

研究报告

PSA 基因启动子中一个与雄激素调节相关的序列

张建业 庞维秋 王 鑫 张莲英

(山东医科大学生物化学教研室, 济南 250012)

茹炳根

(北京大学生命科学院, 北京 100871)

摘要 人前列腺特异抗原 (PSA) 基因的表达受雄激素的调节, 其雄激素应答元件 (ARE) 位于 - 170 附近. 为了确定雄激素对该基因的诱导作用是否受 ARE 上游序列的影响, 把 PSA 启动子区的不同长度的天然的和变异的 DNA 片段分别与报告基因 CAT 相连, 构建了不同的 pBLCAT3-PSA 质粒. 用它们转染人前列腺肿瘤细胞 PC-3. 结果表明 15 bp 的 RF15 序列 (- 340 ~ - 326) 的缺失和变异可显著降低雄激素的诱导作用. 区带转移测定表明人前列腺肿瘤细胞 LNCap 和 PC-3 中的某些核内调节蛋白可与 RF15 结合, 而且其结合能力受 Zn^{2+} 的影响. 这些结果表明 RF15 可能是 PSA 启动子中的一个新的附属调节元件. 与之结合的调节蛋白可能是通过与雄激素受体的相互作用促进雄激素对 PSA 基因的诱导作用.

关键词 前列腺特异抗原, 雄激素, 启动子, 前列腺癌

前列腺特异抗原 (PSA) 是人前列腺组织中的一种特异蛋白, 属于丝氨酸蛋白水解酶类, 具有糜蛋白酶活性, 可水解精液中高分子蛋白和促进精液的液化, 对男性生育有促进作用. 最近发现 PSA 与前列腺癌的发生、发展和转移有密切关系, 而且血清 PSA 浓度已成为目前前列腺癌临床诊断和治疗监测的一个敏感指标^[1]. PSA 的 cDNA 于 1985 年被克隆和测序. 其基因位于染色体 19q^{13.2}, 由五个外显子和四个内含子构成. PSA 启动子含有一个功能性 TATA 盒 (- 28 ~ - 23)、一个 GC 盒 (- 54 ~ - 45) 和一个雄激素应答元件 (ARE) AGAACAgaAGTGCTC (- 170 ~ - 156). 启动子有两个转录起始点 (+ 1 和 + 7). 可译框架 (ORF) 从 + 44 开始^[2]. PSA 基因特异地在前列腺上皮细胞表达^[3], 而且受雄激素的调节^[4,5]. 我们在研究雄激素在转录水平上对 PSA 基因的调节时, 发现 ARE 上游 (- 340 ~ - 326) 15 bp 的 RF15 序

列可促进雄激素对该基因的诱导作用. 本文对 RF15 序列做进一步研究.

1 材料和方法

1.1 质粒的构建

用 PCR 扩增 PSA 基因 5' 侧启动子中不同长度的 DNA 片段, 片段经电泳纯化和限制性酶消化后, 连接到 pBLCAT3 质粒的氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 基因上, 构建成不同的 pBLCAT3-PSA 质粒. 质粒经转化和纯化后, 用双链 DNA 双脱氧核苷酸链式终止法测定其序列.

1.2 转染实验

用加 5% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养人前列腺肿瘤细胞 PC-3. 用无血清培养基洗涤生长好的细胞后, 用 pBLCAT3-PSA 和 pBLCAT3 质粒进行转染实验, pBLCAT3 作为

对照. 对每个 60 mm 培养皿, 使用 4 μ g 质粒 DNA, 0.2 μ g 雄激素受体表达质粒 DNA 和 12 μ l Lipofactamine. 37 $^{\circ}$ C 培养 20 h 后弃去旧培养基, 加入新鲜的 RPMI 1640 和 1% 经活性碳吸附的 FBS. 然后加入或不加入 3.2 nmol/L 人工合成的雄激素 Mibolerone. 培养 30 h 后收集细胞, 经冻溶后制备细胞浆蛋白, 用于蛋白质含量和 CAT 活性的测定. 每个转染实验至少进行三次, 然后实验结果经统计学分析后作图.

1.3 氯霉素乙酰转移酶活性的测定

以³H 标记的乙酰辅酶 A 为底物, 采用 Sambrook^[6]发表的方法.

