细胞对照组相比, Sp3表达载体转染组Sp3蛋白表达水平升高了36.8%($P<0.05$, 图2B)。

2.2 Sp1或Sp3表达载体对Jurkat T细胞端粒酶活性的影响

如图3A银染显示, 正常细胞和载体转染的细胞均可见明显的相差6个碱基的端粒酶产物梯度。其中, 正常细胞组、空载体转染组和Sp3载体转染组梯度强度无明显区别, Sp1载体转染组较其他3组强, 而RNA酶处理因破坏了端粒酶RNA模板作用, 无任何梯度条带显示, 表明该梯度是端粒酶的特异产物。

端粒酶产物ELISA定量结果显示, 正常细胞组、空载体和Sp3载体转染组端粒酶活性强度无显著差别, 而Sp1载体转染组与对照组比较, 端粒酶活性增强了38.5%($P<0.05$, 图3B)。

2.3 Sp1或Sp3表达载体对Jurkat T细胞hTERT mRNA水平的影响

Sp1表达载体转染的细胞, hTERT mRNA含量显著增加(图4A), 与正常对照组比较, 增加了25.4%($P<0.05$, 图4B); 而空载体组和Sp3载体组分别较正常细胞对照组降低了14.5%和22.1%, 但无统计学意义(图4A, 4B)。

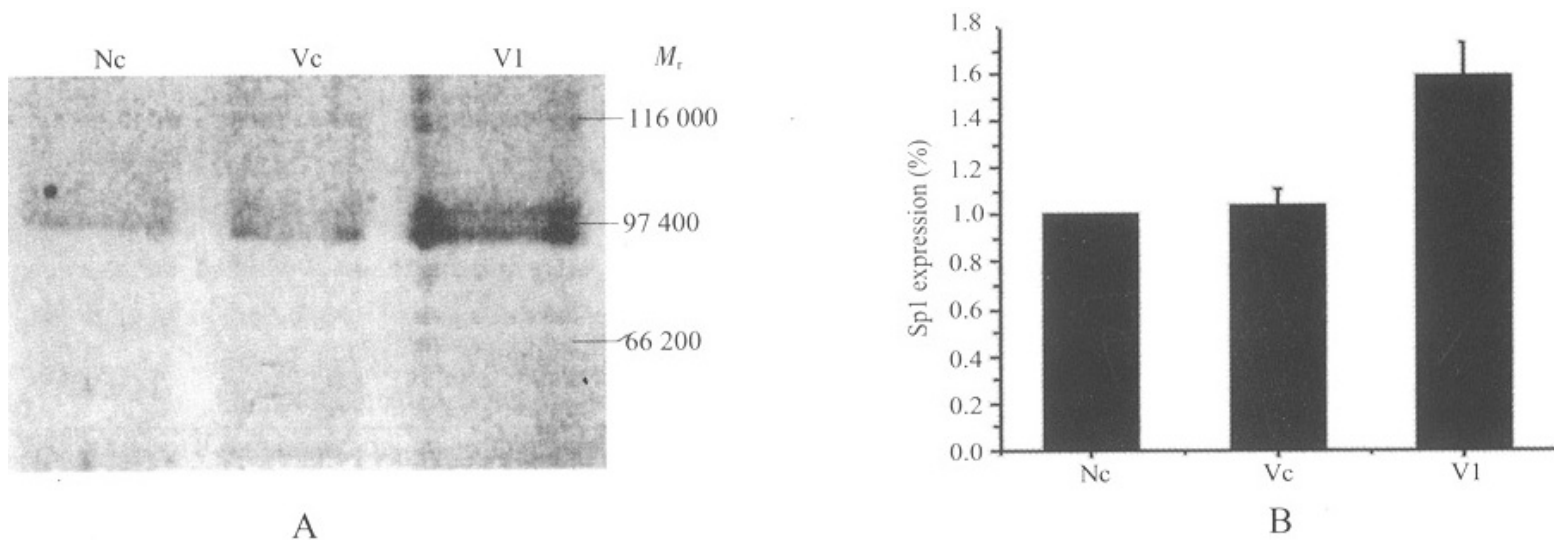


图1 Sp1表达载体在Jurkat T细胞中表达Sp1蛋白的Western blotting(A)和相对百分含量测定(B)

Fig.1 Western blotting (A) and semi-quantification of the relative percentage (B) of Sp1 protein expression in Jurkat T cells treated with Sp1 expression vector

