

雄激素应答元件假冒 DNA 对 PSA 基因启动子的抑制作用

张鹏举, 张建业*, 陈蔚文, 姜安丽, 张莲英, 郭强

(山东大学医学院, 生物化学与分子生物学研究所, 济南 250012)

摘要 研究雄激素应答元件假冒 DNA (ARE decoy) 对前列腺特异抗原 (PSA) 基因启动子的抑制作用. 联合运用报告基因和假冒 DNA 策略, 构建了含 PSA 基因 5 侧启动子区 640 bp DNA 的萤光素酶表达载体 pGL3-PSA, 与人工合成的双链硫代 ARE 假冒 DNA 共转染前列腺癌细胞株 PC3-M 并作用不同的时间 (24 h, 48 h, 72 h). 应用双萤光素酶测定系统, 检测萤光素酶的表达活性. 结果显示: ARE decoy DNA 显著抑制报告基因萤光素酶的表达, 抑制率可达 95%, 而对照 decoy DNA 无此作用. 作用不同的时间对萤光素酶活性的抑制无显著性差异.

关键词 假冒 DNA 策略, 雄激素应答元件, 转录因子, 报告基因

中图分类号 Q55, Q78

Inhibition of Androgen Responsive Element Decoy DNA on the Promoter of Prostate Specific Antigen

ZHANG Peng-ju, ZHANG Jian-ye*, CHEN Wei-wen, JIANG An-li, ZHANG Lian-ying, GUO Qiang

(Institute of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract To observe the effect of exogenous androgen responsive element decoy on the promoter of prostate specific antigen (PSA), pGL3-PSA luciferase expression vector containing 640 bp DNA fragment of the PSA gene 5 promoter region was constructed. Meanwhile, a 23-mer phosphorothioated ARE decoy based on the deduced ARE sequence at the promoter region of PSA gene was synthesized. pGL3-PSA plasmid and the ARE decoy DNA were cotransfected into PC3-M cell by lipofectamine™ 2000. Through detecting the activity of luciferase, the effect of ARE decoy on the promoter of PSA was studied. The results showed that the activity of luciferase was significantly reduced in the ARE decoy-transfected cells, though not in the cells transfected with the control decoy. There were no significant differences in the effect of ARE decoy in different time.

Key words decoy strategy, androgen responsive element, transcription factor, reporter gene

雄激素及其受体在前列腺的发生, 生长, 分化和功能的维持上起着重要的作用. 雄激素的作用是由雄激素受体 (AR) 介导的^[1,2]. AR 属于类固醇/甲状腺素受体超家族成员, 是一种配体依赖型的转录因子, 主要存在靶细胞的核内. 前列腺特异抗原 (prostate specific antigen PSA) 特异地在前列腺上皮细胞中表达^[3], 且其表达受雄激素调节^[4]. PSA 基因附近的 640 bp 的启动子中^[5,6] 含有一个功能性 TATA 盒 (TTTATA, - 28 ~ - 23), 一个 GC 盒 (GGCGGAGT, - 54 ~ - 45) 和一个雄激素应答元件 (ARE, AGAACAgcaAGTGCT, - 170 ~ - 156). 雄激素进入前列腺上皮细胞后首先与细胞核内的雄激素受体结合, 引起受体构象改变, 随后受体与热休克蛋白解离, 受体磷酸化形成二聚体, 二聚体与启动子中的雄

激素应答元件结合, 促进前起始复合物的形成和诱导 PSA 基因的转录. 转录因子假冒 DNA 策略是人工合成与转录因子结合序列相一致的、与转录因子有高亲和力的双链寡核苷酸 DNA, 将其转入细胞内, 与内源性顺式元件竞争结合特定的转录因子, 削弱转录因子与内源性基因的作用, 导致基因表达抑制.

