

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.04.008

AP-2 α 对大肠癌细胞侵袭生长及 ER- β 表达的影响

杜叶平, 苗晋华*, 徐丽萍, 武春梅(中国人民解放军第 264 医院 检验科, 山西 太原 030001)

[摘要] 目的: 研究转录因子激活蛋白-2 α 基因(transcription factor activator protein-2 α , AP-2 α)对大肠癌 SW620 细胞侵袭生长的影响, 并探讨其对雌激素受体 β 基因(estrogen receptor- β , ER- β)表达的影响及其可能的分子机制。方法: 利用脂质体介导重组质粒 pcDNA3.1(+)-AP-2 α 与空质粒 pcDNA3.1(+)转染入 SW620 大肠癌细胞, 采用基质胶黏附实验与 Transwell 实验检测细胞的体外黏附、侵袭生长与迁移能力, 采用实时定量 PCR、Western blotting、免疫荧光细胞化学检测细胞中 AP-2 α 和 ER- β 在基因和蛋白水平的表达, 以电泳迁移率分析(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)方法检测转染 AP-2 α 基因后肿瘤细胞中 AP-2 α 的 DNA 结合活性及其与 ER- β 的结合能力。结果: AP-2 α 转染 SW620 细胞后抑制了细胞的体外黏附、侵袭与迁移能力(均 $P < 0.05$); 同时细胞中 ER- β 基因的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$); EMSA 结果显示, AP-2 α 转染的 SW620 细胞中表达的 AP-2 α 蛋白与 ER- β 基因启动子区域发生特异性结合。结论: AP-2 α 转染 SW620 细胞可显著抑制大肠癌 SW620 细胞体外黏附、侵袭与迁移能力, 其分子机制很可能与 AP-2 α 直接作用于 ER- β 基因启动子区域从而影响 ER- β 基因的表达有关。

[关键词] 大肠肿瘤; SW620 细胞; 转录因子激活蛋白-2 α (AP-2 α); 雌激素受体 β (ER- β)

[中图分类号] R735.3⁺4; R730.54 [文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2009)04-0358-06

Effects of AP-2 α on invasive growth and ER- β expression of colon cancer cell line

DU Ye-ping, MIAO Jin-hua*, XU Li-ping¹, WU Chun-mei (Department of Clinical Laboratory, No. 264 Hospital of Chinese People's Liberation Army, Taiyuan 030001, Shanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of transcription factor activator protein-2 α (AP-2 α) on invasive growth and estrogen receptor- β (ER- β) expression in human colon cancer SW620 cells, and to probe into the involved molecular mechanism. **Methods:** Plasmid pcDNA3.1(+)-AP-2 α and pcDNA3.1(+) were transfected into SW620 cells by liposome-mediated transfection. The adhesion, invasion and migration abilities of SW620 cells were measured by metrical gel adhesion assay and modified Boyden chamber (Transwell assay). The gene and protein expression levels of AP-2 α and ER- β in SW620 cells were examined by Real-time PCR, Western blotting and immunofluorescence cytochemistry. The interaction between AP-2 α DNA and ER- β in SW620 cells was measured by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) after AP-2 α gene transfection. **Results:** Overexpression of AP-2 α markedly reduced the adhesion, invasion and migration abilities of SW620 cells (all $P < 0.05$); meanwhile, the mRNA and protein levels of ER- β in SW620 cells were also significantly enhanced ($P < 0.05$). EMSA results showed that AP-2 α specifically bound to promoter region of ER- β gene in SW620 cells after transfection of pcDNA3.1(+)-AP-2 α plasmid. **Conclusion:** Overexpression of AP-2 α can inhibit the adhesion, invasion and migration abilities of SW620 cells, which is probably related to ER- β expression in SW620 cells directly induced by interaction between AP-2 α and promoter region of ER- β .

