基础研究 文章编号:0253-3626(2009)02-0168-06

肿瘤特异性 hTERT 启动子与 Survivin 启动子在肺癌 A549 细胞中的转录活性研究

李奕璇,陈 全,朱大冕
(重庆医科大学基础医学院免疫学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:比较不同长度的 hTERT 启动子以及 Survivin 启动子在肺癌 A549 细胞中的启动活性,为肺癌靶向性基因治疗提供依据。方法:用 PCR 法扩增 1 084 bp hTERT 启动子、980 bp Survivin 启动子和红色荧光蛋白基因;在真核表达质粒 pGL3-hTERT 基础上分别构建 3 种启动子调控的、以红色荧光蛋白 CDS 为目的基因的真核表达质粒 pGL-H-RED、pGL-LH-RED 和 pGL-S-RED。将重组质粒用脂质体分别转染 A549 和 MRC-5 细胞,72 h 后用 Imagepro-Plus6.0 分析 3 种启动子在相同时间内启动红色荧光蛋白的表达水平。结果:重组质粒在 A549 细胞中观察到了红色荧光,在 MRC-5 细胞中无红色荧光。pGL-S-RED 质粒在 A549 细胞中表达最强,pGL-LH-RED 次之,pGL-H-RED 最弱,3 种质粒在 A549 细胞中的荧光强度(IOD)分别为 201.17、171.70 和 136.34。结论:所克隆的 hTERT 启动子和 Survivin 启动子均表现出肿瘤特异性,其中 Survivin 启动子在肺癌 A549 细胞中具有最好的启动效应,可望开发成为肺癌靶向性基因治疗工具。

【关键词】人端粒酶逆转录酶;survivin 基因;启动区(遗传学);肺癌;基因疗法
【中国图书分类法分类号】R734.2;Q7 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-06-11

Study on transcriptional activities of tumor-specific hTERT and survivin promoter in human lung cancer A549 cell line

LI Yi-xuan, et al
(*Department of Immunology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objectives*: To compare the transcriptional activities of tumor-specific hTERT promoters and survivin promoter in human lung cancer A549 cells, in order to lay some groundwork for targeting gene therapy in human lung cancer. *Methods*: The 1 084 bp fragment of hTERT promoter and 980bp survivin promoter from A549 cells were acquired by PCR amplification. The eukaryotic expression plasmids (pGL-H-RED, pGL-LH-RED and pGL-S-RED) which have Red Fluorescin reporter gene(Red) and are modulated by 263 bp hTERT promoter, 1084bp hTERT promoter and 980bp survivin promoter respectively were constructed based on the pGL3-hTERT which has 263bp hTERT promoter from HepG2 cells. These recombinant plsmids were transfected into A549 and MRC-5 cells with liposome. After 72 hours, the expression level of red fluorescin target protein modulated by 3 promoters at the same time was analyzed by Imagepro-Plus6.0 software. *Results*: The red fluorescin target protein was observed in transfected A549 cells, but there was no red fluorescence in transfected MRC-5 control cells. The pGL-S-RED had the highest expression activity in A549 cells and the strength rate(IOD) of red fluorescence of A549 cells transfected by pGL-S-RED, pGL-LH-RED and pGL-H-RED were 201.17, 171.70, and 136.34 respectively. *Conclusion*: Our data reveals that the cloned hTERT and survivin promoter are tumor-specific, and the survivin promoter has the highest transcriptional activities in lung cancer A549 cells, and may serve as a useful tool for transcriptional targeting gene therapy of human lung cancer.

