

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

10 Ming-er 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 Costellic 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, 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

卵泡抑素 (follistatin) 是抑制素家族成员之一, 具有抑制素相似的抑制垂体卵泡刺激素 (FSH) 分泌的功能, 但效力较弱^[1], 它的另一功能是做为激活素 (activin) 的结合蛋白, 可阻断前者的作用^[2]. 目前已知, 许多组织细胞均有卵泡抑素的基因表达, 如胚胎、垂体、骨髓、肾脏、肝脏及胎盘等^[1], 其基因表达亦受到多种激素如促性腺激素释放激素、FSH、孕酮的调控^[3,4]. 表皮生长因子 (EGF) 是一种具有广泛生物学效应的单链多肽, 它可以内分泌、旁分泌和自分泌作用方式对多种激素的分泌进行调控, EGF 对胎盘内分泌功能也有影响, 近年研究发现不同妊娠期的胎盘组织均存在 EGF 及其受体^[5]. EGF 可促进绒毛膜细胞孕酮, hCG 以及胎盘滋养层细胞抑制素的分泌^[5,6]. 集落刺激因子是维持造血干细胞存活和增殖分化的主要生长因子, 其中粒细胞-吞噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 生物学活性最为广泛^[7]. 但对生殖系统的作用尚未见报道. 本文通过观察 EGF 及 GM-CSF 对人绒毛膜上皮癌细胞卵泡抑素 mRNA 水平的调控, 进一步阐明这三种生物活性蛋白在胎盘内分泌中的相互作用机理.

1 材料及方法

1.1 试剂

Taq DNA 聚合酶, AMV 反转录 Kit, dNTP (购自 Promega 公司), EGF (细胞培养级), 琼脂糖, 矿物油, 异硫氰酸胍 (购自 Sigma 公司), GM-CSF 为北京医科大学免疫系马大龙教授赠.

1.2 人绒毛膜上皮癌细胞株

人绒毛膜上皮癌细胞株 Jar (中科院动物研究所计划生育国家重点生殖实验室赠) 于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液 (青霉素及链霉素各 100 U/ml), 在 37℃ 培养箱, 95% 空气-5% CO₂ 混合气体条件下培养, 实验前用含 1% 胎牛血清的 DMEM 替换, 继续培养 24 h.

1.3 卵泡抑素及 β_2 微球蛋白的寡核苷酸引物

卵泡抑素 DNA 上、下游引物序列分别

为: a: 5'-TCCACAGTCCACGTTCTCACA-3'; b: 5'-CTGTACAAGACCGAACTGAGC-3'. 扩增序列为人卵泡抑素基因第2和第3外显子中 171 个碱基对. β_2 -微球蛋白 DNA 上、下游引物序列分别为: a: 5'-TC-CATTCTTCAGTAAGTCAACT-3'; b: 5'-CTCGCGCTACTCTCTCTCTTTCT-3'. 扩增序列为人 β_2 微球蛋白基因第 1 外显子中 162 个碱基对.

上述两对引物均由北京肿瘤研究所用 DNA 自动合成仪合成.

1.4 细胞总 RNA 提取及鉴定

细胞总 RNA 提取用异硫氰酸胍一步法^[9], 根据 RNA 样品在 260 nm 的 A 值计算 RNA 浓度, 以样品在 260 nm 和 280 nm 的 A 值的比值 (≥ 1.8) 和在 1% 变性琼脂糖凝胶电泳 28 S 和 18 S RNA 条带的比值 (≥ 2.0) 鉴定 RNA 的纯度及完整性.

1.5 反转录 RNA 量的确定

取从细胞中提取的总 RNA 6 μ g, 作 1:3 等量倍比稀释 4 次后分别用 AMV 反转录系统进行反转录, 总体积 20 μ l, 含 5 mmol/L MgCl₂, dNTP 1 mmol/L, 20 U RNA 酶抑制物, 15 U AMV 反转录酶, oligo (dT)₁₅ 引物 0.5 g 每克 RNA. 42℃ 水浴 30 min. 99℃ 变性 5 min. 从各反转录体系中取出 5 μ l 作 DNA 合成模板进行 PCR 反应, 结果用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析.

1.6 PCR 反应扩增周期数的确定

从 2 μ g 总 RNA 的 AMV 反转录体系中各取 5 μ l 作 DNA 模板进行 PCR 扩增. 一个反应体系中包括 dNTP 各 200 μ mol/L、2.0 mmol/L MgCl₂, 卵泡抑素上、下游引物各 50 pmol, 1×Taq 酶缓冲液, Taq DNA 聚合酶 3 U, 总体积 50 μ l, 94℃ 变性 1 min, 54℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 30 s, 分别作 15、20、25、30、35、40 个循环周期后, 72℃ 继续延伸 15 min, 结果用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析.

