维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)03－0325－04

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

况 舸, 黄爱龙, 唐 霓

(重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:克隆 hTERT 基因启动子并检测其在不同肝癌细胞系和正常组织细胞中的转录活性,为肝癌靶向性基因治疗提供依据。方法:采用 PCR 法扩增获得 hTERT 基因的启动子片段,将之克隆到表达虫荧光素酶基因的报告质粒上,通过测定荧光素酶报告基因的表达,检测 hTERT 基因启动子在肝癌细胞系和正常组织中的转录活性,并将之与甲胎蛋白(alpha—fetal-protein,AFP)基因启动子活性相比较,评价其作为肝癌基因治疗中应用的肿瘤特异性启动子的可行性。结果:成功克隆了 hTERT 启动子,证实 hTERT 启动子在肝癌细胞中具有相当强的转录活性,其活性水平为 AFP 启动子的 14～30 倍;在原代培养的成纤维细胞中其启动子未表现转录活性。结论:hTERT 启动子在肝癌细胞系中具有较强的启动活性和显著的肿瘤特异性,可望开发成为新型的肝癌靶向性基因治疗工具。

【关键词】基因表达;人端粒酶逆转录酶;基因疗法,肝癌

【中国图书分类法分类号】R575 【文献标识码】A 【收稿日期】2005－01－19

Cloning of human telomerase reverse transcriptase gene promoter and analysis of specific activities in human hepatocellular carcinoma cells

KUANG Ge, et al

(*Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To clone the hTERT gene promoter and detect its transcriptional activities in various hepatocellular carcinoma cell lines and in human fibroblast cells in order to make groundwork for the targeting gene therapy for human hepatocellular carcinoma. *Methods*: The fragment of hTERT promoters were acquired by PCR amplification and were cloned into the reporter plasmid pGL3－Basic which contains a luciferase gene. The constructed eukaryotic expression plasmid pGL3－hTERT in which the expression of the luciferase were drived by hTERT promoter were transfected into three HCC cell lines and the primary fibroblast cells. At 24 hours post transfection (p. t.), the activity of the luciferase was determined with Dual－Luciferase Reporter Assay System. A pGL3－AFP containing luciferase gene controlled by the AFP promoter was used as positive control and a pGL3－Basic vector which have no promoter in front of the luciferase gene was used as negative control. *Results*: The hTERT promoter was successfully cloned into the eukaryotic reporter vector, pGL3－Basic and gained the pGL3－hTERT vector. The hTERT promoters showed high transcriptional activities in all the three HCC cell lines but no transcriptional activities in the primary fibroblast cells. The transcriptional activity of the hTERT promoter was much higher than AFP promoter(14～30 times). *Conclusion*: Our data revealed that the hTERT promoter possesses the tumor－spesific high transcrioptional activity in all the three established HCC cell lines. It may serve as a useful tool for transcriptional targeting of hepatocellular carcinoma gene therapy.

【Key words】Promoter; hTERT; Gene therapy; Hepatocellular carcinoma

肝癌的基因治疗是当前研究的热点,多种基因治疗手段已经被证实具有良好的肿瘤杀伤作用,但由于目前采用的基因治疗载体缺乏肿瘤靶向性,限制了基因治疗方法的应用。利用肿瘤特异性启动子调控目的基因在肝癌细胞中靶向性表达是实现对肝癌靶向性基因治疗的手段之一。

端粒酶的激活是细胞发生永生化及癌变过程中极为重要的步骤。人类的端粒酶至少由三个单位构

作者介绍:况 舸(1972－),女,讲师,博士,主要研究方向:恶性肿瘤的靶相性基因治疗。

基金项目:863 项目资助(资助号:2001AA217121)
教育部感染性疾病分子生物学重点实验室。

维普资讯 http://www.cqvip.com

成,其中人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase,hTERT)仅在端粒酶阳性的肿瘤细胞和永生化细胞中表达,是它的催化亚基,决定了端粒酶的活性[1]。在所有肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中均有 hTERT 表达,且其中的 74%为强表达[2]。hTERT 基因上游调控区具有强启动子活性,且仅表现于端粒酶阳性的永生化及癌细胞系,提示 hTERT 基因启动子具有肿瘤特异性的转录活性[3]。

