DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.20.024
第26卷第20期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 20
2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

文章编号:1000-5404(2004)20-1857-03

论著

AFP启动子调控增强型绿色荧光蛋白在人肝癌细胞中表达的研究

郝 萍,王东林 (第三军医大学新桥医院肿瘤科,全军肿瘤诊治中心,重庆市肿瘤生物技术研究所,重庆 400037)

提 要:目的 研究人0.3 kb的AFP启动子序列对EGFP在人肝癌细胞中表达的影响。方法 通过设计含有特定酶切位点的引物,选择性地从人基因组中扩增出人甲胎蛋白启动子(AFP promoter)序列,分别构建含有AFP启动子序列和增强型绿色荧光蛋白(EGFP)及AFP启动子序列和DTA基因的真核表达载体pAF-EGFP、pAF-DTA;将pAF-EGFP转染HepG2、SMMC-7721及NIH3T3后进行荧光强度检测。结果 转染pAF-EGFP质粒细胞的EGFP表达量在HepG2细胞中明显高于SMMC-7721、NIH3T3细胞,组间差异显著($P<0.01$)。结论 AFP启动子可以特异性地启动它后面的目的基因在AFP阳性的细胞中高效表达。

关键词:EGFP;AFP启动子;肝癌细胞
中图法分类号:R394.3;R73-36;R735.7 文献标识码:A

Study of AFP promoter on the expression of EGFP in human hepatoma cells

HAO Ping, WANG Dong-lin (Cancer Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To evaluate the effects of 0.3 kb human alpha-fetoprotein (AFP) promotor on the expression of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in human hepatoma cells. Methods By constructing the primer with special enzyme site, human AFP promoter was selectively amplified from human gene bank and eukaryon-expressed pAF-EGFP and pAF-DTA with AFP promotor and EGFP and with AFP promotor and DTA, respectively. pAF-EGFP was transfected into HepG2, SMMC-7721, and NIH3T3. The fluorescence was detected in order to evaluate the transfection rate. Results The expression of EGFP in HepG2 cells transfected with pAF-EGFP was significantly higher than that in SMMC-7721 and NIH3T3 cells ($P<0.01$). Conclusion AFP promotor can specifically promote and accelerate the expression of target gene within the cell with positive AFP.

Key words: enhanced green fluorescent protein; AFP promoter; transfection; hepatoma cell

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国最常见的恶性肿瘤之一,严重危害人类生命,手术、放化疗及介入等常规治疗疗效均不理想,随着现代分子生物学理论和技术的飞速发展,及对肝癌发病机制认识的不断深入,利用基因工程的手段,对肝癌的进行基因治疗,有可能成为肝癌治疗的突破点之一。基因治疗中利用细胞或组织特异性启动子能够使目的基因在特定的靶细胞中表达,从而最大程度地减少对正常组织的毒副作用。目前利用AFP转录调控序列驱动目的基因表达是肝癌靶向治疗的主要手段[1~3]。绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)因荧光性质稳定,分子量小对目的基因的功能没有影响,且大量表达对细胞没有毒性,检测方便而倍受重视[4]。经突变改造的EGFP其荧光强度比野生型GFP(wtGFP)要高出35倍[5]。本研究中通过构建由AFP启动子调控的EGFP真核表达载体pAF-EGFP,经脂质体转染研究EGFP在人肝癌细胞中的表达。

1 材料与方法

1.1 材料

HepG2、NIH3T3细胞、工程菌DH5α由本中心保存,pS2-DTA质粒由本中心赵忠全硕士构建,SMMC-7721细胞由本校生物化学教研室高会广博士惠赠,pEGFP-C3由军事医学科学院施畅博士惠赠。限制性内切酶*Nco*Ⅰ、*Xba*Ⅰ、*Kpn*Ⅰ、*Hind*Ⅲ购于NEB公司,λDNA/*Eco*RⅠ+*Hind*Ⅲ Marker购于华美生物工程公司,胶回收试剂盒、DOTAP Liposomal Transfection Reagent购于ROCH公司,质粒小量提取试剂盒、T4DNA连接酶购于promega公司,组织DNA提取试剂盒购于Omega公司。

1.2 方法

1.2.1 AFP启动子的克隆 根据人AFP基因图谱[3]设计引物并在上、下游引物5′端分别加入限制性内切酶*Kpn*Ⅰ和*Hind*Ⅲ位点。引物序列为:

作者简介:郝 萍(1971—),女,云南省通海县人,硕士研究生,主治医师,讲师,主要从事肿瘤基因治疗和介入治疗方面的研究。电话:(023)68774622
通信作者:王东林,电话:(023)68774622
收稿日期:2004-07-17;修回日期:2004-09-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

