

[文章编号] 1000-4718(2008)05-0901-04

F10 基因对转录因子 NF- κ B、AP1 活性的影响*

曹晓敏, 庞战军, 全松, 邢福祺[△]
(南方医科大学南方医院妇产科, 广东 广州 510515)

[摘要] 目的: 研究 F10 基因对转录因子 NF- κ B、AP1 活性的影响。方法: 质粒体共转染 F10 基因和报道质粒 NF- κ B-Luc、AP1-Luc, 通过测定荧光素酶的活性以确定 F10 基因对 NF- κ B 和 AP1 转录活性的影响; 提取各实验组不同时间点细胞核蛋白, 用电泳迁移率改变实验 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 检测 AP1、NF- κ B 和 DNA 的结合活性。结果: F10 基因瞬间转染 A549 细胞 48 h NF- κ B-Luc 和 AP1-Luc 荧光素酶的活性较其对照组分别下降 0.3 和上升 2 倍, AP1 和 NF- κ B 与 DNA 的结合活性分别上升 23% 和下降 49%。结论: F10 基因上调 AP1 活性、下调 NF- κ B 的活性。

[关键词] 葡萄胎; 基因, F10; NF- κ B; 转录因子 AP-1

[中图分类号] R737.33

[文献标识码] A

Effect of F10 gene on activities of transcriptional factor NF- κ B and AP1

CAO Xiao-min, PANG Zhan-jun, QUAN Song, XING Fu-qi

(Department of Obstetrics and Gynecology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China. E-mail: xinfuqi@tom.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the influence of F10 on the activities of transcription factor NF- κ B and AP1 in A549 cells. **METHODS:** The luciferase report plasmids of NF- κ B-Luc, AP1-Luc and F10 gene were introduced into A549 cells and the luciferase activity was detected. The DNA binding activities of AP1 and NF- κ B in the cells were measured by the electrophoretic mobility shift assay (EMSA). **RESULTS:** The luciferase activity in F10⁺ transfection group decreased 30% and increased 2-fold respectively 48 h after transfected with the luciferase report plasmid of NF- κ B-Luc and AP1-Luc in A549 cells. The DNA binding activity decreased 49% and increased 23%, respectively. **CONCLUSION:** F10 gene up-regulates the transcription activity of AP1 and down-regulates the NF- κ B in A549 cells.

[KEY WORDS] Hydatidiform mole; Genes, F10; NF-kappa B; Transcription factor AP-1

本中心应用抑制性消减杂交和差异筛选法, 已经克隆到 1 个新的在葡萄胎中表达上调的基因: F10 EST cDNA (GenBank 登陆号: AB196290), 该基因在葡萄胎组织中上调表达^[1]。本研究旨在综合前期实验结果的基础上研究 F10 对转录因子 NF- κ B 和 AP1 的影响, 进一步探讨 F10 的功能。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 主要材料及试剂 Luciferase Assay System 为 Promega 公司的产品, 报道质粒 NF- κ B-Luc 和 AP1-Luc 购于 BD 公司。Chemiluminescent nucleic acid detection module、LighShift chemiluminescent EMSA kit、NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagents 为 Pierce 产品。生物素标记的 AP1 双链寡核

苷酸探针: 5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3'、3'-GCGAACTACTCAGTCGGCCTT-5'、生物素标记的 NF- κ B-Luc 双链寡核苷酸探针: 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'、3'-TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG-5', 由上海英竣公司合成。

2 方法

2.1 细胞培养 肺癌细胞株 A549 (广州医学院医学实验中心保存、复苏) 培养于含 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养基中, 在 37℃、5% CO₂ 条件下培养。前期实验证实 A549 细胞株低表达 F10 基因, F10 基因转染 A549 细胞前后其基因表达水平有差异, 故对 F10 的转基因研究时肺癌细胞 A549 是一个很好的细胞模型, 可以真实地反映 F10 功能 (另文发表)。

2.2 Lipofectamine 2000 介导的瞬间细胞转染 按照 Lipofectamine 2000 说明书的操作, 将 A549 细胞接

[收稿日期] 2007-05-17 [修回日期] 2007-11-25

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30470658; No. 30672234)

