文章编号:1000-5404(2009)06-0515-03

论著

前列腺特异启动子驱动的自杀基因对雄激素非依赖前列腺癌的杀伤作用

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

摘 要:目的 将前列腺特异性启动子驱动的自杀基因导入到雄激素非依赖性前列腺癌(androgen independent prostate cancer,AIPC)细胞,观察其对AIPC细胞的杀伤作用。**方法** 将rPB-DR(6)启动子驱动的胞嘧啶脱氨酶(CD)基因融合分子插入到逆转录病毒载体pLNCX,构建pLN-rPB-DR(6)-CD重组逆转录病毒载体,PA317包装,获得重组逆转录病毒,后者感染前列腺癌细胞PC-3,获得G418抗性细胞PC-3^{CD}。在培养基中加入维甲酸、5-氟胞嘧啶,观察其对PC-3^{CD}的杀伤作用。**结果** 经酶切和测序证实成功构建了pLN-rPB-DR(6)-CD重组逆转录病毒载体,PCR证实在PC-3^{CD}基因组DNA中扩增出了CD基因,RT-PCR证实PC-3^{CD}有CD mRNA表达。在培养基中加入维甲酸、5-氟胞嘧啶后,PC-3^{CD}细胞大量死亡,生长显著被抑制。**结论** 前列腺特异性启动子驱动的自杀基因可杀伤雄激素非依赖性前列腺癌细胞,并显著抑制其生长。

关键词: 前列腺癌;前列腺特异性启动子;自杀基因;逆转录病毒;基因治疗
中图法分类号: R73-362;R730.54;R737.25 **文献标识码:** A

Antitumor effect of suicide gene driven by prostate specific promotor on androgen independent prostate cancer cells

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

Abstract: Objective To transduce the suicide gene driven by prostate specific promotor into androgen independent prostate cancer (AIPC) cells and observe its antitumor effect. **Methods** A fusional fragment of cytosine deaminase (CD) gene driven by rPB-DR(6) promotor was inserted into the retroviral vector pLNCX to reconstruct the retroviral vector pLN-rPB-DR(6)-CD which was packaged by PA317 cells. The supernatant containing recombinant retrovirus was used to infect PC-3 cells and G418 was employed to select resistant clones, PC-3^{CD} cells. The antitumor activity of the CD gene on PC-3^{CD} cells was observed by adding tretinoin and 5-fluorocytosine into the culture media. Cell growth curve was plotted and growth inhibitory rate was calculated. **Results** The retroviral vector pLN-rPB-DR(6)-CD was confirmed to be successfully reconstructed by enzyme digestion and DNA sequencing. A fragment containing the CD gene was amplified by PCR in the genomic DNA of PC-3^{CD} cells. The CD mRNAs were present in PC-3^{CD} cells confirmed by RT-PCR. After adding tretinoin and 5-fluorocytosine into the culture media, the PC-3^{CD} cells died dramatically and their proliferation was inhibited significantly. **Conclusion** The suicide gene driven by prostate specific promotor can kill the AIPC cells and inhibit their proliferation.

Key words: prostate cancer, genetic prodrug activation therapy, retroviral vector, gene therapy

临床采用内分泌治疗的晚期前列腺癌患者,在病情缓解数月到数年后,绝大多数会发展为雄激素非依赖性前列腺癌(androgen independent prostate cancer,AIPC),内分泌治疗不再有效,且无有效的治疗方法,患者最终死于肿瘤转移或其他并发症[1]。AIPC的治疗是前列腺癌治疗的难点。在以往的研究中,我们构建了rPB-DR(6)启动子[2],该启动子保持了前列腺特异性,同时可以对维甲酸-维甲酸受体复合物起反应。由于所有的前列腺癌细胞均表达维甲酸受体,在维甲酸存在时,rPB-DR(6)启动子可特异性地在前列腺癌细胞(包括所有类型的AIPC)中起作用,驱动下游基因表达。本研究在此基础上构建重组逆转录病毒载

基金项目:第三军医大学科研基金(XZ200536)
Supported by the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University (XZ200536)
作者简介:王洛夫,男,山东省莒南县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事泌尿系肿瘤和结石的临床和基础方面的研究。电话:(023)68757947
通信作者:靳风烁,电话:(023)68757946
收稿日期:2008-11-21;修回日期:2008-12-23

