

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00015

热休克抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞糖皮质激素受体 mRNA 表达及其机制探讨

于 军¹, 沈亚峰¹, 杨勇骥¹, 王学敏^{2*}

1. 第二军医大学基础部数学教研室, 上海 200433

2. 第二军医大学生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的:**探讨热休克时细胞糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)mRNA 减少的机制。**方法:**利用 RT-PCR 半定量的方法研究热休克时人肝癌 SMMC-7721 细胞 GR mRNA 的总体变化。制备 GR 基因跨外显子 3、4、5 的 RNA 探针和 GR 基因内含子 E 的 RNA 探针,对热休克后不同时间的细胞进行原位杂交,激光扫描共聚焦显微镜观察,计算机图像分析系统进行分析,研究 GR mRNA 转录、降解及前体剪接的变化。**结果:**RT-PCR 实验证实,热休克反应时 SMMC-7721 细胞 GR mRNA 含量降低。原位杂交实验证实, SMMC-7721 细胞热休克时,外显子和内含子探针杂交显色所得的积分灰度值(GR mRNA 和 GR mRNA 前体的量)比未热休克处理组低($P < 0.05$);加放线菌素 D 抑制转录后进行热休克反应,内含子探针杂交显色所得的积分灰度值(GR mRNA 前体的量)比单纯加放线菌素 D(未进行热休克组)高,而外显子探针杂交显色所得的积分灰度值(GR mRNA 的量)比单纯加放线菌素 D 组低($P < 0.05$)。**结论:**热休克反应时 GR mRNA 转录过程受抑,GR mRNA 前体剪接过程存在障碍,GR mRNA 降解加快。

[关键词] 糖皮质激素受体;mRNA;热休克反应

[中图分类号] R 33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)01-0015-05

Mechanism for decrease of glucocorticoid receptor mRNA in human hepatic cancer cell line SMMC-7721 during heat shock

YU Jun¹, SHEN Ya-feng¹, YANG Yong-ji¹, WANG Xue-min^{2*}

1. Department of Mathematics and Physics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the mechanism for decrease of glucocorticoid receptor mRNA (GR mRNA) during heat shock response. **Methods:** The changes of GR mRNA level in SMMC-7721 cells were examined by semi-quantitative RT-PCR during heat shock response. We designed 2 RNA fragments paired with GR gene intron E and cross exon 3, 4, and 5, which were used as probes for *in situ* hybridization with the sequences in SMMC-7721 cells at different periods after heat shock. The result was subjected to confocal microscope observation and computer image analysis. The transcription, degradation, and splicing of GR mRNA were investigated. **Results:** RT-PCR showed that the GR mRNA level was decreased during heat shock response. *In situ* hybridization revealed that both GR mRNA and GR pre-mRNA levels were lower in the heat shock group than in the non-heat shock group ($P < 0.05$). GR pre-mRNA level was higher in cells treated with actinomycin D before heat shock than in cells only treated with actinomycin D, while the GR mRNA level was lower in cells treated with actinomycin D before heat shock ($P < 0.05$). **Conclusion:** During heat shock response, GR mRNA transcription is suppressed, the splicing of GR pre-mRNA is suppressed, and GR mRNA degradation is accelerated.

[KEY WORDS] glucocorticoid receptor; mRNA; heat-shock response

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(1):15-19]

[收稿日期] 2007-09-01 **[接受日期]** 2007-11-25

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(39730210). Supported by National Natural Science Foundation of China(39730210).

[作者简介] 于 军, 硕士生. E-mail: jyu03@hotmail.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25070306, E-mail: wang_xuemin@hotmail.com

糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 是调节生长、发育及维持内环境稳定的重要激素,也是临床广泛应用的药物。糖皮质激素要发挥作用,必须首先与靶细胞内特异的糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 结合,使受体由非 DNA 结合形式转化为 DNA 结合形式,激素受体复合物与特异的 DNA 序列即糖皮质激素应答元件 (glucocorticoid response elements, GRES) 结合^[1],调节特异靶基因的表达^[2]。细胞及动物实验均已证实 GC 对 GR 有下调作用^[3]。GR 基因的转录在热休克反应 (heat shock response, HSR) 中减少,导致 GR 的数量减少,后者可导致机体的抗炎能力减弱,成为促进休克、多器官功能衰竭发生的重要因素^[4]。对于应激时 GR 减少的机制,一般归因于应激时 GC 浓度升高对 GR 的负反馈调节。但培养细胞热应激可引起 GR 量的减少和结合活性降低,而这一过程不可能伴有 GC 含量增高。

