

胃癌细胞中 AP-1 活性与 RAR α 介导的相关性*

吴 乔 陈正明 苏文金

(厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

摘要 为确定全反式视黄酸(A TRA)抑制胃癌细胞 AP-1 活性过程中 RAR α 介导的作用机理, 利用 Northern 印迹和 Western 印迹测定 RAR α 基因和 cJun、cFos 蛋白表达水平; 氯霉素乙酰转移酶活性(CAT)分析 AP-1 活性; 以及 MTT 法检测细胞生长速率. 结果表明, A TRA 能够诱导 RAR α 表达, 抑制 cJun 和 cFos 蛋白表达和 AP-1 活性, 由此导致胃癌细胞生长抑制. 结果证实, A TRA 抑制胃癌细胞 AP-1 活性是抑制细胞生长的重要途径之一, 并与 RAR α 介导密切相关.

关键词 AP-1 活性, RAR α , cJun/cFos, 全反式视黄酸, 胃癌细胞

中图分类号 Q 753, Q 228

Relationship Between AP-1 Activity and RAR α Involvement in Gastric Cancer Cells*

WU Qiao, CHEN Zhengming, SU Wenjin

(The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract To determine the mechanism of RAR α involvement when AP-1 activity was inhibited by all-*trans* retinoic acid (A TRA) in gastric cancer cells, expressions of RAR α gene and cJun and cFos protein were detected by Northern blot and Western blot. AP-1 activity was measured by CAT assay, and the inhibitory rate was analyzed by MTT method. The results showed that expression of RAR α was induced after treatment of gastric cancer cells with A TRA, A TRA inhibited expression of cJun and cFos, as well as AP-1 activity, which led to growth inhibition of gastric cancer cells. The data indicate that inhibition of AP-1 activity by A TRA is one of important pathway to inhibit growth of gastric cancer cells, and RAR α involves in A TRA action.

Key words AP-1 activity, RAR α , cJun/cFos, All-*trans* retinoic acid, Gastric cancer cell

AP-1 (activator protein-1) 是一种转录因子, 其主要组成成分是癌蛋白 cJun 和 cFos^[1], 它们形成同源二聚体(cJun/cJun) 或异源二聚体(cJun/cFos) 而结合到含有 AP-1 位点的 DNA 序列上(如 TPA 应答元件, 胶原酶启动子), 由此激活 AP-1 的转录活性^[2]. 一些促有丝分裂剂, 如 TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)、表皮生长因子(EGF) 和胰岛素样生长因子(IGF) 通过激活 AP-1 刺激细胞生长, 导致细胞转化. 另一些激素, 如甲状腺激素、雌性激素、糖皮质激素以及视黄酸通过抑制 AP-1 而阻止 TPA、EGF 和 IGF 的作用, 这对于调节细胞生长和分化具有重要意义.

视黄酸 (retinoic acid, RA) 作用主要由其受体 RARs (retinoic acid receptors) 和 RXRs (retinoid X receptors) 介导^[3]. 这些受体属于类固醇/甲状腺激

素受体超家族成员, 由 3 种不同基因 α 、 β 和 γ 编码, 形成不同的受体亚类, 发挥不同的功能. RARs 通过与 AP-1 蛋白之间的相互作用抑制其结合到特异的 DNA 序列上. 近来的研究还表明, CBP (cAMP response element-binding protein) 作为共同激活因子参与 AP-1 活性的抑制过程^[4]. 然而, 它们之间的交叉通讯 (cross-talk) 机制至今仍未阐明.

