

肺癌细胞中调控 *ezrin* 基因基本转录活性的顺式作用元件及转录因子的鉴定*

高书颖^{1,2)} 李恩民^{2)**} 孟令英¹⁾ 崔磊²⁾ 袁华敏²⁾ 杜则澎²⁾ 许丽艳^{1)**}

(¹⁾汕头大学医学院肿瘤病理研究室, 汕头 515041; ²⁾汕头大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 汕头 515041)

摘要 研究发现, 质膜-细胞骨架连接蛋白 Ezrin 在多种肿瘤细胞中异常表达, 而且 Ezrin 的表达上调与肿瘤细胞的移动侵袭相关, 但是调控 *ezrin* 基因转录的分子机制却不清楚. 为了探明 *ezrin* 基因的转录调控机制, 以肺癌细胞 A549 为材料, 首先采用双荧光素酶报告基因分析系统检测 *ezrin* 基因 5'侧翼嵌套缺失序列和位点突变序列的转录活性, 鉴定肺癌细胞中 *ezrin* 基因的基本启动子区以及关键的顺式作用元件 Sp1 结合位点 (-75/-69) 和 AP-1 结合位点 (-64/-58). 其次, 利用凝胶电泳迁移率变动分析证明, 肺癌细胞核蛋白提取物能够与 *ezrin* 基因含有关键顺式作用元件的 DNA 序列结合, 形成 DNA-核蛋白复合物, 而且 Sp1 结合位点和 AP-1 结合位点与重组蛋白 rhSp1 和 rhAP-1 的结合具有位点特异性. 最后, 利用瞬时转染实验证实, 转录因子 Sp1 和 AP-1 (由 c-Jun 和 c-Fos 组成的异源二聚体) 分别通过 Sp1 结合位点和 AP-1 结合位点, 增强 *ezrin* 基因基本转录活性, 而且, 过表达转录因子 Sp1、c-Jun 或 c-Fos 上调了 Ezrin 蛋白表达. 研究确定, 肺癌细胞中调控 *ezrin* 基因基本转录活性的关键顺式作用元件是 Sp1 结合位点 (-75/-69) 和 AP-1 结合位点 (-64/-58), 与之作用的转录因子 Sp1 和 AP-1 对于 *ezrin* 基因的转录激活作用至关重要.

关键词 *ezrin* 基因, 转录调控元件, 转录因子, 双荧光素酶报告基因分析系统, 凝胶电泳迁移率变动分析

学科分类号 Q7, R3

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00477

Ezrin 是一种质膜-细胞骨架连接蛋白, 属于 ERM (ezrin-radixin-moesin) 家族成员^[1]. 研究证明 Ezrin 参与多种细胞行为, 如细胞黏附^[2]、移动^[3]、信号传导^[4]等. 而且, Ezrin 在包括肺癌细胞在内的多种肿瘤细胞中异常表达, 其表达上调与肿瘤细胞的移动侵袭相关^[5~8]. 因此, 有人提出 Ezrin 可以作为一些肿瘤的一种新的预警标志分子, 甚至作为肿瘤患者的一种有希望的治疗靶点^[9]. 然而, 迄今为止, 关于 *ezrin* 基因在肺癌等肿瘤组织细胞中的转录调控机制尚不清楚.

为了揭示 *ezrin* 基因在肿瘤细胞中的转录调控机制, 我们曾检测 Ezrin 蛋白在肺癌、胃癌、食管癌和宫颈癌等多种肿瘤细胞中的表达, 以及 *ezrin* 基因 5'侧翼区序列在上述细胞中的转录活力, 初步确定 *ezrin* 基因 5'侧翼区序列对于 Ezrin 蛋白在肿瘤细胞中的高表达起重要作用^[10]. 但是, 调控 *ezrin* 基因转录的关键顺式作用元件及转录激活因子仍不明确. 为此, 本文以肺癌细胞 A549 为材料, 运用双荧光素酶报告基因检测系统和凝胶电泳

迁移率变动分析等实验技术手段, 探测调控 *ezrin* 基因基本转录活性的关键顺式作用元件及转录因子. 这些研究对于揭示 *ezrin* 基因在肺癌等肿瘤细胞中的转录调控机制有重要意义.

1 材料与方法

1.1 质粒

Sp1 表达载体 CMV-Sp1 来源于 Guntram Suske (Philipps-University, Marburg, Germany); pcDNA3 购自 Invitrogen 公司 (Carlsbad, CA, USA); pGL3-Basic

* 国家高技术研究发展计划(863)(2006AA02A403), 国家自然科学基金资助项目(30370641, 30570849, 30672376), 教育部高等学校博士点重点学科专项基金项目(20050560002, 20050560003), 广东省自然科学基金项目(37788, 5104541, 7118419, 7301043)和中国博士后科学基金资助项目(20070410846).

** 通讯联系人. Tel: 0754-8900847

许丽艳. E-mail: liyanxu1130@yahoo.com.cn

李恩民. E-mail: nmli@stu.edu.cn

收稿日期: 2008-07-04, 接受日期: 2008-09-22

(pGLB) 和 pRL-TK 购自 Promega 公司 (Madison, WI, USA). 以 *ezrin* 基因 5'侧翼区嵌套缺失序列为报告基因启动子的质粒 pGLB-hE(-1 759/+134)、pGLB-hE(-1 324/+134)、pGLB-hE(-696/+134)、pGLB-hE(-213/+134)、pGLB-hE(-87/+134)、pGLB-hE(-32/+134) 由汕头大学医学院肿瘤病理研究室构建, 在 pGLB 的萤火虫荧光素酶报告基因上游分别连接 *ezrin* 的 -1 759/+134、-1 324/+134、-696/+134、-213/+134、-87/+134、-32/+134 片段 (*ezrin* 基因转录起始位点定义为 +1, 翻译起始位点在

+135). 以 *ezrin* 基因 5'侧翼区位点突变序列为报告基因启动子的质粒 pGLB-hE (-87/ +134)Sm、pGLB-hE (-87/ +134)Sd、pGLB-hE (-87/ +134)Am、pGLB-hE(-87/+134)Ad 和 pGLB-hE(-87/+134)SAm 由汕头大学医学院肿瘤病理研究室构建, *ezrin* 基因 -87/-46 野生型序列及位点突变序列见表 1. c-Fos 和 c-Jun 表达载体 pcDNA3-c-Jun 和 pcDNA3-c-Fos 由汕头大学医学院肿瘤病理研究室构建, 是在载体 pcDNA3 上分别连接 c-Fos 和 c-Jun 的完整编码区.