【Key words】hTERT; Survivin gene; Promoter; Lung cancer; Gene therapy

利用组织和细胞特异性启动子调控目的基因在靶细胞中特异性表达,是解决基因治疗靶向性的有效途径之一。研究表明,端粒酶在胚胎细胞及肺癌等多种肿瘤细胞中活性增高,而相应正常组织细胞中是失活的或呈低活性,端粒酶活性与 hTERT (human telomerase reverse transcriptase)呈正相关;Survivin 蛋白在胚胎组织和多种肿瘤组织内表达,而在大多数终末分化的成人组织中不表达。hTERT

作者介绍:李奕璇(1975-),女,硕士,
研究方向:恶性肿瘤的靶向性基因治疗。
通讯作者:陈 全,男,副教授,E-mail: quanchen@tom.com。

启动子和 Survivin 启动子只在肿瘤细胞中具有转录活性，可作为抗肿瘤基因的调控元件，以启动下游抗肿瘤基因特异性表达于肿瘤细胞，而避免对正常细胞的损伤[1,2]。本研究克隆了 hTERT 启动子的两个片段（1 084 bp 及 263 bp）以及 Survivin 启动子片段（980 bp），插入到 pGL3-basic 质粒中，以红色荧光蛋白基因为报告基因，比较其在肺癌细胞中的表达水平，探索肿瘤特异性启动子用于肺癌靶向性治疗的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 重组 pGL3-hTERT 质粒[3]，由本校感染性疾病重点实验室黄爱龙教授惠赠，该质粒是在 pGL3-Basic（4818bp）质粒的 *Sac* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ限制性酶切位点间克隆了 HepG2 细胞来源的 263 bp hTERT 启动子基因片段；pDs Red1-C1 质粒为 clontech 公司产品，该质粒含有红色荧光蛋白编码基因，即 DsRed1 基因（简称 Red 基因），由本室收藏；Top10 大肠杆菌由本室收藏。

1.1.2 细胞株 人肺腺癌 A549 细胞株、人胚肺成纤维细胞 MRC-5 细胞株由本室收藏。

1.1.3 主要试剂 RPMI1640 培养基及胎牛血清购自美国 Gibco 公司；真核转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。Prime STAR HS 高保真耐热 DNA 聚合酶、TaKaRa LA Taq with GC Buffer 耐热 DNA 聚合酶、dNTP、各种限制性内切酶、DNA 分子量 Marker（DL2000、DL15000）、真核细胞基因组提取试剂、质粒提取试剂、DNA 连接试剂、胶回收试剂、反应产物回收试剂等购自大连 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 pGL-H-RED 质粒的构建及鉴定 根据 pDsRed1-C1 序列（606~1290）设计 1 对引物，上游引物 R1: 5'-CCGCTC-GAG-CGCCACCATGGTGCGCTCCT-3'；下游引物 R2: 5'-GCT CTAGA-TTACAGGAACAGGTGGTGGCGGC-3'，以上引物分别含有 *Xho* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ限制性酶切位点。以 pDsRed1-C1 质粒为模板，用 Prime STAR HS DNA 聚合酶扩增 Red 基因片段，反应条件为：94℃预变性 5 min、94℃变性 1 min、60℃退火 50 s、72℃延伸 50 s，共 30 个循环，72℃延伸 10 min。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳后，用胶回收试剂回收 PCR 产物中 685 bp 片段。用 *Xho* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切回收的 PCR 产物，用反应产物回收试剂提纯回收酶切产物。用 *Xho* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切 pGL3-hTERT 质粒，酶切混合物经 1%琼脂糖凝胶电泳后，用胶回收试剂回收载体 3 371 bp 大片段（去掉其启动子下游的 1 710 bp"luc+"基因）。分别取上述 Red 基因片段 8 μl（0.8 μg）、大片段 2 μl（0.1 μg）、连接试剂Ⅰ10 μl，组成 20 μl 连接反应体系，16℃，1 h。将连接反应液转化感受态 Top10 大肠杆菌，涂布于含 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养板上，37℃过夜培养，次日挑取单克隆，经培养后提取质粒，命名为 pGL-H-RED（图 1），经 *Xho* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切鉴定后，由大连 TaKaRa 公司对"Red 基因"作序列测定。