[△]通讯作者 Tel: 020-62841908; E-mail: xinfuqi@tom.com

种于24孔板,每孔细胞数量为 2.4×10^4 。37℃、5% CO₂、饱和湿度培养,当细胞生长到90%的融合度时,瞬间共转染F10 cDNA和NF-κB-Luc、API-Luc质粒,每孔取1.5 μL Lipofectamine 2000,加入0.8 μg质粒DNA,转染实验设3个复孔和一个空白对照。

2.3 荧光素酶活性分析 按Luciferase Assay System的说明书的方法,用PBS洗24孔板中待分析的细胞2次,然后每孔加入100 μL,收集细胞裂解液,置于冰上,旋涡振荡15 s,4℃,12 000 r/min 2 min,每个样品取10 μL蛋白裂解液,加入50 μL Luciferase Assay Reagent,迅推入单光子仪中测定2 s荧光素酶,延迟时间为10 s。

2.4 细胞核蛋白提取 A549细胞接种于24孔板,每孔细胞数量为 2.4×10^4 。瞬间共转染F10 cDNA和NF-κB-Luc、API-Luc质粒,分别在转染24 h、48 h、72 h按如下步骤收集核蛋白。收集细胞于离心管中,加入100 μL冰冷的cytoplasmic extraction reagent I(CERI),剧烈振荡15 s冰上孵育10 min,加入5 μL预冷的cytoplasmic extraction reagent II(CREII),剧烈振荡5 s冰上孵育1 min,剧烈振荡5 s,16 000 × g离心5 min,弃上清,50 μL冰冷的nuclear extraction reagent(NER)重悬沉淀,剧烈振荡15 s冰上放置10 min,重复5次,16 000 × g离心10 min,上清即为核蛋白提取液,用Modulus(tm) Method for BCA Protein Assay定量蛋白,分装-70℃保存。

2.5 EMSA实验 以1:1摩尔比混合单链探针加入等量的去离子水,95℃下变性10 min,待缓缓降温至15-25℃,用去离子水稀释至1 μmo/L。配制6%聚丙烯酰胺凝胶,建立探针结合蛋白反应体系(表1),混匀后室温孵育20 min,每个样品管中加入5 μL加样缓冲液,混匀后加入6%聚丙烯酰胺凝胶的上样孔内。用Bio-Rad垂直电泳仪进行电泳,电压为100 V(8 V/cm板长),电泳缓冲液为0.5 × TBE,待溴酚蓝接近胶底部后即停止电泳,取下凝胶,切除多余凝胶,按待转胶大小裁剪3 M滤纸和尼龙膜,在TBE缓冲液中浸泡3 min,从正极到负极按3张滤纸-尼龙膜-凝胶-3张滤纸的顺序叠放整齐于湿转膜仪的夹板中,用玻璃棒压排空气。在0.5 × TBE的缓冲液中以380 mA恒流转膜45 min,取出尼龙膜于紫外交叉联下交联3 min,1 200 Uj/cm²;采用免疫化学发光法检测生物素标记的DNA片段。

3 统计学处理

数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用多样本的t检验。

表1 探针结合蛋白反应体系

Tab 1 Probe binding protein reaction system

Component	Reaction (μL)	Control (μL)
Ultrapure water(μL)	12	4
10 × binding buffer(μL)	2	2
50% glycerol(μL)	1	1
100 mmol/L MgCl ₂ (μL)	1	1
1 g/L poly(dI · dC)(μL)	1	1
1% NP40(μL)	1	1
Unlabeled probe(2 μmol/L)		3
Labeled probe(10 nmol/L)	2	2
Protein extract(6 g/L)	5	5
Total(μL)	20	20

结 果

1 F10基因上调API的表达

转染API-Luc质粒后24 h即可检测荧光素酶的活性,并逐渐增高至转染后48 h,实验组明显高于对照组的2倍,在转染API-Luc质粒72 h后实验组与对照组的荧光素酶活性开始下降,实验组与对照组没有明显的统计学差别,见图1。

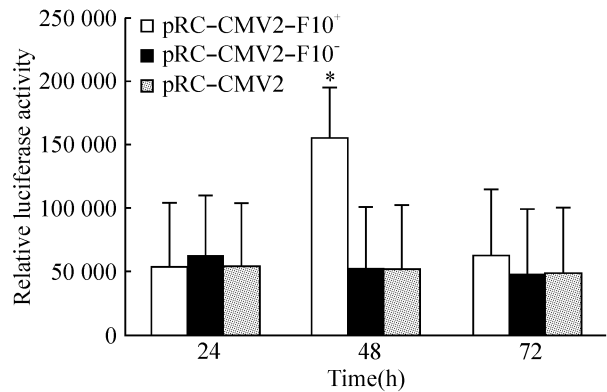


Fig 1 F10 activated API transcription factor. * P < 0.05 vs control.

