

转录因子 OCT-4 对靶基因 AP-2 γ 表达调控的研究 *

赵晓蒙 ** 王 成 ** 李晓峰 张晓婷 刘喜枝 周 畅 ***

(湖南师范大学生命科学学院, 蛋白质化学与发育生物学教育部重点实验室, 长沙 410081)

摘要 OCT-4 和 AP-2 γ 是近年来睾丸生殖细胞瘤诊断过程中研究的热点基因. 作为一个在胚胎发育中起着重要作用的转录因子, OCT-4 基因在发育的不同时期、不同分化过程中发挥着多种生物学功能, 其作用是通过对靶基因的调控来实现的. 本研究运用多种软件分析, 发现 AP-2 γ 启动子区域的序列部分有 OCT-4 的结合位点. 利用 CHIP-PCR 方法鉴定 AP-2 γ 是 OCT-4 调控的靶基因. 应用 Luciferase assay、免疫荧光实验、小鼠隐睾模型等实验进行验证, OCT-4 基因抑制 AP-2 γ 转录活性和影响其蛋白质水平的表达. 这一新发现, 有利于从分子水平上研究睾丸生殖细胞瘤的发生机制.

关键词 睾丸生殖细胞肿瘤, OCT-4, 靶基因, AP-2 γ

学科分类号 Q789

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00203

睾丸生殖细胞肿瘤(testicular germ cell tumors, TGCT)是一组由不同发病机制、不同病理组织和临床表现构成的多样性肿瘤^[1], 占睾丸癌 90%以上, 好发于 20~40 岁的青年男性^[2]. 欧美过去 50 年内睾丸生殖细胞肿瘤的发病率已经达到 11/10⁵. 在我国虽然不是最常见的泌尿生殖系统肿瘤, 但目前发病率呈上升趋势, 其发病原因尚未完全知晓^[3].

最近临床病理标本的观察结果发现, M2A、PLAP、CD117、OCT-4 和 AP-2 γ 是非常敏感和特异的标志物, 对生殖细胞肿瘤的鉴别诊断具有重要意义. 其中 OCT-4 和 AP-2 γ 是重要的转录因子, 有着重要的生理功能. OCT-4 基因也被称为 OCT-3、POU5F1, 定位于染色体 6p21.3, 其编码的蛋白质是一种 POU 转录因子^[4]. Rajpert 等^[5]通过研究 OCT-4 在 58 例正常儿童不同年龄段的表达情况, 发现在正常睾丸发育过程中, 孕期 20 周前, OCT-4 的表达呈递减趋势, 此期以后快速下调, 但仍有少许存在, 直到出生后 3~4 个月时, 也就是生殖母细胞完成迁移转化后, OCT-4 表达完全消失. 研究表明, OCT-4 主要表达于胚胎和生殖细胞肿瘤中, 如睾丸生殖细胞瘤、精原细胞瘤、胚胎性癌和胚胎癌细胞系中. 近年来, 关于 OCT-4

蛋白作为转录因子, 调控下游基因表达的分子机制研究受到人们的广泛关注并取得了很大进展.

OCT-4 基因含有一个保守的 DNA 结合结构域——POU 结合域, 通过结合含 ATGCAAAT 的八聚体结构域而活化下游靶基因的启动子或增强子, 从而调控下游靶基因的转录. 2005 年, Boyer 等^[6]利用位置分析法在基因水平上确定出人类胚胎干细胞中有 623 个(3%)蛋白质编码基因的启动子与 OCT-4 直接关联. 对一些 OCT-4 下游靶基因的研究表明, OCT-4 可能正调控维持细胞全能或多能性状态所需基因的转录, 或者可能负调控与体细胞分化有关基因的转录. 然而这些对于 OCT-4 靶基因的研究仍然是远远不够的.

Victor 等运用 ChIP-on-ChIP 芯片实验鉴定睾丸来源的恶性生殖细胞瘤 NTera-2 细胞株中 SRY 基因和 OCT-4 基因调控的下游基因调控网络, 芯片

* 国家自然科学基金(81071696, 81071656), 湖南省研究生创新基金(CX2011B214)和长沙市科技计划(K1109006-31)资助项目.

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 0731-88872916, E-mail: zhouchang1972@126.com

收稿日期: 2012-04-25, 接受日期: 2012-08-20

结果显示靶基因中包括 AP-2 γ 基因, 但目前未见实验验证的报道. 本实验运用 CHIP-PCR 方法, 检测到 NTera-2 细胞中 OCT-4 蛋白可以结合到 AP-2 γ 基因的启动子上, 证明 AP-2 γ 是 OCT-4 的靶基因. 荧光素酶试验、突变分析、蛋白质免疫印迹和动物模型实验结果都表明 OCT-4 基因负调控 AP-2 γ 的转录活性并下调 AP-2 γ 蛋白的表达水平. 免疫荧光实验表明 OCT-4 和 AP-2 γ 基因有很好的共定位. 本研究初步探讨 OCT-4 对 AP-2 γ 的作用机制, 对进一步研究睾丸生殖细胞肿瘤的病理机制有重要意义.