1.4 细胞核蛋白的制备

人前列腺肿瘤细胞 LNCap 和 PC-3 分别用加入 5% PBS 的 RPMI 1640 培养基培养. 收集生长好的细胞, 采用 Guerin 等^[7]的方法制备细胞核蛋白.

1.5 区带转移测定

DNA 片段用 Klenow 酶标记. 结合反应在 25 μ l 结合缓冲液 (20 mmol/L HEPES pH 7.9, 12% 甘油, 100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L EDTA 和 4 mmol/L DTT) 中进行. 首先加入 1 μ g poly (dI•dc) 和 5~8 μ g 核蛋白. 放置室温 10 min 后加入 20~30 fmol/L ³²P 标记的 RF15 DNA 片段. 继续放置室温 10 min 后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳. 凝胶浓度为 6%, 电泳缓冲液为 12.5 mmol/L Tris, 85 mmol/L 甘氨酸 pH 8.0. 电泳 (12.5 V/cm) 60 min. 凝胶干燥后用于放射自显影. 进行竞争性结合实验时, 未标记的 DNA 片段如 mRF15-1、mRF15-2、mRF15-3, 或 AP-1、AP-2 和 SP-1 等效元件的 DNA 片段与 poly (dI•dc) 同时加入, 它们的浓度为³²P 标记的 RF15 的 100 倍. 研究 Zn²⁺ 对 RF15 与调节蛋白结合作用的影响时, ZnSO₄ 直接加入结合缓冲液. ³²P 标记的 RF15 DNA 片段与调节蛋白结合区带的强度可用 Phosphorimagine 扫描定量.

2 结 果

2.1 质粒的构建和转染实验

为了研究雄激素在转录水平对 PSA 基因表达的调节, 克隆了 PSA 基因 5' 侧 640 bp 片段. 为了确定 PSA 启动子中与雄激素调节相关的序列, 用 PCR 扩增了 PSA 基因 5' 侧启动子区的不同长度的 DNA 片段, 分别把它们与 pBLCAT3 质粒中的 CAT 基因相连, 构成了不同的 pBLCAT3-PSA 质粒 (图 1), 分别命名为 p640、p488、p406 和 p320. 质粒中的 CAT 基因是无启动子的报告基因, 其表达受上游 PSA 启动子 DNA 序列的调节. 转染细胞中的 CAT 活性直接反映 PSA 启动子 DNA 的作用强度.

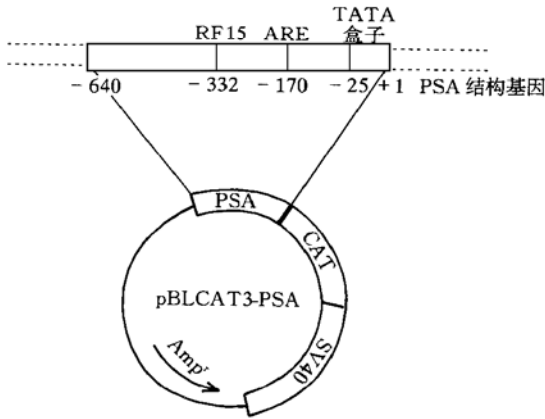


图 1 pBLCAT3-PSA 质粒的结构

用以上 pBLCAT3-PSA 质粒转染人前列腺肿瘤细胞 PC-3 (图 2a), 发现所有含有雄激素应答元件的 PSA DNA 片段在雄激素存在下都可使 CAT 活性显著升高, 而且 p640、p488 和 p406 的 CAT 活性无明显差别. 但是与它们相比, p320 的 CAT 活性显著降低. 表明 ARE 上游 -406~-320 之间的某些序列可能对雄激素的诱导起促进作用. 进一步制备了 PSA 基因 5' 侧的不同长度的 DNA 片段, 它们对 -406~-320 之间的序列有不同程度的缺失, 把它们与 CAT 基因相连构成多种 pBLCAT3-PSA 质粒. 通过进一步的对比转染实验, 发

