文章编号:1000-5404(2009)04-0297-04

论著

含 hTERT 启动子和 Fcy::Fur 基因重组质粒的构建及其对卵巢癌细胞的体外杀伤作用

朱元方[1],李　攀[2],康　楷[3],胡丽娜[2],乐爱文[3],汤雄文[1],杨　环[4]　(重庆医科大学:[1]附属第二医院妇产科, 重庆 400010;[2]超声影像学研究所; [3]附属第一医院院妇产科;[4]公共卫生学院, 重庆 400016)

摘　要: 目的　构建含人端粒酶逆转录酶(hTERT)启动子和融合型自杀基因 Fcy::Fur 的重组真核表达质粒并探讨它对卵巢癌细胞的体外杀伤作用。**方法**　①从 pORF5-Fcy::Fur 质粒中 PCR 扩增 Fcy::Fur 片段,亚克隆进 p2XEB 质粒,构建含 hTERT 启动子和 Fcy::Fur 基因的重组真核表达质粒 p2XEB-Fcy::Fur;同理,将 Fcy::Fur 亚克隆进 pGL3-Promoter 质粒,构建含猿猴病毒 40(SV40)启动子和 Fcy::Fur 基因的重组质粒 pGL3-Pro-Fcy::Fur,重组子经酶切鉴定、测序;② RT-PCR 检测卵巢癌细胞 SKOV3 和人胚肺成纤维细胞 MRC-5 中 hTERT mRNA 的表达,荧光素酶活性分析检测 hTERT 启动子在 2 种细胞中活性;③用超声微泡作载体,将上述 2 种质粒分别转染 SKOV3 和 MRC-5,与前药 5-氟胞嘧啶(5-FC)共培养后,CCK-8 测定转染细胞增殖抑制率;吖啶橙/溴化乙啶(AO/EB)染色观察细胞凋亡;RT-PCR 检测 Fcy::Fur mRNA 的表达。**结果**　p2XEB-Fcy::Fur 和 pGL3-Pro-Fcy::Fur 2 种重组质粒酶切和测序结果与预期完全相符,hTERT 启动子和 Fcy::Fur 片段测序与 GenBank 报道一致,且插入方向正确;SKOV3 和 MRC-5 中 hTERT mRNA 表达分别为阳性和阴性,hTERT 启动子在 SKOV3 中活性为 26.2%,在 MRC-5 中为 0.65%;p2XEB-Fcy::Fur/5-FC 系统对 SKOV3 的增殖抑制率明显高于 MRC-5($P=0.036$),而 pGL3-Pro-Fcy::Fur/5-FC 系统对 2 种细胞的增殖抑制率无明显区别($P=0.87$);转染 pGL3-Pro-Fcy::Fur 的 SKOV3、MRC-5 细胞以及转染 p2XEB-Fcy::Fur 的 SKOV3 细胞,均见大量凋亡细胞和 Fcy::Fur mRNA 表达,而转染 p2XEB-Fcy::Fur 的 MRC-5 少见凋亡细胞,也无 Fcy::Fur mRNA 表达,与前三者比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论**　含人端粒酶逆转录酶启动子和 Fcy::Fur 基因的重组质粒 p2XEB-Fcy::Fur 成功构建,p2XEB-Fcy::Fur/5-FC 系统能靶向杀伤端粒酶逆转录酶阳性的卵巢癌细胞。

关键词:人端粒酶催化亚单位;启动子;自杀基因;克隆;基因治疗;靶向;卵巢癌
中图法分类号: R394-33;R73-362;R737.31　　**文献标识码**: A

Construction of recombinant plasmid containing hTERT promoter and Fcy::Fur gene and its killing effect on ovarian cancer cells

ZHU Yuan-fang[1], LI Pan[2], KANG Kai[3], HU Li-na[2], LE Ai-wen[3], TANG Xiong-wen[1], YANG Huan[4] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010; [2]Ultrasonography Institute, [3]Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital, [4]College of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective　To construct a recombinant expression plasmid containing hTERT promoter and Fcy::Fur suicide gene and to explore its killing effect on ovarian cancer cells. **Methods**　①In order to construct recombinant plasmid p2XEB-Fcy::Fur and pGL3-Pro-Fcy::Fur, Fcy::Fur gene was amplified first from plasmid pORF5-Fcy::Fur using PCR and inserted into plasmid p2XEB and pGL3-promoter respectively. ②We detected the expression of hTERT at mRNA level in SKOV3 and MRC-5 cells by RT-PCR and analyzed its promoter activity using luciferase analysis method. ③We transfected the 2 recombinant plasmids into SKOV3 and MRC-5 cells by ultrasound destructing microbubble and co-cultured cells with 5-FC. The changes of cell proliferation and apoptosis were analyzed by CCK-8 and AO/EB dyeing. Fcy::Fur mRNA was measured by RT-PCR. **Results**　The plasmids of p2XEB-Fcy::Fur and pGL3-Pro-Fcy::Fur were constructed successfully and identified by restriction endonuclease and sequencing. SKOV3 and MRC-5 cells showed respectively positive

