论著

文章编号:1000-5404(2005)01-0028-03

n-3 PUFA 依赖的跨膜型肿瘤坏死因子-α 真核表达载体的构建

承 海[1],糜漫天[1],张乾勇[1],陈 丹[2]* ([1]第三军医大学预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆 400038;[2]第四军医大学基础医学部电镜中心,西安 710032)

提 要:目的 构建 n-3 多不饱和脂肪酸依赖的跨膜型肿瘤坏死因子-α(tmTNF-α)真核表达载体。**方法** 设计并合成包含 PPRE 增强子的 tk 启动子序列,与人突变型 tmTNF-α 真核表达载体 pcDNA3-TNF(△1-12)WB 重组,构建 pPPRE-tk-tmTNF-α 表达载体,转染人乳腺癌 MCF-7 细胞,经 EPA 处理后,应用免疫荧光技术检测 tmTNF-α 蛋白的表达。**结果** 经琼脂糖凝胶电泳分析和测序鉴定证明 pPPRE-tk-tmTNF-α 真核表达载体构建成功,转染此重组表达载体的 MCF-7$^{tmTNF-\alpha}$ 细胞 tmTNF-α 表达受 EPA 正调控,两者之间呈时间、剂量-效应关系。**结论** 成功构建受 n-3 PUFA 正调控的 tmTNF-α 真核表达载体。

关键词:n-3 多不饱和脂肪酸;跨膜型肿瘤坏死因子-α;PPRE;真核表达

中图法分类号:Q782; R394-33; R730.3 **文献标识码**:A

Construction of transmembrane TNF-α eukaryotic expression vector in n-3 PUFA dependant manner

CHENG Hai[1], MI Man-tian[1], ZHANG Qian-yong[1], CHEN Dan[2] ([1]Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Center of Electron Microscopy, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: Objective To construct the transmembrane TNF-α eukaryotic expression vector in n-3 PUFA dependant manner. **Methods** PPRE-tk sequence was designed and artificially synthesized, and then inserted it into pcDNA3-TNF(△1-12)WB plasmid to construct eukaryotic expression vector pPPRE-tk-tmTNF-α by gene recombine techniques. The tmTNF-α protein expression level was observed in MCF-7 transfected cells incubated with EPA by immunofluorescence technique. **Results** pPPRE-tk-tmTNF-α expression vector was constructed successfully and identified by agarose gel electrophoretic analysis and nucleotide sequence analysis. EPA could increase tmTNF expression levels in time- and dose-dependant manners. **Conclusion** tmTNF-α expression vector regulated by n-3 PUFA is successfully constructed.

Key words: n-3 PUFA; transmembrane TNF-α; peroxisome proliferator response element; eukaryotic expression

跨膜型肿瘤坏死因子-α(transmembrane TNF-α, tmTNF-α)是分泌型肿瘤坏死因子-α(secreted TNF-α, sTNF-α)的前体,属于Ⅱ型跨膜蛋白,经特异性金属蛋白酶 TNF 转化酶(TACE/ADAM17/CD156q)作用,切除先导序列(leader sequence)生成 sTNF-α。目前,sTNF-α 已经用于临床抗瘤研究,但发现大剂量使用可导致严重的全身毒副作用。国外有研究发现 tmTNF-α 也可以通过细胞间接触发挥局部细胞毒效应,杀伤多种靶细胞[1],其中对肿瘤细胞的杀伤效应是抗瘤研究的一大热点。

n-3 多不饱和脂肪酸(n-3 PUFA)是一类对人体有益的重要脂肪酸,主要来源于海洋鱼类,包括二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)等,国内报道该类脂肪酸具有调节血脂、抗血栓和抗炎等功效[2]。国外有研究发现 n-3 PUFA 可以通过促进细胞凋亡等途径发挥抗肿瘤效应[3]。此外,n-3 PUFA 可以活化细胞内存在的过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR),通过相应的 PPAR 反应元件(peroxisome proliferator response element, PPRE)调控靶基因的表达。本研究通过基因重组的方法构建受 n-3 PUFA 正调控的 tmTNF-α 真核表达载体,旨在进一步研究 n-3 PUFA 和 tmTNF-α 联合应用的抗瘤效应。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 EPA(Sigma 公司);小量质粒提取试剂盒

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100150)
Supported by the National Nature Science Foundation of China (30100150)

作者简介:承 海(1976-),男,安徽省淮南市人,硕士,医师,主要从事营养学、免疫学与肿瘤学方面的研究。电话:(023)68752291

通讯作者:糜漫天,电话:(023)68752292

收稿日期:2004-07-08;**修回日期**:2004-09-08

(Promage 公司)；DNA 凝胶回收试剂盒、DNA 快速连接试剂盒和 DOTAP 脂质体(Roche 公司)；DMEM/F12 培养基和小牛血清(Gibco 公司)；核酸内切酶(MBI 公司)；抗人 TNF-α 单克隆抗体(Santa Cruz 公司)；其余试剂均为国产。