现 15 bp 的 RF15 序列 (− 340~ − 326) 可促进雄激素的诱导作用. 为进一步确定 RF15 的

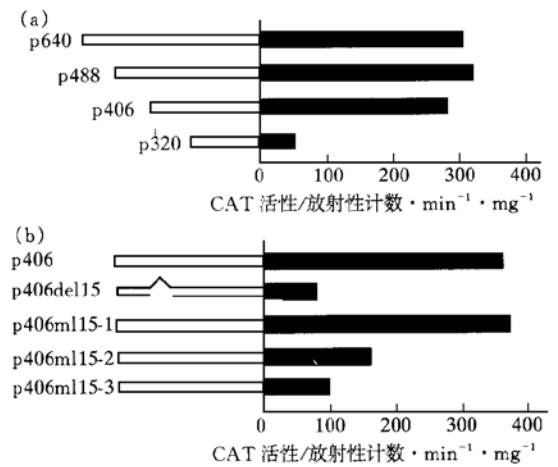


图 2 质粒转染实验的结果

(a) p640, p488, p406和p320的转染实验, 它们三次的实验结果的 s 分别为17.1、48.3、36.6和12.2; (b) p406及其相关变异质粒 p406del15, p406m15-1, p406m15-2和p406m15-3的转染实验, 它们三次实验的 s 值分别为21.9、16.6、20.4、28.3和21.2.

作用, 制备了 PSA 基因 5' 侧的另外四种变异片段: 406delRF15、406mRF15-1、406mRF-2和 406mRF-3. 406delRF15 缺失 RF15 序列, 其他三种片段的 RF15 序列中 1~ 3 对碱基发生置换 (图 3a). 分别把它们与 CAT 基因相连构成的 pBLCAT3-PSA 质粒为 p406del15、p406m15-1、p406m15-2 和 p406m15-3. 用它们和 p406 进行对比转染实验 (图 2b). 发现 RF15 序列中一对碱基的置换 (p406m15-1) 对 CAT 活性无明显影响, 但是两对或三对碱基置换和 RF15 的缺失 (p406m15-2、p406m15-3 和 p406del15) 使 CAT 活性明显降低.

2.2 区带转移测定

进一步合成了正常的 (RF15) 和三种变异片段 (mRF15-1、mRF15-2 和 mRF15-3) (图 3a). 用³²P 标记的 RF15 片段与人前列腺肿瘤细胞 LNCap 或 PC-3 的核蛋白进行体外结

合实验 (区带转移测定) (图 3a). 发现这些细胞中的某些核内调节蛋白可与 RF15 结合. 用 100 倍浓度的未标记的三种变异片段与 RF15 进行竞争结合实验, 发现 RF15 序列中两对 (mRF15-2) 或三对 (mRF15-3) 碱基置换使它与调节蛋白的结合能力部分或全部丧失, 这与转染实验结果基本一致. 为了确定该调节蛋白是否与其他已知的调节元件结合, 用已知的 ARE 和 SP-1、AP-1 和 AP-2 等的调节元件进行了竞争结合实验 (图 3b). 发现它们都不能 RF15 竞争. 但是 RF15 序列是否是 PSA 基因启动子中一个新的调节元件尚需进一步研究.

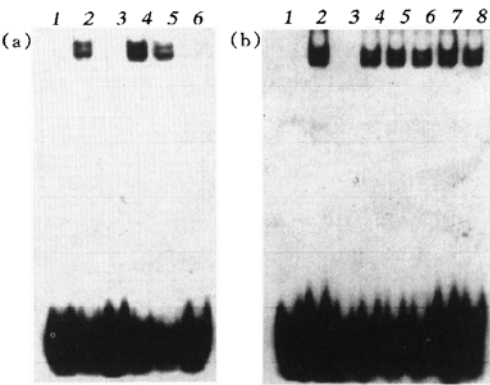


图 3 区带转移测定

(a) RF15 及其变异序列的区带转移测定. 1: RF15 标记探针, 2: a+ 核蛋白抽提物, 3: a+ b+ 未标记 RF15, 4: a+ b+ mRF15-3, 5: a+ b+ mRF15-2, 6: a+ b+ mRF15-1. (b) RF15 和已知调节元件的区带转移测定. 1: RF15 标记探针, 2: a+ 核蛋白抽提物, 3: a+ b+ 未标记 RF15, 4: a+ b+ ARE, 5: a+ b+ SP-1 效应元件, 6: a+ b+ AP-1 效应元件, 7: a+ b+ AP-2 效应元件, 8: a+ b+ 随机寡核苷酸.

