

· 专题报道 ·

转录因子 GATA 4 和甲胎蛋白在小鼠胎肝和肝癌细胞中的表达对比及其相关性

任传路^{1,2}, 季 健¹, 沈红石¹, 刘厚奇^{2*}

(1. 解放军第 100 医院检验科, 苏州 215007; 2. 第二军医大学基础部组织胚胎学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:**探讨转录因子 GATA4 和甲胎蛋白(AFP)在小鼠胎肝和肝癌细胞中的表达及二者相关性。**方法:**获取小鼠孕 10.5 d、孕 13.5 d、孕 15.5 d、孕 17.5 d、出生后 0.5 d 的肝组织,半定量 RT-PCR 检测 GATA4 和 AFP mRNA 的表达,并以小鼠肝、正常肝细胞株和肝癌细胞株作为对照。将小鼠 GATA4 真核表达载体成功转染正常肝细胞并鉴定,将多柔比星作用肝癌细胞,然后均进行以下指标监测:半定量 RT-PCR 法检测 GATA4、AFP 和胎蛋白转录因子(FTF)mRNA 的表达,免疫印迹法检测 GATA4 和 AFP 蛋白的表达,ELISA 法检测细胞上清 AFP 的含量。**结果:**随着胎肝细胞分化的不断成熟,GATA4 和 AFP 的表达逐渐下降,至出生后 0.5 d 已降至成人水平。GATA4、FTF 和 AFP 在正常肝细胞不表达,而在肝癌细胞高表达;正常肝细胞转染 GATA4 后,FTF 和 AFP 表达显著增高,其细胞上清液 AFP 含量亦明显增高。多柔比星作用肝癌细胞后,6 h 内 GATA4 的表达首先降低;随着时间延长(≥ 12 h),FTF 和 AFP 表达逐渐降低,细胞上清液 AFP 含量亦逐渐降低,差别具有显著的统计学意义。**结论:**GATA4 在胎肝组织和肝癌细胞中高表达并可能对 AFP 也有一定的上调作用。

[关键词] GATA4 转录因子;甲胎蛋白;胚胎;肝;肝肿瘤

[中图分类号] R 735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)12-1309-05

Expression of GATA 4 and alpha fetoprotein in fetal mouse liver and hepatocarcinoma cells and their relationship

REN Chuan-lu¹, JI Jian¹, SHEN Hong-shi¹, LIU Hou-qi² (1. Department of Laboratory Medicine, No. 100 Hospital of PLA, Suzhou 215007, China; 2. Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To explore the expression of GATA4 and alpha-fetoprotein (AFP) in fetal liver and hepatocarcinoma cells and their correlation. **Methods:** Semi-quantitative RT-PCR was used to detect the expression of GATA4 and AFP in liver tissues from mouse of E 10.5 d to P 0.5 d, normal liver cells, and hepatocarcinoma cells. Eukaryotic expression vector of mouse GATA4 was used to transfect normal liver cell line and the product was identified. Doxorubicine was used to treat hepatocarcinoma cells; then semi-quantitative RT-PCR was used to determine the mRNA of GATA4, fetoprotein transcription factor(FTF) and AFP; Western blot was used to examine the expression of GATA4 and AFP; and ELISA was used to determine AFP in supernatants. **Results:** The expression of GATA4 and AFP decreased with the maturation of fetal liver cells and reached adult level 0.5 d after birth. GATA4, FTF and AFP were not detected in normal liver cells but were overexpressed in hepatocarcinoma cells. The expression of FTF and AFP was increased in normal liver cells after transfection of GATA4, and the level of AFP was also increased in the supernatant. GATA4 was sharply decreased in hepatocarcinoma cells within 6 h after doxorubicine treatment; the expression of FTF and AFP was also decreased in supernatants 12 h after doxorubicine treatment ($P < 0.05$). **Conclusion:** GATA 4 is highly expressed in fetal liver and hepatocarcinoma cells, which may contribute to the elevation of AFP expression.