1.1.2　质粒、菌种和细胞株　　含有人突变型跨膜肿瘤坏死因子-α 的真核表达载体 pcDNA3-TNF(△1-12)WB 由以色列 Weizmann Institute of Science 的 David Wallach 教授惠赠；根据文献[4, 5]，设计长度约 190 bp 的 PPRE-tk 启动子序列(上海生工生物技术公司合成)，其上下游分别带有 *Bgl* Ⅱ 和 *Kpn* Ⅰ 特异性酶切位点。大肠杆菌 JM109 菌株和人乳腺癌 MCF-7 细胞由本室保存。

1.2　方法

1.2.1　pPPRE-tk-tmTNF-α 表达载体的构建　　*Bgl* Ⅱ 和 *Kpn* Ⅰ 双酶切 pcDNA3-TNF(△1-12)WB 和合成的 PPRE-tk 序列，获得具有互补粘性末端的两个片段，2% AGE 分离回收后，T_4 连接酶室温连接 4 h，见图 1。连接产物转化感受态细菌，筛选出阳性克隆。提取重组质粒，命名为 pPPRE-tk-tmTNF-α，进行限制性内切酶酶切-琼脂糖凝胶电泳鉴定，并委托上海生工技术公司进行测序分析。

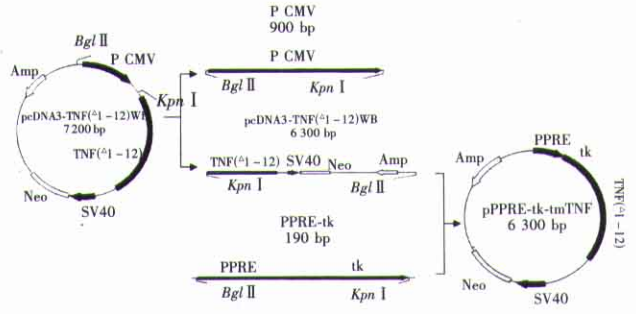


图 1　pPPRE-tk-tmTNF-α 表达载体构建示意图

Fig 1　Sketch map of recombinant expression vector of pPPRE-tk-tmTNF-α

1.2.2　质粒转染和鉴定　　参考 DOTAP 脂质体转染试剂说明，将重组质粒转染入人乳腺癌 MCF-7 细胞，以 600 μg/ml 的 G418 初筛，待对照组细胞完全死亡后，以 400 μg/ml 的 G418 维持筛选两周，阳性细胞命名为 MCF-$7^{tmTNF-\alpha}$，冻存备用。

1.2.3　免疫荧光技术检测 tmTNF-α 表达水平的变化　　以终浓度为 30、60、90 μmol/L 的 EPA 处理转染细胞，分别于 24、48、72 h 后收获细胞，4% 多聚甲醛固定，加入抗人 TNF-α 单抗，4 ℃孵育 24 h，加入 FITC 标记的荧光二抗，37 ℃孵育 2 h，应用激光共聚焦扫描显微镜观察并进行细胞平均荧光强度定量。

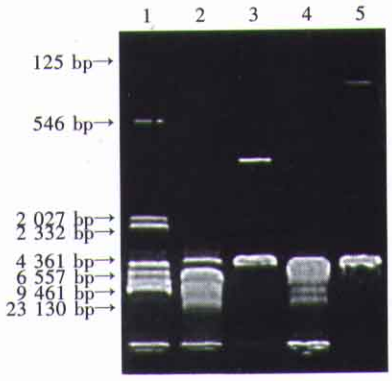
2　结果

2.1　重组 pPPRE-tk-tmTNF-α 表达载体酶切结果

pPPRE-tk-tmTNF-α 经 *Bgl* Ⅱ 和 *Kpn* Ⅰ 酶切可获得约 6.3 kb 的大片段(线性 pcDNA3-tmTNF-α)和约 190 bp 的小片段(PPRE-tk 片段)，见图 2，结合核酸测序分析结果证明重组成功。