Table 1 Site-directed mutagenesis plasmids

Plasmid name	<i>ezrin</i> gene -87/-46 sequences (5'→ 3')	Notes
pGLB-hE(-87/+134)	GCCCCGAGTGCTGGGCGGGGCGCTGACTCACCCGGGCCCGGG	Wild type
pGLB-hE(-87/+134)Sm	GCCCCGAGTGCTAATATTGCGCTGACTCACCCGGGCCCGGG	Sp1 site mutation
pGLB-hE(-87/+134)Sd	GCCCCGAGTGCTGCGCTGACTCACCCGGGCCCGGG	Sp1 site deletion
pGLB-hE(-87/+134)Am	GCCCCGAGTGCTGGGCGGGGCGCGTTCGGATCCCGGGGCCCGGG	AP-1 site mutation
pGLB-hE(-87/+134)Ad	GCCCCGAGTGCTGGGCGGGGCGCCCCGGGCCCGGG	AP-1 site deletion
pGLB-hE(-87/+134)SAm	GCCCCGAGTGCTAATATTGCGCGTTCGGATCCCGGGGCCCGGG	Sp1 and AP-1 sites mutation

Sp1 binding sites (-75/-69) framed; AP-1 binding sites (-64/-58) underlined; Mutation sites shadowed.

1.2 细胞与细胞培养

肺癌细胞株 A549 购自中国科学院上海细胞库. 细胞在含 10%小牛血清的 DMEM 培养基 (Invitrogen 公司) 中贴壁生长. 用含 0.25%胰蛋白酶和 0.02% EDTA 的消化液消化细胞, 进行传代培养. 对于需转染的细胞, 将细胞接种于 96 孔细胞培养板或 6 孔细胞培养板中, 当细胞汇合率为 50%~80%时, 可用于质粒瞬时转染实验.

1.3 瞬时转染

接种于 96 孔培养板中的细胞用于双荧光素酶活性检测. 提取质粒并测定其含量. 用缓冲液 EB (Qiagen 公司质粒提取试剂盒中提供) 将 pGLB 以及含 *ezrin* 基因 5'侧翼区序列的重组 pGLB 质粒稀释至 100 mg/L, 内参照质粒 pRL-TK 稀释至 20 mg/L, 然后将 pGLB 和重组 pGLB 质粒分别与 pRL-TK 按 50 : 1 混合, 即 1 μg : 0.02 μg. 将转录因子表达载体 CMV-Sp1、pcDNA3-c-Jun、pcDNA3-c-Fos 和对照质粒 pcDNA3 用缓冲液 EB 稀释至 100 mg/L, 根据实验需要用量加至上述含有 pRL-TK 的混合质粒中. 质粒瞬时转染步骤参照 Superfect 转染试剂 (Qiagen, Mainz, Germany) 说明进行. 转染后继续培养 48 h, 收获细胞. 每组实验样品 3 个平行实验孔, 并至少进行 3 次重复实验.

接种于 6 孔培养板中的细胞用于 Western blot 分析. 将转录因子表达载体 CMV-Sp1、pcDNA3-c-Jun、pcDNA3-c-Fos 或对照质粒 pcDNA3 分别瞬时转染至 A549 细胞中, 每孔转染质粒 6 μg, 转染后继续培养 48 h, 收获细胞.

1.4 双荧光素酶活性检测及统计学分析

双荧光素酶活性检测参照双荧光素酶报告基因分析系统操作手册, 在 TD20/20 型照度计上进行. 根据 TD20/20 型照度计配置的软件包计算出各组转染细胞的相对荧光素酶活性 (萤火虫荧光素酶 / 海肾荧光素酶), 以此代表重组 pGLB 质粒报告基因启动子的转录活性. 各组实验数据均计算 ($\bar{x} \pm s$). 应用 SPSS 13.0 软件 (SPSS, Chicago, IL, USA) 对各组实验数据之间是否有显著性差别进行 *t* 检验, *P* < 0.05 表示差异显著.

1.5 电泳迁移率变动分析(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

A549 细胞核蛋白的提取参照文献[11]. 设计合成 *ezrin* 基因 5'侧翼区单链寡核苷酸及其互补序列 (表 2). 双链 DNA 序列的合成和探针标记参照 DIG Gel Shift Kit 操作手册进行 (Roche, Mannheim, Germany). 5~10 μg A549 细胞核蛋白提取物或 0.2~0.3 μg 重组蛋白 (rhSp1 或 rhAP1, Promega 公

司) 与标记 DNA 探针在 20 μ l 反应液 (20 mmol/L Hepes pH 7.9, 1 mmol/L EDTA pH 8.0, 1 mmol/L DTT, 10 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2% Tween-20 (*w/v*), 30 mmol/L KCl, 1 μ g poly [d (I-C)], 0.1 μ g poly L-lysine) 中室温下孵育 30 min. 同时, 为检测滞留带的特异性, 加入未标记寡核苷酸序列作为特异性竞争剂, 加入量是探针的 125 倍. 对于 Sp1 结合阻断分析, 标记 DNA 探针与不同浓度的光辉霉素 A

(mithramycin A, MMA) 在 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后加入反应液. 反应混合物在 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上 4 $^{\circ}$ C、80 V 电泳 100 min, 电泳缓冲液为 0.5 $\times$ TBE. 电泳结束后, 将凝胶转移至带正电荷的尼龙膜上. 免疫反应参照 DIG Gel Shift Kit 操作手册进行. 于成像系统 FluorChem TMIS-8900 (Alpha Innotech, USA) 中化学发光 1 h 检测 DNA- 核蛋白复合物的形成, 计算分析灰度值.