本实验利用实验室前期建立的热休克细胞模型^[5],初步探讨热休克过程中 GR mRNA 减少的机制,为进一步研究 GR 减少机制及热休克细胞模型提供良好的实验基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及材料 人肝癌 SMMC-7721 细胞、pGEM-4Z 质粒、大肠杆菌 DH5 α 由本校基础部生物化学与分子生物学教研室保存。DNA 抽提试剂盒、RNA 抽提试剂盒、PCR 试剂盒、逆转录酶、限制性内切酶、连接酶、转录酶购自 TaKaRa 公司。异硫氰酸荧光素标记试剂盒、地高辛标记试剂盒购自 Roche 公司。细胞培养基 DMEM、小牛血清购自杭州四季青公司。

1.2 RT-PCR 法观察热休克时 SMMC-7721 细胞 GR mRNA 的变化 将 5 个培养瓶中的人肝癌 SMMC-7721 细胞经 44 $^{\circ}$ C 培养 1 h 作热休克处理^[4],37 $^{\circ}$ C 培养不同时间,分别于 0、1、2、4、6 h 取样,对照组一直在 37 $^{\circ}$ C 培养箱内培养,未作热休克处理。抽提各细胞瓶中总 RNA,琼脂糖甲醛变性凝胶电泳鉴定所提取 RNA 的完整性,测定 D_{260}/D_{280} 比值均大于 1.8 判定无污染。用 AMV 逆转录酶合成 cDNA 第 1 链。设计 GR 基因上游引物:5'-GTA AGC TTC GTA GTC ATG ATC CTC CAA GT-3',下游引物:5'-TCG GAT CCG AAG GAC AGC ACA ATT ACC TAT-3',扩增长度 339 bp,使扩增片段

跨 GR 基因 3、4、5 外显子。选用 18 S rRNA 为内参照,上游引物:5'-GCT TTC TAC CTA CAT GGT TGA TC-3',下游引物:5'-GGC CTC GAA AGA GTC CTG TA-3',扩增长度 559 bp。引物由上海生物工程技术有限公司合成。进行 RT-PCR 半定量实验,PCR 反应在平台期前,处在 PCR 线性扩增范围内。取反应产物进行琼脂糖凝胶电泳,用天能 GIS 凝胶图像分析系统分析结果。所有实验均重复 3 次。

1.3 质粒构建和探针合成 抽提细胞总 RNA,逆转录后 PCR 扩增出 GR 跨 3、4、5 外显子片段。上游引物:5'-GTA AGC TTC GTA GTC ATG ATC CTC CAA GT-3',下游引物:5'-TCG GAT CCG AAG GAC AGC ACA ATT ACC TAT-3',扩增长度 339 bp。抽提 SMMC-7721 细胞总 DNA,PCR 扩增出 GR 内含子 E 片段。上游引物:5'-GTA AGC TTA GTG CCA GCC TCC CAA GT-3',下游引物:5'-TCG GAT CCG TCA ACC ATT CCC GCT TC-3',扩增长度 366 bp。*Hind* III 酶和 *Bam* H I 酶双酶切 PCR 产物后胶回收,与经 *Hind* III 酶和 *Bam* H I 酶双酶切后胶回收的 pGEM-4Z 质粒,用 T4 DNA 连接酶连接,在大肠杆菌中扩增。重组质粒进行酶切鉴定和 PCR 鉴定后,将测序正确的重组质粒酶切线性化,利用质粒上的 SP6 和 T7 启动子,分别体外转录出反义和正义探针,外显子探针转录过程中用异硫氰酸荧光素耦联的 UTP 来标记探针,内含子探针转录过程中由地高辛耦联的 UTP 来标记探针。将所扩增片段的序列,用 BLAST 与人基因组序列进行比对,未发现其他位置序列重合。