1 材料和方法

1.1 材料

恶性生殖细胞瘤 NTera-2 细胞株为本实验室保存; C57 小鼠为研究室饲养; 真核表达载体 pCMV-Myc 为 Clontech 公司产品; 荧光素酶报告系统载体、RNA 反转录试剂盒为 Promega 公司产品; 限制性内切酶购自 New England Biolabs 公司; Taq DNA 聚合酶购自 Qiagen 公司; 染色体免疫共沉淀试剂盒 The EZ-ChIPTM Kit 购自 Upstate 公司; 抗 AP-2 γ 、抗 OCT-3/4 单克隆抗体和多克隆抗体为 Santa Cruz 产品; 抗 Myc 的单克隆抗体为 Clontech 公司产品; 二抗辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 购于 Jackson Immuno Research 公司; 荧光二抗购自 Molecular Probes 公司; 其他常规试剂均购自上海生工生物工程有限公司.

1.2 方法

1.2.1 人 AP-2 γ 基因序列的生物信息学分析. 用 BLAST 和 Map Viewer 来确定 AP-2 γ 基因在全基因组中的具体位置, 用 JASPAR 软件和 MatInspector program 分析 AP-2 γ 转录起始位点上游 2 000 bp 区域 OCT-4 的结合位点, 选出打分比较高的结合位点.

1.2.2 载体构建和寡核苷酸合成. OCT-4 的编码框序列由 OCT-4(F): CGGAATTCGATGGCGGG-ACACCTGGCT 和 OCT-4 (R): GAAGATCTTCAG-GGCAGGCACCTCAGTTT 引物经 PCR 扩增得到, EcoR I /Bgl II 酶切连入 pCMV-Myc 真核表达载体, 构建成 pCMV-Myc-OCT-4 重组质粒. PCR 扩增人 AP-2 γ 基因 5' UTR(-1 342~-808)区域总长度为 534 bp 的片段, 引物序列分别为 pGL3-AP-2 γ (F): GGGGTACCAACGAACCCGAGAAGGAACA 和

pGL3-AP-2 γ (R): GAAGATCTTCTACTCGCCCTGGGAAAGA, 片段经 Kpn I /Bgl II 酶切后插入 pGL3-Luc 质粒, 获得 pGL3-Luc-AP-2 γ 质粒, 用于荧光素酶分析实验. 采用重叠延伸 PCR 的方法, 分别对人 AP-2 γ 基因启动子上的 3 个潜在的 OCT4 结合位点进行定点突变, 分别由 GAGAATTA 突变为 GAGCTTTA, CATAATAA 突变为 CATGCTAA, 由 TTAAATTTT 突变为 TTAGCTTTT. PCR 产物分别经 Kpn I 和 Bgl II 双酶切后插入到 pGL3-Luc 质粒, 分别构建成 pGL3-Luc-AP-2 γ -OM1、pGL3-Luc-AP-2 γ -OM2 和 pGL3-Luc-AP-2 γ -OM3 这 3 个含突变结合位点的质粒.

1.2.3 染色质免疫共沉淀. 用 EZ-ChIPTM 试剂盒来做染色质免疫沉淀反应(ChIP)实验, 步骤按照试剂盒提供的方法进行, 简述如下: 取一皿 NTera-2 细胞加入 37% 甲醛进行蛋白质与 DNA 之间的交联, 甘氨酸终止交联后进行染色质的超声破碎, 使打断后的混合片段集中在 200~1 000 bp; DNA-蛋白质的混合物用 OCT-4 抗体进行免疫沉淀反应, 经过清洗、洗脱、逆交联, 最后得到纯化的 ChIP-DNA 片段. 根据芯片提示的结合部位, 包含 OCT-4 结合位点的 AP-2 γ 基因的启动子上游区域, 设计的 CHIP-PCR 引物分别是 CHIP-F: GGGG-TACCAACGAACCCGAGAAGGAACA, CHIP-R: GAAGATCTTCTACTCGCCCTGGGAAAGA.

1.2.4 细胞培养及 DNA 转染. 在 37℃, 5% CO₂ 和 90% 相对湿度的细胞培养箱中用 MEM α 完全培养液(含 10% Gibco 胎牛血清、青霉素和链霉素各 1 ml 至终浓度为 100 U/ml)和 DMEM 完全培养液(10% 新生牛血清和终浓度为 100 U/ml 青霉素和链霉素)分别培养 NTera-2 细胞和 HEK293 细胞. 当细胞密度达到 90% 时, 用脂质体 Lipofectamine 2000 转染试剂进行 DNA 瞬时转染.