图1 F10基因提高API转录活性

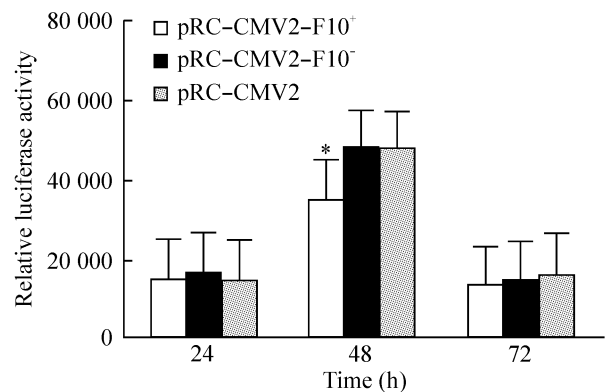


Fig 2 F10 gene inhibited NF-κB transcription factor. * P < 0.05 vs control.

图2 F10基因抑制NF-κB转录活性

2 F10 基因下调 NF- κ B 的表达

在 NF- κ B-Luc 的转染实验中,在转染 24 h 开始检测到荧光素酶的活性,48 h 达到最高,实验组较对照组降低约 30%,转染 72 h 荧光素酶活性下降,实验组与对照组无明显统计学的差别,见图 2。

3 EMSA 法检测 AP1 和 NF- κ B 与 DNA 结合活性的变化

图 3、4 分别为 F10 瞬时转染细胞 24 h、48 h、72 h 后转录因子 AP1 和 NF- κ B 与 DNA 结合活性变化的 EMSA 显影结果。图 3、图 4 中条带 10 为竞争抑制条带(加入 200 浓度的未标记的探针),提示本方法是特异的。转染后不同时间点的电泳滞后条带经图像扫描仪进行密度扫描,经凝胶图像分析系统测定其灰度值和滞后的面积,2 者的乘积表示核提取物中 AP1 和 NF- κ B 与标记探针结合的活性。AP1 在瞬时转染后随着时间的推移其与 DNA 结合活性逐渐增加,转染 48 h 增加到最高,比对照组高 23%,转染 72 h 后其活性开始下降并与对照组无明显差别。NF- κ B 在瞬时转染后随着时间的推移其与 DNA 结合活性逐渐增加,转染 48 h 增加到最高,但实验组比对照组低 49%,其后活性开始下降至转染 72 h 与对照组无明显差别。

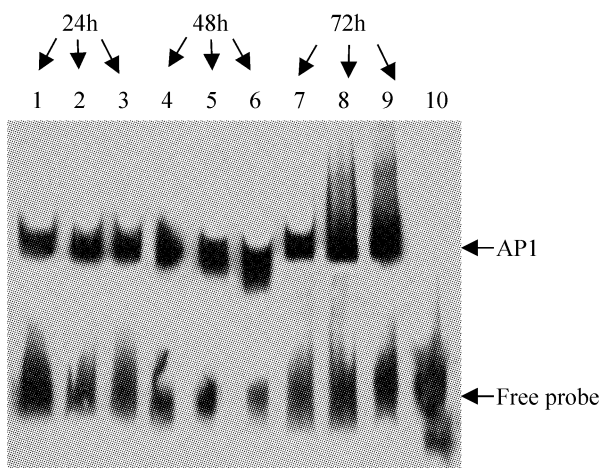


Fig 3 The binding activity of AP1 and DNA. Lane 1,4,7 were groups of cell transfected with pRC-CMV2-F10⁻; Lane 2,5,8 were groups of cell transfected with pRC-CMV2; Lane 3,6,9 were groups of cell transfected with pRC-CMV2-F10⁺; Lane 10 was competitive inhibition strap.

