文章编号:1000-5404(2005)10-0981-04

论著

前列腺特异性启动子 rPB 的改造及其载体质粒的构建和活性测定

张 尧,江 军,王洛夫 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科,重庆 400042)

提 要:目的 构建一个前列腺特异性的、可启动针对雄激素非依赖性前列腺癌的基因治疗的改良启动子并测定其活性。**方法** 选择前列腺特异性启动子 rPB,通过两次 PCR 对其进行改造,用维甲酸反应元件(RARE)替代雄激素反应元件(ARE)或直接插入 RARE,构建成为不同拷贝条件的 rPB-DR,并与质粒连接。转染细胞后,进行荧光素酶活性测定。**结果** 通过电泳鉴定及基因测序,证实构建成功。**结论** 根据实验设计,构建出的 rPB-DR 应具有在维甲酸的调控下,针对雄激素非依赖性前列腺癌特异性启动基因治疗的功能,现构建成功不同拷贝条件的 rPB-DR,证实实验设计构想,同时通过活性测定比较各种拷贝条件的 rPB-DR 启动子活性的优劣,为下一步与治疗基因的连接及功能测定奠定基础。

关键词: 前列腺癌;雄激素非依赖;基因治疗;启动子;维甲酸反应元件

中图法分类号: R322.6; R394-33; R394.3 **文献标识码:** A

Construction and activity determination of modified prostatic specific promoters rPB-DRs

ZHANG Yao, JIANG Jun, WANG Luo-fu (Department of Urology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To construct the prostatic specific promoter used to induce the gene therapy aiming at androgen independent prostatic carcinoma and evaluate the activity. **Methods** Through two steps of polymerase chain reaction (PCR), androgen response elements (AREs) in rPB were replaced by synthetic retinoic acid response elements (RAREs). Then the modified rPBs were connected with the plasmid. The activity was evaluated. **Results** Constructions were confirmed to be successful by electrophoresis and gene sequencing. **Conclusion** Modified rPB should be the prostatic specific promoter which can induce the gene therapy aiming at androgen-independent prostatic carcinoma controlled by retinoic acid. After being constructed, the modified rPBs were used to confirm our ideas about the experiment design and the capability inducing the gene expression of different modified rPBs was compared.

Key words: prostatic neoplasm; androgen independent; gene therapy; promoter; retinoic acid response element

缺乏雄激素时,前列腺细胞内的雄激素受体则不被激活,这被称为雄激素依赖性。而前列腺癌细胞在初期也表现为雄激素依赖性,所以,临床上对晚期前列腺癌患者多采用雄激素去势或抗雄激素治疗,这种治疗在初期对患者有效,但在病情缓解几个月到几年后,绝大多数患者会发展为雄激素非依赖性前列腺癌,这时去雄激素和抗雄激素治疗不再有效,且无有效的替代疗法,成为前列腺癌治疗的难点。近年来,各国学者均大力研究以使前列腺癌基因治疗的临床应用成为可能,但是多数基因治疗均对前列腺癌尤其是雄激素非依赖性前列腺癌缺乏特异性,为此,我们设计该实验,试图寻找特异性及针对性更强的治疗方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 rPB 启动子片段 由美国北纳斯威尔医学中心泌尿外科 Robert J. Matusik 教授惠赠。启动子片段载体质粒为 puc119,氨苄青霉素抗性,全长3 654 bp,启动子片段两端限制性内切酶酶切位点分别为 *Hind* Ⅲ 和 *Bam*H Ⅰ,启动子片段为 -426/+28rPB,长 454 bp,其 5′端具有一雄激素反应区,决定其前列腺特异性,-236/-223 和 -140/-117 两处为雄激素反应元件(androgen response element, ARE)。

1.1.2 构建质粒载体 pGL3-basic 荧光素酶质粒,购自普洛麦格(Promega)中国公司。空质粒全长4 818 bp,氨苄青霉素抗

基金项目:重庆市科委攻关课题(2003-2005)
Supported by the Key Sci & Tech Research Project by Scientific Committee of Chongqing (2003-2005)

作者简介:张 尧(1974-),男,广东省梅县人,硕士研究生,主治医师,讲师,主要从事泌尿系肿瘤方面的研究,发表论文 6 篇。电话:(023)68757344

通讯作者:江 军,电话:(023)68757364

收稿日期:2005-01-18;修回日期:2005-04-20

性,无启动子,具有多克隆位点及荧光素酶反应区。

1.1.3 酶(均自带 Buffer)及 PCR 引物 限制性内切酶(共4种:*Hind*Ⅲ、*Bam*HⅠ、*Mlu* Ⅰ和 *Bgl* Ⅱ)及高保真 DNA 聚合酶(Pyrobest DNA Polymerase)均购自宝生物(TaKaRa)中国公司;T4连接酶购自普洛麦格(Promega)中国公司。共7条引物,分别编号 P1~P7,其中 P1、P3、P5 为上游引物,其余为下游引物,均由北京三博远志生物有限公司合成。