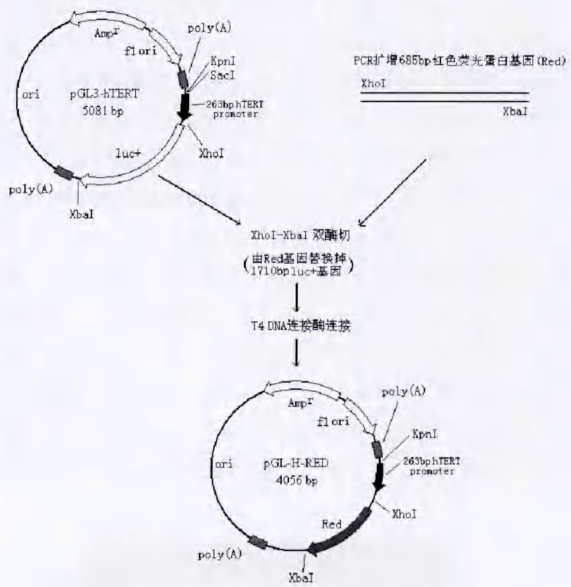


图 1 pGL-H-RED 质粒构建示意图

1.2.2 pGL-LH-RED 质粒的构建及鉴定 根据 GenBank（AF097365:2871~3954）所报道序列设计 1 对引物，上游引物 LH1:5'-GGGGTACC-AGTCTGGATTCCTGGGAAGT-3'；下游引物 LH2:5'-CGCTCGAG-GACGCAGCGCTGCCTGAAAC TCGC-3'，以上引物分别含有 *Kpn* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ限制性酶切位点。以 A549 细胞基因组 DNA 为模板，用 LA TaqTM DNA 聚合酶扩增 1 084 bp hTERT 启动子基因片段。反应条件为：94℃预变性 5 min、94℃变性 1 min、60℃退火 1min、72℃延伸 1 min，共 30 个循环，72℃延伸 10 min。反应混合物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳后，用胶回收试剂回收 PCR 产物中 1 084 bp A549 细胞来源的 hTERT 启动子基因片段（简称 LH 基因片段）。用 *Kpn* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切 pGL-H-RED 质粒，用胶回收试剂回收 3793bp pGL-H-RED 质粒大片段（去除了 263 bp HepG2 细胞来源的 hTERT 启动子）；用 *Kpn* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切"LH 基因"片段，用反应产物回收试剂提纯回收酶切产物。将上述两种回收产物连接、转化并挑取单克隆，经培养后提取质粒，命名为 pGL-LH-RED 质粒，经 *Kpn* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切鉴定后，由大连 TaKaRa 对克隆的"LH 基因"片段作序列测定。

1.2.3 pGL-S-RED 质粒的构建及鉴定 根据 GenBank（U75285:1821~2800）所报道序列，设计 1 对引物。上游引物 SU1:5'-GGGGTACC-CTGGCCATAGAACCAGAGAAGTGA-3；下游引物 SU2:5'-CCGCTCGAG-CCACCTCTGCCAACGGG TCCCGCG-3'，以上引物分别含有 *Kpn* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ限制性酶切位点。以 A549 细胞基因组 DNA 为模板，用 LA TaqTM DNA 聚合酶扩增 980 bp Survivin 启动子基因片段。反应条件为：94℃预变性 5 min、94℃变性 1 min、60℃退火 1 min、72℃延

伸 1 min，共 30 个循环，72℃延伸 10 min。反应混合物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后，用胶回收试剂回收 PCR 产物中 980 bp Survivin 启动子基因片段。用 *Kpn* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切 pGL-H-RED 质粒，用胶回收试剂回收 3 793 bp pGL-H-RED 质粒大片段；用 *Kpn* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切 Survivin 启动子基因片段，用反应产物回收试剂提纯回收酶切产物。将上述两种回收产物连接、转化并挑取单克隆，经培养后提取质粒，命名为 pGL-S-RED 质粒，经 *Kpn* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切鉴定后，由大连 TaKaRa 对克隆的“Survivin 启动子基因”作序列测定。