作者用 PCR 方法克隆了 hTERT 基因 ATG 上游的启动子序列,构建了含有报告基因虫荧光素酶(luciferase,luc)、hTERT 启动子序列的真核表达载体,测定其在人 HCC 细胞系和正常原代培养细胞中的转录活性,并评价 hTERT 启动子作为肝癌特异性启动子的可行性,为进一步应用于肝癌靶向性基因治疗打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和细胞 pGL3 - Basic 和 pRL - tk 购自 Promega 公司,前者为无启动子的含有虫荧光素酶(Luciferase)基因的质粒,后者为含有单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV - tk)启动子控制的海洋腔肠荧光素酶基因(Renilla Luciferase)的质粒。肝癌细胞系 HepG2、QGY7701 和 SMMC7721 均由本研究所保存,原代培养的人成纤维细胞由本校组胚教研室惠赠。

1.1.2 主要试剂 高保真 Pyrobest DNA Polymerase 购自 Takara 公司,T4DNA 连接酶、各种限制性内切酶、双荧光检测系统 Dual - Luciferase Reporter Assay System 购自 Promega 公司,脂质体 Lipofectamine2000 购于 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 HepG2 细胞基因组 DNA 的提取 单层培养的 HepG2 细胞长至 80%融合,TBS 洗 3 次后用细胞刮子刮下收集于 1.5ml 的 EP 管中。按 DNA 提取试剂盒操作说明制备基因组 DNA。

1.2.2 hTERT 启动子引物设计及 PCR 扩增:根据 GenBank 中 hTERT 基因(序列号:AF325900)序列设计引物并分别在各上下游引物 5'端引入 Sac Ⅰ和 Xho Ⅰ酶切位点。引物序列为:上游 5' - TATGAGCTCCAGCTGCGCTGTCGGGGCCAGG - 3';下游 5' - TATCTCGAGGCTGCCTGAAACTCGCGCCGCGA - 3'。PCR 扩增:采用 50μl 体系,热启动法。以 1μgDNA 为模板;分别加入 Taq 酶 1.5U;上下游引物各 50pmol;dNTPs 10nmol。扩增条件为:95℃,4min,加入 Taq 酶。94℃,45s;72℃,50s;72℃,60s。25 个循环后,72℃延伸 10min。1.5%琼脂糖电泳检测,产物保存于 -20℃。PCR 产物为 280bp。

1.2.3 含有报告基因的真核表达载体 pGL3 - hTERT 的构建 PCR 产物经回收和 Sac Ⅰ和 Xho Ⅰ双酶切后,克隆至 pGL3 - Basic 载体的相应位点。酶切鉴定正确的克隆送上海博亚公司测序。测序正确的克隆命名为 pGL3 - hTERT。构建过程如图 1 所示。

