

ezrin 基因在几种癌细胞中的表达及其 5 侧翼区序列转录活性的鉴定

高书颖¹, 许丽艳², 孟令英¹, 崔磊¹, 周飞¹, 李恩民¹

Expression of *ezrin* Gene in Some Carcinoma Cells and Identification of Its 5-Flanking Transcriptional Activity

GAO Shu-ying¹, XU Li-yan², MENG Ling-ying¹, CUI Lei¹, ZHOU Fei¹, LI En-min¹

1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Shantou University, Shantou 515041, China; 2. Institute of Oncologic Pathology, College of Medicine, Shantou University
Corresponding Authors: XU Li-yan, LI En-min, E-mail: nmli@stu.edu.cn

Abstract :Objective To investigate the expression of *ezrin* gene in some carcinoma cells, to detect the transcriptional activity of its 5'-flanking region, and to elucidate the transcriptional regulatory mechanism of the *ezrin* gene in carcinoma cells. **Methods** Expression of *ezrin* gene in esophageal carcinoma EC109, EC171, EC8712 and SHEEC, gastric carcinoma N87 and BGC823, lung carcinoma A549 and 95D, hepatocellular carcinoma Hep G2, leukemia K562, and cervical carcinoma HeLa cells was detected using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and western blot analysis. Plasmid p GLB-hE(-1444/+134), containing -1444/+134 of *ezrin* gene fused to the luciferase gene, was generated by PCR method. Transcriptional activity of the -1444/+134 region in some carcinoma cells was examined using dual-luciferase reporter assay system. **Results** All the tested carcinoma cells high-expressed *ezrin* mRNA and Ezrin protein. -1444/+134 region of *ezrin* gene had strong transcriptional activity compared with SV40 promoter ($P < 0.05$) in EC109, HeLa, A549 and BGC823 cells. **Conclusion** The transcriptional activity of the *ezrin* gene 5'-flanking region may play an important role in the high-expression of Ezrin in some carcinoma cells.

Key words :*ezrin* gene; Reverse transcriptase polymerase chain reaction; Western blot analysis; Relative luciferase activity assay

摘 要:目的 检测 *ezrin* 基因在几种癌细胞中的表达及其 5 侧翼区序列的转录活力,探讨 *ezrin* 基因在癌细胞的表达调控机制。方法 采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)及 Western blot 法检测 *ezrin* 基因在食管癌细胞 EC109、EC171、EC8712、SHEEC,胃癌细胞 N87、BGC823,肺癌细胞 A549、95D,肝癌细胞 Hep G2,白血病细胞 K562 和宫颈癌细胞 HeLa 中的 mRNA 和蛋白表达水平;采用 PCR 法构建以 *ezrin* 基因翻译起始位点上游 -1444/+134 序列为启动子的真核细胞表达质粒 p GLB-hE(-1444/+134);采用双荧光素酶报告基因分析系统检测 -1444/+134 序列在 EC109、HeLa、A549 和 BGC823 细胞中的转录活力。结果 *ezrin* 基因在食管癌等几种癌细胞中均有高表达,其 5 侧翼区 -1444/+134 序列具有较强的转录活力。结论 *ezrin* 基因 5 侧翼区序列的转录活性可能对 *ezrin* 基因的几种癌细胞中的高表达起重要作用。

关键词 :*ezrin* 基因;逆转录聚合酶链反应;Western blot 检测;双荧光素酶报告基因分析

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2008)01-0001-04

收稿日期:2007-09-06;修回日期:2007-11-13

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30672376, 30570849, 30370641);国家教育部博士点项目基金资助项目(20050560002);中国博士后科学基金资助项目(20070410846);广东省自然科学基金重点项目(05104541);广东省自然科学基金博士科研启动项目(7301043)

作者单位:1. 515041 广东 汕头大学医学院生物化学与分子生物学教研室;2. 汕头大学医学院肿瘤病理研究室

通讯作者:许丽艳、李恩民, E-mail: nmli@stu.edu.cn

作者简介:高书颖(1970-),女,博士,博士后,主要从事肿瘤分子生物学研究

0 引言

Ezrin 蛋白是 ERM (Ezrin-Radixin-Moesin) 家族成员之一,主要参与细胞骨架与胞膜之间的连接^[1]。研究证明,*ezrin* 基因在食管癌、胰腺癌、子宫内膜癌、前列腺癌以及其他多种肿瘤细胞中过表达^[2-6]。分析 *ezrin* 基因的外显子、内含子以及转录起始位点上游 3 000 bp 以内的 DNA 序列,结果发现,*ezrin* 基因转录起始位点上游约 1 600 bp 的范围