Table 2 Oligonucleotide sequences for EMSA

Probe name	Sequences	Notes
Probe W	5' GCCCGCAGTGTCTGGGCGGGGCGCTGACTCACCCGGGCCCGGG 3' 3' CGGGCGTCACGACCCGCCC CGCGACTGAGTGGGCCCGGGCCC 5'	Wild type, <i>ezrin</i> -87/-46 sequence
Probe S	5' GCCCGCAGTGTCTGGGCGGGGCGC 3' 3' CGGGCGTCACGACCCGCCC CGCG 5'	Wild type, <i>ezrin</i> -87/-65 sequence
Probe A	5' GCGCTGACTCACCCGGGCCCGGG 3' 3' CGCGACTGAGTGGGCCCGGGCCC 5'	Wild type, <i>ezrin</i> -68/-46 sequence
Probe Sd	5' GCCCGCAGTGTCTGCGCTGACTCACCCGGGCCCGGG 3' 3' CGGGCGTCACGACGCGACTGAGTGGGCCCGGGCCC 5'	Sp1 site deletion, <i>ezrin</i> -87/-46 sequence
Probe Ad	5' GCCCGCAGTGTCTGGGCGGGGCGCCCCGGGCCCGGG 3' 3' CGGGCGTCACGACCCGCCC CGCGGGGCCCGGGCCC 5'	AP-1 site deletion, <i>ezrin</i> -87/-46 sequence
Probe Sm	5' GCCCGCAGTGTCTAATATTGCGCTGACTCACCCGGGCCCGGG 3' 3' CGGGCGTCACGATTATAAACGCGACTGAGTGGGCCCGGGCCC 5'	Sp1 site mutation, <i>ezrin</i> -87/-46 sequence
Probe Am	5' GCCCGCAGTGTCTGGGCGGGGCGCGTTCGGATCCCGGCCCGGG 3' 3' CGGGCGTCACGACCCGCCC CGCGCAGCCTAGGGGCCCGGGCCC 5'	AP-1 site mutation, <i>ezrin</i> -87/-46 sequence

Sp1 binding sites (-75/-69) framed; AP-1 binding sites (-64/-58) underlined; Mutation sites shadowed.

1.6 Western blot 分析

提取 A549 细胞总蛋白, 测定蛋白质含量. 20 μ g 细胞总蛋白提取物进行 12% SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将蛋白质电转至 PVDF 膜 (pore size 0.45 μ m, Millipore, Billerica, MA, USA) 上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入一抗 Ezrin Ab-1 (3C12, Mouse Mab MS-661-P, NeoMarkers, Fremont, CA, USA), 鼠单克隆抗体 Sp1 (ab58199, Abcam, Cambridge, UK), 兔抗体 c-Jun (H-79, sc-1694, Santa Cruz, CA, USA), 兔抗体 c-Fos (sc-52, Santa Cruz) 或单克隆抗体 β -actin (鼠 IgG1 同型, 克隆 AC-15, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 室温孵育 1 h. 然后用 PBST (0.01 mol/L, pH 7.2~7.4, 0.05% Tween 20) 洗 2 次, PBS 洗 1 次; 再加入对应的二抗羊抗鼠 IgG-HRP (sc-2031, Santa Cruz) 或羊抗兔 IgG-HRP (sc-2030, Santa Cruz), 室温孵育 1 h, 用 PBST 洗 2 次, PBS 洗 1 次; 最后加入 Western blotting 化学发光试剂 (sc-2048, Santa Cruz), 于 FluorChem TMIS-8900 成像系统进行成

像及条带灰度分析.

2 结 果

2.1 *ezrin* 基因 5' 侧翼存在增强子区和基本启动子区

重组质粒 pGLB-hE(-1 759/+134)、pGLB-hE(-1 324/+134)、pGLB-hE(-696/+134)、pGLB-hE(-213/+134)、pGLB-hE(-87/+134) 和 pGLB-hE(-32/+134) 以 *ezrin* 基因 5' 侧翼不同长度 DNA 序列为报告基因启动子, 将这些质粒分别与内参照质粒 pRL-TK 共转染 A549 细胞, 检测相对荧光素酶活性. 结果见图 1, *ezrin* 基因 -1 324/+134 片段表现出最强的转录活性, -87/+134 是表现基本转录活性的最短片段. *ezrin* 基因 5' 侧翼区序列从 -1 324 截短到 -696 时, 启动子转录活性降低约 75%, 从 -87 截短到 -32 时, 启动子转录活性几乎完全丧失. 与 -696/+134 比较, 进一步的 5' 侧翼缺失片段 -213/+134 和 -87/+134 没有对启动子转录活性产生显著影响. 这说明, 在 A549 细胞中, *ezrin* 基因

的-1 324/-696 具有转录正调控作用, 含有增强子序列, -87/+134 含有 *ezrin* 基因基本启动子区序列, 而-87/-32 则为基本转录活性调控区。

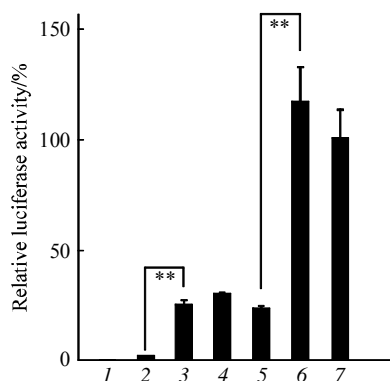


Fig. 1 Localization of transcriptional regulatory region of the human *ezrin* 5'-flanking region

pGLB or recombinant pGLB constructs containing different length of *ezrin* gene 5'-flanking region were cotransfected with pRL-TK into A549 cells. Luciferase activity was normalized to *Renilla* luciferase activity and then shown relative to that of pGLB-hE(-1 759/+134), which was given the value 100%. Each value was plotted as $\bar{x} \pm s$. The data are representative of at least 3 independent experiments. Transfections were carried out in triplicate for each experiment. The asterisks (*) indicate that either deletion mutagenesis of human *ezrin* gene 5'-flanking sequences significantly reduced luciferase expression in A549 cells, where ** indicates $P < 0.01$. 1: pGLB; 2: pGLB-hE(-32/+134); 3: pGLB-hE(-87/+134); 4: pGLB-hE(-213/+134); 5: pGLB-hE(-696/+134); 6: pGLB-hE(-1 324/+134); 7: pGLB-hE(-1 759/+134).

