文章编号:1000-5404(2011)11-1115-04

论著

不同活性的 survivin 基因启动子片段的克隆及鉴定

钟 波[1,2*],叶 枫[1*],王 涛[3],姜 帆[1],梁后杰[2],庞学利[2],邹仲敏[1] (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院防化医学教研室[1],西南医院肿瘤科[2],防原医学教研室,全军复合伤研究所[3])

【摘要】 目的 检测 survivin 在成体干细胞等细胞中的表达差异,克隆并比较 3 种不同片段长度 survivin 启动子的活性。**方法** 取成纤维母细胞 $10T_{1/2}$、成肌母细胞 C_2C_{12}、真皮多能干细胞 DMSC、人骨髓间充质干细胞 BMSC、结肠腺癌细胞 HT_{29}、人胚肾母细胞 293FT 进行培养。用 RT-PCR 和免疫细胞化学染色检测 survivin 在成体干细胞和肿瘤细胞中的表达;用基因组 DNA PCR 和分子克隆等方法,构建不同长度的 survivin 基因启动子驱动荧光素酶报告基因表达的载体,经脂质体转染 293FT 细胞,测定相对荧光素酶活性以反映启动子活性。**结果** survivin 基因在正常成体干细胞中低表达,在成肌母细胞中中度表达,在结肠腺癌细胞 HT_{29} 中高表达。克隆了不同片段长度的 survivin 基因启动子,并连接到荧光素酶 cDNA 上游。在 293FT 细胞中,987 bp 和 160 bp 的 survivin 基因启动子活性高于 270 bp 的 survivin 启动子的活性。**结论** survivin 基因启动子由于肿瘤特异性和泛肿瘤表达的特点,可通过载体构建应用于监控和治疗移植后干细胞的恶性转化。用高活性 survivin 基因启动子构建的载体可能会提高其在监控和治疗中的效果。

【关键词】 survivin 基因;启动子;荧光素酶;基因治疗
【中图法分类号】 R394-33;R394.3;R73-3 **【文献标志码】** A

Cloning and identification of survivin gene promoter segments with different activities

Zhong Bo[1,2*], Ye Feng[1*], Wang Tao[3], Jiang Fan[1], Liang Houjie[2], Pang Xueli[2], Zou Zhongmin[1] ([1]Department of Chemical Defense Medicine, [3]Department of Nuclear Medicine, College of Military Preventive Medicine, [2]Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【Abstract】 **Objective** To study the expression of survivin gene in adult stem cells and the activities of 3 cloned survivin gene promoter segments with different lengths. **Methods** Fibroblasts ($10T_{1/2}$), myoblasts (C_2C_{12}), dermal multifunctional cells (DMSC), human bone mesenchymal cells (BMSC), colonic adenoma cells (HT_{29}), and human nephroblasts (293FT) were cultured. Expressions of survivin gene in adult stem cells and tumor cells were detected by RT-PCR with immunochemical staining. Survivin gene promoter vector with different lengths was constructed with luciferase and transfected into 293FT with lipid some. Activity of luciferase reflecting the activity of promotors was assayed. **Results** The survivin gene was mildly expressed in normal adult stem cells, moderately expressed in fibroblasts, and well expressed in colonic adenoma cells (HT_{29}). Survivin gene promoters with different lengths were cloned and linked to the upstream of luciferase cDNA. The activity of 987 bp- and 160 bp-long survivin gene promoters was higher than that of 270 bp-long survivin gene promoter in 293FT. **Conclusion** The survivin gene promoter can be used in monitoring and treatment of the malignant transformation of implanted stem cells by constructing its expression vector because of the tumor-specific and general expression characteristics. The vector constructed with highly active survivin gene promoter can improve the efficacy of gene therapy.

