

人雄激素芳香化酶基因内含子中启动子的研究^{*}

王金发

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要 利用核酸外切酶 III (*ExoIII*) 对人雄激素芳香化酶基因的 2 400 bp 片段的 5' 端进行系列缺失, 并通过转染实验, 分析了 2 400 bp 片段 3' 端区域的功能作用, 在雄激素芳香化酶基因第 2 外显子的下游区检测到 1 个具有启动子作用的功能元件, 通过序列分析, 发现该元件位于雄激素芳香化酶基因的第 2 内含子中. 该启动子同样受到位于雄激素芳香化酶基因第 1 内含子中沉默因子的抑制作用. 该启动子能够启动不同基因的表达, 并且具有较强的启动功能.

关键词 雄激素芳香化酶基因, 内含子, 缺失, 启动子, 沉默因子

分类号 Q 75

雄激素芳香化酶 (aromatase) 催化雄性激素经芳香化生成雌性激素, 是催化雌性激素生物合成的限速酶^[1]. 该酶将 C19 雄激素底物经过 3 次连续的羟基化, 除去 C19 的角甲基, 使类固醇的 A 环发生酚化而生成相应的芳香化 C18 雌激素类固醇^[2].

一些人类常见的癌症, 尤其是子宫癌和乳腺癌的生长是依赖于雌激素的, 对于雄激素芳香化酶的抑制, 将成为对这些癌症治疗的一种可能的方向. 因此, 对雄激素芳香化酶基因表达调控的研究, 对于了解雄激素芳香化酶在不同组织中的作用具有非常重要的意义.

编码雄激素芳香化酶的基因是单拷贝基因, 至少有 7 500 bp^[2,3], 该基因有 10 个外显子和 9 个内含子. 在 10 个外显子中, 有 9 个是固定不变的编码外显子, 而外显子 1 则是可变的非编码的外显子, 这与在不同组织中使用不同启动子有关^[4,5].

曾报道在雄激素芳香化酶基因的第 1 内含子中发现有沉默因子 (silencer) 的存在^[6], 并在第 1 内含子中发现了 2 个启动子^[6,7]. 又在该基因的第 2 内含子中发现了 1 个启动子, 它也同样受到沉默因子的抑制, 本文报道有关结果.

1 实验部分

(1) 质粒 DNA: 载体为 CAT 表达质粒 (Promega 公司). 克隆 5~85 为含有雄激素芳香化酶基因第 1 内含子 3' 末端 2 400 bp DNA 片段的重组质粒, 由 Chen Shiuan 提供.

(2) 细胞株和培养基: MCF-7 来自美国的 ATCC, 是乳腺癌细胞, 可培养在 DMEM 添加适量小牛血清的培养基中.

^{*} 国家自然科学基金 (39370402) 和回国人员基金 (93360) 资助项目

收稿日期: 1997-03-28 王金发, 男, 50 岁, 教授

(3) 主要试剂: 主要限制性内切酶和 DMEM 培养基均购自 BRL 公司; T₄ 激酶、T₄ DNA 连接酶购自宝灵曼公司; [¹⁴C] 氯霉素购自 Amersham 公司。

(4) pCAT 重组质粒的构建: 见文献 [6]. 将获得的克隆分别命名为 pCAT-C 2.4 和 pCAT-E 2.4. 其它类型的重组质粒构建采用类似的方法。

(5) 重组质粒的系列缺失突变: 见文献 [6].

