

蛋白激酶 C α 对人正常肝和肝癌细胞中 H α ras 基因表达的影响*

冯 怡 柳惠图** 高 萍

(北京师范大学生命科学学院, 细胞增殖及调控生物学教育部重点实验室, 北京 100875)

摘要 运用基因转染技术, 将蛋白激酶 C(PKC α) cDNA 正向插入的真核表达重组质粒 pXJ41-PKC α , 导入人正常肝细胞 (L-02), 经蛋白质免疫印迹等检验, 表明成功构建了稳定过表达 PKC α 的人正常肝细胞模型 (LT3), 用 LT3 和表达反义 PKC α 的人肝癌细胞 HT6 为细胞模型, 通过 RT-PCR, 蛋白质印迹 (Western blot) 等分析和进一步运用自行构建的真核表达质粒 prsGL3, 进行荧光素酶活性检测表明: 过表达 PKC α 可以促进 L-02 细胞的增殖速率, 并引起 H α ras 基因转录水平上升和 H α ras 启动子活性升高; 反之, 表达反义 PKC α 的 BEL-7402 细胞增殖被抑制, H α ras 基因转录水平下降, H α ras 启动子活性降低。通过实验我们首次观察到, PKC α 亚类对 H α ras 癌基因表达的影响与其对 H α ras 启动子活性的作用有关, PKC α 可能参与了对 H α ras 基因表达的调控。

关键词 蛋白激酶 C α , 人正常肝细胞 L-02, 人肝癌细胞 BEL-7402, H α ras 基因启动子

学科分类号 Q291

蛋白激酶 C (PKC) 是一类在细胞信号传递、增殖调控和肿瘤发生中具有重要作用的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。它在中转信号进入细胞的生化途径中占据了枢纽位置。它是一个多基因编码的家族, 目前至少已确定了 12 种亚类, 各亚类的分布异质性, 及在同一组织的不同发育阶段所表达的不同形式, 都与其作用于特异的靶蛋白, 发挥不同的生理功能密切相关^[1]。因此研究某一特定亚类在细胞增殖转化和分化中的作用, 尤其是探讨特异 PKC 亚类在细胞信号转导过程中与一些癌基因, 如 ras 等功能的相关性, 具有重要意义。PKC α 广泛分布于许多组织和细胞中, 具有多种生理功能, 已有资料表明它可在多种信号通路中发挥作用, 如可通过磷酸化 c-Raf, 参与 MAPK 信号通路的调节^[2], 对细胞的存活、生长和增殖分化有重要作用。

哺乳类动物细胞的 Ras 蛋白 (p21^{ras}) 在具有酪氨酸蛋白激酶活性的受体信号转导通路中起重要的分子开关作用。迄今为止在信号转导的交叉网络调节中, PKC 和 Ras 通路相互间的上、下游调节关系报道不尽相同, 而涉及到 PKC 亚类如 PKC α 对 H α ras 基因表达的调节及其机制更未见报道, 因此我们利用自行构建的 PKC α 过表达与表达反义 PKC α 的细胞模型^[3], 在观察 ras 基因表达变化的基础上, 以荧光素酶为报告基因, 观察了在人正常肝和肝癌细胞中 PKC α 亚类对 H α ras 启动子活性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

H α ras 调控区 DNA 片段由康奈尔大学 Lee 教

授惠赠。质粒 pGL3 购自 Promega 公司; 细菌 DH5 α (本室存); 人正常肝细胞 L-02 和人肝癌细胞 BEL-7402 来源于中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所; 内切酶购于 Promega 公司; 逆转录酶 SuperScriptTM II, Trizol 试剂, Lipofect 脂质体转染试剂购自 GIBCO 公司; PKC α 抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 细胞在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 基因转染和细胞筛选: 将本室已构建的真核表达重组质粒 pXJ41-PKC α 与脂质体混合, 置室温下 20 min 后, 加入细胞, 于 37 $^{\circ}$ C 培养 20 h, 换入含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基继续培养 48 h, 加入 G-418 (150 mg/L) 筛选, 25~30 d 挑阳性克隆扩大培养。

