

# 鉴定 AP-4 是在非激素依赖型前列腺癌中上调 L-plastin 表达的转录因子

林天歆<sup>1,2</sup>, 黄健<sup>1</sup>, 许可慰<sup>1</sup>, 蔡清清<sup>3</sup>, 李泗耀<sup>1</sup>, 黄海<sup>1</sup>, 尹心宝<sup>1</sup>, 江春<sup>1</sup>  
(中山大学 1. 附属第二医院泌尿外科; 2. 附属第二医院林百欣医学研究中心, 广东 广州 510120;  
3. 肿瘤医院内科, 广东 广州 510060)

**摘要:**【目的】鉴定 AP-4 是在非激素依赖型前列腺癌中调控 L-plastin 表达的转录因子, 进一步阐明非激素依赖型前列腺癌的发病机制。【方法】在鉴定 L-plastin 启动子近 3' 端 -216 到 1 序列片段存在明显的转录活性的基础上, 利用 TF SEARCH 软件分析该片段的序列, 寻找可能调控 L-plastin 表达的非甾体激素类转录因子, 并用凝胶滞后实验和超滞后实验证实结合于该片段的转录因子, 利用 PCR 定点突变法构建删除该转录因子结合位点的重组子, 并检测切除该片段序列后荧光素酶活性, 研究该转录因子在非激素依赖型前列腺癌中调控 L-plastin 表达的作用。【结果】TF SEARCH 软件分析表明在距转录起始点 -199 ~ -194 bp 处含有 AP-4 转录因子结合位点 CAGCTG, 凝胶滞后实验和超滞后实验表明 AP-4 是结合于 L-plastin 启动子 3' 端序列 CAGCTG 的转录因子, 删除 AP-4 结合位点后荧光素酶活性下降。【结论】AP-4 是促进 L-plastin 在非激素依赖型前列腺癌中表达的重要调控因子。

关键词: 前列腺癌; L-plastin; AP-4; 转录因子; 非激素依赖

中图分类号: R737.25

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)01-0019-05

## Identification of Transcription Factor AP-4 as the Regulator that Upregulates the Expression of L-plastin in Hormone-Independent Prostate Cancer

LIN Tian-xin, HUANG Jian, XU Ke-wei, CAI Qing-qing, LI Si-yao, HUANG Hai, YIN Xin-bao, JIANG Chun  
(1. Department of Urology, 2. LIN Bai-xin Medical Research Center, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China, 3. Department of Medical Oncology, Cancer Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

**Abstract:**【Objective】 To identify the non-steroid transcription factor AP-4 which upregulates the expression of L-plastin in hormone-independent prostate cancer and further elucidate the development mechanism of hormone-refractory prostate cancer. 【Methods】 TF SEARCH software was used to analyze the possible binding sites of transcription factors in sequence -216 to 1 of the 3' end of L-plastin promoter which had been identified as important part of regulation response elements. Gel Shift Assay and Supershift Assay were used to confirm the transcription factor binding the speculated response element; PCR Site-Mutagenesis technique was performed to construct the plasmid which the binding site of transcription factor was deleted and Luciferase activity assay was carried out to detect the change of transcription activity after the binding site was deleted. 【Results】 AP-4 response element CAGCTG which located at -199 ~ -194 of L-plastin promoter was identified with the TF SEARCH software, Gel shift assay and supershift assay confirmed that AP-4 was the transcription factor binding CAGCTG; Mutant deleted the AP-4 binding-site had low-luciferase activity than that of wildtype. 【Conclusion】 AP-4 plays an important role in the up-regulation of L-plastin expression in hormone-independent prostate cancer.

Key words: prostatic neoplasms; L-plastin; AP-4; transcription factor; hormone-independent

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(1):19-23]

收稿日期: 2005-08-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30500507); 广东省自然科学基金资助项目(020402; 05001758)

作者简介: 林天歆(1973-), 男, 广东汕头人, 在职博士生, 讲师; 黄健, 教授, 博士生导师, 课题负责人, 通讯作者。E-mail: yehjn@yahoo.com.cn