胃癌是中国的主要癌症之一. 我们已报道 RA 可以通过诱导细胞分化和调节细胞周期等途径抑制

* 国家自然科学基金 (39880015) 和国家杰出青年科学基金 (B 类) (39825502) 资助

联系人: 吴乔, 女, 1959 年 5 月生, 博士, 副研究员

Tel: (0592) 2182542, Fax: (0592) 2086630

E-mail: XGWU@XMU.EDU.DN

收稿日期: 1999-11-24, 修回日期: 2000-02-16

胃癌细胞生长,并可能与RAR α 和RAR β 的诱导相关^[5]。RA与胃癌细胞AP-1活性的相关性未见报道,本文探讨RA抑制AP-1活性的可能性,以及RAR α 介导的分子机理。结果证实RA抑制AP-1活性可能是其抑制胃癌细胞生长的重要途径之一。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和药物处理

四株胃癌细胞均用RPMI-1640培养液培养。细胞接种24 h后加入全反式视黄酸(all-trans retinoic acid, ATRA, Sigma)处理。MGC80-3细胞由厦门大学抗癌中心提供, BGC-823、SGC-7901和MKN-45细胞购于上海细胞所细胞库。

1.2 报告基因质粒和各种表达质粒

报告基因(-73Col-CAT)是CAT(chloramphenicol acetyltransferase)基因连接的胶原酶(collagenase)启动子,其上存在一个AP-1结合位点,位于-63和-73残基之间。此报告基因通常被用以测定AP-1活性^[1]。RAR α cJun和cFos表达质粒的构建参见文献[1]。

1.3 DNA瞬时转染和CAT活性测定

将报告基因、相关表达质粒(如RAR α 或cJun和cFos等)和 β 半乳糖苷酶表达质粒(Pharmacia)等通过脂质体介导法(根据Gibco/BRI操作程序)瞬时转染到细胞中,转染后分别加入TPA(100 μ g/L)或/和ATRA(1 μ mol/L)处理细胞24 h,再测定 β 半乳糖苷酶活性和CAT活性^[6]。

1.4 RNA提取和Northern印迹

硫氰酸胍-氯化铯离心法提取总RNA,以 α -³²P-dATP和 α -³²P-dCTP(北京亚辉生物公司)标记DNA探针,按常规方法进行Northern印迹^[6]。

1.5 蛋白裂解液制备和Western印迹

常规方法制备细胞裂解液^[5], SDS-PAGE, 蛋白转膜后与相应抗体(Santa Cruz)温育, ECL试剂盒(Amersham)显示蛋白。

1.6 基因转染和稳定表达

脂质体介导法将反义RAR α 转染到BGC-823细胞, G418筛选细胞, Northern印迹方法确定RAR α 基因在细胞中的表达。

1.7 细胞生长速率测定(MTT法)

10⁻⁶ mol/L ATRA连续处理细胞9 d, MTT(3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma产品)染色细胞, 酶标仪上测定细胞反应液的A₅₇₀值, 计算细胞生长相对速

率^[5]。

2 结 果

2.1 ATRA对胃癌细胞AP-1活性的抑制

我们的研究已表明,在10⁻⁶ mol/L ATRA作用下,胃癌细胞MGC80-3、BGC-823和SGC-7901的生长抑制率分别为53.20%、61.03%和33.50%,但是,ATRA不能抑制MKN-45细胞生长,抑制率仅为3.87%^[10]。为了确定ATRA对胃癌细胞AP-1活性抑制的可能性,我们将报告基因瞬时转染细胞。CAT测定表明,在MGC80-3、BGC-823和SGC-7901细胞中,ATRA可以抑制TPA诱导的CAT活性,抑制作用随ATRA浓度增加而加强,而在MKN-45细胞中,ATRA不能抑制TPA诱导的CAT活性(Fig. 1)。结果与ATRA对胃癌细胞生长抑制的结果吻合,提示ATRA抑制AP-1活性可能与其抑制胃癌细胞生长密切相关。

2.2 RAR α 介导ATRA抗AP-1活性的作用

ATRA作用主要由其受体RARs和RXRs介导,为了确定受体介导的作用,我们首先检测RAR α 、RAR β 和RXR α 在细胞中的表达水平。Northern印迹分析表明,ATRA能够诱导MGC80-3、BGC-823和SGC-7901细胞RAR α 的表达,不能诱导MKN-45细胞RAR α 的表达。但是ATRA不能诱导四株细胞RAR β 和RXR α 的表达,尽管RAR β 在MKN-45细胞不表达(Fig. 2)。