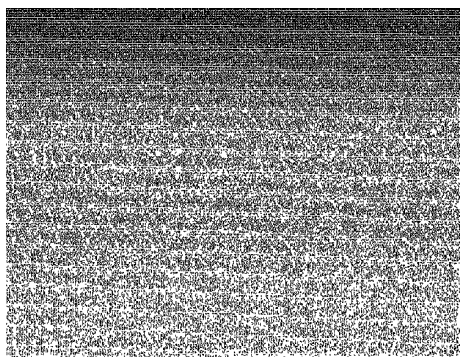
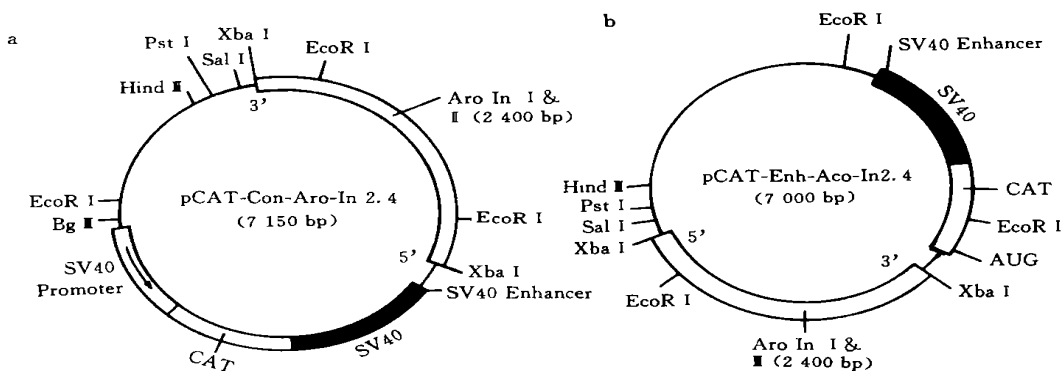
(6) 缺失突变的亚克隆: 经筛选鉴定后, 将部分系列缺失的 DNA 片段分别亚克隆到 pCAT 和 pHGH 质粒载体, 分别进行转染实验, 检测这些片段调节 CAT 或 hGH 基因表达。

(7) 转染实验 CAT 及 hGH 分析: 见文献 [6].

2 结果与讨论

2.1 2 400 bp 片段的功能分析

根据对 2 400 bp 片段 5' 端的部分序列分析的结果, 推测在这一片段中可能含有启动子, 于是将 2 400 bp 片段克隆到 pCAT-E 质粒 DNA 中, 筛选正向插入的重组质粒 pCAT-Enh-Aro-In 2.4 (图 1a). 用这种重组质粒做转染实验, 并以质粒 pCAT-C 和 pCAT-B 作对照. 分析转染细胞中 CAT 基因的表达, 但是没有检测到 CAT 活性, 即启动子没有工作。



a Recombinant pCAT-Con-Aro-In 2.4 DNA;
 b Recombinant pCAT-Enh-Aro-In 2.4 DNA;
 c CAT assays of DNA transfected cell;
 1, 6, 8 为 pCAT-C DNA;
 2 为 pCAT-B DNA; 3 为 pCAT-E DNA;
 4 为 pCAT-P DNA;
 5 为 pCAT-Enh-Aro-In 2.4 DNA;
 7 为 pCAT-Con-Aro-In 2.4 DNA

1 2 3 4 5 6 7 8

图 1 重组体的构建及转染分析

Fig. 1 Construction and CAT assays of recombinant DNA

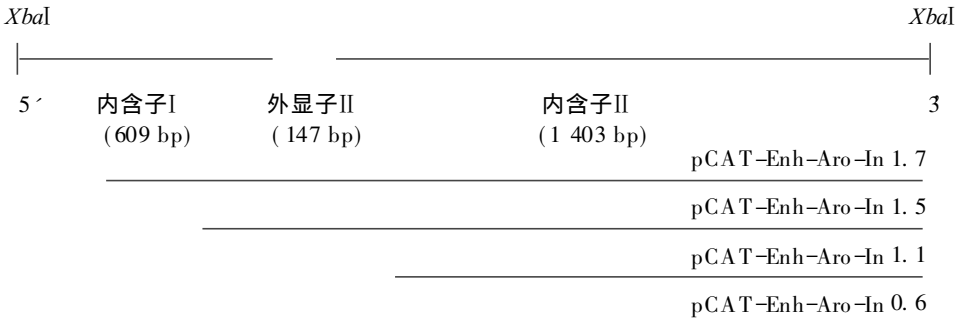
根据有关沉默因子的报道^[8], 推测 2 400 bp 片段中很可能有沉默因子的存在, 从而抑制了启动子的作用. 于是, 将 2 400 bp 片段克隆入 pCAT-C, 筛选到正向插入的克隆

pCAT-Con-Aro-In 2. 4(图 1b). 用这种重组的质粒转染 MCF-7 细胞, 然后分析 CAT 活性. 含 2 400 bp 片段的 DNA 转染后, CAT 的活性有所降低 (图 1c). 即 2 400 bp 片段中存在有负调控元件, 这种负调控元件抑制了 pCAT 载体中 SV40 启动子的作用, 从而抑制了 CAT 基因的表达. 实验结果证实了 2 400 bp 的片段中确有负控元件的存在. 同时也提示, 如果 2 400 bp 片段中有启动子的存在, 是不能起作用的. 因它受到负控元件的抑制作用.