[KEY WORDS] GATA4 transcription factors; alpha-fetoproteins; embryo; liver; liver neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(12):1309-1313]

研究已报道转录因子 GATA4 能够促进正常肝细胞的增殖和瘤化^[1],且人肝癌组织芯片研究发现 GATA4 在肝癌及癌旁组织表达比甲胎蛋白(AFP)敏感^[2],提示 GATA4 可能是优于 AFP 的肝癌诊断指标,两者是否存在一定的调节关系或 GATA4 是否与 AFP 上游调节因子胎蛋白转录因子(fetoprotein transcription factor, FTF)有一定联系,尚未见相关报道。本研究拟比较胎肝细胞和肝癌细胞中 GATA4 和 AFP 的表达及在基因转染和葱环类 GATA4 抑制药物干预条件下两者的相关性,进一

步阐明 GATA4 的生物学作用。

1 材料和方法

1.1 材料 C57BL/6 成年小鼠购自中国科学院实验动物中心。小鼠成纤维细胞株 3T3、小鼠正常肝细胞株 BNL. CL. 2 和小鼠肝癌细胞株 H22 及 He-

[基金项目] 国家自然科学基金(90208026)。Supported by National Natural Science Foundation of China(90208026)。

[作者简介] 任传路,博士,主治医师。E-mail:clu_ren@126.com

* Corresponding author. E-mail:houliliu@126.com

pa1-6均购自中国科学院上海细胞所,用含10%胎牛血清的DMEM培养基在细胞培养箱中37℃、体积分数5%CO₂条件下传代培养。

小鼠GATA 4 pcDNA3.1真核表达载体由Garge V教授惠赠。插入序列两酶切位点分别为*Cla*I和*Xho*I序列,测序工作由上海鼎安生物公司完成。

多柔比星购自Sigma公司,浓度参考文献^[3],为300 nmol/L。RNA抽提试剂盒购自华舜生物有限公司,TaKaRa 两步法 RT-PCR 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司,引物由上海迪安生物有限公司合成。兔抗小鼠GATA 4和AFP多克隆抗体(Santa Cruz, USA)、HRP标记山羊抗兔IgG(上海华美生物工程公司, SABC)。小鼠AFP ELISA试剂盒(编号: E0153m)购自武汉中美生命科学试剂库。

1.2 胎肝获取、细胞株准备 待C57BL/6小鼠适应环境后于晚上合笼,以第2日早上发现阴栓为交配成功标志,该天中午记为E0.5 d(孕0.5 d)。分别将E10.5 d、E13.5 d、E15.5 d、E17.5 d、P0.5 d(生后0.5 d)肝以及成鼠肝放入经DEPC处理的Eppendorf管至液氮片刻,随即放入-80℃冰箱保存备用。同时取E13.5 d胎鼠心脏组织和Hepal-6细胞作为对照。RT-PCR检测GATA4和AFP mRNA的表达。

1.3 细胞转染 将GATA 4真核表达载体转染小鼠正常肝细胞BNL. CL. 2,具体转染步骤及转染后鉴定见参考文献^[1],将转染GATA 4的BNL. CL. 2简称为BNLG,分别用RT-PCR法检测细胞GATA 4、FTF和AFP mRNA的表达、Western印迹法检测细胞中GATA 4和AFP蛋白的表达,并用ELISA法检测细胞培养上清液中AFP的表达。同时以E13.5 d肝、3T3、H22和Hepal-6细胞为对照。

1.4 多柔比星药物干预实验 细胞传代以 2×10^4 分布于六孔板各孔,换液后,待其对数生长期,将多柔比星以300 nmol/L加入六孔板2~4孔,第1孔为空白对照,观察时段点为用药后0、6、12、18、24、30 h,共计6个时间点。实验重复6次。收集上清并分别抽提细胞总RNA和蛋白,分别用RT-PCR检测细胞GATA4、FTF和AFP mRNA的表达、Western印迹法检测细胞中GATA4和AFP蛋白的表达,并用ELISA法检测细胞培养上清液中AFP的表达。