【Key words】 survivin gene; promoter; luciferase; gene therapy

Supported by the National Key Basic Research and Development Plan (973 Program, 2005CB522605), and the Natural Science Foundation of Chongqing (SCTC, 2007BA5011). Zhong Bo and Ye Feng are first authors who contributed equally to the article. Corresponding authors: Zou Zhongmin, E-mail: zouzhmin@yahoo.com; Pang Xueli, E-mail: pangxueli@sohu.com

【基金项目】 国家重点基础研究发展计划(973 计划,2005CB522605);重庆市自然科学基金(SCTC2007BA5011)
* 同等贡献者
【通信作者】 邹仲敏,E-mail:zouzhmin@yahoo.com;庞学利,E-mail:pangxueli@sohu.com

成体干细胞基础研究的快速发展推动其走向临床应用，避免了胚胎干细胞存在着的治疗性克隆技术、医学伦理、移植物排斥等关键问题。但在体外扩增和移植的应用中，成体干细胞恶性转化成了不可避免的问题。恶性化的干细胞生物学特性与肿瘤细胞相似，表现为不受调控，恶性增殖。我们拟选择一种泛肿瘤特异性表达基因的启动子，将其应用到干细胞恶性转化的监控和治疗，研究显示 survivin 基因是比较理想的候选者。Survivin 基因是 1997 年 Ahieri 等发现的一种抗凋亡因子，属于凋亡抑制蛋白（inhibitor of apoptosis protein，IAP）基因家族的一个新成员，定位于人 17 号染色体（17q25），全长 15 kb，含有 4 个外显子和 3 个内含子，转录编码产生 1 个 142 个氨基酸残基组成的蛋白质，同时具有抑制细胞凋亡和调节细胞有丝分裂的双重功能[1-2]。Survivin 基因广泛表达于人的胚胎组织和多种人类常见肿瘤，而在正常成人分化组织中并不表达。在多种肿瘤中 survivin 的表达可作为肿瘤发生的分子标记[3]，也是多种治疗性载体的靶向基因。此外，也有以该启动子调控的肿瘤特异性表达载体应用于肿瘤基因治疗研究当中[4,7-8]。

本研究首先检测了 survivin 在正常干细胞、成肌母细胞和肿瘤细胞中的表达，将克隆得到的不同片段长的 survivin 基因启动子与荧光素酶报告基因载体连接并转染肿瘤细胞，测定相对荧光素酶活性以反映不同片段长的 survivin 基因启动子的活性，为将适宜活性的 survivin 基因启动子应用于干细胞恶性转化的监控和治疗以及肿瘤的靶向性基因治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

成纤维母细胞 $10T_{1/2}$、成肌母细胞 C_2C_{12}、真皮多能干细胞 DMSC、人骨髓间充质干细胞 BMSC、结肠腺癌细胞 HT、人胚肾母细胞 293FT 由第三军医大学防原医学教研室保存。Top10 感受态菌（自制）、pMIR-REPORT System（Ambion）、pMD-18T simple vector 为宝生物工程（大连）有限公司产品。质粒 DNA 抽提试剂盒和凝胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司；λ kb DNA Marker（Bio Flux）；限制性内切酶 *Bam*HⅠ、*Kpn*Ⅰ、*Xba*Ⅰ、*Pst*Ⅰ和 T_4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司；dTNP、*Taq* DNA 聚合酶（博大泰克公司）；荧光素酶检测试剂盒和 β-gal 检测试剂盒（碧云天）；Trizol 试剂、M-MLV 逆转录酶、随机引物、RNAsi nRNA 酶抑制剂、Opti-MEM 和 Lipofectamine2000 脂质体均购自 Invitrogen 公司；小牛血清（Hyclone 公司）、DMEM 培养液（Gibco 公司）、羊抗小鼠 survivin 多克隆抗体（Santa Cruz 公司）、小鼠抗大鼠的 β-Actin 单克隆抗体（Sigma 公司）、辣根过氧化酶标记的驴抗山羊 IgG 和驴抗小鼠 IgG 的抗体（KPL）。其余试剂均为进口分装或国产分析纯。自发荧光检测仪（LumatLB9506，Berthold technology）。

1.2 方法

1.2.1 免疫细胞化学检测 survivin 基因的表达 将上述细胞 12 孔板培养，玻璃爬片，待细胞长至 40% 时，S-P 法检测 survivin 蛋白的表达。肿瘤细胞胞质深棕黄染色为阳性。

1.2.2 RT-PCR 检测 survivin 的表达 采用 Trizol 试剂，按照说明书提取细胞总 RNA，利用逆转录得到的 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增。扩增 survivin 基因的上游引物：5′-TTTCTCAAGGACCACCGCA-3′，下游引物：5′-TTCCAGCTCCTTGAAGCA-3′，片段长度 160 bp。扩增内参 GADPH 的上游引物：5′-TGGGGAAGGTGAAGGTCGG-3′，下游引物：5′-CTGGAAGATGGTGATGGGA-3′，片段长度 233 bp。反应体系为 50 μl，扩增条件为 95 ℃ ×3 min，94 ℃ ×45 s，56 ℃ ×45 s，72 ℃ ×45 s，27 个循环，72 ℃延伸 5 min。