以上结果提示,ATRA对RAR α 诱导可能与其抑制AP-1活性有关。为了证实这一可能性,我们将反义RAR α 和正义RAR α 分别转染BGC-823和MKN-45细胞并稳定表达。与各自对照组对比, BGC/aRAR α -6的RAR α 表达被抑制,ATRA不能诱导其表达;但MKN/RAR α -4的RAR α 表达增强,且ATRA诱导RAR α 表达(Fig. 3)。当报告基因瞬时转染细胞后,ATRA抑制BGC-823细胞的AP-1活性,但不能抑制BGC/aRAR α -6细胞的AP-1活性;相反,不能抑制MKN-45细胞的AP-1活性,而抑制MKN/RAR α -4细胞的AP-1活性(Fig. 4)。MTT测定证实,ATRA抑制BGC-823细胞生长,但不能抑制BGC/aRAR α -6细胞生长,抑制率从61.03%下降为18.4%;相反,ATRA不能抑制MKN-45细胞生长,而抑制MKN/RAR α -4细胞生长,抑制率从3.87%上升到31.7%。结果不仅表明RAR α 的介导作用,而且证实ATRA通过抑制AP-1活性而抑制胃癌细胞生长。

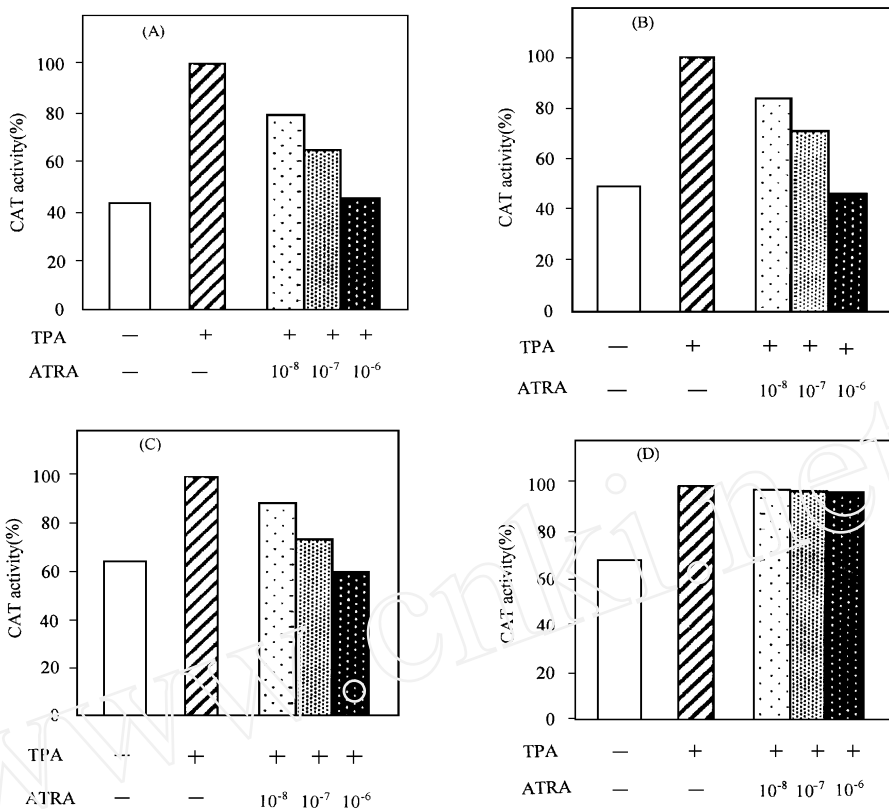


Fig 1 Inhibitory effect of ATRA on AP-1 activity in four gastric cancer cell lines (A) MGC80-3; (B) BGC-823; (C) SGC-7901; (D) MKN-45