Nc: Normal control; Vc: Empty vector; V1: Sp1 expression vector

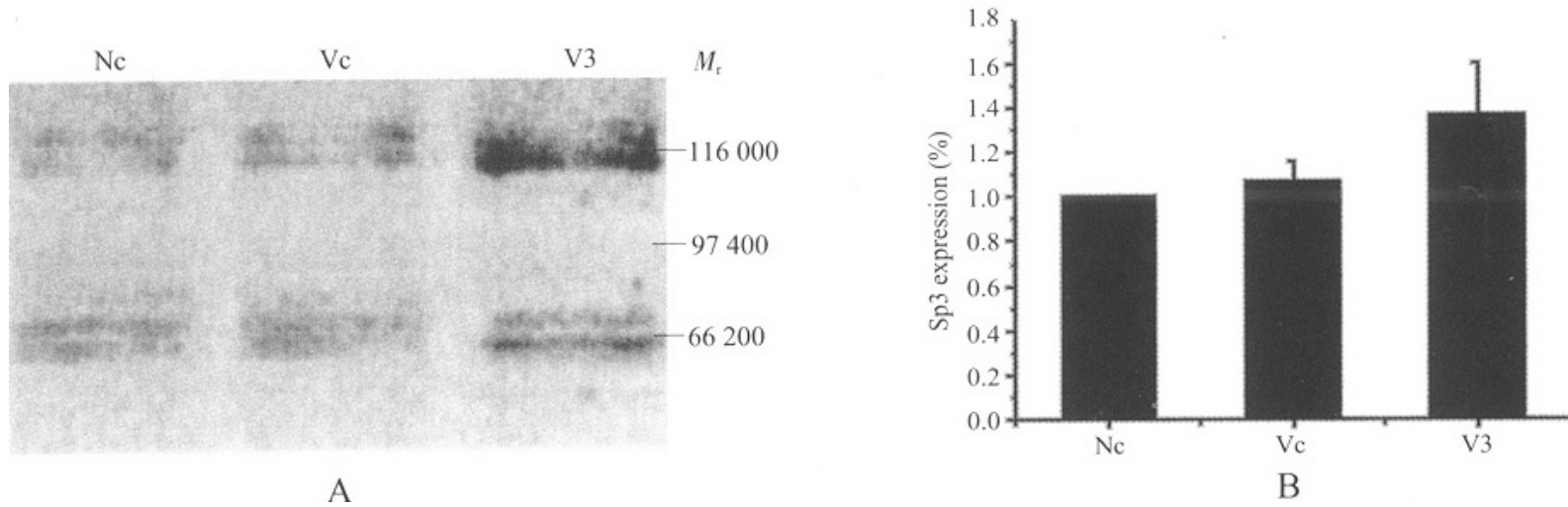


图2 Sp3表达载体在Jurkat T细胞中表达Sp3蛋白的Western blotting (A)和相对百分含量测定 (B)
 Fig.2 Western blotting (A) and semi-quantification of the relative percentage (B) of Sp3 protein expression in Jurkat T cells treated with Sp3 expression vector
 Nc: Normal control; Vc: Empty vector; V3: Sp3 expression vector

