

三氧化二砷下调 MG-63 骨肉瘤细胞 IEX-1 基因表达的转录调控机制研究*

肖 涛^{1)**} 朱 武¹⁾ 姚茂金²⁾ 方建珍²⁾ 罗远明¹⁾ 曾 伟¹⁾ 胡金奎¹⁾

(¹⁾中南大学湘雅二医院创伤骨科研究室, 长沙 410011; ²⁾中南大学湘雅二医院医学实验中心, 长沙 410011)

摘要 三氧化二砷(arsenic trioxide, As₂O₃)是中国传统中药砒霜的主要有效成分, 最早应用于血液系统肿瘤的治疗, 随后研究表明其对实体瘤也具有抑制细胞增殖并诱导凋亡的作用。早期研究发现, 1.0 μmol/L 的 As₂O₃ 可以体外诱导骨肉瘤细胞系 MG-63 细胞凋亡, 进一步的 cDNA 芯片分析、RT-PCR、RNA 印迹证实细胞凋亡与 As₂O₃ 干预后 IEX-1 基因表达下调有关。IEX-1 为早期诱导应答基因, 调节细胞生长和凋亡。通过荧光素酶分析, EMSA、蛋白质印迹等实验, 发现 As₂O₃ 干预骨肉瘤细胞系 MG-63 后能诱导 p53 蛋白表达上调, 增加的 p53 蛋白通过与 IEX-1 的启动子结合, 转录抑制 IEX-1 的转录, 导致 IEX-1 基因表达下调。进一步证实了 IEX-1 与骨肉瘤的重要关系, 同时也阐明 As₂O₃ 诱导 IEX-1 基因表达下调的转录调控机制。

关键词 As₂O₃, IEX-1, 骨肉瘤, p53, 转录调控

学科分类号 R4, R73

三氧化二砷(arsenic trioxide, As₂O₃)为传统中药砒霜的主要有效成分, 最早用于慢性髓性白血病(CML)的治疗^[1], 随后的研究发现 As₂O₃ 对治疗早幼粒细胞白血病(APL)有良好的疗效^[2,3]。最新的研究结果显示, As₂O₃ 对肝癌、食管癌、胃癌等消化系统肿瘤有明显的治疗作用, 对宫颈癌、卵巢癌、膀胱癌等泌尿生殖系统肿瘤, 以及肺癌、乳腺癌、前列腺癌等其他实体瘤也具有抑制细胞增殖并诱导凋亡的作用^[4]。有研究表明, 采用 As₂O₃ 诱导 B 淋巴细胞株 MBC-1 凋亡时, p53 蛋白表达阳性率由 2.3%增高到 32.9%^[5]; 诱导人肺腺癌细胞凋亡时, p53 表达增高。

本研究小组早期研究发现, As₂O₃ 可诱导骨肉瘤细胞系 MG-63 细胞发生明显的凋亡, 1.0 μmol/L 的 As₂O₃ 干预 MG-63 细胞 48 h, 电镜观察可发现典型的凋亡特征^[6,7]。进一步的 cDNA 阵列研究发现, 早期应答基因 IEX-1 在 As₂O₃ 作用于 MG-63 细胞后, 基因表达明显下调, 说明其与骨肉瘤相关^[8]。IEX-1 为早期应答基因, 在细胞生物学效应上扮演着“双重角色”, 可正性或复性影响细胞生存和细胞进程。研究表明, IEX-1 过表达可抑制细

胞生长, 促进细胞凋亡。并 IEX-1 具有抗凋亡作用, 可抑制细胞凋亡。同时, IEX-1 基因在很多肿瘤细胞系中高表达。表明 IEX-1 与肿瘤的发生、发展有密切关系。本文拟对 As₂O₃ 体外干预骨肉瘤细胞系 MG-63 诱导 IEX-1 基因表达下调的转录调控机制进行研究, 为进一步研究 IEX-1 基因在骨肉瘤中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

MG-63 细胞系为本实验室保存; p53 单克隆抗体购自 BD 公司, IEX-1 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司; As₂O₃ 购自 Sigma 公司; 限制性内切酶为 TaKaRa 公司产品; Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; Hotstar 酶、Tip100 质粒抽提试剂盒购自 Qiagen 公司; 双荧光素酶检测试剂盒、

* 国家自然科学基金资助项目(30571883)。

** 通讯联系人。

Tel: 0731-5292168, E-mail: xiaotaoyl@163.com

收稿日期: 2008-02-12, 接受日期: 2008-03-18

EMSA 试剂盒购自 Promega 公司; Luminometer 单光子检测仪为 Promega 公司产品; 核蛋白抽提试剂盒购自 Active Motif 公司.