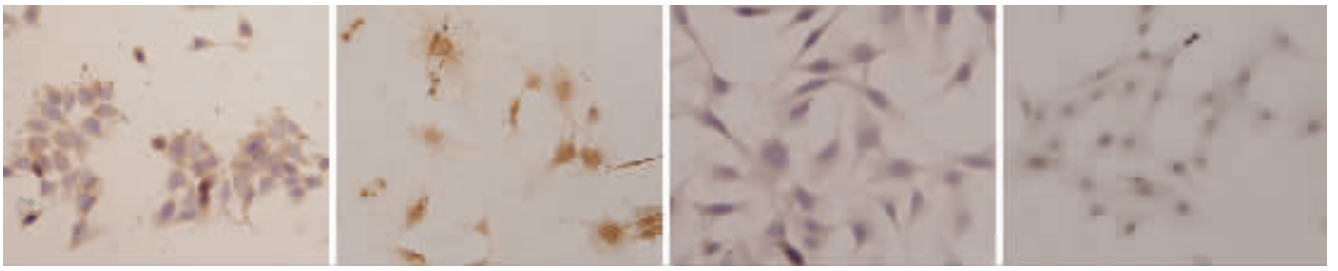
1.2.3 人骨髓间充质干细胞基因组 DNA 的提取 BMSCs 培养于含 100 ml/L 小牛血清的完全 RPMI1640 培养液，置 37℃，50 ml/L CO_2 培养箱。胰蛋白酶消化后离心收集细胞，弃上清，采用经典的酚-氯仿法提取 BMSCs 基因组 DNA。

1.2.4 survivin 基因启动子 PCR 扩增及克隆至 PMD-18T 载体 根据 GenBank 数据库提供的 survivin 基因启动子序列对 survivin 启动子设计扩增引物，上游引物带有 Xho Ⅰ酶切位点（下划线），sp160-S：5′-TGCCTCGAGTACAACTCCCGGCCACAC-3′；sp270-S：5′-TGCCTCGAGCACGCGTTCTTTGAAAGC-3′；sp1k-S 5′-TGCCTCGAGCCTGGCCATAGAACCAGAGAAGTG-3′。下游共同引物带有 *Not*Ⅰ酶切位点（下划线），sp-AS 5′-GCCGCGGCCGCCACCTCTGCCAACG-3′。引物由上海英骏有限公司合成。取正常人骨髓基质细胞的基因组 DNA 1 μl，Pyrobest DNA polymerase 酶 1 μl，10 mmol dNTP 8 μl，0.01 mmol/L 上下游引物各 4 μl，补水到 100 μl。循环参数为 94 ℃预变性 3 min；94 ℃变性 1 min，58 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 90 s，30 个循环；72 ℃延伸 7 min。将 PCR 产物 rTap 处理后 T/A 克隆到 PMD-18T 载体，分别命名为 T-160pSur、T-270pSur 和 T-987pSur，并进行酶切鉴定和测序（由上海英骏公司完成）。

1.2.5 survivin 基因启动子-荧光素酶报告基因表达载体的构建及鉴定 将测序正确的 T-160pSur、T-270pSur 和 T-987pSur 双酶切（*Bam*HⅠ/*Kpn*Ⅰ）后回收含启动子的大片段，将 pMIR-REPORT 质粒双酶切（*Bam*HⅠ/*Kpn*Ⅰ）切下自带的 CMV 启动子后回收大片段骨架，两者作 T_4 连接后产物分别命名为 pMIR-T160、pMIR-T270、pMIR-T987 并行 *Xba*Ⅰ/*Pst*Ⅰ双酶切鉴定。

1.2.6 细胞培养和质粒转染 293FT 细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液，于 37 ℃，5% CO_2 的条件下培养。24 孔板中每孔接种（4～8）×10^4 细胞，培养 24 h 后（细胞生长至 80%～90% 融合度），报告质粒 DNA（200 ng/孔）与带有 CMV 启动子的内参质粒 pMIR-REPORT β-Gal control plasmid（200 ng/孔）进行脂质体介导的 DNA 共转染。转染 6 h 后用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液替换无血清培养液。48 h 后裂解细胞离心收获上清。