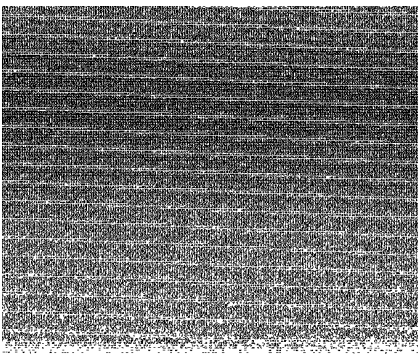
2.2 2 400 bp 片段中调控元件的功能分析

为了鉴定 2 400 bp 片段中的功能元件, 即沉默因子和启动子, 分别对 pCAT-Con-Aro-In 2. 4 和 pCAT-Enh-Aro-In 2. 4 这 2 类重组 DNA 进行了系列缺失, 得到系列缺失突变体, 然后进行转染实验, 分析 2 400 bp 片段中功能元件的作用. 系列缺失结果如图 2 所示. 对重组质粒 DNA pCAT-Con-Aro-In 2. 4 中的 2 400 bp 片段进行 3 端系列缺失, 并通过转染实验, 在 2 400 bp 片段的 5 端发现了 2 个启动子和 1 个沉默因子^[8]. 对重组质粒 pCAT-Enh-Aro-In 2. 4 DNA 中的 2 400 bp 片段进行 5 端系列缺失, 并通过转染实验, 在 2 400 bp 片段的 3 端部分发现有启动子的功能元件存在 (图 2b).

a 2 400 bp 和重组 DNA 图



b 重组 DNA 转染实验



- 1 为 pCAT-C;
- 2 为 pCAT-Con-Aro-In 2. 4
- 3 为 pCAT-E 4 为 pCAT-C;
- 5 为 pCAT-Enh-Aro-In 1. 1;
- 6 为 pCAT-Enh-Aro-In 0. 6;
- 细胞为 MCF-7

1 2 3 4 5 6

图 2 质粒 pCAT-Enh-Aro-In 2. 4 DNA 的 5 端系列缺失突变

Fig. 2 5'-Deletion of pCAT-Enh-Aro-In 2. 4 plasmid DNA

2.3 2 400 bp 片段 3 端序列分析

对 pCAT-Enh-Aro-In 2. 4 的 2. 4 片段 3 端进行了序列分析, 发现至少有 2 处存在类 TATA 盒 (No. 141~ 150, No. 471~ 480). 由于我们在第 1 内含子中已经发现了 2 个启动

子, 故将此启动子暂时命名为启动子 Aro-III。

人雄激素芳香化酶基因外显子II 下游区的部分序列结构为

```

001  CCCCATTTTT  CTCCCAGTGT  CTGGATCCCA  TTCGACCCTT  ATGGAGCCTG
051  GTAGTGGGAG  AAAAATGGGC  AATCCAGTGC  TCTTGGAAACA  TCATACCCCG
101  GGAGAAATCTT  CAACAAGATC  TGTGTTCAA  TCAAAAGCAG  AGAATAATAT
151  AATTATTCAG  ATAATCCCAA  TAGAAAACCC  CACCCTTCCA  CCCTTAAAGC
201  CGCAATGATC  AGATATCAGA  TTAATTCAGA  ATGACTTGAA  ATTTCAGACT
251  GCTTCTTTAG  GTTTCAGTGA  AAATGCTTCA  TTGCAGACAC  ATCTGTTCCC
301  AATTCCATAA  GATATCCAA  GAGACTTTAA  GAGCATAGTT  ACACACTGGT
351  AAGTGTGTGG  GCCTAGTCTC  AGTGGGATCA  GAAGTGGGAG  CATGGGGCTG
401  GCACAAAATG  CTCTGTGTCT  GGATTCTTTT  TAACATTCCA  GATAATTCTT
451  GTCTCTCTGC  CTGATTACAG  CTGATATTTT  GATTACTTTA  ATGCCAGTT
501  TAAAGGAACA  TTTAGTTAAT  TTTGTTCTCT  GCCTGACAG  GGTCAACTCT
    
```

2.4 启动子 Aro-III的功能确证

为了确证启动子 Aro-III的功能, 选用另外 1套筛选启动子的表达载体, pQGH质粒 DNA(图 3). 该质粒含有人的 hGH基因, 其中 pXGH5的 hGH基因在 mMT-1(mouse met-allo-thionein-1) 启动子的控制之下, 而 pTKGH的 hGH基因在 TK (HSV thymidine kinase) 启动子的控制之下. 将启动子 Aro-III克隆到 pQGH的 hGH基因的上游, 然后用携带有不同启动子的 hGH表达质粒转化 MCF-7, 以固相放射免疫分析法测定 hGH的表达量, 结果示于表 1.