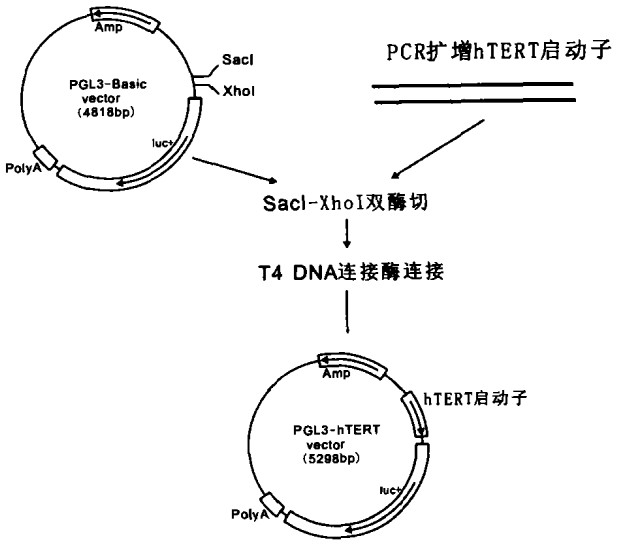


图 1 pGL3 - hTERT 构建示意图

1.2.4 细胞转染和荧光素酶报告基因检测 以 pGL3 - Basic 为阴性对照,以本室构建的 pGL3 - AFP 为阳性对照,将 pGL3 - Basic、pGL3 - AFP、pGL3 - hTERT 各 1μg 分别与 pRL - tk0.1μg 共转染 HepG2、SMMC7721、QGY7701 细胞和原代培养的成纤维细胞。HepG2、QGY7701 和 SMMC7721 均培养于含 10%热灭活小牛血清的 RPMI1640 培养基,原代成纤维细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基。于 37℃,5% CO_2 恒温培养箱培养。将 HepG2、QGY7701、SMMC7721 和原代成纤维细胞细胞按 0.6×10^5/孔种于 24 孔板中,用无抗生素的培养液培养 24h 后,换无血清培养液,用脂质体(Lipofectamin2000)转染。用质粒 DNAlug 与 pRL - tk0.1μg 共转染上述细胞,每种质粒转染 4 孔。转染 6h 后换掉转染培养液,用含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液继续培养。24h 后,用裂解液裂解转染细胞,测定虫荧光素酶(Luc)和海洋腔肠荧光素酶(RL)活性。后者的活性反映每孔细胞的转染效率。各启动子的相对活性以 Luc/RL 的比值来比较的,同一转染实验的 4 孔所得 Luc/RL 的比值求平均值和标准差,并据此作图。

2 结 果

2.1 hTERT 启动子的 PCR 扩增

以 HepG2 细胞基因组为模板,PCR 扩增 hTERT 基因 280bp 的启动子片段。产物 1μl 点样

维普资讯 http://www.cqvip.com

于 1.5% 的琼脂糖凝胶,结果显示在 280bp 大小处可见清晰的目的条带(见图 2)。

2.2 基因表达重组质粒的构建及鉴定

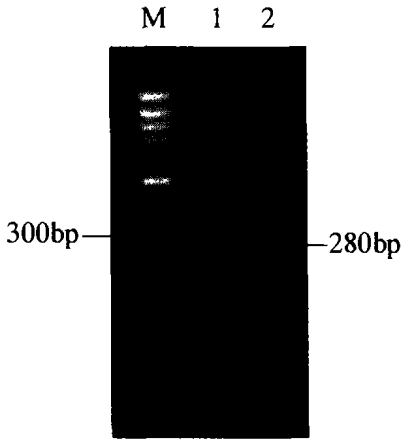


图 2 hTERT 启动子 PCR 扩增结果

Lane1:**阴性对照** Lane2:280bp **的** hTERT **启动子片段**

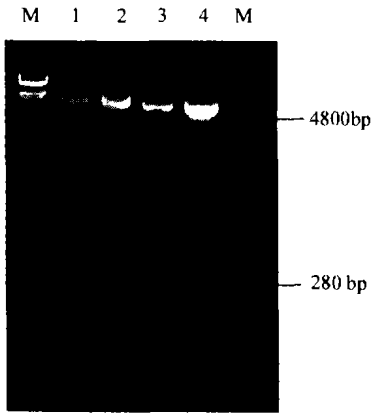


图 3 pGL3 - hTERT 双酶切鉴定图

Lane1:pGL3 - hTERT **未酶切** Lane2:pGL3 - Basic **未酶切** Lane3:pGL3 - hTERT **经** Sac Ⅰ **和** Xho Ⅰ **双酶切** Lane4:pGL3 - Basic **经** Sac Ⅰ **和** Xho Ⅰ **双酶切**