为高 GC 含量区,存在 CpG 岛,且含有转录因子 Sp1 的众多潜在结合位点。然而,*ezrin* 基因在肿瘤细胞中的表达是否受到 CpG 岛甲基化或转录因子 Sp1 的调控,调控位点又在哪里? 这些问题迄今仍不明确。本研究对我们实验室现有的几种癌细胞进行 *ezrin* 基因表达检测,同时克隆 *ezrin* 基因 5 侧翼高 GC 含量区序列,检测此序列在癌细胞中的转录活力,为进一步揭示 *ezrin* 基因在癌细胞中的表达调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞系及主要试剂

质粒 pGL3-Basic (pGLB)、pGL3-Promoter (pGLP) 和 pRL-TK 购自 Promega 公司。

食管癌 SHEEC 细胞株为本实验室建立^[7],其余细胞株购自中国科学院细胞库。

Trizol 试剂、199 培养基、DMEM 培养基购自 Invitrogen 公司;限制性内切酶、逆转录系统试剂盒、PCR Mix、双荧光素酶报告基因分析系统购自 Promega 公司;PVDF 膜购自 Millipore 公司;Ezrin Ab-1 (3C12) 购自 Neo Markers 公司;-actin 抗体 (AC-15) 购自 Sigma 公司;标准蛋白分子量 (sc-2035)、羊抗鼠 IgG HRP (sc-2031)、化学发光试剂购自 Santa Cruz 公司。SuperFect 转染试剂、质粒提取试剂盒购自 QIA GEN 公司。其他常用试剂为国产分析纯试剂。

1.2 细胞培养

所有细胞均置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。EC109 (食管癌)、EC171 (食管癌)、EC8712 (食管癌)、SHEEC (食管癌)、BGC823 (胃癌)、Hela (宫颈癌) 等细胞贴壁生长于含 10% 灭活小牛血清的 199 培养液中;N87 (胃癌)、A549 (肺癌)、95D (肺癌)、Hep G2 (肝癌) 等细胞贴壁生长于含 10% 灭活小牛血清的 DMEM 培养液中。贴壁细胞培养成单层后,用 0.25% 胰蛋白酶 (含 0.02% EDTA) 消化,传代培养,待达到一定数目 [(1~2) × 10⁷] 后收获细胞。K562 (髓性白血病细胞株) 细胞悬浮生长于含 10% 灭活小牛血清的 RPMI199 培养液中,细胞密度保持在 (0.1~0.5) × 10⁶ cells/ml,每 3 天传代一次,当密度达到 (1.0~1.5) × 10⁶ cells/ml 时收获细胞。

需要进行瞬时转染实验的细胞接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μl,细胞接种密度为 2 × 10⁵ cells/ml。细胞置 37℃ 培养,细胞满度约为 50%~60% 时,转染质粒。

1.3 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR)

Trizol 试剂提取细胞总 RNA,经逆转录获得 cDNA。扩增 *ezrin* 基因部分序列的上、下游引物分别为 5'-CGGGCGCTCTAAGGGTTCT-3' 和 5'-TTTCGGTTTCTGGTGA GTA TCCTCGA TCCC-3',扩增片段位于 *ezrin* 基因的 +30/+134 (转录起始位点定义为 +1)。扩增 GAPDH 基因的上下游引物分别为 5'-GAAGGTGAA GGTCGGA GTC-3' 和 5'-GAAGATGGTGA TGGGATTTTC-3',扩增片段位于 GAPDH 基因的 +108/+333 (转录起始位点定义为 +1)。将两对引物放入同一 PCR 反应体系,反应条件如下:94℃ 5 min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,循环 30 次;72℃ 5 min。扩增产物进行 2.0% 琼脂糖凝胶电泳,于 FluorChem TMIS-8900 成像系统 (Alpha Innotech, USA) 分析成像,计算目的基因产物 (*ezrin*) 和内对照基因产物 (GAPDH) 的灰度比值。

1.4 细胞总蛋白质的提取

收集细胞团块,用 4℃ 预冷的 PBS (0.01 M, pH 7.2~7.4) 重悬细胞,每瓶细胞 (30 cm² 的培养瓶) 加 400 μl 裂解液 (50 mM Tris·HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 100 μg/ml PMSF),于冰上裂解 30 min,4℃ 下 12 000 r/min 离心 5 min。离心后的上清即为细胞总蛋白。