收稿日期: 2003-01-22, 接受日期: 2003-04-10

国家自然科学基金项目 (No. 30171026)

*联系人 Tel: 0531-8382092, E-mail: zhjy@sdu.edu.cn

张鹏举, 女, 1976 年 11 月生, 硕士研究生

Received: January 22, 2003; Accepted: April 10, 2003

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30171026)

*Corresponding author Tel: 0531-8382092, E-mail: zhjy@sdu.edu.cn

本实验根据 PSA 基因启动子 - 170 bp 附近的 ARE 序列合成 ARE decoy DNA, 为了使寡核苷酸片段在细胞内稳定而采用了全硫代的形式. 将合成的 ARE decoy DNA 与构建的含有 PSA 5 侧启动子区 640 bp DNA (- 170 附近存在一个 ARE) 的萤光素酶报告基因表达载体 pGL3-PSA 共转染前列腺癌细胞 PC3-M, 通过检测萤光素酶活性, 研究 ARE decoy DNA 对 PSA 启动子的抑制作用.

1 材料和方法

1.1 材料

各种酶均购自 Takara 公司. RPMI1640 为 Hyclone 产品. Dual-luciferase Reporter Assay System 购自 Promega 公司.

细胞和质粒 pGL3-Basic 质粒, pGL3-Control 质粒, pRL-TK 质粒 由本校遗传教研室龚瑶琴教授惠赠. PC3-M 细胞和雄激素受体表达质粒 hAR 由本教研室保存.

1.2 pGL3-PSA 质粒的构建

用 PCR 扩增 PSA 基因 5 侧启动子中 640 bp 的 DNA 片段, 经电泳纯化后用限制性内切酶 *Sac* 和 *Kpn* 消化, 然后连接到用同样限制性内切酶切割的 pGL3-Basic 质粒上, DNA 片段连至质粒中萤光素酶(Luc⁺) 基因上游. 重组质粒转化到大肠杆菌, 分离纯化后, 双酶切和电泳鉴定后交上海博雅公司测序. 构建的质粒命名为 pGL3-PSA.

1.3 合成硫代寡核苷酸并退火

ARE decoy 5'-TGCA GAACAGCAA GTGCTA GC-3'

3'-ACGICTTGTCGTTACGATCG-5'

Control decoy 5'-GICTGATAAA GGGTGTCTTTTT-3'

3'-CAGACTATTTCCCAAA GAAAAA-5'

TEN 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 0.1 mmol/L EDTA, 0.1 mol/L NaCl, pH 8.0) 分别溶解寡核苷酸单链, 互补链等摩尔比混合, 95 °C 10 min, 缓慢冷却至室温.

1.4 细胞培养

PC3-M 在 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中培养, 培养基为 RPMI1640, 含 10% 新生牛血清及青霉素、链霉素各 100 U/ml.

1.5 转染实验

使用 Invitrogen 公司的 Lipofectamin™ 2000 转染系统, 按说明书操作. 利用 pRL-TK 质粒作为内参照, 内参照与各表达质粒的比值为 1:25. 转染前 1 d, 接种 2 × 10⁵ 细胞于 12 孔板中, 培养 18 ~ 24 h, 待细胞汇合至 90% ~ 95%, 用无血清培养基洗涤细胞

2 次. 0.4 ~ 1.6 μg 质粒/合成 DNA 和 1 ~ 4 μl Lipofectamin™ 2000 在无血清培养基中混匀, 室温放置 20 min, 加到细胞上, 培养 36 ~ 40 h 后收获细胞.

1.6 细胞的收获和萤光素酶表达活性的测定

应用 Dual-luciferase Assay System, 按照试剂盒说明书操作. 吸去细胞培养液, PBS(1.15 g/L Na₂HPO₄, 0.2 g/L KH₂PO₄, 8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, pH 7.4) 洗涤细胞 1 次, 尽量吸尽 PBS 洗涤液, 每孔加入 100 μl 1 × PLB (passive lysis buffer), 轻轻晃动 5 min, 将细胞裂解液转移到 1.5 ml Eppendorf 管内. 化学发光仪设置如下: 测量前延搁时间 2 s, 测量时间 10 s, 手动操作. 在测量管中加入 100 μl LAR (Luciferase Assay Reagent), 吸取 20 μl 细胞裂解液与之混匀, 尽快放入发光仪, 读取样品中载体携带的萤火虫萤光素酶激发底物所释放荧光的数值 (M₁). 读数完毕后, 在同一测量管中加入 100 μl Stop & Go Reagent, 混匀后放入发光仪读取样品中内参照质粒携带的水母萤光素酶激发底物所释放荧光的数值 (M₂). 为消除转染效率带来的影响, 以萤火虫萤光素酶与水母萤光素酶活性的比值 (M₁/M₂) 表示萤光素酶重组质粒的相对表达活性.