1.2 方法

1.2.1 载体构建. IEX-1 启动子荧光素酶报告质粒构建以正常人 gDNA 为模板, 采用 PCR 方法扩增获得目的片段, PCR 产物回收完毕 *Xho* I 和 *Kpn* I

双酶切后连入 pGL3-Basic 质粒. 突变体采用重叠 PCR(Over-lap PCR)技术, 以野生型 pGL3-279 质粒为模板, 用引入突变碱基引物进行两轮 PCR 扩增, 从而得到定点突变的片段, 用 *Xho* I 和 *Kpn* I 双酶切后连入 pGL3-Basic 质粒, 得到突变质粒 pGL3-mNF-kb 和 pGL3-mP53. 经酶切、测序证实, 用 Tip100 抽提质粒后备用, 所有相关引物见表 1.

Table 1 Primer sequence and EMSA probe

Primers	Sequence(5'→3')
IEX-rev	TCA GTT CTC GAG AAG GCC AAG TGA GGG TCG GCT GC
-1419IEX-f	CT GGT ACC TCT CAC TAT GTT GCC CAG GCT CCT
-575IEX-f	CTGGT ACC CTA CTA GAA GAA GGA CGG AGG GAG
-279IEX-f	CTGGT ACC TAA AGT GAG CCC CTC TCC AGG TGC CAC
mp53(<i>Sal</i> I)-f	CCT CTC CAG GTG CCA gtc gac TCG ACA TGT GCC TGC AGC
mp53(<i>Sal</i> I)-r	GCT GCA GGC ACA TGT CGA gtc gac TGG CAC CTG GAG AGG
mNF-κB(<i>Sal</i> I)-f	CCT TTG TTT AAT CGT CGG gtc gac CAG CCC GCT GCT GCC AAC
mNF-κB(<i>Sal</i> I)-r	GTT GGC AGC AGC GGG CTG gtc gac CCG ACG ATT AAA CAA AGG
p53 consensus	TAC AGA ACA TGT CTA AGC ATG CTG GGG
p53/IEX-1	CAG GTG CCA CAT GCC TCG ACA TGT GCC
mp53/IEX-1	CAG GTG CCA gtc gac TCG ACA TGT GCC

IEX-rev, -1419IEX-f, -575IEX-f and -279IEX-f are primers using for construction of luciferase reporter plasmids of IEX-1 promoter. mp53 (*Sal* I)-f and mp53 (*Sal* I)-r are primers using for constructing of luciferase reporter plasmids of p53 mutant. mNF-κB (*Sal* I)-f and mNF-κB (*Sal* I)-r are primers using for constructing of luciferase reporter plasmids of p53 mutant. The mutated sites are marked with lower case, and restrict enzyme sites was marked by bars drawn below the diagram. p53 consensus, p53/IEX-1 and mp53/IEX-1 was probes for EMSA assay.

1.2.2 细胞培养、瞬时转染及双荧光素酶活性分析. MG-63 细胞株在含 10% 灭活小牛血清的高糖 DMEM 培养液中, 37℃, 5% CO₂ 和适合湿度的细胞培养箱传代培养. 瞬时转染采用脂质体 Lipofectamine 2000, 具体转染方法参照其说明书进行. 每次转染均用 24 孔板, 每个样品转 2 个孔. 转染体系如下: Lipofectamine 2000 脂质体 1.5 μl, 待检或对照质粒 600 ng, phRL-SV40 质粒(内对照) 4.0 ng, DMEM 培养液 100 μl. 每个质粒至少单独转染 3 次. 同时干预组加入浓度为 1.0 μmol/L As₂O₃ 干预, 转染 32 h 后, 收集细胞, 按照试剂盒操作手册进行双荧光素酶活性分析, 每个孔测 2 次. 各孔细胞之间的转染效率通过内对照活性进行校正. 样品校正转染效率后的活性, 分别减去阴性对照的背景值, 除以阳性对照的标准值, 最后得到各样品相对于对照 pGL3-Basic 的相对活性(Basic 相对活性值为 1).