1.2.5 荧光素酶实验. NTera-2 细胞在 12 孔板中生长至 85% 时, 将质粒 DNA 用脂质体 Lipofectamine 2000 转染细胞. 转染 24 h 后, 每孔加入 100 μ l 的 1 $\times$ 裂解缓冲液, -80℃ 和 37℃ 反复冻融 3 次, 使细胞充分裂解. 将细胞从孔板中洗脱下来移至 1.5 ml 离心管, 4℃ 12 000 g 离心 10 min, 将上清移至新的离心管中. 取细胞裂解液 20 μ l 加入到 180 μ l ONPG 缓冲液中, 37℃ 温育 30 min. 当溶液颜色变成淡黄色时, 用 100 μ l 1 mol/L 碳酸钠终止反应, 紫外分光光度计测 A₄₂₀ 值. 根据 A₄₂₀ 值定量确定细胞裂解液的浓度. 每管样品加入

20 μ l 荧光分析物, Luminometer(Turner Designs)在火焰荧光光度计下测量荧光强度.

1.2.6 Western blot 实验. 将 pCMV-Myc-AP-2 γ 、pCMV-Myc-OCT-4 和反义寡核苷酸 OCT-4 siRNA 转染至 HEK293 细胞, 同时 NTera-2 细胞也转入 siRNA-OCT-4(AAGGAUGUGGUCCGAGUGUGG), 24 h 后收集细胞并加入真核细胞裂解液 RIPA (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.2, 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 10 g/L 脱氧胆酸钠, 1 g/L SDS) 含蛋白酶抑制剂 Cocktail, 提取细胞总蛋白. 加入 SDS 上样缓冲液, 105 $^{\circ}$ C 金属浴变性 5 min, 将蛋白质作 10% SDS-PAGE, 转移至 PVDF 膜. 以 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 兔抗 OCT-4 多克隆抗体为一抗, 稀释为 1:500; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 为二抗, 稀释为 1:1 000, 化学发光法显影.

1.2.7 细胞免疫荧光. NTera-2 细胞接种于加有玻片的 12 孔板中, 培养 24 h 后弃去培养液, 常规方法处理. NTera-2 细胞中加入 AP-2 γ 单克隆抗体和 OCT-4 多克隆抗体, 稀释度为 1:500, 二抗分别采用 Alexa 594 红色荧光标记的羊抗鼠 IgG 和 Alexa 488 绿色荧光标记的羊抗兔 IgG, 稀释度为 1:1 000. 加入荧光标记二抗的同时也加入 Hoechst 33258 至终浓度 0.5 g/L. 荧光显微镜下观察结果.

1.2.8 小鼠隐睾模型的建立及 HE 染色. 取 6~8 周实验小鼠 20 只, 用 2% 戊巴比妥钠对小鼠进行麻醉, 常规消毒阴囊, 小心剪开小鼠腹腔, 将其睾丸挤入到腹腔内, 在阴囊根部行连续性缝合. 培养小鼠 120 天后将小鼠脱颈处死, 将其睾丸组织取出, 进行称重比对和 RNA 提取. 取对照睾丸和隐睾分别用 4% 多聚甲醛固定, 按常规方法进行石蜡包埋, 切 4 μ m 厚的切片进行分析. 组织切片进行 HE 染色, 镜检.

2 结果与分析

2.1 AP-2 γ 基因启动子区域的生物信息学分析

我们利用 JASPAR 软件和 MatInspector program 软件对转录因子 AP-2 γ 基因近端启动子区域进行了生物信息学分析, 结果表明, 在 AP-2 γ 基因转录起始位点上游有 3 个 OCT-4 的潜在结合位点: GAGAATTA(-1 133~-1 126), 命名为 O1; CATAATAA(-1 091~-1 084), 命名为 O2; 以及 TTAAATTTT(-1 060~-1 052), 命名为 O3.

2.2 OCT-4 能够结合到 AP-2 γ 基因启动子的上游区域

睾丸生殖细胞肿瘤根据肿瘤的组织来源可分为以下几类: 畸胎瘤、卵黄囊瘤、恶性胚胎瘤、绒毛膜癌、胚组织瘤和性腺母细胞瘤等^[7]. 本实验室研究男性生殖肿瘤常用的细胞系为 NTera-2 细胞株. Western blotting 结果显示: 在 NTera-2 细胞中 AP-2 γ 和 OCT-4 均表达, 但在对照组 HEK293 细胞中无表达(图 1a). 于是选用 NTera-2 细胞系进行 ChIP 实验. 通过 ChIP-PCR 实验, 研究内源性的 OCT-4 蛋白能否与 AP-2 γ 基因的启动子区域结合. 按染色体免疫共沉淀试剂盒 The EZ-ChIPTM Kit 的方法, 用 OCT-4 多克隆抗体来免疫沉淀与 OCT-4 相互作用的 DNA 片段, 然后在人 AP-2 γ 基因启动子区域设计出跨 3 个 OCT-4 结合位点的 PCR 引物, 以免疫沉淀下来的 DNA 片段为模板进行 PCR, 最后进行琼脂糖凝胶电泳以判断 OCT-4 是否在体内结合 AP-2 γ 基因启动子部位. 电泳结果显示(图 1b): OCT-4 多抗(实验组)能清晰地检测到 PCR 产物条带, 正常鼠 IgG (阴性对照组) 未检测到 PCR 产物, 这说明在体内 OCT-4 能够与 AP-2 γ 基因的启动子上游区域结合.

