- 2 邹继军, 董伟, 杨庆凯, 等. 大豆对灰斑病菌7号小种的抗性遗传及抗病基因的 RAPD 标记. 科学通报, 1998, 43(21): 2302~ 2307
- 3 Barret P, Deloume R, Feisset N, et al. Development of a SCAR (sequence characterized amplification region) marker for molecular tagging of the dwarf BREIZH (*Bzh*) gene in *Brassica napus* L. Theor Appl Genet, 1998, 97: 828~ 833
- 4 Dedryver F, Jubier M-F, Thouvenin J, et al. Molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr24* in different wheat cultivars. Genome, 1996, 39: 830~ 835
- 5 Kawchuk L M, Hachey J, Lynch D R. Development of sequence characterized DNA markers linked to a dominant verticillium wilt resistance gene in tomato. Genome, 1998, 41: 91~ 95
- 6 Ohmori T, Murata M, Motoyoshi F. Molecular characteristics of RAPD and SCAR markers linked to the *Tm-1* locus in tomato. Theor Appl Genet, 1996, 82: 151~ 156
- 7 Paran I, Michelmore R W. Development of a sequence characterized amplified region (SCAR) based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. Theor Appl Genet, 1993, 85: 985~ 993
- 8 Patridge N G, Collins N C, Bendahmane A, et al. Development of YLM, a codominant PCR marker closely linked to the *Yd2* gene for resistance to barley yellow dwarf disease. Theor Appl Genet, 1998, 96: 1170~ 1177
- 9 Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 6531~ 6535
- 10 Horvath D P, Dahleen L S, Stebbing J, et al. A co-dominant PCR-based marker for assisted selection of durable stem rust resistance in barley. Crop Sci, 1995, 35: 1445~ 1450
- 11 Miklas P N, Stavely J R, Kelly J D. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. Theor Appl Genet, 1993, 85: 745~ 749

(1999-02-12 收稿, 1999-07-23 收修改稿)

3 种化学诱导物对大鼠 *GST_P* 基因表达的影响及机理

廖名湘 刘东远 左瑾 张红云 方福德

(中国医学科学院 中国协和医科大学基础医学研究所 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)

摘要 大鼠谷胱甘肽 S-转移酶 P(*GST_P*) 基因可被多种化学致癌物诱导表达. 采用基因诱导实验、共转染报告质粒瞬时表达实验、凝胶阻滞实验和分子杂交实验探讨了 3 种化学物诱导 *GST_P* 基因表达的机理. 结果表明, 佛波酯(TPA)、甲基丙烯酸环氧丙酯(GMA)和 H_2O_2 对 *GST_P* 基因表达的影响及其机理不甚相同: TPA 和 GMA 主要通过激活 AP-1 或相应转录因子与 GPE 增强子元件相作用而促进 *GST_P* 表达, H_2O_2 则通过某些未知因子与 GPE 增强子元件相作用.

关键词 谷胱甘肽 S-转移酶 P 化学诱导物 基因表达调控

大鼠谷胱甘肽 S-转移酶 P(Glutathione S-transferase P, *GST_P*) 是化学诱导癌前病变和肝癌的一种可靠的肿瘤标志酶, 因此, *GST_P* 的表达可能与大鼠癌变过程密切相关. 在多步骤致癌过程中, 基因表达形式的改变是非常重要的步骤, 为探讨癌变过程中基因表达方式的改变, 研究癌变过程中涉及 *GST_P* 的特异表达的分子机理是很有必要的. *GST_P* 基因可被多种化学致

癌物诱导表达^[1],理论上,这一诱导过程中,位于该基因上游的增强子与其相应的反式作用因子的相互作用起关键性作用,但其具体机理尚不清楚。*GST_P* 基因上游增强子位于 GPE iv和 GPE ⑤两个小区域中。用计算机检索即可发现, GPE iv增强子具有与 AP_1 家族成员和其他因子结合的类似序列, GPE ⑤增强子则具有与 NF_κB(p65) 结合的类似序列。这些基因转录调控因子是否在不同化学物诱导 *GST_P* 基因表达过程中起作用以及作用的程度,是令人感兴趣的重要问题,成为研究该基因诱导表达机理的一个突破口。本文为此提供了科学论据和解释。