1.2.3 蛋白质印迹检测 As₂O₃ 诱导后 p53 和 IEX-1 的表达. MG-63 细胞株前一天接种于 6 cm 培养

皿, 加入浓度为 1.0 μmol/L 的 As₂O₃ 干预细胞, 48 h 后收获细胞, 抽提细胞总蛋白质, 并测定样品蛋白浓度(按 BCA 试剂盒说明书进行), 取 10 μg 总蛋白行 12% SDS-PAGE 并将蛋白质转至 PVDF 膜, 依次与 IEX-1 一抗(IEX-1: 1 : 500, β-actin: 1 : 2 500)和二抗(羊抗兔 IgG, 1 : 5 000) 各在室温下孵育 1 h, p53 一抗(p53: 1 : 500, β-actin: 1 : 2 500)和二抗(羊抗鼠 IgG, 1 : 5 000) 各在室温下孵育 1 h, ECL 试剂盒显影. 实验重复 3 次.

1.2.4 电泳迁移率分析(EMSA). MG-63 细胞株前一天接种于 6 cm 培养皿, 加入浓度为 1.0 μmol/L 的 As₂O₃ 干预细胞, 48 h 后收获细胞, 抽提细胞核蛋白, 并测定样品蛋白质浓度(按 BCA 试剂盒说明书进行). T4 多核苷酸激酶催化法对转录因子 p53 结合的特异性核苷酸片段(表 1)进行[γ-³²P]ATP 末端标记, 在加入标记的探针前, 将 5 × 结合缓冲液 3.0 μl, MG-63 细胞核蛋白提取物 15 μg(约 3 ~ 5 μl)混合, 并用无核酸酶的水补充至 15.0 μl. 对于竞争性反应, 在此体系中加入非标记的竞争性或

非竞争性寡核苷酸 30 ng, 竞争性探针与标记探针加入量的摩尔比例为 100:1. 样品经 4% PAGE (40:1, 0.5 × TBE, 350 V 电泳 45 min), 干胶后在 -70℃ 胶片放射自显影 72 h, 显影, 定影.

1.2.5 数据处理及分析. 各质粒的相对荧光素酶活性的计算: (实验片段荧光素酶活性 / 共转的海肾荧光素酶活性) / (pGL3-Basic 荧光素酶活性 / 共转的海肾荧光素酶活性), 相对荧光素酶活性数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计方法采用 One-way ANOVA 方差分析^[9].

2 结 果

2.1 重组质粒的构建及鉴定

荧光素酶重组质粒采用 PCR 方法扩增、连接获得. 突变重组质粒的构建是以野生型 pGL3-279 质粒为模板定点引入突变碱基引物, 得到了突变质粒 pGL3-mSp1 和 pGL3-mP53. 所有经 *Xho* I 和 *Kpn* I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳检测, 证明连接片段与目的片段一致, 经测序证实定点突变已经成功地被引入(图 1).

2.2 As₂O₃ 干预 IEX-1 启动子及突变体双荧光素酶分析

1.0 μmol/L 浓度的 As₂O₃ 干预后, IEX-1 启动子 pGL3/-1 419、pGL3/-575、pGL3/-279 和 pGL3/-mNF-κb 荧光素酶活性较没有干预组都有不同程度的下降, pGL3-mP53 荧光素酶活性无明显改变. As₂O₃ 干预后, pGL3/-1419 荧光素酶活性(58.3 ± 1.3)相当于未干预组(67.1 ± 1.2)的 86.8%, $P < 0.05$,

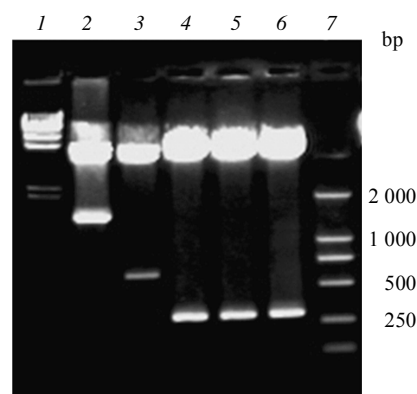


Fig. 1 The electrophoretic assay using agarose

1: Lambda DNA-*Hind* III marker; 2: pGL3/-1419 *Kpn* I and *Xho* I double digestion; 3: pGL3/-575 *Kpn* I and *Xho* I double digestion; 4: pGL3/-279 *Kpn* I and *Xho* I double digestion; 5: pGL3-mP53 *Kpn* I and *Xho* I double digestion; 6: pGL3-mP53 *Kpn* I and *Xho* I double digestion; 7: DL2000 marker.