2.2 Sp1 结合位点 (-75/-69) 和 AP-1 结合位点 (-64/-58) 是调控 *ezrin* 基因基本转录活性的关键顺式作用元件

利用转录因子预测程序 <http://www.generegulation.com/pub/programs/alibaba2> 对 *ezrin* 基因基本转录活性调控区 (-87/-32 序列) 进行转录因子结合位点预测, 结果发现, 这一区域存在多个转录因子的潜在结合位点, 其中-75/-69 (GGGCGGG) 为转录因子 Sp1 的经典结合位点, -64/-58 (TGACTCA) 为转录因子 AP-1 的经典结合位点。将含有 Sp1 和 AP-1 位点的质粒 pGLB-hE(-87/+134)、Sp1 位点突变质粒 pGLB-hE(-87/+134)Sm、Sp1 位点删除质粒 pGLB-hE(-87/+134)Sd、AP-1 位点突变质粒 pGLB-hE(-87/+134)Am、AP-1 位点删除质粒 pGLB-hE(-87/+134)Ad 以及 Sp1 和 AP-1 两位点同时突变质粒 pGLB-hE(-87/+134)SAm 分别与内参照质粒 pRL-TK 共转染至 A549 细胞中, 检测相对荧光素酶活性。结果见图 2, A549 细胞中, 与同时含有 Sp1 和 AP-1 位点的质粒 pGLB-hE

(-87/+134) 相比, 单独突变或删除 Sp1 位点或 AP-1 位点使荧光素酶活性降低约 50%, 两位点同时突变使酶活性降低约 90%, 接近于不表现转录活性质粒 pGLB-hE(-32/+134) 的水平。这说明, 在 A549 细胞中, Sp1 位点 (-75/-69) 和 AP-1 位点 (-64/-58) 为调控 *ezrin* 基因基本转录活性的关键顺式作用元件, 它们对于表现 *ezrin* 基因基本转录活性同等重要。

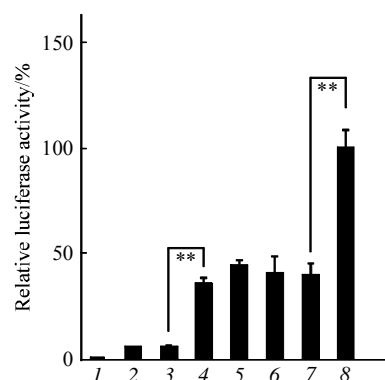


Fig. 2 Identification of key transcriptional regulatory elements within the *ezrin* basal promoter region

pGLB-hE(-87/+134) or site-directed mutagenesis constructs were cotransfected with pRL-TK into A549 cells. Luciferase activity was normalized to *Renilla* luciferase activity and then shown relative to that of pGLB-hE(-87/+134), which was given the value 100%. Each value was plotted as $\bar{x} \pm s$. The data are representative of at least 3 independent experiments. Transfections were carried out in triplicate for each experiment. The asterisks (*) indicate that site-directed mutagenesis of human *ezrin* gene 5'-flanking sequences significantly reduced luciferase expression in A549 cells, where ** indicates $P < 0.01$. 1: pGLB; 2: pGLB-hE(-32/+134); 3: pGLB-hE(-87/+134)SAm; 4: pGLB-hE(-87/+134)Ad; 5: pGLB-hE(-87/+134)Am; 6: pGLB-hE(-87/+134)Sd; 7: pGLB-hE(-87/+134)Sm; 8: pGLB-hE(-87/+134).

2.3 *ezrin* 基因含关键顺式作用元件序列与 A549 细胞核蛋白提取物的结合反应

采用 EMSA 实验研究确定, 在 A549 细胞中是否存在某种核蛋白与含有 Sp1 位点或 AP-1 位点的 *ezrin* 基因序列相结合, 结果见图 3。从图 3 可见: a. A549 细胞核蛋白提取物能够与 *ezrin* 基因的-87/-46 序列 (Probe W, 含 Sp1 位点和 AP-1 位点) 形成两条明显的 DNA-核蛋白复合物带 (图 3-2), 与-87/-65 序列 (Probe S, 含 Sp1 位点) 和-68/-46 序列 (Probe A, 含 AP-1 位点) 分别形成一条明显的 DNA-核蛋白复合物带 (图 3-4, 6); b. 在含有 A549 细胞核提取物和寡核苷酸序列探针的混合物中, 加入对应的未标记寡核苷酸序列作为竞争性抑制剂, 结果表明上述 DNA-核蛋白复合物带减弱或

消失(图 3-3, 5, 7). 由此可见, 在肺癌细胞中的确存在着某种核蛋白, 能够特异性地与含有 *ezrin* 基因关键顺式作用元件的 DNA 序列相结合. 另外, 与 Probe W(42 bp) 相比较, Probe S(23 bp) 和 Probe A(23 bp) 片段较短, 电泳速度快, 在凝胶前沿已看不到游离探针(图 3-4~7).

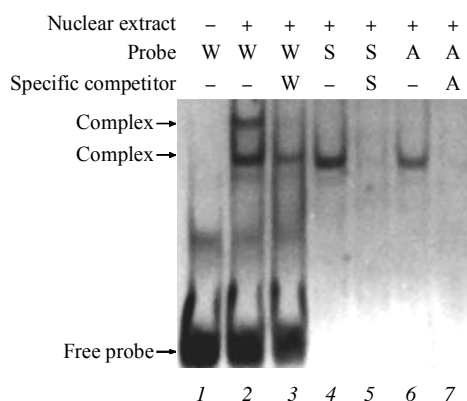


Fig. 3 Binding activity of nuclear extracts from A549 cells to *ezrin* basal transcriptional regulatory region

Nuclear extracts prepared from A549 cells were incubated with DIG-ddUTP labeled DNA probes (lane 1~3: Probe W; lane 4, 5: Probe S; lane 6, 7: Probe A) at room temperature for 30 min. 125 fold molar excess unlabeled oligonucleotides (lane 3: W; lane 5: S; lane 7: A) were used as specific competitors, respectively. The DNA-protein complexes and free probes were marked by arrows.

2.4 光辉霉素 A 抑制 A549 细胞核蛋白与 *ezrin* 基因含 Sp1 位点序列的结合

光辉霉素 A (MMA) 为 Sp1 特异性化学阻断剂, 可阻断转录因子与 DNA 序列上的 Sp1 位点的结合. 在 EMSA 反应体系中加入不同浓度的 MMA, 检测 MMA 对 DNA-核蛋白复合物形成的影响. 结果显示: a. A549 细胞核蛋白与含有 Sp1 位点和 AP-1 位点的野生型探针 (Probe W) 形成 2 条明显的 DNA-核蛋白复合物带, MMA 抑制复合物 I 的形成, 而且这种抑制作用具有 MMA 浓度依赖性(图 4a); b. 当探针删除 Sp1 位点、保留 AP-1 位点 (Probe Sd) 时, 只形成一条明显的 DNA-核蛋白复合物带 A, 复合物 A 的形成不受 MMA 浓度影响(图 4b); c. 当探针删除 AP-1 位点、保留 Sp1 位点 (Probe Ad) 时, 形成一条明显的 DNA-核蛋白复合物带 B, MMA 抑制复合物 B 的形成具有浓度依赖性(图 4c). 说明, 图 4a 中的复合物 I 和图 4c 中复合物 B 的形成与 Sp1 位点有关.