体,该载体含前列腺特异性启动子 rPB-DR(6)驱动的自杀基因——胞嘧啶脱氨酶基因(CD),将其导入到前列腺癌细胞,观察其对前列腺癌细胞的杀伤作用。

1 材料与方法

1.1 pLN-rPB-DR(6)-CD 逆转录病毒载体的构建、包装

*Bam*HⅠ + *Hind*Ⅲ(TaKaRa 公司)双酶切回收逆转录病毒载体 pLNCX(Miller AD, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle),去掉其 CMV 启动子,并与 rPB-DR(6)启动子驱动的 CD 基因融合分子相连,构建 pLN-rPB-DR(6)-CD 重组逆转录病毒载体(图1),采用脂质体包裹法转染包装细胞 PA317,获得重组逆转录病毒。重组逆转录病毒感染 NIH 3T3 细胞,测定逆转录病毒的滴度。

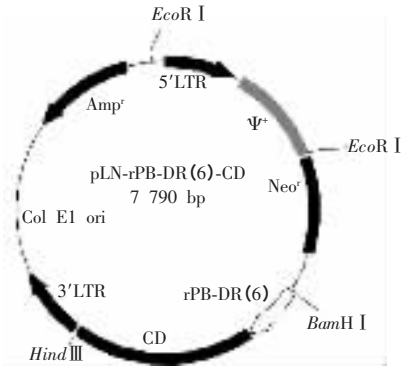


图1 重组逆转录病毒载体 pLN-rPB-DR(6)-CD 的物理图谱

1.2 逆转录病毒感染 PC-3 细胞及抗性克隆的获得

于6孔板接种 5×10^5 雄激素非依赖性前列腺癌细胞 PC-3(美国 ATCC),培养基为含 10% FBS 的 RPMI1640,37 ℃ 5% CO_2 培养箱内培养。24 h 后移去培养液,加入 1 ml 含 0.1 ml 重组逆转录病毒的培养基,并加入 800 μg/ml 的聚凝胺(polybrene)至终浓度 8 μg/ml,37 ℃、5% CO_2 培养箱内孵育细胞 1 ~ 3 h。用培养基稀释聚凝胺至 2 μg/ml,培养 2 d。将细胞按 1∶3 传代,培养基含 500 μg/ml G418,培养 3 d。换液,继续选择培养直至可见抗性克隆。消化传代于 15 cm^2 培养瓶,加无 G418 的新鲜培养基,扩大培养并冻存。将重组逆转录病毒感染所得的抗性 PC-3 细胞命名为 PC-3^{CD}。

1.3 PCR 检测插入片段在基因组 DNA 中的存在

采用 Trizol 试剂(Invitrogen)提取 PC-3^{CD}、PC-3 细胞基因组 DNA(按说明书操作),采用引物 P1、P2 进行 PCR:P1:5′-ACAGAGCTCATTCAGGCTAGCAATGTCGAA-3′,P2:5′-ATCAAGCTTGCATTTTTGCACATGGCGT-3′。P1、P2 引物位于 CD 基因的两侧,依 CD 基因序列采用 Primer Premier 4 软件设计,由上海生工生物工程公司合成,扩增片段的长度为 1 511 bp。

1.4 RT-PCR 检测 CD mRNA 的存在

采用 Trizol 试剂(Invitrogen)提取 PC-3^{CD}、PC-3 细胞总 RNA,DNA 酶消化后,电泳证实 RNA 提取成功,以随机六聚体引物反转录为 cDNA,反应条件:42 ℃,10 min→30 ℃,20 min→99 ℃,5 min→4 ℃,5 min,然后以 P1、P2 引物进行扩增,反应条件:94 ℃,5 min→(94 ℃,30 s→58 ℃,30 s→72 ℃,30 s)×28→72 ℃,10 min,扩增片段的长度应为 1 511 bp。

1.5 自杀基因对前列腺癌细胞的杀伤作用

于传代次日,在 PC-3^{CD}、PC-3 中加入 2 μmol/L 的维甲酸、10 μmol/L 5-氟胞嘧啶(5-FC, Sigma 公司),继续培养,观察自杀基因对细胞的杀伤作用。