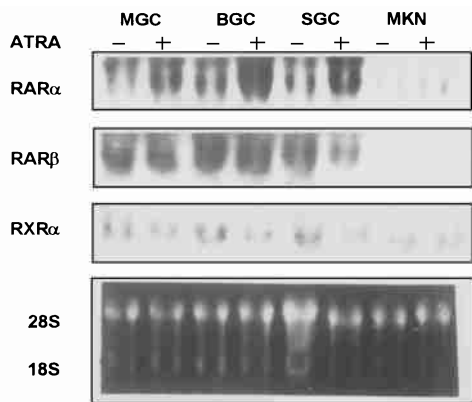


Fig 2 Expression of RAR α , RAR β and RXR α mRNA in four gastric cancer cell lines

2.3 ATRA 对 cJun 和 cFos 表达的调节

AP-1的主要成分是cJun和cFos蛋白。ATRA抑制胃癌细胞AP-1活性的结果提示, ATRA可能调节cJun和cFos水平。Western印迹分析表明, ATRA抑制MGC80-3、BGC-823和SGC-7901细胞的cJun表达,但不能抑制MKN-45细胞的cJun表达。cFos在MKN-45细胞中不表达, ATRA抑制MGC80-3、BGC-823和SGC-7901细胞cFos表达 (Fig 5)。

2.4 ATRA 对 HeLa 细胞的作用

宫颈癌HeLa细胞不表达内源性RARs和RXRs^[1], 因而我们利用它作为参照, 进一步证实



Fig 3 Expression of RAR α mRNA in BGC/aRAR α -6 and MKN/RAR α -4 cell lines

AP-1活性与RAR α 的相关性 CAT 测定显示, 当外源性RAR α 表达质粒不存在时, ATRA 只能轻微地抑制TPA 诱导的CAT 活性(抑制率约11%), 而当外源性RAR α 表达质粒转染细胞时, ATRA 则显著抑制TPA 诱导的CAT 活性(抑制率约62%) (Fig 6) 表明ATRA 可以通过RAR α 介导而加强对AP-1活性的抑制。

进一步观察cJun/cFos, RAR α 与AP-1活性之间的相关性 CAT 测定显示, 当外源性RAR α 表达质粒不存在时, ATRA 只能轻微地抑制cJun/cFos

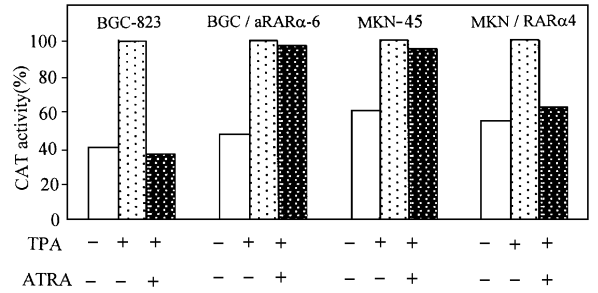


Fig 4 Effect of ATRA on AP-1 activity in BGC/aRAR α -6 and MKN/RAR α 4 cell lines

