DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.03.002
第24卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 3
2002年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2002

文章编号:1000-5404(2002)03-0249-03

论著

视黄酸和α-干扰素对带有视黄酸反应元件的LUC报告基因表达的调控作用

张乾勇[1],糜漫天[1],程天民[2],韦 娜[1] (第三军医大学预防医学系:[1]营养与食品卫生学教研室;[2]防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨视黄酸(Retinoic acid,RA)通过视黄酸反应元件(RARE)调控外源基因表达的可行性。方法 构建带有视黄酸受体β(RARβ)基因增强子区域RARE的荧光素酶(Luciferase,LUC)报告基因表达载体,应用脂质体包裹RARE-TK-LUC和RARE3-TK-LUC质粒,并转染HL-60细胞,48 h后,用RA和/或α-干扰素(IFNα)处理不同时间,用LUC报告基因检测试剂盒分析LUC报告基因活性。结果 经RA处理不同时间后,RARE-TK-LUC和RARE3-TK-LUC质粒转染细胞的LUC相对活性分别较未经处理的转染细胞增加12~38和20~85倍;单用IFNα处理转染细胞,对LUC的表达无明显的诱导作用;IFNα和RA联合处理48、72 h,LUC相对活性比单用RA处理增加60%~70%。结论 RA可调控带有RARE的LUC报告基因的表达,说明应用RARE构建RA可调控的目的基因表达载体是可行的。

关键词:视黄酸;干扰素;视黄酸反应元件;荧光素酶报告基因
中图法分类号:R392.11;R394.2;R986 文献标识码:A

Effect of retinoic acid on the expression of luciferase reporter gene in HL-60 cells transfected with the reporter plasmids containing retinoic acid response element

ZHANG Qian-yong, MI Man-tian, CHENG Tian-min, WEI Na (Department of Nutrition and Food Hygiene, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the possibility of the expression of exogenous gene mediated by retinoic acid(RA). Methods Two reporter plasmids containing retinoic acid response element(RARE), pRARE-TK-LUC, and pRARE3-TK-LUC, were transfected into HL-60 cells with liposome DOTAP respectively. After a period of 48 h, luciferase activity of transfected cells stimulated by vehicle or all-trans retinoic acid(ATRA) and/or interferon alpha(IFNα) was determined by measurement of relative luciferase units in scintillation counter device. Results Stimulations of transient transfected HL-60 cells with ATRA within differential scheduled periods resulted in 12~38-fold and 20~85-fold increase in luciferase activity over basal activity of pRARE-TK-LUC and pRARE3-TK-LUC transfected cells respectively. A combination of RA and IFNα led to a higher increase in luciferase activity than that merely by RA or IFNα. Conclusion Retinoic acid could induce the expression of exogenous gene containing RARE.

Key words: retinoic acid; luciferase; reporter gene; retinoic acid response element

视黄酸(Retinoic acid,RA)能激活细胞内视黄酸受体(Retinoic acid receptor,RAR)或视黄醇类物质X受体(Retinoid-X receptor,RXR),并通过视黄酸反应元件(Retinoic acid response element,RARE)对靶基因表达进行调控。本研究采用带有RARE的荧光素酶(Luciferase,LUC)报告基因表达载体转染细胞,初步探讨RA通过RARE调控外源基因表达的可行性。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

HL-60细胞株购自中科院上海细胞所。全反式视黄酸(All-trans retinoic acid,ATRA)为Sigma产品,重组人IFNα-2b由天津华立达生物工程公司生产,DOTAP脂质体转染试剂盒、高纯度质粒提取试剂盒、LUC报告基因分析试剂盒、*Xba* Ⅰ、*Hind* Ⅲ和*Hpa* Ⅰ限制性内切酶购自Roche公司。

1.2 表达载体

RARE-TK-LUC质粒是以pUC18为母本载体,在其多克隆位点的*Xba I*处插入TK-LUC,*Hind* Ⅲ处插入来源于人RARβ2基因的RARE;RARE3-TK-LUC质粒是将pTK-CAT的CAT基因换成LUC基因,并在其TK启动子上游嵌入3个串联的RARE(来源于人的RARβ2基因的-62到+1的视黄酸反应元件)。两载体分别由美国The Salk Institute的Evans教授、法国The Pasteur Institute的Dejean教授惠赠。

1.3 质粒提取与酶切鉴定

常规质粒转化大肠杆菌DH_5,扩增,用高纯度质粒提取试剂盒提取质粒,小量酶切鉴定,用紫外分光光度计检测质粒DNA的纯度与含量。

1.4 质粒转染

按DOTAP脂质体转染试剂盒说明书进行:用10 mmol/L HEPES缓冲液将5μg质粒DNA稀释至50μl,将30μl DOTAP脂质体稀释至100μl,再将他们混合并轻轻摇匀,室温放置15 min。处于对数生长期的HL-60细胞,换新鲜培养液后调整浓度为2×10^5/ml,以5 ml/孔接种于6孔培养板中,加入质粒DNA/

