

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

杨玉捷 袁张亚历 袁赖卓胜 袁崔海宏 袁钟世顺 袁刘宇虎 袁第一军医大学南方医院全军消化内科研究所袁广东 广州 510515 袁

摘要 目的 确定阻抑大肠腺癌 LS-174T 细胞中过量表达的真核细胞起始因子-4E 是否促进乙酰肝素酶 mRNA 的降解并改变其翻译表达水平。方法 应用脂质体包裹与 eIF-4E mRNA 翻译起始点互补的反义寡核苷酸转染处理人大肠腺癌细胞 LS-174T。Western blotting 和 RT-PCR 方法分别检测 eIF-4E 被阻抑后转录和翻译水平的改变。采用 Northern blotting 定量检测乙酰肝素酶 mRNA 的细胞内水平。Western blotting 检测其蛋白表达水平的改变。结果 反义寡核苷酸经脂质体转染 LS-174T 细胞后 eIF-4E 基因表达明显受到抑制。其蛋白表达产物也显著下降。伴随 eIF-4E 被阻抑表达。Northern blotting 结果显示乙酰肝素酶 mRNA 水平下降。且其蛋白翻译表达量也降低。结论 阻抑 eIF-4E 影响 LS-174T 细胞乙酰肝素酶 mRNA 的稳定表达。使其降解并降低乙酰肝素酶表达。

关键词 寡核苷酸类;真核细胞起始因子-4E;乙酰肝素酶 mRNA;信使 RNA;结肠直肠癌

中图分类号 R329.24;R735.35 文献标识码 文章编号 000-2588(2003)07-0655-04

Effect of eIF-4E inhibition on heparanase mRNA and its expression in colon adenocarcinoma cell
YANG Yu-jie, ZHANG Ya-li, LAI Zhuo-sheng, CUI Hai-hong, ZHONG Shi-shun, LIU Yu-hu

Institute of Digestive Diseases of PLA, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To verify whether inhibition of the overexpressed eukaryotic initiation factor-4E (eIF-4E) in human colon adenocarcinoma cell line LS-174T may facilitate the degradation of heparanase mRNA and alter the translation and expression level of heparanase protein. Methods A 20-mer antisense oligodeoxynucleotide (asODN) targeted against the translation start site of eIF-4E mRNA was introduced into LS-174T cells by means of lipid-mediated DNA-transfection, followed by Western blotting analysis and reverse transcription-PCR to determine eIF-4E protein and mRNA levels, respectively. Northern blotting was applied to determine heparanase mRNA expression level, with the alteration of heparanase expression assessed by Western blotting analysis. Results The 20-mer asODN against eIF-4E specifically and significantly inhibited eIF-4E protein expression, and as a result, a significant reduction in heparanase mRNA level was observed by Northern blotting in conjunction with significantly decreased heparanase protein expression. Conclusion The inhibition of eIF-4E strongly reduces the stability of heparanase mRNA in colon adenocarcinoma cell line LS-174T and results in an apparent reduction in the expression of heparanase protein.

Key words: oligodeoxynucleotides; eukaryotic initiation factor-4E; heparanase; RNA, messenger; colorectal neoplasms; adenocarcinoma

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 帽结合蛋白。是帽依赖性 mRNA 翻译过程中的限速因子。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。近期研究提示 eIF-4E 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。乙酰肝素酶是一种促进癌细胞侵袭转移的关键酶。

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。取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。ODN 组。实验细胞均处于对数生长期。

收稿日期 2003-03-25

基金项目 国家自然科学基金广东省自然科学基金 10643

Supported by National Fund for College Backbone Teachers; Natural Science Foundation of Guangdong Province (010643)

作者简介 杨玉捷 1965 年 10 月 1 日出生。第一军医大学在读博士研究生。主治医师。电话 020-61364634。E-mail: yujieyang@fimmu.edu.cn

1.1.2 寡聚核苷酸 (ODN) 针对人的 eIF-4E 设计的 asODN 参阅文献 [1] 序列为 5'-AGTCGCCATCTTA GATCGAT-3' (20mer) 与靶 mRNA 的翻译起始区互补对应人 eIF-4EmRNA-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-MuLVH-(minus) 逆转录酶 芬兰 FINNZYMES 公司 100bp DNA 分子量标准 华美生物工程公司 eIF-4E 的引物序列如下 上游引物 5'-AGATGGCGA CTGTGCAACC-3' 下游引物 5'-CAGCGCCACATAC ATCAT-3' 磷酸甘油醛脱氢酶 GAPDH 引物序列如下 上游引物 5'-CTGGCGCTGAGTACGTCGTG-3' 下游引物 5'-CAGTCTTCTGGGTGGCAGTG-3' eIF-4E 和 GAPDH 的预计扩增产物分别是 459 和 294bp