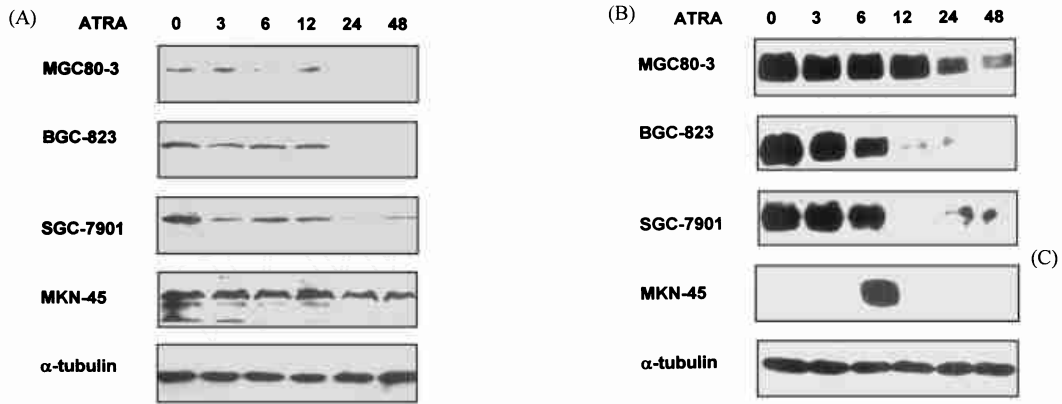


Fig 5 Expression of cJun and cFos(B)protein in four gastric cancer cell lines (A) cJun; (B) cFos; (C) Positive control

诱导的CAT 活性(抑制率约20%), 而当外源性RAR α 表达质粒转染细胞时, ATRA 则显著抑制cJun/cFos 诱导的CAT 活性(抑制率约58%) (Fig 7) 结果证实, ATRA 对AP-1活性的抑制与RAR α 介导的对cJun、cFos的抑制密切相关。

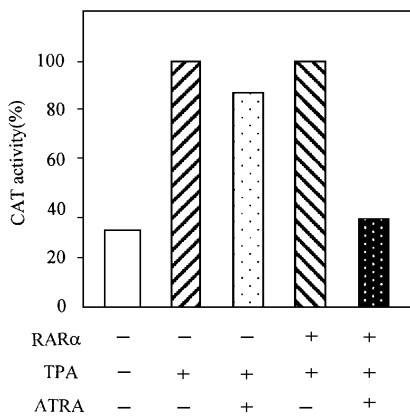


Fig 6 Effect of RAR α on AP-1 activity in HeLa cells

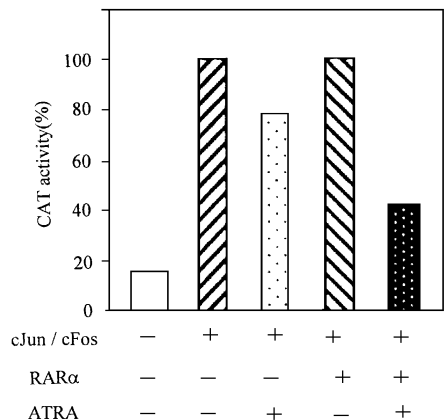


Fig 7 Effect of cJun/cFos and RAR α on AP-1 activity in HeLa cells

3 讨 论

视黄酸作用主要由其受体RAR和RXR介导^[3], 视黄酸及其受体对AP-1活性的抑制已被认为是其抑制细胞生长和转化的重要机制之一^[7] 在乳腺癌细胞中, RAR α 或RXR α 介导REM (retinyl

methyl ether)的抗AP-1活性^[8,9],而在RA抗性的卵巢癌细胞中,RAR α 和RXR α 的过度表达可以恢复视黄酸对AP-1活性和细胞生长的抑制^[10].本文结果也表明,视黄酸抑制AP-1活性与其抑制胃癌细胞生长密切相关.ATRA抑制MGC80-3、BGC-823和SGC-7901细胞生长和AP-1活性,但不能抑制MKN-45细胞生长和AP-1活性,而且对AP-1活性的抑制是由RAR α 介导的,当反义RAR α 转染BGC-823细胞时,由于RAR α 表达受到抑制,ATRA则不能抑制AP-1活性,由此导致ATRA对胃癌细胞生长抑制作用的丧失.反之,当正义RAR α 转染MKN-45细胞时,由于ATRA诱导RAR α 表达,因此能够抑制AP-1活性和细胞生长.进一步实验则证实,当外源性RAR α 瞬时转染Hela细胞时,ATRA可以显著抑制AP-1活性,抑制率提高近6倍.这些结果证实,ATRA诱导的内源性RAR α 能够介导其对AP-1活性的抑制,并通过它而有效地抑制胃癌细胞生长.