基金项目:国家自然科学基金重点项目(30430230);国家自然科学基金(30371619)
Supported by the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (30430230) and the National Natural Science Foundation of China (30371619)
作者简介:朱元方,男,江西省鄱阳县人,博士研究生,讲师,主要从事妇科肿瘤治疗方面的研究,E-mail: zhuyf1027@163.com
通信作者:胡丽娜, E-mail: cqhulina@126.com
收稿日期:2008-05-13;**修回日期**:2008-10-21

and negative expression of hTERT mRNA, with hTERT promoter activity of 26.2% in SKOV3 cells and 0.65% in MRC-5 cells. Cell proliferation inhibitory rate was higher in p2XEB-Fcy::Fur/SKOV3 than that in p2XEB-Fcy::Fur/MRC-5 ($P=0.036$), while the inhibitory rate was of no distinction in pGL3-Pro-Fcy::Fur/SKOV3 and pGL3-Pro-Fcy::Fur/MRC-5 ($P=0.87$). Except in p2XEB-Fcy::Fur/MRC-5, large scale of cell apoptosis and Fcy::Fur mRNA expression were found in the other three transfected groups ($P<0.01$). **Conclusion** The recombinant plasmid of p2XEB-Fcy::Fur is constructed successfully, and in the combination with 5-FC, it can kill targeted ovarian cancer cells.

Key words: human telomerase reverse transcriptase; promoter; suicide gene; clone; gene therapy; target; ovarian cancer

研究表明85%以上的人类肿瘤细胞中存在端粒酶的再激活,人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)是端粒酶的重要组成成分,在肿瘤细胞中过表达,因此,构建含hTERT启动子和目的基因的重组质粒可实现肿瘤基因治疗的靶向性[1-3]。在肿瘤基因治疗中,自杀基因因其巨大的旁观者效应备受瞩目。自杀基因Fcy::Fur融合了酵母菌胞嘧啶脱氨酶基因和尿嘧啶磷酸核糖转移酶基因,具有更高的活性[4],选择它作靶基因能最大限度消除肿瘤细胞对治疗药物的耐药性并减少前药用量,降低了前药的毒性作用,进一步提高了基因治疗的安全性。本研究中,我们构建了含hTERT启动子和融合型自杀基因Fcy::Fur的重组真核表达质粒,并探讨了它对卵巢癌细胞及正常人胚肺细胞的体外杀伤作用。

1 材料与方法

1.1 材料

pORF5-Fcy::Fur购自InvivoGen公司,PCR试剂盒为TaKaRa公司产品,脂质体2000购自Invitrogen公司,CCK-8试剂盒、EZNA™质粒抽提试剂盒购自博大公司,DNA回收试剂盒、Marker购自天根公司,p2XEB质粒由美国North Carolina州国立环境健康科研所Izumi教授惠赠,pGL3-Promoter、pGL3-control、pGL3-basic及pRL-TK均为Promega产品,5-氟胞嘧啶(5-FC)购自Sigma公司,DH5α菌、卵巢癌细胞SKOV3、人胚肺成纤维细胞MRC-5由我校基研所保存,微泡及超声基因转染仪由我校超声影像学研究所提供,PCR扩增引物由上海生工生物公司合成,Fcy::Fur cDNA上游引物:5′-CATGCCATGGTCACAGGAGGCATCCATGG-3′,下游引物:5′-GCTCTAGAGGTTTAGACACAGTAGTATCTGTCTCTA-GA-3′(产物1 139 bp);β-actin上游引物:5′-GACTACCTCATGAAGATC-3′,下游引物:5′-GATCCACATTTGCTGGAA-3′(产物512 bp);hTERT上游引物:5′-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3′,下游:5′-GGATGAAGCGGAGTCTGGA-3′(产物145 bp)。