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洲大学 Mark D. Hulett 教授惠赠 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体 美国 Amersham 公司 Luminal 化学发光试剂盒 美国 Santa Cruz Biotechnology 公司 PVDF 膜 德国 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 × 10⁶/瓶 接种 70ml 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 和 sODN 与 LIPO2000 复合物 ODN 的终浓度分别为 2 μmol/L 培养瓶中吸出含 10% 小牛血清 RBMI1640 培养液 用无血清 RBMI 1640 洗细胞 1 次 直接加入制备好的 ODN+LIPO2000 复合物 前后轻摇混匀 培养 24 和 48h 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 1.8~2.0 并稀释至 2 μg/μl

1.2.3 RT-PCR 检测 eIF-4E 基因表达水平 在 20 μl

逆转录体系中加入模板 RNA 1 μg 细胞总 RNA 达 0.1~1.0 μg oligo(dT)₁₈ (0.2 μg/μl) 4 μl 用 DEPC 处理的双蒸水补足体积至 15.5 μl 加热 5min 迅速置冰上 短暂离心 上述微量离心管内加入 10 μl 反应缓冲液 2 μl 逆转录酶 NTP mix 每种 10mmol/l 逆转录酶抑制剂 100 U/μl 0.5 μl M-MuLV 逆转录酶 100 U/μl 逆转录 8 益 恒温 60min 进行逆转录反应 70 益 加热 10min 灭活逆转录酶活性 取 10 μl 逆转录产物作 PCR 扩增 CR 参数 94 益 45 s 5 益 45 s 2 益 1 min 进行 30 次循环 循环次数是根据其扩增动力学实验确定的 2 益 延伸 6min 以 GAPDH 作为内参对照 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 [2] 并稍作修改 取蛋白 50 μg 与 1 × DS 上样缓冲液按 1 (v/v) 比例混合 沸水浴 10min 10000r/min 离心 10min 与蛋白质分子量标准一起上样 eIF-4E 采用 15% 分离胶 抗 1 μg/ml 乙酰肝素酶采用 10% 分离胶 抗 1 μg/ml 两者积层胶均为 5% 抗 1 μg/ml PVDF 膜与二抗孵育完后 洗膜 用 Luminal 化学发光显影 暗室内曝光 30 s~5 min 立即冲洗 Western blot 图片应用 UVITec 凝胶成像系统测定 D_{max} 处理组所测数据均与对照组比较

1.2.5 Northern blotting 参阅文献 [3] 采用 30 μg 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 上游引物序列 5'-G ATATT TTCATCAATGGGTCGC-3' 下游引物序列 5'-TATATGAGAAAGCTGGCAAGCC-3' PCR 产物纯化 用随机引物标记试剂盒 (Boehringer Mannheim) 以 [³²P]dATP 标记 DNA 探针 放射比活度为 1.67 MBq/μg 42 益 预杂交 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 益 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 459bp 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 ODN 组和空白组间差别不明显 且各组均出现的 294bp 处的基因条带为内参对照 GAPDH 的扩增产物 各组间无明显差别 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 依 0.07 和 0.81 依 0.06 两者无显著性差异 $P > 0.05$ 然而 asODN 组为 0.30 依 0.16 与对照组和 sODN 相比显著降低 $P < 0.01$

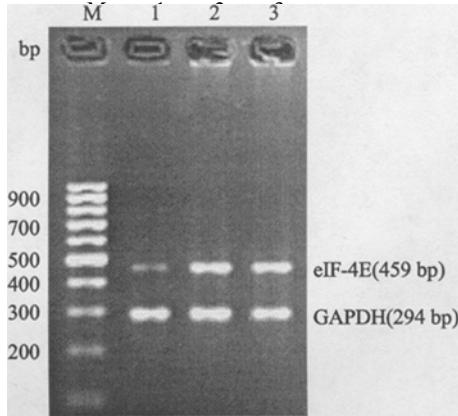


图 1 RT-PCR 检测反义寡核苷酸阻抑 eIF-4E 基因表达
Fig.1 Inhibitory effect of antisense oligonucleotide on eIF-4E gene expression assayed by RT-PCR
M:Marker;1:Antisense oligonucleotide-transfected cells;2:Sense oligonucleotide-transfected cells;3:Control

2.2 Westernblotting 检测分析

在 Westernblotting 分析中我们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 Westernblotting 结果如图 2 应用光密度成像分析 asODN 转染组 eIF-4E 蛋白 0.64 依 0.05 和 sODN 组 0.93 依 0.02 与空白对照组 0.95 依 0.04 比较表达显著减少 $P < 0.01$ 然而 sODN 组和空白对照组之间无显著差别 $P > 0.05$