1.2.3 RNA 提取与 RT-PCR: 收集细胞, 按照 Trizol 试剂说明程序提取细胞总 RNA。取 1 μ g RNA 经逆转录酶 SuperScriptTM II 作用, 在下列条件下合成 cDNA: 70 $^{\circ}$ C 5 min, 42 $^{\circ}$ C 50 min; 70 $^{\circ}$ C 15 min。H α ras 5' 引物序列为 5'-TGA GGA GCG ATG ACG GAA TA-3', 3' 引物序列为 5'-GTA TCC AGG ATG ATG TCC AAC AG-3'。内参 β_2 -微球蛋白 5' 引物序列为 5'-AAG ATG AGT ATG CCT GCC GT-3', 3' 引物序列为 5'-ATG CTG CTT ACA

* 国家自然科学基金资助项目 (39870366)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-62209699, E-mail: liuhuitu@bnu.edu.cn

收稿日期: 2002-03-26, 接受日期: 2002-04-28

TGT CTC GAT-3'. 按如下程序进行 PCR 反应: 94 °C 3 min; 94 °C 50 s, 57 °C 50 s, 72 °C 20 s, 35 个循环; 72 °C 7 min 终止反应^[4]. PKC α 5' 引物序列为 5'-CGAGGAAGGAAACATGGAAGCTCAG-3', 3' 引物序列为 5'-CCTGTCTGGCAAGCATCACCTTT-3', 按如下程序进行 PCR 反应: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55.9 °C 2 min, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min 终止反应^[5]. PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离检测.

1.2.4 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法测定细胞生长曲线: 细胞固定, MTT (5 g/L) 染色, 酶标仪读取 A_{570} 值. 实验方法参见文献 [6].

1.2.5 质粒的重组构建: 分别将 H α ras 启动子 DNA 和真核表达载体 pGL3-Basic 用 *Hind* III 切割回收, 获得片段用 T4 连接酶连接, 16 °C 孵育 16 h, 转化感受态菌 DH5 α , 筛选菌落, 提取并纯化重组质粒 prasGL3.

1.2.6 细胞瞬时转染与荧光素酶活性测定: 将 1×10^5 个细胞接种于 35 mm 培养皿中, 利用脂质体方法将 prasGL3 质粒瞬时转染细胞, 将细胞裂解后离心, 取上清, 加入发光底物, 在 Lumat LB 9501 荧光检测仪上进行荧光素酶活性测定. 用考马斯亮蓝染色法测定总蛋白质浓度, 校正活性. 同时用 β -半乳糖苷酶报告质粒共转染校正转染效率. 实验每次设三组平行对照. β -半乳糖苷酶活性测定参照文献 [7] 方法.

1.2.7 蛋白质印迹: 蛋白质提取依照常规方法, 按照 ECL 免疫印迹检测试剂盒说明的方法进行显色、曝光.

2 结 果

2.1 过表达 PKC α 的人正常肝细胞模型的建立

通过 Lipofect 脂质体转染方法将 pXJ41-neo、pXJ41-PKC α 分别转染人正常肝细胞, 经 G418 筛选后挑选含有 PKC α (命名为 LT3) 和含有空载体 (命名为 LTC) 的阳性克隆进行扩大培养. 进一步分别提取 L-02、LTC、LT3 细胞中总 RNA 和蛋白质分别进行 RT-PCR 和免疫印迹分析, RT-PCR 结果显示与对照组细胞 LTC 相比, LT3 细胞 PKC α 的 mRNA 水平升高 (图 1a), 蛋白质印迹结果显示, LT3 细胞中 PKC α 蛋白水平升高 (图 1b), 表明已获得过表达 PKC α 的细胞模型.

