

全反式维甲酸对结肠癌细胞 XIA P 相关因子 1 表达的影响

罗晓勇¹, 张积仁¹, 王继德²

Effects of All-trans Retinoic Acid on Expression of XAF1 in Colon Cancer Cell Line

LUO Xiao-yong¹, ZHANG Ji-ren¹, WANG Ji-de²

1. Oncology Center, Zhujiang Hospital, The Southern Medical University, Guangzhou 510282, China;

2. Department of Digestive Diseases, Southern Hospital, The Southern Medical University

Abstract :Objective To investigate the effect of all-trans retinoic acid (ARTA) on XIA P-associated factor 1 (XAF1) expression and the growth of human colorectal carcinoma. **Methods** Lovo cell were treated with various concentrations of ATRA. The mRNA and protein expression of XAF1 were detected by Western blot and RT-PCR methods. The cell growth was measured by MTT assay. Transcription activity of XAF1 promoter is examined by luciferase reporter assay. **Results** The mRNA and protein expression of XAF1 were up regulated by ATRA stimulation in a dose-dependent manner, MTT showed that ATRA could suppress the proliferation of colorectal carcinoma cells. ATRA stimulation also resulted in

increase in luciferase activity in cells transfected with the plasmid containing XAF1 promoter region sequences. **Conclusion** ARTA could significantly inhibit the growth of hu-

收稿日期:2007-09-14;修回日期:2008-01-30

作者单位:1. 510282 广州,南方医科大学珠江医院肿瘤中心;2. 广州南方医科大学南方医院消化科

作者简介:罗晓勇(1968-),男,博士在读,副主任医师,主要从事肿瘤早期诊断和临床治疗研究

及其他增殖分化旺盛的细胞,Zhang 等^[6]认为生存素是细胞生物学转化的中间环节,其表达阳性提示组织学尚正常的组织存在癌变的可能,这为早期诊断提供依据。Sharp 等^[7]以膀胱镜细胞学检查与检测尿液中生存素诊断膀胱癌,认为细胞学检查虽有特异性,但花费高、有创伤且灵敏性较低,而检测生存素的表达对新发现或复发膀胱癌的灵敏度达 100%,对其他新生物和非赘生物性泌尿生殖系疾病的特异性达 95%。Ikeguchi 等^[8]认为检测生存素表达可以预测肝癌术后是否复发,因此通过检测细胞内生存素的表达对特定肿瘤的早期诊断和预后判断具有重要价值。

我们以 pET32a(+) 质粒原核高效表达重组人生存素的融合蛋白,制备相应抗体以发展通过免疫组化技术检测生存素表达而检测肿瘤细胞,结果在原核系统中表达出了约 37 KD 大小的 survivin 与 Trx-His 的融合蛋白,表达量达总蛋白的 30% 左右,目的蛋白以可溶性蛋白和包涵体同时存在,说明硫氧还原蛋白促使目的蛋白正确折叠作用有限,当表达效率增高后,不能完全促使目的蛋白自然折叠。当我们以 Trx-His-生存素融合蛋白免疫小鼠制备抗血清用于检测生存素表达时,所制备的抗血清不仅效价高,而且通过 Western blotting 技术和免疫细胞化学技术检测证实,其对人生存素识别的特异

性较好,可用于临床肿瘤诊断。

参考文献:

- [1] Ikeguchi M, Ueta T, Yamane Y, et al. Inducible nitric oxide synthase and survivin messenger RNA expression in hepatocellular carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2002, 8 (10): 3131-3136.
- [2] Tonini G, Vincenzi B, Santini D, et al. Nuclear and cytoplasmic expression of survivin in 67 surgically resected pancreatic cancer patients[J]. Br J Cancer, 2005, 92 (12): 2225-2232.
- [3] Kami K, Doi R, Koizumi M, et al. Survivin expression is a prognostic marker in pancreatic cancer patients[J]. Surgery, 2004, 136 (2): 443-448.
- [4] Ku JH, Kwak C, Lee HS, et al. Expression of surviving, a novel inhibitor of apoptosis, in superficial transitional cell carcinoma of the bladder[J]. J Urol, 2004, 171 (2): 631-635.
- [5] Wall NR, Connor DS, Hescia J, et al. Suppression of surviving phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis[J]. Cancer Res, 2003, 63 (1): 230-235.
- [6] Zhang SQ, Qiang SY, Yang WB, et al. Expression of survivin in different stages of carcinogenesis and progression of breast cancer[J]. Ai Zheng, 2004, 23 (6): 697-700.
- [7] Sharp JD, Hausladen DA, Maher MG, et al. Bladder cancer detection with urinary survivin, an inhibitor of apoptosis[J]. Front Biosci, 2002, 7: 36-41.
- [8] Ikeguchi M, Ueda T, Sakatani T, et al. Expression of survivin messenger RNA correlates with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma [J]. Diagn Mol Pathol, 2002, 11 (1): 33-40.

[编辑:周永红;校对:杨 卉]

man colorectal carcinoma cells, and this anti-tumor effect might be related to the up-regulation of XAF1 mRNA and protein by increasing the transcription activity of XAF1 promoter.

Key words: All-trans retinoic acid; Colorectal carcinoma; XIAP-associated factor 1

摘要:目的 了解全反式维甲酸对结肠癌 lovo 细胞 XIAP 相关因子 1(XAF1)表达及细胞增殖的影响。方法 以不同浓度的 ATRA 刺激 lovo 细胞,RT-PCR 检测 XAF1 的 mRNA 水平变化,Western blot 分析 XAF1 蛋白水平的表达;MTT 法检测 ATRA 对 lovo 细胞生长抑制率。构建含有 XAF1 启动子序列萤火虫荧光素酶报告质粒,分析 ATRA 作用对 XAF1 启动子活性的影响。结果 经 ATRA 作用,lovo 细胞 mRNA 和蛋白的表达水平上调,细胞生长受到抑制。上述效应均具有药物浓度依赖性。报告基因分析结果显示,ATRA 使含有 XAF1 启动子序列萤火虫荧光素酶报告质粒的萤火虫荧光素酶的活性增加。结论 ATRA 通过促进启动子转录活性上调 XAF1 的 mRNA 和蛋白表达水平,并抑制结肠癌细胞的生长。

关键词:全反式维甲酸;结肠癌;XIAP 相关因子 1

中图分类号:R735.3⁺5 **文献标识码:**A

文章编号:1000-8578(2008)04-0243-04

0 引言

X-染色体相关凋亡抑制蛋白(X-chromosomal-linked inhibitor of apoptosis, XIAP)是凋亡抑制蛋白家族成员之一,具有抑制细胞凋亡作用^[1]。XIAP 相关因子 1(XIAP-associated factor 1, XAF1)是凋亡抑制因子(IAP)家族成员——XIAP 的负向调节蛋白,能拮抗 XIAP 的抗凋亡作用,是一种新近发现的抑癌基因。全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)是维生素 A 的天然衍生物及生物活性形式,能够诱导多种肿瘤细胞分化或抑制肿瘤细胞的增殖。为探讨 ATRA 对结肠癌细胞 XAF1 表达及细胞增殖的影响,我们进行了以下研究。

1 材料和方法

1.1 材料

全反式维甲酸(ATRA)、二甲亚砜(DMSO)及甲基偶氮唑蓝(MTT)均购自 Sigma 公司;RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司;羊抗人 XAF1(C-16)、HRP-偶合抗羊 IgG 均购自 santa cRaz 生物技术公司;结肠癌细胞株 lovo 来自美国 American Type Culture Collection(ATCC)。

1.2 载体构建

基因组 DNA 抽提试剂盒(大连宝生物公司)提取 lovo 细胞的基因组 DNA,Hotstart PCR 扩增 XAF1 基因启动子序列(-107 nt ~ 164 nt),在这里