1.7 数据处理

所有数据均以平均数 ± 标准差表示. 应用 t 检验进行两均数间的差异性分析, P < 0.05 认为有显著性差异. 采用复孔处理, 每组实验重复 3 次.

2 结果

2.1 pGL3-PSA 质粒的构建及鉴定

用 PCR 扩增了 PSA 基因 5 侧启动子区 640 bp 的 DNA 片段, 把它连于 pGL3-Basic 质粒中萤光素酶(Luc⁺) 基因的上游, 构建了质粒 pGL3-PSA (Fig. 1). 此重组质粒经限制性内切酶 *Sac* 和 *Kpn* 的联合消化, 会被切成 640 bp 和 4.8 kb 的两个片段, 酶切反应的结果与预期的相符. 将酶切验证正确的重组质粒送上海博亚公司测序, 结果完全正确(图略).

在重组质粒中萤光素酶的表达受上游启动子序列的调节. 转染后, Luc 活性的高低直接反映了启动子作用的强度. 用等量的 pGL3-Basic, pGL3-Control, pGL3-PSA 分别和 pRL-TK 共转染 PC3-M, pGL3-PSA, hAR, pRL-TK 共转染 PC3-M, 在有或无睾酮条件下培养 (Fig. 2).

发现 pGL3-PSA 的萤光活性介于 pGL3-Basic 和 pGL3-Control 之间, 在雄激素和雄激素受体同时存在

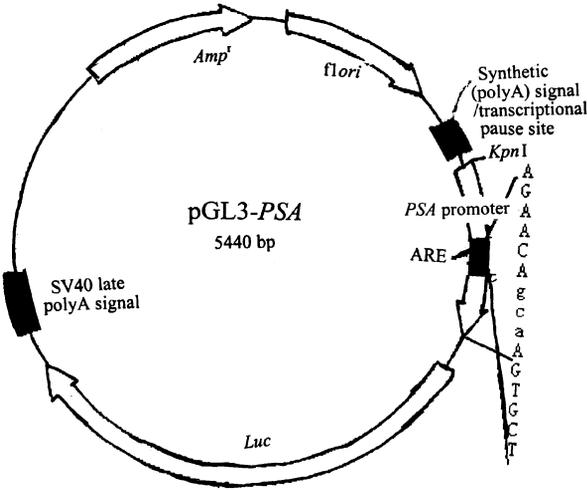


Fig. 1 pGL3-PSA plasmid

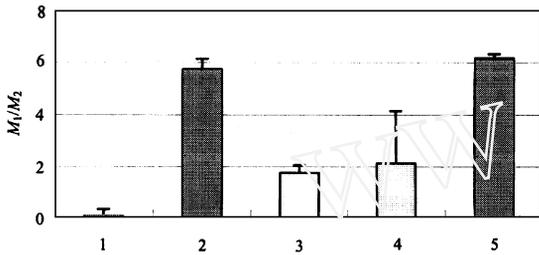


Fig. 2 Measurement of luciferase activities in PC3-M
1. pGL3-Basic; 2. pGL3-Control; 3. pGL3-PSA; 4. pGL3-PSA + hAR; 5. pGL3-PSA + hAR + testosterone

下, Luc 活性显著升高.

2.2 ARE decoy DNA 转染结果

为确定雄激素受体表达质粒 hAR 和 pGL3-PSA 的合适浓度, 保证 pGL3-PSA 过量. 我们固定 hAR 浓度 1.5 μg 与不同量 pGL3-PSA, pRL-TK 共转染 PC3-M (Fig. 3).

