

# 利用电泳迁移分析法初步探讨肺癌细胞株 CEA 的转录调控

徐平<sup>1</sup>, 童大跃<sup>2</sup>, 李芳<sup>1</sup>, 伍新尧<sup>2</sup>

(中山医科大学 1. 生化教研室, 2. 法医学教研室, 广东 广州 510089)

**摘要:**【目的】探讨癌胚抗原(CEA)表达水平不同的肺癌细胞株在转录因子水平有无差异。【方法】利用电泳迁移分析法(EMSA)检测这些细胞株与 CEA 启动子阳性足迹区探针结合的 DNA 结合蛋白。维甲酸(RA)诱导分化 A549 细胞, 检测诱导前后转录因子的变化。【结果】CEA 水平高的细胞 DNA 结合蛋白的条带信号强, CEA 水平低的细胞 DNA 结合蛋白的条带信号弱, CEA 阴性细胞可见到较弱的 DNA 结合蛋白信号。结合条带信号在诱导后细胞组明显减弱。【结论】CEA 基因特异性的表达部分依赖于转录因子的合成。转录因子量的改变与 CEA 表达的高低有关, 并且提示 RA 对 CEA 阳性肺癌细胞的诱导是在转录水平起作用。

**关键词:** 癌胚抗原; 转录因子; 凝胶迁移分析法; DNA 结合蛋白; 肺肿瘤

**中图分类号:** R734.2      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-257X(2002)01-0044-03

## Study on CEA Transcriptioned Regulation in Lung Cancer Cells by Electrophoretic Mobility Shift Assay

XU Ping<sup>1</sup>, TONG Da-yue<sup>2</sup>, LI Fang<sup>1</sup>, WU Xin-yao<sup>2</sup>. (1. Department of Biochemistry, 2. Faculty of Forensic Medicine, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

**Abstract** 【Objective】To study CEA transcriptioned regulation in lung cancer cells with different CEA expressing level and observe the changes in CEA and its transcription factors after A549 cell induced by RA (retinoic acid). 【Methods】DNA-binding proteins that bind specifically to three probes of positive footprinting area of CEA promoter were detected by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). A549 cells were induced by RA, the change of transcription factors were determined by EMSA. 【Results】The binding signal intensities of cells produced high CEA were stronger than that of cells produced low CEA, whereas weak signals could be found in non CEA producing cells. The intensities and numbers of the binding bands showed difference between A549 cells treated with RA for 4 days and the control cells. 【Conclusion】The various concentration or affinity of transcription factors to the cis-acting elements make changeable CEA expression. The quantity of transcription factors is related with the level of CEA expression. The RA induction acts on the CEA trascription level.

**Key words:** CEA; transcription factor; EMSA; DNA-binding proteins; lung neoplasms

癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)是一种重要的肿瘤相关抗原公认的肿瘤标志物, 该抗原在人体胚胎发育阶段表达, 出生后因控制合成 CEA 的基因被阻遏而逐渐消失, 当某些细胞恶变后又出现 CEA 的表达。大多数结直肠癌、胃癌和胰腺癌, 50% 乳腺癌及 70% 非小细胞性肺癌有 CEA 的高表达<sup>[1]</sup>。目前 CEA 转录调控机制尚未阐明<sup>[2,3]</sup>, 了解 CEA 转录调控可以更好的实现 CEA 阳性肿瘤的靶向治疗<sup>[4]</sup>。已经证明大肠组织在癌变过程中和癌变后 CEA 基因及其调控序列均为保守区, 没有重排和扩增现象, 也未发现其他有意义的突变<sup>[5]</sup>。由此我们把研究重点放在转录因子与 CEA 表达的关系上。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

①PCR 仪; ②电泳仪; ③电转移巢; ④硝酸纤维素膜; ⑤X-线胶片; ⑥有关的肺癌细胞; ⑦PCR 及电泳相关试剂。

### 1.2 提取核蛋白

以 CEA 表达水平不同的肺癌细胞株为研究对象, 以 Schreiber<sup>[6]</sup>报道的微量提取法提取核蛋白, 采用 Brad-ford 法蛋白定量。