临近翻译初始密码子 ATG 上游的核苷酸定义为-1。引物序列如下:上游引物 5'-GATCTCCTCCTCCTGAA-3',下游引物 5'-GTCTCCAGCTGCTTGTCTC-3',Kpn I 酶切位点加入到上游引物的 5'端,Xho I 酶切位点加入到下游引物中。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。用 GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit (Amersham 公司)纯化 PCR 产物,经 Kpn I 和 Xho I 分别双酶切载体 pGL3 basic 载体(Promega 公司)和 PCR 产物后,将纯化的 PCR 产物插入到 pGL3 basic 载体的荧光素酶报告基因上游方向上构建成启动子荧光素酶报告质粒(pLUC107)。常规转化大肠杆菌 DH5⁺,在含氨苄青霉素的培养平板上挑选并鉴定阳性克隆。上述质粒经序列测定正确后使用。

1.3 细胞培养与转染

结肠癌细胞 lovo 用含 10% 胎牛血清,100 μg/ml 链霉素和 100 μg/ml 青霉素的 1640 培养液,在 5% CO₂、37℃ 环境的培养箱中进行培养,待细胞长满瓶底时传代。

按照 Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司)脂质体转染说明书进行细胞转染操作。将生长状态良好的 lovo 细胞接种 6 孔培养板,在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 18~20 h,与质粒 DNA (3 μg)和脂质体 (6 μl)混合后置 CO₂ 培养箱 4 h,4 h 后更换完全培养基继续培养 48 h。

1.4 RT-PCR 检测 XAF1 mRNA 的表达

采用 TRizol 法提取细胞总 RNA。使用 Thermo-script RT-PCR 系统(Invitrogen 公司)进行 RT-PCR。按厂家说明书进行操作,先将 RNA 逆转录成 cDNA,在 PCR 反应体系中含 2 μl cDNA,0.3 单位 Hotstart DNA 多聚酶,上下游引物和 dNTPs,反应体积 50 μl。XAF1 引物序列如下:上游:5'-GCTCCACGA GTCCTACTG-3',下游:5'-ACTCTGA GTCTGGACAAC-3',扩增片段大小 262 bp。GAPDH 作为内参照,引物序列:上游:5'-GTCAACGGATTTGGTCTGTATT-3',下游:5'-AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3',扩增片段 560 bp。Hotstart PCR 扩增 33 个循环,95℃ 变性 30 min(第一循环),94℃ 变性 45 s,55℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 45 s 和 10 min(第一循环)。

1.5 Western blot 检测

细胞离心沉淀并提取蛋白,用蛋白分析试剂盒(Amersham 公司)测定蛋白浓度。取 20 μg 蛋白经 SDS-PAGE 变性胶电泳(5% 堆积凝胶,12% 分离凝胶)后,蛋白质被转移到 PVDF(polyvinylidene difluoride membranes)膜上,非特异带用 10 mol/L 含 0.05% Tween-20、2% 脱脂奶、pH 7.6 的 Tris-HCl

溶液进行封闭后,先后加入羊抗人 XAF1 抗体(C-16),HRP-偶合抗羊二抗,抗原抗体复合物在 ECL 系统下观察。

1.6 报告基因检测

为了解 ATRA 对 XAF1 启动子活性的影响,将含有 XAF1 启动子报告基因质粒(pLUC107)和表达 CMV 启动子驱动的海肾(Renila)荧光素酶载体 pRL-CMV 与 Lipofectamine 2000 混合,共转染细胞株,转染后 48 h,给予 ATRA 刺激 10 h 后,将细胞与 50 μl 的荧光素酶检测试剂(promega)混合,萤火虫和海肾(Renila)荧光素酶活性用双荧光素酶报告基因系统(Promega)在 TD20/20 光度计上进行测量,萤火虫荧光素酶活性值以海肾荧光素酶活性为参照进行测量,启动子转录活性用萤火虫荧光素酶表达值/海肾荧光素酶表达值(RLU)的荧光素酶相对活性表示。

1.7 MTT 实验

MTT 法用于测量细胞毒性,将指数生长的细胞按每孔 1 × 10⁵ 个细胞接种入 96 孔板中培养 18 h,每组设 3 个复孔,加入不同浓度 ATRA 处理 48 h,弃上清,每孔加入 50 μl MTT 液(1 mg/ml)加入各孔中,细胞在 37 °C 环境下继续培养 4 h 后加入二甲基亚砷(DMSO),用微-ELISA 仪读取每孔 570 nm 吸光度,计算抑制率。细胞抑制率(%) = (对照孔吸光度 - 实验孔吸光度/对照孔吸光度) × 100 %。