1.5 RT-PCR法检测GATA 4和AFP mRNA表达

1.5.1 RNA抽提 按华舜生物有限公司说明书抽提组织和细胞RNA,总RNA保存方法、质量鉴定、浓度调整等见参考文献^[1]。

1.5.2 引物合成 小鼠GATA4、AFP的引物序列由Primer Premier5.0设计,分别以GenBank核酸序列数据库对应mRNA序列为模板设计。GATA4 P₁:5'-CTA AGC TGT CCC CAC AAG GCT ATG CA-3'; P₂:5'-CAG AGC TCC ACC TGG AAA GGT GTT TG-3';产物长度为326 bp。AFP P₁:5'-CTC TGG CGA TGG GTG TTT AG-3'; P₂:5'-TGC CTG GAG GTT TCG GGA TT-3';产物长度为469 bp。FTF P₁:5'-CAG AGT CCA GGA GAA CA-3'; P₂:5'-ATC CAC CAT TAG TAG CA-3';产物长度为319 bp。PCR条件:94℃,35 s;50℃,40 s;72℃,45 s;共30个循环。以GAPDH为内参照。P₁:5'-TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC-3'; P₂:5'-CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3',产物长度为990 bp。

1.5.3 RT-PCR 按两步法RT-PCR试剂盒说明书,将RNA反转录为cDNA,再行PCR,先94℃灭活5 min,GATA4和FTF PCR条件均为:94℃,35 s;50℃,40 s;72℃,45 s。AFP PCR条件:94℃,5 min;94℃,35 s;60℃,40 s;72℃,45 s;共30个循环;最后延伸温度72℃,10 min。内参照与各基因扩增条件相同。

1.6 Western印迹法检测GATA4和AFP蛋白的表达 以β-actin为内参照,将检测各组细胞中AFP和GATA4蛋白进行定量。细胞和组织先行匀浆,RIPA裂解液(0.01 mol/L Tris HCl pH 7.5,0.15 mol/L NaCl,1% Triton X-100,0.1% SDS pH 7.4)裂解,提取总蛋白。制备12% SDS聚丙烯酰胺凝胶。采用Bio-Rad公司的垂直电泳装置进行电泳,蛋白上样量为40 μg。按Bio-Rad公司的转膜装置将蛋白样本转移至硝酸纤维素膜上。电泳及转膜条件见产品说明书。杂交按Amershan公司的ECL Western blotting kit说明进行。将膜置暗盒中,X线片曝光。

1.7 ELISA法检测细胞培养上清液中AFP含量 各组细胞传代培养24 h时首次换液,以后每36 h换液1次(多柔比星处理组每6 h收集培养上清液)。1 000 r/min,除去细胞碎片。将处理后的培养上清液在-20℃下保存,以备蛋白含量测定。每次换液用1 000 μl微量移液器加培养液3 ml。各试剂在使用前平衡至室温。分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。除空白孔外,余孔分别加标准溶液或待测样品100 μl,注意不要有气泡,轻轻混匀,酶标板加上盖,37℃反应60 min,然后按试剂盒说明书依次进行加样等操作,最后用Bio-Rad 680酶免仪在450

nm 波长依序测量各孔的光密度值(D)。

1.8 图像分析和统计学处理 RT-PCR 产物电泳及免疫印迹成像以 pImage 软件分析, 结果以目的基因与内参照的灰度值之比即表达强度显示。采用 SPSS 11.0 软件, 进行 ANOV 方差分析。

2 结果

2.1 胎肝组织中 GATA 4 和 AFP mRNA 的表达 随着肝细胞分化的不断成熟, GATA 4 和 AFP mRNA 的表达逐渐下降, 至出生后 0.5 d 已降至成肝水平。GATA 4 mRNA 在 E13.5 d 心脏表达很高, 同时 GATA 4 mRNA 在小鼠肝癌细胞株中亦高表达, 与成肝相比有显著性差异($P < 0.01$)。见图 1。

