DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.06.008
第23卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 6
2001年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2001

文章编号:1000-5404(2001)06-0641-03

论著

雄激素受体反义RNA逆转录病毒载体的构建及其鉴定

王洛夫,江 军,方玉华,靳风烁,靳文生 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所泌尿外科,重庆 400042)

提 要:目的 构建雄激素受体(AR)反义RNA逆转录病毒载体pL-AR-SN并进行包装和鉴定。方法 PCR扩增AR cDNA片段并将之反向插入到逆转录病毒载体pLXSN,用脂质体法转染PA317细胞,提取转染细胞基因组DNA和培养上清中重组逆转录病毒RNA,用PCR和RT-PCR法进行鉴定,NIH 3T3细胞测定病毒滴度。结果 限制性内切酶分析证明pL-AR-SN含有反向插入的AR cDNA目的片段;培养上清中病毒滴度为2.34×10^5 CFU/ml,PCR和RT-PCR分别从转染细胞基因组DNA和培养上清中的重组逆转录病毒RNA中扩增出了插入的目的片段。结论 成功构建了AR反义RNA逆转录病毒载体并包装出了高滴度的重组逆转录病毒。

关键词:雄激素受体;反义RNA;逆转录病毒载体
中图法分类号:R347.911;R373.9;R394.2 文献标识码:A

Construction, package and identification of retroviral vector of androgen receptor antisense RNA

WANG Luo-fu, JIANG Jun, FANG Yu-hua, JIN Feng-shuo, JIN Wen-sheng (Department of Urology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To construct, pack and identify the retroviral vector of androgen receptor (AR) antisense RNA (pL-AR-SN). **Methods** PCR amplified fragment of AR cDNA was inserted inversely into the retroviral vector pLXSN. PA317 cells were transfected by the recombinant retroviral vector with liposome. The genomic DNA of the transfected PA317 cells and the retrovirus RNA from the supernatant of cell culture were extracted and identified by PCR and RT-PCR. NIH 3T3 cells were used to determine the virus titer of the supernatant. **Results** pL-AR-SN was proved to contain the inversely inserted fragment of AR cDNA by restriction endonuclease digestion. The virus titer of the supernatant was 2.34×10^5 CFU/ml. The inserted fragment could be amplified by both PCR and RT-PCR from the genomic DNA and the retrovirus RNA. **Conclusion** The retroviral vector of androgen receptor antisense RNA has been constructed successfully and the transfected PA317 cells can produce high titer recombinant virus.

Key words: androgen receptor; antisense RNA; retroviral vector

前列腺癌的生长受雄激素的刺激[1],雄激素的作用通过雄激素受体(Androgen receptor, AR)介导[2]。通过雄激素去势或在雄激素受体水平阻断雄激素而进行的内分泌治疗,是晚期不宜手术的前列腺癌患者的必然选择[3],然而内分泌治疗最终对大多数患者无效,且无有效的替代疗法。目前的研究认为,AR基因突变和AR基因扩增与内分泌治疗失败密切相关[4],因此,在分子水平阻断AR基因的表达不仅对雄激素依赖性前列腺癌有效,而且可能对内分泌治疗失败的前列腺癌也有效。本研究构建了雄激素受体反义RNA逆转录病毒载体,并进行了鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料

含雄激素受体cDNA的质粒由美国Shutoung Liao教授(The Ben May Institute For Cancer Research, Chicago)惠赠,逆转录病毒载体质粒pLXSN由美国A Dusty Miller博士(Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle)提供。逆转录病毒包装细胞PA317和小鼠成纤维细胞株NIH 3T3由第三军医大学附属新桥医院泌尿外科提供。限制性内切酶 *EcoR*Ⅰ、*BamH*Ⅰ、*Sac*Ⅰ、*Hind* Ⅲ、脂质体DOSPER、Tripure™ Isolation Reagent、T4 DNA连接酶均购自瑞士罗氏公司。Taq酶、反转录酶AMV购自美国Promega公司。细胞培养基DMEM、胎牛血清购自美国HyClone公司。

1.2 方法

1.2.1 雄激素受体反义RNA逆转录病毒载体的构建 采用PCR扩增AR cDNA目的片段,引物采用PREMIER Biosoft的软件PRIMER PRIMERE 4设计,由上海生物工程公司合成。

P1(正向引物):5′-CGGGATCCGCCCATTGACTATTACTT-3′

P2(反向引物):5′-CGGAATTCCATAACATTTCCGAAGAC-3′

正、反向引物5′端的前8个碱基不与AR cDNA对应,起引入酶切位点的作用,其中P1带特异酶切位点*BamH*Ⅰ,P2带特异酶切位点*EcoR*Ⅰ。以AR cDNA为模板,P1和P2扩增的目的片段长度为237 bp,对应于AR基因的外显子B、C的绝大部分。