[Key words] colon neoplasms; SW620 cell; transcription factor activator protein-2 α (AP-2 α); estrogen receptor- β (ER- β)

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(4): 358-363]

[基金项目] 山西省科学技术发展计划项目(No. 2006031087)。Supported by the Science and Technology Development Program of Shanxi Province (No. 2006031087)

[作者简介] 杜叶平(1981-), 女, 山西省朔州市人, 硕士生, 主要从事大肠癌分子生物学机制的研究。E-mail: dyphappiness@163.com

* 通信作者(Corresponding author)。E-mail: canmobu@163.com

目前已发现多个与大肠癌的发生、发展密切相关的基因,这些基因的改变影响着大肠黏膜上皮细胞的生物学行为。转录因子激活蛋白-2 α 基因 (transcription factor activator protein-2 α , *AP-2 α*) 是一种特异性 DNA 结合蛋白^[1],通过其特异结合序列 (5'-GCCNNNGGC-3')^[2]调控雌激素受体 β (estrogen receptor β , *ER- β*) 等多种靶基因的表达,参与调节胚胎发育以及细胞生长分化^[3]。*AP-2 α* ^[4,6]与 *ER- β* ^[7,8] 在多种肿瘤包括大肠癌中表达降低或缺失,其表达缺失可能与大肠癌发生密切相关。本研究以大肠癌细胞株 SW620 作为细胞模型,观察 *AP-2 α* 基因对 SW620 细胞侵袭生长的影响,并探讨其作用的分子机制,为大肠癌基因治疗提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

人大肠癌 SW620 细胞株购自中国科学院细胞库。菌株 *E. coli* DH5 α 和 pcDNA3.1 质粒载体由本教研室保存, pCMX-PL1-*AP-2 α* 由德国 Reinhard Buettner 教授惠赠。RPMI 1640 培养液购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司, TRIzol 和转染试剂 Lipofectamine 2000 Reagent 购自美国 Invitrogen 公司。RT-PCR 试剂盒、*EcoR* I、T4 DNA Ligase、T4 多聚核苷酸酶及 GAPDH 引物 (Hs002) 购自日本 TaKaRa 公司, *AP-2 α* 及 *ER- β* 引物序列均由日本 TaKaRa 公司合成。Fast SYBR Green Master Mix 购自美国 ABI 公司,兔抗人 *AP-2 α* 多克隆抗体、兔抗人 *ER- β* 多克隆抗体和兔抗人 β -actin 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,山羊抗兔 HRP 标记的二抗购自北京中衫金桥生物技术有限公司。电致化学发光 (electrogenenerated chemiluminescence, ECL) 检测试剂购自美国 Amersham 公司。Matrigel 胶购自美国 BD 公司,24-Transwell 模型系统购于美国 Coster 公司,纤维连接蛋白 (fibronectin, FN)、小牛血清白蛋白 (BSA)、多聚赖氨酸 (Poly-L-lysine)、鲑精 DNA 购于美国 Sigma 公司。核蛋白提取试剂盒购自普利莱基因技术有限公司, [γ -³²P] ATP 购北京市福瑞生物工程公司核酸研究室。

1.2 细胞培养与转染

细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内培养。收获对数生长期的细胞,接种于 60 mm 细胞培养皿中继续培养至 95% 满,换新鲜无血清无抗生素培养液培养 5~6 h 后用于转染。细胞转染按照 Lipofectamine 2000 试剂盒提供的操作方法进行。将转染细胞分成 3 组:

pcDNA3.1 (+)-*AP-2 α* /SW620 组、pcDNA3.1 (+)/SW620 组以及 SW620 空白对照组。

1.3 细胞黏附实验

无血清无抗生素 1640 配制 Matrigel (1:5 稀释),在 24 孔培养板中每孔铺 Matrigel 30 μ l,置于 37 $^{\circ}$ C、0.5 h 使胶凝固,每孔加入含 1% BSA 双无 1640 培养液 1 ml,置于 37 $^{\circ}$ C、0.5 h,水化基底膜;0.25% 胰蛋白酶消化 SW620 细胞,用双无 1640 悬浮后计数,每孔接种 4×10^4 个细胞,每个时间点设 3 个平行皿,用含 10% FCS 的 1640 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养,于设定时间点取出培养板,用 PBS 洗 3 次,去除未黏附的细胞,再用 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞进行计数。依下列公式计算细胞黏附比率:黏附率 (%) = (黏附细胞/接种细胞) \times 100%。以上实验重复 3 次。