1 材料与方法

() 材料。 CBRH_7919 系用二乙基亚硝胺诱发的大鼠肝癌细胞系,购自中国科学院细胞生物研究所细胞库。 NF_κB(p65) 和 ikB(NF_κB 抑制因子) 表达质粒由伦敦大学生化和分子生物学系 Xia 教授赠送。其余所用质粒、试剂、药品同前^[2]。

() 质粒构建。按我们以前报告的方法^[2,3]从 E_CAT 上切下含有 GPE, GPE iv, GPE ⑤部分的 DNA 片段,连接于 pGL2_Promoter 质粒上游,构建成含有 GPE, GPE iv和 GPE ⑤的荧光素酶报告质粒,分别命名为 pGL2 Luc GPE iv+ ⑤, pGL2 Luc GPE iv和 pGL2 Luc GPE ⑤。

() 质粒 DNA 的制备。按常规的碱裂解法,制备后用 CsCl 超速离心法纯化。

() 化学物诱导 *GST_P* 基因表达实验。采用的化学物为 TPA(佛波酯,为一促癌物)、GMA(甲基丙烯酸环氧丙酯, glycidyl methacrylate, 一种环境诱变剂和细胞转化剂) 和 H₂O₂(一种过氧化物)。实验过程参考 Aoki 及 Sakai 的方法稍加改进^[3]。

() 荧光素酶报告基因真核表达质粒在细胞中的瞬时表达及其酶活性的测定。采用 lipofectamine 法(按说明书)将 pGL2 Luc GPE iv+ ⑤, pGL2 Luc GPE iv和 pGL2 Luc GPE ⑤分别转染 CBRH_7919 细胞,同时共转染 β-半乳糖苷酶表达质粒 pSV_β-gal 作为测定转染效率的内参对照。转染后 33 h 分别用 TPA(125 nmol/L)、GMA(100 nmol/L) 和 H₂O₂(200 μmol/L) 处理 15 h,裂解细胞,测定荧光素酶及 β-半乳糖苷酶活性,并用 β-半乳糖苷酶活性校正荧光素酶活性,得到相对荧光素酶表达活性。每次转染设 3 个平行组。分别将 ikB 表达质粒和 pGL2 Luc GPE ⑤, NF_κB 表达质粒和 pGL2 Luc GPE ⑤共转染 CBRH_7919 细胞, pSV_β-gal 作为内参照质粒。于裂解细胞前 15 h 用 TPA, GMA 和 H₂O₂处理共转染 ikB 和 pGL2 Luc GPE ⑤的细胞,测定其相对荧光素酶活性。同时分别以单独转染 pGL2 Luc GPE ⑤和共转染 ikB 表达质粒和 pGL2 Luc GPE ⑤的 CBRH_7919 细胞作为对照。

() Northern blot 分析。用 GIBCO BRL Trizol 试剂盒提取总 RNA,经含有甲醛的 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后,转移至尼龙膜上,与³²P 标记的大鼠 *GST_P* cDNA 探针进行杂交,用 β-actin cDNA 作为内对照。

2 结果

2.1 TPA, GMA 对 *GST_P* mRNA 表达水平的影响

CBRH_7919 细胞在血清饥饿 24 h 之后,用不同浓度的化学物分别处理 8 h 后作 Northern blot 分析。结果表明,经 TPA 作用后, *GST_P* mRNA 表达量增加,在一定浓度范围内其表达量随 TPA 作用浓度的增加而增加,呈现剂量-效应关系, GMA 也增加了 *GST_P* mRNA 的表达(图 1)。

2.2 转染 GPE iv 和 GPE ⑤的 CBRH_7919 细胞对化学物的反应

由图 2 可见, TPA 和 GMA 使转染 pGL2 Luc GPE iv+ ⑤和 pGL2 Luc GPE iv的 CBRH_7919 细

图1 TPA(a)和GMA(b)对CBRH_7919细胞GST-P mRNA表达的影响

(a) N——未经化学物作用, 1——20 nmol/L TPA, 2——32 nmol/L TPA, 3——80 nmol/L TPA, 4——125 nmol/L TPA, 5——200 nmol/L TPA; (b) N——未经化学物作用, 1——25 nmol/L GMA, 2——50 nmol/L GMA, 3——75 nmol/L GMA, 4——100 nmol/L GMA, 5——125 nmol/L GMA