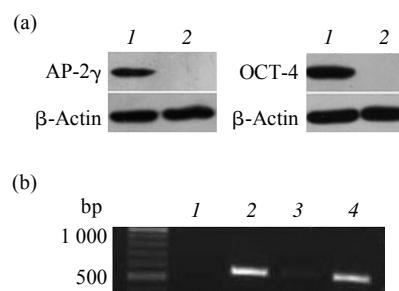
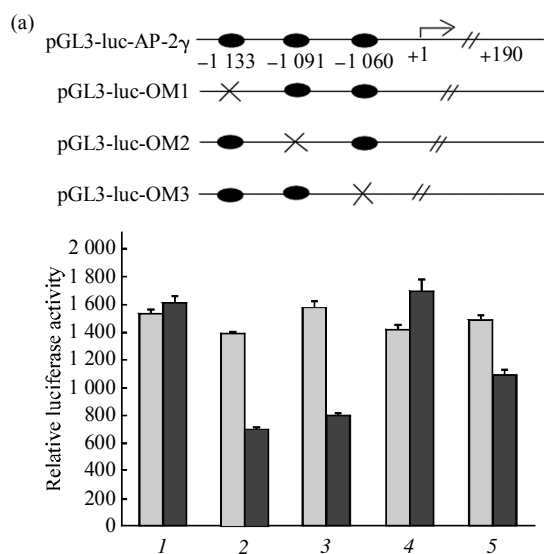


Fig. 1 OCT-4 could bind to the upstream region of AP-2 γ gene promoter

(a) The total proteins from NTera-2 and HEK293 cells were separated on 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred onto PVDF membrane. Endogenous AP-2 γ and OCT-4 proteins were determined by Western blotting with mouse monoclonal anti-AP-2 γ antibody and rabbit polyclonal anti-OCT-4 antibody in NTera-2 and HEK293 cells. The blot membranes were rehybridised with anti- β -actin antibody as loading control. 1: NTera-2; 2: HEK293. (b) ChIP assay carried out in NTera-2 cells. Rabbit anti-OCT-4 polyclonal antibody and normal mouse IgG were used to immunoprecipitate the DNA fragments which interacted with the OCT-4 proteins. The ChIP-PCR primers were designed in the promoter region of AP-2 γ , then the PCR assay executed. There are no bands in control and IgG groups, but the distinct bands in Input and anti-OCT-4 groups. 1: No template; 2: Input; 3: IgG; 4: Anti-OCT-4.

2.3 OCT-4 抑制 AP-2 γ 转录活性

软件预测 AP-2 γ 基因的启动子上游区域含有 3 个潜在的 OCT-4 结合位点, 构建了分别对应于结合位点 O1、O2 和 O3 的定点突变载体 pGL3-luc-OM1、pGL3-luc-OM2 和 pGL3-luc-OM3, 荧光素酶实验结果显示(图 2a): O2 这个位点突变后 AP-2 γ 的转录活性明显下调, 这一结果揭示了



OCT-4 主要通过 O2 这个结合位点与 AP-2 γ 基因的启动子结合并下调 AP-2 γ 的表达. 在 HEK293 细胞中共转染 pCMV-Myc、pCMV-Myc-OCT-4、pGL3-luc-AP-2 γ 质粒和 OCT-4 的 siRNA 干扰序列及其对照, 转染后继续培养 24 h, 荧光素酶实验分析结果得出 OCT-4 对 AP-2 γ 具有下调作用, 干扰 OCT-4 表达后 AP-2 γ 的转录活性明显上升(图 2b).