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770303)
作者简介:张乾勇(1969-),男,四川省南充市人,博士研究生,讲师,主要从事营养与肿瘤方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68752291
收稿日期:2001-03-21;修回日期:2001-05-08

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

脂质体复合物 150 μl, 37 ℃, 5% CO_2, 饱和湿度培养 8 h(每小时振摇 1 次), 换新鲜培养液传代培养 48 h。

1.5 LUC 的诱导表达及检测

用 ATRA(2×10^{-7} mol/L)、IFNα-2b(1 000 U/ml)、ATRA+IFNα-2b 处理转染细胞 0、6、12、24、48、72 h, 收集细胞, 按 LUC 报告基因分析试剂盒说明书检测 LUC 的相对活性。5×10^{6} 细胞中加入 150 μl 裂解缓冲液提取蛋白质, 用 Brodford 法测定蛋白质含量, 取含 50 μg 蛋白质的提取液, 加 100 μl 底物反应缓冲液, 闪烁计数器测定 1 min 荧光量, 作为 LUC 的相对活性。

1.6 MTT 实验检测 RA 和 IFNα 对 HL-60 细胞增殖功能的影响

以 5×10^{4}/ml 细胞密度将 HL-60 细胞接种于 96 孔板, 用 ATRA(2×10^{-7} mol/L)、IFNα-2b(1 000 U/ml)、ATRA+IFNα-2b 处理 1~3 d, 加 15 μl 5 mg/ml 的 MTT, 在 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度条件下孵育 4 h, 弃培养液上清, 加 100 μl 异丙醇乙醇等体积混合液, 室温 30 min, 用酶联仪在 492 nm 处测 OD 值。

1.7 统计学处理

实验数据经 SPSS 10.0 统计软件处理。

2 结果

2.1 表达载体的鉴定

根据质粒酶切图谱, 用 *Xba I* 酶切 RARE-TK-LUC 质粒、*Hind III* 和 *Hpa I* 酶切 RARE3-TK-LUC 质粒, 所得 DNA 片段分别为 1 780 bp 和 4 900 bp、2 460 bp 和 3 200 bp, 符合理论计算值。

2.2 ATRA 对带 RARE 的 LUC 报告基因表达的调控

以未经处理的 LUC 表达载体转染的 HL-60 细胞的荧光量为基数 1, 计算 LUC 活性的相对数。RA 处理 6 h, LUC 的表达增加 10~20 倍左右, 24 h 达到较高水平, 并持续到 72 h 以后, 三个 RARE 重复序列对 LUC 表达的调控作用强于单个的 RARE, 见图 1。

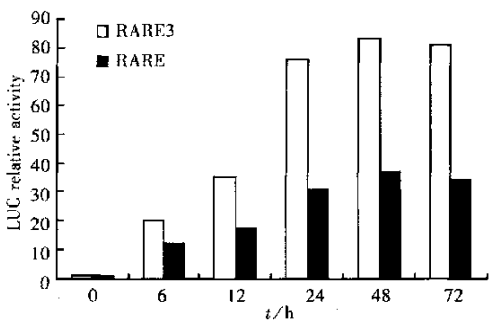


图1 RA 对 LUC 报告基因活性的影响

Fig 1 Luciferase activity of transfected cells stimulated with ATRA

2.3 IFNα 协同 ATRA 对 RARE 调控 LUC 表达的影响

单独使用 IFNα 不能诱导 RARE 调控的 LUC 基因的表达, 但 IFNα 与 ATRA 联合能显著增加 ATRA 对 LUC 报告基因表达的诱导作用。IFNα 与 ATRA 联合处理转染细胞 48、72 h 后, 可使 LUC 的相对活性比单用 ATRA 处理的细胞增加 60%~70%。

2.4 ATRA 和 IFNα 对 HL-60 细胞增殖功能的影响

MTT 比色实验结果显示, ATRA 和 IFNα 处理 HL-60 细胞 1~3 d 后, D_{492} 值分别较经处理的 HL-60 细胞明显下降, ATRA+IFNα 组下降更明显, 见表 1。

表1 视黄酸和 IFNα 对 HL-60 细胞增殖功能的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab 1 Effect of RA and IFNα on the proliferation capacity of HL-60 cells($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Time(d)	Control	IFNα	RA	IFNα+RA
1	0.456±0.035	0.446±0.043	0.384±0.035[a]	0.364±0.021[ab]
2	1.003±0.068	0.783±0.081[a]	0.586±0.037[a]	0.501±0.033[abc]
3	1.185±0.087	0.937±0.076[a]	0.698±0.031[a]	0.588±0.026[abc]

a: $P<0.01$ *vs* control group; b: $P<0.01$ *vs* IFNα group; c: $P<0.05$ *vs* RA group

