



阻抑eIF-4E对大肠腺癌细胞乙酰肝素酶mRNA水平及其表达的影响

真核细胞中mRNA的半衰期差异明显，mRNA的降解是基因表达过程中的一个重要步骤，对于mRNA降解机制的研究将有助于对基因表达进行调控。真核细胞起始因子-4E (eIF-4E) 是mRNA帽结合磷蛋白，是帽依赖性mRNA翻译过程中的限速因子；同时，它和真核细胞mRNA的转运和降解关系密切。有研究表明，eIF-4E水平在一些人类肿瘤组织和肿瘤细胞株中普遍升高[1]。近期研究提示，帽结合蛋白eIF-4E过量表达是结肠癌恶性转变中的早期事件[2]。乙酰肝素酶是一种促进癌细胞侵袭转移的关键酶，细胞外基质及基底膜破坏需要此酶的活力。本实验使用反义寡核苷酸技术，阻抑或封闭eIF-4E基因表达，降低eIF-4E活性和水平，从而观察肿瘤细胞内乙酰肝素酶mRNA水平和蛋白表达量的改变，探讨eIF-4E在乙酰肝素酶调控机制中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 高侵袭性人源大肠腺癌细胞株LS-174T由美国ATCC(American Type Culture Collection)收录，购自中科院上海细胞所细胞库。LS-174T接种于含10%热灭活新生小牛血清的RBMI 1640培养基中，在37℃、饱和湿度及5% CO₂的培养箱中连续培养。细胞分3组：空白对照组(未加任何处理因素)；转染反义寡核苷酸(asODN)组；转染正义寡核苷酸(sODN)组。实验细胞均处于对数生长期。

1.1.2 寡聚核苷酸(ODN) 针对人的eIF-4E设计的asODN参阅文献[3]，序列为：5'-AGTCGCCATCTTA GATCGAT-3' (20 mer)，与靶mRNA的翻译起始区互补，对应人eIF-4E mRNA -11到+9碱基序列；作为对照的sODN序列为：5'-ATCGATCTAAGATGGC GACT-3'，并在两条ODN链进行全硫代磷酸化修饰，形成硫代磷酸化寡核苷酸，以阻止其被核酸酶降解。ODN由上海生工生物工程公司合成。

1.1.3 脂质体 选用Invitrogen公司出品的阳离子脂质体LIPOFECTAMINE™ 2000。

1.1.4 RT-PCR试剂 Trizol RNA提取试剂盒(Gibco公司)，Taq DNA聚合酶(华美生物工程公司)，M-MuLV H-(minus)逆转录酶(芬兰FINNZYMES公司)，100 bp DNA分子量标准(华美生物工程公司)。eIF-4E的引物序列[4]如下，上游引物：5' AGATGGCGA CTGTGCAACC3'；下游引物：5' CAGCGCCACATAC ATCAT3'。磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物序列如下，上游引物：5' CTGGCGCTGAGTACGTCGTG3'；下游引物：5' CAGTCTTCTGGGTGGCAGTG3'。eIF-4E和GAPDH的预计扩增产物分别是459和294 bp。

1.1.5 Western blotting试剂 eIF-4E单抗(美国BD Transduction Laboratories)，乙酰肝素酶多抗由澳州大学Mark D. Hulett教授惠赠，辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体(Amersham公司)，Luminal化学发光试剂盒(Santa Cruz Biotechnology公司)，PVDF膜(Boehringer Mannheim公司)，测量蛋白浓度试剂盒为Bio-Rad Coomassie Protein Assay Kit。

1.1.6 Northern blot试剂 随机引物标记试剂盒为Boehringer Mannheim公司产品，尼龙膜为Amersham公司产品。

1.2 方法

1.2.1 反义核酸快速脂质体转染 转染按Invitrogen公司脂质体试剂说明书操作。细胞计数，以 5×10^6 /瓶接种70 ml培养瓶，培养过夜，使其达到80%瓶底面积。在消毒试管中配制asODN(或sODN)/LIP0 2000复合物，使ODN的终浓度分别为 $2 \mu\text{mol/L}$ 。培养瓶中吸出含10%小牛血清RBMI 1640培养液，用无血清RBMI 1640洗细胞1次，直接加入制备好的ODN+LIP02000复合物，前后轻摇混匀。培养24和48 h后，提取细胞。分别提取细胞蛋白和各段RNA，测RNA和蛋白浓度。