1.2 方法

1.2.1 Fcy::Fur基因的扩增 以pORF5-Fcy::Fur质粒为模板,PCR扩增Fcy::Fur片段,反应条件如下:40 μl反应体系,模板质粒0.1 μl,上下游引物各2 μl,dNTP 4 μl,10×Buffer 4 μl $MgCl_2$ 2.5 μl,KOD-Plus 0.4 μl,双蒸水25 μl,反应参数94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,68 ℃ 50 s,共30个循环,反应完成经*Nco* Ⅰ、*Xba* Ⅰ双酶切后,1.0%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,DNA凝胶回收试剂盒快速纯化回收产物,操作按试剂盒说明书进行。

1.2.2 重组质粒的构建及鉴定 p2XEB质粒经*Nco*Ⅰ、*Xba* Ⅰ双酶切后,纯化回收大片段,然后在T_4 DNA连接酶作用下与经*Nco* Ⅰ、*Xba* Ⅰ双酶切的PCR纯化产物16 ℃连接过夜。酶切体系:质粒5 μl,*Nco* Ⅰ 4 μl,*Xba* Ⅰ 4 μl,10×M Buffer 5 μl,双蒸水12 μl;连接体系:双酶切质粒1 μl,双酶切PCR产物6 μl,连接缓冲液1 μl,T_4连接酶2 μl,重组质粒产物命名为p2XEB-Fcy::Fur,将重组产物转化DH5α感受态细菌,挑取单个阳性克隆,扩增后抽提质粒,操作按说明书进行。*Nco* Ⅰ、*Xba* Ⅰ双酶切鉴定,质粒送上海生工测序。同理,将Fcy::Fur纯化产物与pGL3-Promoter质粒进行酶切、连接,重组质粒产物命名为pGL3-Pro-Fcy::Fur,同法进行转化、扩增、抽提、酶切鉴定及测序。

1.2.3 细胞培养 SKOV3培养在含10%小牛血清、双抗(青霉素100 U/ml和链霉素100 μg/ml)的1640培养液中,MRC-5培养在含10%胎牛血清、双抗的DMEM培养液中,所有细胞均在37℃、5% CO_2和一定湿度的条件下孵育培养。

1.2.4 SKOV3和MRC-5内hTERT mRNA表达检测 提取2种细胞内总RNA,进行RT-PCR反应(内对照为β-actin),产物电泳图像分析,以hTERT和β-actin的比值表示各细胞中hTERT的相对水平。

1.2.5 hTERT启动子活性的检测 当细胞密度达60%~70%时,用脂质体分别介导p2XEB(含hTERT启动子)、pGL3-basic(不含启动子的阴性对照)、pGL3-control(含SV40启动子和增强子的阳性对照)和pRL-TK(含CMV启动子的内参照)共转染SKOV3和MRC-5,测量每种细胞的发光强度,以pGL3-control/pRL-TK的荧光素酶活性为100%,其他载体活性为相对于pGL3-control的百分比,重复3次,取其均值,操作均按试剂盒说明书进行。

1.2.6 质粒转染 分别将SKOV3和MRC-5分成p2XEB-Fcy::Fur组、pGL3-Pro-Fcy::Fur和pGL3-Promoter质粒组,参照我们前期实验[5],用超声微泡作载体进行转染。

1.2.7 细胞增殖抑制实验 转染36 h后,与不同浓度(0、32、65、130、250、500 mg/L)的前体药物5-FC共培养72 h后,收集细胞,接种于96孔板,细胞终密度为1.0×10^4,200 μl体系,

CCK-8 法测定 4 组细胞的增殖抑制率。每组均由对照孔(不加 5-FC)和实验孔(加不同浓度的 5-FC)组成,对照孔和实验孔均设 3 个平行孔,取其均值,细胞增值抑制率 = (1 - 实验组平均 D(595)值/对照组平均 D(595)值) ×100%。

1.2.8　AO/EB 染色观察细胞凋亡　　爬片细胞转染 36 h,与浓度为 250 mg/L 5-FC 培养 48 h 后,取 1% AO、EB 各 1 ml 等量混合,每片加 50 μl,荧光显微镜下正常细胞核发绿色荧光,凋亡细胞呈橙红色,随机取 6 个高倍视野计算细胞凋亡率。