1.7 PCR 产物的确定

用 Sanger 双脱氧链终止法测序, 确定

PCR 产物, 方法见文献 [10].

1.8 结果表示及数据处理

样品琼脂糖凝胶电泳照片用 IBAS 2000 图像分析仪 (OPTON) 的图像分析系统进行灰度扫描, 分析测定面积的积分光密度值 (IA), 结果表示为样品卵泡抑素的 IA 值与作为质量内参定的 β_2 -微球蛋白的 IA 值的比值, 每组实验重复 3 次, 统计学处理采用 Duncan 检验.

2 结 果

2.1 RT-PCR 方法学鉴定

RT-PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶中为一条约 171 碱基对的片段, 未见明显非特异性条带, 使用 PCR 产物直接测序法测定扩增片段 DNA 序列与预期序列相同, 表明 PCR 产物具高度特异性, 从图 1 可见, 当模板 RNA 为

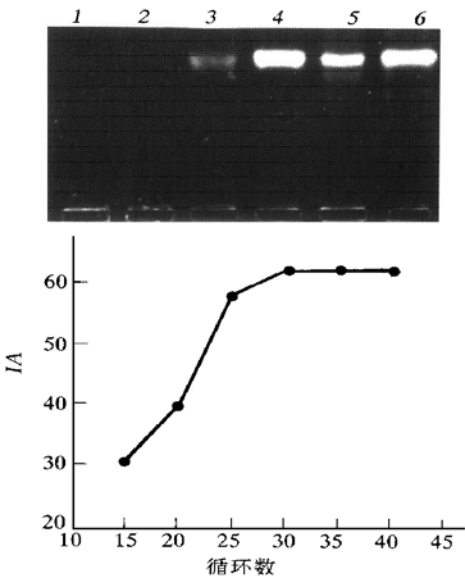


图 1 PCR 循环数对 PCR 产物量的影响
1: 15 循环; 2: 20 循环; 3: 25 循环;
4: 30 循环; 5: 35 循环; 6: 40 循环.

2 μ g 时, 20 循环后才有较明显带出现, 随着循环周期增加, PCR 产物亦增加, 在 30 循环后, 扩增片段的量不再随循环数增加而明显增多, 且有非特异性带出现, 表明已达 PCR 的饱和

期. 本实验选用 25 个循环正处于指数增长期. 此外, 随模板 RNA 量增加, PCR 产物在 0.07 ~ 6 μ g 范围内呈明显增加, 故选用 2 μ g RNA 为实验用量 (图 2).

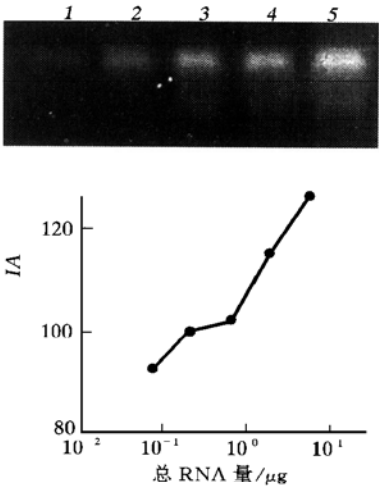


图 2 总 RNA 量对 PCR 产物量的影响
1: 0.07 μ g 总 RNA; 2: 0.222 μ g 总 RNA; 3: 0.666 μ g 总 RNA; 4: 2 μ g 总 RNA; 5: 6 μ g 总 RNA.

2.2 EGF 对卵泡抑素 mRNA 表达的影响

2.2.1 EGF 对卵泡抑素 mRNA 表达影响的剂量效应: 分别加入终浓度为 0、0.01、0.1、1.0、10、100 nmol/L EGF 于培养的人绒癌细胞株 Jar 中, 4 h 后收集细胞提取总 RNA, RT-PCR 结果显示, 随 EGF 剂量至 0.1 nmol/L 时, 即明显刺激细胞卵泡抑素 mRNA 表达, 其最大效应剂量为 1.0 nmol/L, 半效剂量为 0.3 nmol/L (图 3).

2.2.2 EGF 对卵泡抑素 mRNA 表达影响的时间效应: 用终浓度为 1.0 nmol/L EGF 刺激培养的人绒癌细胞株 Jar, 分别于刺激后 2、4、8、16 h 收集细胞, 提取总 RNA, RT-PCR 结果表明, EGF 刺激后 2 h 即出现卵泡抑素 mRNA 表达增加, 4 h 到达高峰, 后随时间推移而逐渐下降, 但仍显著高于对照组.