蛋白含量的测定采用 Bradford 法。

1.5 Western blot 分析

50 μg 细胞总蛋白提取物进行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白电转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h;加入鼠抗 Ezrin 抗血清和鼠抗 -actin 抗血清,室温孵育 1 h,PBST (0.01 M, pH 7.2~7.4, 0.05% tween 20) 洗 2 次,PBS 洗 1 次;再加入羊抗鼠 IgG HRP,室温孵育 1 h,PBST 洗 2 次,PBS 洗 1 次;最后加入 Western blot 化学发光试剂,于 FluorChem TMIS-8900 成像系统 (Alpha Innotech, USA) 进行成像分析,计算 Ezrin 和对照 -actin 的灰度比值。

1.6 *ezrin* 基因 5 侧翼区序列的克隆

扩增 *ezrin* 基因 5 侧翼区序列的下游引物为 5'-CCC AAGCT⁺¹³⁴ TTTCGGTTTCTGGTGA GTA-TCCTCGA TCCC-3' (下划线为 HindⅢ 酶切位点;*ezrin* 基因转录起始位点定义为 +1,翻译起始位点在 +135,碱基所在位置标注在右上角);利用软件 Primer Premier 5.0 设计上游引物 5'-T⁻¹⁵²⁹ TAAC-CAGAGCTTCGGAAAGGCGG-3'。扩增片段包含了 *ezrin* 基因翻译起始位点上游的高 GC 含量区。以食管癌细胞基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,反应条件为:94℃ 5 min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,

72 2 min,循环 30 次;72 5 min。扩增片段中含有 *Stu* 酶切位点 AGGCCT,位于在 *ezrin* 基因的 - 1447/ - 1442 处,将扩增产物经 *Stu* / *Hind* 双酶切,定向连接至经 *Sma* / *Hind* 双酶切不含启动子的萤火虫荧光素酶报告基因表达载体 pGLB 上,构建重组质粒 pGLB-hE(- 1444/ + 134)。采用 *Kpn* / *Hind* 双酶切鉴定重组质粒,同时进行 DNA 测序分析。

1.7 瞬时转染

提取质粒并测定其含量。用 Buffer EB (QIA-GEN 公司质粒提取试剂盒中提供) 将实验质粒 pGLB、pGLP、pGLB-hE(- 1444/ + 134) 稀释至 100 ng/μl,内参照质粒 pRL-TK 稀释至 20 ng/μl,然后将实验质粒分别与 pRL-TK 按 50 : 1 混合,即 1 μg 0.02 μg。具体转染步骤参照 SuperFect 转染试剂操作手册进行。转染后 48 h 后,收获细胞。每组实验样品 3 个平行实验孔,并至少进行 3 次重复实验。

1.8 双荧光素酶活性检测及统计学分析

参照双荧光素酶报告基因分析系统操作手册,在 TD20/20 照度计 (Turner Designs 公司) 上进行双荧光素酶活性检测。根据 TD20/20 型照度计配置的软件包计算出各组转染细胞的相对荧光素酶活性(萤火虫荧光素酶/海肾荧光素酶),以此代表实验质粒启动子的转录活力。各组实验数据均计算平均值及标准差。应用 SPSS 13.0 软件对各组实验数据之间差异是否有统计学意义进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 *ezrin* 基因在几种癌细胞中的 mRNA 表达

RT-PCR 扩增 *ezrin* 基因片段的长度为 105 bp,扩增 GAPDH 片段的长度为 226 bp。电泳结果显示,在所检测的食管癌等 11 种癌细胞中均有两条特异性扩增条带,且条带位置与预期相符,阳性率为 100 %。利用 FluorChem TMIS-8900 成像系统分析扩增条带的灰度值。GAPDH 为看家基因,在各种组织和细胞中的表达相对稳定,以 GAPDH 的扩增产物作为对照,计算各细胞 *ezrin* 基因与 GAPDH 基因扩增产物的比值,将食管癌细胞 EC109 的 *ezrin*/ GAPDH 灰度比值定义为 1,其他癌细胞与 EC109 比较。可以看出,与已经被证实高表达 *ezrin* 基因的 EC109 相比,所检测的其他几种癌细胞 *ezrin* 基因 mRNA 的表达水平在 0.77 ~ 1.07 之间,见图 1。

2.2 Ezrin 蛋白在几种癌细胞中的表达

Ezrin 蛋白分子量为 82 kDa。 α -actin 是肌动蛋白的一种,分子量为 42 kDa,在各种组织和细胞中

的表达相对稳定,在此作为内对照。细胞总蛋白 Western blotting 检测结果显示,在所检测的几种癌细胞中均有 Ezrin 蛋白表达。利用 FluorChem TMIS-8900 成像系统分析蛋白条带,计算各癌细胞 Ezrin 和 α -actin 的灰度比值,将食管癌细胞 EC109 的 Ezrin/ α -actin 比值定义为 1,其他癌细胞与 EC109 比较。可以看出,与 EC109 相比,所检测的其他几种癌细胞 Ezrin 蛋白的表达水平在 0.79 ~ 1.32 之间,见图 2。

