

肝癌细胞 AFP 基因高水平的转录 是受核蛋白成分的促进

刘海湖 申庆祥 王蘅文

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)

摘要 利用大鼠甲胎蛋白(AFP)基因片段作为模板,分析大鼠肝癌细胞核蛋白成分对体外转录活性的影响,发现大鼠肝癌含有促进 AFP 基因体外转录的核蛋白。作为对照,没有发现任何成年大鼠肝核蛋白可以促进 AFP 基因的体外转录。为了确定促进 AFP 基因体外转录的核蛋白作用部位,对 AFP 基因模板 5'端上游序列进行了不同程度的删除,进一步分析核蛋白对删掉 5'端上游序列后的模板体外转录的影响,结果表明,AFP 基因转录的起始点到-255bp 这段 DNA 序列是大鼠肝癌核蛋白促进 AFP 基因转录必不可少的。以 SV40 DNA 经 Pst I 酶酶切所得的 DNA 片段(1216bp 和 4027bp)代替 AFP 基因片段作为模板,不存在核蛋白促进体外转录的现象。用 AFP 基因转录的起始点到-255bp 这段的 DNA 为探针,进行 Southwestern 印迹分析,结果发现了 8 种与探针结合的核蛋白。

关键词 AFP 基因,促进转录,大鼠肝癌,结合蛋白

AFP 是胚胎时期的一种主要的血清蛋白。在肝癌中,它的含量也很高^[1]。但在成年动物或人肝中,它的含量降至残迹水平。在我国,血清 AFP 含量的多少,早已作为可靠的指标,应用于人肝细胞癌的普查和临床诊断。大量研究证实,AFP 基因不同水平表达的调控发生在基因转录水平^[2]。我们曾比较了正常大鼠肝和大鼠肝癌细胞染色质体外转录 AFP 基因的水平,发现肝癌细胞染色质的转录远远高于正常肝^[3]。这个实验表明,肝癌细胞染色质包含促进 AFP 基因转录的因子。近年来,越来越多的人集中力量研究 AFP 基因 5'端上游调控序列对肝癌细胞 AFP 基因表达的作用,发现有些序列对肝癌细胞 AFP 基因的转录有促进作用^[4]。但是这些发现还不能解释 AFP 基因序列相同的正常肝与肝癌何以表现出完全不同的基因转录水平。

我们用柱层析分步洗脱法分离大鼠肝癌细胞核蛋白,并制备具有不同长度上游和编码序列的 AFP 基因片段,在体外转录系统中分析核蛋白部分对不同基因片段转录的作用,发现某些核蛋白,通过和近转录起始点上游一段序列的相互作用,突出地促进 AFP 基因片段的转录。用含有近转录起始点上游这段序列作探针,进行 Southwestern 印迹分析,找出了与其作用的核蛋白。

1 材料和方法

1.1 核提取物的制备与分离

国家自然科学基金资助。

本文于 1993 年 12 月 10 日收到。

制备核提取物的材料为大鼠肝癌 AH66, 整个制备均在 0—2℃ 进行。按分离大鼠肝细胞核的方法^[3]分离肝癌细胞核。悬浮核在 4mmol/L HEPES(pH7.9), 114mmol/L KCl, 48mmol/L MgCl₂, 0.1mmol/L EDTA, 1mmol/L DTT, 25% 甘油液中, 调 (NH₄)₂SO₄ 浓度到 0.36mol/L, 同时不断搅拌, 使核蛋白释出, 150 000g 离心 80 分钟, 使 DNA 及其他杂质沉淀, 吸取上清液, 加固体 (NH₄)₂SO₄ 0.4g/ml, 并不断搅拌, 使核蛋白沉淀。离心收集核蛋白, 溶于 25mmol/L HEPES(pH7.9), 0.1mmol/L EDTA, 1mmol/L DTT, 25% 甘油液中, 对此液透析, 然后上 DE-52 柱, 依次以含 0.1mol/L, 0.25mol/L, 0.6mol/L KCl 的缓冲液洗脱并收集。