2.3 GM-CSF 对卵泡抑素 mRNA 表达的影响
用终浓度各为 0、0.01、0.1、1.0、10、

100 nmol/L GM-CSF 分别加入培养的人绒毛癌细胞 Jar, 4 h 收集细胞提取总 RNA, 其 RT-PCR 反应产物, 琼脂糖凝胶电泳区带经分析测定未有明显差别. 同样检测 10 nmol/L GM-CSF 与细胞共同培养不同时间 (2、4、8、16、24 h) 均未见其对卵泡抑素 mRNA 表达有显著影响.

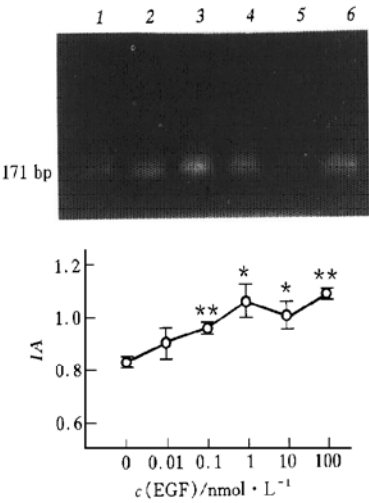


图3 EGF 对人绒毛膜上皮癌细胞系 Jar 卵泡抑素 mRNA 表达的影响 (剂量效应)
与对照组比* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$.
1: EGF 0 nmol/L; 2: EGF 0.01 nmol/L;
3: EGF 0.1 nmol/L; 4: EGF 1.0 nmol/L;
5: EGF 10 nmol/L; 6: EGF 100 nmol/L.

2.4 GM-CSF 对 EGF 效应时间曲线

以终浓度为 1.0 nmol/L EGF 预先与人绒毛癌细胞株 Jar 培养 2 h 后加入终浓度 10 nmol/L GM-CSF 继续培养. 分别于加入 GM-CSF 后 2、4、8、16、24 h 收集细胞, 提取总 RNA, RT-PCR 结果显示: 10 nmol/L GM-CSF 2 h 后即出现明显抑制 EGF 诱导的细胞卵泡抑素 mRNA 表达增加, 4 h 抑制效应最强, 故在下列实验中 GM-CSF 的作用时间定在 4 h.

2.5 GM-CSF 对 EGF 效应的剂量曲线

终浓度为 1.0 nmol/L EGF 与终浓度分别为 0、0.01、0.1、1.0、10、100 nmol/L GM-CSF 共同加入培养的人绒毛癌细胞 Jar 中, 4 h 后

收集细胞提取总 RNA, RT-PCR 结果表明, GM-CSF 可明显抑制人绒毛癌细胞 Jar 经 EGF 诱导的卵泡抑素 mRNA 表达的增加. 并呈剂量依赖效应. 起始有效剂量为 0.1 nmol/L, 最大效应剂量为 10 nmol/L, 抑制率可达 62.3%, 半效抑制剂量为 3.0 nmol/L (图 4).

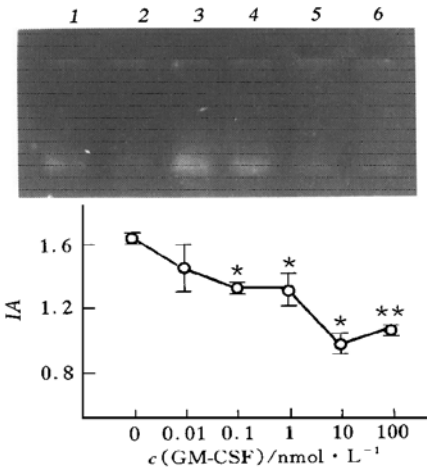


图4 GM-CSF 对 EGF 刺激后人绒毛膜上皮癌细胞系 Jar 卵泡抑素 mRNA 表达的抑制作用 (剂量效应)
与对照组比* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$.
1: GM-CSF 0 nmol/L; 2: GM-CSF 0.01 nmol/L; 3: GM-CSF 0.1 nmol/L;
4: GM-CSF 1.0 nmol/L; 5: GM-CSF 10 nmol/L; 6: GM-CSF 100 nmol/L.