1.2.4　质粒转染及表达　分别复苏 A549 细胞和 MRC-5 细胞，培养在含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液中；转染前 1 d，将细胞悬液接种到 24 孔板上（1×10^5 个/孔），于 37℃、5% CO_2 恒温培养箱中培养 24 h 后，细胞株生长至对数生长期（85%融合度），用脂质体分别将 pGL-H-RED、pGL-LH-RED、pGL-S-RED 和 pDsRed1-C1 质粒转化上述 2 种细胞，其中 pDsRed1-C1 质粒为研究转化率及阳性表达的对照质粒，均作复孔，质粒用量为 1 μg/孔。转染过程严格按 Lipofectamine 2000 说明书进行。转染 72 h 后在荧光显微镜下观察红色荧光蛋白的表达情况、拍照。实验重复 3 次。

1.2.5　转录活性分析　用 Imagepro-Plus6.0 分析上述质粒分别转化 A549 细胞和 MRC-5 细胞后的荧光照片，通过计算每个具有荧光的细胞的平均积分光密度（Integrated optical density，IOD）间接比较 3 种肿瘤特异性启动子启动红色荧光蛋白基因的表达水平。

2　结　果

2.1　PCR 扩增红色荧光蛋白（Red）CDS

以 pDsRed1-C1 质粒为模板、R1 和 R2 为引物，PCR 扩增得到的产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳分析可见大小约 685 bp 的 DNA 条带（图 2），与预期结果相符。

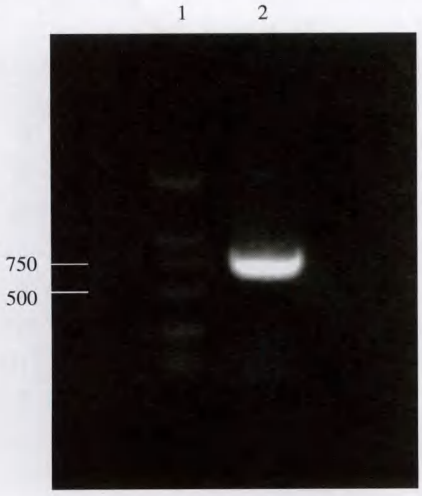


图 2　PCR 扩增 Red 基因片段

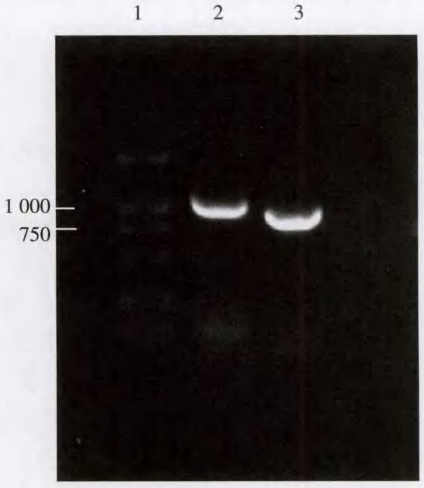


图 3　PCR 扩增 A549 细胞来源的 hTERT 启动子和 Survivin 启动子基因片段

2.2　PCR 扩增 hTERT 启动子和 Survivin 启动子

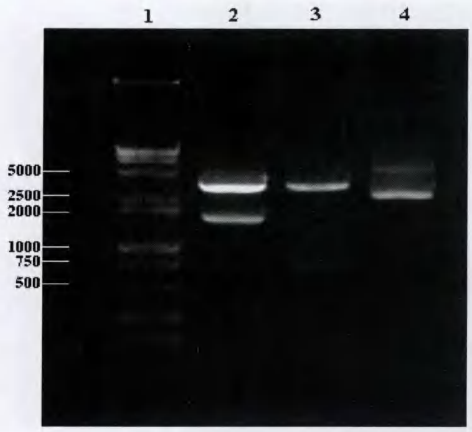
以肺癌 A549 细胞基因组 DNA 为模板，以 LH1 和 LH2 为引物，PCR 扩增得到的产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳分析可见大小约 1 084 bp 的 DNA 条带（图 3），与 hTERT 启动子预期大小相符；以肺癌 A549 细胞基因组 DNA 为模板，以 SU1 和 SU2 为引物，PCR 扩增得到的产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳分析可见大小约 980 bp 的 DNA 条带（图 3），与 Survivin 启动子预期大小相符。