1.4 原位杂交法观察外显子和内含子探针杂交信号 将 12 mm \times 12 mm 的盖玻片浸润于 0.05% 多聚赖氨酸中,干燥后放置于 12 孔板细胞培养板中,作为原位杂交用飞片。待细胞生长至飞片 80% 左右时,经过 3 种不同处理:(1)44 $^{\circ}$ C 热休克 1 h 后,37 $^{\circ}$ C 培养不同时间,分别在 0、1、2、4、6 h 取样,对照未经热休克;(2)在热休克之前 30 min 加放线菌素 D (终质量浓度 0.3 μ g/ml) 处理,44 $^{\circ}$ C 热休克 1 h 后,37 $^{\circ}$ C 培养不同时间,分别在 0、1、2、4、6 h 取样;(3)加放线菌素 D (终质量浓度 0.3 μ g/ml) 处理,未经热休克,取样时间点与 (2) 相同。PBS 洗涤飞片,4% 多聚甲醛固定细胞,进行原位杂交,外显子探针杂交用探针上的 FITC 直接显色,PI 染核;内含子探针杂交

用抗地高辛抗体耦联的 RB200 显色, DAPI 染核, 激光扫描共聚焦显微镜观察。利用 Imagetool 软件统计每一飞片上随机选取的 30 个细胞的积分灰度值。实验重复 3 次。

1.5 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有数据均采用 SPSS 11.0 软件进行处理。组间数据比较采用 *t* 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 热休克时 SMMC-7721 细胞 GR mRNA 的变化 总 RNA 经凝胶电泳显示 3 条完整的条带 (28S, 18S, 5S), D_{260}/D_{280} 比值大于 1.8, 说明 RNA 质量符合要求。如图 1 所示条带, 经软件分析后, 未经热休克组 GR mRNA 与 18S rRNA 信号比为 0.910 ± 0.023 , 热休克后 37°C 放置 0、1、2、4、6 h 各组与 18S rRNA 的信号比分别为 0.790 ± 0.016 ($P < 0.01$), 0.799 ± 0.023 ($P < 0.05$), 0.811 ± 0.019 ($P < 0.05$), 0.832 ± 0.006 ($P < 0.05$), 0.858 ± 0.016 ($P < 0.05$)。与未经热休克组相比, 热休克各组均降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。这说明热休克后细胞内 GR mRNA 含量降低。

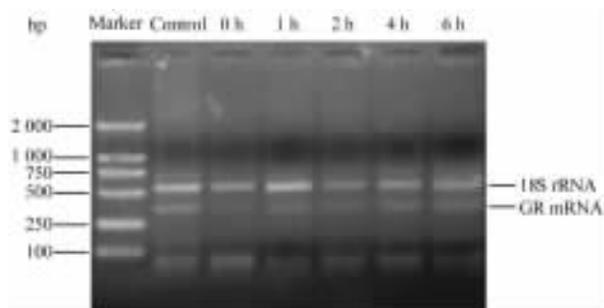


图 1 RT-PCR 检测 GR mRNA 的表达

Fig 1 Analysis of GR mRNA expression by RT-PCR

2.2 质粒构建及探针合成 质粒构建完成后, 对插入跨外显子片段和内含子 E 片段的重组质粒进行 PCR 酶切鉴定 (图 2), 结果与预期一致。重组质粒测序结果与人类基因组序列相一致。

2.3 原位杂交显示外显子杂交信号和探针的荧光值 SMMC-7721 细胞 44°C 热休克 1 h 后, 37°C 培养不同时间, 分别在 0、1、2、4、6 h 取样, 对照未经热休克组的外显子杂交信号 (图 3, 绿色为探针信号, 红色为核复染信号)。探针的荧光值分别为: 对照组 74.20 ± 1.36 ; 0 h 为 27.36 ± 0.25 (与对照组相比

$P < 0.05$); 1 h 为 36.00 ± 1.04 (与对照组相比 $P < 0.05$); 2 h 为 42.32 ± 0.74 (与对照组相比 $P < 0.05$); 4 h 为 53.12 ± 1.25 ; 6 h 为 54.32 ± 1.32 。由于外显子探针只与成熟的 GR mRNA 结合, 杂交信号变化表明, 热休克时 GR mRNA 的总量减少, 随着 37°C 放置时间的延长, 其表达逐渐恢复。