接种 PC-3^{CD}、PC-3 于 24 孔板,每孔接种 3×10^4 个细胞,24 h 后更换为含 2 μmol/L 的维甲酸、10 μmol/L 5-FC 的培养基。每天消化 3 孔细胞并计数,取平均值,绘制细胞生长曲线并计算细胞生长抑制百分率,计算公式如下。

$$细胞生长抑制百分率(\%)=\frac{N_n-N}{N_n-N_0}\times100\%$$

其中 N_0 为始接种细胞数,N 为实验组(PC-3^{CD})细胞 n 天后的细胞数,Nn 为对照(PC-3)细胞 n 天后的细胞数。

2 结果

2.1 pLN-rPB-DR(6)-CD 逆转录病毒载体的构建、包装

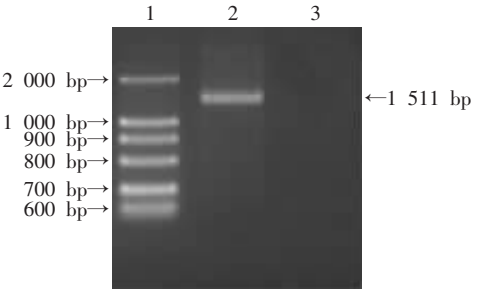
构建的载体采用 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ双酶切,获得大小约 2 000 bp条带,符合 rPB-DR(6)启动子与 CD 基因相连的长度,进一步测序,证实插入方向及序列正确。经 PA317 细胞包装,获得了含重组 LN-rPB-DR(6)-CD 逆转录病毒的上清。取上清感染 NIH 3T3 细胞,测定病毒滴度为 2.86×10^5 CFU/ml。

2.2 重组 PC-3 细胞的获得

重组逆转录病毒感染 PC-3 细胞,加入 G418 筛选,第 11 天镜下可见有克隆形成,第 14 天,部分区域已形成肉眼可见克隆。第 17 天,挑取细胞克隆于 24 孔板,扩大培养。

2.3 检测 CD 基因在重组细胞基因组 DNA 中的存在

PCR 证实 PC-3^{CD}有大小符合 1 511 bp 的条带,而 PC-3 未见扩增条带,表明 CD 基因整合到了 PC-3 细胞的基因组(图2)。

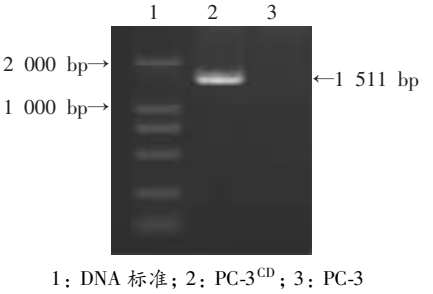


1:DNA 标准; 2:PC-3^{CD}; 3:PC-3

图2 PCR 检测 CD 基因在细胞基因组 DNA 中的存在

2.4 RT-PCR 检测 CD mRNA 的表达

RT-PCR 在 PC-3^{CD}扩增出大小符合 1 511 bp 的条带,而 PC-3 未见扩增条带,表明 PC-3^{CD}细胞有 CD 基因的转录(图3)。

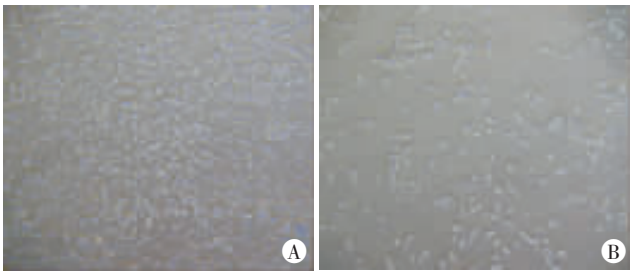


1: DNA 标准; 2: PC-3^{CD}; 3: PC-3

图3 RT-PCR 检测 CD 基因的表达

2.5　自杀基因对前列腺癌细胞的杀伤作用

在培养的 PC-3、PC-3^{CD} 中加入 2 μmol/L 的维甲酸、10 μmol/L 5-FC,次日即可见 PC-3^{CD}生长被抑制,第 4 天可见细胞脱壁死亡,而对照 PC-3 生长旺盛(图 4)。细胞生长曲线见图 5,可见 PC-3^{CD}生长明显被抑制,而 PC-3 生长不受影响,细胞生长抑制率为 87.5%。



A:PC-3;B: PC-3^{CD}

图 4　光镜下观察自杀基因对 AIPC 细胞的杀伤作用　(×100)

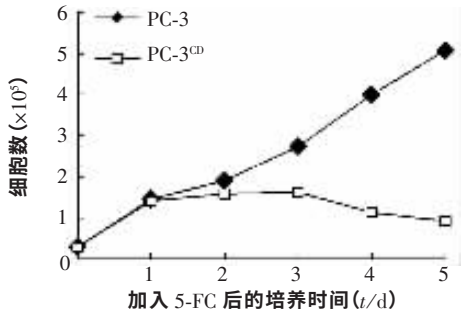


图 5　细胞生长曲线

3　讨论

目前针对 AIPC 治疗的实验研究进展缓慢,尚无明显突破。阻断雄激素受体(AR)基因的表达可在一定程度上抑制前列腺癌细胞的增殖分化,但对于不表达 AR 的前列腺癌细胞无效[3,4]。采用反义 c-myc 等进行的一些实验研究尽管取得了可喜进展[5],但由于目的基因的表达水平低而难以向临床过渡,因此,探索新的治疗方法以走出目前 AIPC 治疗的困境非常有必要,且具有广阔的应用前景。

