

肺癌中肿瘤抑制基因 CEACAM1 的选择性拼接与 PTB 的过表达有关

袁榴娣, 丁洁, 李震

Alternating Splicing of Tumor Suppressor Gene CEACAM1 is Correlated with Over-expression of PTB in Lung Cancer

YUAN Liur-di, DING Jie, LI Zhen

Department of Genetics and Development Biology, Genetics Center of Southeast University, Nanjing 210009, China

Corresponding Author: YUAN Liur-di, E-mail: yld@seu.edu.cn

Abstract: Objective The possibility of modulating the difference of CEACAM1 splicing pattern between tumor tissues and their corresponding non-malignant lung tissue. **Methods** Detect the expression pattern of CEACAM1 in non-small cell lung cancer (NSCLC) by Hot-PCR, mini-gene constructs and co-transfection with PTBs. **Results** The RNA transcript from this mini-gene could be spliced in a cell-specific manner. The exon 7 was predominantly included in H1944, but predominantly excluded in 22B. Over-expression of PTB could ubiquitously alter the ratio of CEACAM1L and CEACAM1S. The amount of CEACAM1L was decreased in a dosage-dependent manner. **Conclusion** We identified polypyrimidine tract binding protein (PTB) as the splicing factor that involves in inclusion / exclusion of CEACAM1 exon 7. A clear correlation was found between over-expression of PTB and the alternative processing of CEACAM1.

Key words: CEACAM1; Alternative splicing; PTB; Mini-gene

收稿日期: 2005-06-01; 修回日期: 2005-10-20

作者单位: 210009 南京, 东南大学遗传与发育生物学系, 东南大学遗传中心

通讯作者: 袁榴娣, E-mail: yld@seu.edu.cn

作者简介: 袁榴娣(1965-), 女, 博士, 副教授, 主要从事 RNA 拼接机制研究

摘要: 目的 研究 CEACAM1 通过选择性拼接而产生的两种变体在小细胞肺癌及癌旁组织中表达比例不同的调控机制。 **方法** 通过 Hot-PCR 检测小细胞

NSCLC 的阳性表达率为 64.8%, 也证明 GST- 在 NSCLC 中有着高而强的阳性表达, 提示 GST- 可能是介导 NSCLC 固有耐药性的主要原因之一。有关 NSCLC 中 GST- 表达与以顺铂为主的诱导化疗疗效分析的研究表明, GST- 高表达患者的生存期明显低于低表达者, 且 GST- 高表达与 p53 突变显著相关, 说明 GST- 通过外排顺铂抑制了由顺铂导致的 p53 依赖的肿瘤细胞的凋亡。本研究结果也显示 GST- 的表达与 NSCLC 对环磷酰胺、顺铂 + 5-Fu 及阿霉素的化疗耐药性呈显著的正相关并与表达程度有关 ($P < 0.05$), 说明 GST- 是介导 NSCLC 固有耐药性的重要耐药性因素之一。

通过本研究, 我们发现非小细胞肺癌存在着固有的化疗耐药性, 而且 LRP 及 GST- 的表达与 NSCLC 的耐药性呈明显的相关性并与表达程度正相关, 说明 LRP 及 GST- 基因共同参与作用了 NSCLC 的固有的化疗耐药性。

(本文图见第 384 页)

参考文献:

- [1] 辛华雯, 王润帮. MTT 显色法快速测定实体瘤化疗药物敏感性方法[J]. 肿瘤防治研究, 1993, 20(4): 254-256.
- [2] Abe S, Kubota T, Matsuzaki SW, et al. Chemotherapy test is useful in evaluating the appropriate adjuvant cancer chemotherapy for stage non-scirrhus and scirrhus gastric cancers [J]. Anticancer Res, 1999, 19(5C): 4581-4586.
- [3] 赵彤, 朱梅刚, 黄宗义, 等. 肺癌基因蛋白产物同步检测的对比分析[J]. 癌症, 1995, 1(3): 13-14.
- [4] Carmichael J, Mitche JB, Degraff G. Chemotherapy testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay [J]. Br J Cancer, 1998, 57(6): 540-544.
- [5] Volm M, Mattern J, Samsel B. Overexpression of P-glycoprotein and glutathione S-transferase in resistant non-small cell lung carcinomas of smokers [J]. Br J Cancer, 1991, 6(4): 700-705.
- [6] 王洁, 刘叙仪, 蒋薇, 等. LRP, MRP, MDR1 基因在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义 [J]. 中华肿瘤杂志, 2000, 22(4): 304-308.