1.2.2 RNA提取 提取总RNA用Trizol提纯(Gibco公司)，RNA沉淀溶于0.1% DEPC水中，采用紫外分光光度计测RNA浓度。 D_{260}/D_{280} 值须在 $1.8 \sim 2.0$ ，并稀释至 $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

1.2.3 RT-PCR检测eIF-4E基因表达水平 在 $20 \mu\text{l}$ 逆转录体系中加入模板RNA $1 \mu\text{l}$ ，细胞总RNA达 $0.1 \sim 1.0 \mu\text{g}$ ，Oligo(dT)₁₈ ($0.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) $4 \mu\text{l}$ ，用DEPC处理的双蒸水补足体积至 $15.5 \mu\text{l}$ 。 $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 加热5 min，迅速置冰上，短暂离心。上述微量离心管内加入： $10 \times$ 反应缓冲液 $2 \mu\text{l}$ ， $4 \times$ dNTP mix(每种 10 mmol) $1 \mu\text{l}$ ，RNA酶抑制剂($40 \text{ U}/\mu\text{l}$) $0.5 \mu\text{l}$ ，M-MuLV逆转录酶($200 \text{ U}/\mu\text{l}$) $1 \mu\text{l}$ ， $38 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温60 min，进行逆转录反应。 $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 加热10 min，灭活逆转录酶活性。取 $10 \mu\text{l}$ 逆转录产物作PCR扩增，PCR参数： $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 45 s、 $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 45 s、 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min，进行30次循环后(循环次数是根据其扩增动力学实验确定的)， $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸6 min。以GAPDH作内参照。PCR产物作2%琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色，分析。

1.2.4 免疫学鉴定 蛋白表达产物采用Western blot进行分析，参照文献[5] 并稍作修改。取蛋白 $50 \mu\text{g}$ ，与 $1 \times$ SDS上样缓冲液按 $1:3$ (v/v)比例混合，沸水浴10 min， $10\ 000 \text{ r/min}$ 离心10 min，与蛋白质分子量标准一起上样。eIF-4E采用15%分离胶，一抗 $1:500$ ；乙酰肝素酶采用10%分离胶，一抗 $1:700$ 。两者积层胶均为5%，二抗 $1:2\ 000$ 。PVDF膜与二抗孵育完后，洗膜。Luminal化学发光显影，暗室内曝光 $30 \text{ s} \sim 5 \text{ min}$ ，立即冲洗。Western blot图片应用UVI Tec凝胶成像系统测定 D_{λ} ，处理组所测数据均与对照组比较。

1.2.5 Northern blotting 参阅文献[5]，采用 $30 \mu\text{g}$ RNA上样跑1%甲醛变性电泳凝胶，毛细管洗脱法将RNA转至带阳离子的尼龙膜上。用于制作探针的DNA片段采用PCR方法扩增[6]，上游引物序列： $5' \text{ -G ATATT TTCATCAATGGGTCGC-3'}$ ；下游引物序列： $5' \text{ -TATA TGAGAAAGCTGGCAAGCC-3'}$ 。PCR产物纯化，使用随机引物标记试剂盒(Boehringer Mannheim)以 $[\alpha^{32}\text{P}]$ dATP标记DNA探针，放射比活度为 $1.67 \text{ MBq}/\mu\text{g}$ 。 $42 \text{ }^\circ\text{C}$ 预杂交约4 h，加入变性探针，相同温度杂交过夜。选择低严谨性漂洗，洗膜后室温干燥尼龙膜， $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 放射自显影显示杂交信号。