pGL3/-575 荧光素酶活性(49.8 ± 1.3)相当于未干预组(65.4 ± 1.4)的 76.1%, $P < 0.05$, pGL3/-279 荧光素酶活性(52.3 ± 1.2)相当于未干预组(74.0 ± 1.2)的 70.6%, $P < 0.05$. p53 核心结合位点突变后, 突变体荧光素酶活性(116.8 ± 1.8)相当于野生型(74.0 ± 1.2)的 160.2%, $P < 0.05$, As₂O₃ 干预组与未干预组无明显改变. NF-κb 核心结合位点突变后, 突变体荧光素酶活性(105.3 ± 1.5)相当于野生型(74.0 ± 1.2)的 142.3%, $P < 0.05$, As₂O₃ 干预组(55.2 ± 1.4)相当于未干预组(105.3 ± 1.5)的 52.4%, $P < 0.05$ (图 2). IEX-1 启动子 -279/+1 区间的主要转录因子结合位点分析见图 3.

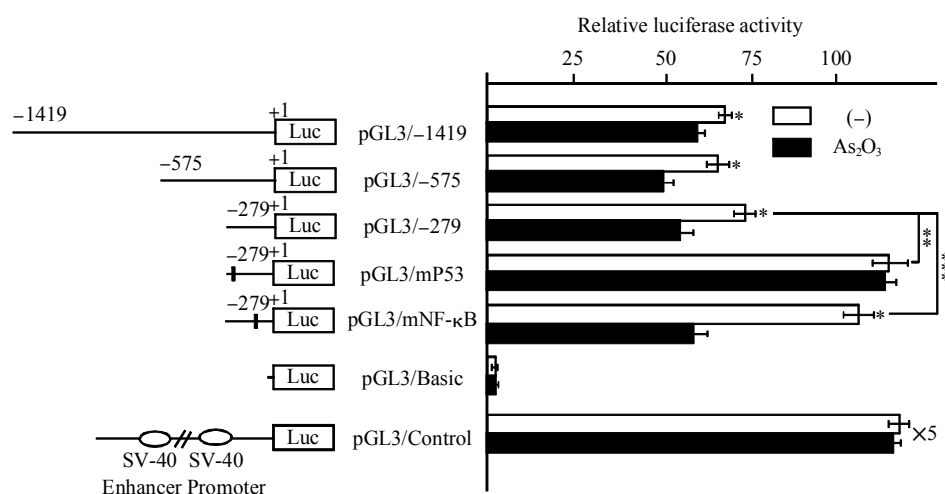


Fig. 2 Dual-luciferase assay

Relative luciferase activity in cells transfected with fragments pGL3/-1 419, pGL3/-575, pGL3/-279 and pGL3-mNF-κB was lower than after the addition of 1.0 μmol/L As₂O₃, while the transcriptional activity of pGL3-mP53 is not, $P < 0.05$. Mutation of the p53 site resulted in a dramatic increase of the luciferase activity (160.2% of the wild type control), $P < 0.05$; mutations of the NF-κB sites had little effect on the promoter activity (142.3% of the wild type control), $P < 0.05$. Data are given as $\bar{x} \pm s$ ($n = 6$).

3 讨 论

骨肉瘤是儿童及青少年中常见的恶性肿瘤。目前,早期患者采用手术辅助以化疗,其预后相对改善。临床常用抗癌药物有多种选择,如:阿霉素、顺铂和环磷酰胺等,常单用或合用。化疗可显著改善患者的生存,但仍可发生转移和复发,并很容易形成耐药,常常导致化疗效果不佳。因此,寻求新的治疗效果更好的化疗药物是骨肉瘤临床治疗中有待解决的问题。