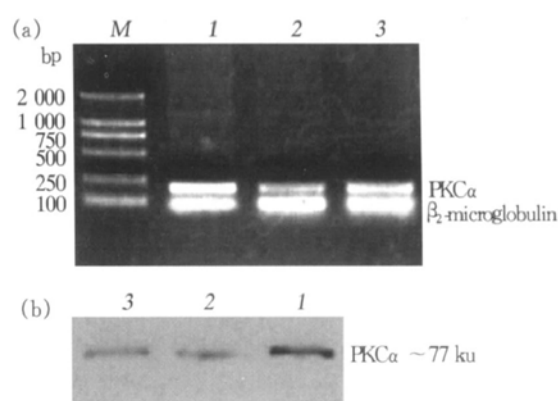


Fig 1 Identification of L-02 cells transfected with pXJ41-neo and pXJ41-PKC α plasmids

(a) RT-PCR analysis of PKC α gene expression, M: DL2000 marker; 1: LT3; 2: LTC; 3: L-02. (b) Western blot analysis for PKC α .

2.2 PKC α 对人正常肝和肝癌细胞生长的影响

生长曲线表明, 与对照组相比, 过表达 PKC α 的人正常肝细胞 LT3 生长速率增加. 至第 3 天细胞生长速率增加了 30.4% ($P < 0.1$) (图 2a); 而表达反义 PKC α 的人肝癌细胞 HT6 则生长明显被抑制, 至第 4 天细胞生长被抑制了 58.7% ($P < 0.05$) (图 2b).

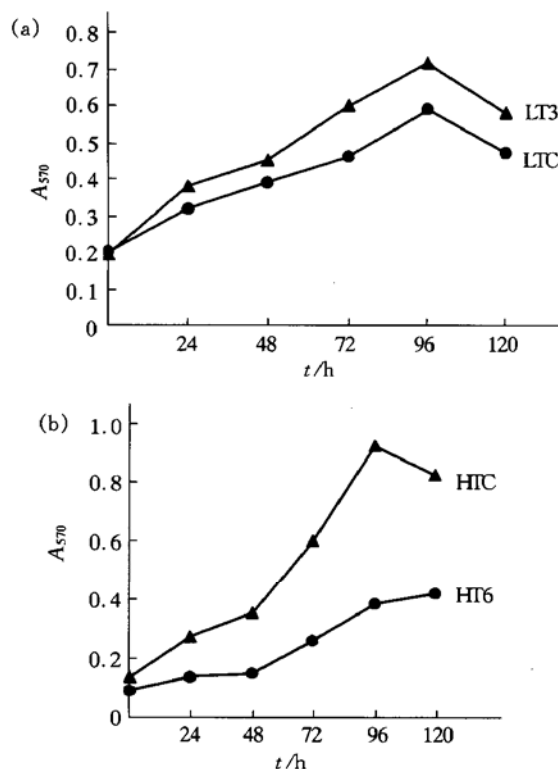


Fig 2 Growth curve of the cells

(a) L-02 cells, transfected with pXJ41-neo (LTC) or with pXJ41-PKC α (LT3); (b) BEL-7402 cells, transfected with pXJ41-neo (HTC) or with pXJ41-PKC α (HT6).