1.1.4 试剂盒 如质粒小规模抽提试剂盒、PCR 纯化试剂盒、DNA 胶回收试剂盒等均购自中鼎生物技术公司。

1.1.5 细胞培养及转染 细胞为前列腺癌细胞株,编号 DU145;培养应用 1640 培养基加 20% 胎牛血清; GeneJuice 转染试剂购自美国 Novagen 公司;荧光素酶检测试剂盒购自普洛麦格(Promega)中国公司。

1.2 方法

1.2.1 rPB-luci 的构建

构建原理:即 -426/+28rPB 与 pGL3-basic 荧光素酶质粒的连接,作为实验对照。因 pGL3-basic 的多克隆位点无 *Hind*Ⅲ和 *Bam*HⅠ酶切位点,选用 *Mlu* Ⅰ和 *Bgl* Ⅱ2种内切酶酶切位点,需为 -426/+28rPB 两端插入新的酶切位点。

构建方案:以 rPB-puc119 为模板,应用 P1(含有 *Mlu* Ⅰ酶切位点)、P6(含有 *Bgl* Ⅱ酶切位点)两条引物进行 PCR;用 *Mlu* Ⅰ和 *Bgl* Ⅱ两种内切酶对分别 PCR 产物及 pGL3-basic 进行双酶切,回收酶切产物;以回收产物为底物,应用 T4 连接酶进行连接反应,应用 *E. coil*DH5α 感受态菌转化连接产物,应用质粒小规模抽提试剂盒抽提纯化获得重组质粒。

1.2.2 rPB-DR-luci 的构建 构建原理:应用代表维甲酸反应元件(ratinoic acid response element, RARE)的寡核苷酸(三拷贝的 AGGTCAGAGGTCA,共 39 bp)替换 rPB 上的 ARE,构建改良型启动子 rPB-DR,使我们可以利用维甲酸诱导其启动针对雄激素非依赖性前列腺癌的基因治疗。共构建4种拷贝条件的 rPB-DR,具体原理方案见图1。

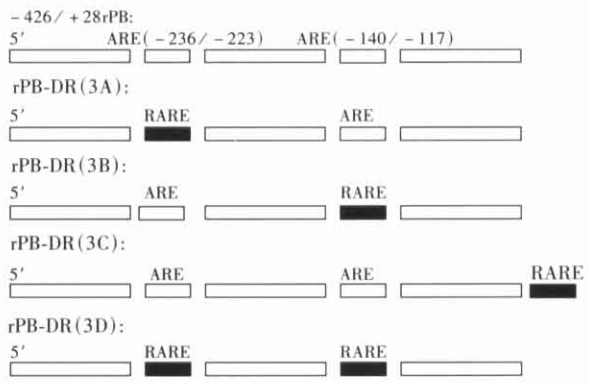


图1 4种 rPB-DR 的构建原理和方案

Fig 1 Principle and programs of construction of the rPB-DRs

构建方案:应用 *Hind*Ⅲ和 *Bam*HⅠ对 rPB-puc119 进行双酶切,酶切产物稀释 100 倍作为 PCR 模板;通过两步 PCR,应用不同引物和不同模板的组合,完成替换和插入,构建4种拷贝条件的 rPB-DR;应用 *Mlu* Ⅰ和 *Bgl* Ⅱ两种内切酶对 PCR 产物及 pGL3-basic 进行双酶切,回收酶切产物;以回收产物为底物,应用 T4 连接酶进行连接反应,通过转化抽提获得重组质粒。

1.2.3 构建结果的鉴定 PCR 结果的琼脂糖凝胶电泳鉴定:两次 PCR 结果均进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。

构建结果的单酶切鉴定:应用 *Bgl* Ⅱ建立 10 μl 单酶切体系,37 ℃反应 1 h,利用琼脂糖凝胶电泳鉴定结果。

基因测序鉴定:将转化的菌液及质粒送上海生工测序部进行基因测序鉴定。

1.2.4 细胞转染及荧光素酶活性测定 细胞培养及转染:培养细胞并调整细胞密度至(0.5~2.5)×10^6/ml,转染前将细胞转至 12 孔细胞培养板。取 0.2 μg rPB-DR(6)-luci 质粒加入 GeneJuice 转染试剂/1640 培养基混合物中,再逐滴加入培养板,37 ℃、5% CO_2 培养箱培养。