1.2.7 荧光素酶活性的测定 采用碧云天的荧光素酶活性检测试剂盒及 β-Gal 半乳糖苷酶检测试剂盒测定细胞裂解液荧光素酶（Luc）和 β-半乳糖苷酶（β-Gal）的活性，后者的活性反映每孔细胞的转染效率。荧光素酶的相对活性以 Luc/β-Gal 的比值来进行比较。每次转染实验转 3 个孔，至少重复 3 次转染实验，所选结果是 3 次实验中典型的 1 次。



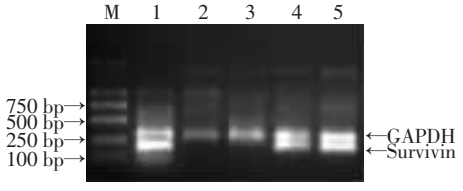
A：HT_{29}；B：$10T_{1/2}$；C：DMSC；D：BMSC

图 1　免疫细胞化学检测 survivin 基因在不同细胞中的表达　（×200）

2　结果

2.1　免疫组化和 RT-PCR 检测 survivin 基因的表达

细胞质中棕黄色颗粒可以反映 survivin 蛋白表达。结果显示，在正常干细胞和肿瘤细胞中 survivin 表达明显有差异。Survivin 基因在结肠腺癌细胞中呈高表达（图 1A），在成肌母细胞和成纤维母细胞（图 1B）中有中等强度的表达，在真皮多能干细胞（图 1C）和骨髓间充质干细胞（图 1D）中低表达。RT-PCR 检测 survivin mRNA 的水平，显示结果与免疫组化一致（图 2）。

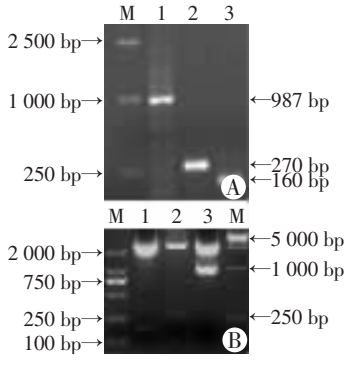


M：DNA 标准；1：HT29；2：BMSC；3：DMSC；4：$10T_{1/2}$；5：C2C12

图 2　RT-RCR 检测 Survivin 基因表达

2.2　3 种不同片段长的 survivin 启动子的 PCR 扩增、TA 克隆及酶切鉴定

以正常人的骨髓间充质干细胞基因组 DNA 为模板，经 PCR 扩增获得不同片段长的 survivin 启动子。PCR 产物电泳图分别示 3 种不同长度的 survivin 启动子，分别为 160、270 bp 和 987 bp（图 3A）。TA 克隆后得到 T-160pSur、T-270pSur 和 T-987pSur 质粒，经 *Xho* Ⅰ/*Not* Ⅰ 双酶切后，电泳可见相应的插入启动子（图 3B）。上述 3 个质粒经测序确认包含的 survivin 启动子的序列与 GenBank 中的序列一致。其中 T-987pSur 质粒经反向测序结果正确。

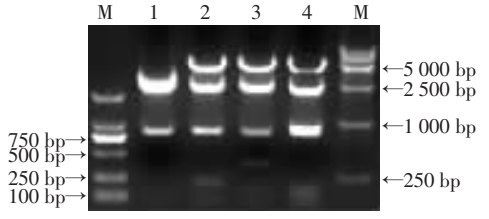


A：PCR 扩增的 survivin 启动子的电泳鉴定（M：DNA 标准；1：987pSur；2：269pSur；3：160pSur）；B：survivin 启动子 TA 克隆的双酶切鉴定（M：DNA 标准；1：T-160pSur；2：T-269pSur；3：T-987pSur）