在寻找骨肉瘤疗效更好的化疗药物时,我们首次报道了 As_2O_3 可诱导骨肉瘤细胞系 MG-63 细胞发生明显的凋亡, $1.0 \mu\text{mol/L}$ 的 As_2O_3 与 MG-63 细胞共孵育 48 h, 可以观察到细胞抑制率达 $(23.15 \pm 3.60)\%$, 电镜观察发现出现明显的细胞凋亡特征。随后的基因芯片分析,发现早期应答基因 IEX-1 在 As_2O_3 作用骨肉瘤细胞 MG-63 后,基因表达明显下调,并被 RT-PCR 和 RNA 印迹实验证实,这是首次报道 IEX-1 基因与骨肉瘤相关,说明 IEX-1 基因可能参与骨肉瘤的发生、发展。

目前研究表明, IEX-1 与肿瘤有密切的关系,在多种肿瘤细胞系中表达上调,但各研究小组的结果不尽一致,表明 IEX-1 基因在细胞生物学效应中扮演双重角色,其 N 端的糖基化和磷酸化位点在细胞凋亡扮演重要功能。IEX-1 过表达可以促进角细胞、HeLa 细胞、肝细胞和 293 人胚肾细胞的凋亡^[10~14],同时拮抗 TGF- β 诱导的淋巴细胞凋亡。有研究报道, IEX-1 基因在胰腺癌中高表达并可作为其预后相关指标^[15]。IEX-1 的转基因小鼠 T 淋巴细胞过度激活表现出狼疮样综合症, T 淋巴细胞凋亡受到抑制并可能受 NF- κB 调控^[16~18]。IEX-1 在转录水平受到多种转录因子的调节,其启动子及调控区域具有 NF- κB 、p53 等多个转录因子结合位点, NF- κB 、p53 可以转录抑制 IEX-1 基因转录^[9]。考虑到已有研究报道 As_2O_3 干预可以诱导 p53 蛋白的表达上调,结合我们发现 As_2O_3 干预下调 IEX-1 基因的表达,加上 IEX-1 为 NF- κB 信号通路的靶基因及 NF- κB 信号通路在肿瘤发生、发展中的重要作用,我们构建了 IEX-1 启动子区及 p53、NF- κB 结合位点突变荧光素酶报告载体,瞬时转染 MG-63 细胞,加入 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 的 As_2O_3 共孵育,结果发现,各报告质粒 As_2O_3 干预后荧光素酶活性比未干预组明显降低。p53 结合位点突变后, As_2O_3 干预后荧光素酶活性与未干预无明显变化。NF- κB

结合位点突变后, As_2O_3 干预后荧光素酶活性比未干预组明显降低,进一步的蛋白质印迹证实 $1.0 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 干预后 p53 蛋白明显增加, IEX-1 蛋白明显降低,同时 EMSA 实验证实 As_2O_3 干预后更多的转录因子 p53 与 IEX-1 的启动子结合。

本研究发现, $1.0 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 干预骨肉瘤 MG-63 细胞,通过上调转录因子 p53 的表达下调 IEX-1 基因的表达,进一步证实 IEX-1 与骨肉瘤的相关并表明其为一潜在的治疗骨肉瘤的分子靶点,同时也为 As_2O_3 作为骨肉瘤临床化疗药物奠定了实验基础。

参 考 文 献

- 1 Murgo A J. Clinical trials of arsenic trioxide in hematologic and solid tumors: overview of the national cancer institute cooperative research and development studies. *Oncologist*, 2001, **6** (Suppl 2): 22~28
- 2 Chen G Q, Shi X G, Tang W, *et al.* Use of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL) As_2O_3 exerts dose-dependent dual effects on APL cells. *Blood*, 1997, **89** (9): 3345~3353
- 3 Shen Z X, Shi Z Z, Fang J, *et al.* All-trans retinoic acid- As_2O_3 combination yields a high quality remission and survival in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(15): 5328~5335
- 4 张晨,凌昌全.三氧化二砷抗实体瘤的研究概况.第二军医大学学报,2003, **24**(004): 440~443
- 5 Pu Y S, Hour T C, Chen J, *et al.* Arsenic trioxide as a novel anti-cancer agent against human transitional carcinoma-characterizing its apoptotic pathway. *Anticancer Drugs*, 2002, **13**(3): 293~300
- 6 肖涛,李康华,方建珍,等.三氧化二砷诱导骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡的实验研究.湖南医科大学学报,2002, **27**(2): 111~113
- 7 肖涛,李康华,方建珍,等. As_2O_3 联合 FP99 诱导骨肉瘤细胞 MG-63 凋亡的初步研究.科技导报,2006, **24**(4): 48~50
- 8 Xiao T, Li K H, Li G Y, *et al.* Mechanism of apoptosis of human osteosarcoma MG-63 induced by arsenic trioxide. *J central south univ tech*, 2005, **12**(Suppl1): 317~321
- 9 姚茂金,王永俊,沈宏伟,等. p53 对 STK11 的转录调控研究.自然科学进展,2007, **17** (7): 878~883
- 10 Schilling D, Pittelkow M R, Kumar R, *et al.* IEX-1, an immediate early gene, increases the rate of apoptosis in keratinocytes. *Oncogene*, 2001, **20**(55): 7992~7997
- 11 Osawa Y, Nagaki M, Banno Y, *et al.* Expression of the NF- κB target gene X-ray-inducible immediate early response factor-1 short enhances TNF-alpha-induced hepatocyte apoptosis by inhibiting Akt activation. *J Immunol*, 2003, **170**(8): 4053~4060
- 12 Arlt A, Grobe O, Sieke A, *et al.* Expression of the NF- κB target gene IEX-1 (p22/PRG1) does not prevent cell death but instead triggers apoptosis in HeLa cells. *Oncogene*, 2001, **20**(1): 69~76