AP-1主要组成成分为cJun和cFos蛋白^[1].已知AP-1活性可由多种途径调节,包括cJun和cFos蛋白表达及其磷酸化,cJun正向自主调节和cFos反向自主调节,其中cJun和cFos蛋白水平的变化则是最直接的调节方式.因此,ATRA抑制MGC80-3、BGC-823和SGC-7901细胞的cJun和cFos表达与其抑制AP-1活性直接相关,而不能抑制MKN-45细胞的cJun表达则导致其不能抑制AP-1活性.而当RAR α 介导时,ATRA就有效地抑制cJun/cFos诱导的AP-1活性,这是由于在cJun和RAR α 之间存在一种蛋白-蛋白的直接作用,从而阻滞cJun结合到其应答元件上^[1,4].有关报道还指出,RAR α 阻止cJun和cFos形成二聚体,抑制AP-1活性^[1],RAR α 还可以直接抑制一种与cJun作用的促进DNA结合的细胞因子而导致AP-1活性下降^[4,8].值得注意的是,在MKN-45细胞中,尽管RAR α 表达,却不能介导ATRA抗AP-1活性,我们认为这是由于RAR α 表达水平过低的缘故,因此,ATRA对RAR α 水平的诱导具有关键作用.

致谢 报告基因,RAR α 、cJun和cFos等表达质粒由张

晓坤博士(美国加州Burnham研究所)惠赠,在此致谢.

参考文献(References)

- 1 Yang-Yen H F, Zhang X K, Graupner G, Tzukeman M, Sakamoto B, Karin M, Pfahl M. Antagonism between retinoic acid receptors and AP-1: implications for tumor promotion and inflammation *Nat Biol*, 1991, **3**: 1206~ 1219
- 2 Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos, and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation *Biochim Biophys Acta*, 1991, **1072**: 129~ 157
- 3 Zhang X K, Hoffmann B, Tran P, Graupner G, Pfahl M. Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors *Nature(London)*, 1992, **355**: 441~ 446
- 4 Roland S, Pundi R, Yang N, Steven K, Lynn J R, Jack B, Inder M V, Ronald M e. Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 6092~ 6096
- 5 陈正明, 吴乔, 陈玉强, 苏文金. 视黄酸对胃癌细胞周期的调控, 实验生物学报(Chen Zhengming, Wu Qiao, Chen Yu-qiang, Su Wen-jin. Regulation of cell cycle by retinoic acid in gastric cancer cells *Acta Biol Exp Sin*), 1999, **32**(2): 135~ 140
- 6 吴乔, 张晓坤. 孤生受体的相互作用对视黄酸应答元件的影响. 中国生物化学与分子生物学报(Wu Qiao, Zhang Xiao-kun. Interaction of orphan receptors and their effect on retinoic acid receptor elements *Chin J Biochem Mol Biol*), 1999, **15**(1): 136~ 141
- 7 Wan H, Dawson M I, Hong W K, Lotan R. Enhancement of Calu-1 human lung carcinoma cell growth in serum-free medium by retinoids: dependence on AP-1 activation, but not on retinoid response element activation. *Oncogene*, 1997, **15**: 2 109~ 2 118
- 8 van der Burg B, Slager-Duvidov R, van der Leede B M, de Laat S W, van der Saag P T. Differential regulation of AP1 activity by retinoic acid in hormone-dependent and -independent breast cancer cells *Mol Cell Endoc*, 1995, **112**: 143~ 152
- 9 Chen T K, Smith L M, Gebhardt D K, Birrer M J, Brown P H. Activation and inhibition of the AP1 complex in human breast cancer cells *Mol Carcinog*, 1996, **15**: 215~ 226
- 10 Soprano D R, Chen L X, Wu S J, Donigan A M, Borghaci R C, Soprano K J. Overexpression of both RAR and RXR restores AP-1 repression in ovarian adenocarcinoma cells resistant to retinoic acid-dependent growth inhibition *Cancer Res*, 1995, **55**: 578~ 584