1.4 细胞侵袭实验

4 $^{\circ}$ C 条件下解冻 Matrigel 过夜,双无 1640 按 1:5 稀释 Matrigel,于每个 Transwell 小室上室底部均匀平铺 Matrigel 30 μ l,并置于 37 $^{\circ}$ C 放置 0.5 h 使基底膜胶凝固,然后用 37 $^{\circ}$ C 双无 1640 浸浴水化小室膜 30 min。0.25% 胰蛋白酶消化处于指数生长期的细胞,用双无 1640 悬浮并计数,每个小室接种 1×10^5 个细胞,每组设 3 个平行皿,并加双无 1640 200 μ l。下室内加入 350 μ l 10% FCS 的 1640 培养液和 fibronectin (16 μ g/室)。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中培养,24 h 后吸净上室液体,用棉签将上室的细胞擦掉,用甲醇原液固定 20 min, H-E 染色,光学显微镜下 ($\times 200$) 随机选取 15 个视野进行细胞计数,算出每个视野的平均值。上述实验重复 3 次。

1.5 细胞迁移实验

采用 Transwell 穿膜运动实验检测细胞的迁移能力,具体方法除 Transwell 小室上室不铺 Matrigel 膜外,其余均与侵袭实验相同。

1.6 Real-time PCR 检测 *AP-2 α* 、*ER- β* 基因的表达

转染 48 h 后用 TRIzol 提取各组细胞总 RNA,各组均以 2 μ g 总 RNA 反转录成为 cDNA。引物均由 TaKaRa 公司设计并合成, *AP-2 α* 基因上游引物为 5'-TGC CAA CGT TAC CCT GCT CA-3',下游引物为 5'-GTT TCG CAC ACG TAC CCA AAG TC-3',扩增片段长度为 80 bp。 *ER- β* 基因上游引物为 5'-AGA GTC CCT GGT GTG AAG CAA GA-3',下游引物为 5'-AGT AAC AGG GCT GGC GCA AC-3',扩增片段长度为 103 bp。Real-time PCR 反应体系 20 μ l,包括:Fast SYBR Green Master Mix 10 μ l,稀释的 cDNA 0.5 μ l,上、下游引物各 200 nmol/L,用无菌去离子

水补齐总体积。反应程序: 95 °C 预变性 20 s; 95 °C、3 s, 60 °C、30 s, 循环重复 2、3 步 40 次。反应结束后, 由 ABI 公司自带的 Step-One PCR 系统分析软件分析。

1.7 Western blotting 检测 AP-2α、ER-β 蛋白表达

转染 48 h 后提取各组细胞总蛋白, 取 50 μg 等量总蛋白样品变性后进行 12% SDS-PAGE, 转膜后用含 5% 脱脂奶粉的 1 × TBST 缓冲液 4 °C 封闭 3 h; 加入封闭液稀释的兔抗人 AP-2α 多克隆抗体 (1: 400)、兔抗人 ER-β 多克隆抗体 (1: 400) 和兔抗人 β-actin 多克隆抗体 (1: 1 000), 4 °C 过夜, 加 HRP 标记的二抗 (1: 2 000) 室温反应 2 h, 加入 ECL 超敏发光液, X 线胶片曝光成像。

1.8 免疫荧光细胞化学检测 ER-β 蛋白的表达

接种细胞于多聚赖氨酸包被的载波片, 待其覆盖率达 80% 时, 常温条件下 4% 多聚甲醛固定 30 min, 5% BSA 室温封闭 30 min, ER-β 抗体 4 °C 温育过夜 (1: 50), PBS (pH 7.2 ~ 7.4) 冲洗 3 次 × 5 min, 以后步骤均需避光, Cy3-生物素化二抗 (1: 150) 37 °C 温育 60 min, PBS 冲洗, 5 min × 3 次。荧光显微镜观察拍照。

1.9 电泳迁移率分析 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 检测 AP-2α 的 DNA 结合活性及 AP-2α 与 ER-β 的结合能力