3 讨论

RA 与细胞内特异性核受体 RAR 或 RXR 结合后, 可以通过 RARE 顺式调控带有 RARE 的目的基因的表达[1]。本研究将带有 RARE 序列的 LUC 报告基因表达载体转染 HL-60 细胞, RA 处理可使转染细胞的 LUC 活性升高数十倍, 其中有三个 RARE 重复序列的 LUC 报告基因转染细胞的 LUC 活性升高更明显。说明构建 RA 可调控的目的基因的表达载体是可行的。

单独使用 IFNα 不能诱导 RARE 调控的 LUC 基因的表达, 但 IFNα 与 ATRA 联合能显著增加 ATRA 对 LUC 报告基因表达的诱导作用。IFNα 与 ATRA 联合处理转染细胞 48、72 h 后, 可使 LUC 的相对活性比单用 ATRA 处理的细胞增加 60%~70%。说明 IFNα 可增加 RA 调控基因表达的能力, 这可能与 IFNα 增加细胞内视黄酸受体的表达有关[2]。RA 和 IFNα 都是细胞生长抑制剂, 单独应用时均能抑制 HL-60 细胞的增殖, 联合应用时还具有协同效应, 这可能与 RA 和 IFNα 能协同调节某些基因的表达有关。

视黄酸(RA)是维生素 A 的活性代谢产物, 具有广泛的生物化学功能。RA 可抑制癌细胞增殖、诱导癌细胞分化和凋亡[3], 临床上已广泛应用于白血病、肺癌、胃癌、黑色素细胞瘤、神经胶质细胞瘤等癌症的治疗[4]。但近年来发现有的病例对 RA 不敏感(即出现抗性)或易复发而出现耐药性, RA 有较大毒副作用, 这些缺点限制了 RA 的临床应用[5]。肿瘤的基因治疗是将对肿瘤有直接或间接杀伤作用的基因经载体转入体内, 在肿瘤的生长部位进行表达而杀伤肿瘤。但是某些基因的表达产物既对肿瘤有杀伤作用, 也可能造成正常组织的损伤, 如果这些外源基因的高效表达不受限制, 无疑是十分危险的[6]。利用 RA 通过 RARE 对靶基因表达的调控作用, 设想将 RA 抗癌与基因治疗结合起来, 使外源基因的定位限时诱导表达受控于 RA。本研究初步表明这一设想是可行的, 这将为肿瘤的治疗开辟新的途径。

参考文献:

[1] Baust G, Redpath L, Schwarz E. Different ligand responsiveness of human

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

retinoic-acid-receptor beta-gene transcription in tumorigenic and non-tumorigenic cervical-carcinoma-derived cell lines is mediated through a large retinoic-acid-response domain[J]. Int J Cancer, 1996, 67(3): 409—416.

[2] Gianni M, Zanotta S, Terao M, *et al*. Interferons induce normal and aberrant retinoic-acid receptors type alpha in acute promyelocytic leukemia cells: potentiation of the induction of retinoid-dependent differentiation markers[J]. Int J Cancer, 1996, 68(1): 75—83.

[3] Fujimura S, Suzumiya J, Anzai K, *et al*. Retinoic acids induce growth inhibition and apoptosis in adult T-cell leukemia (ATL) cell lines[J]. Leuk Res, 1998, 22(7): 611—618.

[4] Maeda Y, Naiki Y, Sono H, *et al*. Clinical application of all—trans retinoic acid (tretinoin) for adult T-cell leukaemia[J]. Br J Haematol, 2000, 109(3): 677—678.

[5] Sacchi S, Kantarjian H M, Freireich E J, *et al*. Unexpected high incidence of severe toxicities associated with alpha interferon, low-dose cytosine arabinoside and all-trans retinoic acid in patients with chronic myelogenous leukemia[J]. Leuk Lymphoma, 1999, 35(5—6): 483—489.

[6] Zhang R, Straus F H, DeGroot L J. Effective genetic therapy of established medullary thyroid carcinomas with murine interleukin-2: dissemination and cytotoxicity studies in a rat tumor model[J]. Endocrinology, 1999, 140(5): 2 152—2 158.