[编辑: 安凤]

肺癌中 CEACAM1 的两种产物的表达;Western blot 分析 PTB 在小细胞肺癌组织的表达;用 PCR 方法获得 CEACAM1 基因中从内含子 5 至外显子 8 长 1,606-bp DNA 片段插入到真核表达载体 pCMV 中,构建成 CEACAM1 迷你基因模型并与 PTB 基因共转染,PCR 法鉴定转染后的产物变化。结果 PTB 过表达与 CEACAM1 的低表达有明显的相关性。PTB 三种变体使 CEACAM1L 表达下降,其中 PTB4 对迷你基因的表达产物影响最大。仅转染迷你基因的细胞中 CEACAM1L 在两条带中所占比例为 76.7%,而与 PTB 三种变体共转染后,比例分别下降至 58.3%、64.8% 和 54%。结论 拼接因子 PTB 与 CEACAM1 的选择性拼接有关。

关键词:CEACAM1;选择性拼接;PTB;迷你基因

中图分类号:R734.2 文献标识码:A

文章编号:1000-8578(2006)05-0320-04

0 引言

肺癌为当前世界各地最常见的恶性肿瘤之一,而肺癌的病因和发病机制尚未明确。从分子生物学角度看,细胞癌变是多因素、多阶段、多基因变异的结果。这些改变与抑癌基因失活有很大的关系^[1]。

癌胚抗原相关的细胞粘附分子 1(CEACAM1, CEACAM1),是一种跨膜糖蛋白^[2],在多种上皮细胞起源的肿瘤中起肿瘤抑制基因作用,属于免疫超家族基因。该基因长约 1.48 kb,共有 9 个外显子组成,其中第七外显子长 53 bp,位于 CEACAM1 的胞内端,在选择性拼接中可被选择性去除,从而产生两种变体,即 CEACAM1L 和 CEACAM1S。CEACAM1L 含外显子 7,因此胞内端较长,而在 CEACAM1S 的形成中,由于外显子 7 被剪切去除产生移框,其胞内端少了 73 个氨基酸。有研究表明,CEACAM1 在多种肿瘤如肠癌、肝癌、乳腺癌和前列腺癌中普遍下调^[3]。当老鼠的 CEACAM1L 被转入鼠的肠癌或乳腺癌等细胞时,细胞的生长速度明显减慢,恶性程度降低^[4,6]。Estrera 等^[7]研究认为仅表达 CEACAM1L 的胞内部分即能产生抑制肿瘤生长的作用,因此 CEACAM1L 的胞内端对抑制肿瘤的生长是必需的。但在肺癌的发生中,CEACAM1 的表达与其他肿瘤有明显的不同。根据 RNA 原位杂交和 Northern blot 分析,CEACAM1L 在 75% 的肺癌旁组织高表达,而 CEACAM1S 在 84% 的肺癌中高表达^[8]。为了研究肺癌发生过程中两种变体表达谱改变的调控机制,我们采用了迷你基因模型与 PTB 共转染,实验证明 CEACAM1 的选择性拼接与 PTB 有关。

1 材料和方法

1.1 菌株及试剂

大肠杆菌 DH5 由本实验室保存。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司,Complete™ protease inhibitor cocktail 购自 Roche 公司,BCA 蛋白定量试剂盒购自 Pierce 公司。Hotstar Taq DNA Polymerase 购自 Qiagen 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

H1944、22B 由美国 M. D. 安得森癌症中心毛利先生惠赠。细胞在 37℃、5% CO₂、DMEM/F12 培养基(5% 的小牛血清,100U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素)中生长。

