

Key words diacylglycerol (DG), cellular signalling transduction, protein kinase C (PKC)
phosphatidylinositol, second messenger,

谷胱甘肽 S-转移酶基因 P1 的研究进展

刘东远 方福德

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005)

摘要 谷胱甘肽 S-转移酶 P1-1 在癌变细胞和抗药性肿瘤细胞中表达水平发生变化, 提示可以作为恶性转化及肿瘤抗药性的标志物。对大鼠谷胱甘肽 S-转移酶 P1 基因上游调控序列的研究发现在 -2.5 kb 及 -2.2 kb 各存在一增强子序列 GPE I、GPE II, -400 bp 存在一沉默子。GPE I、沉默子上均至少结合有 3 种反式作用因子。人谷胱甘肽 S-转移酶 P1 基因上游区域中迄今尚未发现增强子或沉默子, 但却发现了胰岛素及视黄酸的应答序列, 在癌变细胞和抗药性的肿瘤细胞中该基因表达的调控机制有别于正常细胞。

关键词 谷胱甘肽 S-转移酶 P1 基因, 基因结构, 基因表达调控, 肿瘤

谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferases, GSTs, E. C. 2. 5. 1. 18) 是一多功能的蛋白质家族, 能够催化还原型的谷胱甘肽的巯基结合到多种亲电子的疏水化合物上, 经一系列代谢反应, 使这些化合物转变为亲水的易排泄的物质^[1], 因此它们在致癌物、诱变剂及其他细胞毒物的胞内解毒中起重要作用。哺乳类 GSTs 被分为 5 类: pi (π), alpha (α), mu (μ), theta (θ) 和微粒体 GST^[2], 其中 pi 类谷胱甘肽转移酶 P1-1 (GSTP1-1) 与细胞的癌变^[3]、肿瘤的形成及癌细胞的抗药性密切相关^[4]。近年来对 GSTP1-1 的研究已经深入到基因水平, 种种迹象表明 GSTP1 基因转录水平的调控是其表达调控的关键环节^[5]。因此搞清 GSTP1 基因结构及转录调控对于癌症的预防和治疗将有十分重要的意义。

1 大鼠谷胱甘肽 S-转移酶 P1 基因

Sugioka 等^[6]用合成的 DNA 探针在化学致癌物诱导的大鼠肝癌细胞 cDNA 文库中首先克隆到了大鼠谷胱甘肽 S-转移酶 P1 (rGSTP1) cDNA (pGP5)。Okuda^[7]以 pGP5

为探针从大鼠的基因组文库中筛到了 rGSTP1 基因。序列分析表明该基因约含 3000 bp, 包括 7 个外显子和 6 个内含子, 转录起始位点位于翻译起始位点上游 70 bp, 转录起始位点上游 200 bp 内有一富含 “G+C” (61%) 序列, -27 位置上为 TATA 盒。Sakai 等^[8]对 rGSTP1 基因 5' 上游 -2900 bp 到 +59 bp 范围内调控序列进行了分析。他们用限制性内切酶酶切制备了一系列不同长度的 5' 侧缺失片段, 分别插入细菌氯霉素乙酰转移酶 (chloramphenicol acetyltransferase, CAT) 报告基因上游或下游构成系列缺失重组质粒, 转染到肝癌细胞系 dRLh84 中, 检测 CAT 瞬时表达水平。发现 -2.5 kb 和 -2.2 kb 处各存在一个增强子, 分别叫增强子 I (GPE I) 和增强子 II (GPE II)。其中 GPE II (-2.2 kb) 有佛波酯 (TPA) 应答序列 (TRE)。在 rGSTP1 基因转录起始位点上游 -61 bp 区还存在另一 TRE 序列, 它与 -47 位 GC 盒, -27 位 TATA 盒共同调节 rGSTP1 基因的基础转录。另外在 -400 bp 处还存在另一沉默子序列。Sakai 还发现用佛波酯刺激大