L-plastin 是人肌动蛋白结合蛋白家族中一个亚型,在前列腺癌中表达增加,且受雄激素和雌激素上调<sup>[1]</sup>,可能通过其启动子上 3 个雄激素受体半结合位点和一个雌激素受体半结合位点起作用<sup>[2]</sup>。我们以前研究表明 L-plastin 启动子近 3 端 216 个碱基仍具有较强的启动子活性,且雄激素刺激后该启动子片段活性增强不明显,表明该片段可能存在重要的非甾体类转录因子调控序列调控着前列腺癌的进展<sup>[3]</sup>。本研究拟进一步鉴定结合于 L-plastin 启动子近 3 端非甾体受体类转录因子,阐明 L-plastin 在非激素依赖性前列腺癌中的发病机理。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

定点突变试剂盒、Pfu DNA 多聚酶,转染试剂盒 GeneJammer 购自美国 Stratagene 公司,质粒抽提试剂盒、DNA 凝胶纯化试剂盒购自荷兰 Qiagen 公司,限制性内切酶 Bgl II 和 T4 DNA 连接酶等购自美国 NEB 公司,引物由上海生工公司合成,DNA 提取试剂盒,荧光素酶测定 Dual Luciferase System 试剂盒,质粒 pGL3-Basic 和 pRGL 内对照质粒购自美国 Promega 公司,LNCaP 细胞系购自美国模式菌种收集中心(ATCC),T4 多核苷酸激酶购自 New England Biolabs, [<sup>32</sup>P]ATP 和 G-25 纯化柱购自美国 Amersham Biosciences, Charcoal-stripped 胎牛血清,氨苄西林、链霉素,培养液 RPMI-1640 购自 Atlantic Scientific Inc., LNCaP 和 PC-3 全核提取物购自美国 Active Motif,双氢睾酮购自美国 Sigma 公司,其余均为进口或国产分析纯试剂。DNA 序列测定由大连 TaKaRa 公司完成。大肠杆菌 XL1-Blue 由中山大学附属第二医院医学研究中心提供。

### 1.2 方 法

1.2.1 切除甾体类激素受体结合位点的重组荧光素酶质粒的构建 利用定点突变试剂盒依次切除 AR1、AR2、AR3、ER 序列,构建重组荧光素酶质粒 pGL3-LPP-ARE1-ARE2-ARE3-ER,简称为 pGL3-LPP-Mut4<sup>[3]</sup>。

1.2.2 巢式分段切除 pGL3-LPP-Mut4 启动子并检测相应荧光素酶活性 结果表明与非甾体类调控因子相结合的反应元件(Cis-acting element)主要位于启动子近 3 端 216 个碱基上<sup>[3]</sup>。

1.2.3 TF SEARCH 软件分析目的片段序列 利用

TF SEARCH 软件分析 L-plastin 启动子近 3 端 216 个碱基序列(克隆 ND73),寻找调控 L-plastin 表达的非甾体激素类的转录因子。

1.2.4 凝胶滞后实验(Gel Shift Assay, or EMSA)和超滞后实验(supershift assay) 凝胶滞后实验: 包含有 AP-4 可能结合位点的靶核苷酸序列为 CAGGGACTACTCAAAGACAGCTGGAGGAGA (第-216 ~ 186 碱基),互补单链寡核苷酸在 95 °C 变性 10 min 后,逐步冷却至室温,退火形成双链寡核苷酸,双链寡核苷酸用 [<sup>32</sup>P]ATP 和 T4 多核苷酸激酶进行末端标记后形成探针,并用 G-25 柱子纯化,凝胶滞后实验按 Promega 凝胶滞后试验试剂盒(Cat #E3050)产品说明进行。8 μg LNCaP 或 PC-3 全核提取物分别和 5 倍浓度的反应缓冲溶液 2 μL 混合,室温下孵育 10 min,接着加入 2 μL 标记的探针(1.75 pmol/μL),室温下孵育 20 min,总反应体积为 10 μL。再与 10 倍加样缓冲溶液 1 μL 混匀后加样,用 60 g/L 非变性的聚丙烯酰胺凝胶在 0.5 ×TBE, 300 V 条件下电泳 15-20 min,分离 DNA/蛋白质复合物和寡核苷酸探针,固定,干胶,放射自显影过夜。竞争实验和凝胶超滞后实验:竞争实验通过加入 50 倍的无同位素标记的竞争性寡核苷酸。凝胶超滞后实验首先把相应抗体与核提取物冰浴过夜,再进行上述实验。