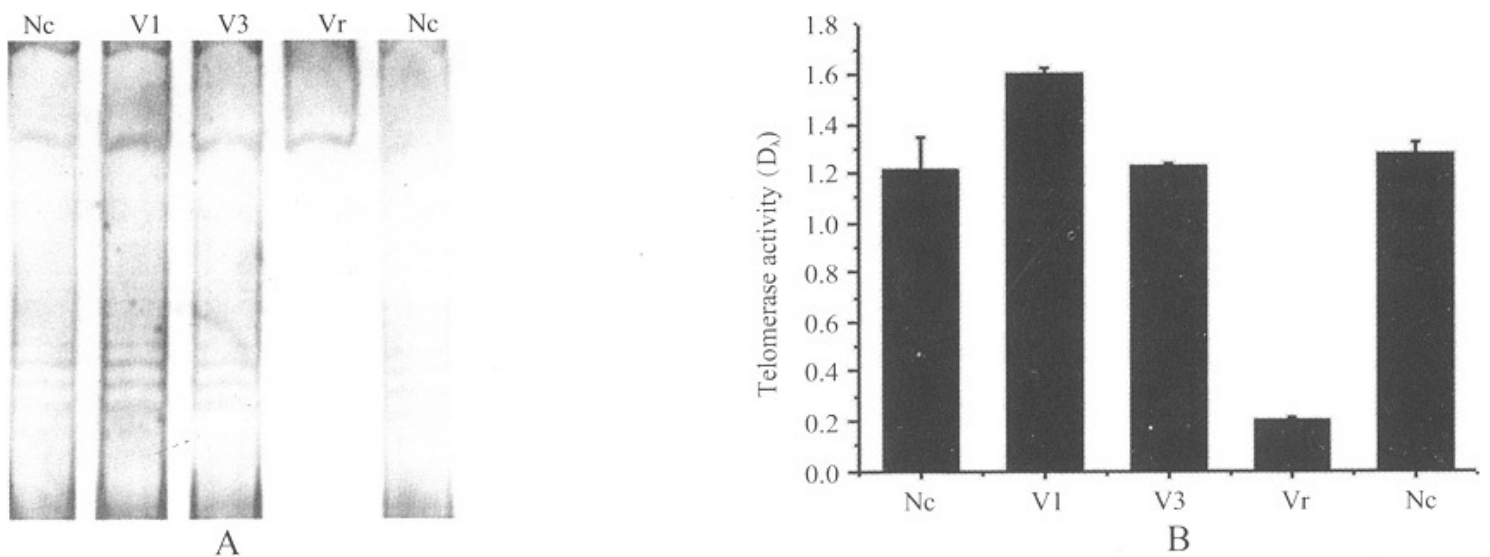


图3 Sp1和Sp3过表达对Jurkat T细胞端粒酶活性的影响
 Fig.3 Effect of Sp1 and Sp3 overexpression on telomerase activity in Jurkat T cells
 A: Telomeric DNA ladder stained by silver; B: Analysis of quantification by Telo-PCR-ELISA
 Vc: Empty vector; V1: Sp1 expression vector; V3: Sp3 expression vector; Vr: RNase treatment; Nc: Normal control