### 1.3 合成探针及标记

合成三段寡核苷酸探针 FP1、FP2、FP3 及互补序列, 他们是 CEA 启动子具有最大活性所必需

收稿日期: 2001-07-08

基金项目: 中山医科大学科研基金资助项目(301182)

作者简介: 徐平(1970-), 女, 黑龙江巴彦人, 硕士, 主治医师, 现在北京中日友好医院。

的<sup>7]</sup>。探针序列如下:FP1:5' CACACCCATGACC-CACGTGATGCTG3'; FP2:5' AGAAATGAGAGG-GGAGGGGACAGA3'; FP3:5' AAAAAAGAGGAGGGACAAAAG3'。探针的地高辛标记以3'末端转移酶法标记并检测标记效率。

#### 1.4 检测与分析

①电泳迁移分析法 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA): 在冰浴中将5倍结合缓冲液4  $\mu$ L, Poly (dI-dC)1  $\mu$ L, Poly-L-精氨酸1  $\mu$ L, 标记的探针2  $\mu$ L, 核提取物3~5  $\mu$ g 混合, 无菌水补足总体积为20  $\mu$ L。23  $^{\circ}$ C 孵育30 min, 加5  $\mu$ L 无溴酚蓝的上样缓冲液, 混匀后立即上样。50 g/L 聚丙烯酰胺 (PAG) 凝胶电泳 (单体与交联剂比例为80:1), 电泳条件为10 V/cm。②电转移: 凝胶中DNA-蛋白质复合物在电转移槽中以200 mA 30 min 转移到尼龙膜。③固定: 转移后产物通过80  $^{\circ}$ C 烘烤2 h 固定于尼龙膜。④化学发光反应: 包括用阻断剂防止地高辛抗体的非特异吸附, 膜与稀释的抗体溶液孵育, Fab 片段交联碱性磷酸酶, Ag-Ab-碱性磷酸酶 (AP) 与发光底物反应。⑤尼龙膜与X线片置暗盒中在室温下曝光15~20 h。⑥自显影。⑦维甲酸 (RA) 诱导 A549 细胞: A549 细胞用含体积分数10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液培养, 处理组细胞加入终浓度为10  $\mu$ mol/L 的 RA, 避光37  $^{\circ}$ C 培养, 每24 h 换液一次, 共处理7 d。⑧细胞周期的改变 (流式细胞术测定)。⑨CEA 测定 (RIA 法)。⑩提取诱导前后 A549 细胞的核蛋白, 分别与3段探针做 EMSA。

## 2 结果

### 2.1 诱导前电泳迁移分析法

3  $\mu$ g 核蛋白与探针相互作用后, 电泳结果显示: 用 FP1 探针得到的一条结合带在 CEA 表达水平不同的细胞中强弱不一, 其中 A549 细胞 (CEA 高表达) 的结合带最强, GLC-82 细胞 (CEA 低表达) 的结合带次之, L-78 细胞 (CEA 阴性) 只见较弱的结合带 (图1)。FP2 和 FP3 探针与3种细胞的核蛋白结合后, 均出现两条不同迁移率的结合带, 其中 A549 细胞的两条结合带强于 GLC-82 细胞的, L-78 细胞只见微弱的结合带 (图2, 3)。

### 2.2 RA 作用 A549 细胞后出现特有的细胞表型

2.2.1 细胞形态改变 细胞形态改变明显, 在光镜下出现细胞体积缩小, 在7 d 的过程中未见急剧的细胞死亡。

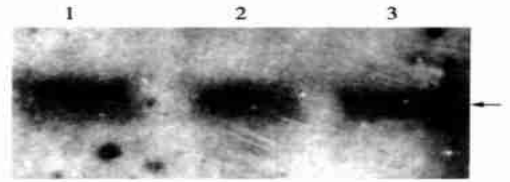


图1 FP1 探针与3种细胞核提取物结合泳带  
Fig. 1 Binding effect of the FP1 probe with cells nuclear extracts (EMSA)