胞表达的相对荧光素酶活性均高于对应组(未经化学处理的转染细胞), 其升高倍数均分别为3倍左右和1~2倍, 经统计学处理, 这种升高具有显著性差异($P < 0.05$). 而 H_2O_2 对转染上述两种质粒的CBRH_7919细胞的相对荧光素酶活性升高不明显($P > 0.05$). TPA和GMA对转染pGL2 Luc GPEII质粒的CBRH_7919细胞相对荧光素酶活性无明显升高作用($P > 0.05$), 而 H_2O_2 使转染pGL2 Luc GPEI质粒的CBRH_7919细胞相对荧光素酶活性升高1.86倍, 在统计学上有显著性差异($P < 0.05$).

图2 转染3种荧光素酶表达质粒的CBRH7919细胞在不同化学物作用下相对荧光素酶活性

* 为与对照组相比, $P < 0.05$, $n = 3$

2.3 ikB和NF- κ B转录因子与GPEI的关系

图3显示, TPA和GMA对于共转染ikB表达质粒和pGL2 Luc GPEI的CBRH_7919细胞的相对荧光素酶活性无影响($P > 0.05$), 而 H_2O_2 使其相对荧光素酶活性升高1.88倍($P < 0.05$). NF- κ B表达质粒和pGL2 Luc GPEI质粒共转染的CBRH_7919细胞相对荧光素酶活性明显地降低, 具有显著性差异($P < 0.01$). 共转染ikB表达质粒和pGL2 Luc GPEI而未经化学物处理的

CBRH7919 细胞与转染 pGL2 Luc GPE ⑤的 CBRH7919 细胞的相对荧光素酶活性无显著性差异 ($P > 0.05$).

图3 共转染 ikB 和 pGL2 Luc GPE ⑤, NF_kB 和 pGL2 Luc GPE ⑤表达质粒对 CBRH7919 细胞荧光素酶表达活性的影响对照为转染 pGL2 Luc GPE ⑤的 CBRH7919 细胞荧光素酶表达活性. 对照[ikB] 为共转染 ikB 和 pGL2 Luc GPE ⑤的 CBRH7919 细胞荧光素酶表达活性. * 为与共转染 ikB 和 pGL2 Luc GPE ⑤组相比, $P < 0.05$, $n = 3$; * * 与共转染 ikB 和 pGL2 Luc GPE ⑤组相比, $P < 0.01$, $n = 3$

3 讨论

我们以前曾报道^[4], 由我们首先发现的新环境诱变剂和细胞转化剂 GMA 具有促进 *GST_P* 表达的作用. 本文进一步证明 GMA 和 TPA 能够促进带有 GPE iv+ ⑤和 GPE iv增强子的荧光素酶报告基因的表达. 由于 GPE iv的核心序列由两个尾尾相对的 TRE 类似序列组成, 故有理由认为 GMA 和 TPA 可能是通过激活 AP_1 或相应的转录因子与 TRE 样序列相互作用而促进 *GST_P* 表达的. 另外 Xia^[5]等研究表明, 导致细胞前氧化状态的因子如 H₂O₂和紫外线等可以诱导 AP_1 mRNA 的表达, 但抗氧化状态的诱导强度高于前氧化状态. 从这点来看, 不排除 GMA 与 TPA 一样通过氧化还原途径激活 AP_1 进而促进 *GST_P* 转录的可能性.

文献报道^[6], TPA 还可通过作用于 Fos 和 Jun 分子中对氧化还原敏感的半胱氨酸残基, 使其以还原型存在, 从而介导较强的 DNA 结合能力, 促进 *GST_P* 表达, GMA 为环氧化物, 不具有这种作用机理.