1.2.5 构建重组荧光素酶质粒 利用定点突变试剂盒切除 ND73 序列中 AP-4 结合位点,构建相应的重组荧光素酶质粒。用 Qiagen 公司的质粒抽提试剂盒提取质粒 ND73,在 0.2 mol/L NaOH 中使 DNA 模板变性,并以此为模板,5 端引物序列为 AGGAGAAAGGGAGAGAGA,3 引物序列为 TCTTTGAGTAGTCCCTG,进行 PCR,反应参数为: 95 °C 10 min; 95 °C 30 s, 55 °C 1 min, 68 °C 7 min, 30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min,扩增出线性化的切除 AP-4 结合位点的 pGL3-LPP-ND73-AP-4 (简称 ND73-AP-4)。在 T4 DNA 连接酶的作用下,于 16 °C 反应过夜,获得环化质粒 DNA,转染大肠杆菌 XL1-Blue,挑选克隆,测序鉴定。

1.2.6 转染前列腺癌细胞系 LNCaP 并检测荧光素酶活性 LNCaP 细胞在加入体积分数 10% Charcoal-stripped 胎牛血清和 10 g/L 氨苄西林、链霉素的 RPMI-1640 培养液中生长。将 LNCaP 细胞培养 1 周,按 Stratagen 公司的 genejammer 试剂盒说明书进行转染。简述如下: 12 μL genejammer 和 2

μg 目的质粒及 0.2 μg 的 pRGL 内对照质粒混和后转染去激素的 LNCaP, 其中一组 24 h 后加入 100 ng/mL 的双氢睾酮 (dihydrotestosterone, DHT), 刺激转染细胞 24 h. 弃培养基, 加胰酶消化后取细胞, 用 Promega 公司的 Dual luciferase 系统的裂解液溶解细胞, 离心后取上清, 然后按产品说明书进行荧光素酶测定。简述如下: 取 20 μL 细胞裂解液上清加至荧光测定管中, 加入 100 μL 荧光素酶反应底物, 在荧光分析仪上测定荧光强度, 检测时间为 20 s。

## 2 结果

### 2.1 软件分析转录因子结合于 L-plastin 启动子 3 端的序列

以前结果表明与非甾体类调控因子相结合的反应元件主要位于启动子近 3 端 216 个碱基上, TF SEARCH 软件分析表明在距转录起始点 -199 ~ -194 bp 处含有 AP-4 转录因子结合位点 CAGCTG (AP-4: Acting enhancer-binding protein 4), 序列同源性为 91% (图 1)。

```

-216 CAGGACTAC TCAAAGACAG CTGGAGGAGA AAGGGGAGAA GAAAAATGCT -157
                AP-4 binding site
-156 TATAAAGAGG TGGCCAAAAG AGCGGGACCT TGTCTCAAAA AAAAAAAAAA -117
-116 AAAAGAGGAA GTGGTAGGAG GTGTCTGAAT TTCACGTGGA CTTTGTCTGT -67
-66 CAGGTGATTT TTGGTGGGKC GCGGACATGA AAAAAAAGTT AAAATGTCCT -17
-16 TATAAAGACA AAATGCT-1
  
```

图 1 L-plastin 启动子 -216 ~ -1 AP-4 结合位点序列分析  
Fig.1 Analysis of transcription factor binding site in the sequence of -216 to -1 of L-plastin promoter

### 2.2 凝胶滞后实验和超滞后实验

用去激素培养的激素依赖型前列腺癌 LNCaP 细胞提取物和包含有 AP-4 可能结合位点 CAGCTG 探针进行凝胶滞后实验, 结果见图 2。Lane 2 可见到有两条电泳条带滞后, 用 50 倍竞争性寡核苷酸可消除上方条带, 而不影响下方条带 (lane 3), 而用 50 倍序列不相关寡核苷酸不能消除上方条带, 说明上方条带为特异性结合条带 (lane 4), 加入 AP-4 特异性抗 AP-4 (N-17) 和抗 AP-4 (C-18) 抗体后可见进一步滞后的条带 (lane 5,6 和 lane 7,8), 说明抗 AP-4 特异性抗体能与滞后条带特异性结合, 滞后条带为 DNA/AP-4 蛋白复合物, 而进一步滞后的条带为 DNA/AP-4/抗 AP-4 抗体复合物。