1.3 统计学处理

各实验组实验重复3次，采用多个样本均数比较的方差分析，两两比较用LSD法。

2 结果

2.1 LS-174T细胞eIF-4E基因表达

RT-PCR产物电泳显示，对照组和处理组均在459 bp处有特异性的eIF-4E基因条带，但asODN组基因表达明显低于sODN组，sODN组和空白组间差别不明显；各组均出现的294 bp处的基因条带为内参照GAPDH的扩增产物，各组间无明显差别(图1)。经凝胶成像分析系统分析电泳结果并成像，对照组及sODN组eIF-4E/GAPDH比值分别为 0.87 ± 0.07 和 0.81 ± 0.06 ，两者无显著性差异($P > 0.05$)；而asODN组为 0.30 ± 0.16 ，与对照组和sODN相比，显著降低($P < 0.01$)。

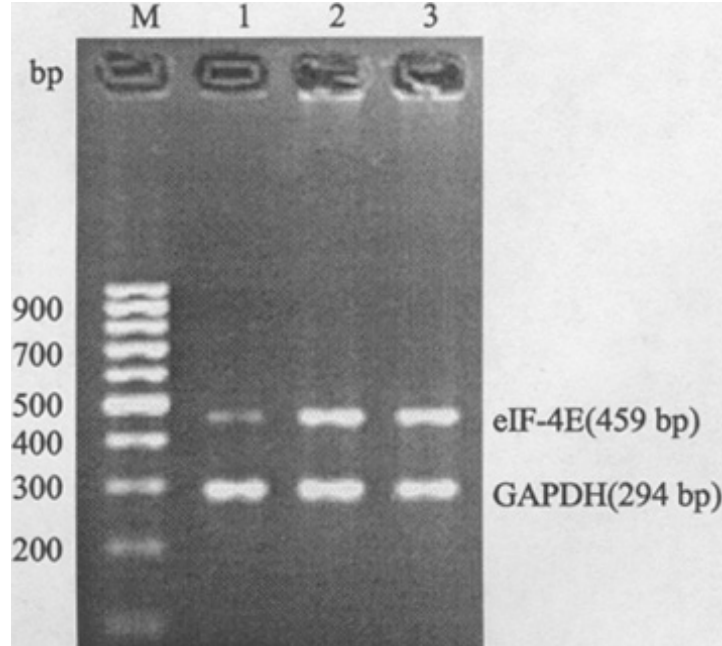


图1 RT-PCR检测反义寡核苷酸阻抑eIF-4E基因表达

Fig.1 Inhibitory effect of antisense oligonucleotide on eIF-4E gene expression assayed by RT-PCR

M: Marker; 1: Antisense oligonucleotide-transfected cells; 2: Sense oligonucleotide-transfected cells; 3: Control

2.2 Western blotting检测分析

在Western blotting分析中，以第一道阳性对照组表达量为1，其他各组值均与阳性对照组表达量比较，得出相对值。Western blotting结果(图2)应用光密度成像分析。asODN转染组eIF-4E蛋白(0.64 ± 0.05)和sODN组(0.93 ± 0.02)及空白对照组(0.95 ± 0.04)比较，表达显著减少($P < 0.01$)，而sODN组和空白对照组之间无显著差别($P > 0.05$)。

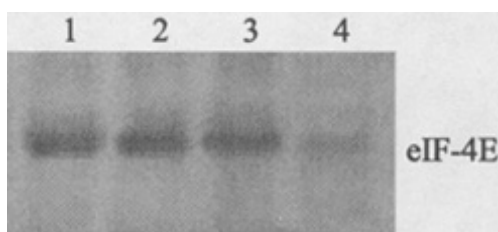


图2 Western blotting 检测寡核苷酸处理后eIF-4E蛋白表达

Fig.2 Western blotting for eIF-4E protein expression after oligonucleotide treatment
1: eIF-4E standard antigen (derived from a human neuroblastoma cell line) as the positive control marker; 2: Untreated cells (control); 3: Sense oligonucleotide-treated cells; 4: Antisense oligonucleotide-treated cells