1.2 体外转录分析

体外转录反应参照 Heberlein 等人所述方法进行^[6]。体外转录反应液含有 25mmol/L HEPES(pH7.9), 70mmol/L KCl, 5mmol/L MgCl₂, 4 种三磷酸核苷酸, 其中 3 种各为 0.5mmol/L, 另一种为 0.05mmol/L 未标记物和 200μ Ci/ml (α-³²P)UTP, 3 000Ci/mmol 或 (α-³⁵S)ATP, 600Ci/mmol Amersham 标记物, 0.05mmol/L EDTA, 0.6mmol/L DTT, 12.5μg/ml 模板 DNA, 作为 RNA 聚合酶 I 来源的大鼠肝癌或肝细胞核蛋白部分及被分析的核蛋白部分。于 30℃ 温浴 45 分钟, 一部分反应液点到 DE81 纸片上, 经洗后测量同位素脉冲数。另一部分经酚和氯仿提取, 沉淀样品, 在含 7mol/L 尿素的 5% 聚丙烯酰胺胶上电泳, 然后作放射自显影。

1.3 AFP 基因转录产物与 AFP 基因片段的杂交

用 AFP 基因片段为模板, 参照体外转录分析一节中所述方法制备体外转录产物, 用作探针, 按文献[6]所述方法进行杂交实验。

1.4 Southwestern 印迹分析

Southwestern 印迹分析是按 Kenji 等人的作法^[7]。50μg 左右的蛋白进行电泳, 再转到硝酸纤维膜上。然后与 ³²P 标记的 +2 到 -255bp 基因 DNA 片段结合, 经洗后进行放射自显影。

2 结果与讨论

2.1 核蛋白部分的制备

在含 SDS 的 12% 聚丙烯酰胺胶上电泳分析肝癌细胞 3 个核蛋白部分。从图版 I-A 可见, 3 个部分的蛋白组成和含量的相对比例均不相同。从体外转录角度分析, 各核蛋白部分可能含有不同质和量的体外转录所需的成分。图版 I-D 显示了各核蛋白部分与 +2 到 -255bp 基因片段结合的蛋白带。从图中可以看出结合蛋白在各核蛋白部分中的分布是不一样的。有的甚至只分布在一种核蛋白部分里。这样就可以通过体外转录系统分别检测各核蛋白部分及其合并物对模板转录的作用。找到具有促进作用的最短模板及其结合蛋白。

2.2 促进 AFP 基因转录的核蛋白存在

将大鼠肝癌细胞核的 3 种蛋白组分分别或合并进行 AFP 基因体外转录分析。0.1mol/L KCl 缓冲液洗脱部分有低的转录活性, 这是因为少量 RNA 聚合酶 II 混入其中所致。0.25mol/L KCl 缓冲液洗脱部分显示较高的转录活性, 这是 RNA 聚合酶 II 所引

起。按洗脱缓冲液中 KCl 浓度, RNA 聚合酶 I 也应该存在于这部分蛋白之中。0.6mol/L KCl 缓冲液洗脱部分很少有转录活性。三部分合并物显示极高的转录活性, 比三部分单独转录活性的总和高出 4—8 倍。当提高合并物中 0.1mol/L 和 0.6mol/L KCl 缓冲液洗脱部分的浓度, 降低 0.25mol/L KCl 缓冲液洗脱部分的浓度时, 高出的倍数就更多, 在有的实验中, 高达 108 倍(数据未出示)。这些事实充分表明, 0.1mol/L 和 0.6mol/L KCl 缓冲液洗脱部分含有促进 AFP 基因转录的蛋白因子。表 1 显示出一组实验结果。三部分合并物的转录活性比三部分单独转录活性的总和高出近 7 倍。转录产物的放射自显影结果(未出示)与同位素测量结果完全一致。

表 1 大鼠肝癌核蛋白部分和它们合并物的体外转录活性*

Table 1 Transcription activity of fractions and their reconstitution from rat hepatoma AH66 nuclei extract

Type	A	B	C	D
Transcription activity(cpm)	85	1 187	10	8 522

* : A, B and C. fractions, D. reconstitution

图版 I-B 示以 AFP 基因片段模板在肝癌细胞核蛋白部分合并物作用下转录产物与 3 600bp 长的 AFP 基因片段杂交, 而它不与 pUC19 DNA 杂交。杂交实验表明体外转录系统真实地转录 AFP 基因模板。

2.3 核蛋白通过近基因启动区 DNA 序列促进 AFP 基因的转录

用同样的方法, 不同模板的体外转录结果表明, 含有 AFP 基因起始点上游近 8 000bp, 1 400bp 和 255bp 的模板都能保证促进 AFP 基因的转录。唯有仅含 AFP 基因起始点上游 55bp 的模板不具备这种功能。显然, 某些核蛋白通过 AFP 基因起始点上游的 -55bp 到 -255bp 之间 DNA 序列促进 AFP 基因的转录。