鼠成纤维细胞系 3Y1, 则 rGSTP1 mRNA 水平增加 5 倍, 由此证明佛波酯能通过 GST-P 基因上游 TRE 序列诱导基因的表达。

通过进一步缺失、点突变研究 GPE I^[9] 发现 GPE I 由两个尾对尾的 TRE 类似序列组成, 其中下游 TRE 是决定 GPE I 增强子活性的主要部位, 上游 TRE 类似序列本身无活性, 但可与下游 TRE 序列协调作用, 大大增加后者的活性。众所周知, TRE 序列是 c-jun/c-fos 复合物或其类似蛋白识别结合部位, 用电泳迁移率改变的方法证实了纯化的 Jun/AP-1 确实能识别和结合在 GPE I 上。但令人惊讶的是在缺少 AP-1 的 F9 细胞中 GPEI 仍具有很强的增强子效应, 因此除 AP-1 外一定存在其他的反式作用因子与 GPE I 结合而调节基因的表达。Diccianni^[10] 用带有 GPE I 核心序列的 122 bp 片段分别与 HeLa 或 F9 细胞核抽提物作用, 通过迁移率改变的方法鉴定 GPE I 结合蛋白, 发现两种新的反式作用因子 #2、#3 蛋白质。用竞争结合实验 AP-1 仅同下游 TRE 序列结合; #3 仅结合于上游 TRE, 对反式激活起一定作用, 但不能独立作用; #2 结合区域跨越整个 GPE I, 可能对 GPE I 介导的激活起主要作用。

rGSTP1 在成年大鼠肝细胞中几乎不表达, 其中一定存在某些因子起抑制作用。因此 Imagawa^[11] 用 rGSTP1 基因上游 -400 bp 处的沉默子、-396 bp 到 -140 bp 寡核苷酸片段和大鼠肝细胞核抽提物做 DNase I 足迹分析, 发现其中有多数蛋白质保护区段 GPS1 ~ GPS5。至少有 3 个反式因子 SF-A、SF-B、SF-C 可以结合在其上。用 Ultrogel ACA 44 柱和 GPS-4 亲和层析柱提纯了 SF-A, 纯化的 SF-A 可以结合于多个 GPS 区段上, 推测对 rGSTP1 基础表达具有调节作用。另一调节蛋白 SF-B 的基因也已从基因文库中筛出^[12], 对其 DNA 序列研究发现和以前已经确定的肝脏富含专一性增强因子 LAP/NF-IL6 相同。SF-B/LAP/NF-IL6 在大鼠肝细胞中如何既起正调控作用又起负调控作用。有待于进一步研究。

GSTP1 基因与其他使肝细胞恶化的基因被共同活化, 可能是由于 GSTP1 基因与这些基因在染色体上相距很近, 所以受共同的调控区作用顺式活化, 也可能是由于共同的反式因子作用。为了澄清这一问题, Morimura^[13] 将 GSTP1 基因上游调控区连到 pSVoCAT 质粒中形成 E-CAT, 注入 Wistar 大鼠受精卵的雄核中, 产生基因组整合有 E-CAT 的转基因鼠, 然后用 Solt-Farber 致肝癌的方法处理转基因鼠, 3 种相互独立的转基因鼠系处理后肝癌细胞内均有 CAT 高表达活性, 由于 3 个不同的转基因鼠导入的基因都整合到肝癌基因附近的机率几乎等于零, 所以癌细胞中 GSTP1 基因的诱导表达一定取决于反式作用机制。

2 人谷胱甘肽 S-转移酶 P1

人谷胱甘肽 S-转移酶 P1 (hGSTP1) 基因长度为 2.8 kb, 有 7 个外显子, 6 个内含子^[14]。在 hGSTP1 基因上游启动子区有 4 个调控元件, 包括转录起始位点上游 -29 bp 处的 TATA 盒, -46 bp 到 -41 bp 及 -56 bp 到 -51 bp 处 2 个 SP1 识别位点序列 (GGGCGG) GC 盒, -69 bp 到 -63 bp 位置上的 AP-1 识别序列 TRE。-1 bp 到 -200 bp 处有一富含 GC 区域 (79%), -505 bp 到 -413 bp 处有 17 个 AAAAT 串联重复序列。在包括 hGSTP1 基因启动子区在内的 5' 侧 2203 bp 范围内, 仅发现 -80 bp 到 -8 bp 是基因表达的必需区域^[15]。Xia^[16] 进一步证明 -60 bp 处 TRE 序列对启动子控制基因在各种细胞中的基础表达是必需的, 同时 +8 bp 到 +72 bp 对表达有正调控作用, 可能属于启动子的一部分。在 hGSTP1 基因 5' 侧一直到 -13.5 kb, 下游 +8 bp 到 1.8 kb 均未再发现任何调控元件。