阻抑eIF-4E后，乙酰肝素酶蛋白Western blotting结果显示相对分子质量50 000和65 000处均有蛋白表达，文献提示：50 000处蛋白代表有活性酶，65 000处蛋白代表未经剪切的酶原[7]。Western blotting结果(图3)示：asODN处理组50 000处乙酰肝素酶蛋白相对光密度值为 0.32 ± 0.08 ，显著低于sODN处理组(0.96 ± 0.05)和空白对照组(1.00 ± 0.03) ($P < 0.01$)；asODN处理组65 000处乙酰肝素酶蛋白相对光密度值为 0.27 ± 0.06 ，亦显著低于sODN处理组(0.95 ± 0.03)和空白对照组(1.00 ± 0.04) ($P < 0.01$)；而50 000和65 000处蛋白在空白对照组和sODN处理组间无差异($P > 0.05$)。以上提示，asODN阻抑eIF-4E表达后，乙酰肝素酶蛋白翻译表达量下降。

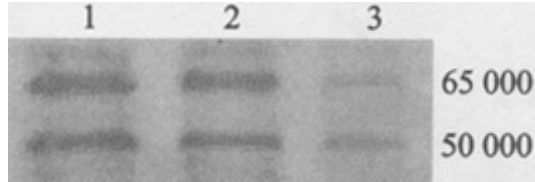


图3 Western blot检测LS-174T细胞乙酰肝素酶蛋白表达水平

Fig.3 Heparanase expression in LS-174T cells detected by Western blotting
1: Untreated cells (control); 2: Sense oligonucleotide-treated cells; 3: Antisense oligonucleotide-treated cells

2.3 Northern blotting检测乙酰肝素酶mRNA表达水平

杂交光密度信号代表mRNA丰度，分别除以同组的28 S RNA光密度来校正上样的差异。未阻滞组(sODN组)乙酰肝素酶mRNA光密度是阻滞组(asODN组)的6.4倍(图4)。表明阻滞eIF-4E表达后，乙酰肝素酶mRNA表达水平下降，并进而影响其翻译表达过程。

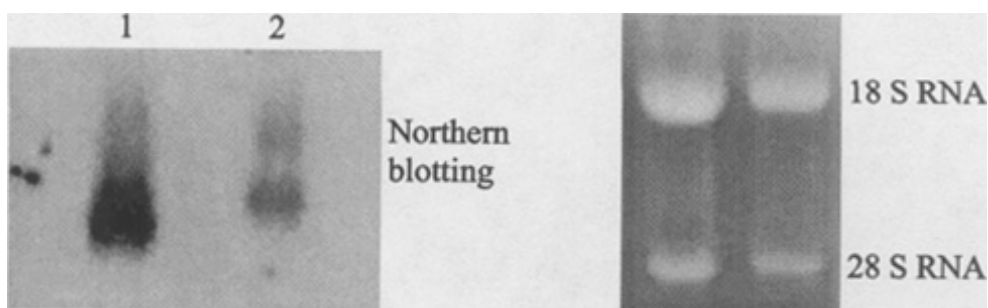


图4 抑制eIF-4E对大肠癌细胞内乙酰肝素酶mRNA丰度的影响

Fig.4 Effect of eIF-4E inhibition on heparanase mRNA abundance in LS-174T cells
The left figure shows the result of Northern blotting for heparanase mRNA; The right one shows the corresponding ethidium bromide gel for differential correction in loading
Lane 1: Group without inhibition of eIF-4E (sODN-treated); 2: Group with inhibition of eIF-4E (asODN-treated)