2.3 PKC α 对 Ha-ras 基因表达的影响

运用 RT-PCR 检测和经内参 (β_2 -微球蛋白) 校正, 与对照组相比, 过表达 PKC α 的人正常肝细

胞 LT3 中 Ha-ras 基因表达增强 (图 3a); 而表达反义 PKC α 的人肝癌细胞 HT6 中 Ha-ras 基因表达则受到抑制 (图 3b)。

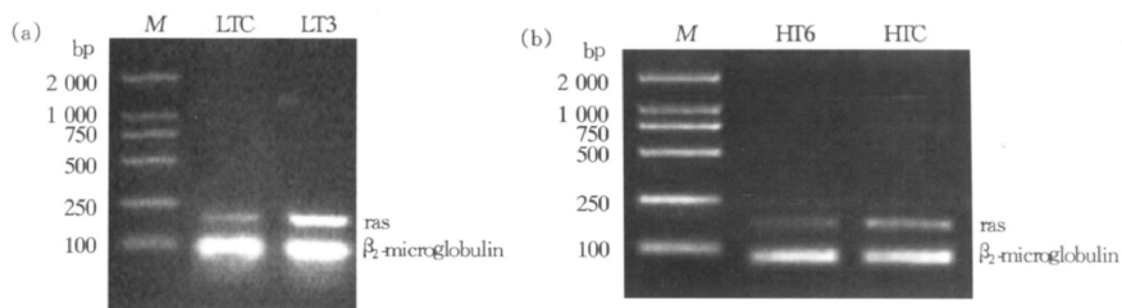


Fig. 3 RT-PCR analysis of Ha-ras gene expression

M: DL2000 marker; (a) L-02 cells, transfected with pXJ41-neo (LTC) or with pXJ41-PKC α (LT3); (b) BEL-7402 cells, transfected with pXJ41-neo (HTC) or with pXJ41-CKPa (HT6).

2.4 PKC α 对 Ha-ras 启动子活性的影响

为了观察 PKC α 对 Ha-ras 基因表达水平的影响是否与其作用于 Ha-ras 启动子活性有关, 首先构

建了真核表达载体 pras-GL3, 将 ras 启动子置于报告基因荧光素酶 cDNA 片段的上游 (图 4), 经脂质体转染技术瞬时转染细胞, 在以 β -半乳糖苷酶为