上游: 5′GGGGTACCCCTGAGGAGAATATTTGTTA3′;

下游: 5′GCAAGCTTGCTGTTATTGGCAGTGGTGG3′。

取人AFP阳性肝癌组织, 按照Omega公司Tissue DNA Kits试剂盒操作说明抽提基因组DNA, 用基因组DNA为模板进行PCR扩增, 并将产物纯化后进行测序。

1.2.2 EGFP的克隆 根据pEGFP-C3的基因图谱设计引物并在上、下游引物5′端分别加入限制性内切酶 *Nco* Ⅰ 和 *Xba* Ⅰ 位点。

上游引物为: 5′-GCCCATGGGACCAGCTCGACCTGCCGC-3′;

下游引物为: 5′-GCTCTAGACACGAACTCCAGCAGGACC-3′。

取pEGFP-C3质粒, 按照Omega公司质粒小量提取试剂盒进行提取, PCR扩增产物纯化后电泳, 用胶回收试剂盒回收目的片段。

1.2.3 表达载体构建[6]

1.2.3.1 DTA表达载体的构建 质粒pS2-DTA用 *Kpn* Ⅰ、*Hind* Ⅲ进行双酶切, 切下SV40 promoter片段, 电泳后按胶回收试剂盒说明进行回收。在T_4DNA连接酶的作用下, 将0.3 kb的AFP启动子片段定向克隆到去除了SV40 promoter片段的载体上, 构建成新质粒pAF-DTA。转化工程菌DH5α后, 挑取单个克隆进行质粒小量提取, 再用 *Kpn* Ⅰ、*Hind* Ⅲ进行双酶切证实, 并由上海博亚生物技术有限公司进行测序验证。

1.2.3.2 EGFP表达载体构建 PCR产物EGFP片段和质粒pAF-DTA分别用 *Nco* Ⅰ、*Xba* Ⅰ进行双酶切, 电泳后切下目的片段, 按胶回收试剂盒说明进行回收。在T_4连接酶的作用下, EGFP片段取代pAF-DTA中的DTA基因, 构建成新质粒pAF-EGFP。转化工程菌DH5α后, 挑取单个克隆进行质粒小量提取, 再用 *Nco* Ⅰ、*Xba* Ⅰ进行双酶切验证。

1.2.4 细胞培养[7] 在研究中分实验组(AFP阳性肝癌细胞系HepG2)及对照组(AFP阴性肝癌细胞系SMMC-7721及小鼠成纤维细胞NIH3T3), 3株细胞在含10%小牛血清的1640培养基中, 于37 ℃, 5%CO_2, 饱和湿度下培养。

1.2.5 脂质体转染 转染前1 d, 在12孔培养板内以1×10^5接种细胞, 每种细胞做12个复孔, 其中6孔作实验组, 另6孔作阴性对照, 共3个12孔培养板。待细胞生长到70%~80%密度时, 以含0.5 μg pAF-EGFP、2.5 μl DOTAP和1 ml无血清的1640培养基进行混合转染, 对照组给予0.5 μg EGFP、2.5 μl DOTAP和1 ml无血清的1640培养基。3~6 h后用1 ml含10%小牛血清的1640培养基取代。

1.2.6 EGFP荧光强度检测(虫荧光素酶活性分析法) 转染48 h后PBS清洗培养细胞, 加入适量1× lysis buffer, 将细胞转入微量离心管置冰上, 离心后将细胞裂解液置于检测管并放入照度计中检测EGFP的荧光强度, 用于评价重组质粒pAF-EGFP在肿瘤细胞中的表达。

1.3 统计学处理

结果用$\bar{x}\pm s$表示, 采用SPSS11.0统计软件, 组间比较采用单因素方差分析及均数间多重比较。

2 结果

2.1 AFP启动子克隆的鉴定

AFP启动子PCR产物纯化后1%琼脂糖凝胶电泳在300 bp处见1条带, 说明AFP启动子克隆成功。测序结果与Gene bank公布的AFP基因序列完全相同。

2.2 重组质粒pAF-DTA、pAF-EGFP的酶切鉴定

用 *Kpn* Ⅰ、*Hind* Ⅲ对pAF-DTA质粒双酶切, 得到0.3 kb的AFP启动子片段和3 733 bp的大片段, 证明pAF-DTA构建的正确(图1)。用 *Nco* Ⅰ、*Xba* Ⅰ对pAF-EGFP质粒双酶切, 得到630 bp的EGFP片段和3 435 bp片段, 与目的片段大小相同, 证明pAF-EGFP构建及方向正确(图2)。