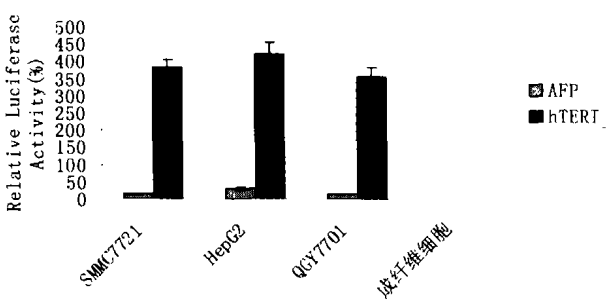


图 4 hTERT 和 AFP 启动子在 HCC 细胞和原代成纤维细胞中的转录活性比较

将人 hTERT 基因启动子片段(280bp)定向克隆至虫荧光素酶报告质粒 pGL3 - Basic 中 1μc 基因的上游,得到 pGL3 - hTERT 虫荧光素酶报告重组体。构建的真核表达质粒用 Sac Ⅰ 和 Xho Ⅰ 双酶切后,得到约 4800bp 的载体片段和 280bp 的小片段,与 PCR 产物大小一致。酶切鉴定结果见图 3。酶切鉴定正确的重组质粒送上海博亚公司测序,测序结果证实:自人 HepG2 细胞克隆得到的启动子序列与 GenBank 中人 hTERT 启动子序列完全相同,说明 HepG2 细胞内 hTERT 基因的转录调节区未见基因突变。

2.3 细胞转染和荧光素酶报告基因的检测

在 HepG2、SMMC7721、QGY7701 和原代培养的成纤维细胞中,pGL3 - hTERT 的相对虫荧光素酶活性分别为 382%、421%、356% 和 0.8%,pGL3 - AFP 的相对虫荧光素酶活性分别为 29.4%、14%、15% 和 1%,阴性对照 pGL3 - Basic 的相对虫荧光素酶活性分别为 1.4%、1.2%、0.9% 和 1%。pGL3 - hTERT 的在三种肝癌细胞系中的相对虫荧光素酶活性分别为 AFP 启动子的 14 倍、30 倍和 24 倍,而在成纤维细胞中相对虫荧光素酶活性为阴性对照的 0.8 倍,经统计学分析没有显著差异。结果表明:hTERT 的启动子区域在三种人肝癌细胞系中均有强转录活性,在正常人成纤维细胞中没有发现转录活性,显示 hTERT 启动子在肝癌细胞中具有肿瘤特异性的转录调节活性。hTERT 启动子的活性明显强于肝癌特异性 AFP 启动子活性。以上结果提示 hTERT 启动子在肝癌细胞中能够有效激活外源基因表达,其启动子具有肿瘤特异性的转录调节活性,且其活性大大优于 AFP 启动子(见图 4 所示)。

3 讨 论

基因治疗能否成功应用于临床实践最为关键的问题是如何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。利用肿瘤特异性启动子调控目的基因在肿瘤细胞中表达是实现靶向性基因治疗的重要手段。目前肝癌的靶向基因治疗中应用最多的是甲胎蛋白(AFP)启动子。研究证实 AFP 启动子能够在肝癌组织中特异性激活外源基因的转录,并在肝癌的靶向性基因治疗中取得了一定的疗效。但 AFP 启动子仅在高表达 AFP 的肝癌细胞中具有一定的治疗效果;而对低表达 AFP 的肝癌无效[4,5]。而在人类肝癌中,高表达 AFP 的仅占 40% 左右。因此,对于肝癌的基因治疗需要寻找更加广谱、有效的启动子来调控目的基因的表达。

端粒酶是一种新的广谱的肿瘤标志物,约 90% 的肿瘤中端粒酶的活性显著增高。人类的端粒酶有三个亚基,包括人端粒酶 RNA、端粒酶相关蛋白 1

维普资讯 http://www.cqvip.com

和 hTERT,前两种成分在端粒酶阴性的正常组织中广泛表达,而 hTERT 仅在端粒酶阳性的肿瘤细胞和永生化细胞中表达,说明 hTERT 是端粒酶活性的决定因素。hTERT 活性涉及细胞永生化和肿瘤发生,其表达水平在肿瘤中增加而在正常细胞中几乎没有表达[1]。

Toshikuni 等研究发现,hTERT 在肝细胞癌及其癌旁肝组织中的阳性率分别为 100% 和 30.4%,且在其中 74% 的肝细胞癌中为强表达,而在正常组织中无表达[2]。充分说明 hTERT 在肝癌组织中具有肿瘤特异性表达的特性。