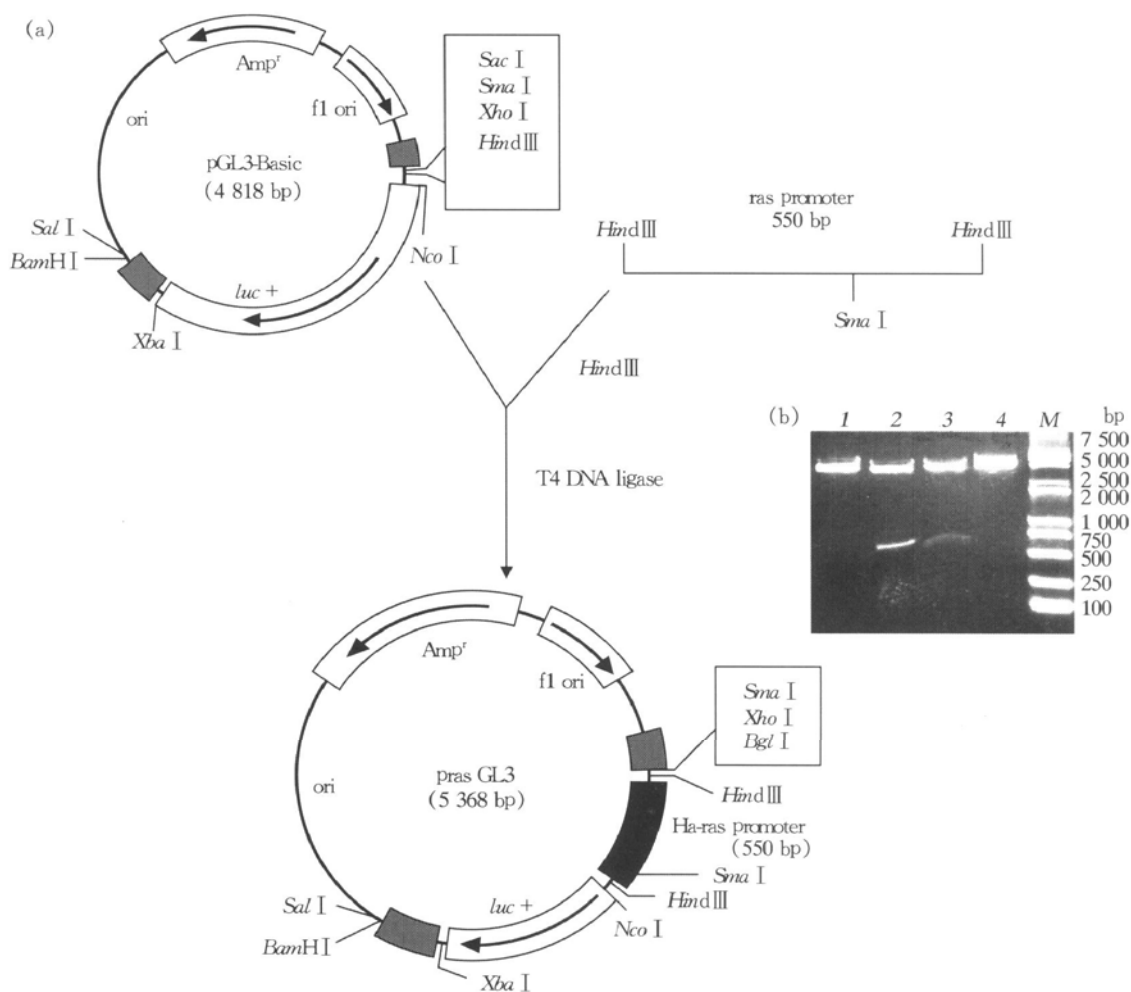


Fig. 4 Construction of prasGL3 recombinant plasmid with Ha-ras gene promoter

(a) schedule for construction of prasGL3; (b) restriction enzyme analysis. 1: prasGL3/Xba I; 2: prasGL3/Hind III; 3: prasGL3/Sma I; 4: pGL3-Basic/BamHI, M: DL 15 000 & DL 2 000 marker.

内参的条件下, 通过荧光素酶活性检测表明, 与对照组相比, 过表达 PKC α 的人正常肝细胞 LT3 中 Ha-ras 启动子活性升高了 182.63% (图 5a); 而表达反义 PKC α 的人肝癌细胞 HT6 中 Ha-ras 启动子活性被抑制了 64.86% (图 5b).

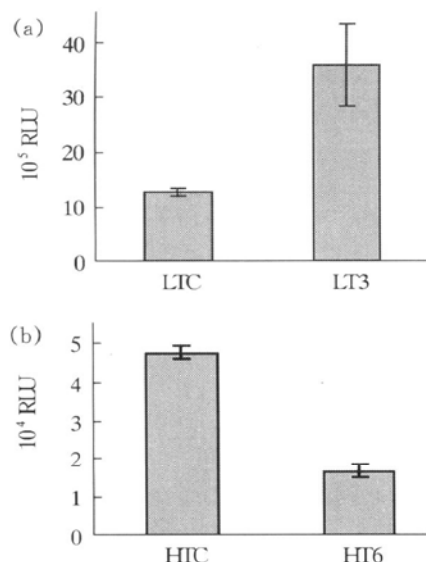


Fig. 5 Effect of PKC α on Ha-ras promoter activity by using luciferase assay

(a) L-02 cells, transfected with pXJ41-neo (LTC) or with pXJ41-PKC α (LT3); (b) BEL-7402 cells, transfected with pXJ41-neo (HTC) or with pXJ41-CKPa (HT6).

3 讨 论

我们采用过表达 PKC α 的人正常肝细胞和表达反义 PKC α 的人肝癌细胞模型研究了 PKC α 亚类对 ras 基因表达及其启动子活性的影响, 发现在过表达 PKC α 的 LT3 细胞中增殖速率加快, 而在表达反义 PKC α 的人肝癌细胞 HT6 中增殖被抑制. 为了进一步探讨 PKC α 与癌基因 Ha-ras 的相互作用关系, 我们运用 RT-PCR 和荧光素酶报告系统, 检测了在上述细胞模型中 Ha-ras 的基因表达水平和启动子活性. 实验结果表明, 过表达 PKC α 能引起 Ha-ras 基因转录水平的上升和启动子活性的升高; 反之, 表达反义 PKC α 的 BEL-7402 细胞中 Ha-ras 基因转录水平下降, 启动子活性降低. 我们首次观察到 PKC α 亚类对癌基因 Ha-ras 表达的影响, 与其对 Ha-ras 启动子的作用有关.