相比, $P < 0.01$)。见图 2、图 3、图 4。

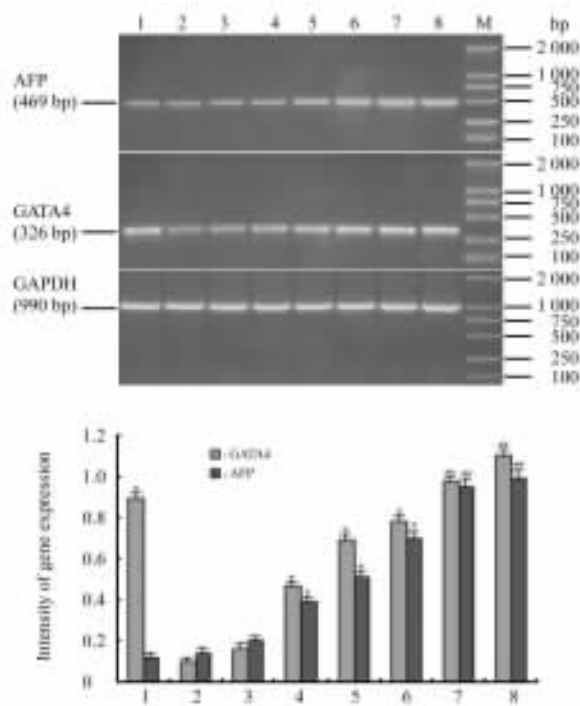


图 1 不同发育时段胎肝中 GATA4 和 AFP mRNA 的表达

Fig 1 GATA4 and AFP mRNA expression in fetal liver at different stages

1: E13.5 d heart; 2: Liver of adult mouse; 3: P0.5 d liver; 4: E17.5 d liver; 5: E15.5 d liver; 6: E13.5 d liver; 7: E10.5 d liver; 8: Hepa1-6; M: Marker. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs liver of adult mouse; $n = 12$, $\bar{x} \pm s$

2.2 GATA4 和 AFP 在细胞株及转染前后的表达 GATA4、FTF 和 AFP 在 3T3 和 BNL. CL. 2 中的表达极低, 而在 Hepa1-6 和 H22 中高表达, 差别具有显著的统计学意义($P < 0.01$), 而 FTF 和 AFP 趋势大致一致, 但在正常肝细胞中尚有极少许表达(与 3T3 相比, $P > 0.05$)。转染 GATA4 后, BNLG 中 GATA4、FTF 和 AFP 的表达均显著增高, 其上清液中也可检测到较高含量的 AFP(同 BNL. CL. 2

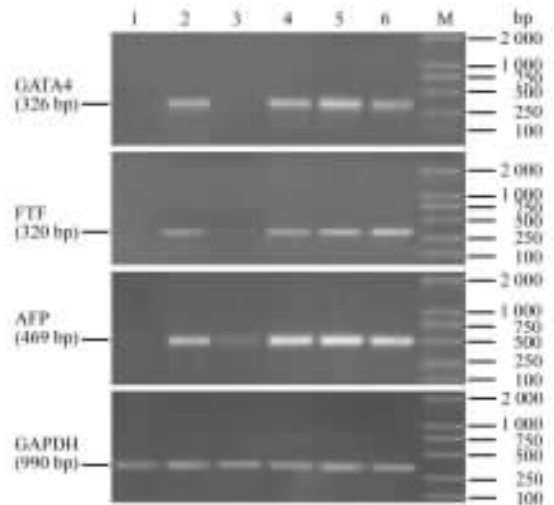


图 2 GATA4 转染前后 GATA4、FTF 和 AFP mRNA 的表达
Fig 2 mRNA expression of GATA4, FTF and AFP before and after GATA4 transfection

1: 3T3; 2: BNLG; 3: BNL. CL. 2; 4: H22; 5: Hepa1-6; 6: E13.5 d liver; M: Marker; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs BNL. CL. 2; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

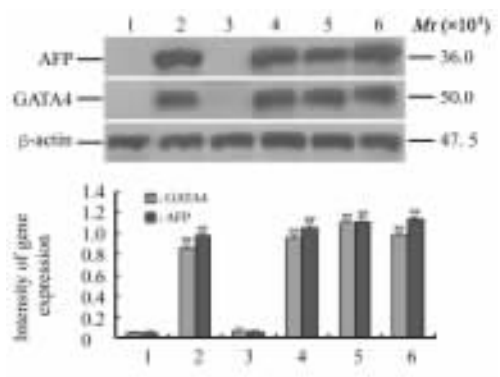


图 3 GATA4 转染前后 GATA4 和 AFP 蛋白表达强度
图 3 GATA4 and AFP protein expression before and after GATA4 transfection

1: 3T3; 2: BNLG; 3: BNL. CL. 2; 4: H22; 5: Hepa1-6; 6: E13.5 d liver. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs BNL. CL. 2; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