2.3　重组 pGL-H-RED 质粒的酶切鉴定和 DNA 序列分析结果

用 *Xho* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切 pGL-H-RED 质粒后，经 1%琼脂糖凝胶电泳，可见大小约 3 371 bp 的载体大片段和 685 bp 的 Red 基因小片段；而 pGL3-hTERT 质粒只有 3371 bp 载体大片段和 1 710 bp luc+基因片段，结果与预期相符（图 4）。以 pGL3-Basic 质粒的通用测序引物分析重组 pGL-H-RED 质粒中 Red 基因序列表明：Red 基因 CDS（685 bp）与 CLONTECH 公司公布的 pDsRed1-C1（PT3425-5）质粒的 DsRed1 序列完全一致。

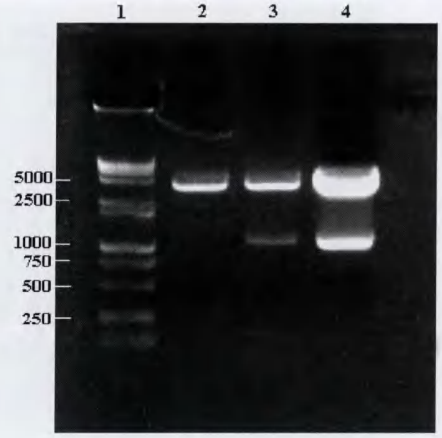
2.4　重组 pGL-LH-RED 质粒的双酶切鉴定及 DNA 序列分析结果

重组 pGL-LH-RED 质粒经 *Kpn* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切后，经 1%琼脂糖凝胶电泳，可见大小约 3 793 bp



1. DNA marker (DL2000+DL15000);
2. pGL3-hTERT 质粒经 *Xho* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切;
3. pGL-H-RED 质粒经 *Xho* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切;
4. 完整的 pGL-H-RED 质粒

图 4 重组 pGL-H-RED 质粒双酶切鉴定



1. DNA marker (DL2000+DL15000);
2. pGL-H-RED 质粒经 *Kpn* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切;
3. pGL-LH-RED 质粒经 *Kpn* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切;
4. pGL-S-RED 质粒经 *Kpn* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切

图 5 重组 pGL-LH-RED 及 pGL-S-RED 质粒双酶切鉴定

的载体大片段和 1 084 bp 的 hTERT 启动子基因小片段;而 pGL-H-RED 质粒只有约 3 793 bp 载体大片段和 263 bp hTERT 启动子基因小片段,结果与预期相符(图 5)。DNA 测序结果显示,所克隆的 1 084 bp hTERT 启动子基因序列与 GenBank (AF097365: 2871~3954)报道的序列完全一致。