图 3 AP1 和 DNA 结合活性

讨 论

葡萄胎是 1 种与妊娠有关的良性病变,部分可发展为恶性,其发病机制目前尚未清楚,现有报道葡萄胎的发病与多种因素有关,其中有学者认为葡萄胎的基因组中存在易感基因。本课题组前期通过对

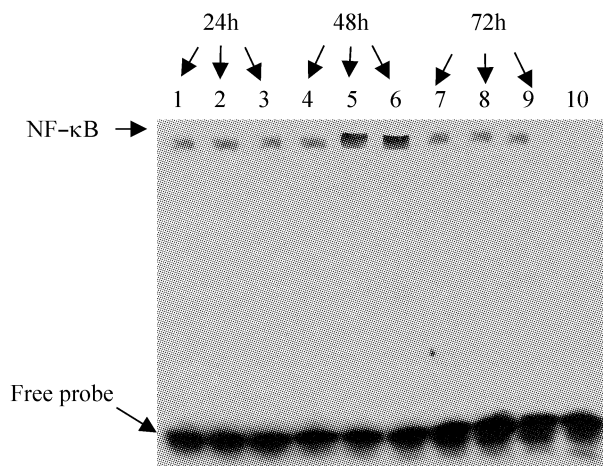


Fig 4 The binding activity of NF- κ B and DNA. Lane 1,4,7 were groups of cell transfected with pRC-CMV2-F10⁺; Lane 2,5,8 were groups of cell transfected with pRC-CMV2; Lane 3,6,9 were groups of cell transfected with pRC-CMV2-F10⁻; Lane 10 was competitive inhibition strap.

图 4 NF- κ B 和 DNA 结合活性

葡萄胎组织和早孕绒毛膜组织进行抑制性消减杂交,获得了几条在 2 者之间差异表达的基因,其中 F10 是 1 个在葡萄胎中高表达的基因,前期实验结果提示 F10 基因与滋养细胞的侵袭性相关,还可能参与某些腺癌的发生并观察了 F10 基因编码蛋白在细胞内的定位情况。采用差异显示技术高通量的筛选转染 F10 基因后宿主细胞基因表达的变化,得出 F10 基因可能参与促进细胞增殖、抑制细胞凋亡的过程。从而推出新基因 F10 可能是 1 个新的癌基因(论文尚未发表)。肿瘤的发生是多基因、多因素参与的细胞生长分化机制紊乱所致。而 NF- κ B 和 AP1 是细胞增殖、分化转录调控中的 2 个核心因子。基因转录是细胞生命活动的 1 种重要的调控方式,是现今研究最活跃的领域之一。所以本实验研究转基因后细胞内 NF- κ B 和 AP1 的变化来明确新基因 F10 在肿瘤发生中的作用。

AP1 是一类早期基因编码的核转录因子,其组成成员包括 c-Fos 家族 c-Fos、FosB、Fra-1、Fra-2、c-jun 家族的 c-Jun、JunB、JunD。AP1 是多种信号通路的下游分子,活化的 AP1 能调控许多基因的表达^[2],参与转化、增殖、分化、凋亡等多种生物学功能,特别是激活许多与肿瘤有关的基因如细胞周期素、金属蛋白酶、胶原酶、溶基质素的表达、促进肿瘤的发生和演变^[3,4]。AP1 是肿瘤蛋白转化的一个重要的核效应因子,遗传分析也支持上述观点,c-fos 突变细胞对激活的 src 等位基因的转化后效应有部分抵抗能力,而 c-jun 突变细胞则完全可以抵抗激活的 ras 的转化效应^[5]。AP1 尚能抑制细胞凋

亡,在某些条件下还促进细胞凋亡^[6-8]。AP1 信号转导通路还参与转移瘤新生血管的形成,研究表明 AP1 的活化参与了 VEGF 和 bFGF 的异常表达,参与恶性肿瘤的转移过程^[9]。本研究中低表达 F10 基因的细胞株在瞬间转 AP1 - Luc 48 h 后,荧光素酶的活性较其对照组上升 2 倍。EMSA 结果在 F10 瞬时转染细胞 48 h 时 AP1 和 DNA 结合活性上升 23%。提示 F10 可能通过激活 AP1 的表达,引起 AP1 介导的信号转导通路的下游因子的激活及可能与其它转录因子协同作用参与了肿瘤的发生。