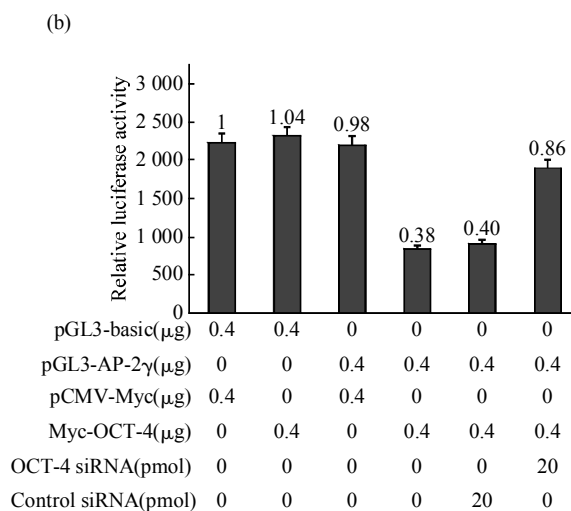


Fig. 2 OCT-4 inhibit the transcriptive activity of AP-2 γ

(a) Three mutational plasmids (pGL3-luc-OM1, pGL3-luc-OM2 and pGL3-luc-OM3) obtained by Overlap Extension PCR were used to explore the importance between the expression of AP-2 γ and the binding sites of OCT-4 in AP-2 γ gene. Luciferase assay have shown that when the second binding site O2 was mutated, the degradation of relative luciferase activity was inhibited. So the binding site O2 was necessary for the combination of OCT-4 protein with AP-2 γ gene, then downregulated the expression of AP-2 γ . 1: pGL3-basic; 2: pGL3-AP-2 γ ; 3: pGL3-OM1; 4: pGL3-OM2; 5: pGL3-OM3. □: PCMV-Myc; ■: Myc-OCT-4. (b) HEK293 cells were transfected with pCMV-Myc, pCMV-Myc-OCT-4, pGL3-luc-AP-2 γ fusion protein expressing plamids and OCT-4 siRNA. The luciferase assay carried out after the additional incubation of 24h and revealed that OCT-4 could downregulated the transcriptive activity of AP-2 γ . When OCT-4 was silenced, the transcriptive activity of AP-2 γ upregulated.

2.4 OCT-4 下调 AP-2 γ 蛋白水平的表达

为进一步研究 OCT-4 对 AP-2 γ 蛋白水平表达的影响, 我们分别在 HEK293 和 NTera-2 细胞中对 OCT-4 进行了外源蛋白过表达水平和本底的蛋白质水平以及对应的干扰实验后, 用 Western blot 方法检测蛋白质的表达情况. 结果显示: 当加入 OCT-4 siRNA 后, 无论是外源过表达蛋白质水平还是本底蛋白质水平的 OCT-4 表达明显下降. OCT-4 被干扰之后, AP-2 γ 的蛋白质表达水平都明显升高(图 3), 与预想结果一致.

2.5 AP-2 γ 和 OCT-4 在细胞株 NTera-2 中的共定位

在 NTera-2 细胞中检测内源的 AP-2 γ 蛋白和 OCT4 蛋白的共定位. 如图 4 所示, NTera-2 细胞中内源的 AP-2 γ 蛋白和 OCT4 蛋白都定位在细胞核中. 信号叠加, 发现在核内二者有很好的共定位.

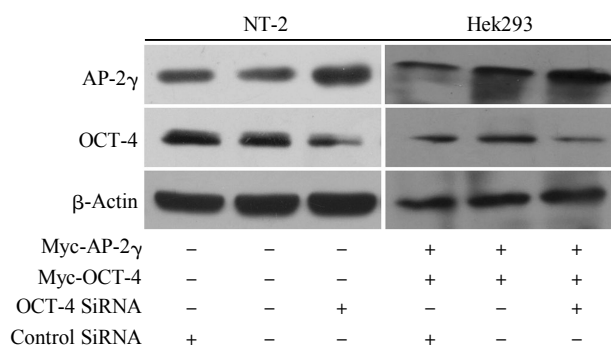


Fig. 3 The influence of OCT-4 involved in the expression of AP-2 γ

Exogenous AP-2 γ protein and OCT-4 protein were obtained by the cotransfection of pCMV-Myc-AP-2 γ , pCMV-OCT-4 and OCT-4 siRNA into HEK293 cells. The endogenous AP-2 γ protein and OCT-4 protein in NTera-2 cells were detected by mouse anti-AP-2 γ monoclonal antibody and rabbit anti-OCT-4 polyclonal antibody. When silenced OCT-4 by siRNA, the expression of AP-2 γ was up-regulated.

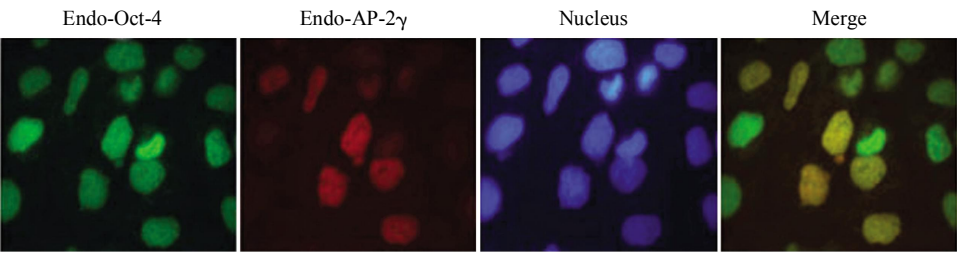


Fig. 4 The co-localization of AP-2 γ and OCT-4 (100 $\times$)
Co-localization of endogenous AP-2 γ protein and OCT-4 protein in Ntera-2 cells. The murines anti-AP-2 γ monoclonal antibody and Texas Red-conjugated anti-mouse IgG (red) were used to detect AP-2 γ , whereas rabbit anti-OCT-4 polyclonal antibody and FITC-conjugated anti-rabbit IgG (green) were used to detect OCT-4. Nuclei were stained by Hoechst 33258 (blue). Yellow in merged image represents colocalisation of AP-2 γ and OCT-4.