2.5 重组 pGL-S-RED 质粒的双酶切鉴定及 DNA 序列分析结果

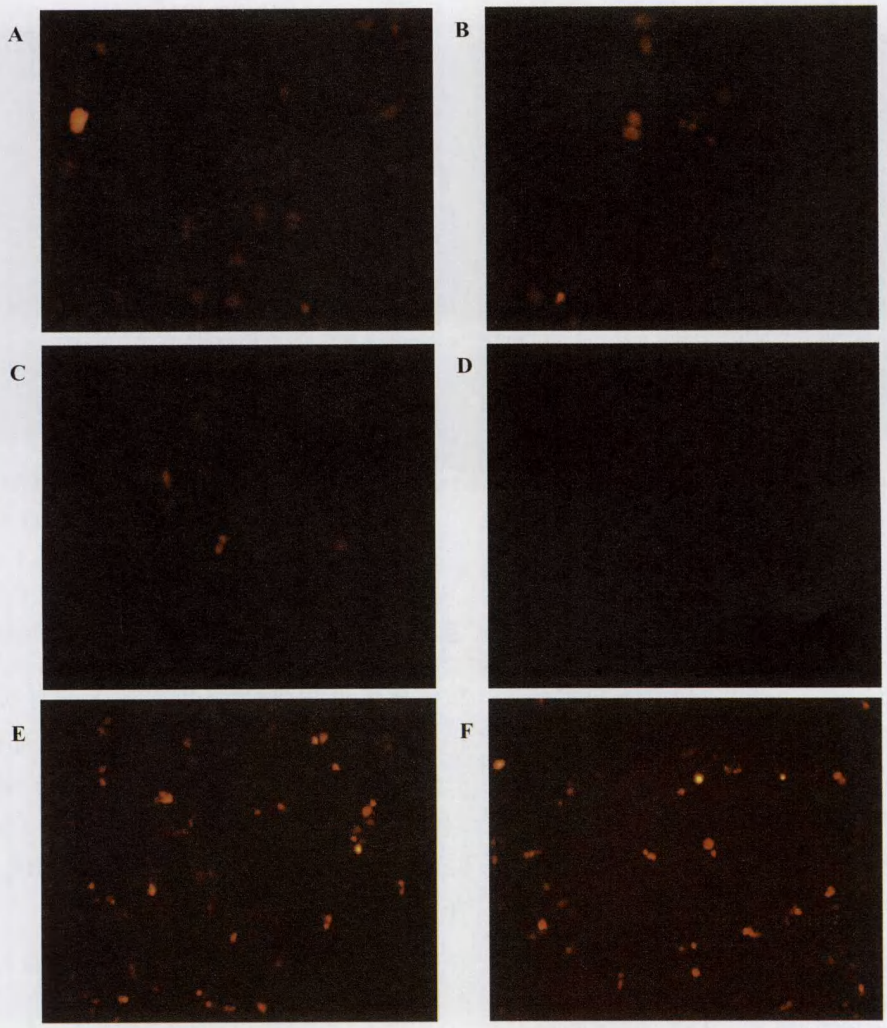
重组 pGL-S-RED 质粒经 *Kpn* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切后,经 1%琼脂糖凝胶电泳,可见大小约 3 793 bp 的载体大片段和 980 bp 的 Survivin 启动子基因小片段;而 pGL-H-RED 质粒只有约 3 793 bp 载体大片段和 263 bp hTERT 启动子基因小片段,结果与预期相符(图 5)。DNA 测序结果显示,所克隆的 980 bp Survivin 启动子基因序列与 GenBank (U75285: 1821~2800)报道的序列完全一致。

2.6 肿瘤特异性启动子调控表达活性检测

重组质粒 pGL-H-RED、pGL-LH-RED 和 pGL-S-RED 转化 A549 细胞和 MRC-5 细胞 72h 后,在荧光显微镜下可见 3 种质粒转化的 A549 细胞呈现出强度不同的红色荧光,其中 pGL-S-RED 红色荧光最强、pGL-LH-RED 次之、pGL-H-RED 荧光最弱;3 种质粒转化的 MRC-5 细胞均没有红色荧光。对照质粒(pDsRed1-C1 质粒)转化 2 种细胞后均出现较强的红色荧光(图 6)。用 Imagepro-Plus6.0 软件分析不同启动子启动红色荧光表达的强度(表 1),结果表明:3 种肿瘤特异性启动子所调控的真核表达质粒在肺癌 A549 细胞中均启动了表达,其中 Survivin 启动子在 A549 细胞中具有相对较强的肿瘤特异性启动活性,但其在肺癌 A549 细胞中的启动能力低于 pDsRed1-C1 质粒中的 CMV 启动子,Survivin 启动子启动活性约为 CMV 启动子的 76.26%。