采用*EcoR*Ⅰ、*BamH*Ⅰ双酶切PCR产物和pLXSN,采用T4 DNA连接酶进行连接,连接反应混合物转化感受态大肠杆菌DH5α,挑选Amp抗性克隆,小量扩增,提取质粒,酶切鉴定。

将构建的重组逆转录病毒载体命名为pL-AR-SN,pL-AR-SN的物理图谱见图1。

1.2.2 逆转录病毒的包装、滴度测定 用于转染的质粒为pLXSN和pL-AR-SN。转染前1 d,将5×10^5 PA317细胞接种于6孔培养板,转染时吸出细胞培养液,加入1 ml DMEM,然后滴加质粒\脂质体DOSPER混合液,培养6 h后,更换培养基继续培养24 h。将细胞按1∶10传代于含600 μg/ml G418的选择培养液,培养10~14 d,直至可见抗性克隆生长并直径达2~3 mm。挑取抗性克隆于24孔板,继续选择并扩大培养。收集培养上

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770740)
作者简介:王洛夫(1970-),男,山东省莒南县人,博士,主治医师,讲师,主要从事前列腺癌基因治疗方面的研究。电话:(023)68757344
收稿日期:2000-05-13;修回日期:2000-09-26

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

清, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 等份分装, 置－70 ℃冰箱保存备用, 采用 NIH 3T3 测定逆转录病毒的滴度。

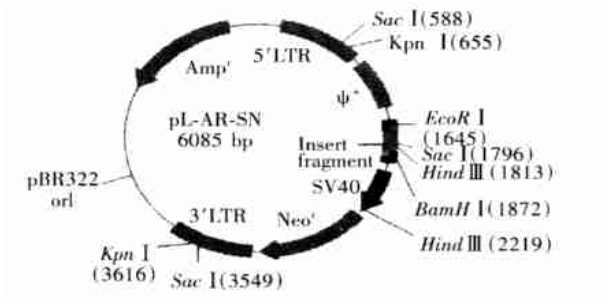


图 1 pL-AR-SN 的物理图谱

Fig 1 Physical graph of plasmid pL-AR-SN

1.2.3 分泌重组逆转录病毒的包装细胞系的鉴定 采用 Tripue™ Isolation Reagent 提取 G418 抗性 PA317 细胞基因组 DNA, 以引物 P1、P2 进行 PCR。取 100 μl 病毒上清, 异硫氰酸胍一步法提取病毒 RNA, 先用随机六聚体引物进行反转录, 再以引物 P1、P2 进行 PCR, 扩增产物进行电泳分析。

2 结果

2.1 雄激素受体反义 RNA 逆转录病毒载体的构建

回收的目的 DNA 片段, 用 T4 DNA 连接酶进行连接, 连接反应混合物转化大肠杆菌, 随机挑取 Amp 抗性克隆, 小量扩增后提取质粒, *Sac*Ⅰ 酶切, 初步筛选出有插入的重组质粒 pL-AR-SN。然后分别用 *Sac*Ⅰ、*Hind* Ⅲ、*BamH*Ⅰ、*EcoR*Ⅰ 和 *EcoR*Ⅰ＋*BamH*Ⅰ 酶切重组质粒 pL-AR-SN 进行限制性酶切分析, 见图 2, 所产生的片段经与分子量标准比较, 均与理论计算值相符, 证明成功构建了逆转录表达载体。

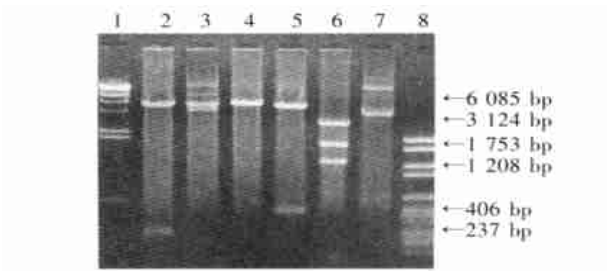


图 2 重组逆转录病毒载体质粒 pL-AR-SN 的限制性酶切分析

Fig 2 Restriction endonuclease analysis of recombinant retroviral vector pL-AR-SN

1: Marker; λDNA＋*Hind* Ⅲ; 2: pL-AR-SN ＋ *BamH*Ⅰ ＋ *EcoR*Ⅰ; 3: pL-AR-SN＋*EcoR*Ⅰ; 4: pL-AR-SN＋*BamH*Ⅰ; 5: pL-AR-SN＋*Hind* Ⅲ; 6: pL-AR-SN＋*Sac*Ⅰ; 7: pL-AR-SN; 8: Marker; pBR328 DNA＋*Bgl*Ⅰ＋*Hinf*Ⅰ