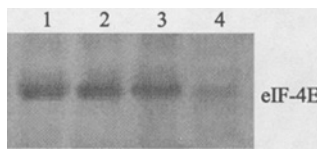


图 2 Westernblotting 检测寡核苷酸处理后 eIF-4E 蛋白表达
Fig.2 Westernblotting for eIF-4E protein expression after oligonucleotide treatment
1:eIF-4E standard antigen (derived from a human neuroblastoma cell line) as the positive control marker; 2: Untreated cells (control); 3: Sense oligonucleotide-treated cells; 4: Antisense oligonucleotide-treated cells

阻抑 eIF-4E 后乙酰肝素酶蛋白 Westernblotting 结果显示相对分子质量 50000 和 65000 处均有蛋白表达文献提示 65000 处蛋白代表有活性酶 50000 处蛋白代表未经剪切的酶原 Westernblotting 结果如图 3 显示 sODN 处理组 50000 处乙酰肝素酶蛋白相对光密度值为 0.32 依 0.08 显著低于 sODN 处理组 0.96 依 0.05 与空白对照组 0.00 依 0.03 比较 $P < 0.01$ 然而 sODN

处理组 65 000 处乙酰肝素酶蛋白相对光密度值为 0.27 依 0.06 亦显著低于 sODN 处理组 0.95 依 0.03 与空白对照组 0.00 依 0.04 比较 $P < 0.01$ 然而 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 sODN 阻抑 eIF-4E 表达后乙酰肝素酶蛋白翻译表达量下降

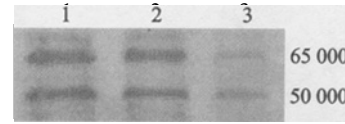


图 3 Westernblot 检测 LS-174T 细胞乙酰肝素酶蛋白表达水平
Fig.3 Heparanase expression in LS-174T cells detected by Western blotting
1: Untreated cells (control); 2: Sense oligonucleotide-treated cells; 3: Antisense oligonucleotide-treated cells

2.3 Northernblotting 检测乙酰肝素酶 mRNA 表达水平

杂交光密度信号代表 mRNA 丰度表分别除以同组的 28S RNA 光密度来校正上样的差异 未阻滞组 sODN 组 eIF-4E 蛋白 mRNA 光密度是阻滞组 sODN 组的 6.4 倍 如图 4 所示表明阻滞 eIF-4E 表达后乙酰肝素酶 mRNA 表达水平下降进而影响其翻译表达过程

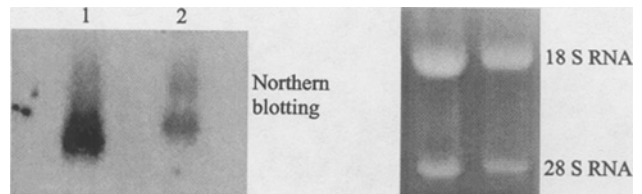


图 4 阻抑 eIF-4E 对大肠癌细胞内乙酰肝素酶 mRNA 丰度的影响

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 eIF-4E 活性增加促进一些调节细胞不良生长的因子 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 可能在帽依赖性翻译水平上调节这些恶性相关因子表达 eIF-4E 还参与真核细胞 mRNA 核浆转运

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。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' 端 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。抑制 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，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，使其降解，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。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。本实验结果对抗肿瘤转移的基因治疗具有一定意义。

参考文献

- 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. *Anticancer Res*, 2000, 20(3A): 1343-51.
- Rosenwald IB, Chen JJ, Wang S, et al. Upregulation of protein synthesis initiation factor eIF-4E is an early event during colon carcinogenesis. *Oncogene*, 1999, 18(15): 2507-17.
- 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. *Mol Cell Biol*, 1991, 11(11): 5435-45.
- Anthony B, Carter P, DeBenedetti A. Overexpression of the proto-oncogene/translation factor 4E in breast-carcinoma cell lines. *Int J Cancer*, 1996, 65(6): 858-63.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 1989. 362, 888.
- Kussie PH, Hulmes JD, Ludwig DL, et al. Cloning and functional expression of a human heparanase gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 261(1): 183-7.
- Hulett MD, Hornby JR, Ohms SJ, et al. Identification of active-site residues of the pro-metastatic endoglycosidase heparanase. *Biochemistry*, 2000, 39(51): 15659-67.
- 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(3): 1065-70.
- Dehlin E, Wormington M, Korner CG, et al. Cap-dependent deadenylation of mRNA. *EMBO J*, 2000, 19(5): 1079-86.
- 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. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(2): 1056-67.
- Eccles SA. Heparanase: breaking down the barriers of tumors. *Nat Med*, 1999, 5(7): 735-6.
- Richter L. Organization and functional roles of the cytoskeleton in oligodendrocytes. *Microsc Res Tech*, 2001, 52(6): 628-36.
- Barzilai A, Zilkha FR, Daily D, et al. The molecular mechanism of dopamine-induced apoptosis: identification and characterization of genes that mediated dopamine toxicity. *J Neural Transm Suppl*, 2000, (60): 59-76.

责任编辑 黄开颜 冤