2.3 多柔比星抑制 GATA4 后相关基因的表达 随着药物作用时间的延长, GATA4 表达逐渐降低, 其余基因也在逐渐降低, 但 0 h 和 6 h 差别无显著的统计学意义($P > 0.05$); 在 12 h 以后, FTF

和 AFP 同 GATA4 的下降趋势基本一致(同 0 h 和 6 h 相比, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但同 GATA4 相比有所滞后, 见图 5、图 6。上清液中 AFP 的含量 0 h 和 6 h 差别无显著的统计学意义($P > 0.05$), 自 12 h 以后也逐渐降低(同 0 h 和 6 h 相比, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见图 7。

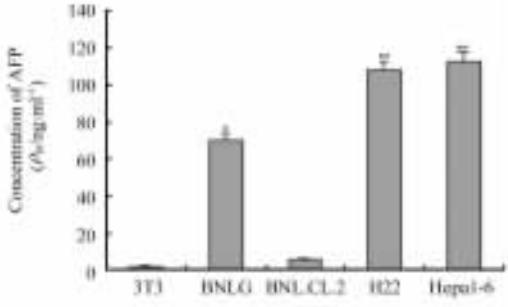


图 4 GATA4 转染前后细胞培养上清液中 AFP 的含量

Fig 4 AFP level in supernatants before and after GATA4 transfection

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs BNL1.CL.2; $n = 6, \bar{x} \pm s$