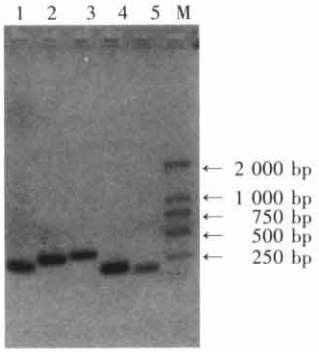
最佳时相测定:转染 5 h 后,加入维甲酸(1 μg/ml)进行刺激,并分别于刺激后 0、1、3、6、12、24 h 进行取样,同时设未转染对照组。应用荧光素酶检测试剂盒及化学发光检测仪测定荧光素酶活性,记录数据。

荧光素酶活性测定:分为 6 组,分别以 pGL3-basic 空质粒、rPB-luci 及 4 种 rPB-DR-luci 质粒按上述方法进行培养转染,加入维甲酸(1 μg/ml)进行刺激后,于最佳时相点取样进行荧光素酶活性测定,记录数据。

2 结果

2.1 凝胶电泳鉴定结果

rPB 经第 1 次 PCR 获得的 5 个片段产物凝胶电泳图像如图 2。图中可见 5 个片段亮条带集中于 Marker DL2000 指示的 250 bp 条带位置前后,其中 P1P2、P3P6、P1P4 3 组产物片段条带位于 250 bp 稍后方,位置分别与它们约 260、320、330 bp 的长度基本相符;P5P6、P3P4 两组产物片段条带位于 250 bp 稍前方,位置与它们长度各约 170 bp 基本相符,初步证实第 1 次 PCR 成功。



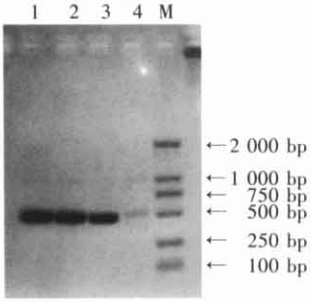
1: Product of PCR by P1P2; 2: Product of PCR by P3P6; 3: Product of PCR by P1P4; 4: Product of PCR by P5P6; 5: Product of PCR by P3P4; M: DL2000 marker

图2 第1次 PCR 结果:替换 ARE 后的片段

Fig 2 Fragments after replacing the AREs after the first PCR

经第 2 次 PCR 获得的产物 rPB-DR 凝胶电泳图像如图 3。

图中可见 4 条产物片段条带整齐排列于 Marker DL2000 指示的 500 bp 位置,与预想片段长度相符,初步证实 rPB-DR 构建成功。

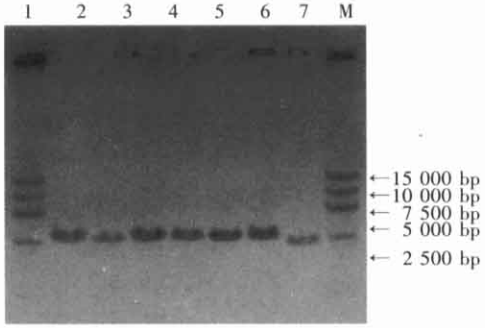


1: rPB-DR(3A); 2: rPB-DR(3B); 3: rPB-DR(3C); 4: rPB-DR(6); M: DL2000 marker

图 3　第 2 次 PCR 结果:完成的 rPB-DR

Fig 3　Completed rPB-DRs after the second PCR

rPB-luci 的单酶切鉴定结果及 4 个构建的质粒 rPB-DR-luci 的单酶切鉴定结果如图 4。图中可见作为对照的 pGL3-basic 空质粒单酶切产物形成的亮条带位于 Marker DL15000 指示的 5 000 bp条带稍前方,位置与其4 818 bp的长度相符;而 4 个构建质粒 rPB-DR-luci 单酶切产物的条带[共 5 条:rPB-DR(6)-luci 共作两孔]整齐排列于5 000 bp条带稍后方,与预想质粒长度(5 300 bp左右)相符,初步证实 rPB-luci 和 4 种 rPB-DR-luci 均构建成功。



1: rPB-luci; 2: rPB-DR(3A); 3: rPB-DR(3B); 4: rPB-DR(3C); 5: rPB-DR(6); 6: rPB-DR(6); 7: pGL3-basic; M: DL15000 marker