2.2　MCF-$7^{tmTNF-\alpha}$ 经 EPA 处理后 tmTNF-α 表达水平的变化

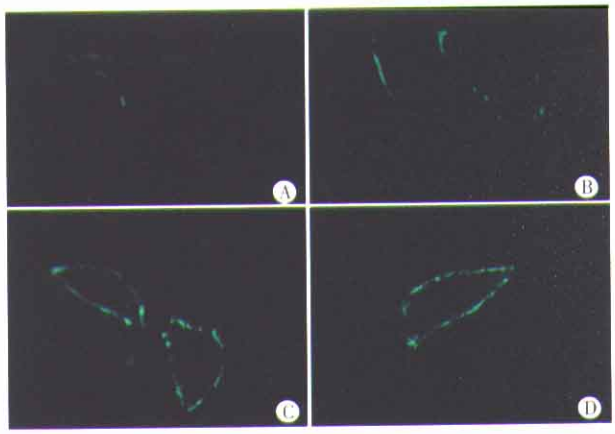
tmTNF-α 表达于 MCF-$7^{tmTNF-\alpha}$ 细胞膜上，随着 EPA 处理浓度的增加和处理时间的延长，tmTNF-α 的表达水平显著增加，见图 3～6，两者之间呈时间、剂量-效应关系，说明 tmTNF-α 在转染细胞内的表达受 EPA 的正调控。



1: Marker (λDNA + *Hind* Ⅲ)；2: pcDNA3-TNF(△1-12)WB；3: pcDNA3-TNF(△1-12)WB (*Bgl* Ⅱ + *Kpn* Ⅰ)；4: pPPRE-tk-tmTNF-α；5: pPPRE-tk-tmTNF-α(*Bgl* Ⅱ + *Kpn* Ⅰ)

图 2　pPPRE-tk-tmTNF-α 重组载体酶切鉴定

Fig 2　Results of pPPRE-tk-tmTNF-α by restriction enzyme digestion



A: MCF-$7^{tmTNF-\alpha}$；B: 30 μmol/L；C: 60 μmol/L；D: 90 μmol/L

图 3　不同浓度 EPA 处理 MCF-$7^{tmTNF-\alpha}$ 48 h 后 tmTNF-α 表达变化(免疫荧光 × 400)

Fig 3　Changes of tmTNF-α expression of MCF-$7^{tmTNF-\alpha}$ at 48 h after treatment with different concentrations of EPA (Immunofluorescence × 400)

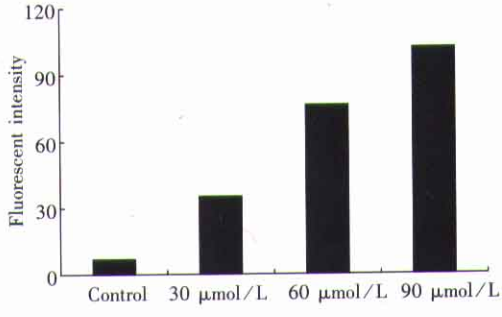
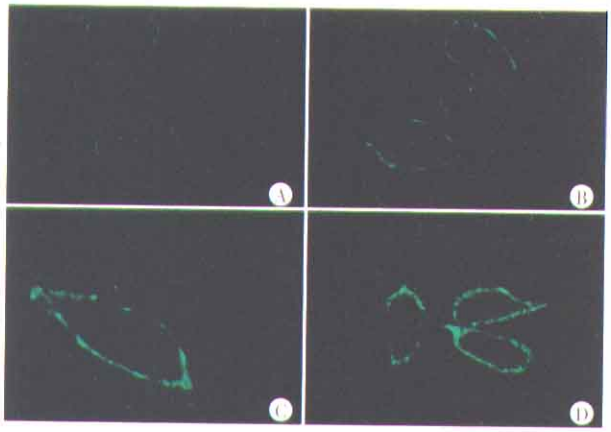


图 4　不同浓度 EPA 处理 MCF-$7^{tmTNF-\alpha}$ 48 h 后荧光强度定量

Fig 4　Fluorescence intensity of MCF-$7^{tmTNF-\alpha}$ at 48 h after treatment with different concentrations of EPA



A: MCF-7$^{tmTNF-\alpha}$; B: 24 h; C: 48 h; D: 72 h

图5 60 μmol/L EPA处理MCF-7$^{tmTNF-\alpha}$不同时间后tmTNF-α表达变化 (免疫荧光×400)

Fig 5 Changes of tmTNF-α expression of MCF-7$^{tmTNF-\alpha}$ after treatment with 60 μmol/L EPA for different time (Immunofluorescence×400)

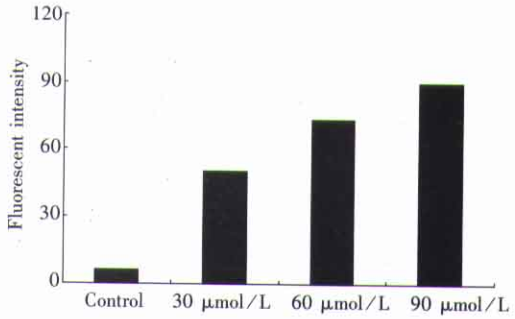


图6 60 μmol/L EPA处理MCF-7$^{tmTNF-\alpha}$不同时间后荧光强度定量

Fig 6 Fluorescence intensity of tmTNF-α expression of MCF-7$^{tmTNF-\alpha}$ after treatment with 60 μmol/L EPA for different time