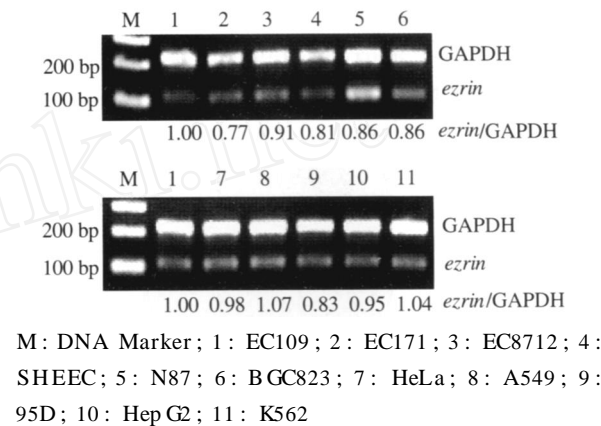


图 1 *ezrin* 基因 mRNA 在几种癌细胞中表达的 RT-PCR 检测

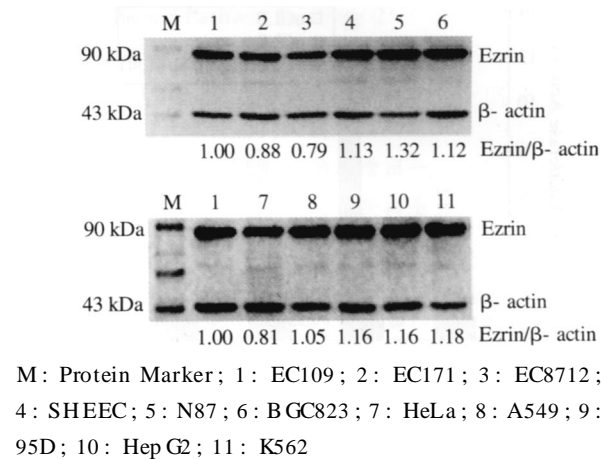


图 2 Ezrin 蛋白在几种癌细胞中表达的 Western blotting 检测

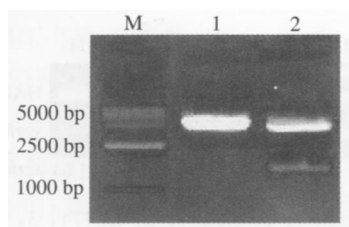
2.3 *ezrin* 基因 5' 侧翼区序列的克隆鉴定

含有 *ezrin* 基因 - 1444/ + 134 序列的重组质粒 pGLB-hE(- 1444/ + 134) 的 *Kpn* / *Hind* 双酶切鉴定结果显示,重组质粒所连接的外源片段长度与预计值一致。质粒测序结果也证实所克隆序列为 *ezrin* 基因 5' 侧翼区序列 (GenBank 登录号: EF184645),见图 3。

2.4 *ezrin* 基因 - 1444/ + 134 序列在几种癌细胞中的转录活力

质粒 pGLB、pGLP 和 pGLB-hE(- 1444/ +

134) 分别与内参照 pRL-TK 共转染 EC109、HeLa、A549 和 BGC823 细胞。以含 SV40 启动子的质粒, PG4 的相对荧光素酶活性为 1 来计算同一细胞系中 pGLB 和 pGLB-hE(-1444/+134) 的相对酶活性。结果显示,在所检测的几种癌细胞中,不含启动子序列的 pGLB 基本不表现荧光素酶活性(相对值为 0.01~0.03);以 *ezrin* 基因 -1444/+134 序列作为启动子的 pGLB-hE(-1444/+134) 表现出较强的荧光素酶活性,是 pGLP 的 4~10 倍,见图 4。这说明, *ezrin* 基因的 -1444/+134 序列在癌细胞中具有很强的转录活力,有可能是调控 *ezrin* 基因转录的重要区域。



M: DL15000; 1: pGLB; 2: pGLB-hE(-1444/+134)