（编辑 潘式文）

文章编号：1000-5404(2002)03-0251-01

个案与短篇

基底节区生殖细胞瘤 3 例报告

A report of three cases of basal ganglia germinoma

吴 南，王宪荣，冯 华 （第三军医大学附属西南医院神经外科，重庆 400038）

颅内生殖细胞瘤多位于松果体区，发病率约 1.5%，发生于基底节区的较少，约占总数的 4%～10%[1]，本研究报告 3 例基底节区生殖细胞瘤，结合文献对其临床表现、影像特点及治疗进行探讨。

1 临床资料

1.1 一般资料

3 例患者均为男性，年龄 9～14 岁，平均 11 岁。2 例病程在 1 年以上，1 例因肿瘤出血，急性起病。3 例首发症状均为偏侧肢体无力，2 例伴偏侧感觉障碍。有 2 例在晚期出现头痛、呕吐的高颅压表现。

1.2 影像学检查

3 例均行 CT 检查，见肿瘤起源于一侧基底节区，肿瘤最小者 2.8 cm×3.0 cm×2.4 cm，最大者：7.9 cm×3.6 cm×5 cm。1 例表现为环状增强阴影，环内为低密度，1 例表现为基底节区脑出血，另 1 例表现为基底节区高密度、边缘清楚的肿块阴影，内有小囊性改变。3 例均未见钙化，病灶周围无明显水肿带。

1.3 病理诊断及生化检查

3 例术后均经病理证实为生殖细胞瘤。3 例术前血清绒毛膜促性腺激素（HCG）测定有 2 例增高，治疗后复查均在正常范围内。

1.4 治疗与预后

3 例均行肿瘤大部切除术，（其中 1 例先行血肿穿刺引流术，再行肿瘤大部切除术）术中见肿瘤呈鱼肉样，易出血，无包膜，与周围组织分界不清，有囊变，囊液呈草黄色。术后均行肿瘤局部加全脑放射治疗。3 例病人术后均未出现严重并发症，术后 2 例临床症状有明显改善，肢体肌力增加，1 例无明显变化。3 例放疗后半年复查 CT 肿瘤均消失，无复发表现。随访 1～5 年，2 例恢复学习，1 例生活基本自理。

2 讨论

颅内生殖细胞瘤约占所有颅内肿瘤的 1%～2%，它多发生在松果体区及鞍区，而发生在基底节区的生殖细胞瘤占所有颅内生殖细胞瘤的 4%～10%。本组 3 例，占同期 32 例中的 9.4%。通过本组病例结合文献，对基底节区生殖细胞瘤的临床表现，影像学特点及治疗方法进行讨论。

2.1 临床表现

复习文献结合本组病例，可总结出如下特点[2,3]：①国内外多个案报告，患者均为男性。②发病年龄多在青春期前后（7～17 岁）。③与鞍上及松果体区生殖细胞瘤的首发症状：性早熟、内分泌障碍、视力障碍不同，多因偏侧肢体无力入院。④病程进展相对缓慢，多在 1～2 年之间，较其它部位生殖细胞瘤发展慢。如果有肿瘤出血，则表现为急性病程。⑤由于早期症状体征相对不明显，缺乏特异性，易被忽视，而延误诊断。

2.2 影像学特点

基底节区生殖细胞瘤在 CT 上有特征性表现[4,5]。①部位、形态：肿瘤发生在基底节区，可侵及丘脑，部分肿瘤向对侧基底节扩散。呈圆形、椭圆形或形态不规则，边缘欠清晰，呈等、高、低混合密度病灶。较松果体区及鞍区瘤体大。②多有囊变、坏死及出血表现。③呈斑片状、环形或分隔样增强。④瘤旁水肿轻或无水肿带。⑤中线移位常不明显，个别可见同侧大脑半球皮层萎缩现象。MRI 虽有较高分辨率，但缺乏特异性。

2.3 诊断、鉴别诊断

基底节区生殖细胞瘤的诊断依靠临床表现及影像特点。对于青春期前后男性患者出现缓慢发展的一侧肢体无力，结合上述影象特征，应警惕基底节区生殖细胞瘤的可能。由于对基底节区生殖细胞瘤认识不足，本组 3 例均误诊，2 例误诊为胶质瘤。故常需与基底节区胶质瘤鉴别。基底节区胶质瘤发病年龄较大，多为 20～40 岁，男女发病率类似，病程常小于 1 年，恶性高的胶质瘤 CT 呈混合密度，增强效应明显，伴有明显瘤周水肿。胶质瘤恶性程度低者亦可无瘤周水肿，但多为均匀低密度病灶。另外肿瘤继发出血时，因出血可掩盖肿瘤表现，应注意

（下转 254 页）

作者简介：吴 南（1971— ），男，河南省新乡市人，硕士，主治医师，主要从事脑外伤及功能神经外科方面的研究。电话：(023)68754153

收稿日期：2001-01-03；修回日期：2001-06-07

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