3 讨论

活化的单核细胞、T细胞等免疫细胞可以生成26×10^3的tmTNF-α,此Ⅱ型跨膜蛋白可以被另一种膜蛋白——TNF转化酶"切割",从细胞膜上脱落(shedding),生成17×10^3的分泌型TNF-α。tmTNF-α的+1~12氨基酸序列参与此识别和切割过程,缺失此段序列的tmTNF-α不能被TACE切割,从而稳定表达在膜上。由此Perez等[1]利用定点突变(site-directed mutagenesis)技术,首先构建出可以稳定表达tmTNF-α的真核表达载体。与其他分泌型蛋白的前体蛋白不同,tmTNF-α本身就是一种活性蛋白,依赖细胞间的接触,参与抗病毒感染、肿瘤的消退、恶病质、感染性休克及自身免疫性疾病等病理过程。国内石文芳等[6]研究发现tmTNF-α可以通过Ⅰ型和Ⅱ型TNF受体发挥对肿瘤细胞的细胞毒性作用,且对多种sTNF-α耐受的肿瘤细胞同样有效,其中促进肿瘤细胞凋亡可能是重要机制之一。由此推测体内应用tmTNF-α,其抗瘤效应可能优于sTNF-α,而且不会产生严重的全身毒副作用。

n-3 PUFA可以通过抑制肿瘤细胞增殖、促进细胞分化和细胞凋亡等途径发挥抗瘤效应,目前已经作为一种新型抗癌药物应用于临床研究,具有一定的应用前景。但是由于代谢较快等特点,n-3 PUFA应用于体内不易达到有效剂量,给临床实际应用带来不便。PPAR是一种新的甾体类激素受体,存在于多种细胞内,n-3 PUFA是其中众多配体的一种。n-3 PUFA与细胞内PPAR结合并使其活化,进而调控基因增强子区域含有PPRE增强子的靶基因的表达,从而诱导下游众多细胞事件的发生。本研究中通过合成含有与PPARα、γ高亲和力的PPRE-tk启动子序列,使其下游靶基因tmTNF-α的表达受n-3 PUFA高效正调控。实验结果表明EPA处理稳定表达跨模型肿瘤坏死因子的人乳腺癌MCF-7细胞,可使tmTNF-α蛋白表达显著增加,两者之间呈时间、剂量-效应关系。以肿瘤细胞为靶细胞,可以将n-3 PUFA和tmTNF-α联合抗瘤作用定位于肿瘤组织,特别是实体瘤组织,在达到定位、定量、定时发挥功效的同时减少两者单独使用对机体造成的不良反应。

目前抗癌研究还是集中在开发新型抗癌药物以及探索肿瘤基因治疗方案上。通过构建肿瘤细胞特异性定向高表达载体使肿瘤细胞作为受体细胞,采用回体法基因转移技术或体内直接注射方式,使靶基因在患者体内发挥抗瘤作用是现在肿瘤基因治疗的主导研究方向。构建受n-3脂肪酸正调控的跨膜型肿瘤坏死因子-α真核表达载体,其意义在于可以更好的研究n-3 PUFA和tmTNF-α联合抗瘤效应,也为进一步探讨肿瘤的基因治疗方案提供一定的研究依据。

参考文献:

[1] Perez C, Albert I, DeFay K, *et al*. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact[J]. Cell, 1990, 63(2): 251-258.

[2] 丁 力, 吴葆杰, 张岫美. 鱼油抗大鼠实验性心律失常作用[J]. 中国生化药物杂志, 1993, 4(1): 45-50.

[3] Arita K, Kobuchi H, Utsumi T, *et al*. Mechanism of apoptosis in HL-60 cells induced by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids[J]. Biochem Pharmacol, 2001, 62(7): 821-828.

[4] Meynier de Salinelles V, Berenbaum F, Jacques C, *et al*. Design of a chimeric promoter induced by pro-inflammatory mediators in articular chondrocytes[J]. FEBS Lett, 2002, 518(1-3): 67-71.

[5] McKnight S L, Gavis E R, Kingsbury R, *et al*. Analysis of transcriptional regulatory signals of the HSV thymidine kinase gene: identification of an upstream control region[J]. Cell, 1981, 25(2): 385-398.

[6] 石文芳, 李卓娅, 龚非力, 等. 跨膜型与分泌型TNF-α细胞毒性效应的比较[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1998, 18(6): 499-504.

(编辑 陈聪连)