图 3 重组质粒 pGLB-hE(-1444/+134) 的 Kpn / Hind 双酶切鉴定

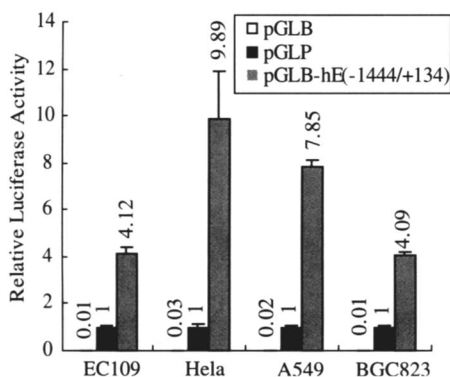


图 4 重组质粒 pGLB-hE(-1444/+134) 在几种癌细胞中的相对荧光素酶活性检测

3 讨论

Ezrin 蛋白是一种磷酸化蛋白质,主要表达于各种类型的上皮细胞及某些非上皮细胞,具有广泛的生理功能。我们曾研究发现^[2,8], *ezrin* 基因在永生食管上皮细胞恶性转化为食管癌细胞过程中显著异常过表达,通过 RNAi 手段下调 *ezrin* 基因的表达可以有效阻止食管癌细胞的移动、侵袭等肿瘤细胞生物学行为,在临床食管癌组织中发生明显的 Ezrin 蛋白移位表达现象,提示 *ezrin* 是食管癌转移侵袭相关基因。

ezrin 基因 5' 侧翼区存在 CpG 岛和转录因子 Sp1 的众多潜在结合位点,为了明确 *ezrin* 基因的表

达是否受其 5' 侧翼区序列调控,我们首先检测了实验室现有几种细胞株的 *ezrin* 基因表达情况,结果发现, *ezrin* 基因在所检测的几种癌细胞中均有高水平表达。由于没有明显低表达 *ezrin* 基因的细胞株,甲基化实验暂时无法进行,不能确定是否存在 5' 侧翼区 CpG 岛甲基化调控 *ezrin* 基因的表达。然而, -1444/+134 序列的报告基因检测结果显示, *ezrin* 基因 5' 侧翼区序列具有很强的转录活力,很可能对 *ezrin* 基因在癌细胞中的高表达起重要作用。近期,我们针对 *ezrin* 基因在食管癌细胞中的转录调控进行了深入研究,结果发现,在 *ezrin* 基因 -1444/+134 序列中含有增强子区和基本启动子活性区,对基本启动子活性起重要调控作用的元件包括一个经典的 Sp1 结合位点(-75/-69)和一个经典的 AP-1 结合位点(-64/-58)。过表达 c-Fos 能够提高 *ezrin* 基因基本启动子活性;Sp1 特异性化学抑制剂 Mithramycin A 能够阻断核蛋白因子与含有 Sp1 位点的 DNA 序列的结合,同时降低 *ezrin* 基因基本启动子活性。我们认为在食管癌细胞中,转录因子 Sp1 和 AP-1 共同调控 *ezrin* 基因的基本转录活性(另文发表)。 *ezrin* 基因在其他癌细胞中是否具有相同的转录调控机制,还需进一步研究。

参考文献:

- [1] Algrain M, Turunen O, Vaheri A, et al. Ezrin Contains Cytoskeleton and Membrane Binding Domains Accounting for its Proposed Role as a Membrane-Cytoskeletal Linker [J]. J Cell Bio, 1993, 120(1): 129-139.
- [2] Shen ZY, Xu LY, Chen MH, et al. Upregulated expression of Ezrin and invasive phenotype in malignant transformed esophageal epithelial cells [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(6): 1182-1186.
- [3] Akisawa N, Nishimori I, Iwamura T, et al. High levels of ezrin expressed by human pancreatic adenocarcinoma cell lines with high metastatic potential [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 258(2): 395-400.
- [4] Ohtani K, Sakamoto H, Rutherford T, et al. Ezrin, a membrane-cytoskeletal linking protein, is highly expressed in atypical endometrial hyperplasia and uterine endometrioid adenocarcinoma [J]. Cancer Lett, 2002, 179(1): 79-86.
- [5] Valdman A, Fang X, Pang ST, et al. Ezrin expression in prostate cancer and benign prostatic tissue [J]. Eur Urol, 2005, 48(5): 852-857.
- [6] Bruce B, Khanna G, Ren L, et al. Expression of the cytoskeleton linker protein ezrin in human cancers [J]. Clin Exp Metastasis, 2007, 24(2): 69-78.
- [7] 沈忠英, 蔡维佳, 沈健, 等. 人乳头状瘤病毒 18E6E7 和 TPA 协同诱发人食管上皮细胞恶性转化的研究 [J]. 病毒学报, 1999, 15(1): 1-5.
- [8] Zeng H, Xu L, Xiao D, et al. Altered expression of ezrin in esophageal squamous cell carcinoma [J]. J Histochem Cytochem, 2006, 54(8): 889-896.

[编辑:周永红;校对:贺文]