虽然对 hGSTP1 基因通用表达调控元件的研究没有获得更多的有意义的信息, 但近两年来对 hGSTP1 基因受特异因子的诱导及在特异细胞中的表达调控的研究却取得了一些成果。

Xia^[17] 发现视黄酸 (RA) 能抑制人谷胱甘

肽 S-转移酶 (hGSTP1-1) 的表达, 而胰岛素却能诱导其表达, 这两种物质诱导或抑制的作用点都在转录水平上. 由基因调控序列缺失实验, 可见胰岛素的诱导表达是通过 hGSTP1 基因上游 -97 bp 到 +72 bp 区段介导的. 比较其他胰岛素响应基因的序列推测胰岛素诱导作用可能通过内含子 I + 48 bp 到 +55 bp 的一个 8 bp 序列 “CCCGCGTC” 完成的. 视黄酸对 hGSTP1 基因的负调控作用也是由 -99 bp 到 +72 bp 这一区段介导的, 可能是视黄酸和人 β 类视黄酸受体 (hRAR β) 结合后, RA-hRAR β 复合物通过蛋白质-蛋白质作用封闭结合于这一区段上 AP-1 位点上未知的正调控因子, 从而抑制 hGSTP1 基因表达.

hGSTP1-1 在多重抗药性肿瘤细胞中水平升高. 已证实人乳腺癌细胞系 MCF7 多重抗药性的衍生细胞系 VCREMS 中 hGSTP1-1 的水平升高是非基因放大的结果^[18]. Moffat 等^[19] 用 VCREMS 和 MCF7 细胞系做 hGSTP1 基因表达调控的比较, 他们将 GSTP1 基因启动子区不同长度的缺失片段连接到 CAT 报告质粒中, 然后转染到 VCREMS 及 MCF7 细胞系中, 发现同一缺失质粒转染到 VCREMS 细胞系中 CAT 的表达均明显高于其在 MCF7 中表达. 但当缺失到 -65 bp 处, 即破坏了一 69 bp 到 -63 bp 的 TRE 序列, 两细胞系中均丧失了表达 CAT 的能力, 可见 TRE 序列对 hGSTP1 诱导及基础表达都是十分重要的. 进一步用竞争结合实验、点突变实验及人的 Jun、Fos 蛋白抗血清与核抽提物的结合实验, 证明 VCREMS 细胞系中是 c-Jun/c-Fos 组成 AP-1 复合物结合在 TRE 序列上从而诱导了 hGSTP1 基因的表达, 而在 MCF7 细胞中 TRE 序列上结合的不是 AP-1, 可能是其他未知反式因子. 从以上实验可以看到 Jun/Fos 蛋白对基因表达的诱导作用是抗药性乳癌细胞内 hGSTP1-1 水平升高的重要因素.

许多实验表明基因上游调控区 “CpG” 甲基化的水平会影响基因转录活性, 甲基化程度越高, 基因表达越低. Lee^[20] 在对比人的前列腺癌

组织与正常前列腺组织 hGSTP1 基因表达时发现癌组织中 hGSTP1 表达明显降低. hGSTP1 基因 5' 上游 400 bp 内 G、C 约占 72%, 其中有 41 个 CpG 二核苷酸. Lee 研究了前列腺癌组织和正常前列腺组织 hGSTP1 这一段启动子区的甲基化水平, 结果表明癌组织细胞内 hGSTP1 启动子区 CpG 是高甲基化的, 而正常前列腺细胞中却是低甲基化的, 从而, 从另一侧面揭示了正常组织与癌组织 hGSTP1 表达差异的原因.

综上所述, 可见大鼠和人 GSTP1 基因的调控有许多差别, 但从基因结构及编码的氨基酸来看, 它们却有很高的同源性^[14]. 它们都含 7 个外显子, 6 个内含子, 编码 209 个氨基酸, 氨基酸组成顺序同源性 85.6%, 外显子 II 到 VI 是高度保守的, 因此可以推测它们在细胞内的功能是一致的.

目前对 GSTP1-1 的研究大多集中于病理学和药理学领域. 对于基因表达的调控机理, 诸多的顺、反式因子如何相互作用, 尤其是在癌细胞、抗药性细胞中调控方式如何改变等还了解甚少, 有待于进一步探讨.