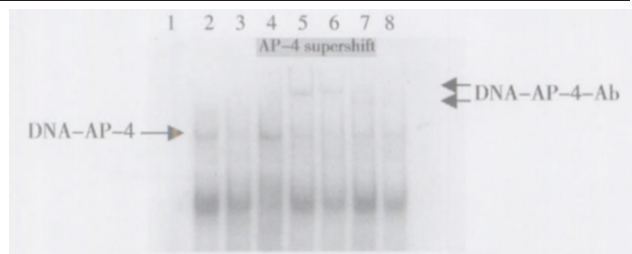


图 2 LNCaP 细胞中 AP-4 凝胶滞后和超滞后实验  
Fig.2 The Gel shift assay and supershift assay for AP-4 in LNCaP cell line

Lane 1: digo probe only; lane 2: digo probe plus LNCaP nuclear extract (NE); lane 3: digo probe plus NE and 50x specific competitor; lane 4: digo probe plus NE and 50x non-specific competitor; lane 5: digo probe plus NE and 8 μg AP-4 antibody (N-17); lane 6: digo probe plus NE and 2 μg AP-4 antibody (N-17); lane 7: digo probe plus NE and 8 μg AP-4 antibody (C-17); and lane 8: digo probe plus NE and 2 μg AP-4 antibody (C-17). The single arrow (→) indicated DNA-AP-4 band shift for EMSA and the double arrows (⇔) indicated supershift of DNA-AP-4 plus AP-4 antibody

上述结果表明 AP-4 是结合于 ACTAC TCAAAGACAG CTGGAGGAGA AAGGG 的转录因子。以上实验证明 AP-4 是激素依赖型前列腺癌细胞株 LNCaP 去激素条件下结合于 L-plastin 启动子 3' 端序列的转录因子, 同样用凝胶滞后实验和超滞后实验证实 AP-4 是非激素依赖型前列腺癌细胞株 PC-3 中结合于 L-plastin 启动子 3' 端序列的转录因子 (图 3)。

### 2.3 删除 AP-4 结合位点后荧光素酶活性变化

以上实验表明 AP-4 是结合于 L-plastin 启动子 3' 端序列的转录因子, 但是 AP-4 是否是促进 L-plastin 在非激素依赖型前列腺癌中表达的重要调控因子呢? 以前的体外实验表明含有 AP-4 结合位点的 L-plastin 启动子近 3 端 216 碱基 (质粒 ND73) 仍具有一定的转录活性, 我们通过删除 ND73 序列上的 AP-4 结合位点, 得到质粒 ND73 AP-4, 通过比较分别用 ND73 和 ND73 AP-4 转染前列腺癌细胞株 LNCaP 后测定体外荧光素酶活性, 结果表明删除 AP-4 结合位点后荧光素酶活性明显下降, 表明 AP-4 是促进 L-plastin 在非激素依赖型前列腺癌中表达的重要调控因子 (图 4)。

## 3 讨论

前列腺癌 (prostate carcinoma, PCa) 是欧美国家

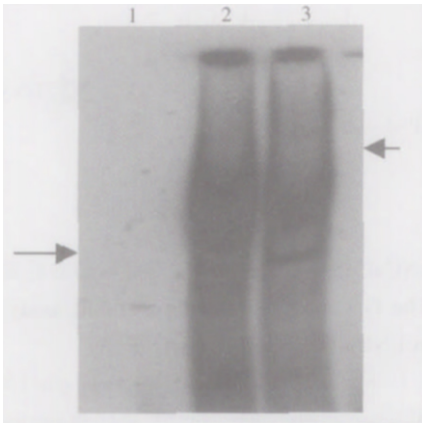


图 3 PC-3 细胞中 AP-4 凝胶滞后实验和超滞后实验

Fig. 3 The Gel shift assay and supershift assay for AP-4 in PC-3 cell line

EMSA and AP-4 supershift results for digoxigenin in PC-3 cell line. Lane 1: digoxigenin probe only; lane 2: digoxigenin probe plus PC-3 nuclear extract; lane 3: digoxigenin probe plus PC-3 nuclear extract and 8  $\mu$ g AP-4 antibody (N-17); The long arrow indicated DNA-AP-4 band shift for EMSA and the short arrow indicated supershift of DNA-AP-4 plus AP-4 antibody