图 3　不同片段长度 survivin 启动子克隆酶切鉴定

2.3　survivin 基因启动子-荧光素酶报告基因表达载体构建及鉴定

为确定不同片段长的 survivin 基因启动子的活性，我们用 *Bam*H Ⅰ/*Kpn* Ⅰ 将 T-160pSur、T-270pSur 和 T-987pSur 质粒片段化。*Bam*H Ⅰ/*Kpn* Ⅰ 将 pMIR REPORT Luciferase 质粒双酶切，切下 CMV 启动子（约 600 bp），代之以不同片段长度 survivin 基因启动子来驱动荧光素酶的表达。pMIR-REPORT Luciferase 质粒和 pMIR-T160、pMIR-T270、pMIR-T987 质粒经 *Xba* Ⅰ/*Pst* Ⅰ 双酶切后可见到插入不同启动子片段形成的 199、303 bp 和 1 030 bp［(133 + 897) bp］以及载体的共同片段 5 181、2 493、800 bp 和 62 bp（图 4），与预期结果一致。

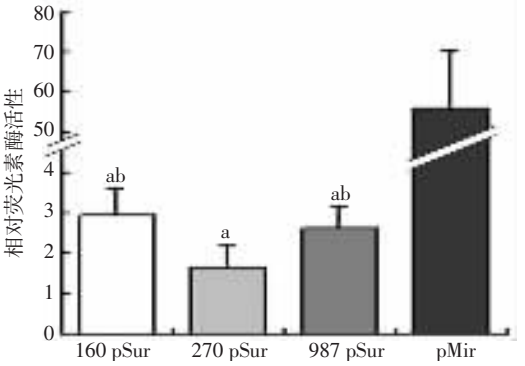


M：DNA 标准；1：pMir；2：pMir-T160；3：pMir-T269；4：pMir-T987

图 4　Survivin 启动子驱动荧光素酶表达的质粒的酶切鉴定

2.4　不同长度 survivin 启动子在多种肿瘤细胞株中的活性研究

图 5 示 160、270 bp 和 987 bp 的 survivin 启动子在 293FT 中都表现出较高的活性，提示该启动子中的起始密码子 ATG 上游 160 bp 片段中即存在起重要转录激活作用的反应元件。270 bp 启动子活性较 160 bp 和 987 bp 启动子活性低提示在 ATG 上游 160 ~ 270 bp 可能存在负调节作用的元件。对照质粒的 CMV 启动子活性在 293FT 中显著高于 survivin 启动子，这与其高活性的 CMV 启动子相吻合。



a：$P < 0.05$，与 pMir 相比，b：$P < 0.05$，与 270 pSur 相比

图 5　报告基因载体转染 293FT 细胞后荧光素酶分析

3 讨论

目前已有多种肿瘤特异启动子应用于肿瘤靶向治疗中[9-10]，我们欲借鉴相关技术，寻找一种合适的启动子，用来驱动能清除恶性转化的成体干细胞基因。AFP启动子可以用于治疗肝癌细胞，PSA启动子或ratprobasin启动子可以用于治疗前列腺癌，酪氨酸酶启动子/增强子可以用于治疗黑色素瘤等[11-12]，上述特异性的启动子可调控外源基因表达从而杀伤靶细胞。但是，由于多能成体干细胞的恶性转化同时具有多组织性，上述启动子只能针对特异性表达该启动子基因的恶性细胞，限制了其应用范围。Survivin基因启动子不仅具有肿瘤特异性，也具有泛肿瘤表达的特点。此外，我们的实验结果显示survivin基因在成体干细胞低表达于肿瘤细胞，这与文献[13-14]报道一致。因此，survivin基因启动子对于我们构建治疗性载体是一个很好的选择。

据Li等[15]对1.4 kb长survivin基因启动子序列分析发现，起始密码子ATG上游250 bp区域内有少TATA盒，多GC框的特点。该区域含有两个重要转录起始位点以及多个sp1、细胞周期依赖性元件(CDE)和细胞周期同源性区域(CHR)等重要的转录结合位点存在，结合在Hela细胞中对不同片段长的survivin启动子比较的结果，作者认为ATG上游250～230 bp区域为survivin基因启动子活性的基本区，该区片段缺失将导致启动子活性不同程度降低。我们的实验结果显示在293FT细胞中160bp survivin启动子并不比269 bp活性低，与Li等[15]结论不符，这可能由于两个启动子在不同细胞中所表现出的活性差异所致。987 bp survivin启动子较269 bp有更高的活性，这与Li等[15]结论相符，说明987～270 bp间有对启动子起正调节作用的元件存在。此外，Li等也在对正常组织及肿瘤组织的survivin基因启动子分析发现，它们含有的CpG岛均未甲基化。也有研究者在卵巢细胞[16]及口腔上皮细胞的癌旁正常组织[17]发现survivin基因启动子CpG岛呈甲基化，但更多的研究结果[18]与Li等[15]结果一致，说明在组织中survivin基因启动子CpG岛未甲基化的普遍性。CpG岛甲基化的基因通常活性很低，不受调控，而带有未甲基化CpG岛的基因与非必须表达的基因相比具有潜在的组织或发育阶段特异性活性[19]。其他的调控机制如组蛋白修饰，染色质重组和非编码RNA等可能对survvin基因调控也有重要影响。