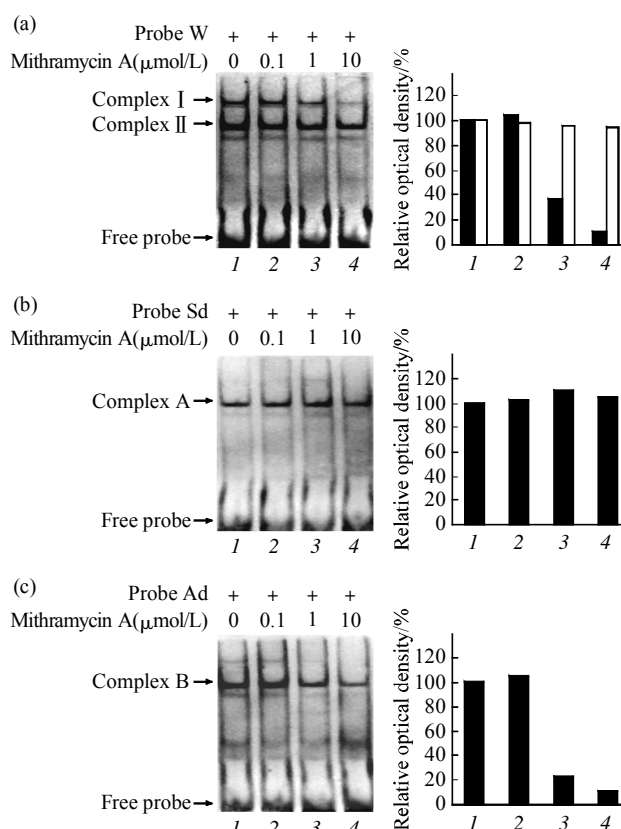


Fig. 4 Effect of mithramycin A on nuclear extracts from A549 cells binding to *ezrin* gene -87/-46 sequence

Increasing concentrations of mithramycin A (0.1, 1, or 10 $\mu\text{mol/L}$) were preincubated with Probe W (a), Probe Sd (b) or Probe Ad (c) for 1 h at 4°C before being added to EMSA reaction mixture. The DNA-protein complexes and free probes were marked by arrows. (a) ■: Complex I; □: Complex II. (b) ■: Complex A. (c) ■: Complex B.

2.5 重组蛋白 rhSp1 和 rhAP-1(c-Jun)与 Sp1 位点和 AP-1 位点的结合具有特异性

重组蛋白 rhSp1 是利用杆状病毒表达系统在昆虫 Sf9 细胞中表达人 Sp1 结构基因所提取纯化的蛋白质; 重组蛋白 rhAP-1 (c-Jun) 是利用大肠杆菌表达人 c-Jun 结构基因所提取纯化的蛋白质. rhSp1 和 rhAP-1 (c-Jun) 可代替转录因子 Sp1 和 c-Jun 进行体外 DNA-蛋白质结合实验. 利用 rhSp1 和 rhAP-1 (c-Jun) 检测 *ezrin* 基因的 Sp1 结合位点 (-75/-69) 和 AP-1 结合位点 (-64/-58) 与转录因子 Sp1 和 c-Jun 的结合活性和结合特异性. 结果见图 5, rhSp1 能够与含有 Sp1 结合位点的野生型探针 Probe W 结合形成滞留带 Complex A (图 5-1), 而与不含 Sp1 结合位点的突变型探针 Probe Sm 不能形成滞留带(图 5-2), 类似地, rhAP-1 能够与含有 AP-1 结合位点的野生型探针 Probe W 结合形成

滞留带 Complex B (图 5-3), 而与不含 AP-1 结合位点的突变型探针 Probe Am 不能形成滞留带(图 5-4)。可见, *ezrin* 基因的关键顺式作用元件 Sp1 位点和 AP-1 位点能够分别特异性地结合转录因子 Sp1 和 AP-1。

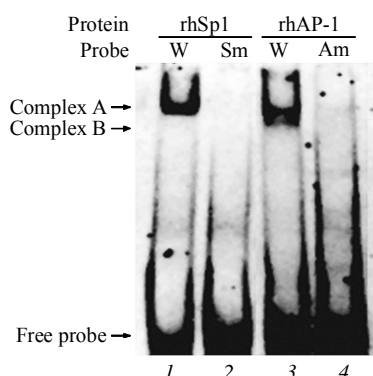


Fig. 5 Binding activity of rhSp1 and rhAP-1 (c-Jun) with the *ezrin* gene -87/-46 sequence

0.2~0.3 μ g recombinant protein rhSp1 or rhAP-1 (c-Jun) was incubated with Probe W (wild-type), Sm (Sp1 site mutation) or Am (AP-1 site mutation) and then was analyzed by EMSAs.

2.6 转录因子 Sp1、c-Jun、c-Fos 对 *ezrin* 基因基本启动子的激活作用

为了明确转录因子 Sp1、c-Jun 和 c-Fos 对 *ezrin* 基因的转录激活作用, 以及检测这种激活作用是否通过 Sp1 位点 (-75/-69) 和 AP-1 位点 (-64/-58), 将报告基因表达载体 pGLB-hE(-87/+134)、pGLB-hE(-87/+134)Sm 或 pGLB-hE(-87/+134)Am 与内参照质粒 pRL-TK 和转录因子表达载体 CMV-Sp1、pcDNA3-c-Jun 或 pcDNA3-c-Fos 共转染 A549 细胞, 利用双荧光素酶报告基因检测系统分析过表达转录因子 Sp1、c-Jun 或 c-Fos 对 *ezrin* 基因基本启动子活性的影响, 以及在转录因子之间是否存在协同调控转录的作用。前期实验结果显示, 转染空载体 pCMV 或 pcDNA3 对报告基因表达的影响没有明显差异 ($P > 0.05$), 本研究选择以 pcDNA3 为转录因子表达载体对照质粒。