1.2.9　RT-PCR 检测 Fcy::Fur mRNA 表达　　提取各组转染细胞总 RNA,进行 RT-PCR 反应,以 Fcy::Fur 与 β-actin 的比值表示各细胞中 Fcy::Fur 的相对水平。

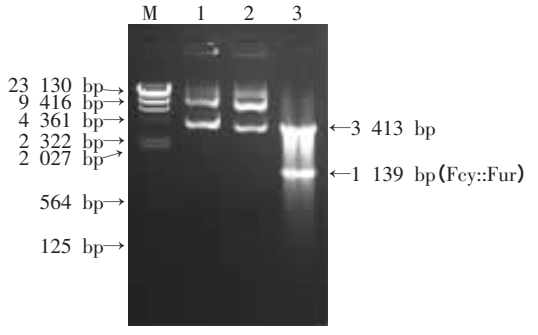
1.3　统计学处理

使用 SPSS 13.0 软件进行 t 检验和 χ^2 检验。

2　结果

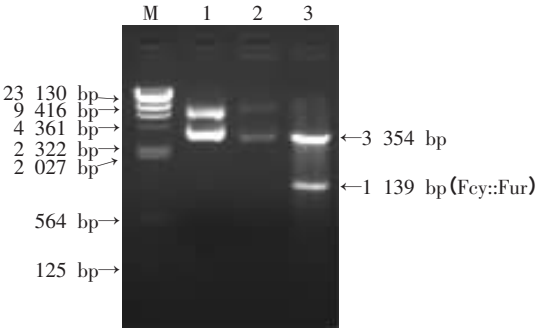
2.1　重组质粒 p2XEB-Fcy::Fur、pGL3-Pro-Fcy::Fur 的酶切鉴定及测序

约 1 139 bp 的 Fcy::Fur PCR 产物成功扩增。重组质粒 p2XEB-Fcy::Fur、pGL3-Pro-Fcy::Fur 成功构建,经双酶切后小片段与 Fcy::Fur PCR 产物位置一致,分别见图 1、2;测序显示,hTERT 启动子和 Fcy::Fur 片段与 GenBank 序列比对 100% 吻合,且插入方向正确。



M:标准; 1:p2XEB-Fcy::Fur; 2: p2XEB; 3: p2XEB-Fcy::Fur 双酶切

图 1　p2XEB-Fcy::Fur 双酶切电泳图

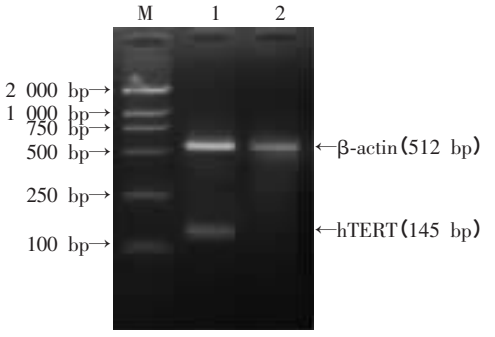


M:标准; 1: pGL3-Pro-Fcy: Fur; 2: pGL3-Promoter; 3: pGL3-Pro-Fcy::Fur 双酶切

图 2　pGL3-Pro-Fcy::Fur 双酶切电泳图

2.2　SKOV3 和 MRC-5 内 hTERT mRNA 水平的表达

RT-PCR 半定量结果显示:SKOV3 内检测到 hTERT mRNA 表达,而 MRC-5 内则呈阴性,如图 3。



M:标准; 1: SKOV3; 2: MRC-5

图 3　SKOV3 和 MRC-5 内 hTERT mRNA 水平的表达

2.3　2 种细胞中 hTERT 启动子的活性检测

p2XEB 转入 SKOV3 细胞后,其 hTERT 启动子转录活性为 26.2%,虽然只为 pGL3-control 转录活性(100%)的 26%,却相当于 pGL3-basic 阴性对照质粒转录活性(0.63%)的 42 倍。而将 p2XEB 质粒转入 MRC-5 细胞中,则只产生背景水平的荧光素酶活性,仅为 0.65%。

2.4　转染后的 SKOV3 和 MRC-5 细胞增值抑制情况

在相同 5-FC 浓度情况下,pGL3-Pro-Fcy::Fur/5-FC 系统对 SKOV3 和 MRC-5 细胞的增殖抑制率无明显区别(P = 0.87);而 p2XEB-Fcy::Fur/5-FC 对 SKOV3 增殖抑制率明显高于 MRC-5 细胞(P = 0.036);在 5-FC 浓度为 250 mg/L 范围内时,空质粒 pGL3-Promoter 转染后对 2 种细胞增值抑制均无明显影响,抑制率 < 10%。SKOV3、MRC-5 转染 3 种不同质粒后,细胞增值抑制率与 5-FC 浓度的量效关系见图 4。