1: λDNA/*Eco*RⅠ+*Hind*Ⅲ marker(125 bp, 564 bp, 831 bp, 947 bp, 1 375 bp, 1 584 bp, 1 904 bp, 2 027 bp, 3 530 bp, 4 268 bp, 4 973 bp, 5 148 bp, 21 227 bp); 2: Plasmid pAF-DTA digested with *Kpn* Ⅰ and *Hind* Ⅲ; 3: Plasmid pAF-DTA; 4: Plasmid pAF-DTA digested with *Kpn* Ⅰ; 5: Plasmid pAF-DTA digested with *Hin*d Ⅲ

图1 pAF-DTA酶切鉴定

Fig 1 Restriction analysis of the digestion of pAF-DTA



1: λDNA/*Eco*RⅠ+*Hind*Ⅲ marker(125 bp, 564 bp, 831 bp, 947 bp, 1 375 bp, 1 584 bp, 1 904 bp, 2 027 bp, 3 530 bp, 4 268 bp, 4 973 bp, 5 148 bp, 21 227 bp); 2: Plasmid pAF-EGFP digested with *Nco* Ⅰ and *Xba* Ⅰ; 3: Plasmid pAF-EGFP; 4: Plasmid pAF-EGFP digested with *Nco* Ⅰ; 5: Plasmid pAF-EGFP digested with *Xba* Ⅰ

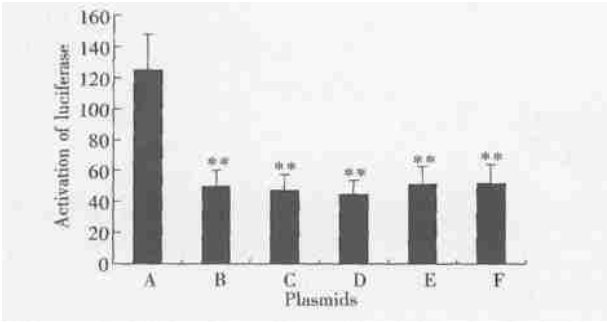
图2 pAF-EGFP酶切鉴定

Fig 2 Restriction analysis of the digestion of pAF-EGFP

2.3 AFP启动子功能检测

分别将pAF-EGFP质粒、EGFP质粒转染AFP阳性的HepG2细胞和对照组AFP阴性的SMMC-7721和NIH3T3细胞, 对细胞EGFP表达量进行虫荧光素酶活性分析, 结果(图3)显示: 转染pAF-EGFP质粒的HepG2细胞中的荧光强度明显高于转染pAF-EGFP质粒的SMMC-7721和NIH3T3细胞及转染EGFP片段的HepG2、SMMC-7721和NIH3T3细胞。表明AFP启动子特异性地启动其下游的EGFP基因在AFP阳性的肝癌细胞中高效表达。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



F= 192.453　P= 0.000　**: P< 0.01 *vs* A; A: HepG2+pAF-EGFP; B: HepG2+EGFP; C: SMMC+pAF-EGFP; D: SMMC+EGFP; E: NIH3T3+pAF-EGFP; F: NIH3T3+EGFP

图 3　细胞荧光强度比较

Fig 3　Comparison of fluorescence intensities in cells

3　讨论

HCC 是一种恶性程度极高及预后较差的恶性肿瘤, 尽管目前肝癌的治疗方法较多, 但仍不能从根本上改善病人的预后。其高发病率和死亡率促进了其基因治疗和诊断的发展。自杀基因治疗是利用某些病毒等微生物含有的, 而哺乳动物没有的特殊代谢途径来杀死肿瘤细胞。目的基因的靶向性传导表达对肝癌的治疗极重要, 而载体起关键作用, 目前利用肝癌组织特异性启动子 AFP 驱动治疗基因表达是肝癌靶向基因治疗的主要手段。