3 讨 论

近年来,肿瘤的基因治疗已成为肿瘤防治研究的一个热点,基因治疗能否成功应用于临床实践的关键问题是能否提高治疗基因的靶向性和表达效率,以保证治疗的安全性和有效性。hTERT 是端粒酶催化亚单位,与端粒酶活性呈正相关。研究表明,正常体细胞中不含 hTERT,但肿瘤细胞等永生化细胞中含有 hTERT[4]。由于 hTERT 仅在肿瘤等具有端粒酶活性的细胞中表达,也即在这些细胞中存在 hTERT 启动子的活性,因此可用 hTERT 启动子调控自杀基因等抗肿瘤基因在肿瘤组织中特异性表达并特异地作用于肿瘤细胞。Survivin 是 1997 年由 Ambrosini 等发现的一种具有肿瘤特异性表达的细胞凋亡抑制因子[5]。Survivin 蛋白与肺癌组织病理分级、TNM 分期、淋巴结转移、预后、P53 蛋白过表达呈正相关,说明 Survivin 蛋白的表达预示肿瘤有较高的侵袭性和不良预后[6]。Bao 等[7]证实,Survivin 蛋白在肿瘤组织中的表达调控是发生在转录水平,Survivin 基因的启动子是一种肿瘤特异性启动子,



A. pGL-S-RED 质粒转染 A549 细胞；B. pGL-LH-RED 质粒转染 A549 细胞；
C. pGL-H-RED 质粒转染 A549 细胞；D. pGL-S-RED 质粒转染 MRC-5 细胞；
E. pDsRed1-C1 质粒转染 A549 细胞；F. pDsRed1-C1 质粒转染 MRC-5 细胞

图 6　荧光显微镜下观察转染后的 A549 和 MRC-5 细胞系（×100）

表 1　红色荧光蛋白表达细胞的平均 IOD

No*		pGL-H-RED+ A549	pGL-LH-RED+ A549	pGL-S-RED+ A549	pDsRed1-C1+ A549
1	IOD/cel**	141.94	168.61	220.78	285.73
2	IOD/cell	127.63	186.81	197.42	263.49
3	IOD/cell	139.46	159.67	185.32	242.14
平均 IOD		136.34	171.70	201.17	263.79

注：* No 重复实验次数；** IOD/cell 每个表达红色荧光蛋白细胞的平均积分光密度

能够选择性地在肺癌组织中激活其后的外源基因的转录，从而实现对治疗基因在肺癌细胞中的选择性表达。

我们采用 PCR 法、以肺癌 A549 细胞基因组为模板、扩增了位于转录起始点上游-1 126 bp 到-43 bp 的 1 084 bp 的 hTERT 启动子基因片段（AF097365：2871~3954），并将其克隆到 pGL3-hTERT 质粒中，替代原有的 263 bp 的 HepG2 细胞来源的 hTERT 启动子。经测序证实，所克隆的 1 084 bp hTERT 启动子序列与 GenBank（AF097365）中的序列完全一致，pGL3-hTERT 质粒中的 263 bp hTERT 启动子序列（AF325900：1835~2097）与所扩增的 1 084 bp 启动

子同源,1 084 bp 启动子包含 263 bp(AF097365:3684~3946)序列。结果表明,从人肺癌 A549 细胞克隆得到的 hTERT 启动子序列与肝癌 HepG2 细胞克隆得到的 hTERT 启动子的相对应片段的序列完全相同,hTERT 启动子在不同肿瘤中具有高度保守性,与文献报道一致[3]。由于 hTERT 启动子和 Survivin 启动子序列 GC 含量较高,我们在 PCR 过程中采用了 TaKaRa 公司生产的针对高 GC 含量 DNA 模板的 LA Taq 聚合酶和 GC Buffer。

启动子启动活性研究最常用的方法是用荧光素酶为报告基因检测,该方法所用质粒包括:pGL3-Basic 及 pRL-tk,前者为无启动子的含有虫荧光素酶(Luciferase,Luc)基因的质粒,后者为含有 tk 启动子控制的海洋腔肠荧光素酶基因(Renillaluciferase,RL)的质粒,在 pGL3-Basic 基础上克隆进启动子序列后,与 pRL-tk 共转染靶细胞后,用双荧光检测系统测定转染细胞裂解液中 Luc 和 RL 活性,后者的活性反映每孔细胞的转染效率,启动子的相对活性以 Luc/RL 的比值来表示[3]。该方法尽管准确可靠,但是该法涉及质粒较多、测定酶活性受检测试剂及仪器的限制,并且是间接反应启动水平、不直观。