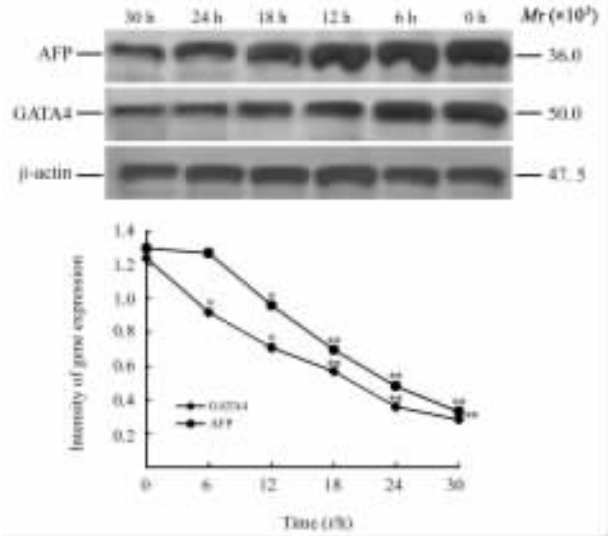


图 6 多柔比星抑制 GATA4 后 AFP 和 GATA4 的蛋白表达强度

Fig 6 AFP and GATA4 protein expression after GATA4 depletion by doxorubicine

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 h; $n = 6, \bar{x} \pm s$

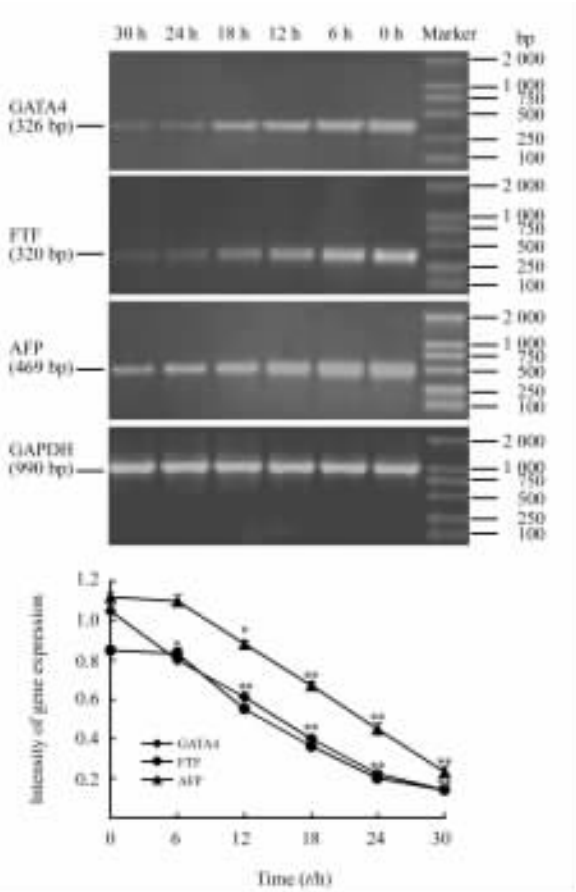


图 5 多柔比星抑制 GATA4 后 GATA4、FTF 和 AFP mRNA 的表达

Fig 5 GATA4, FTF and AFP mRNA expression after GATA4 depletion by doxorubicine

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 h; $n = 6, \bar{x} \pm s$

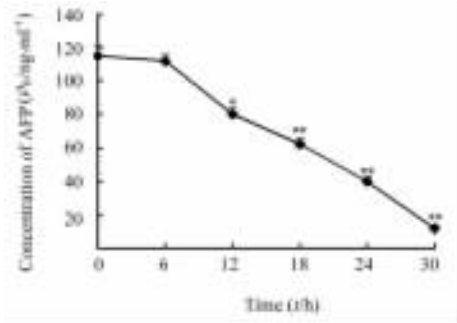


图 7 多柔比星抑制 GATA4 后细胞培养上清液中 AFP 的含量

Fig 7 AFP level in supernatants after GATA4 depletion by doxorubicine

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 h; $n = 6, \bar{x} \pm s$

3 讨论

3.1 GATA4 与肝发育 肝脏的发育是个十分精细的过程, 需要多种基因参与调控并形成复杂的网络。肝脏发育过程中的内胚层反应能力是如何获得的? 其间的参与基因及其上下游基因激活机制等, 目前尚未研究清楚。初步研究表明, GATA 家族中的某些成员如 4 和 6 参与了肝的发育^[4-5]。我们发现, GATA4 在胎肝中的表达随着细胞分化程度的不断升高而逐渐降低, 至出生后 0.5 d 已接近极低的成肝水平, 与 AFP 情况类似, 说明某种开关机制在发挥作用, 同时也验证了 GATA4 对发育中肝的主要作用。

3.2 GATA4 与 AFP 我们从肝癌细胞株肝癌组织芯片、肝癌组织及肝癌细胞株以 RT-PCR 法和免疫组化水平平均检测到 GATA4 的高表达,而在正常肝细胞株及肝组织不表达或极低表达,充分证实了 GATA4 在肝癌中存在高表达的现象,这在国内外尚未见相关报道。

众所周知,AFP 为临床检测和筛选肝癌的常用且重要的血生化指标,具有重要的参考价值,虽然其在正常肝细胞有少量表达,但超出上限值外,其含量高低也与肿瘤的恶性程度有一定相关^[6]。以前的研究结果也显示,AFP 在癌和癌旁均有表达,癌较癌旁高,低分化癌较高分化癌高^[2],提示 GATA4 与 AFP 在肝癌中存在惊人的消长一致。更有甚者,二者在众多肿瘤中如畸胎瘤、卵巢癌中的扩增也较为同步^[7]。FTF 位于 AFP 调控网络的枢纽或核心部位,既受 GATA 和碱性螺旋-环-螺旋的正向调控,同时也受肝细胞核因子 HNF4 α 的调控,但其亦可反过来调控 HNF4 α 、HNF3 β 及 HNF1 α 启动子^[8]。与本实验一致的是,BNLG 细胞中 GATA4 的高表达,促进了 FTF 和 AFP 的表达增高。在肝癌细胞株中,FTF 和 AFP 的表达也显著高于正常肝细胞,进一步提示 GATA4 位于 FTF 和 AFP 的上游。

蒽环类抗生素是公认的 GATA4 抑制剂,常用作心肌细胞凋亡研究^[9]。在多柔比星抑制肝癌细胞 GATA4 实验中,随着肝癌细胞中 GATA4 的不断被消除,FTF 和 AFP 也呈递减趋势,但稍滞后于 GATA4,提示可能是 GATA4 的减少导致了二者的渐低表达。虽有别于直接的 GATA4 基因转染,但也从反面验证并提示了 GATA4 和 FTF 及 AFP 间的调控关系,能在一定程度上说明问题。由于药物干预可能存在一定的非特异性,尚需 GATA4 RNAi 技术来进一步证明。