− 340 − 326

RF15: TCTTGGAGTGCAAAG

mRF15-1: -----T-----

mRF15-2: -----C--T-----

mRF15-3: -----C--T-C----

由于 RF15 的碱基顺序与金属硫蛋白基因启动子中的金属应答元件 (MRE) 十分相似^[8], 研究了 Zn²⁺ 对 RF15 与调节蛋白结合

作用的影响 (图 4). 结果表明 Zn^{2+} 浓度为 $10^{-8} \sim 10^{-7} \text{ mmol/L}$ 时, RF15 对调节蛋白的结合能力最强, 然后随着 Zn^{2+} 浓度的升高而降低, 当 Zn^{2+} 浓度超过 10^{-4} mmol/L 后, RF15 不再与该调节蛋白结合.

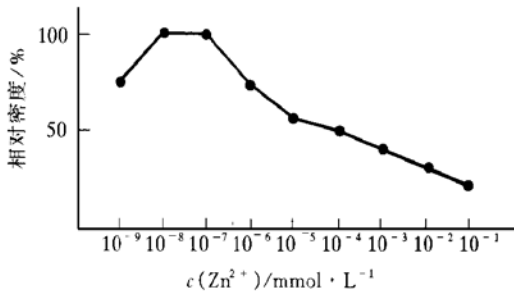


图 4 Zn^{2+} 对 RF15 与调节蛋白结合的影响

3 讨 论

PSA 基因的表达受雄激素的调节. 雄激素对 PSA 基因的调节是通过促进基因的转录. 对 PSA 基因启动子 DNA 序列的分析, 发现在转录起始点的上游 170 bp 附近有一个雄激素应答元件 (ARE)^[9]. 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、受体的磷酸化和二聚体的形成. 最后二聚体与 PSA 启动子中的 ARE 结合, 促进前起始复合物的形成和诱导 PSA 基因的转录^[10]. 雄激素对 PSA 基因的诱导作用, 除了 ARE 的直接参与外, 还可能受 ARE 上游序列的影响. Riegman 等在研究确定 PSA 的 ARE 时, 发现 ARE 上游序列 (-519~ -320) 对雄激素的诱导作用是必需的, 但他们未做进一步的研究. 人激肽释放酶是前列腺组织中的另外一种特异蛋白, 其基因结构, DNA 和蛋白质序列和 PSA 十分相似. 而且其基因 (hKLK-2) 的表达亦受雄激素调节. Murtha 等^[11] 研究确定了 hKLK-2 的雄激素应答元件位于 -160 附近, 同时发现 ARE 上游某些序列的缺失可大大降低雄激素对 hKLK-2 的诱导作用. 本项研究发现 PSA 启动子中 ARE 上游 (-340~

-326) RF15 序列 TCTTGGAGTGCAAAG 的缺失和变异可显著降低雄激素对 PSA 基因的诱导作用. 而且 RF15 可与人前列腺肿瘤细胞的某些核内调节蛋白结合. 表明 RF15 是 PSA 基因启动子中一段与雄激素调节相关的调节序列. 与之结合的调节蛋白质可能通过与结合于 ARE 的雄激素受体的相互作用, 促进雄激素的诱导作用, 共同介导雄激素对 PSA 基因的调节作用.

另外研究发现 RF15 与调节蛋白的结合作用受 Zn^{2+} 的影响, 前列腺是 Zn^{2+} 含量最高的组织之一, Zn^{2+} 与前列腺上皮细胞中柠檬酸、金属硫蛋白和维生素 A 的代谢以及雄激素、雄激素受体和某些生长因子的含量有着密切关系^[12]. 而且伴随前列腺肿瘤的发生前列腺上皮细胞中 Zn^{2+} 的含量明显下降^[13]. Zn^{2+} 是否对 PSA 基因有调节作用以及它与雄激素的诱导作用有什么关系, 尚待进一步的研究.