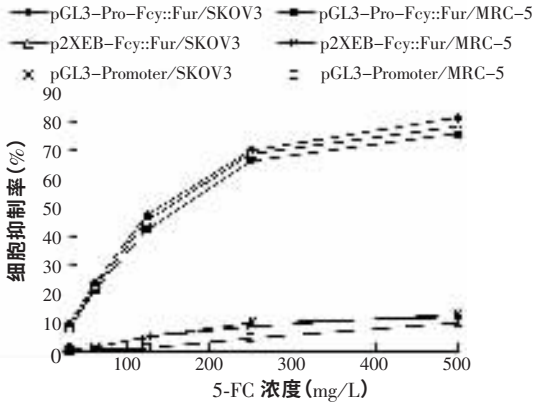


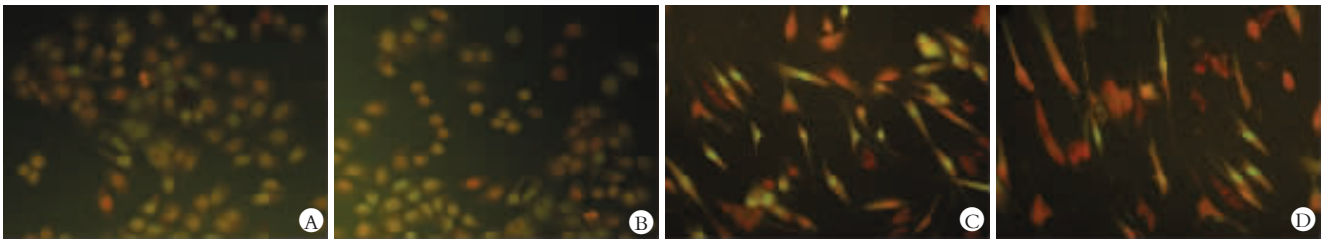
图 4　SKOV3、MRC-5 转染 3 种不同质粒后在不同浓度 5-FC 作用下的细胞增殖抑制率

2.5　AO/EB 染色结果

转染 pGL3-Pro-Fcy::Fur 的 SKOV3、MRC-5 细胞以及转染 p2XEB-Fcy::Fur 的 SKOV3 细胞,荧光镜下均见大量核呈橙红色的凋亡细胞,凋亡率分别为 84.6%、82.3% 和 80.7%,而转染 p2XEB-Fcy::Fur 的 MRC-5 核则发绿色荧光,较少见凋亡细胞,凋亡率仅为 29.6%,如图 5。

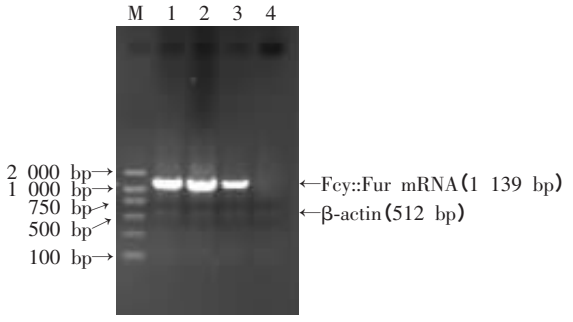
2.6　Fcy::Fur mRNA RT-PCR 检测结果

在转染的 4 组细胞中,p2XEB-Fcy::Fur/MRC-5 细胞未检测到 Fcy::Fur mRNA 条带,而其他 3 组转染细胞均可检测到 Fcy::Fur mRNA 表达,后三者比较无明显差别,见图 6。



A：p2XEB-Fcy::Fur/SKOV3；B：pGL3-Pro-Fcy::Fur/SKOV3；C：p2XEB-Fcy::Fur/MRC-5；D：pGL3-Pro-Fcy::Fur/MRC-5

图5 AO/EB 染色观察4组转染细胞凋亡情况 （×100）



M：标准；1：p2XEB-Fcy::Fur/SKOV3；2：pGL3-Pro-Fcy::Fur/SKOV3；3：pGL3-Pro-Fcy::Fur/MRC-5；4：p2XEB-Fcy::Fur/MRC-5