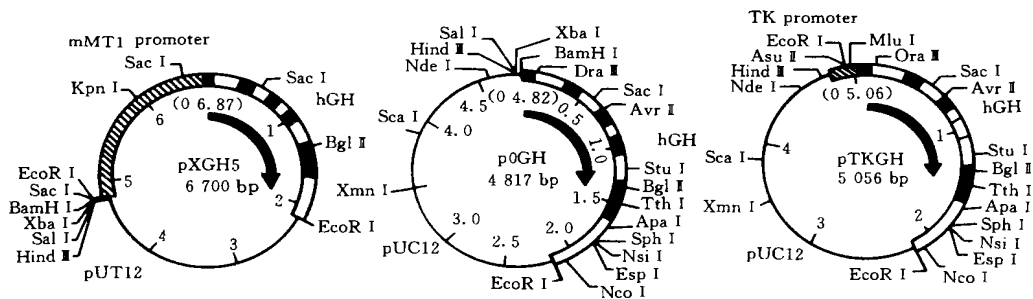


图 3 hGH表达载体

Fig. 3 The hGH expression vectors

表 1 在 Aro-III启动子控制下的 hGH基因的表达检测

Tab. 1 Detection of the hGH gene expression under the promoter Aro-III activation

编号	处理	表达量 ¹⁾ / (c° min ⁻¹)	编号	处理	表达量 / (c° min ⁻¹)
1	pXGH	40 055	2	pTKGH	5 246
3	pQGH	425	4	pQGH-Aro-III	23 215

1) 表达量为 3次实验结果的平均值

这个实验结果进一步确证了 Aro-III的启动子功能, 并且在 MCF-7细胞中启动子 Aro-III比启动子 TK要强, 但比 mMT-1要弱. 另外, 用不同的细胞作为转染受体, 发现启动子 Aro-III具有组织特异性 (结果未示出), 有关研究正在进行中.

参 考 文 献

- 1 Harada N, Yamada K, Saito K, et al. Structural characterization of the human estrogen synthetase (aromatase) gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 166: 365-372
- 2 Toda K, Terashima M, Kawamoto T. Structural and functional characterization of human aromatase P-450 gene. *Eur J Biochem*, 1990, 193: 559-565
- 3 Mahendroo M S, Mendelson C R, Simpson E R. Tissue-specific and hormonally controlled alternative promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human adipose tissue. *J Bio Chem*, 1993, 268: 19463-19470
- 4 Mahendroo M S, Means G D, Mendelson C R, et al. Tissue-specific expression of human P450arom, the promoter responsible for expression in adipose tissue is different from that utilized in placenta. *J Bio Chem*, 1991, 266: 11276-11281
- 5 Means G D, Kigore M W, Mahendroo M S, et al. Tissue-specific promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human ovary and fetal tissues. *Mol Endocrinol*, 1991, 5: 2005-2013
- 6 Wang J, Chen S. Identification of a promoter and a silencer at the 3' end of the first intron of the human aromatase gene. *Molecular Endocrinology*, 1992 (6): 1479-1488
- 7 Zhou D, Clarke P, Wang J, et al. Identification of a promoter that controls aromatase expression in human breast cancer and adipose stromal cells. *J Bio Chem*, 1996, 271: 15194-15202
- 8 Brand A H, Breeden L, Abraham J. Characterization of a "silencer" in yeast: a DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer. *Cell*, 1985, 41: 41-48

The Studies of the Promoter in the Intron II of the Human Aromatase Gene

Wang Jinfa*

Abstract In order to study the possible function of 2 400 bp fragment that contains partial sequence of human aromatase gene, DNA systematic deletion analysis of the fragment was performed, and a putative promoter in the fragment was found. DNA sequence analysis revealed that the promoter was located in the second intron of the aromatase gene. The function of the promoter was suppressed by a negative element, silencer, situated in the first intron. The promoter can promote different gene expression in different vectors, but the degree of the expression is different from TK or mu-MT promoter.

Keywords aromatase gene, intron, deletion, promoter, silencer

* School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275