自杀基因应用到 AIPC 的治疗,关键是找到一种前列腺特异性启动子。如能找到一种前列腺特异性启动子,使其在特定条件下驱动自杀基因,如 CD,则可能带来 AIPC 治疗的突破。前列腺特异性启动子的克隆和改建已进行了一些研究,目前已克隆的启动子有 PSA(前列腺特异性抗原)启动子、PSMA(前列腺特异性膜抗原)启动子、rPB 启动子、Kallikrein 2 等[6]。PSA 启动子需要雄激素-雄激素受体复合物与它的雄激素反应元件(ARE)结合才能起作用,被证实只在雄激素受体(AR)阳性且表达 PSA 的前列腺癌细胞中被激活。PSMA 启动子只在表达 PSMA 的细胞中起作用,而多数 AIPC 细胞表达 PSMA,但研究提示该启动子的转录活性比较弱[7]。rPB 启动子与 PSA 启动子类似,需要雄激素-雄激素受体复合物与它的雄激素反应元件(ARE)结合才能起作用,故只在 AR 阳性细胞中起作用,而对 AR 阴性的 AIPC 则不起作用。

由于有一部分 AIPC 不表达 PSA 或 AR,故 rPB 启动子和 PSA 启动子的应用受限。为了使前列腺特异的启动子能在 AIPC 细胞中起作用,我们对 rPB 启动子进行了改建,使其能在所有类型前列腺癌中发挥调控作用。rPB 启动子 5′端有一个雄激素反应区,决定其前列腺组织特异性,下游有 2 个雄激素反应元件(ARE),我们用维甲酸反应元件(RARE)替换 ARE,构建了 rPB-DR(6)启动子。该启动子保持了前列腺组织特异性,同时可以对维甲酸-维甲酸受体复合物起反应。由于所有的前列腺癌均表达维甲酸受体,在维甲酸存在时,rPB-DR(6)启动子可特异性地在前列腺癌细胞(包括所有类型的 AIPC)中起作用,驱动下游基因表达,故该启动子可用于驱动自杀基因 CD;实验证实该启动子具有前列腺特异性和高效调控能力,其驱动的报告基因可在雄激素依赖和非依赖性前列腺癌中高表达,而在非前列腺癌细胞中不表达[2]。

在本研究中,我们采用 rPB-DR(6)启动子驱动 CD 基因,转导至 AIPC 细胞株 PC-3,在培养基中加入维甲酸和 5-FC 后,PC-3 细胞大量死亡,表明 rPB-DR(6)启动子可在 AIPC 细胞中发挥转录调控作用,能驱动 CD 基因的表达,CD 使 5-FC 转变为 5-FU,通过 5-FU 的作用杀伤 AIPC 细胞。本研究结果为探索激素难治性复发性前列腺癌的治疗提供了实验依据,但尚需进一步研究。

参考文献:

[1] Schrijvers D. Androgen-independent prostate cancer[J]. Recent Results Cancer Res, 2007, 175: 239 - 249.

[2] 张　尧,江　军,王洛夫. 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[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(10): 981 - 984.

[3] Singh P, Uzgare A, Litvinov I, *et al*. Combinatorial androgen receptor targeted therapy for prostate cancer[J]. Endocr Relat Cancer, 2006, 13(3): 653 - 666.

[4] 王洛夫, 江　军, 方玉华, 等. 雄激素受体反义寡核苷酸对前列腺癌细胞生长的抑制作用[J]. 中华泌尿外科杂志, 2003, 24(6): 383 - 385.

[5] Iversen P L, Arora V, Acker A J, *et al*. Efficacy of antisense morpholino oligomer targeted to c-myc in prostate cancer xenograft murine model and a Phase I safety study in humans[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(7): 2510 - 2519.

[6] Essand M. Gene therapy and immunotherapy of prostate cancer: adenoviral-based strategies[J]. Acta Oncol, 2005, 44(6): 610 - 627.

[7] Lee S J, Kim H S, Yu R, *et al*. Novel prostate-specific promoter derived from PSA and PSMA enhancers[J]. Mol Ther, 2002, 6(3): 415 - 421.

(编辑　王　红)