参 考 文 献

- 1 Wang M L, Stich S R. A new potential marker for prostatic cancer. *Prostate*, 1991, **3**: 89~ 96
- 2 Riegman P H J, Vlietstra R J, Suurmeier L. Characterization of the human Kallikrein Locus. *Genomics*, 1992, **14**: 6 ~ 11
- 3 Qui S, Young C Y F, Bilhartz D L. *in situ* hybridization of prostate-specific antigen mRNA in human prostate. *J Urol*, 1990, **144**: 1550~ 1556
- 4 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
- 5 Dieter A W, Peter S, Friedrich F. Transcriptional regulation of prostate Kallikrein-like genes by androgen. *Mol Endo*, 1992, **6** (5): 753~ 762
- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*. 2nd. New York: Cold Spring Laboratory Press, 1989. 3. 16
- 7 Guerin S L, Reed M J. Identification of a DNA binding site for the transcription factor G12 in the promoter region of the P12 gene and repression of its positive activity by upstream negative regulatory elements. *J Biol Chem*, 1990, **265**: 22035~ 22043
- 8 Stuart G W, Gleave M. Identification of multiple metal regulatory elements by assaying synthetic sequences. *Nature*, 1985, **317**: 837~ 842
- 9 Riegman P H J, Henttu P, Vihko P. The promote of the prostate specific antigen contains a functional androgen

responsive element. Mol Endo, 1991, 6: 1942~ 1953

10 Ming-jer T, Bert W. Omeley, molecular mechanism of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. Annu Rev Biochem, 1994, 63: 451~ 486

11 Murtha P, Huang J K, Chang L S *et al.* Androgen induction of human prostate-specific Kallikrein, hKLK-2: characterization of an androgen responsive element in 5'-promoter region of the gene. Biochemistry, 1993, 32: 6459~ 6467

12 Costelic L C, Fraklin R B. Concepts of citrate production and secretion by prostate: 2 hormonal relationship in normal and neoplastic prostate. Prostate, 1991, 19: 181~ 202

13 Ogunlewe J P, Osegbe D N. Zinc and cadmium concentrations in indigenous blacks with normal, hypertrophic, and malignant prostate. Cancer, 1989, 63: 1388~ 1395

A Sequence in the PSA Gene Promoter Which Involved in Androgen Regulation of the Gene.
ZHANG Jianye, PANG Weiqiu, WANG Xin, ZHANG Lianying (*Department of Biochemistry, Shandong Medical University, Jinan 250012, China*); RU Binggen (*Institute of Life Science, Peking University, Beijing 100871, China*).

Abstract Human prostate-specific antigen (PSA) gene has been shown to be regulated by androgen, and its androgen response element (ARE) has been located at about - 170. To

determine whether the androgen induction of the gene was affected by upstream sequence of ARE, different natural and mutated DNA fragments of PSA promoter were linked to the CAT reporter gene respectively, and different pBLCAT3-PSA plasmids were constructed and used for transfection in human prostatic cancer cell line PC-3. The results indicated that a 15 bp segment of RF15 (- 340~ - 326) could cooperate with ARE in maximal androgen induction significantly. The bandshift assay showed that some nucleic regulatory protein from human prostatic cancer cell line LNCap and PC-3 could bind to RF15 DNA fragment. And the protein ability to bind to RF15 was influenced by Zn²⁺. The results suggested that the RF15 may be a new regulatory sequence in the PSA promoter region. The regulatory protein, which binds to the RF15 sequence, may enhance the androgen induction *via* interaction with androgen receptor.

Key words prostate-specific antigen, androgen, promoter, prostatic cancer

人绒毛膜癌细胞 Jar 卵泡抑素基因表达的调控*

杨 明 张志文

(北京医科大学生理学系, 北京 100083)

侯伟敏

(北京医科大学生物化学及分子生物学系, 北京 100083)

摘要 用逆转录-多聚酶链聚合反应 (RT-PCR) 方法证实, 表皮生长因子 (EGF) 可刺激人绒癌细胞株 Jar 卵泡抑素 mRNA 的表达, 并呈剂量依赖效应, 最大效应剂量为 1.0 nmol/L, 半数有效剂量为 0.3 nmol/L. GM-CSF 虽然单独对人绒癌细胞株 Jar 卵泡抑素 mRNA 表达无任何影响, 但却能显著抑制 EGF 刺激后的人绒癌细胞株 Jar 卵泡抑素 mRNA 的表达, 并有剂量依赖关系, 最大效应剂量为 10 nmol/L, 抑制率达 62.3%, 半数有效剂量为 3.0 nmol/L. 提示胎盘组织卵泡抑素基因除受多种激素调控外, 还受一些生长因子内分泌和旁分泌的调控.

关键词 卵泡抑素, 基因表达, 表皮生长因子, 颗粒细胞-吞噬细胞集落刺激因子

* 国家自然科学基金资助项目 (39470279).
收稿日期: 1996-05-20, 修回日期: 1996-09-23