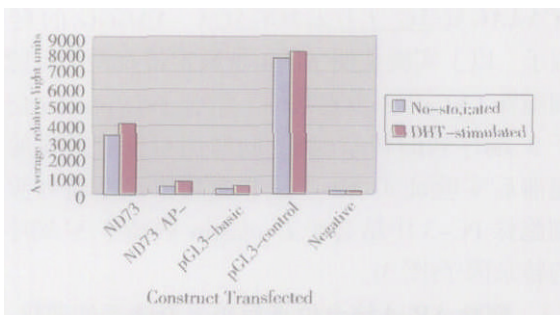


图 4 删除 AP-4 结合位点后荧光素酶活性

Fig.4 Luciferase activity after deletion of the AP-4 binding site

ND73 is the clone containing 216 base pairs in the 3' end of L-plastin promoter, ND73 AP-4 is the clone which ND73 clone was deleted the AP-4 binding site. pGL3-basic is the basic vector which lacks promoter sequence and used for cloning putative regulatory sequence, pGL3-control vector contains SV40 promoter and enhancer sequence and used for positive control. Negative is the control LNCaP without plasmid transfected. Compared with luciferase activity of ND73, ND73 AP-4 has much lower luciferase activity either with or without DHT stimulation

男性最常见的恶性肿瘤,死亡率仅次于肺癌居第二位。在我国随着人平均寿命的延长,前列腺癌发病率及死亡率明显逐年增高。早期前列腺癌不易发现,大多数前列腺癌病人诊断时已有远处转移<sup>[45]</sup>。对早期前列腺癌采用根治性切除效果较好,对晚期前列腺癌患者多采用内分泌治疗。内分泌治疗早期

能有效抑制肿瘤生长,但最终产生非雄激素依赖的、激素拮抗性前列腺癌克隆而导致治疗失败<sup>[6]</sup>。因此进一步研究非激素依赖型前列腺癌的发病机制,有利于发现新的、有效的治疗手段。产生非激素依赖型前列腺癌克隆是晚期前列腺癌致死的原因,产生非激素依赖型前列腺癌的可能作用机制可分为三大类<sup>[6]</sup>: 雄激素受体基因的点突变和扩增<sup>[7]</sup>; 点突变改变了雄激素受体对雌激素、氢化可的松,甚至对雄激素受体拮抗剂氟他胺的反应。晚期前列腺癌通过增加有丝分裂原激活的蛋白激酶信号(MAPK)途径,导致不依赖雄激素而激活雄激素受体。通过不依赖于雄激素受体的生长和存活功能的其它信号途径。雄激素受体与前列腺癌的进展不再相关。在晚期患者中可见抗凋亡基因 BCL2, 或 IGF1, EGF/TGF $\alpha$  上调, TGF $\beta$ 1, K $\alpha$ 1 下调和 p53 突变,说明除雄激素受体以外其它因子调控着前列腺癌的演进。

我们和其他学者以前的研究表明存在甾体激素受体以外的其他因子参与调控前列腺癌中 L-plastin 的激活。本研究首先构建 L-plastin 启动子在含有荧光素酶的载体 pGL3-basic 上,通过删除启动子上的雄激素和雌激素受体的结合位点,在此基础上用巢式切除法产生一系列不同启动子长度的克隆,分别转染 LNCaP 细胞株后进行体外荧光素酶活性实验,结果表明该启动子近 3' 端 216 个碱基仍具有较强的启动子活性,且雄激素刺激后启动子活性增强不明显,表明该片段存在重要的非甾体类转录因子相结合的调控序列调控着前列腺癌的进展,我们用凝胶滞后实验和超滞后实验证实 AP-4 是结合于 L-plastin 启动子 3' 端序列的转录因子,删除 AP-4 结合位点后荧光素酶活性下降,表明 AP-4 是促进 L-plastin 在非激素依赖型前列腺癌中表达的重要调控因子。根据我们所检索到的文献资料,我们最早发现 AP-4 在非激素依赖型前列腺癌的演进中起着重要的作用。