2.6 利用小鼠隐睾模型研究 OCT-4 和 AP-2 γ 的表达关系

许多研究表明隐睾是睾丸癌发生的重要诱因, 研究小鼠隐睾模型中 OCT-4 与 AP-2 γ 的表达情况非常有意义. 将隐睾术后 120 天的小鼠睾丸组织取出, 然后进行称重比对、RNA 提取、组织切片和 HE 染色实验. 称重比对结果显示(图 5a), 小鼠隐

睾(cryptorchid)组与正常对照组(normal)相比, 隐睾小鼠的睾丸明显小于正常睾丸, 重量只有正常的 1/3 左右; HE 染色分析发现, 正常小鼠(normal)的曲细精管正常, 而隐睾小鼠(cryptorchid)睾丸的曲细精管变小, 各级精母细胞减少(图 5b), 这些证明小鼠隐睾模型构建成功. 将小鼠隐睾和正常睾丸组织抽提 RNA, 反转录得到 cDNA. RT-PCR 结果发

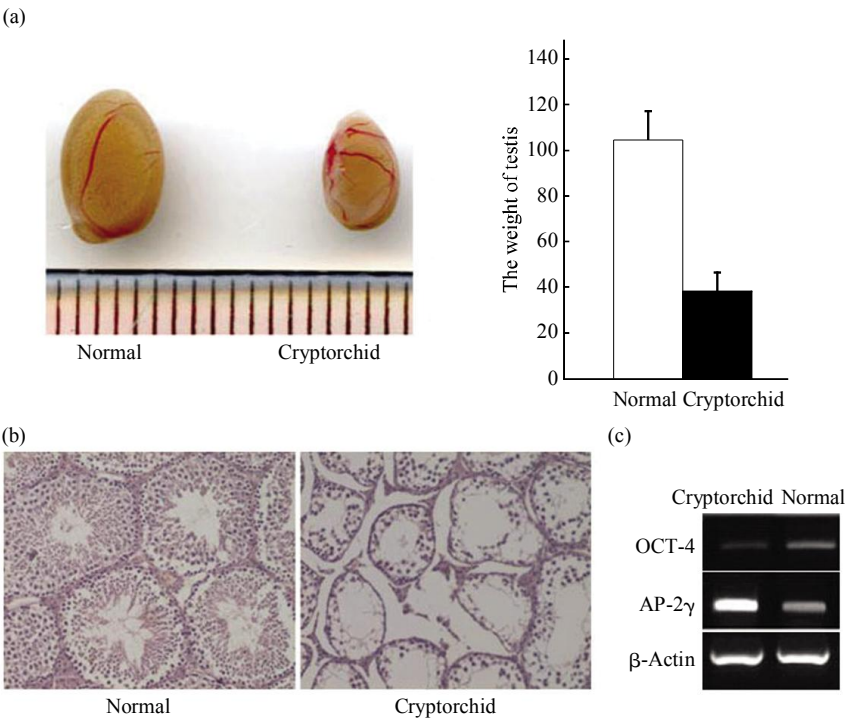


Fig. 5 The foundation of mouse cryptorchidism model and OCT-4 affected the expression of AP-2 γ at mRNA levels
(a) The comparison of testicular size and weight between normal mouse and cryptorchid mouse. The testes of cryptorchid mouse were significantly less than normal mouse. (b) HE staining of the testicular tissue slices of normal mouse and cryptorchid mouse. The seminiferous tubes in the testicular tissue of normal mouse were regular and elastic, while the seminiferous tubules of the cryptorchid mouse formed large voids and obvious fibrosis. (c) The testicular tissue RNA of normal mouse and cryptorchid mouse was respectively extracted. RT-PCR assay had shown that normal mouse have a high expression of OCT-4 and a low expression of AP-2 γ , while low expression of OCT-4 and high expression of AP-2 γ in cryptorchid mouse.

现, 正常小鼠睾丸组织中 OCT-4 高表达, AP-2 γ 低表达, 而在隐睾小鼠睾丸组织中 OCT-4 表达下降, 而 AP-2 γ 表达升高明显(图 5c). 小鼠隐睾模型实验结果表明, OCT-4 负调控 AP-2 γ mRNA 水平表达.