转染 48 h 后, 按照核蛋白提取试剂盒说明提取各组细胞核蛋白, 采用考马斯亮蓝染色法进行蛋白定量。与 AP-2α 结合的保守序列和该保守序列的突变序列分别被用作特异性探针和非特异性探针, 保守序列为: 5'-GAT CGA ACT GAC CGC CCG CGG CCCCT-3'; 在突变序列中, 保守序列中的 CC 被置换为 TT^[1]。根据 ER-β 基因启动子区域中可能的 AP-2α 结合位点设计 1 对寡核苷酸探针: 5'-GGT CAC GCG CGG CGT CGG GCG TTC CT-3', 上述序列及其互补链均由上海生工生物工程技术有限公司合成。各互补链于 95 °C 变性 3 min, 逐渐冷却, 退火形成双链。在 T4 多聚核苷酸酶作用下用 [γ-³²P]ATP 标记特异性探针于 4 °C 继续反应 30 min。在特异性竞争反应体系中, 另外加入 100 倍的未标记的特异性探针或非特异性探针; 在 Super shift 反应体系中, 核蛋白在同链精 DNA 作用之前, 首先与抗体于 4 °C 反应 20 min。反应完毕后, 于 4 °C 行 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 90 V, 2.5 h。使用胶用保鲜膜覆盖后, 放入暗盒, 压 X 线胶片, -70 °C 自显影 72 h。

1.10 统计学处理

采用 SPSS11.5 软件对数据进行处理, 数据以

$\bar{x} \pm s$ 表示; 两组间连续变量比较用 *t* 检验, 多组间连续变量比较用方差分析。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AP-2α 基因转染后 SW620 细胞中 AP-2α 的表达及其活性鉴定

pcDNA3.1 (+)-AP-2α 重组质粒转染大肠癌 SW620 (实验组) 细胞后, 由图 1 可以看出 AP-2α 蛋白得到高表达。为了进一步评价 pcDNA3.1 (+)-AP-2α/SW620 细胞中表达的 AP-2α 是否具有 DNA 结合活性, 本研究利用 EMSA 技术检测各组细胞中所提取的核蛋白与一段 AP-2α 保守 DNA 序列的结合能力。结果如图 2 所示, 与 pcDNA3.1 (+)/SW620 组相比, 实验组 lane 3 中的核蛋白产生了一条较强的 DNA 结合带, lane 6 中加入抗体之后形成更加滞后的特异条带, 说明此 DNA 结合带为 AP-2α 与标记探针结合形成的特异滞后条带, 同时也说明实验组中表达 AP-2α; lane 5 中加入 100 倍未标记的特异探针时, 未出现特异结合带, DNA 结合带基本上被竞争掉; lane 4 中加入 100 倍未标记的非特异性探针时, DNA 结合带依然存在, 说明 AP-2α 与该段保守序列是特异结合的。

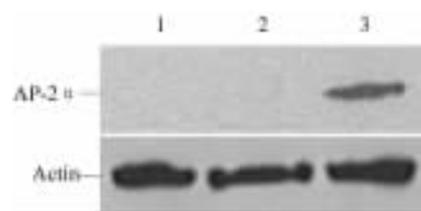


图 1 转染后 SW620 细胞中 AP-2α 蛋白的表达水平
Fig. 1 Expression of AP-2α protein in SW620 cells after transfection

1: SW620 cells; 2: pcDNA3.1 (+)/SW620 cells;
3: pcDNA3.1 (+)-AP-2α/SW620 cells

2.2 AP-2α 基因对 SW620 细胞黏附能力的影响

通过对 Matrigel 基质胶贴壁黏附的观察, 比较了 pcDNA3.1 (+)-AP-2α 与 pcDNA3.1 (+) 转染的 SW620 细胞的黏附性特征。结果如图 3 所示: 2 组细胞在接种后 10 min, 即有约 10% 的细胞黏附贴壁, 120 min 时贴壁细胞基本均达 95%。在 30、60、90 min 3 个时间点, 对照组细胞的黏附率明显较 pcDNA3.1 (+)-AP-2α 组高 (*P* < 0.05); 在 60 min 时间点, 2 种细胞的黏附比率差异达到 25%, pcDNA3.1 (+)SW620 细胞约有 75% 已经黏附于基质

膜胶,而 pcDNA3.1(+)-*AP-2 α* 组 SW620 细胞在该时间点的贴壁率不足 55%。以上结果说明转染 *AP-2 α* 基因后使得 SW620 细胞的黏附能力降低。