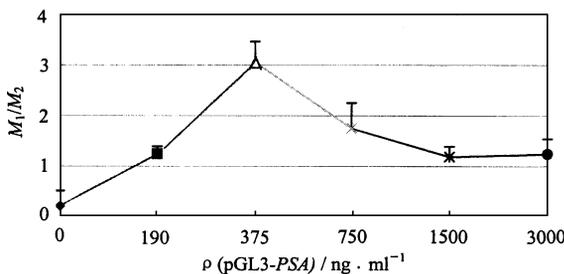


Fig. 3 Measurement of luciferase activities in PC3-M
Different amount of pGL3-PSA cotransfected with a fixed amount of hAR

固定 pGL3-PSA 0.19 μg/ml 和 pRL-TK 7.6 ng/ml 与不同浓度的 hAR 共转染 PC3-M (Fig. 4).

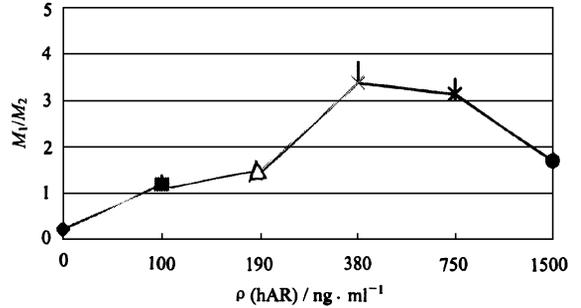


Fig. 4 Measurement of luciferase activities in PC3-M
Different amount of hAR cotransfected with a fixed amount of pGL3-PSA

最终确定应用共转染的 hAR, pGL3-PSA, pRL-TK 量分别为 0.19 μg/ml, 0.19 μg/ml 和 7.6 ng/ml.

不同浓度 ARE decoy DNA 与 hAR, pGL3-PSA, pRL-TK 共转染 PC3-M, 以 Control decoy DNA 作对照 (Fig. 5).

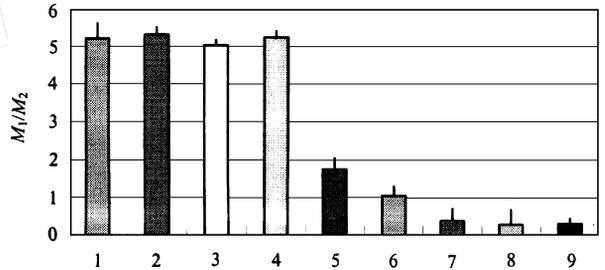


Fig. 5 Measurement of luciferase activities in PC3-M with the following transfections
1. Treated without any decoy DNA; 2-4. Treated with 0.66 μg/ml, 1.32 μg/ml, 1.98 μg/ml control decoy DNA respectively; 5-9 Treated with 0.66 μg/ml, 0.99 μg/ml, 1.32 μg/ml, 1.98 μg/ml, 2.64 μg/ml ARE decoy DNA, respectively

实验发现, ARE decoy DNA 能显著降低萤光素酶表达活性, 在 1.98 μg/ml 时抑制率可达 95%, 而 Control decoy DNA 却无此作用.

为了研究共转染时间对 ARE decoy DNA 作用的影响, 我们分别在共转染后 24 h, 48 h, 72 h 收获细胞, 检测萤光素酶活性 (Fig. 6).

对照组和实验组的结果显示, 不同时间段内, ARE decoy DNA 的抑制作用无显著性差异.

3 讨论

雄激素及其受体在前列腺癌的发生发展过程中起着非常重要的作用. 雄激素的作用由雄激素受体介导. 未活化的雄激素受体通常与热休克蛋白结合.

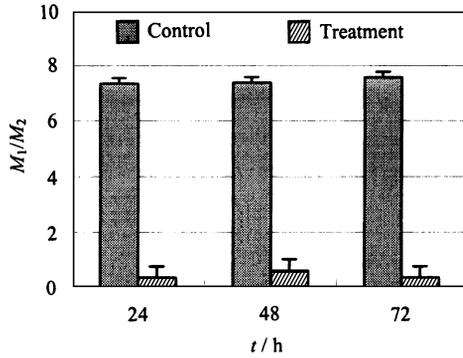


Fig. 6 Measurement of luciferase assay activities in PC3-M in different times with the following transfections