2.4 核蛋白促进 AFP 基因转录的专一性

AFP 基因模板在正常成年大鼠肝核蛋白的三个部分及它们的合并物作用下的体外转录结果表明, 合并物的转录活性不高于三部分单独转录活性的和。说明正常成年大鼠肝没有促进 AFP 基因转录的核蛋白, 这种核蛋白只存在于肝癌细胞中。表 2 列出一组用同样模板检测成年大鼠肝核蛋白的结果。转录产物电泳条带的放射自显影(未显示)与表 2 的结果完全一致。

表 2 正常成年大鼠肝核蛋白部分和它们合并物的体外转录活性*

Table 2 Transcription activity of fractions and their reconstitution from rat liver nuclei extract

Type	A	B	C	D
Transcription activity(cpm)	159	1 252	70	1 399

* : A, B and C. fractions, D. reconstitution

以 SV40 DNA 经 Pst I 酶切所得 DNA 片段(1 216bp 和 4 027bp)作模板, 进行体外转录活性分析, 如表 3 所示, 肝癌细胞核蛋白的三个部分合并物的转录活性不高于三部分核蛋白单独转录活性之和, 表明肝癌细胞促进 AFP 基因转录的核蛋白对 SV40 DNA 片

段模板没有作用,它们只作用于 AFP 基因片段的模板上。转录产物电泳条带的放射自显影(未出示)结果与此完全一致。

表 3 SV40 DNA 片段为模板时,肝癌细胞核蛋白部分及它们的合并物体外转录活性*

Table 3 Transcription activity of fractions and their reconstitution from hepatoma AH66 nuclei extract to SV40 DNA fragment template

Type	A	B	C	D
Transcription activity(cpm)	5 307	23 203	2 147	18 889

* : A, B and C. fractions, D. reconstitution

2.5 基因启动区及上游 DNA 序列结合的核蛋白

真核基因表达调控的研究结果表明,促进基因转录的 DNA 序列和与它结合的核蛋白一起完成基因转录。为了探查这些核蛋白,以+2 到-255bp 基因 DNA 片段为探针,进行 Southwestern 印迹分析,结果发现了 8 条肝癌细胞核蛋白带。其中 3 条主蛋白带,其分子量为 89,50 和 41kDa。5 条次蛋白带,分子量为 111,101,65,35 和 30kDa。正常肝细胞与肝癌细胞的情况完全不同,隐约看到分子量为 36kDa 的蛋白带(图版 I-C)。这些结合蛋白与基因转录的关系,显然是非常密切的。它们是否能促进基因的转录,有待进一步研究。但是,从以上实验结果可以推测,某些核蛋白能够促进肝癌细胞中 AFP 基因的转录。在肝癌细胞核蛋白的 3 个部分中,主蛋白和 65kDa 次蛋白都存在。主要分布在 0.1mol/L 和 0.25mol/L KCl 缓冲液洗脱部分中。在正常肝对照中,多出一条 33kDa 蛋白带(图版 I-D)。与总核蛋白的结果比较,有些次蛋白未被检测到,可能因分布分散或更复杂的原因所致。另有些次蛋白带更加明显,可能因分布集中造成。

以上结果表明,大鼠肝癌细胞中存在着促进 AFP 基因转录的核蛋白成分。Southwestern 印迹法探查到 8 种,可供进一步筛选。这些在正常大鼠肝中不存在,因此必定产生于肝癌形成过程中。同时实验结果也表明核蛋白成分通过 AFP 基因启动区及 5'端上游近起始点序列促进该基因的转录,而它们对非 AFP 基因的 SV40 DNA 片段模板不起作用,所以这种核蛋白成分有一定的专一性。核蛋白成分如何促进 AFP 基因转录及它们与肝癌形成的关系等,有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1]Abelev G I. Adv Cancer Res, 1971, 14:295-355.
- [2] Tilghman S M & Belayew A. Proc Natl Acad Sci USA, 1982, 79:5254-5257.
- [3]刘海潮等. 实验生物学报, 1986, 19:31-38.
- [4]Guertin M *et al.*. Mol Cell Biol, 1988, 8:1398-1407.
- [5]Heberlein U *et al.*. Cell, 1985, 41:965-977.
- [6]Maniatis T *et al.* A laboratory manual "Molecular cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, pp. 324-328.
- [7]Kenji M *et al.* J Biol Chem. 1989, 264:4599-4604.