AFP 为胎儿生长和胚胎发育必需蛋白, 起着保护胚胎不受母体排斥的作用。胎儿出生后 AFP 浓度急剧下降, 约出生后 5 周血清 AFP 降至正常水平。肝癌时 AFP 来源于肝癌细胞, AFP 合成位于内质网核糖体上, 不是所有肝癌细胞 AFP 均呈阳性, 约 60%～70% 肝癌患者血清 AFP 水平升高。FP 启动子区含有正常的 TATA 盒以及 GRE 和两个 HNF 结合位点, 但却不含有典型的 CCAAT 区域。在肝细胞分化生长时, HNF 结合位点也可被核心因子-1 和 CCAAT 增强子结合蛋白所识别, 所以在正常肝细胞中, 核心因子-1 和 CCAAT 增强子结合蛋白可与 HNF-1 在此结合位点共同形成一个 DNA-蛋白质复合物, 抑制了 AFP 启动子的活性。所以在正常肝组织中 AFP 启动子不能启动其下游基因表达 AFP[8]。Nahon 等[9] 报道人的 AFP 基因启动子区有 DNA 序列保守区, 这些保守区可能与肝 AFP 基因特异表达有关。Huber 等[10] 在体外实验中与肝癌细胞内特异性地表达与 AFP 启动子相偶联的单纯疱疹胞苷激酶(HSV-TK)基因, 而由于正常肝细胞对甲胎蛋白启动子无高应答性, 因而可使 HSV-TK 的表达局限于肝癌细胞中, 这一结果说明 AFP 启动子能促进其下游基因的表达。为了达到对肝癌细胞的特异杀伤作用, 以往研究曾尝试了 AFP 的许多调控元件, 包括 7.6 kb 的 5′ 端前导序列等, 但 7.6 kb 片段太大, 一方面不易操作, 另一方面除启动子外还有许多正、负调控元件, 专一效果并不很好[11]。Aldo 等[8] 后来证实, 300 bp 的人 AFP 启动子序列已足以在人、大鼠细胞中启动目的基因的表达, 利用含这种启动子的逆转录病毒载体在 AFP 阳性的肝癌细胞株中取得了高效特异表达自杀基因的效果。0.3 kb 的启动子由于不含增强子序列, 其活性较温和, 不至于对也分泌 AFP 的肝脏干细胞产生太大毒性, 有利于体内转基因治疗的进行。为了避免 SV40 启动子对 AFP 启动子专一性的影响, 我们构建载体时去除了 SV40 启动子, 所构建的载体只含有 AFP 启动子。

转染 pAF-EGFP 质粒细胞的 EGFP 表达量在 AFP 阳性肝癌细胞 HepG2 中高表达, 而在 AFP 阴性肝癌细胞 SMMC7721 及 NIH3T3 细胞中弱表达, 表明 AFP 启动子可以特异性地启动其下游的目的基因在 AFP 阳性的细胞中高效表达。

参考文献:

[1] Sa Cunha A, Bonte E, Dubois S, *et al*. Inhibition of rat hepatocellular carcinoma tumor growth after multiple infusions of recombinant Ad. AFPtk followed by ganciclovir treatment[J]. J Hepatol, 2002, 37(2): 222－230.

[2] Takahashi M, Sato T, Sagawa T, *et al*. E1B-55K-deleted adenovirus expressing E1a-13S by AFP-enhancer/promoter is capable of highly specific replication in AFP-producing hepatocellular carcinoma and eradication of established tumor[J]. Mol Ther, 2002, 5(5 Pt 1): 627－634.

[3] Kim J, Lee B, Kim J S, *et al*. Antitumoral effects of recombinant adenovirus YKL-1001, conditionally replicating in alpha-fetoprotein-producing human liver cancer cells[J]. Cancer Lett, 2002, 180(1): 23－32.

[4] Heim R, Cubitt A B, Tsien R Y. Improved green fluorescence. Nature, 1995, 373(6516): 663－664.

[5] Yang T T, Chang L, Kain S R. Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. Nucleic Acids Res, 1996, 24(22): 4592－4593.

[6] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 19－20.

[7] 薛庆善 主编. 体外培养的原理及技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 237－245.

[8] Ido A, Nakata K, Kato Y, *et al*. Gene therapy for hepatoma cells using a retrovirus vector carrying herpes simplex virus thymidine kinase gene under the control of human α-fetoprotein gene promoter[J]. Cancer Res, 1995, 55(14): 3105－3109.

[9] Nahon J L, Danan J L, Poiret M, *et al*. The rat alpha-fetoprotein and albumin genes. Transcriptional control and comparison of the sequence organization and promoter region[J]. J Biol Chem, 1987, 262(26): 12479－12487.

[10] Huber B E, Richards C A, Krenitsky T A, *et al*. Retroviral-mediated gene therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma: an innovative approach for cancer therapy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(18): 8039－8043.

[11] Macri P, Gordon J W. Delayed morbidity and mortality of albumin/SV40 T-antigen transgenic mice after insertion of an α-fetoprotein/herpes virus thymidine kinase transgene and treatment with ganciclovir[J]. Hum Gene Ther, 1994, 5(2): 175－182.

（编辑　王　红）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net