图6 4组转染细胞 Fcy::Fur mRNA 表达

3 讨论

研究表明 hTERT 启动子在端粒酶阳性细胞中被激活，而在端粒酶阴性的正常细胞中受抑制，因此，将目的基因构建在 hTERT 启动子下游，可实现肿瘤基因治疗的靶向性[2,3]。hTERT 转录起始位点为上游近端 180～208 bp 片段，称为核心启动子区域，该区域中 －208～－150 之间的 59 bp 序列则负责最高的启动子活性[6]，敲除该片段可使启动子活性显著下降。本实验所用的 p2XEB 质粒即是含 －211～＋40 的核心启动子片段，我们通过荧光素酶分析法检测了该启动子在 hTERT 阳性和阴性细胞 SKOV3、MRC-5 中的活性，结果提示，在 SKOV3 中它的活性较高，为 26.2%，而在 MRC-5 中为 0.63%，故该启动子是卵巢癌基因治疗中较为理想的靶向启动子。

pORF5-Fcy::Fur 质粒是含 Fcy::Fur 目的基因的真核表达载体，它的启动子是在所有细胞中均呈高表达的杂合启动子，也无组织特异性，因此它启动的 Fcy::Fur 基因不能实现靶向治疗。为此，我们用 PCR 方法，构建了含 hTERT 启动子和 Fcy::Fur 基因的真核表达质粒 p2XEB-Fcy::Fur 及含 SV40 启动子和 Fcy::Fur 基因的对照质粒 pGL3-Pro-Fcy::Fur，经酶切鉴定显示含有 1 139 bp 的 Fcy::Fur 目的条带和约 3 400 bp 的质粒骨架条带，测序结果比对 hTERT 启动子和 Fcy::Fur 序列 100% 吻合。

随后我们用含不同启动子的 2 种质粒去转染 SKOV3 和 MRC-5 细胞，结果显示转染 p2XEB-Fcy::Fur 的 MRC-5 细胞未见 Fcy::Fur mRNA 表达，其余 3 组转染细胞均见 Fcy::Fur mRNA 表达。增殖抑制实验表明，随着 5-FC 浓度不断增高，各组细胞增值抑制率也增大，在相同 5-FC 浓度情况下，pGL3-Pro-Fcy::Fur/5-FC 系统对 SKOV3 和 MRC-5 2 种细胞抑制率无明显区别；而 p2XEB-Fcy::Fur/5-FC 系统对 SKOV3 的杀伤作用明显强于 MRC-5 细胞，有显著性差异。进一步的 AO/EB 染色显示转染 pGL3-Pro-Fcy::Fur 的 SKOV3、MRC-5 细胞以及转染 p2XEB-Fcy::Fur 的 SKOV3 细胞，均见大量凋亡细胞，而转染 p2XEB-Fcy::Fur 的 MRC-5 则凋亡很少。上述结果充分表明：hTERT 启动子因在端粒酶逆转录酶阳性的卵巢癌细胞中启动子活性高，启动了自杀基因转录，而在 MRC-5 中活性极低，杀伤效应低，故用 p2XEB-Fcy::Fur/5-FC 系统对卵巢癌实行基因治疗有靶向杀伤作用，而对正常细胞影响极小。

本实验利用基因克隆技术，成功构建了含 hTERT 启动子和 Fcy::Fur 基因真核表达质粒 p2XEB-Fcy::Fur，并探讨了它对卵巢癌细胞和正常人胚肺细胞的杀伤作用，为肿瘤靶向基因治疗提供了实验基础。

参考文献：

[1] Janknecht R. On the road to immortality: hTERT upregulation in cancer cells[J]. FEBS Lett, 2004, 564(1－2): 9－13.

[2] Fujiwara T, Urata Y, Tanaka N. Telomerase-specific oncolytic virotherapy for human cancer with the hTERT promoter[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2007, 7(2): 191－201.

[3] Yang L F, Zhao Y, Zeng L, *et al*. hTERT/re-caspase-3 system induce apoptosis in hTERT-positive cancer cells[J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(11): 1554－1553.

[4] Hamstra D A, Lee K C, Tychewicz J M, *et al*. The use of 19F spectroscopy and diffusion-weighted MRI to evaluate differences in gene-dependent enzyme prodrug therapies[J]. Mol Ther, 2004, 10(5): 916－928.

[5] 朱元方，胡丽娜，李 攀，等. 自制脂质微泡联合超声辐照介导 pGL3- Promoter-EGFP 质粒转染卵巢癌细胞的实验研究[J]. 中国超声医学杂志，2008，24(4)：303－306.

[6] Horikawa I, Cable P L, Mazur S J, *et al*. Downstream E-box-mediated regulation of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene transcription: evidence for an endogenous mechanism of transcriptional repression[J]. Mol Biol Cell, 2002, 13(8): 2585－2597.

（编辑 汪勤俭）