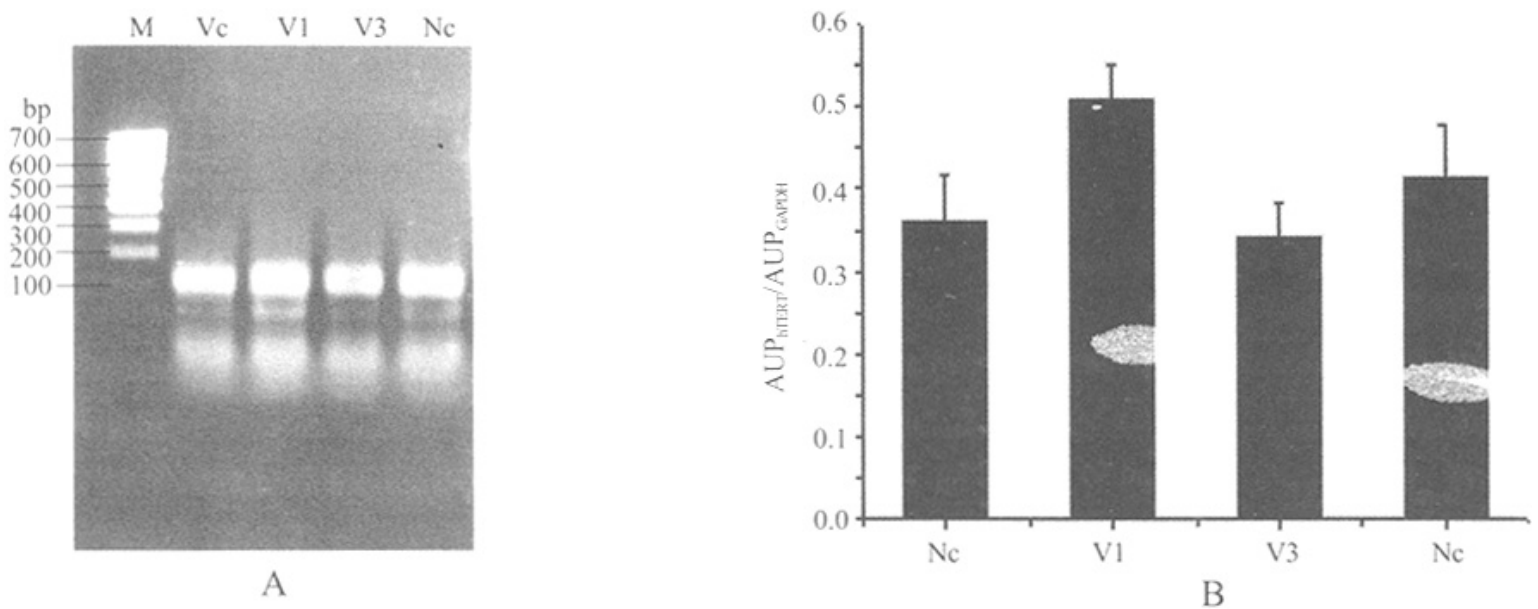


图4 Sp1和Sp3过表达对Jurkat T细胞hTERT mRNA水平的影响

Fig.4 Effect of Sp1 and Sp3 overexpression on hTERT mRNA level in Jurkat T cells
 A: 2% agarose gel electrophoresis of hTERT mRNA co-amplified with GAPDH by RT-PCR; B: Semi-quantification of hTERT mRNA
 M: Marker; Vc: Empty vector; V1: Sp1 expression vector; V3: Sp3 expression vector; Nc: Normal control; hTERT: Human telomerase reverse transcriptase; AUP: Area under the peak

3 讨论

Sp 家族成员主要有Sp1、Sp2、Sp3、Sp4。其中, Sp2 功能研究较少, Sp4只在脑等少数组织中表达。我们主要研究了Sp1和Sp3转录因子对端粒酶活性和hTERT转录调控作用。结果证明, Sp1转录因子明显促进端粒酶活性和hTERT mRNA转录活性, 这与文献报道结果相一致[4][5]; 而Sp3转录因子对hTERT mRNA转录水平和端粒酶活性无明显抑制作用, 显然, 这一点与长期以来认为的Sp1和 Sp3是同一家族中作用完全相反的两种转录因子[2][3]不完全一致。最近有研究报道, 鼠细胞中Sp3能促进hTERT基因转录[11][12][13], 甚至与Sp1表现为协同作用。因此, Sp 转录因子家族对基因的调节方式因基因而异, 而且有种属差异。Sp1与Sp3表现为相反作用是Sp3竞争Sp1结合位点的结果, 从而抑制Sp1的转录激活作用[3], 而鼠细胞hTERT基因启动子上存在Sp1和Sp3不同的结合位点[12], 这可能是Sp1和Sp3表现为协同作用的原因之一。在人细胞hTERT基因启动子上是否存在Sp1和Sp3不同的结合位点尚不清楚, 我们的实验也没有观察到Sp3促进hTERT转录和端粒酶活性的任何作用。这一结果表明, 在hTERT基因启动子上可能不存在Sp1和Sp3不同的结合位点。最近文献报道, Sp1不仅促进hTERT基因表达, 还促进端粒酶的另一成分人端粒酶RNA(hTR)的表达, 而Sp3对hTR的表达表现为抑制作用[14]。如果Sp3对hTERT转录表现为促进作用的话, 就出现了同一转录因子对同一酶的两个功能相关的不同亚基进行相反的转录调控, 这种相互矛盾的调控方式对端粒酶的表达是不利的。那么, 本实验为什么没有观察到Sp3对端粒酶活性的明显抑制作用呢? hTERT的转录还受另一转录因子c-Myc的调控, c-Myc与Sp1协同调节hTERT的转录[5][6], c-Myc和Sp3对端粒酶活性的调节方式虽然不清楚, 但这可能是Sp3对端粒酶活性没有明显影响的原因之一。

总之, 本研究证明Sp1转录因子通过促进hTERT mRNA的转录水平而增加Jurkat T细胞端粒酶活性, 而Sp3对 hTERT mRNA的转录水平和端粒酶活性没有明显影响, 表明Sp3不是端粒酶活性的负调控因子。抑制转录因子Sp1的表达水平可以作为抑制端粒酶活性, 进而抑制肿瘤生长的手段之一。

参考文献:

- [1]庞建新, 吴曙光. 端粒酶逆转录酶(hTERT)的分子调节机制[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(2): 156-7.
- [2]Suske G. The Sp-family of transcription factors[J]. Gene, 1999, 238(2): 291-300.
- [3] Hagen G, Muller S, Beato M, et al. Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3 [J]. EMBO J, 1994, 13(16): 3843-51.
- [4]Takakura M, Kyo S, Kanaya T, et al. Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells[J]. Cancer Res, 1999, 59(3): 551-7
- [5] Satoru K, Masahiro T, Takahiro T, et al. SP1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(3): 669-77.
- [6]Oh ST, Kyo S, Laimins LA. Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites [J]. J Virol, 2001, 75(12): 5559-66.
- [7]Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, et al. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human[J]. Science, 1997, 277(5328): 955-9.
- [8]Jackson SP, McDonald JJ, Lees-Miller S, et al. GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase[J]. Cell, 1990, 63(1): 155-65.
- [9]Ammanamanchi S, Kim SJ, Sun LZ, et al. Induction of transforming growth factor-beta receptor type II expression in estrogen receptor-positive breast cancer cells through SP1 activation by 5-aza-2'-deoxycytidine[J]. J Biol Chem, 1998, 273(26): 16527-34.
- [10]Kennett SB, Udvardia AJ, Horowitz JM. Sp3 encodes multiple proteins that differ in their capacity to stimulate or repress transcription[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(15): 3110-7.
- [11]Park NH, Guo W, Kim HR, et al. c-Myc and Sp1/3 are required for transactivation of hamster telomerase catalytic subunit gene promoter[J]. Int J Oncol, 2001, 19(4): 755-61.
- [12]Guo W, Okamoto M, Lee YM, et al. Enhanced activity of cloned hamster TERT gene promoter in transformed cells[J]. Biochem Biophys Acta, 2001, 1517(3): 398-409.

[13]Nozawa K, Maehara K, Isobe K. Mechanism for the reduction of telomerase expression during muscle cell differentiation[J]. J Biol Chem, 2001, 276(25): 22016-23.

[14]Zhao JQ, Glasspool RM, Hoare SF, et al. Activation of telomerase RNA gene promoter activity by NF- κ B, Sp1, and the retinoblastoma protein and repression by Sp3[J]. Neoplasia, 2000, 2(6): 531-9.

参考文献:

[1]庞建新, 吴曙光. 端粒酶逆转录酶 (hTERT) 的分子调节机制[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(2): 156-7.

[2]Suske G. The Sp-family of transcription factors[J]. Gene, 1999, 238(2): 291-300.

[3] Hagen G, Muller S, Beato M, et al. Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3[J]. EMBO J, 1994, 13(16): 3843-51.

[4]Takakura M, Kyo S, Kanaya T, et al. Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells[J]. Cancer Res, 1999, 59(3): 551-7

[5] Satoru K, Masahiro T, Takahiro T, et al. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(3): 669-77.

[6]Oh ST, Kyo S, Laimins LA. Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites[J]. J Virol, 2001, 75(12): 5559-66.

[7]Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, et al. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human[J]. Science, 1997, 277(5328): 955-9.

[8]Jackson SP, McDonald JJ, Lees-Miller S, et al. GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase[J]. Cell, 1990, 63(1): 155-65.

[9]Ammanamanchi S, Kim SJ, Sun LZ, et al. Induction of transforming growth factor-beta receptor type II expression in estrogen receptor-positive breast cancer cells through Sp1 activation by 5-aza-2'-deoxycytidine[J]. J Biol Chem, 1998, 273(26): 16527-34.

[10]Kennett SB, Udvardia AJ, Horowitz JM. Sp3 encodes multiple proteins that differ in their capacity to stimulate or repress transcription[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(15): 3110-7.

[11]Park NH, Guo W, Kim HR, et al. c-Myc and Sp1/3 are required for transactivation of hamster telomerase catalytic subunit gene promoter[J]. Int J Oncol, 2001, 19(4): 755-61.

[12]Guo W, Okamoto M, Lee YM, et al. Enhanced activity of cloned hamster TERT gene promoter in transformed cells[J]. Biochem Biophys Acta, 2001, 1517(3): 398-409.

[13]Nozawa K, Maehara K, Isobe K. Mechanism for the reduction of telomerase expression during muscle cell differentiation[J]. J Biol Chem, 2001, 276(25): 22016-23.

[14]Zhao JQ, Glasspool RM, Hoare SF, et al. Activation of telomerase RNA gene promoter activity by NF- κ B, Sp1, and the retinoblastoma protein and repression by Sp3[J]. Neoplasia, 2000, 2(6): 531-9.