1.2.2 RT-“Hot”PCR

RT-“Hot”PCR 用末端标记³²P 的引物进行,上游引物:5'-GGTTGCTCTGATAGCAGTAG-3',下游引物:5'-AGCCTGGAGATGCCATTAG-3',来扩增细胞中 CEACAM1 两种表达产物,分别为 CEACAM1L(408bp)和 CEACAM1S(355bp)。PCR 反应体系为 12.5μl,含 7% DMSO,1.5 mM dNTP,6.7 mM MgCl₂,16.6 mM (NH₄)₂SO₄,67 mM Tris,10 mM β-巯基乙醇,6.7 mM EDTA,1.2 mM 引物,0.625 U 的 Hotstar 聚合酶。反应条件如下:95℃ 变性 30s,60℃ 退火 1min,70℃ 延伸 1min,25 个循环,PCR 产物行 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,压 X 光片。

1.2.3 Western blot 分析 PTB 表达

抗 PTB 的单克隆抗体由冷泉港实验室 David Helfman 惠赠。按文献^[9]提取临床标本的核蛋白,1X 上样缓冲液(SDS loading buffer)溶解,煮沸 5min 处理后,行 SDS-PAGE。100V、1.5h 将蛋白转至 PVDF 膜上,在含有 20% Tween-100 的 TBS(TBST)溶解的脱脂奶粉中封闭 1h,PTB 作为一抗(1:200)室温孵育 1h,TBST 清洗 8 次,每次 5ml,带有 HRP 标记的羊抗兔的二抗室温孵育 1 小时,TBST 清洗 8 次,每次 5ml,加入发光底物,X 光片感光显色观察。

1.2.4 CEACAM1 迷你基因重组质粒的构建

用 PCR 方法获得 CEACAM1 基因中从内含子 5 至外显子 8 长 1,606-bp DNA 片段插入到真核表达载体 pCMV 中,重组质粒经测序鉴定。引物序列为:5'-GGGAA TTCCCA TGACAaA TAA TGCTC-TACC-3'和 5'-GGTACCCTTGTTA GGTGGGT-CATTGG-3'。为了避免内含子 5 和外显子 6 的连接处拼接位点核苷酸序列可能的影响,我们将内含子 5 拼接位点内的“ag”突变为“aa”。