综合来讲,GATA 4 基因转染及 GATA 4 抑制药物多柔比星的应用从正反两方面显示 GATA 4 位于 FTF 和 AFP 的上游,提示在肝癌的发生中 GATA 4 可能为比 AFP 更早的事件及肝癌诊断的较敏感指标。

3.3 GATA4 与肿瘤 在成体组织中,GATA 可能在维持细胞的未分化状态中起作用,虽然 GATA4 在肝癌高表达尚未有相关报道,但在其他肿瘤存在明显的扩增或异常。一个可能是 GATA 因子或 GATA 同源体调控通路的丧失会导致上皮细胞去分化并导致肿瘤发生。以前,在肿瘤细胞中检测到 GATA 因子的表达。

研究发现,在原本不表达 GATA 4 的胃、食管、肾上腺器官中,其对应的胃癌、Barrett 食管、食管癌、肾

上腺瘤中常有不同程度的表达,并且上述肿瘤分化程度愈低,GATA 4 表达愈高^[10]。Yun 等^[11]从 11 个人胃癌细胞株中检测 GATA 4 的表达,发现其在分化较低的胃癌细胞中表达较高分化的明显增高,其在食管癌中的表达也存在类似现象。作为蒽环类抗生素多柔比星,具有广谱的抗肿瘤作用,而比较吻合的是这些肿瘤均存在不同程度的 GATA 4 扩增现象,其机制之一是否为抑制 GATA 4 表达尚有待于进一步实验验证。

本实验也从转录因子水平把肝脏的发育和肝癌联系起来,并推测可以作为肝癌恶性程度和预后的早期评价指标之一,体现了发育和肿瘤发生之间在某些方面存在一定的共性。尚有待于从临床肝癌标本、人肝癌细胞株等多方面加以检测和确认。

[参考文献]

- [1] 任传路,刘善荣,杨玲,等.发育相关转录因子 GATA4 在小鼠肝癌细胞中的表达及其意义[J].第二军医大学学报,2005,26:361-365.
- [2] 任传路,王一,刘善荣,等.组织芯片检测肝癌组织中 GATA4 及甲胎蛋白的表达及二者相关性[J].解剖学杂志,2005,28:497-499.
- [3] Suzuki Y J, Evans T. Regulation of cardiac myocyte apoptosis by the GATA-4 transcription factor[J]. Life Sci, 2004, 74: 1829-1838.
- [4] Zhao R, Watt A J, Li J. GATA6 is essential for embryonic development of the liver but dispensable for early heart formation[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25:2622-2631.
- [5] Fair J H, Cairns B A, Lapaglia M. Induction of hepatic differentiation in embryonic stem cells by co-culture with embryonic cardiac mesoderm[J]. Surgery, 2003, 134:189-196.
- [6] Marrero J A, Lok A S. Newer markers for hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2004, 127(Suppl 1):S113-S119.
- [7] Lassus H, Laitinen M P, Anttonen M, et al. Comparison of serous and mucinous ovarian carcinomas: distinct pattern of allelic loss at distal 8p and expression of transcription factor GATA-4[J]. Lab Invest, 2001, 81: 517-526.
- [8] Pare J F, Roy S, Galarneau L. The mouse fetoprotein transcription factor (FTF) gene promoter is regulated by three GATA elements with tandem E box and Nkx motifs, and FTF in turn activates the Hnf3beta, Hnf4alpha, and Hnf1alpha gene promoters[J]. J Biol Chem, 2001, 276:13136-13144.
- [9] Kim Y, Ma A G, Kitta K, et al. Anthracycline-induced suppression of GATA-4 transcription factor: implication in the regulation of cardiac myocyte apoptosis[J]. Mol Pharmacol, 2003, 63:368-377.
- [10] Capo-chichi C D, Roland I H, Vanderveer L, et al. Anomalous expression of epithelial differentiation-determining GATA factors in ovarian tumorigenesis[J]. Cancer Res, 2003, 63: 4967-4977.
- [11] Bai Y, Akiyama Y, Nagasaki H. Distinct expression of CDX2 and GATA 4/5, development-related genes in human gastric cancer cell lines[J]. Mol Carcinog, 2000, 28: 184-188.

[收稿日期] 2007-07-02

[修回日期] 2007-10-18

[本文编辑] 曹静