有文献报道^[7], H₂O₂能够激活完整细胞中的 NF_kB 因子. 计算机预测显示 GPE ⑤中存在的 ggggagtcc 序列与 NF_kB(p65) 结合的可能性达 98.5%. 本文结果表明: H₂O₂ 对 GPE ⑤增强子有激活作用, 提示 H₂O₂ 产生的过氧化环境能够通过 GPE ⑤对下游的基因表达起增强作用. 综合以上结果, 我们提出这样的问题: H₂O₂ 是否通过激活 NF_kB 与 GPE ⑤相作用的机理而促进基因的表达? 为了澄清这个问题, 我们分别进行了共转染和凝胶阻滞实验, 获得了明确结果: (1) ikB 不能激活 GPE ⑤增强子活性; (2) NF_kB 不能与 GPE ⑤结合(结果未显示); (3) NF_kB 抑制 GPE ⑤增强子活性. 这就清楚地说明, H₂O₂对 GPE ⑤的激活作用不是由 NF_kB 所介

导,而是由其他因子所介导,NF_κB对GPE③活性的抑制作用则可能是通过与GPE③激活因子的结合而实现.

总之,由以上的讨论可知,不同化学物对GST_P基因表达的作用机理是不同的.这为化学致癌机理的多样性、复杂性及其综合治疗和预防提供了理论依据.

致谢 本工作为国家教委博士点基金资助项目.

参 考 文 献

- 1 Sakai M, Muramatsu M, Nishi S, et al. Suppression of Glutathione Transferase P expression by glucocorticoid. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 187: 976~ 983
- 2 刘东远,全 硕,王 娟,等.大鼠谷胱甘肽S_转移酶P1基因顺式调控元件的搜寻. *中国医学科学院学报*, 1998, 20(5): 322~ 325
- 3 Aoki Y, Matsumoto M, Suzuki K T, et al. Expression of Glutathione S_transferase P_form in primary cultured rat liver parenchymal cells by coplanar polychlorinated biphenyl s congeners is suppressed by protein kinase inhibitors and dexamethasone. *FEBS*, 1993, 333: 114~ 118
- 4 杨俊保,谢大英,左 瑾,等.甲基丙烯酸环氧丙酯对金仓鼠胚胎细胞基因表达的影响. *癌变·畸变·突变*, 1994, 6(1): 6~ 10
- 5 Angel P, Karin M. Phorbol ester_inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA_modulated trans_acting factor. *Cell*, 1987, 49: 729~ 739
- 6 Xia C L, Jiangting H U, Brian Ketterer, et al. The organization of the human GST_P1_1 gene promoter and its response to retinoic acid and cellular redox status. *Biochem J*, 1996, 313: 155~ 161
- 7 Meyer M, Schreck R, Baeuerle P A, et al. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF_κB and AP_1 in intact cells: AP_1 as secondary antioxidant_responsive factor. *EMBO J*, 1993, 12(5): 2005~ 2015

(1999-05-20 收稿, 1999-08-02 收修改稿)

青海囊谦盆地新生代火山岩的 K-Ar 年龄

邓万明 孙宏娟 张玉泉^④

(中国科学院地质与地球物理研究所, 北京 100029; ④中国科学院广州地球化学研究所, 广州 510640)

摘要 报道囊谦盆地新生代火山岩9个样品的K-Ar同位素稀释法定年的结果.全岩或单矿物黑云母的表面年龄均在32.04~36.50 Ma的范围之中.放射成因Ar与K构成了相关性良好的一条等时线,表明样品中既无过剩Ar,也没有放射成因Ar的丢失,即上述年龄值为真实的成岩年龄.印度板块与欧亚板块的碰撞发生在45~50 Ma之前.本区火山活动是处在碰撞后构造环境,受岩石圈剧烈增厚和强烈的陆内剪切-走滑断裂带的控制,有证据表明,高原东、西、北部岩浆活动的时代存在着差异.脉动式的岩浆侵入和喷发是高原阶段性隆升的示踪剂.

关键词 囊谦盆地 火山岩 K-Ar年龄 青藏高原 高原隆升

在青藏高原东南部的横断山北段有一系列的第三纪走滑拉分盆地^[1],囊谦盆地是其中最典型者.该区在中-晚第三纪发育了一套基性至中酸性和偏碱性的火山岩或次火山岩.研究

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-23-2550-x>