survivin基因启动子因其在多数恶性肿瘤中特异性表达的特点使其成为一个在肿瘤基因治疗中很有潜力的启动子，也对相关的如干细胞恶性转化的研究提供了思路。通过我们的实验，在3种不同片段的survivin启动子中找到了两个较高活性的启动子987、160 bp。下一步，根据成体干细胞应用的组织学特异性，选用适宜活性的survivin基因启动子驱动杀伤恶性转化细胞的基因表达，将可能对恶性转化的干细胞有监控和自我清除作用。

参考文献：

[1] Ambrosini G, Adida C, Altieri D C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997, 3(8): 917-921.

[2] Li F, Ambrosini G, Chu E Y, *et al*. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin[J]. Nature, 1998, 396(6711): 580-584.

[3] Li F. Survivin study: what is the next wave? [J]. J Cell Physiol, 2003, 197(1): 8-29.

[4] Ryan B M, O'Donovan N, Duffy M J. Survivin: a new target for anticancer therapy[J]. Cancer Treat Rev, 2009, 35(7): 553-562.

[5] 李庆霞，王娟，赵文清，等. RNA干扰survivin基因增强SKBr-3细胞对多柔吡星敏感性的体外研究[J]. 第三军医大学学报，2010，32(11)：1158-1161.

[6] 杜虎，吴小侯，罗春丽，等. shRNA沉默survivin基因对人膀胱移行细胞癌T24细胞生物学行为的影响[J]. 第三军医大学学报，2009，31(2)：124-127.

[7] 孙萍胡，吴云林，董文杰，等. Survivin启动子介导自杀基因与突变体融合基因真核表达载体的构建[J]. 世界华人消化杂志，2009，17(11)：1085-1090.

[8] 白万胜，成诗银，王军利，等. survivin基因启动子驱动的肿瘤特异性腺病毒载体的构建[J]. 陕西医学杂志，2008，37(8)：959-961.

[9] 黄玉，杨波，迟小华，等. 真核生物启动子的研究及应用[J]. 生物技术通讯，2010，21(2)：275-279.

[10] Nettelbeck D M, Jerome V, Muller R. Gene therapy: designer promoters for tumour targeting[J]. Trends Genet, 2000, 16(4): 174-181.

[11] Lo H W, Day C P, Hung M C. Cancer-specific gene therapy[J]. Adv Genet, 2005, 54: 235-255.

[12] Haviv Y S, Curiel D T. Conditional gene targeting for cancer gene therapy[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 53(2): 135-154.

[13] Altieri D C. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer[J]. Oncogene, 2003, 22(53): 8581-8589.

[14] Fukuda S, Pelus L M. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues[J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(5): 1087-1098.

[15] Li F, Altieri D C. Transcriptional analysis of human survivin gene expression[J]. Biochem J, 1999, 344 Pt 2: 305-311.

[16] Hattori M, Sakamoto H, Satoh K, *et al*. DNA demethylase is expressed in ovarian cancers and the expression correlates with demethylation of CpG sites in the promoter region of c-erbB-2 and survivin genes[J]. Cancer Lett, 2001, 169(2): 155-164.

[17] Tanaka C, Uzawa K, Shibahara T, *et al*. Expression of an inhibitor of apoptosis, survivin, in oral carcinogenesis[J]. J Dent Res, 2003, 82(8): 607-611.

[18] 胡华梅，杨晓亚，熊刚，等. 食管鳞状细胞癌survivin表达与其CpG岛甲基化的研究[J]. 第三军医大学学报，2010，32(1)：13-15.

[19] Lewin B. Gene Ⅷ[M]. 8th ed, Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall, 2004: 620-621.

(收稿 2010-11-29 修回 2011-02-06)

(编辑 龙 亮)