3 讨 论

RT-PCR 技术是一种检测细胞 mRNA 的快速灵敏的方法, 扩增的 DNA 模板来源于 mRNA 反转录生成的 cDNA, 通过检测扩增后 cDNA 含量以对 mRNA 作间接定量. 若样品中 RNA 含量过高或 PCR 循环次数太多, 反应达到平台期, 此时不论起始样品中 mRNA 含量相差多大, 都将被 PCR 平台效应所掩盖而失去比较的可能^[10]. 为避免此种假象, 我们对总 RNA 量及循环次数进行一系列预实验, 确定 2 μg 总 RNA, 25 次循环, PCR 反应处于指数增长期, 此外, 为保证 RNA 加样的均一

性, 每个样本均用 β_2 微球蛋白作为质量内参照, 从而使结果具有较高的可靠性和可比性. 特别指出的是, 我们对 PCR 扩增产物进行直接测序经与卵泡抑素 cDNA 中预期序列比较完全一致, 从而证明 RT-PCR 产物的特异性.

卵泡抑素自 1987 年纯化成功后, 抑制垂体 FSH 分泌和阻断激活素一直被认为是其两大主要功能, 近年来其在调节胚胎发育及分化中的作用受到愈来愈多的重视. 有报道卵泡抑素在非洲蟾蜍胚胎神经系统的发育中起重要作用^[11], 最近哺乳动物的基因清除实验 (gene knockout experiment) 证实: 缺失卵泡抑素基因的小鼠体型小, 骨骼肌细胞体积缩小, 皮肤变薄, 下颌骨、牙齿发育不全, 不能呼吸, 生后数小时内死亡^[12]. 值得注意的是卵泡抑素基因缺失所导致的小鼠发育缺陷较激活素基因缺失更加广泛, 提示卵泡抑素还可能对 TGF- β 家族其他成员的产生和功能也具有调节作用. 特定细胞在特定的分化阶段产生卵泡抑素, 而胚胎过程中, 胎盘产生的卵泡抑素可能是胚胎的来源之一.

各种生殖激素对胎盘组织卵泡抑素基因表达调控的研究较多^[13], 但有关生长因子的作用却少报道, 本研究观察到 EGF 以剂量依赖方式促进卵泡抑素基因在人绒癌细胞中的表达, 而且作用时间较短在 4 h 后即可达到高峰, EGF 这种刺激效应可被 GM-CSF 明显抑制, 最大可使 EGF 的上调效应下降 60%. 胎盘组织除产生 EGF 外, 其中的上皮细胞, 成纤维细胞以及游离到组织间隙的 T 细胞均可分泌 GM-CSF^[14]. 上述结果提示胎盘组织中卵泡抑素基因的表达除受 FSH 和 hCG 的调控外, 其自身来源的 EGF 和 GM-CSF 也可以旁分泌或自分泌对其的调控作进一步的调整和修正, 妊娠不同阶段胎盘卵泡抑素含量的变化就是多种因素相互作用的最终结果^[15].

卵泡抑素基因受多种激素或因子的调节, 可能主要涉及到 PKA 和 PKC 介导途径, 而与钙/钙调素依赖的激酶关系不大^[4], 这方面的研究有待于进一步探讨.

参 考 文 献

- 1 Depaolo L V, Bicsak T A, Erickson G F *et al.* Follistatin and activin: a potential intrinsic regulatory system within diverse tissue. *Proc Soci Exp Bio Med*, 1991, **198** (1): 500 ~ 506
- 2 Nakamura T, Takio K, Eto Y *et al.* Activin binding protein from rat ovary is follistatin. *Science*, 1990, **247**: 836~ 838
- 3 Kirk S E, Dalkin A C, Yasin M *et al.* Gonadotropin-releasing hormone pulse frequency regulates expression of pituitary follistatin messenger ribonucleic acid: a mechanism for differential gonadotrope function. *Endocrinology*, 1994, **135** (3): 876~ 883
- 4 Lindsell C E, Misra V, Murphy B D. Regulation of follistatin gene expression in the ovary and in primary cultures of porcine granulosa cells. *J Reprod Fertil*, 1994, **100** (2): 591~ 595
- 5 Barnea E R, Feldman D, Kaplan M *et al.* The dual effect of epidermal growth factor upon human chorionic gonadotropin secretion by the first trimester placenta *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1990, **71** (4): 923~ 927
- 6 Arakawa S, Isobe S, Mori H *et al.* The effect of epidermal growth factor on progesterin secretion and cyclic AMP synthesis in cultured luteal cells from pregnant rat. *Endocrinology Jpn*, 1990, **37**: 479~ 484
- 7 Metcalf D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood*, 1986, **67**: 257~ 267
- 8 Hofmann G E, Scott R T J, Bergh D A. Immunohistochemical location of epidermal growth factor in human endometrium, decidua and placenta. *J Clin Endocrinol Metab*, 1991, **73**: 882~ 890
- 9 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**: 156~ 161
- 10 Erlich H A. PCR technology, Principles and applications for DNA amplification. New York: Stockton press, 1989. 45~ 60
- 11 Hashimoto M, Nakamura T, Inoue S *et al.* Follistatin is a developmentally regulated cytokine in neural differentiation. *J Biological Chemistry*, 1992, **267** (11): 7203~ 7207
- 12 Matzuk M M, Lu N F, Vogel H *et al.* Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature*, 1995, **374**: 360~ 363
- 13 Xiao S, Findly J K, Robertson D M. The effect of bovine activin and follicle-stimulating hormone (FSH) suppressing protein/follistatin on FSH induced differentiation of rat granulosa cells *in vitro*. *Mol Cell Endocrinol*, 1990, **69**: 1~ 8
- 14 Clark S C, Kamen R. The human hematopoietic colony-