1: A549; 2: GLC-82; 3: L-78; ←: Complex of the FP1 probe and nuclear extracts

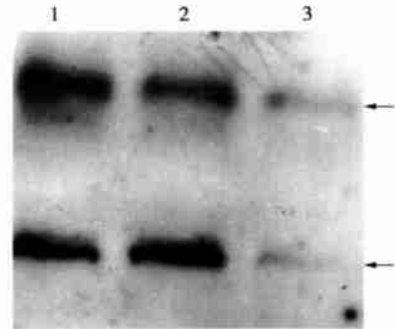


图2 FP2 探针与3种细胞核提取物结合泳带  
Fig. 2 Binding effect of the FP2 probe with cells nuclear extracts (EMSA)

1: A549; 2: GLC-82; 3: L-78; ←: Complex of the FP2 probe and two two different molecular nuclear extracts

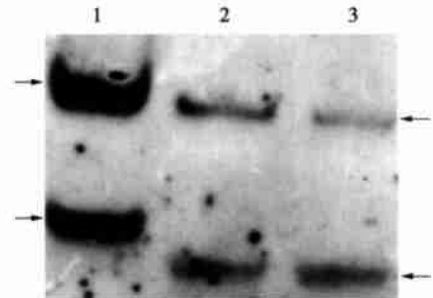


图3 FP3 探针与3种细胞核提取物结合泳带  
Fig. 3 Binding effect of the FP3 probe with cells nuclear extracts (EMSA)

1: A549; 2: GLC-82; 3: L-78; ←: Complex of the FP3 probe and two two different molecular nuclear extracts

2.2.2 细胞周期改变 用药第3天细胞  $G_0/G_1$  期百分比明显增加, S 期百分比下降。以第4天效果显著 (表1)。

2.2.3 CEA 测定 未处理的 A549 CEA 为0.51  $\mu$ g/ $\mu$ g 细胞总蛋白, 用药第4天的 A549 细胞的 CEA 为0.24  $\mu$ g/ $\mu$ g 细胞总蛋白, 较未用药时下降约50%。

表 1 维甲酸诱导前后 A549 细胞周期的改变

Table 1 Cell cycles of A549 cells after treated with RA (%)

Day	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> (%)	G <sub>2</sub> (%)	S(%)
0	58.7	3.2	38.2
3	76.6	0.5	22.8
4	76.0	4.0	20.0
6	73.9	5.8	20.3

### 2.3 诱导后电泳迁移分析法

分别用 RA 作用第 4 天与未用药细胞的核提取物与 3 段探针相互作用。与 FP1 探针作用后, 结合信号在诱导后的细胞组明显减弱(图 4); 与 FP2、FP3 探针结合的结合带在诱导后均减弱。

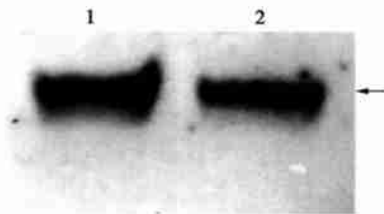


图 4 FP1 探针与 A549 细胞诱导前后的核提取物反应

Fig. 4 Binding effect of the FP1 probe with nuclear extracts of A549 cell

1: FP1 probe bound with differentiated A549 cell after using RA for 4 days; 2: FP1 probe bound with nuclear extracts of undifferentiated A549 cell ←: Complex of the FP1 probe and nuclear extracts