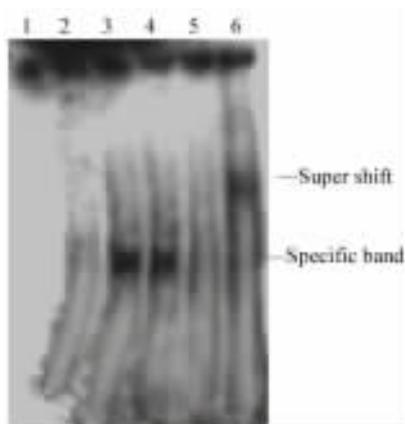


图2 转染后 SW620 细胞中 *AP-2 α* DNA 结合活性的鉴定

Fig.2 Identification of DNA-binding activity of *AP-2 α* in SW620 cells after transfection

1: Free probe group; 2: pcDNA3.1(+)/SW620 cells group; 3: pcDNA3.1(+)-*AP-2 α* /SW620 cells group; 4: 100 fold unlabelled unspecific probe group; 5: 100 fold unlabelled specific probe group; 6: Anti-*AP-2 α* antibody group

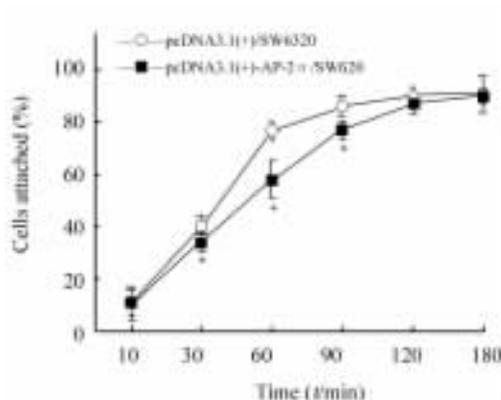


图3 转染 *AP-2 α* 基因对 SW620 细胞黏附能力的影响

Fig.3 Effect of *AP-2 α* transfection on adhesion ability of SW620 cells

* $P < 0.05$ vs pcDNA3.1(+)/SW620

2.3 *AP-2 α* 基因对 SW620 细胞侵袭能力的影响

采用 Transwell 装置检测了转染 pcDNA3.1(+)-*AP-2 α* 与 pcDNA3.1(+)-SW620 细胞的体外侵袭能力,结果显示,pcDNA3.1(+)-*AP-2 α* 组 SW620 细胞侵袭到 Transwell 下小室面的数量为 (31.4 ± 8.76) ,明显较对照组细胞 (174.6 ± 30.66) 减少 ($P < 0.01$)。

2.4 *AP-2 α* 基因对 SW620 细胞迁移能力的影响

为判断 pcDNA3.1(+)-*AP-2 α* 组 SW620 细胞侵袭能力减弱是否由细胞迁移能力改变引起,本研究采用 Transwell 方法比较了 2 种细胞的迁移能力。结果显示,pcDNA3.1(+)-*AP-2 α* 组 SW620 细胞迁移数目为 (98 ± 37.3) ,较对照组 (227 ± 80.5) 明显减少 ($P < 0.01$)。

2.5 *AP-2 α* 基因对 SW620 细胞 *ER- β* 基因的表达

为了进一步研究转染 *AP-2 α* 基因后 SW620 细胞侵袭生长能力减弱的分子机制,通过 Western blotting 检测 pcDNA3.1(+)-SW620 细胞与 pcDNA3.1(+)-*AP-2 α* 组转染的 SW620 细胞中 *ER- β* 蛋白的表达水平。结果显示,*ER- β* 在 pcDNA3.1(+)-*AP-2 α* 组的表达水平较对照组升高。接着采用实时定量 PCR 方法检测了这 2 组细胞中 *ER- β* 基因的 mRNA 水平,结果显示与蛋白水平一致(图 4)。细胞水平进行免疫荧光细胞化学检测,结果同样证实了 *ER- β* 基因在 pcDNA3.1(+)-*AP-2 α* 组 SW620 细胞的表达水平高于对照组(图 5)。上述结果提示,*AP-2 α* 基因对 *ER- β* 基因表达很可能有上调作用。