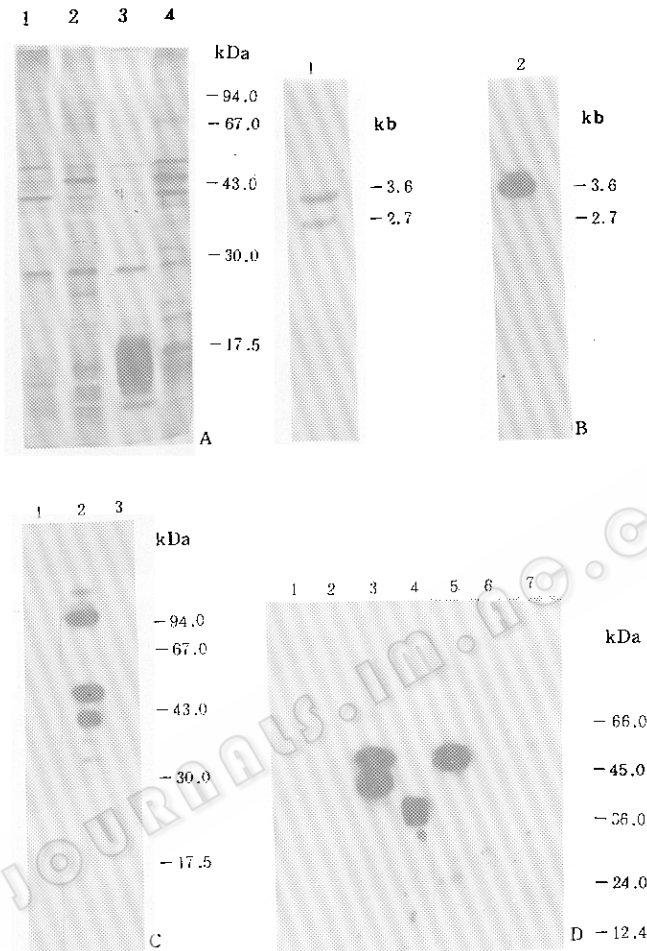
The Nuclear Proteins Direct Activation of α -fetoprotein Gene in Rat Hepatoma AH66

Liu Haihu Shen Qingxiang Wang Hengwen

(Shanghai Institute of Cell Biology, Academia Sinica, Shanghai 200031)

Abstract The presence of the nuclear proteins directing activation of α -fetoprotein (AFP) gene was examined by stimulation of transcription of run-off AFP gene in an *in vitro* transcription system. The results indicated that nuclei of hepatoma AH66 contain some proteins which stimulate transcription of run-off AFP gene in an *in vitro* system. In contrast, adult rat liver nuclei were devoid of any stimulatory function. To define the functioning site of stimulatory proteins, 5' flanking region of the run-off AFP gene template was subjected to deletion analyses. The experiments indicated that only the sequence between the transcription initiation site of AFP gene and -255bp of gene was required for high-level stimulation by nuclear proteins. PstI cleaved SV40 DNA instead of AFP gene template had no stimulatory action. We undertook Southwestern blot assays using the sequences from the transcription initiation site of AFP gene to -255bp of the gene as probe. The results showed that there were eight binding-proteins in the nuclear proteins of hepatoma AH66.

Key words AFP gene, stimulation transcription, rat hepatoma, binding-protein



A. SDS-PAGE of the fractions from rat hepatoma AH66 nuclei extract.

1, 2 and 3 were eluted successively with 0.1 mol/L, 0.25 mol/L and 0.6 mol/L KCl buffer, and 4 was total protein. Their amount was about 50 μ g respectively.

B. Hybridization analyses of transcription products.

The mixture of 3.6 kb AFP gene fragments and pUC19 DNA (2.7 kb) were transferred to the filter after separation by electrophoresis 1, and hybridized with 32 P-labelled transcription products. The radiolabelled band was identified by autoradiography 2.

C. Southwestern blot assay of nuclear proteins.

1. Adult rat liver; 2. Rat hepatoma AH66; 3. The group of proteins as negative control.

D. Southwestern blot assay of nuclei-protein fractions.

1 was the group of the proteins, as negative control, 2, 4 and 6 were fractions of rat liver extract eluted by 0.1 mol/L, 0.25 mol/L, 0.6 mol/L KCl buffer respectively, 3, 5 and 7 were fractions of hepatoma extract eluted by 0.1 mol/L, 0.25 mol/L and 0.6 mol/L KCl buffer respectively.