图 4　重组质粒的单酶切鉴定结果

Fig 4　The recombinant plasmid by enzyme digestion

2.2　基因测序结果

已获得 rPB-luci 的测序结果,与预想序列相符率 100%,证明构建完全成功。

已获得 4 种 rPB-DR-luci 重组质粒的测序结果,与预想序列相符率 100%,证明构建完全成功。

2.3　荧光素酶活性测定结果

最佳时相点测定结果:荧光素酶活性在加入维甲酸刺激后 3 h 达到最高峰,因此可以认为刺激后 3 h 为最佳时相点。

荧光素酶活性测定结果:最后测定结果如表 1。

表 1　荧光素酶活性测定结果

Tab 1　The determination of luciferase activities

Plasmid	pGL3-basic	rPB-luci	rPB-DR (3A)-luci	rPB-DR (3B)-luci	rPB-DR (3C)-luci	rPB-DR (6)-luci
Luciferase activity	137.5	369.4	3 754	4 312	1 569	8 752

3　讨论

随着分子生物学及基因组学的迅速发展,前列腺癌的基因治疗已成为目前研究的热点。目前有关前列腺癌基因治疗的治疗策略很多。Eastham 等[1]报道,应用编码单纯疱疹病毒胸腺嘧啶激酶(HSV-tk)的腺病毒载体,直接向裸鼠皮下前列腺肿瘤注射,可明显抑制肿瘤生长。我们也应用雄激素反义 RNA 直接转染前列腺细胞株,结果表明雄激素反义 RNA 不仅可抑制前列腺癌细胞 LNCaP 对雄激素的增殖反应,同时也可抑制雌激素、抗雄激素药物对前列腺癌的生长刺激作用[2,3]。但是,这些治疗方法均没有较好的特异性,不能直接针对前列腺癌细胞,尤其是雄激素非依赖性前列腺癌。

在本研究中,为了提高治疗的特异性,我们选用了前列腺特异性启动子 rPB,它含有两个雄激素反应元件(ARE)及一个雄激素反应区,其中 5′端的雄激素反应区决定了它对前列腺组织的高度特异性。不过,有研究表明[4],在前列腺癌组织中存在两种类型雄激素非依赖性的癌细胞,一类仍表达 AR,许多细胞通过敏化(sensitization)使 AR 的活性大幅度提高,而获得雄激素非依赖性生长;另一类 AR 表达丧失,AR 表达丧失癌细胞的比例越高,前列腺癌预后越差。而 rPB 只可启动针对雄激素受体(AR)表达阳性的前列腺癌细胞的基因治疗,对 AR 表达阴性的前列腺癌细胞则无任何作用。因此,有必要对 rPB 进行改造,使之在两种细胞内均能启动治疗基因的表达。

维甲酸受体与 AR 同为核转录因子超家族,有研究表明[5]无论 AR 表达阳性还是 AR 表达阴性的前列腺癌细胞均有维甲酸受体,因此,我们设计应用维甲酸反应元件(RARE)替代 rPB 内的 ARE,构建改良型启动子 rPB-DR,再利用外加维甲酸药物诱导 rPB-DR 启动前列腺癌治疗基因,达到针对性治疗雄激素非依赖性前列腺癌的目的。

本实验报告了改良型启动子 rPB-DR 的构建方法及结果。有研究[6]证实 RARE 的外显子基因序列为 AGGTCA,一拷贝序列称为一个半位点(half site),两拷贝序列加一个碱基(C 或 G),简称为 DR + 1,是反应活性最高的序列, DR(3)(三重叠拷贝的 DR + 1)即可代表 RARE 与维甲酸反应。因此我们应用三重叠拷贝的 AGGTCAGAGGTCA 代表 RARE 进行替换插入。从电泳

图像及基因测序结果可知，rPB-DR 已获得成功构建，并已经与具有启动子活性报告功能的 pGL3-basic 荧光素酶质粒连接，成功构建 rPB-DR-luci。同时，我们成功构建了 rPB-luci，作为活性测定的对照实验组。