1.2.5 迷你基因与 PTB 共转染

我们选用主要表达 CEACAM1L 的 H1944 细

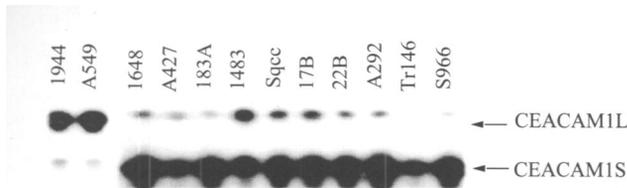


图 1 CEACAM1L and CEACAM1S 在 NSCLC 细胞株中的表达

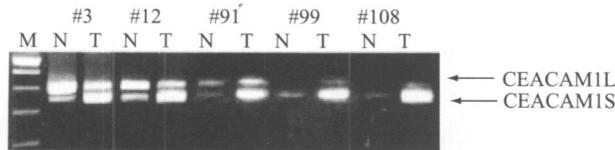


图 2 肺癌组织中 PTB 的 western blot 分析 PTB 高表达和 CEACAM1L 的低表达

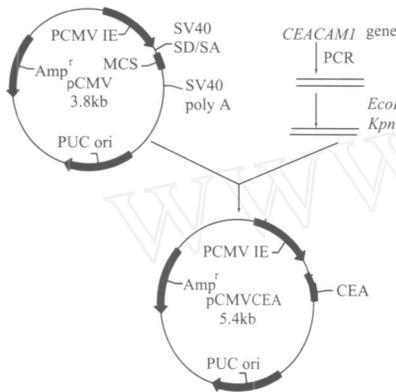


图 3 重组载体的构建

胞株作为 CEACAM1 迷你基因与 PTB 的瞬时转染的宿主细胞,实验按 Lipofect AMINE™ 转染试剂盒操作说明书进行。细胞在 100-mm 培养皿中生长至约 80%,加入 DNA/lipofect AMINE™ 混合物 (10μg/40 μl,室温放置 40min) 和 4ml 无血清、无抗生素的培养基混合物加入细胞中,37℃ 培养 6h 后,更换为含有血清、抗生素的培养基。转染 72h 后收集细胞,用 RNAzol 提取总 RNA,每种载体重复转染 3 次。用位于外显子 6 中的序列作为引物 S1:5'-GGTTGCTCTGATAGCAGTAG-3'和载体上的 T7 序列为引物:5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA G-3',来扩增转染的 CEACAM1 迷你基因的表达产物。PCR 反应条件如下:94℃ 变性 1min,55℃ 退火 1min,72℃ 延伸 2min,25 个循环,PCR 产物经测序鉴定。

2 结果

2.1 RT-“ Hot ”PCR

RT-“ Hot ”PCR 结果见图 1,CEACAM1 两种

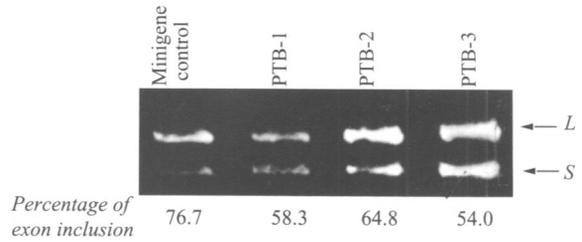
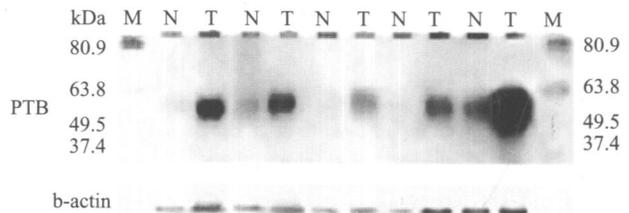


图 4 H1944 细胞株中与 PTB 共转染后迷你基因 L/S 表达谱



产物的表达有细胞特异性,在 H1944 及 A549 细胞株中,主要以 CEACAM1L 的形式存在,而在大部分其他细胞株中,则主要以 CEACAM1S 的形式存在。

2.2 PTB 的 Western blot 分析

Western blot 分析的结果见图 2,PTB 高表达与 CEACAM1L 低表达有明显的相关性。在肿瘤组织中,PTB 明显高表达,而 CEACAM1L 表达水平较癌旁组织明显下降。

2.3 重组载体的构建

PCR 得到的约为 1.6kb 的 DNA 片段,经酶切连入真核表达载体 pCMV,构建的重组载体经测序鉴定无误,阅读框不变。

2.4 迷你基因的表达及与 PTB 共转染

我们选用主要表达 CEACAM1L 的 H1944 细胞株作为迷你基因及 PTB 重组载体瞬时转染的宿主细胞,用 PCR 方法检测表达产物的变化,见图 4。PTB 三种变体都影响迷你基因的表达产物的比例,都使 CEACAM1L 表达下降,其中 PTB4 对迷你基因的表达产物影响最大。仅转染迷你基因的细胞中 CEACAM1L 占比为 76.7%,而与 PTB 三中变体共转染后,比例分别下降至 58.3%、64.8%和 54%。

3 讨论

真核生物基因由外显子与内含子组成,通过转录形成的 mRNA 前体必须去除内含子,将外显子拼接起来,才能形成成熟的 mRNA,作为翻译的模板。拼接有组成型拼接与选择性拼接两种,是基因表达的必经阶段,也是转录后遗传信息扩展的重要机制。有研究表明,人类因基因突变所致的疾病中,有 15%是由于拼接异常引起的。尽管拼接的缺失与肿瘤的因果关系还不十分清楚,但很多实验结果表明,