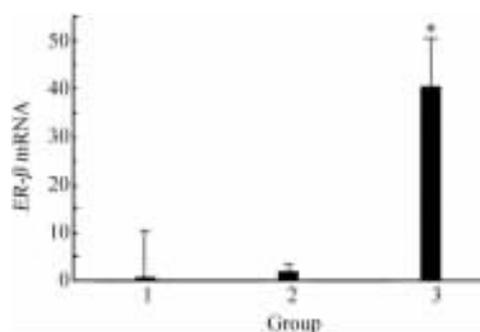


图4 转染后 SW620 细胞中 *ER- β* mRNA 表达水平

Fig.4 Expression of *ER- β* mRNA in SW620 cells after *AP-2 α* transfection

1: SW620 cells; 2: pcDNA3.1(+)/SW620 cells;

3: pcDNA3.1(+)-*AP-2 α* /SW620 cells

* $P < 0.01$ vs pcDNA3.1(+)/SW620 cells

2.6 *AP-2 α* 介导 *ER- β* 基因的转录激活

为鉴定 *AP-2 α* 基因对 *ER- β* 基因的可能的调控作用,采用 EMSA 方法检测 pcDNA3.1(+)-*AP-2 α* 组与 pcDNA3.1(+)-SW620 细胞核蛋白与 *ER- β* 基因启动子区域的结合情况。结果如图 6 所示:Lane 1 为自由探针; Lane 2 为 pcDNA3.1(+)-*AP-2 α* /SW620 细胞中的核蛋白与 *ER- β* 探针的结合情况; Lane 3 为 pcDNA3.1(+)-SW620 细胞的核蛋白中残余的 *AP-2 α* 与 *ER- β* 探针形成了较弱的结合带;而 pcDNA3.1(+)-*AP-2 α* /SW620 细胞中的核蛋白与 *ER- β*

探针产生的结合带强度均显著增强。Lane 4 加入 100 倍未标记的非特异性探针(100 × mut-AP-2)时, 这些蛋白-DNA 结合条带依然存在, 说明 AP-2 α 与该条探针是特异结合的; Lane 5 加入 100 倍未标记的特异性探针(100 × AP-2)时, 蛋白-DNA 结合条带基本上被竞争掉; Lane 6 加入 anti-AP-2 α 之后, 蛋白-DNA 结合条带均形成了更加滞后的 supershift 带, 说明蛋白-DNA 结合条带为 AP-2 α 与该条探针结合形成的特异滞后带。

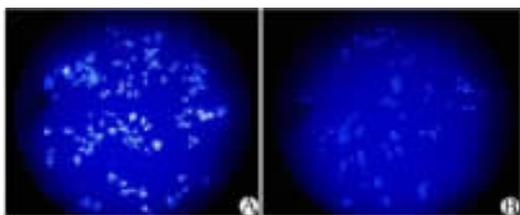


图 5 AP-2 α 基因转染后 SW620 细胞上调 ER- β mRNA 的表达

Fig. 5 Increased expression of ER- β mRNA in SW620 cells after AP-2 α gene transfection

A: pcDNA3.1(+)AP-2 α /SW620; B: pcDNA3.1(+)/SW620

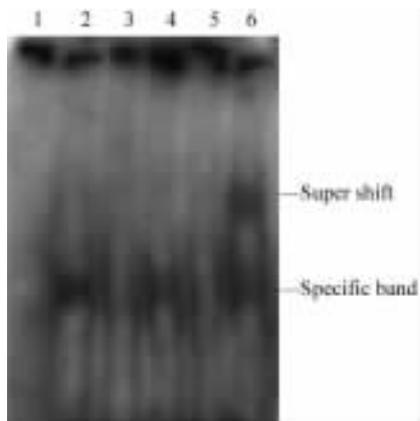


图 6 转染后 SW620 细胞中 AP-2 α 与 ER- β 基因启动子区域的特异性结合

Fig. 6 Specific interaction between AP-2 α and promoter region of ER- β in SW620 cells after transfection

1: Free probe group; 2: pcDNA3.1(+)-AP-2 α /SW620 cells group; 3: pcDNA3.1(+)/SW620 cells group; 4: 100 fold unlabelled unspecific probe group; 5: 100 fold unlabelled specific probe group; 6: Anti-AP-2 α antibody group