stimulating factors. Science, 1987, **236**: 1229~ 1237

15 Petraglia F, Gallinelli A, Grande A *et al.* Local production and action of follistatin in human placenta. J Clin Endocrinol Metab, 1994, **78** (1): 205~ 210

Regulation of Follistatin Messenger Ribonucleic Acid in Human Choriocarcinoma Cell Line Jar by Epidermal Growth Factor and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. YANG Ming, ZHANG Zhiwen (*Department of Physiology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*); HOU Weimin (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).
Abstract The experiments were designed to test follistatin mRNA expression and regulation by EGF and GM-CSF in human choriocarcinoma

cell line Jar using reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. The results showed as follows: 1. EGF induced a dose-dependent accumulation of follistatin mRNA level, with maximal increase at a dose of 1.0 nmol/L 2. Although GM-CSF did not affect the follistatin mRNA expression alone, it could reduce the follistatin mRNA level enhanced by EGF in a dose-dependent manner, the maximal effect dose was 10 nmol/L, the rate of inhibition could reach 62.3%. Those results indicated that follistatin gene expression was regulated by both hormones and growth factors in endocrine and paracrine/autocrine manner.
Key words follistatin, gene expression, EGF, GM-CSF

C₆₀对体外培养癌细胞的光致作用研究*

钱凯先 严庆丰 黄文栋
(浙江大学生物科学与技术系, 杭州 310027)

李文铸
(浙江大学物理学系, 杭州 310027)

摘要 研究结果表明用 C₆₀ 磷脂酰胆碱与体外培养的 HeLa 细胞融合后, 以 4 000 lx 光强度激发 C₆₀ (C₆₀ 浓度 20 mg/L) 对 HeLa 细胞具有显著的光致杀伤作用. 生化测定证实光激发 C₆₀ 导致膜蛋白巯基含量减少、膜脂过氧化、丙二醛含量增高, SDS-PAGE 证明膜蛋白交联, 荧光偏振显示膜流动性降低, 电镜超微膜结构破坏, 经 MTT 法检测, 大部分细胞死亡. C₆₀ 的强烈光致作用证实了 Arbogast 等认为光激发 C₆₀ 可产生单线态氧的观点.

关键词 富勒烯 (C₆₀), 癌细胞, 自由基, 光致作用

富勒烯 C₆₀ 是碳的第三种分子形态, 它的发现和制备是 90 年代最重要的科技成就之一. 1990 年 Krätschmer 等^[1] 宏观量制备 C₆₀ 取得成功以来, 揭示了许多重要而奇特的性质, 并迅速开创了一个新兴研究领域——富勒烯 C₆₀ 研究. Arbogast 等^[2] 报道, 光激发 C₆₀ 可使其从基态跃迁为三重态, 这是一种有效的电子受体系统, 具很高的电子传递效率; 另一方面, 激发态³C₆₀ 能被氧分子 (O₂) 有效猝灭, 可产

生量子产额高达 0.96 的单线态氧 (¹O₂), 并预言 C₆₀ 在生命系统中可能存在重要作用. 然而, 由于 C₆₀ 水不溶性等障碍, 它在生命科学领域的研究进展缓慢, 目前仅见个别研究报告, Sijbesma 等^[3~5] 合成的 C₆₀ 衍生物可以有效抑制爱滋病毒蛋白酶和逆转录酶的活性, Tokuyama 等^[6] 发现富勒烯羧酸能专一性剪切

* 浙江省自然科学基金资助项目.
收稿日期: 1996-05-24, 修回日期: 1996-10-27