Control group represented cotransfected pCL3-*PSA*, pRL-*TK*, hAR without any decoy DNA; Treatment group represented pCL3-*PSA*, pRL-*TK*, hAR cotransfected with 1.98 $\mu\text{g/ml}$ ARE decoy DNA

一旦与雄激素结合,AR 的构象发生变化而与热休克蛋白分离,活化的 AR 形成二聚体并识别、结合靶基因启动子/增强子中特定的 DNA 序列即雄激素应答元件(ARE)从而启动相应基因的转录。转录因子假冒 DNA 策略^[5]是目前分子生物学领域研究的热点之一,它是应用与顺式作用元件相一致的寡核苷酸双链 DNA 转染细胞,竞争结合并抑制转录因子的作用,从而抑制转录因子调控基因的表达。本实验联合应用报告基因和假冒 DNA 策略,将 PSA 基因启动子与萤光素酶基因(报告基因)相连构建了 PSA-萤光素酶基因真核表达载体,并使之与雄激素应答元件假冒 DNA 共转染前列腺肿瘤细胞 PC3-M。ARE 假冒 DNA 进入细胞后,竞争结合细胞内的雄激素受体,使之不能与 PSA 启动子中的 ARE 结合,从而抑制了 PSA 启动子的作用和萤光素酶基因的表达,抑制率可达 95%。

利用不同顺式作用元件的假冒 DNA 转染细胞,抑制细胞内相应转录因子的作用,可以研究这些顺式元件/转录因子在基表表达调控中的作用机理,以及不同顺式元件/转录因子之间的协同作用,为基因

表达调控研究提供一个重要工具。另一方面,利用假冒 DNA 转染肿瘤细胞,抑制其细胞内转录因子的功能和相关基因的表达,有可能抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡。例如,ARE 假冒 DNA 转染前列腺肿瘤细胞,有可能通过抑制 AR 的作用,诱导前列腺肿瘤细胞的凋亡。利用 E2F 特异结合序列的假冒 DNA 转染肿瘤细胞,有可能抑制肿瘤细胞增殖。又如,生存素(survivin)基因和 *bcl-2* 基因是两个重要的细胞凋亡抗性基因,它们的有效表达均需转录因子 Sp-1 的反式激活。利用 Sp-1 特异结合序列的假冒 DNA 转染肿瘤细胞,有可能通过抑制 Sp-1 的作用阻止生存素和 *bcl-2* 基因的表达,诱导肿瘤细胞凋亡。因此,假冒 DNA 的应用有可能为肿瘤的基因治疗开辟一个新的途径。

参考文献 (References)

- 1 Montgomery B T, Young C Y F, Bilhartz D L, Andrews P E, Prescott J L, Thompson N F, Tindall D J. Hormonal regulation of prostate-specific antigen (PSA) glycoprotein in the human prostatic adenocarcinoma cell line, LNCaP. *Prostate*, 1992, **21**:63 ~ 73
- 2 Young C Y F, Montgomery B T, Andrews P E. Hormonal regulation of prostate-specific antigen mRNA in a human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *Cancer Res*, 1991, **51**: 3748 ~ 3752
- 3 Redgman P H J, Vlietstra R J, Suurmeier L. Characterization of the human kallikrein locus. *Genomics*, 1992, **14**:6 ~ 11
- 4 Lundwall A, Hans Lilja, Lukkarinen O, Vihko P. Molecular cloning of human prostate specific antigen cDNA. *FEBS Lett*, 1987, **214**(2):317 ~ 322
- 5 Henttu P, Lukkarinen O, Vihko P. *Int J Cancer*, 1990, **45**:654 ~ 660
- 6 Riegman P H J, Vlietstra R J, Van der korput J A G M, Brinkmann A O, Trapman J. The promoter of the prostate-specific antigen gene contains a functional androgen responsive element. *Mol Endocrinol*, 5:1921 ~ 1930
- 7 Morishita R, Higaki J, Tomita N, Ogihara T. Application of transcription factor "decoy" strategy as means of gene therapy and study of gene expression in cardiovascular disease. *Circ Res*, 1998, **82**(10): 1023 ~ 1028