NF - κ B 是一种具有转录激活作用的蛋白质,它是 Rel 家族的成员,广泛存在于多种类型的细胞中。该家族与细胞增殖、凋亡和分化密切相关^[10],在发育和肿瘤发生过程中发挥着重要的作用。目前已发现人的胃癌、卵巢癌、乳腺癌和肺癌等都有 NF - κ B 的异常表达。近年发现 NF - κ B 家族与细胞的增殖、分化有密切关系。NF - κ B 对一些细胞系的分化成熟也起着重要作用,如胸腺细胞、树突状细胞、巨噬细胞、成纤维细胞等^[11]。目前大量证据显示 NF - κ B 具有抗凋亡的作用。RelA 基因敲除的小鼠,胚胎在 15 - 16 d 死亡,伴随着肝细胞的大量凋亡。但是也有一些证据支持 NF - κ B 促进凋亡。如人胚胎肾细胞系 293 在血清撤除时发生凋亡伴随着 NF - κ B 的活化;而抗凋亡基因 *bcl-2* 瞬时或稳定表达可阻止细胞凋亡,同时 NF - κ B 报告基因表达减少。NF - κ B 负显性突变基因的转染亦具有相同的结果^[12]。近来有人发现在过氧化氢诱导 T 细胞凋亡时,抑制 NF - κ B 的活性可使细胞免于凋亡^[13]。本研究中低表达 F10 基因的细胞株在瞬间转染 NF - κ B - Luc 48 h 后,荧光素酶的活性较其对照组分别下降 0.3 倍。EMSA 结果在 F10 瞬时转染细胞 48 h 时 NF - κ B 和 DNA 结合活性下降 49%。基于本研究的结果我们推测 F10 基因可能通过 NF - κ B 的变化启动与细胞周期相关因子的表达,扰乱细胞周期的进展最终导致肿瘤的发生。

[参 考 文 献]

- [1] 李贵堂,庞战军,周 瑾,等. 葡萄胎发病相关新基因的克隆[J]. 广东医学杂志,2006,27(1):22-24.
- [2] 段金虹,徐海珊,戴顺龄,等. EDN1 基因 5'上游 AP-1 顺式调控元件在同型半胱氨酸诱导 HUVECs EDN1 基因转录中的作用[J]. 中国病理生理杂志,2007,23(9):1665-1670.
- [3] Janulis M, Silberman S, Ambegaokar A, et al. Role of mitogen-activated protein kinases and c-Jun/AP-1 trans-activating activity in the regulation of protease mRNAs and the malignant phenotype in NIH 3T3 fibroblasts[J]. J Biol Chem, 1999, 274(2):801-813.
- [4] Hsu T, Young MR, Cmarik J, et al. Activator protein 1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B)-dependent transcriptional events in carcinogenesis[J]. Free Radic Biol Med, 2000, 28(9):1338-1348.
- [5] Saez E, Rutberg SE, Mueller E, et al. c-fos is required for malignant progression of skin tumors[J]. Cell, 1995, 82(5):721-732.
- [6] Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival[J]. Oncogene, 2001, 20(19):2390-2400.
- [7] Mechta-Grigoriou F, Gerald D, Yaniv M. The mammalian Jun proteins; redundancy and specificity[J]. Oncogene, 2001, 20(19):2378-2389.
- [8] Vogt PK. Jun the oncoprotein[J]. Oncogene, 2001, 20(19):2365-2377.
- [9] Silins G, Grimmond S, Egerton M, et al. Analysis of the promoter region of the human VEGF-related factor gene[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 230(2):413-418.
- [10] 叶 孟, 林 蕾, 方 勇, 等. 羟基喜树碱通过激活 NF - κ B 诱导人乳腺癌 Beap-37 细胞凋亡[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(1):146-150.
- [11] Ammon C, Mondal K, Andreesen R, et al. Differential expression of the transcription factor NF-kappa B during human mononuclear phagocyte differentiation to macrophages and dendritic cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 268(1):99-105.
- [12] Baichwal VR, Baeuerle PA. Activate NF-kappa B or die[J]. Curr Biol, 1997, 7(2):94-96.
- [13] Dumont A, Hehner SP, Hofmann TG, et al. Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF-kappa B[J]. Oncogene, 1999, 18(3):747-757.