为了研究不同长度的 hTERT 启动子和 Survivin 启动子用于肺癌靶向性基因治疗的可能性,我们将 pGL3-hTERT 质粒的 luc 基因(荧光素酶基因)替换成红色荧光蛋白基因,构建成 pGL-H-RED 质粒,用 A549 细胞来源的 1 084 bp hTERT 启动子和 980 bp Survivin 启动子替换 pGL-H-RED 质粒中 263 bp HepG2 来源的 hTERT 启动子,分别构建成 pGL-LH-RED 和 pGL-S-RED。通过脂质体将 pGL-H-RED、pGL-LH-RED 和 pGL-S-RED 质粒转入正常 MRC-5 细胞和肺癌 A549 细胞中,通过红色荧光蛋白的表达来研究 3 种启动子在上述细胞中的转录活性。结果显示,我们克隆的 hTERT 启动子和Survivin 启动子在对照细胞 MRC-5 中无转录活性,而在肺癌 A549 细胞中表达了红色荧光蛋白,3 种启动子均表现出了肿瘤特异性。以 pDsRed-C1 质粒为对照质粒,通过 Imagepro-Plus6.0 软件分析 A549 细胞转染 72 h 的蛋白表达水平,结果表明,Survivin 启动子在 A549 细胞中启动表达的红色荧光最强,其活性约为 pDsRed1-C1 质粒中 CMV 启动子活性的 76.26%,1 084 bp hTERT 启动子次之,263 bp hTERT 启动子最弱。分析其可能原因有:①在肿瘤特异性启动子中,hTERT 启动子、AFP 启动子为弱启动子,其在肿瘤细胞中启动表达的 hTERT 和甲胎蛋白量较少;Survivin 启动子属肿瘤特异的强启动子,其在 A549 等恶性肿瘤细胞中启动表达大量的 Survivin 蛋白。②两种长度 hTERT 启动子在肺癌 A549 细胞中均启动了红色荧光的表达,但 1 084 bp 启动子在相同时间启动目的基因表达的能力明显强于 263 bp 启动子片段。这两个片段启动子均包含"转录起始点上游 181 bp 区域"的启动子活性关键序列,故在肺癌细胞中均启动了表达,但是可能 1 084 bp 含有某些能增强启动子启动基因转录的序列,故其在 A549 细胞中的启动活性强于 263 bp 的 hTERT 启动子,这些未知功能序列如何调控下游启动子的功能,有待进一步研究。

在肺癌细胞中比较研究 hTERT 启动子和 Survivin 启动子启动目的基因表达的效率,尚未见有相关文献报道。我们克隆的 980 bp Survivin 启动子在肺癌 A549 细胞中具有较强的靶向转录特性,为进一步构建以该启动子为调控序列、肿瘤自杀基因等抗肿瘤基因为目的基因的真核表达质粒奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Gu J,Andreeff M,Roth J A,et al. hTERT pr moter induces tumor-specific Bax gene expression and cell killing in syngenic mouse tumor model and prevents systemic toxicity[J]. Gene Ther,2002,9(1):30-37.

[2] Zhu Z B,Makhija S K,Lu B,et al. Transcriptional targeting of tumors with a novel tumor-specific survivin promoter[J]. Cancer Gene Ther,2004,11(4):256-262.

[3] 况 舸,黄爱龙,唐 霓.端粒酶逆转录酶(hTERT)启动子的克隆及在人肝癌细胞的肿瘤特异性分析[J]. 重庆医科大学学报,2005,30(3):325-328.

[4] Soder A I,Hoare S F,Muir S,et al. Amplification,increased dosage and in situ expression of the telomerase RNA gene in human cancer[J]. Oncogene,1997,14(9):1013-1021.

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

[6] 董德琼,薛东鹰,杨渝浩.Survivin 蛋白在肺腺癌中的表达及临床意义[J]. 国际呼吸杂志,2006,26(2):92-94.

[7] Bao R,Connolly D C,Murphy M,et al. Activation of cancer-specific gene expression by the survivin promoter[J]. J Natl Cancer Inst,2002,94(7):522-528.

(责任编辑:冉明会)