3 讨 论

男性生殖健康领域起步较晚, 但目前已成为一个研究热点领域. 睾丸生殖细胞瘤发生的分子机制取得一些进展^[8-9]. 睾丸生殖细胞肿瘤包括精原细胞瘤、畸胎瘤、胚胎癌、绒毛膜上皮癌等. TGCT 起源于原位癌细胞(*carcinoma in situ*, CIS), 也就是转化的原始生殖细胞(*primordial germ cell*, PGC)^[10-11], 其发病原因还不为人们所知晓. 寻找 TGCT 的易感基因常常由于难以找到足够的家系和人内在的遗传异质性而变得十分困难. 分子遗传学的近期研究对 TGCT 的发生原因提出了一些论证, 主要包括:

- 通过连锁分析和组织学分析取得一些进展. 比如, 连锁分析发现在 25% 的 TGCT 患者 Xq27 处有一睾丸生殖细胞瘤易感基因, 命名为 TGCT1.
- 最特征性的染色体异常是 80% 以上的 TGCT 基因组中出现 i12p, 这提示 i12p 存在 TGCT 的易感基因, 但由于 i12p 跨度太大, 包含基因太多, 迄今在 i12p 还未发现易感基因. 所以早期诊断、早期治疗对提高睾丸生殖细胞肿瘤患者的生存率极为重要. 最近 10 年, 对精原细胞瘤诊断的标记物研究是一个热点. 包括 PLAP、CD117、OCT-4、AP-2 γ 、M2A 在内的一批诊断的标记物被发现^[12]. 从诊断标记物入手, 研究它们之间的调控关系, 对弄清睾丸生殖细胞肿瘤的病理机制有着重要的意义.

染色质免疫共沉淀技术(ChIP)可以通过选择合适的抗体, 特异性地富集目的蛋白及与之结合的基因组 DNA 序列, 反映体内基因表达调控的真实情况. 我们通过 ChIP-PCR 方法证明 OCT-4 能在体内与 AP-2 γ 基因转录起始位点上游结合. AP-2 γ 是转录因子激活蛋白 -2 (AP-2) 基因家族中非常重要的成员, 在胚胎滋养层和生殖细胞的生长和分化过程中发挥重要作用^[13-15]. AP-2 γ 参与生殖细胞发育调控主要体现在: 与生殖细胞自我更新、生殖细胞维持未分化有关, 尤其在睾丸特异干细胞和未成熟生殖细胞中发挥作用. 最近有研究表明, 蛋白 AP-2 γ 在睾丸生殖细胞肿瘤中表达, 使之成为睾丸生殖细胞肿瘤的一个标记蛋白^[16]. 男性胚胎发育早

期(胎儿 22 周以前)睾丸组织中有 AP-2 γ 蛋白的表达, 22 周以后睾丸组织中 AP-2 γ 蛋白表达量逐步下降. 正常睾丸发育过程中 AP-2 γ 先于 OCT-4 表达关闭. 出生后包括成年期的正常男性睾丸组织中检测不到 AP-2 γ 蛋白表达, 不过睾丸生殖细胞肿瘤的异常癌变组织中 AP-2 γ 蛋白表达量很高, 这说明 AP-2 γ 在这样的从良性到恶性的转变过程中起着重要的作用. 通过荧光素酶实验, 各组实验中的平均荧光强度强弱, 可以间接反映出在细胞中转录因子 OCT-4 对 AP-2 γ 片段的转录活性具有明显的抑制效应. 通过荧光素酶活性以及突变分析实验、Western blot 实验, 分别抑制或过表达 NTera-2 细胞和 HEK-293 细胞中的 OCT-4, 从“正”和“反”两方面实验证明 OCT-4 蛋白对 AP-2 γ 的转录水平和蛋白质水平都有一定的抑制效应. 为了进一步证实 OCT-4 和 AP-2 γ 相互作用, 利用免疫荧光实验检测发现 OCT-4 能和 AP-2 γ 在 NTera-2 细胞内共定位. 隐睾是最常见的泌尿生殖畸形之一, 足月男婴的发生率高达 3%~4%. 隐睾的“癌变”较正常睾丸高出 20~40 倍, 临床的流行病因调查显示隐睾是发生精原细胞瘤的诱因之一. 我们通过构建小鼠的隐睾模型, 检测到小鼠隐睾模型中 OCT-4 的表达下降, 而 AP-2 γ 的表达上升. 在动物模型水平分析 OCT-4 对 AP-2 γ mRNA 表达水平的影响.

我们首次发现 AP-2 γ 基因是 OCT-4 转录因子的靶基因, OCT-4 对 AP-2 γ 基因表达起负调控作用. 我们注意到以往的临床样本分析结果, 正常成人睾丸中 OCT-4 和 AP-2 γ 均不表达, 而在睾丸生殖细胞肿瘤中 OCT-4 和 AP-2 γ 的表达都有上调^[15]. 我们推测, 在病理条件下可能还有其他基因协同 OCT-4 调控 AP-2 γ 表达, 或者 AP-2 γ 下游靶基因对 OCT-4 的表达有反馈调控的机制, 或者 OCT-4 失去调控 AP-2 γ 的作用, 等等. 鉴于 OCT-4 对下游靶基因调控情况的多样化, OCT-4 基因在基因表达调控方面的重要作用以及 AP-2 γ 基因的重要生理功能, 我们将继续致力于二者之间的调控与精原细胞瘤发生的关系.