- 13 Arlt A, Kruse M L, Breitenbroich M, *et al.* The early response gene IEX-1 attenuates NF- κ B activation in 293 cells, a possible counter-regulatory process leading to enhanced cell death. *Oncogene*, 2003, **22**(21): 3343~3351
- 14 Shen L, Guo J, Santos-Berrios C, *et al.* Distinct domains for anti- and pro-apoptotic activities of IEX-1. *J Biol Chem*, 2006, **281**(22): 15304~15311
- 15 Sasada T, Azuma K, Hirai T, *et al.* Prognostic significance of the immediate early response gene X-1 (IEX-1) expression in pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol*, 2008, **15**(2): 609~617
- 16 Zhang Y, Schlossman S F, Edwards R A, *et al.* Impaired apoptosis, extended duration of immune responses, a lupus-like autoimmune disease in IEX-1-transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(2): 878~883
- 17 Zhang Y, Finegold M J, Porteu F, *et al.* Development of T-cell lymphomas in Emu-IEX-1 mice. *Oncogene*, 2003, **22**(44): 6845~6851
- 18 Mittal A, Papa S, Franzoso G, *et al.* NF-kappaB-dependent regulation of the timing of activation-induced cell death of T lymphocytes. *J Immunol*. 2006, **176**(4): 2183~2189
- 19 Im H J, Pittelkow M R, Kumar R. Divergent regulation of the growth-promoting gene IEX-1 by the p53 tumor suppressor and Sp1. *J Biol Chem*, 2002, **277**(17): 14612~14621

Study on The Mechanism of Transcriptional Regulation of IEX-1 Gene Induced By As₂O₃ in Human Osteosarcoma MG-63*

XIAO Tao**, ZHU Wu, YAO Mao-Jin, FANG Jian-Zhen, LUO Yuan-Ming, ZENG Wei, HU Jin-Xi

(¹ Department of Osteocarcinoma Institute, The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 41001, China;

2) Medical Research Centre of The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract As₂O₃ is a Chinese traditional medicine. In previous study, 1.0 μ mol/L As₂O₃ have been found that could induce MG-63 cell apoptosis *in vitro*. And then it was identified that IEX-1 gene expression was down regulated after the addition of 1.0 μ mol/L As₂O₃ using cDNA Array, RT-PCR, Northern blot. IEX-1, a recently discovered early response gene, regulates cell growth and apoptosis. The exact transcriptional mechanism of IEX-1 was found using Dual-luciferase assay, EMSA, Western blot. Transcriptional factor p53 was up-regulated after the addition of 1.0 μ mol/L As₂O₃, and the increased p53 protein bind the promoter region of IEX-1 gene, which repress the transcription and result in down-regulation of IEX-1 gene expression. It is further confirmed that IEX-1 gene is associated with osteosarcoma and the exact transcriptional mechanism of IEX-1 after the addition of As₂O₃ was found.

Key words As₂O₃, IEX-1, osteosarcoma, p53, transcriptional regulation

*This work was supported by a grant from The Natural Science Foundation of China (30571883).

**Corresponding author.

Tel: 86-731-5292168, E-mail: xiaotaoyl@163.com

Received: February 12, 2008 Accepted: March 18, 2008