A549 细胞的报告基因检测结果见图 6。从图 6 中可见, 对于同时含有 Sp1 和 AP-1 位点的报告基

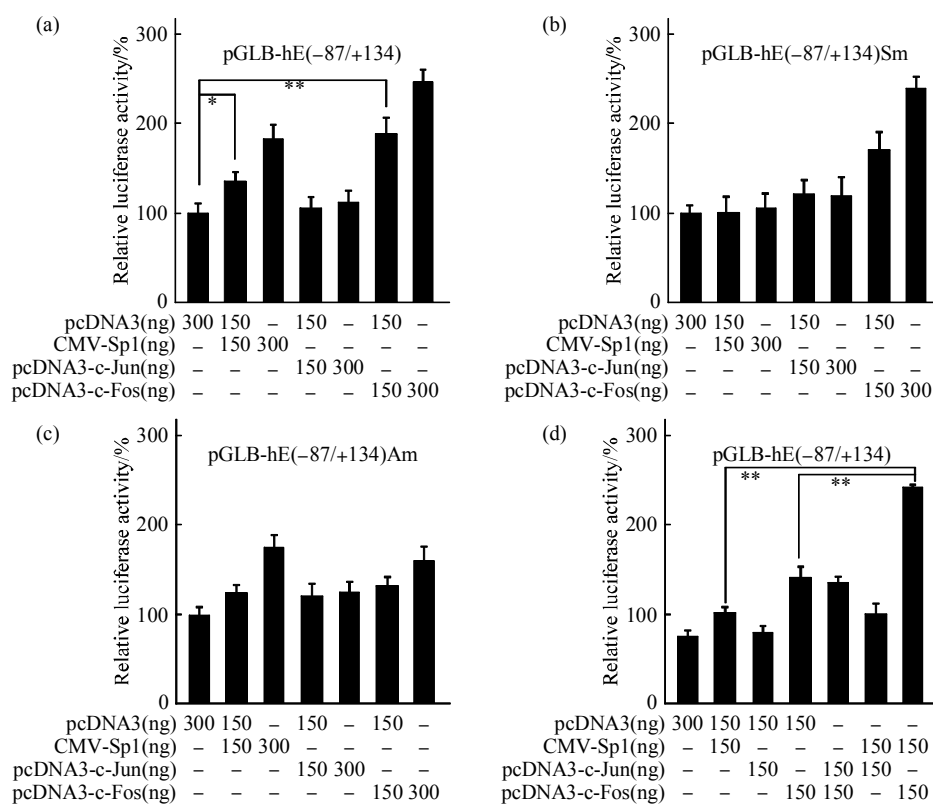


Fig. 6 Effect of transient expression of Sp1, c-Jun, or c-Fos on the human *ezrin* basal transcriptional activity in A549 cells Constructs pGLB-hE(-87/+134) (a, d), pGLB-hE(-87/+134)Sm (b), or pGLB-hE(-87/+134)Am (c) were cotransfected into A549 cells with pRL-TK and the indicated amounts of pcDNA3, CMV-Sp1, pcDNA3-c-Jun or pcDNA3-c-Fos. Luciferase activity was normalized to *Renilla* luciferase activity and then shown relative to that of pGLB-hE(-87/+134) (a, d), pGLB-hE(-87/+134)Sm (b), or pGLB-hE(-87/+134)Am (c) in response to pcDNA3, which was given the value 100%. Each value was plotted as $\bar{x} \pm s$. The data are representative of at least 3 independent experiments. Transfections were carried out in triplicate for each experiment. The asterisks (*) indicate that transient expression of Sp1, c-Jun, and/or c-Fos significantly increased human *ezrin* basal promoter-directed luciferase expression in A549 cells, where * and ** indicate $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

因表达质粒, 瞬时表达 Sp1 或 c-Fos 均能增强 *ezrin* 基因基本启动子活性 ($P < 0.01$, 图 6a), 对于含有 Sp1 位点突变的报告基因表达质粒, 瞬时表达 Sp1 对 *ezrin* 基因启动子活性无增强作用 (图 6b), 对于含有 AP-1 位点突变的报告基因表达质粒, 瞬时表达 c-Fos 对启动子活性增强作用低于含有 AP-1 位点的质粒 (图 6c), 而无论报告基因表达质粒的 AP-1 位点是否突变, 瞬时表达 c-Jun 对于启动子的增强作用均不明显 (图 6a, 6b, 6c). 这些实验结果说明, 转录因子 Sp1 是通过 Sp1 位点调控 *ezrin* 基因基本转录活性, c-Jun 对 *ezrin* 基因基本启动子无明显的转录激活作用, c-Fos 对 *ezrin* 基因的激活作用具有 AP-1 位点依赖性.

为了进一步确定转录因子之间是否存在协同调控 *ezrin* 基因转录的作用, 组合两种因子 c-Jun/c-Fos、c-Jun/Sp1 或 c-Fos/Sp1 分别同时瞬时表达, 结果显示 (图 6d), 同时表达 c-Jun/c-Fos 与单独表达 c-Fos 对荧光素酶活性的增强作用差异不显著 ($P > 0.05$), 同时表达 c-Jun/Sp1 与单独表达 Sp1 对荧光素酶活性的增强作用差异不显著 ($P > 0.05$), 与转染 pcDNA3 的对照相比, 单独表达 c-Fos 使荧光素酶活性提高约 87%, 单独表达 Sp1 使荧光素酶活性提高约 35%, 而同时表达 c-Fos/Sp1 使荧光素酶活性提高 220%. 这说明, c-Jun 与 c-Fos 之间、c-Jun 与 Sp1 之间无协同调控 *ezrin* 基因基本转录活性的作用, 而 c-Fos 和 Sp1 具有协同调控 *ezrin* 基因基本转录活性的作用.

2.7 过表达转录因子 Sp1、c-Jun 或 c-Fos 上调 Ezrin 蛋白表达

为了探究转录因子 Sp1、c-Jun 和 c-Fos 对 A549 细胞 Ezrin 蛋白表达的影响, 将转录因子表达载体 CMV-Sp1、pcDNA3-c-Jun、pcDNA3-c-Fos 以及对照质粒 pcDNA3 分别瞬时转染 A549 细胞, 提取细胞总蛋白, Western blot 检测 A549 细胞内 Sp1、c-Jun、c-Fos 和 Ezrin 蛋白表达水平的变化. 检测结果见图 7. 从图 7 中可见, 与转染 pcDNA3 的对照 (图 7-1) 比较, 转染 CMV-Sp1 (图 7-2)、pcDNA3-c-Jun (图 7-3) 或 pcDNA3-c-Fos (图 7-4) 分别引起 A549 细胞内转录因子 Sp1、c-Jun 或 c-Fos 的表达量增加, 而且, 这三种转录因子表达载体的转染均使 Ezrin 蛋白的表达量上调. 这说明, 在 A549 细胞内转录因子 Sp1、c-Jun 和 c-Fos 对 Ezrin 蛋白的表达起调控作用.