3 讨论

有关eIF-4E和人类肿瘤相关性的研究较少。现有证据显示：eIF-4E不仅参与细胞的转化，而且影响肿瘤的形成、浸润和转移[1]。eIF-4E活性增加促进一些调节细胞不良生长的因子(如c-myc、cyclin D1、TGF- β 等)过量表达和肿瘤的浸润、转移，这些因子的过量表达共同诱导肿瘤进展过程中的一些恶性表型的产生。关于eIF-4E调控基因表达的机制：(1)可能在帽依赖性翻译水平上调节这些恶性相关因子表达；(2)eIF-4E还参与真核细胞mRNA核浆转运[8]，并参与调控mRNA的降解。在真核细胞mRNA的降解方式中，脱腺苷酸依赖型降解是大部分mRNA降解的主要途径。在此途径中，eIF-4E与mRNA 5'端帽子结构连接，eIF-4G同时和eIF-4E和poly(A)结合蛋白发生关联[9][10]。这种构型保护mRNA的5'端和3'端不受脱帽酶和脱腺苷酶的作用。一旦这种稳定的环状结构被破坏，poly(A)尾巴在poly(A)核糖核酸酶的作用下发生水解，poly(A)结合蛋白脱离，紧接着发生脱帽反应。脱帽酶Dcp1切除mRNA 5'端鸟苷酸形成的帽子结构，脱帽后的mRNA很容易被5'→3'核酸外切酶识别降解。所以，eIF-4E在保护mRNA不被降解方面有重要作用。

在肿瘤侵袭转移酶中，乙酰肝素酶是一个关键的细胞外基质降解酶。已知细胞外基质和血管基底膜中含有大量硫酸类肝素，可以封阻癌细胞移动。乙酰肝素酶通过降解硫酸乙酰肝素和乙酰肝素蛋白聚糖上的聚糖侧

链, 在肿瘤浸润和转移中起重要作用[11]。阻抑eIF-4E是否会通过脱腺苷酸依赖型降解途径影响乙酰肝素酶mRNA的丰度, 并进而降低其蛋白表达量是我们研究的重点。本实验结果表明, 针对eIF-4E的硫代asODN经脂质体导入LS-174T细胞后, 其基因表达明显受到抑制, eIF-4E的蛋白表达产物显著下降, 表明针对eIF-4E mRNA的asODN具有较强的特异性, 充分抑制了靶基因的表达。本实验还观察到: 与对照组比较, eIF-4E被阻滞表达后, 肿瘤细胞内乙酰肝素酶mRNA含量显著下降; 同时, Western blotting检测显示在eIF-4E阻滞组乙酰肝素酶的蛋白表达水平也显著下降。这些表明结肠癌细胞中乙酰肝素酶受eIF-4E的调控, 其精确机制可能为: 阻滞eIF-4E, 影响了乙酰肝素酶mRNA的稳定表达, 促其降解, 进而使乙酰肝素酶的蛋白表达量下降。

有研究表明, 许多疾病的发生与mRNA的稳定性相关, 干扰mRNA的降解过程可能治疗相关疾病[12][13]。到目前为止, 只发现了一种乙酰肝素酶, 未见其亚型存在, 而细胞外基质及基底膜的破坏又必须此酶的活力, 所以研究它的调控机制有重要意义。本研究结果对抗肿瘤转移的基因治疗具有一定意义。

(责任编辑: 黄开颜)

参考文献:

- [1] Zimmer SG, De-Benedetti A, Graff JR. Translational control of malignancy: the mRNA cap-binding protein, eIF-4E, as a central regulator of tumor formation, growth, invasion and metastasis[J]. *Anticancer Res*, 2000, 20(3A): 1343-51.
- [2] Rosenwald IB, Chen JJ, Wang S, et al. Upregulation of protein synthesis initiation factor eIF-4E is an early event during colon carcinogenesis[J]. *Oncogene*, 1999, 18(15): 2507-17.
- [3] de-Benedetti A, Joshi-Barve S, Rinker-Schaeffer C, et al. Expression of antisense RNA against initiation factor eIF-4E mRNA in HeLa cells results in lengthened cell division times, diminished translation rates, and reduced levels of both eIF-4E and the p220 component of eIF-4F[J]. *Mol Cell Biol*, 1991, 11(11): 5435-45.
- [4] Anthony B, Carter P, DeBenedetti A. Overexpression of the proto-oncogene/translation factor 4E in breast-carcinoma cell lines[J]. *Int J Cancer*, 1996, 65(6): 858-63.
- [5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*[M]. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 1989. 362, 888.
- [6] Kussie PH, Hulmes JD, Ludwig DL, et al. Cloning and functional expression of a human heparanase gene[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 261(1): 183-7.
- [7] Hulett MD, Hornby JR, Ohms SJ, et al. Identification of active-site residues of the pro-metastatic endoglycosidase heparanase[J]. *Biochemistry*, 2000, 39(51): 15659-67.
- [8] Rousseau D, Kaspar R, Rosenwald I, et al. Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(3): 1065-70.
- [9] Dehlin E, Wormington M, Korner CG, et al. Cap-dependent deadenylation of mRNA[J]. *EMBO J*, 2000, 19(5): 1079-86.
- [10] Chang M, French-Cornay D, Fan HY, et al. A complex containing RNA polymerase II, Paf1p, Cdc73p, Hpr1p, and Ccr4p plays a role in protein kinase C signaling[J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(2): 1056-67.
- [11] Eccles SA. Heparanase: breaking down the barriers of tumors[J]. *Nat Med*, 1999, 5(7): 735-6.
- [12] Richter L. Organization and functional roles of the cytoskeleton in oligodendrocytes[J]. *Microsc Res Tech*, 2001, 52(6): 628-36.
- [13] Barzilai A, Zilkha FR, Daily D, et al. The molecular mechanism of dopamine-

induced apoptosis: identification and characterization of genes that mediate dopamine toxicity[J]. J Neural Transm Suppl, 2000, (60): 59-76.

参考文献:

- [1] Zimmer SG, De-Benedetti A, Graff JR. Translational control of malignancy: the mRNA cap-binding protein, eIF-4E, as a central regulator of tumor formation, growth, invasion and metastasis[J]. Anticancer Res, 2000, 20(3A): 1343-51.
- [2] Rosenwald IB, Chen JJ, Wang S, et al. Upregulation of protein synthesis initiation factor eIF-4E is an early event during colon carcinogenesis[J]. Oncogene, 1999, 18(15): 2507-17.
- [3] de-Benedetti A, Joshi-Barve S, Rinker-Schaeffer C, et al. Expression of antisense RNA against initiation factor eIF-4E mRNA in HeLa cells results in lengthened cell division times, diminished translation rates, and reduced levels of both eIF-4E and the p220 component of eIF-4F[J]. Mol Cell Biol, 1991, 11(11): 5435-45.
- [4] Anthony B, Carter P, DeBenedetti A. Overexpression of the proto-oncogene/translation factor 4E in breast-carcinoma cell lines[J]. Int J Cancer, 1996, 65(6): 858-63.
- [5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 1989. 362, 888.
- [6] Kussie PH, Hulmes JD, Ludwig DL, et al. Cloning and functional expression of a human heparanase gene[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 261(1): 183-7.
- [7] Hulett MD, Hornby JR, Ohms SJ, et al. Identification of active-site residues of the pro-metastatic endoglycosidase heparanase[J]. Biochemistry, 2000, 39(51): 15659-67.
- [8] Rousseau D, Kaspar R, Rosenwald I, et al. Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(3): 1065-70.
- [9] Dehlin E, Wormington M, Korner CG, et al. Cap-dependent deadenylation of mRNA[J]. EMBO J, 2000, 19(5): 1079-86.
- [10] Chang M, French-Cornay D, Fan HY, et al. A complex containing RNA polymerase II, Paf1p, Cdc73p, Hpr1p, and Ccr4p plays a role in protein kinase C signaling[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(2): 1056-67.
- [11] Eccles SA. Heparanase: breaking down the barriers of tumors[J]. Nat Med, 1999, 5(7): 735-6.
- [12] Richter L. Organization and functional roles of the cytoskeleton in oligodendrocytes[J]. Microsc Res Tech, 2001, 52(6): 628-36.
- [13] Barzilai A, Zilkha FR, Daily D, et al. The molecular mechanism of dopamine-induced apoptosis: identification and characterization of genes that mediate dopamine toxicity[J]. J Neural Transm Suppl, 2000, (60): 59-76.