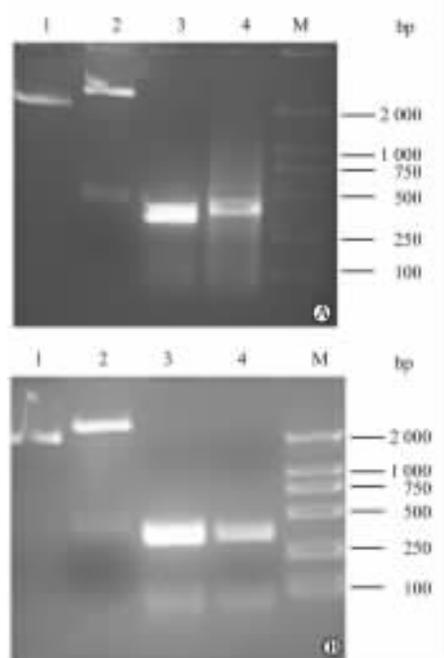


图 2 跨外显子片段 (A) 和内含子片段 (B) 重组质粒 PCR 酶切鉴定结果

Fig 2 Digestion analysis and PCR analysis of exon (A) and intron (B) fragment recombinant plasmid

1: Recombinant plasmid; 2: Digestion of recombinant plasmid; 3: PCR product of recombinant plasmid; 4: PCR product of GR gene fragment; M: Lambda DNA/*Hind*III marker

2.4 原位杂交显示内含子杂交信号和探针的荧光值 SMMC-7721 细胞 44°C 热休克 1 h 后, 37°C 培养不同时间, 分别在 0、1、2、4、6 h 取样, 对照未经热休克组的内含子杂交信号 (图 4, 红色为探针信号, 蓝色为核复染信号)。探针的荧光值分别为: 对照组 80.20 ± 5.63 ; 0 h 为 40.36 ± 5.25 (与对照组相比 $P < 0.05$); 1 h 为 50.24 ± 3.08 (与对照组相比 $P < 0.05$); 2 h 为 60.32 ± 4.12 ; 4 h 为 57.12 ± 3.25 ; 6 h 为 63.45 ± 6.14 。由于内含子探针只与 GR 前体 mRNA 结合, 内含子探针杂交信号变化表明, 热休克时 GR 前体 mRNA 的总量减少, 随着 37°C 放置时间的延长, 其表达逐渐恢复。

2.5 经放线菌素 D 处理的 SMMC-7721 细胞热休克后外显子和内含子探针杂交信号 加入放线菌素 D, 其可以抑制真核细胞 mRNA 的转录, 且热休

克组的外显子探针杂交信号要小于未热休克组(表1),即热休克组 GR mRNA 的量要小于未热休克组,提示热休克反应能加速 GR mRNA 降解。而热休克组的内含子杂交信号大于未热休克组(表

1),即热休克组 GR 前体 mRNA 的量要大于未热休克组,提示热休克反应能阻碍 GR mRNA 的剪接。但随着时间的延长,热休克组和未热休克组的内含子信号强度趋于一致。