1.8 统计学方法

采用 ² 检验和 t 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ATRA 上调 lovo 细胞 XAF1 的 mRNA 和蛋白表达水平

为了解结肠癌内 XAF1 mRNA 表达水平和 ATRA 诱导对结肠癌细胞 XAF1 的 mRNA 表达水平的影响,我们用 ATRA 处理结肠癌细胞 lovo,发现在没有 ATRA 刺激的情况下 lovo 细胞内 XAF1 的 mRNA 水平很低,经 ATRA 刺激后 XAF1 mRNA 的表达增加。随 ATRA 浓度的增加,XAF1 mRNA 的表达量亦增加,ATRA 对 mRNA 的影响呈剂量依赖性,见图 1。

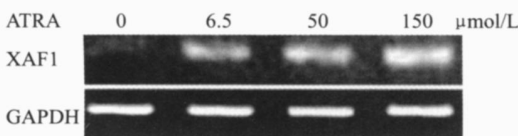


图 1 RT-PCR 检测 XAF1 mRNA 表达

Western blot 检测显示,lovo 细胞未经 ATRA

处理,XAF1 表达一条弱的蛋白阳性带;经 ATRA 处理 48 h 后,XAF1 蛋白的表达有不同程度的增加,阳性带显色强度随药物浓度增加而增强,见图 2。

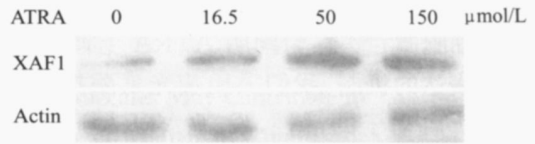


图 2 Western blot 检测 XAF1 蛋白表达

2.2 ATRA 对结肠癌 LoVo 细胞的抑制作用

MTT 比色法检测结果显示:不同浓度的 ATRA 对 lovo 细胞的生长均有抑制作用,与细胞对照组相比均有统计学意义(P < 0.05)。随着 ATRA 剂量的增加,抑制细胞生长的作用越明显。

2.3 ATRA 对 XAF1 启动子转录活性的影响

为了解 ATRA 是否通过增强 XAF1 基因的转录活性促进 XAF1 的 mRNA 表达,将包含 XAF1 核心启动子的片段克隆到含荧光素酶报告基因质粒中(pLUC107),转染细胞用 16.5 μmol/L 的 ATRA 处理,荧光素酶活性检测结果显示,未经 ATRA 处理的含 pluc107 的 lovo 细胞的 RLU 值为(7 ± 0.5),经 ATRA 处理后,pluc107 活性增加为(19 ± 0.7)。结果提示 ATRA 通过上调转录活性增加 XAF1 的表达。

3 讨论

已有研究结果显示,XAF1 在所有胚胎组织及成人正常组织中广泛表达,但在大多数人类恶性肿瘤细胞中表达水平低下甚至缺失^[2,3]。MA 等^[4]的研究发现,XAF1 mRNA 在结肠癌组织中表达降低,存在转录抑制现象。在同一患者体内,恶性肿瘤组织/邻近正常组织 XAF1 表达的比值显著低于良性肿瘤组织/邻近正常组织。提示 XAF1 基因可能在结直肠肿瘤中具有良、恶性鉴别作用。XAF1 的低表达或不表达还与结直肠肿瘤的分期、分级密切相关^[5];低表达 XAF1 抑制肿瘤细胞凋亡的发生,过表达 XAF1 可抑制胃肠肿瘤细胞的增殖,增强肿瘤细胞对依托泊甙和肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)诱导凋亡的敏感性^[5-7]。这些研究发现提示 XAF1 在结直肠肿瘤组织中低表达可能是肿瘤细胞存活和进展的重要机制。