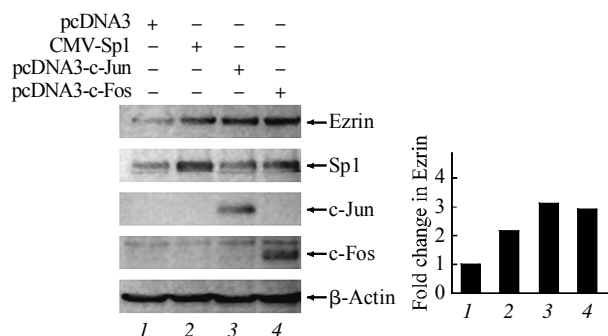


Fig. 7 Transient expression of Sp1, c-Jun or c-Fos up-regulates Ezrin expression in A549 cells

A549 cells were transfected with the transcription factor expression vectors pcDNA3, CMV-Sp1, pcDNA3-c-Jun or pcDNA3-c-Fos. Total protein from A549 cells was collected and analyzed by Western blotting using 20 μ g protein per lane. β -Actin is shown as a loading control. Fold change in Ezrin indicates the ratio of optical density of Ezrin to β -actin.

3 讨 论

Ezrin 在多种肿瘤细胞中异常表达, 而且 Ezrin 的表达上调与肿瘤细胞的移动侵袭相关^[5~8]. 我们以往的研究结果提示, 5'侧翼区序列对 *ezrin* 基因在癌细胞中的高表达起重要作用^[10]. 转录因子结合位点预测结果也显示, *ezrin* 基因 5'侧翼区序列含有众多的 Sp1 结合位点, 此外, 还有 NF- μ E1、AP-1 等转录因子结合位点. 研究发现, 转录因子 Sp1 的表达与肿瘤的发生、发展和转移密切相关^[12], AP-1 参与细胞的增殖、分化和肿瘤细胞的转移侵袭等过程^[13]. Sp1 和 AP-1 是调控肿瘤转移侵袭相关基因表达的重要转录因子.

本研究中, 我们利用人肺癌细胞株 A549 来探测调控 *ezrin* 基因基本转录活性的 DNA 序列元件及转录因子, 结果发现, 两个关键顺式作用元件, 一个经典的 Sp1 结合位点 (-75/-69) 和一个经典的 AP-1 结合位点 (-64/-58), 对于表现 *ezrin* 基因基本转录活性是必需的 (图 2), 转录因子 Sp1 和 AP-1 分别通过 Sp1 结合位点和 AP-1 结合位点调控 *ezrin* 基因基本转录活性 (图 6).

AP-1 是由 Jun(c-Jun, JunD 和 Jun) 和 Fos(c-Fos, FosB, Fra-1 和 Fra-2) 家族成员组成的二聚体, 通过亮氨酸拉链结构域的碱性区域与 DNA 序列结合, 识别经典序列 5' TGAGTCA 3' 或相似序列^[14, 15]. Jun 家族成员能够形成同源和异源二聚体, Fos 家族成员相互间不能二聚化作用, 但可以与任一 Jun 家族成员结合, 这种结合比 Jun 家族成员自身二聚

化更能激活转录^[16]。在许多类型的细胞中 AP-1 以 Jun/Fos 异源二聚体的形式起作用, 有时也存在 Jun/Jun 同源二聚体的形式。AP-1 二聚体中, 与 AP-1 位点直接结合的因子是 Jun, Fos 不能直接与 DNA 序列结合, 需要通过 Jun 形成异源二聚体的方式间接结合 DNA 序列, 增强转录激活作用。本研究中, 瞬时表达 c-Jun, 不表现依赖 AP-1 位点的转录激活作用, 这与 AP-1 位点突变降低荧光素酶活性的结果不一致, 可以推断通过 AP-1 位点介导转录激活作用的不是由 c-Jun 组成的同源二聚体。然而, 瞬时表达 c-Fos 对于含有 AP-1 位点的启动子的增强作用大于不含 AP-1 位点的启动子。提示, 在肺癌细胞中, c-Jun 和 c-Fos 组成异源二聚体作用于 AP-1 位点, 共同调控 *ezrin* 基因基本转录活性, c-Fos 在转录激活过程起主要作用。Sp1 为含锌指结构、序列特异性 DNA 结合蛋白, 它结合被称为 GC box 的序列 5' GGGCGG 3', 在任一方向表现功能^[17]。Sp1 还与其他转录因子形成联合体调控基因表达, 这些转录因子有 NF- κ B^[18]、C/EBP^[19]和 AP-1^[20]等, 我们的研究结果也显示 Sp1 和 c-Fos 协同调控 *ezrin* 基因基本转录活性。

本研究中, 转录因子 Sp1、c-Jun 和 c-Fos 的表达上调均对 A549 细胞 Ezrin 蛋白的表达起增强作用, 而报告基因检测结果却显示, c-Jun 对 *ezrin* 基因基本启动子无明显的转录激活作用。实际上, *ezrin* 基因基本启动子区上游的序列对 A549 细胞 *ezrin* 的转录调控同样起重要作用 (图 1), 细胞中 Ezrin 蛋白的表达是多因素综合调控的结果, c-Jun 有可能直接或通过调控其他转录因子的表达而间接作用于 *ezrin* 基因基本启动子区以外的序列, 从而调控 Ezrin 蛋白的表达。

综上所述, 本文鉴定了肺癌细胞 A549 中调控 *ezrin* 基因基本转录活性的关键顺式作用元件和转录因子, 这将有助于进一步揭示肺癌等肿瘤细胞中 *ezrin* 基因的转录调控机制。