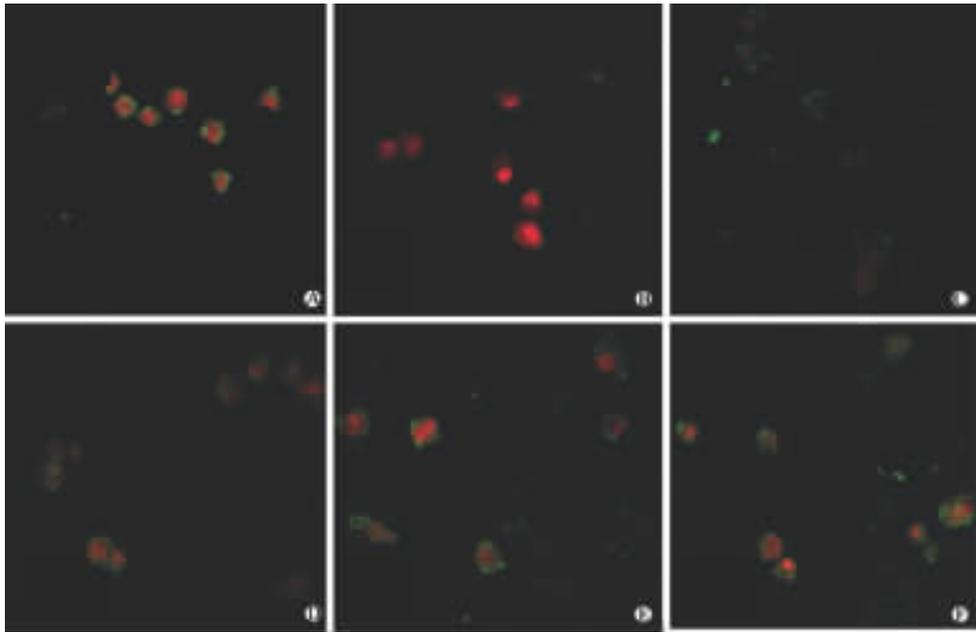


图3 SMMC-7721 细胞热休克后外显子探针杂交信号

Fig 3 Signal of exon RNA probes in heat treated SMMC-7721 cells

A:Control group before treatment; B:0 h after treatment; C:1 h after treatment; D:2 h after treatment; E:4 h after treatment; F:6 h after treatment. Original magnification:×1 000

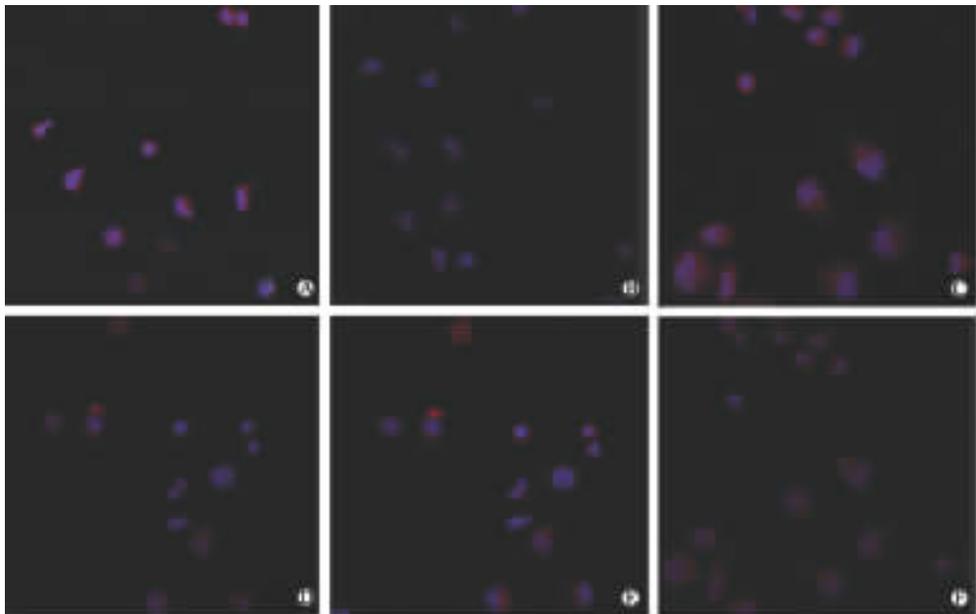


图4 SMMC-7721 细胞热休克后内含子探针杂交信号

Fig 4 Signal of intron RNA probes in heat treated SMMC-7721 cells

A:Control group before treatment; B:0 h after treatment; C: 1 h after treatment; D:2 h after treatment; E:4 h after treatment; F:6 h after treatment. Original magnification:×1 000

表 1 放线菌素 D 处理 SMMC-7721 细胞热休克后外显子和内含子探针荧光值

Tab 1 Optical density of exon and intron RNA probes in heat and actinomycin D treated SMMC-7721 cells

(n=3, $\bar{x} \pm s$)

Probe	Treatment	Time after treatment				
		0 h	1 h	2 h	4 h	6 h
Exon	Actinomycin D	53.26±1.23	48.75±4.68	46.34±0.98	36.68±2.65	30.20±2.31
	Actinomycin D+heat shock	43.12±4.32*	35.45±1.98*	25.36±0.78*	30.36±3.12	12.25±0.39*
Intron	Actinomycin D	40.62±3.26	28.57±1.56	32.58±4.36	26.68±2.34	19.34±2.56
	Actinomycin D+heat shock	60.12±2.32*	40.49±3.96*	25.64±1.78*	30.36±1.12	19.26±1.36