Horikawa 等克隆了 hTERT 上游调控区,发现该区域缺乏典型真核启动子的核心元件 TATA 盒和 CAAT 盒而富含 GC,具有强启动子活性,并与端粒酶的活性一致。hTERT 启动子中 ATG 上游 -208～-150bp 的 59 个碱基是 hTERT 启动子转录活性的基本单位,在转录起始位点上游含有几个公认的细胞增殖和肿瘤发生相关的转录因子的结合位点,包括 3 个 SP1 元件,2 个 E box 及数个 MAZ (Myc—associated zinc finger protein, Myc 相关锌指蛋白)和 AP-2(activator protein-2,激活蛋白-2)结合位点[3]。先前的研究证实 myc-max 异二聚体就是与 E box 结合而激活 hTERT 启动子的转录[6]。对启动子 CpG 岛的研究显示 CpG 岛的甲基化可能对 hTERT 的表达有抑制作用,但对 hTERT 表达的调节存在依赖 CpG 岛的甲基化和不依赖 CpG 岛的甲基化的多个水平的调节方式[7]。以上研究说明 hTERT 的表达是在转录水平被调控的。

鉴于 hTERT 基因及其启动子的特点,目前有关 hTERT 基因的调控和在基因治疗方面的研究已成为热点。Gu 等利用 hTERT 启动子在肿瘤细胞中高活性的特点,构建了一种由 hTERT 启动子调控的、携带有半胱氨酸蛋白酶和 Bax 等凋亡诱导基因的靶向基因治疗载体,这种新颖的载体可特异性的诱导鼠的纤维肉瘤细胞发生凋亡,而对正常细胞几乎没有影响。这种由 hTERT 启动子调控的特异性基因治疗载体能增加基因治疗的安全性和有效性,是一种非常有前景的基因治疗方法[8]。

在本研究中,我们扩增了 hTERT 基因翻译起始位点上游约 0.3kb 的片段,结果证实:自人 HepG2 细胞克隆得到的启动子序列与 GenBank 中人源于其他肿瘤细胞的 hTERT 启动子序列完全相同,说明 hTERT 基本启动子在不同肿瘤细胞中具有高度保守性。实验证实在人肝癌细胞中 hTERT 启动子具有强转录活性和肿瘤特异性。将之与 AFP 启动子活性相比较,我们发现:hTERT 启动子在肝癌细胞系中具有较 AFP 启动子更强的转录活性,即使是在高表达 AFP 的 HepG2 细胞中,其启动活性也比 AFP 启动子活性高 14 倍。结合 hTERT 在肝癌中极高的阳性率,我们认为,利用 hTERT 启动子调控治疗基因转录,可望实现对肝癌靶向性的基因治疗。

参 考 文 献

[1] Soder AI, Hoare SF, 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.

[2] Toshikuni N, Nouso K, Higashi T, et al. Expression of telomerase-associated protein 1 and telomerase reverse transcriptase in hepatocellular carcinoma[J]. Br J Cancer, 2000; 82(4): 833-837.

[3] Horikawa I, Cable PL, Afshari C, et al. Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene[J]. Cancer Res, 1999; 59(4): 826-830.

[4] Hallenbeck PL, Chang YN, Hay C, et al. A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma. Hum Gene Ther[J]. 1999; 10(10): 1721-1733.

[5] Huang X, Zhang W, Wakimoto H, et al. Adenovirus-mediated tissue-specific cytosine deaminase gene therapy for human hepatocellular carcinoma with different AFP expression levels[J]. J Exp Ther Oncol, 2002; 2(2): 100-106.

[6] Wu KJ, Grandori C, Amacker M, et al. Direct activation of TERT transcription by c-MYC[J]. Nat Genet, 1999; 21(2): 220-224.

[7] Devereux TR, Horikawa I, Anna CH, et al. DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene[J]. Cancer Res, 1999; 59(24): 6087-6090.

[8] Gu J, Andreeff M, Roth JA, et al. hTERT promoter 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.