参 考 文 献

- Algrain M, Turunen O, Vaheri A, *et al.* Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeletal linker. *J Cell Biol*, 1993, **120**(1): 129~139
- Hiscox S, Jiang W G. Ezrin regulates cell-cell and cell-matrix adhesion, a possible role with E-cadherin/beta-catenin. *J Cell Sci*, 1999, **112**(18): 3081~3090
- Crepaldi T, Gautreau A, Comoglio P M, *et al.* Ezrin is an effector of hepatocyte growth factor-mediated migration and morphogenesis in epithelial cells. *J Cell Biol*, 1997, **138**(2): 423~434
- Louvet-Vallee S. ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling. *Biol Cell*, 2000, **92**(5): 305~316
- Deng X, Tannehill-Gregg S H, Nadella M V, *et al.* Parathyroid hormone-related protein and *ezrin* are up-regulated in human lung cancer bone metastases. *Clin Exp Metastasis*, 2007, **24**(2): 107~119
- Akisawa N, Nishimori I, Iwamura T, *et al.* High levels of Ezrin expressed by human pancreatic adenocarcinoma cell lines with high metastatic potential. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **258**(2): 395~400
- Ohtani K, Sakamoto H, Rutherford T, *et al.* Ezrin, a membrane-cytoskeletal linking protein, is highly expressed in atypical endometrial hyperplasia and uterine endometrioid adenocarcinoma. *Cancer Lett*, 2002, **179**(1): 79~86
- Shen Z Y, Xu L Y, Chen M H, *et al.* Upregulated expression of ezrin and invasive phenotype in malignantly transformed esophageal epithelial cells. *World J Gastroenterol*, 2003, **9**(6): 1182~1186
- Kobel M, Langhammer T, Huttelmaier S, *et al.* Ezrin expression is related to poor prognosis in FIGO stage I endometrioid carcinomas. *Mod Pathol*, 2006, **19**(4): 581~587
- 高书颖, 许丽艳, 孟令英, 等. *ezrin* 基因在几种癌细胞中的表达及其 5'侧翼区序列转录活性的鉴定. 肿瘤防治研究, 2008, **35**(1): 1~4
- Gao S Y, Xu L Y, Meng L Y, *et al.* *Cancer Research on Prevention and Treatment*, 2008, **35**(1): 1~4
- F. M. 奥斯伯, R. E. 金斯顿, J. G. 塞德曼等主编. 马学军, 舒跃龙, 颜子颖等译. 精编分子生物学实验指南, 第四版. 北京: 科学出版社, 2005. 503~506
- Ausubel F M, Kingston R E, Seidman J G, *et al.* Translated by Ma X J, Shu Y L, Yan Z Y, *et al.* *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th. Beijing: Science Press, 2005. 503~506
- Jungert K, Buck A, Wichert G, *et al.* Sp1 is required for transforming growth factor- β -induced mesenchymal transition and migration in pancreatic cancer cells. *Cancer Res*, 2007, **67**(4): 1563~1570
- Ozanne B W, Spence H J, McGarry L C, *et al.* Transcription factors control invasion: AP-1 the first among equals. *Oncogene*, 2007, **26**(1): 1~10
- Ball A R, Bos T J, Loliger C, *et al.* Jun: oncogene and transcriptional regulator. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1988, **53**(Pt 2): 687~693
- Matsui M, Tokuhara M, Konuma Y, *et al.* Isolation of human fos-related genes and their expression during monocyte-macrophage differentiation. *Oncogene*, 1990, **5**(3): 249~255
- Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*, 1991, **1072**(2~3): 129~157
- Kadonaga J T, Jones K A, Tjian R. Promoter-specific activation of RNA polymerase II transcription by SP1. *Trends Biochem Sci*, 1986, **11**(1): 20~23
- Perkins N D, Edwards N L, Duckett C S, *et al.* A cooperative interaction between NF- κ B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. *EMBO J*, 1993, **12**(9): 3551~3558
- Lee Y H, Yano M, Liu S Y, *et al.* A novel cis-acting element

controlling the rat CYP2D5 gene and requiring cooperativity between C/EBP beta and an Sp1 factor. Mol Cell Biol, 1994, **14**(2): 1383~1394

20 Jang S I, Steinert P M. Loricrin expression in cultured human

keratinocytes is controlled by a complex interplay between transcription factors of the Sp1, CREB, AP1, and AP2 families. J Biol Chem, 2002, **277**(44): 42268~42279

Identification of Elements and Transcription Factors for *ezrin* Basal Transcriptional Activity in Lung Cancer Cells*

GAO Shu-Ying^{1,2)}, LI En-Min^{2)**}, MENG Ling-Ying¹⁾, CUI Lei²⁾, YUAN Hua-Min²⁾, DU Ze-Peng²⁾, XU Li-Yan^{1)**}

¹⁾ Institute of Oncologic Pathology, Medical College of Shantou University, Shantou 515041, China;

²⁾ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical College of Shantou University, Shantou 515041, China)

Abstract It has been found that Ezrin is aberrantly expressed in some carcinomas and there is a relationship between the high level of Ezrin expression and metastatic potential of carcinomas. However, the molecular mechanisms underlying the regulation of the human *ezrin* gene transcription are not well understood. Transcriptional regulation regions of the human *ezrin* gene were examined by linking 5'-deletion mutants and site-directed mutagenesis of the 5'-flanking region to a luciferase reporter gene, and the basal promoter region and key DNA sequence elements (an Sp1 binding site, -75/-69; and an AP-1 binding site, -64/-58) involved in the expression of the human *ezrin* gene in lung cancer A549 cells were explored. Furthermore, electrophoretic mobility shift assay (EMSA) showed that DIG-ddUTP labeled DNA sequences containing *ezrin* key elements could bind nuclear extracts from lung cancer cells to form DNA-protein complex, and the bindings to Sp1 and AP-1 sites by rhSp1 and rhAP-1, respectively, were specific. Finally, the analysis of transient transfection of A549 cells by transcription factor expression vectors indicated that Sp1 and AP-1 (c-Jun/c-Fos heterodimer) could increase the human *ezrin* basal transcriptional activity significantly through the Sp1 and AP-1 binding sites, respectively. In addition, over-expression of Sp1, c-Jun or c-Fos could up-regulate Ezrin expression. The data suggested that the Sp1 and AP-1 binding sites were two key elements regulating *ezrin* gene basal transcriptional activity in lung cancer cells, and the corresponding transcription factors Sp1 and AP-1 were crucial for the transactivation.

Key words *ezrin* gene, transcriptional regulatory element, transcription factor, dual-luciferase reporter assay system, electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00477

*This work was supported by grants from Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA02A403), The National Natural Science Foundation of China (30370641, 30570849, 30672376), Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (20050560002, 20050560003), Guangdong Scientific Fund (37788, 5104541, 7118419, 7301043) and China Postdoctoral Science Foundation Funded Project (20070410846).

**Corresponding author. Tel: 86-754-8900847

XU Li-Yan. E-mail: liyanxu1130@yahoo.com.cn

LI En-Min. E-mail: nmli@stu.edu.cn

Received: July 4, 2008 Accepted: September 22, 2008