* $P < 0.05$ vs only treated with actinomycin D

3 讨 论

GR 是激素核受体家族中的主要成员之一,也是重要的核转录因子。通常情况下,GR 与热休克蛋白(HSP)70、HSP90 等分子伴侣相结合而处于失活状态^[6]。GC 的作用需要通过 GR,一旦 GC 与 GR 结合,分子伴侣蛋白则会从 GR 上解离出来,GC 和 GR 结合,复合物由胞质进入胞核,从而发挥它的转录调控作用。在热休克过程中,在动物整体及培养的细胞中,GR 的量减少,GR 的结合活性也降低,还发现 GR mRNA 的量也降低。本实验室前期的工作,建立了热休克的细胞模型^[5],发现人肝癌 SMMC-7721 细胞在 44℃ 培养 1 h 后,细胞内 HSP70 表达增加,GR 与 ³H 标记地塞米松的特异性结合量降低,免疫组化证实 GR 含量也降低,37℃ 继续培养 12 h,存活率 >96%,进一步培养细胞可恢复正常生长。

本实验利用细胞热休克模型,44℃ 培养 1 h 作热休克处理,37℃ 培养不同时间(0、1、2、4、6 h),对照组一直保持 37℃ 培养,未作热休克处理。使用 18S rRNA 做内参,半定量 RT-PCR 实验显示,热休克后,细胞内总的 GR mRNA 量比未热休克组少,其中 0、1、2、4 h 有统计学差异($P < 0.05$),提示热休克后 GR 转录水平受到抑制^[7-8],或者降解增加。也有可能存在 mRNA 前体剪接受阻,或者是核输出水平的改变。本实验设计了一组 300 bp 左右的外显子和内含子的单链 RNA 探针,用非放射性的地高辛和荧光素来标记。其杂交稳定性好、信噪比高、长度合适,易于渗透到靶核酸的位置,显色简便。外显子的反义探针与 GR mRNA 结合,显示细胞中 GR mRNA 的量;内含子的反义探针^[9]与 GR mRNA 的前体结合,显示细胞中未剪接 GR mRNA 的量。正义探针用来作对照。原位杂交实验中,SMMC-7721 细胞经热休克后,外显子与内含子探针杂交的积分灰度值均下降,0、1、2 h 时与未热休克组相比有统计学差异($P < 0.05$),说明热休克反应可以引起

GR mRNA 的转录受到抑制,与半定量 RT-PCR 得出的结论一致。加入放线菌素 D 后,其可以抑制真核细胞 mRNA 的转录,热休克组的外显子探针杂交信号要小于未热休克组,即热休克组 GR mRNA 的量要小于未热休克组,提示热休克反应能加速 GR mRNA 的降解。加入放线菌素 D 后,热休克组的内含子杂交信号大于未热休克组,即热休克组的 GR mRNA 前体的量要大于未热休克组,提示热休克反应能阻碍 GR mRNA 的剪接。上述结果表明,SMMC-7721 细胞热休克过程中,GR mRNA 的转录受到抑制,mRNA 前体剪接受到阻碍,降解也加速。

[参 考 文 献]

- [1] De-Bosscher K, Vanden-Berghe W, Haegeman G. Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoid; negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors[J]. *J Neuroimmunol*, 2000, 109:16-22.
- [2] Hayashi R, Wada H, Ito K, Adcock I M. Effects of glucocorticoids on gene transcription[J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 500(1-3):51-62.
- [3] Schaaf M J, Cidlowski J A. Molecular determinants of glucocorticoid receptor mobility in living cells; the importance of ligand affinity[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 3:1922-1934.
- [4] Malago J J, Koninkx J F. The heat shock response and cytoprotection of the intestinal epithelium[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2002, 7:191-199.
- [5] 徐晓辉,王学敏,徐仁宝. 人肝癌 SMMC-7721 细胞热休克反应条件的确立[J]. *第二军医大学学报*, 2002, 23:920-922.
- [6] Brkljacic J, Perisic T, Dundjerski J, Matic G. Interaction of rat renal glucocorticoid receptor with Hsp90 and Hsp70 upon stress provoked by mercury[J]. *J Appl Toxicol*, 2007, 27:43-50.
- [7] Basu N, Kennedy C J, Iwama G K. The effects of stress on association between hsp70 and the glucocorticoid receptor in rainbow trout[J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2003, 134:655-663.
- [8] Wadekar S A, Li D, Periyasamy S, Sanchez E R. Inhibition of heat shock transcription factor by GR[J]. *Molecular Endocrinology*, 2001, 15:1396-1410.
- [9] Cai X M, Lancto C A, Abrahamson M S, Zhu G. Intron-containing transcripts in cryptosporidium parvum cultured *in vitro* [J]. *Microbiology*, 2004, 150:1991-1995.

[本文编辑] 尹 茶, 孙 岩