本研究资料显示,结肠癌细胞 lovo 表达 XAF1 低下,给予 ATRA 诱导后,XAF1 的表达在 mRNA 水平和蛋白水平均可升高,并随着 ATRA 浓度的增加而增强,具有剂量依赖的效应。MTT 实验结果表明,ATRA 可抑制 lovo 细胞生长,且这种抑制作用随 ATRA 浓度增加而增强,表明 ATRA 对结肠癌

细胞生长有负调控作用。

维甲酸类化合物是一种常用的诱导分化剂,通过与靶基因上游启动子或增强子的维甲酸反应元件结合而调控一些基因网络的活性,进而影响细胞周期或促进细胞凋亡^[8]。为阐明 ATRA 上调 lovo 细胞 XAF1 表达的机制,我们采用荧光素酶报告基因分析 XAF1 启动子的活性,发现 ATRA 通过增强 XAF1 启动子活性上调 XAF1 的 mRNA 和蛋白表达水平。尽管许多研究提示 XAF1 可能是一个潜在的肿瘤抑制基因,但 XAF1 抑制肿瘤细胞增殖的机制仍不十分清楚。早期的研究显示,XAF1 是通过拮抗 XIAP 对 caspase-3 的抑制作用发挥诱导凋亡作用^[6];最近的研究发现,XAF1 还可以通过非 XIAP 依赖途径诱导细胞的凋亡^[9]。而且,通过内源性或外源性诱导 XAF1 表达能够增强肿瘤细胞对凋亡激发剂如:羟基喜树碱、顺铂、依托泊甙,射线等诱导凋亡的敏感性^[5]。研究还发现,XAF1 是一种新的 IFN 刺激因子,介导 IFN 诱导凋亡的作用,并且显著增强肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 诱导肿瘤细胞凋亡^[7,10]。本实验结果亦显示,高浓度 ATRA 能够明显上调 XAF1 的表达,并显著抑制 lovo 细胞的增殖。提示 XAF1 有可能在介导 ATRA 诱导凋亡的过程中发挥作用,但具体机制仍需进一步研究。

本研究初步探讨了 XAF1 基因在 ATRA 抑制结肠癌细胞增殖中的作用,为进一步阐明 XAF1 在肿瘤生长过程中的表达调控机制的研究打下了一定的基础。

参考文献:

- [1] Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis[J]. *Genes Dev*, 1999, 13:239-252.
- [2] Fong WG, Liston P, Rajcan-Separovic E, et al. Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor1 (XAF1) in cancer cell lines[J]. *Genomics*, 2000, 70:113-122.
- [3] Ng KC, Campos EI, Martinka M, et al. XAF1 expression is significantly reduced in human melanoma[J]. *J Invest Dermatol*, 2004, 123:1127-1134.
- [4] Ma TL, Ni PH, Zhong J, et al. Low expression of XIAP-associated factor 1 in human colorectal cancers[J]. *Chin J Dig Dis*, 2005, 6:10-14.
- [5] Chung SK, Lee MG, Ryu BK, et al. Frequent alteration of XAF1 in human colorectal cancers: implication for tumor cell resistance to apoptotic stresses[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132:2459-2477.
- [6] Liston P, Fong WG, Kelly NL, et al. Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity[J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3:128-133.
- [7] Leaman DW, Chawla-Sarkar M, Vyas K, et al. Identification of X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor-1 as an interferon-stimulated gene that augments TRAIL Apo2L-induced apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (32): 28504-28511.
- [8] Garattini E, Gianni M, Terao M, et al. Retinoid related molecules an emerging class of apoptotic agents with promising therapeutic potential in oncology pharmacological activity and mechanisms of action[J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10 (4): 433-448.
- [9] Xia Y, Novak R, Lewis J, et al. XAF1 can cooperate with TNF alpha in the induction of apoptosis independently of interaction with XIAP[J]. *Mol Cell Biochem*, 2006, 86:67-76.
- [10] Reu FJ, Bae SI, Cherkassky L, et al. Overcoming resistance to interferon induced apoptosis of renal carcinoma and melanoma cells by DNA demethylation[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24: 3771-3779.

[编辑:安凤;校对:杨卉]