人肿瘤中有很多基因产物的比例发生了变化。

CEACAM1 基因通过其外显子 7 的选择性拼接产生两种变体,即 CEACAM1L 和 CEACAM1S。CEACAM1L 的胞内部分是其具有肿瘤抑制活性所必需的,当去除第七外显子后成为 CEACAM1S,则失去其肿瘤抑制活性。有文献报道,在 84% 的小细胞肺癌组织中及大多数非小细胞肺癌细胞和小细胞中,CEACAM1L 的表达水平均下降^[10]。为了研究 CEACAM1 外显子 7 的选择性拼接机制,我们将 CEACAM1 基因中从内含子 5 至外显子 8 长 1 606-bp 的 DNA 序列插入到真核表达载体 pCMV 中,并转染 H1944,以此检测从 CEACAM1 同一个 mRNA 前体是否能产生两种变体。为了避免内含子 5 和外显子 6 的连接处拼接位点核苷酸序列可能的影响,我们将内含子 5 拼接位点内的“ag”突变为“aa”。实验结果表明,迷你基因的表达产物 CEACAM1L 和 CEACAM1S 是从同一 mRNA 前体经选择性拼接而产生的。

PTB 是 hnRNP 家族的一员,识别富含嘧啶的核苷酸序列,能与 U2AF 竞争结合位点,在一些外显子选择剪切过程中起负调控作用,能抑制外显子的剪切。文献报道的 PTB 调控的基因有 FGFR-1, GABA_A receptor 2, c-src, fibronectin, and α -tropomyosin。Western blot 分析的结果表明,PTB 高表达与 CEACAM1L 低表达有明显的相关性。为了研究可能参与 CEACAM1 外显子 7 的选择性拼接的拼接因子,我们将 CEACAM1 迷你基因模型与三种 PTB-pCDNA 共转染细胞株,实验结果表明,PTB 三种变体都影响迷你基因的表达产物的比例,CEACAM1L 所占比例分别下降至 58.3%、64.8% 和 54%。

至此我们建立了研究 CEACAM1 选择性拼接

的细胞模型,初步探讨了 PTB 与 CEACAM1 外显子 7 的选择性拼接的相关性,为进一步研究 PTB 对 CEACAM1 外显子 7 选择性拼接的调控及在肿瘤发生过程的作用研究奠定基础。

参考文献:

- [1] 李奇志,张胜名,毛永荣,等. 非小细胞肺癌中 p65 和 C-myc 的表达及意义[J]. 肿瘤防治研究,2003,30(5):359-363.
- [2] About-Rjaily GA, Lee SJ, May D, et al. CEACAM1 modulates epidermal growth factor receptor-mediated cell proliferation[J]. J Clin Invest, 2004, 114(7):944-952.
- [3] Kammerer R, Riesenber R, Weiler C, et al. The tumour suppressor gene CEACAM1 is completely but reversibly downregulated in renal cell carcinoma[J]. J Pathol. 2004, 204(3):258-267.
- [4] Kunath T, Ordonez-Garcia C, Turbide C, et al. Inhibition of colonic tumor cell growth by biliary glycoprotein[J]. Oncogene, 1995, 11:2375-2382.
- [5] Luo W, Wood CG, Earley K, et al. Suppression of tumorigenicity of breast cancer cells by an epithelial cell adhesion molecule (C-CAM1): the adhesion and growth suppression are mediated by different domains[J]. Oncogene, 1997, 14: 1697-1704.
- [6] Sielaff W, Dango S, Woelfle U, et al. Elevated expression of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 promotes progression of non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(6):2260-2266.
- [7] Estrera VT, Phan D, Luo W, et al. The cytoplasmic domain of C-CAM1 cell adhesion molecule is necessary and sufficient to suppress the tumorigenicity of prostate cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 263: 797-803.
- [8] Wang L, Lin SH, Wu WG, et al. C-CAM1, a Candidate Tumor Suppressor Gene, is Abnormally Expressed in Primary Lung Cancers[J]. Clinical Cancer Res, 2000, 6:2988-2993.
- [9] Tran H T, Bridges D, Ulke A, et al. Detection of multiple splice variants of the nuclear protein phosphatase 1 regulator sds22 in rat liver nuclei[J]. Biochem Cell Biol, 2002, 80(6):811-815.
- [10] Soria JC, Lee HY, Lee Ji, et al. Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(5):1178-1184.

[编辑:周永红]