3 讨论

转录因子 AP-2 α 在大多数肿瘤中被认为是一种抑癌基因, 可调节细胞增生、分化及凋亡^[9]。AP-2 α 作为一种特殊序列 DNA 结合蛋白, 通过调控靶

基因进行有选择性的表达, 使某些靶基因表达产物异常而参与肿瘤的恶性增生、侵袭和转移等。已有研究^[10-14]表明, 癌相关基因包括 p21WAF/CIP、TGF- α 、c-Kit、EGFR、HER-2/neu、MCAM/MUC18 and c-myc、VEGF and MMP-2、KAI1 and KiSS-1、ER- β 等都具有 AP-2 α 结合位点与顺式调控序列^[15]。因此 AP-2 α 作为一种具有肿瘤抑制样作用的蛋白, 可以通过调控这些基因转录和表达, 从而在细胞正常生长分化过程中发挥着重要的生物学功能。

为了深入探讨 AP-2 α 的表达缺失参与大肠癌发生、发展的作用机制, 本研究应用转基因技术将野生型 AP-2 α 基因导入 SW620 细胞内并获得表达, 应用 EMSA 技术证实高表达的 AP-2 α 具有较强的 DNA 结合活性。本研究在应用 Matrigel 基质胶贴壁的方法及 Transwell 方法发现 AP-2 α 可抑制 SW620 细胞的黏附、迁移、侵袭生长。

研究表明^[16], ER- β 是类固醇激素受体基因超家族成员之一, 在肿瘤的发生发展中 ER- β 表达缺失, 通常被认为是一种肿瘤抑制基因^[17]。有报道显示男性大肠癌的发病率和病死率是女性的 1.5 倍, 而绝经后的妇女用雌激素替代疗法可降低大肠癌发病率^[8]。在 50 多个随机选取的结肠癌样本中 ER- β 表达同样是缺失的, 但在正常和分化较好的大肠黏膜中 ER- β 的表达水平较高^[18]。在众多恶性肿瘤, 如肝癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、大肠癌和卵巢癌中 ER- β 可有效的抑制恶性细胞的增殖侵袭能力。由于 ER- β 基因启动子上存在可能的 AP-2 α 结合位点^[19], 提示 AP-2 α 有可能调控 ER- β 基因的表达。为了确定结肠癌中 AP-2 α 对 ER- β 基因表达的影响, 本研究利用 RT-PCR 技术和 Western blotting、免疫细胞荧光化学技术分析检测转染 AP-2 α 基因后 SW620 细胞中 ER- β 基因的表达情况, 结果显示, 转染 AP-2 α 基因后, SW620 细胞中 ER- β 基因 mRNA 含量和蛋白表达水平显著升高。为了进一步探讨大肠癌中 AP-2 α 对 ER- β 基因表达的可能的分子机制, 本实验根据 ER- β 基因启动子区域中可能的 AP-2 α 结合位点设计 1 对寡核苷酸探针, 通过 EMSA 技术检测到 pcDNA3.1(+)-AP-2 α 组 SW620 细胞中表达的 AP-2 α 蛋白与 ER- β 基因启动子区域发生特异性结合。

尽管转录因子 AP-2 α 很可能通过调控其他靶基因如 E-cadherin、MMP-9^[20]、c-myc^[21] 及 p21^[22] 等来影响结肠黏膜上皮细胞的生物学行为, 但从本研究结果推测, AP-2 α 表达降低或缺失导致的大肠黏膜上皮细胞恶性生物学行为的形成也可能与 ER- β

基因表达改变有关,即 AP-2 α 抑制大肠癌细胞株—SW620 细胞体外恶性侵袭能力的作用机制很可能与通过直接作用于 ER- β 基因启动子区域从而改变 AP-2 α 基因的表达有关。

总之,本研究结果进一步揭示了在大肠癌发生过程中,AP-2 α 的表达降低或缺失很可能是一个非常关键的分子事件;同时,该结论也解释了大肠癌中 AP-2 α 表达降低或缺失与 ER- β 表达降低并存这一现象的可能原因。

[参考文献]