PKC 与 p21^{ras} 均为细胞内重要的信号传递系统, 在细胞信号转导途径中都位于与质膜相结合的酪氨酸蛋白激酶的下游, 但是有关它们在细胞内相对位置及功能的相互关系报道尚有争议. 已有研究表明存在两种可能性, 一是在一共同的信号通路中

PKC 与 p21^{ras} 可能是上下游的关系^[8], 另一种可能是这两种通路同时存在, 以各自独特又彼此依赖的方式行使功能^[9]. PKC 介导了 ras 基因促增殖与转化作用, 当 PKC 高于阈值, ras 表现转化活性, 已有研究表明用活化的 v-ras 基因转化真核细胞, 转化表型的形成需要功能性的 PKC α 的存在. 提示了癌基因 ras 功能的发挥需要通过 PKC 信号通路介导^[10], 另外高表达 PKC β I 的大鼠成纤维细胞对活化 Ha-ras 的转化非常敏感, 表明 PKC 介导了 Ha-ras 引起的某些细胞转化效应. 我室已有的研究表明在表达反义 PKC α 的肺癌 LTP α 2 细胞中, 当 PKC α 活性被抑制时, 可显著降低 Ha-ras 基因的 mRNA 水平^[11].

PKC 能增强转录因子 AP1 和 AP2 的活性^[12,13], 在稳定过表达 PKC α 的人胚肺细胞中 AP-1 活性升高^[14], AP-1 转录因子可识别一些基因启动子区中 TRE (TPA response element, TPA 应答序列) 序列, 激活基因转录. 而转录因子 AP2 在 PKC 调节基因转录过程中的作用也不容忽视. 已有报道, PKC 激活剂 PMA 处理 HL-60 细胞 1 h 后显示 AP2 活性显著增强. 另外 PMA 长期处理 B16 黑色素瘤细胞导致胞内 cPKCs 和 nPKCs 下调, 并发现上游连接有酪氨酸酶启动子的报告基因表达明显下降^[15], 而酪氨酸酶基因启动子就含有 AP2 结合位点. 此外, 另有报道转录因子 Sp1 可能通过 PMA-PKC 对某些基因进行转录调控. D'Angelo 等^[16]报道 PMA 刺激血小板血栓烷受体 (platelet thromboxane receptor) 基因的转录, 是通过转录因子 Sp1 介导的. 同样, Ries 等^[17]报道, 通过 LAL (lysosomal acid lipase) 缺失突变分析, 发现 PMA-PKC 对 LAL 基因的转录调控作用部分是由 Sp1 介导的. 通过对 Ha-ras 启动子序列分析发现, 该启动子序列包含 6 个转录因子 Sp1 的结合部位, 此外还发现三个 AP2 结合位点及两个 NF- κ B 结合位点. 因此进一步研究 Sp1, AP2 及可能存在的一些未知转录因子, 在 PKC 调节 Ha-ras 基因转录过程中的作用, 对理解 Ha-ras 基因的转录调控机理无疑会有重要意义. 但迄今为止均未见到 PKC 特别是 PKC α 亚类通过作用于这些转录因子对 Ha-ras 基因进行调节的报道. 我们的实验首次显示出 PKC α 亚类可能通过对 Ha-ras 启动子活性的影响, 参与了 Ha-ras 基因的转录调节, 而这种调节作用是否与 PKC α 作用于 Ha-ras 启动子结合蛋白有关, 值得进一步探讨.