参 考 文 献

- 1 Mannervik B. *Adv Enzymology*, 1985; **57**: 357
- 2 Mannervik B, Board P G, Ketterer B *et al.* *Biochem J*, 1992; **282**: 305
- 3 Toffoli G, Viel A, Tumiotto L *et al.* *Eur J Cancer*, 1992; **28A** (89): 1441
- 4 Fields W R, Ying Li, Townsend A J. *Carcinogenesis*, 1994; **15**: 1155
- 5 Koo P, Nagai M K, Farber E. *J Biol Chem*, 1994; **269**: 14601
- 6 Sugioka Y, Kano T, Okuda A *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1985; **13**: 6049
- 7 Okuda A, Sakai M, Muramatsu M. *J Biol Chem*, 1987; **262** (8): 3858
- 8 Sakai M, Okuda A, Muramatsu M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; **85**: 9456
- 9 Okuda A, Imagawa M, Maeda Y. *J Biol Chem*, 1989; **264** (28): 16919
- 10 Diccianni M B, Imagawa M, Muramatsu M. *Nucleic Acids Res*, 1992; **20**: 5153

- 11 Imagawa M, Osada S, Okuda A *et al.* Nucleic Acids Res, 1991; **19** (1): 5
- 12 Imagawa M, Osada S, Koyama *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1991; **179** (1): 293
- 13 Morimura S, Suzuki T, Hochi S *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993; **90**: 2065
- 14 Morrow C S, Cowan H, Goldsmith M E. Gene (Amst), 1989; **75**: 3
- 15 Morrow C S, Goldsmith M E, Cowan K H. Gene, 1990; **88**: 215
- 16 Xia C L, Cowell I G, Dixon K H *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1991; **176** (1): 233
- 17 Xia C L, Taylor J B, Spencer S R *et al.* Biochem J, 1993; **292**: 845
- 18 Whelan R D H, Waring C J, Wolf C R *et al.* Int J Cancer, 1992; **52**: 241
- 19 Moffat G J, McLaren A W, Wolf C R. J Biol Chem, 1994; **269**: 16397
- 20 Lee W H, Mortox R A, Epstein J I *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1994; **91**: 11733

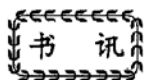
Studies of Glutathione S-Transferase P1 Gene.

Liu Dongyuan, Fang Fude (*Institute of Basic Medical Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China*).

Abstract Glutathione S-transferase P1-1

(GSTP1-1) is expressed at a different level in tumor cell and drug resistant neoplastic cell. It is suggested that GSTP1-1 can serve as a marker for malignant transformation and drug resistance. On the study upstream regulatory sequence of rat glutathione S-transferase P1 (rGSTP1) gene, it is found that two enhancing elements named GPE I and GPE II are located in -2.5 kb, -2.2 kb respectively. A silencer locates at -400 bp. Both of GPE I and silencer bind at least three kinds of trans-acting factors. Although any enhancer or silencer has not been found in human glutathione S-transferase P1 (hGSTP1) gene so far, but insulin and retinoic acid (RA) responsive sequences have been identified. The regulatory mechanism of hGSTP1 gene in tumor cells and antidrug tumor cells is different from normal cells.

Key words glutathione S-transferase P1 gene, gene structure, regulation of gene expression, tumor



《膜脂-膜蛋白相互作用及其在医学和农业上的应用》简介

由中国科学院生物物理研究所杨福愉院士、黄芬研究员主编的《膜脂-膜蛋白相互作用及其在医学和农业上的应用》一书, 将由山东科学出版社出版。

膜脂-膜蛋白相互作用及其在医学和农业上的应用为“七五”期间国家自然科学基金重大项目。本书内容除反映此研究项目的主要研究成果外, 还结合国际动态增加了几篇综述性文章, 内容新颖, 具有重要理论意义和应用价值。本书共分四个部分。第一部分(第1~11章)反映膜脂-膜蛋白相互作用基础理论研究的成果。第二部分(第12~14章)反映了膜脂-膜蛋白相

互作用与医学的研究结果及国际动态。第三部分(第15~17章)包括膜脂-膜蛋白相互作用与农作物抗冷性的研究成果。第四部分(第18、19章)介绍研究膜脂-膜蛋白相互作用有关的生物物理技术与方法(包括小角度X衍射、圆二色光谱、红外和拉曼光谱、核磁共振和激光微束技术等)以及膜蛋白的二维结晶研究概况。

本书可供各研究单位、高等院校及农、医等部门从事生物膜科研和教学人员参考。

[中国科学院生物物理研究所, 北京 100101]