- [1] Williams T, Admon A, Lüscher B, *et al.* Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements [J]. *Genes Dev*, 1988, 2(12A): 1557-1569.
- [2] Williams T, Tjian R. Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2 [J]. *Genes Dev*, 1991, 5(4): 670-682.
- [3] Huang S, Jean D, Luca M, *et al.* Loss of AP-2 results in down-regulation of c-KIT and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis [J]. *EMBO J*, 1998, 17(15): 4358-4369.
- [4] Ropponen KM, Kellokoski JK, Pirinen RT, *et al.* Expression of transcription factor AP-2 in colorectal adenomas and adenocarcinomas; comparison of immunohistochemistry and *in situ* hybridisation [J]. *J Clin Pathol*, 2001, 54(7): 533-538.
- [5] Heimberger AB, McGary EC, Suki D, *et al.* Loss of the AP-2 alpha transcription factor is associated with the grade of human gliomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(1): 267-272.
- [6] Ruiz M, Troncoso P, Bruns C, *et al.* Activator protein 2 alpha transcription factor expression is associated with luminal differentiation and is lost in prostate cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(12): 4086-4095.
- [7] Martinetti V, Picariello L, Tognarini I, *et al.* ER beta is a potent inhibitor of cell proliferation in the HCT8 human colon cancer cell line through regulation of cell cycle components [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2005, 12(2): 455-469.
- [8] Campbell-Thompson M, Lynch IJ, Bhardwaj B. Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ER beta isoforms in colon cancer [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(2): 632-640.
- [9] Orso F, Fassetta M, Penna E, *et al.* The AP-2 alpha transcription factor regulates tumor cell migration and apoptosis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 604: 87-95.
- [10] Hilger-Eversheim K, Moser M, Schorle H, *et al.* Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control [J]. *Gene*, 2000, 260(1-2): 1-12.
- [11] Jean D, Gershenwald JE, Huang S, *et al.* Loss of AP-2 results in up-regulation of MCAM/MUC18 and an increase in tumor growth and metastasis of human melanoma cells [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(26): 16501-16508.
- [12] Wang X, Bolotin D, Chu DH, *et al.* AP-2 alpha: a regulator of EGF receptor signaling and proliferation in skin epidermis [J]. *J Cell Biol*, 2006, 172(3): 409-421.
- [13] Bar-Eli M. Gene regulation in melanoma progression by the AP-2 transcription factor [J]. *Pigment Cell Res*, 2001, 14(2): 78-85.
- [14] Marreiros A, Dudgeon K, Dao V, *et al.* KAI1 promoter activity is dependent on p53, junB and AP2: evidence for a possible mechanism underlying loss of KAI1 expression in cancer cells [J]. *Oncogene*, 2005, 24(4): 637-649.
- [15] Eckert D, Buhl S, Weber S, *et al.* The AP-2 family of transcription factors [J]. *Genome Biol*, 2005, 6(13): 246.
- [16] Green S, Walter P, Kumar V, *et al.* Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A [J]. *Nature*, 1986, 320(6058): 134-139.
- [17] Foley EF, Jazaeri AA, Shupnik MA, *et al.* Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(2): 245-248.
- [18] Campbell-Thompson M, Lynch IJ, Bhardwaj B. Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(2): 632-640.
- [19] Zhang X, Leung YK, Ho SM, *et al.* AP-2 regulates the transcription of estrogen receptor (ER)-beta by acting through a methylation hotspot of the promoter in prostate cancer cells [J]. *Oncogene*, 2007, 26(52): 7346-7354.
- [20] Schwartz B, Melnikova VO, Tellez C, *et al.* Loss of AP-2 alpha results in deregulation of E-cadherin and MMP-9 and an increase in tumorigenicity of colon cancer cells *in vivo* [J]. *Oncogene*, 2007, 26(28): 4049-4058.
- [21] Gaubatz S, Imhof A, Dosch R, *et al.* Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2 [J]. *EMBO J*, 1995, 14(7): 1508-1519.
- [22] Wajapeyee N, Somasundaram K. Cell cycle arrest and apoptosis induction by activator protein 2 alpha (AP-2 alpha) and the role of p53 and p21WAF1/CIP1 in AP-2 alpha-mediated growth inhibition [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(52): 52093-52101.

[收稿日期] 2009-04-18

[修回日期] 2009-06-15

[本文编辑] 王莹

欢迎登陆我刊网站 www.biother.org