## 3 讨论

基因的特异性表达主要在转录起始的水平上受到调控。基因在转录水平上受两大因素调控, 一种是基因顺式作用序列, 另一种因素是细胞核内存在的识别以上序列并发挥相应功能的反式作用因子<sup>[8]</sup>。从本实验的结果得出结论 CEA 基因的特异性表达部分依赖于转录因子的合成。不同细胞中 CEA 基因的转录因子的有效浓度不同或者与顺式元件的亲合力不同, CEA 表达水平不同。实验中还发现 CEA 阴性细胞也可见到与 FP1、FP2 和 FP3 探针结合的较弱条带, 说明了 3 种可能: 这些 DNA 结合蛋白并非全部都能启动 CEA 基因的转录过程。CEA 表达的调控机制尚存在其他水平的控制<sup>[9]</sup>。CEA 阴性细胞 CEA 基因表达调控与阳性细胞有不同的机制。本实验使用 RA 2 天后流式细胞术检测结果表明, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞增多, S 期细胞减少。RA 分化诱导剂阻止 A549 细胞进入 S 期, 减少细胞增殖。而且在 7 d 的诱导过程中, 第 4

天的细胞各项指标的变化最明显, 与某些文献报导类似<sup>[10]</sup>, 所以选取第 4 d 的细胞做进一步的研究。10<sup>-5</sup> mol/L RA 诱导后的 A549 细胞出现生长状态、DNA 合成速率及 G<sub>1</sub> 期延滞和 G<sub>1</sub>-S 期转换的抑制。这是处于分化过程中的细胞具有的共同特征。A549 细胞受诱导剂作用后 CEA 表达下降, 相关的 DNA 结合蛋白的水平降低, 进一步说明了转录因子量的改变在一定程度上决定了 CEA 表达的变化, 也提示 RA 对 CEA 阳性肺癌细胞的诱导是在转录水平起作用。据研究认为维甲酸进入细胞核后即与特异的核受体结合, 形成 RA-RA (RAR-VA 酸受体) 复合物, 这些二聚体与靶基因(包括 CEA 基因)启动子结合, 通过调节靶基因的转录表达, 而发挥生物学活性, 产生维甲酸效应<sup>[11]</sup>。RA 作为一种很有希望的治疗肿瘤的药物, 将受到越来越多的重视。

### 参考文献:

- [1] Norton J A. Carcinoembryonic antigen, new application for an old marker[J]. *Ann Surg*, 1991, 213(2): 113.
- [2] Chen C J, Li J L, Maruya A. *In vitro* and *in vivo* footprint analysis of the promoter of carcinoembryonic antigen in colon carcinoma cells: effects of interferon r treatment[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(17): 3873.
- [3] Hauck W, Stanners C P. Transcriptional regulation of the carcinoembryonic antigen gene[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(8): 3602.
- [4] Harrington K J, Linardakis E, Vile R G. Transcriptional control: an essential component of cancer gene therapy strategies [J]. *Adv Drug Deliv Rev* 2000, 44(2-3): 167.
- [5] Cao G W, Kuriyama S, Gao J. Comparison of carcinoembryonic antigen promoter regions isolated from human colorectal carcinoma and normal adjacent mucosato induce strong tumor-selective gene expression[J]. *Int J Cancer*, 1998 78(2): 242.
- [6] Schreiber E, Matthias P, Muller M M. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts' prepared from a small number of cells[J]. *Nucleic Acids Res* 1989, 17(15): 6420.
- [7] Fichera A, Michelassi F, Arenas R B. Selective expression of carcinoembryonic antigen promoter in cancer cell lines[J]. *Dis Colon Rectum*, 1998, 41(6): 589.
- [8] 沈羽非, 方福德. 真核基因表达调控[M]. 北京高等教育出版社, 1996. 156~159.
- [9] Chen C J, Li L T, Maruya A, *et al.* *In vivo* footprint analysis of the promoter of carcinoma cell: effects of interferon gamma treatment[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(17): 3873.
- [10] 黎伯钧, 张雪艳, 蔡岩. 维甲酸对人肺癌细胞系分化作用的实验研究[J]. *中华医学杂志*, 1995, 75(5): 11.
- [11] 王振义, 陈竺. 肿瘤的诱导分化和凋亡疗法[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998. 89~91.

(编辑 张敏瑞)