另外，我们在构建 rPB-DR 时将 RARE 进行了不同拷贝条件的替换和插入，包括了两种单位置替换，一种双位置替换及一种直接插入，便于选择活性最高的拷贝条件。

在构建实验中，我们参考基因突变的基本方案，设计了应用两步 PCR 进行构建的方法。首先，我们应用双酶切后的产物作为模板，提高了 PCR 的特异性，减少了非特异条带的产生。其次，我们将两端需要的限制性内切酶酶切位点和 DR(3)序列(及反向互补序列)设计在引物中，以 rPB-DR(3A)为例，设计引物 P1、P6 中分别带有两端需要插入的酶切位点(*Mlu* Ⅰ和 *Bgl* Ⅱ)，而 P3、P2 中则分别带有 DR(3)序列及其反向互补序列，第 1 步两次 PCR(引物分别是 P1P2 和 P3P6)将模板序列 rPB 于 ARE 处(－236/－223)分为两段，第 1 段下游端与第 2 段上游端完全相同并均有 DR(3)序列；第 2 步 PCR(引物 P1P6)将两段重新整合，而插入的 DR(3)序列已将 ARE 序列替换，同时构建的改造启动子序列两端已插入新的酶切位点。这种方法简单易行，构建成本较低，尤其适合于突变碱基较多，突变位置距模板两端较远的情况，虽然有一定的基因突变的可能性，但高保真 DNA 聚合酶的应用可有效防止突变的发生，使之成为一种稳定有效的突变方案。

构建完成后，我们应用构建的质粒转染前列腺癌细胞株 DU145，并进行荧光素酶活性测定，以此反映该启动子的活性。DU145 是一种常用的前列腺癌细胞株，能够代表 AR 表达阴性的雄激素非依赖性前列腺癌。从实验结果可见，插入前列腺特异性启动子 rPB 的 pGL3-basic 质粒在转染后其荧光素酶活性仍然较低，说明 rPB 在 AR 表达阴性的前列腺癌细胞中的活性很低。而同时进行的转染及活性测定中可见，4 种改良型 rPB-DR 在维甲酸的刺激下，其活性均远高于 rPB($P<0.01$)，其中 rPB-DR(6)的活性最高，这说明我们构建的改良型启动子在 AR 表达阴性的前列腺癌细胞中已经具有相当的活性，并以 rPB-DR(6)的活性最高，证明我们构建的启动子基本具备了较强的特异性和针对性，符合实验预想，可以进行之后的整合自杀基因及改良启动子的腺病毒载体的构建工作，也为我们选择最佳的启动子构建方式奠定了基础。

参考文献：

[1] Eastham J A, Chen S H, Sehgal I, *et al*. Prostate cancer gene therapy: herpes simplex virus thymidine kinase gene transduction followed by ganciclovir in mouse and human prostate cancer models[J]. Hum Gene Ther, 1996, 7(4): 515－523.

[2] 江 军，王洛夫，方玉华，等. 雄激素受体反义 RNA 抑制前列腺癌细胞 LNCaP 致瘤性的研究[J]. 第三军医大学学报，2003，25(15)：1336－1338.

[3] 江 军，王洛夫，方玉华，等. 雄激素受体反义 RNA 对前列腺癌细胞雄激素受体表达的抑制作用研究[J]. 第三军医大学学报，2003，25(6)：501－504.

[4] Blackburn R V, Galoforo S S, Corry P M, *et al*. Adenoviral-mediated transfer of heat-inducible double suicide gene into prostate carcinoma cells [J]. Cancer Res, 1998, 58(7): 1358－1362.

[5] Koshiuka K; Elstner E, Williamson E, *et al*. Novel therapeutic approach: organic arsenical melarsoprol alone or with all-trans-retinoic acid markedly inhibits growth of human breast and prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Br J Cancer, 2000, 82(2): 452－458.

[6] Jiang G, Sladek F M. The DNA binding domain of hepatocyte nuclear factor 4 mediates cooperative, specific binding to DNA and heterodimerization with the retinoid X receptor alpha[J]. J Biol Chem, 1997, 272(2): 1218－1225.

（编辑 龙 亮）

关于数字的用法

在各种出版物上数字的用法总的原则是：凡是可以使用阿拉伯数字，而且又很得体的地方均应使用阿拉伯数字。以下两种情况必须使用阿拉伯数字：

1 公历世纪、年代、年、月、日和时刻 例如：公元前 5 世纪、20 世纪 90 年代、1995 年 6 月 8 日 14 时 30 分。表示年份要写全称，1995 年不能写成 95 年或'95 年；1953－1958 年不能写成 1953－58 年。年月日可以写成 1995-06-08。时刻用":"分隔的形式。如：13 时 45 分 8 秒可以写成 13:45:08。

2 计数和计量(整数、小数、分数、百分数、均数)包括序数、编号 4 位和 4 位以上的数字采用三位分节法，不用"千分撇"，节与节之间留半个阿拉伯数字的空隙(如 2,431 改为 2 431)。年份、部分代号、仪器型号等非计量数字不用分节，也不加千分撇。尾数"0"多，5 位以上的数字，可以用"万""亿"表示，但不得以十，百，千，百万，十亿等汉字表示，例如 3 579 000 可写成 357.9 万但不能写成 3 百 57 万千或 357 万 9 千。

本刊编辑部