参 考 文 献

- [1] Looijenga L, Oosterhuis J W. Pathogenesis of testicular germ cell tumours. *Reviews of Reproduction*, 1999, 4(2): 90-100
- [2] Bosl G J, Motzer R J. Testicular germ-cell cancer. *N Engl J Med*, 1997, 337(4): 242-253

- [3] Tummala M K, Hussain A. Recent developments in germ cell tumors of the testes. *Current Opinion in Oncology*, 2008, **20**(3): 287
- [4] Pesce M, Schöler H R. Oct-4: Control of totipotency and germline determination. *Molecular Reproduction and Development*, 2000, **55**(4): 452–457
- [5] Rajpert-De Meyts E, Hanstein R, Jorgensen N, *et al.* Developmental expression of POU5F1 (OCT-3/4) in normal and dysgenetic human gonads. *Human Reproduction*, 2004, **19**(6): 1338–1344
- [6] Boyer L A, Lee T I, Cole M F, *et al.* Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 2005, **122** (6): 947–956
- [7] Dieckmann K P, Loy V. Prevalence of contralateral testicular intraepithelial neoplasia in patients with testicular germ cell neoplasms. *J Clinical Oncology*, 1996, **14**(12): 3126–3132
- [8] Oosterhuis J W, Looijenga L H J. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nature Reviews Cancer*, 2005, **5**(3): 210–222
- [9] Reuter V E. Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors. *Modern Pathology*, 2005, **18**: S51–S60
- [10] Dieckmann K P, Skakkebaek N E. Carcinoma *in situ* of the testis: review of biological and clinical features. *International J Cancer*, 1999, **83**(6): 815–822
- [11] Hussain A. Germ cell tumors. *Current Opinion in Oncology*, 2005, **17**(3): 268–274
- [12] Biermann K, Klingmuller D, Koch A, *et al.* Diagnostic value of markers M2A, OCT3/4, AP-2 γ , PLAP and c-KIT in the detection of extragonadal seminomas. *Histopathology*, 2006, **49**(3): 290–297
- [13] Boshier J M, Totty N F, Hsuan J J, *et al.* A family of AP-2 proteins regulates c-erbB-2 expression in mammary carcinoma. *Oncogene*, 1996, **13**(8): 1701
- [14] Werling U, Schorle H. Transcription factor gene AP-2 γ essential for early murine development. *Molecular and Cellular Biology*, 2002, **22**(9): 3149–3156
- [15] Hoei-Hansen C E, Nielsen J E, Almstrup K, *et al.* Transcription factor AP-2 γ is a developmentally regulated marker of testicular carcinoma *in situ* and germ cell tumors. *Clinical Cancer Research*, 2004, **10**(24): 8521–8530
- [16] Hong S M, Frierson Jr H F, Moskaluk C A. AP-2 γ protein expression in intratubular germ cell neoplasia of testis. *American J Clinical Pathology*, 2005, **124**(6): 873–877

The Regulation of Downstream Target Gene AP-2 γ by Transcription Factor OCT-4*

ZHAO Xiao-Meng**, WANG Cheng**, LI Xiao-Feng, ZHANG Xiao-Ting, LIU Xi-Zhi, ZHOU Chang***

(Key Laboratory of Protein Chemistry and Development Biology of State Education Ministry of China,
College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract In recent years, OCT-4 and AP-2 γ have been widely used as clinical markers of testicular germ cell tumors. Transcription factor OCT-4, which plays an important role in embryonic development, gives full play to a variety of biological functions in different developmental periods and differentiations. The effect of OCT-4 is realized through the regulation of the target genes. In this study, we found OCT-4 binding sites within the sequence of AP-2 γ promoter region by a variety of bionumerics. AP-2 γ , a novel target gene of OCT-4, was identified by chromatin immunoprecipitation (ChIP) -PCR. A combination of sequence analysis, reporter gene assays, Western blot, immunofluorescence assay and mouse cryptorchidism model experiment further confirmed that AP-2 γ was the target gene of OCT-4. OCT-4 inhibited the transcriptive activity of AP-2 γ . The expression of AP-2 γ gene was confirmed to be significantly altered by silencing or overexpression of OCT-4. This new discovery is conducive to study the malignant process of germ cell tumors at the molecular level.

Key words testicular germ cell tumors, OCT-4, target gene, AP-2 γ

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00203

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81071696, 81071656), Hunan Provincial Innovation Foundation For Postgraduate (CX2011B214) and Project of Chang Sha Science and Technology Plan(K1109006-31).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-731-88872916, E-mail: zhouchang1972@126.com

Received: April 25, 2012 Accepted: August 20, 2012