参 考 文 献

- 1 Blumberg P M. Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: sixth Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res*, 1988, **48** (1): 1~ 8
- 2 Kolch W, Heidecker G, Kochs G, *et al.* Protein kinase C α activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature*, 1993, **364** (6434): 249~ 252
- 3 Wang X Y, Liu H T. Differentiation of human hepatoma cells induced by the expression of antisense PKC α . *Prog Nat Sci*, 1998, **8** (3): 335~ 341
- 4 Duroux I, Godard G, Boidot-Forget M, *et al.* Rational design of point mutation selective antisense DNA targeted to codon 12 of H α ras mRNA in human cells. *Nucleic Acids Research*, 1995, **23** (17): 3411~ 3418
- 5 Oshevski S, Bousse-Kerdll MC L, Clay D, *et al.* Differential expression of protein kinase C isoform transcripts in human hematopoietic progenitors undergoing differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **263** (3): 603~ 609
- 6 贾西华, 肖成祖. MTT 法在微囊培养动物细胞计数中的应用. *军事医学科学院院刊*, 1993, **17** (3): 207~ 210
- 7 Jia X H, Xiao C Z. *Bull Acad Mil Med Sci*, 1993, **17** (3): 207~ 210
- 7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 808~ 809
- 8 Szamel M, Resch E. T-cell antigen receptor-induced signal - transduction pathways activation and function of protein kinase C in T lymphocytes. *Eur J Biochem*, 1995, **228** (2): 1~ 15
- 9 Krook A, Rapoport M J, Anderson S, *et al.* p21 and protein kinase C function in distinct and interdependent signaling pathways in C3H10T1/2 fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 1993, **13** (3): 1471~ 1479
- 10 Hsiao W L, Housey G M, Johnson M D, *et al.* Cells that overproduce protein kinase C are more susceptible to transformation by an activated H α ras oncogene. *Mol Cell Biol*, 1989, **9** (6): 2641~ 2647
- 11 Wang X Y, Elizabeth R, Liu H T. Antisense inhibition of protein kinase C α reverses the transformed phenotype in human lung carcinoma cells. *Exp Cell Res*, 1999, **250** (1): 253~ 263
- 12 Imagawa M, Chiu R, Karin M. Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: protein kinase C and cAMP. *Cell*, 1987, **51** (2): 251~ 260
- 13 Lee W, Haslinger A, Karin M, *et al.* Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallo thionein gene and SV40. *Nature*, 1987, **325** (6102): 368~ 372
- 14 王向阳, 柳惠图. PKC α 对人胚肺细胞增殖相关基因表达及 AP-1 活性的影响. *科学通报*, 1997, **13** (42): 1444~ 1447
- 15 Wang X Y, Liu H T. *Chin Sci Bull*, 1997, **13** (42): 1444~ 1447
- 15 Watters D J, Parsons P G. Critical targets of protein kinase C in differentiation of tumour cells. *Biochem Pharmacol*, 1999, **58** (3): 383~ 388
- 16 D'Angelo D D, Oliver B G, Davis M G, *et al.* Novel role for Sp1 in phorbol ester enhancement of human platelet thromboxane receptor gene expression. *J Biol Chem*, 1996, **271** (8): 19696~ 19704
- 17 Ries S, Buchler C, Langmann T, *et al.* Transcriptional regulation of lysosomal acid lipase in differentiating monocytes is mediated by transcription factors Sp1 and AP2. *J Lipid Res*, 1998, **39** (11): 2125~ 2134

Effect of PKC α on H α ras Gene Promoter Activity in Human Normal Liver and Hepatoma Cell Lines*

FENG Yi, LIU Hu-Tu**, GAO Ping

(Key Laboratory of Cell Proliferation and Regulation Biology of Ministry of Education,
College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract The human normal liver cells (L-02) were transfected with plasmid pXJ41-neo and pXJ41-PKC α respectively by lipofectamine agent and were selected positive clones by using G418. The analysis of RT-PCR and Western blot showed that the cell model overexpressing PKC α was constructed successfully. In contrast of control cells (LTC) transfected with pXJ41-neo, the PKC α overexpressing cells (LT3) have enhanced growth rate. The RT-PCR analysis showed that the LT3 cells have elevated transcription level of H α ras gene and the luciferase assay showed that H α ras gene promoter activity increased, in which the pGL3 plasmid containing H α ras promoter was constructed. On the contrary, the BEL-7402 cells (HT6) transfected with antisense PKC α displayed the decrease of growth rate, H α ras gene transcription level and H α ras promoter activity compared with the control cells (HTC). The results suggested that the effect of PKC α isoform on H α ras oncogene expressing was related with the H α ras promoter activity. It seems that PKC α play a positive role in H α ras gene expressing regulation.

Key words protein kinase C α , human normal liver cell L-02, human hepatoma BEL-7402 cell, H α ras gene promoter

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (39870366).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62209699, E-mail: liuhuitu@bnu.edu.cn

Received: March 26, 2002 Accepted: April 28, 2002