AP-4 是一个转录增强结合因子,该蛋白属于螺旋-环-螺旋(bHLH)蛋白家族中的一员,最初 AP-4 因能与类人猿病毒(simian virus 40, SV40)增强子结合,并与另一转录因子 AP-1 协同作用而增加 SV40 病毒的晚期基因启动子的转录而被发现<sup>[8]</sup>。它在体内分布比较广泛但表达量极微,免疫荧光发现 AP-4 位于细胞核的周围区域,AP-4 通过小 GTP 结合蛋白(small GTP binding protein)的

一个亚基装配反应因子 (assembly reaction factor, ARF)与核膜结合<sup>[8]</sup>。已有的研究表明, AP-4 的主要作用是作为一个转录因子增强子, 通过与 DNA 序列 CAGCTG 结合而激活病毒和细胞的基因表达<sup>[9]</sup>, 它还能激活 hMTIIA 基因的转录并参与人脑啡肽原的表达调控, 提高亨廷顿病 (Huntington's disease) 基因的转录表达<sup>[10]</sup>和免疫球蛋白 kappa 链的表达<sup>[11]</sup>, 其它研究表明 AP-4 能通过 HIV 病毒 I 型基因启动子上的相应结合位点调控 HIV 基因表达<sup>[12]</sup>。

我们的研究表明 AP-4 在非甾体激素依赖型前列腺癌细胞株中起重要的调节作用; AP-4 和其它因子在激活与上调 L-plastin 在前列腺癌表达中起重要作用。该机制在正常前列腺上皮细胞中处于沉默状态, 而在前列腺癌激活, 激活后上调许多基因, 包括 L-Plastin 基因, 以促进肿瘤的生长和浸润。鉴定这因子将有利我们理解非激素依赖型前列腺癌的发生机制, 为非激素依赖型前列腺癌的治疗提供理论基础。

#### 参考文献:

- [1] ZHENG J, RUDRA-GANGULY N, MILLER G J, et al. Steroid hormone induction and expression patterns of L-plastin in normal and carcinomatous prostate tissues [J]. *Am J Pathol*, 1997, 150(6):2009-2018.
- [2] LIN C S, LAU A, YE H C C, et al. Upregulation of L-plastin gene by testosterone in breast and prostate cancer cells: identification of three cooperative androgen receptor-binding sequences [J]. *DNA Cell Biol*, 2000, 19(1):1-7.
- [3] 林天歆, 黄健, 黄海, 等. 甾体类激素受体 ER、AR 对前列腺癌中 L-Plastin 表达的调控[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2005, 26(9):611-614.
- [4] 黄海, 黄健, 潘秋辉, 等. 前列腺特异性膜抗原人源 Fab 抗体可变区基因的筛选与鉴定[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2005, 26(1): 84-87.
- [5] FELDMAN B J, FELDMAN D. The development of androgen-independent prostate cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2001, 1(1): 34-45.
- [6] CHEN C D, WELSBIE D S, TRAN C, et al. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy [J]. *Nature Medicine*, 2004, 10(1): 33-39.
- [7] 张勇, 桂治宁. 前列腺癌中雄激素受体基因突变的研究[J]. *中山医科大学学报*, 1997, 18(3): 168-170.
- [8] MERMOD N, WILLIAMS T J, TJIAN R. Enhancer binding factors AP-4 and AP-1 act in concert to activate SV40 late transcription in vitro [J]. *Nature*, 1988, 332(6164):557-561.
- [9] UNK I, KISS-TOTH E, BOROS I. Transcription factor AP-4 participates in activation of bovine leukemia virus long terminal repeat by p34 Tax[J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22(23): 4872-4875.
- [10] HOLZMANN C, SCHMIDT T, THIEL G, et al. Functional characterization of the human Huntington's disease gene promoter [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001, 92(1-2):85-97.
- [11] ARANBURU A, CARLSSON R, PERSSON C, et al. Transcription factor AP-4 is a ligand for immunoglobulin-kappa promoter E-box elements [J]. *Biochem J*, 2001, 354(Pt2):431-438.
- [12] OU S H, GARCIA-MARTINEZ L F, PAULSSON E J, et al. Role of flanking E box motifs in human immunodeficiency virus type 1 element function [J]. *J Virology*, 1994, 68(11):7188-7199.

(编辑 张敏瑞)