2.2 逆转录病毒的包装和滴度测定

转染细胞 PA317 在加入 G418 第 3 天开始死亡, 第 8 天镜下可见个别区域细胞呈岛状生长, 第 12 天形成肉眼可见克隆, 见图 3, 第 16 天多数克隆直径达 2～3 mm。挑取 pLXSN 和 pL-AR-SN 转染的 PA317 细胞克隆于 24 孔板, 继续 G418 选择, 扩大培养, 更换培养基为不含 G418 的液体, 48～72 h 后收集含逆转录病毒的上清, 取上清感染 NIH 3T3, 测定病毒滴度为 2.34×10^5 CFU/ml。

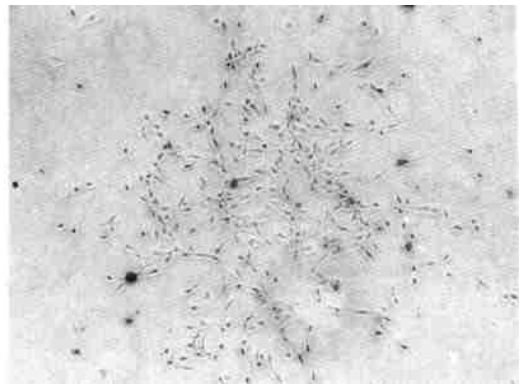


图 3 逆转录病毒载体转染 PA317 细胞形成的 G418 抗性克隆

Fig 3 G418 resistant clone of PA317 cells

2.3 分泌重组逆转录病毒的包装细胞系的鉴定

以 G418 抗性 PA317 细胞基因组 DNA 为模板, 采用引物 P1 和 P2 进行 PCR, 结果见图 3, 可以见到有一条带, 大小符合 237 bp, 而 pLXSN 转染的 PA317 未见扩增条带, 证明 AR 目的片段整合到了 PA317 细胞的基因组。

反转录 PCR(RT-PCR)结果见图 4, 可见 pL-AR-SN 转染的 PA317 细胞产生的病毒 RNA 有一条带, 大小符合 237 bp, 而 pLXSN 转染的 PA317 细胞产生的病毒 RNA 未见扩增条带, 说明重组逆转录病毒中含有了 AR 目的片段。

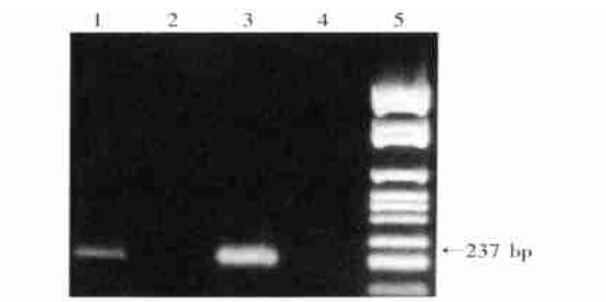


图 4 PCR 及 RT-PCR 产物电泳照片

Fig 4 Photograph of electrophoresis of PCR and RT-PCR products

1: RT-PCR of virus RNA in the supernatant of pL-AR-SN transfected PA317 cells; 2: RT-PCR of virus RNA in the supernatant of pLXSW transfected PA317 cells; 3: PCR of genomic DNA of pL-AR-SN transfected PA317 cells; 4: PCR of genomic DNA of pLXSN transfected PA317 cells; 5: Marker; pBR328 DNA＋*Bgl*Ⅰ＋*Hinf*Ⅰ

3 讨论

前列腺癌是美国男性最常见的恶性肿瘤, 占男性癌症死亡的第二位[5]; 我国前列腺癌的发病率也急剧上升, 现已排在泌尿系肿瘤的第三位[6]。尽管前列腺癌的发病机制尚不完全清楚, 但研究表明雄激素受体与前列腺癌的发生、进展与复发有关[4]。雄激素受体是甾体激素受体超家族的一员, 属于核内受体[7]。AR 蛋白由 AR 基因的 8 个外显子编码[8], 可分为三个功能区, ①N-端区: 由外显子 A 编码, 其功能主要是转录激活。②DNA 结合区: 由外显子 B 和 C 编码。③配基结合区: 由外显子 D 到 H 编码, 其功能主要是与激素结合形成激素－受体复合物, 促使受体活化及核内转

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

位并可促进受体二聚化。在 AR 的 8 个外显子中, 外显子 B 和 C 高度保守, 很少发生突变[9], 且其核苷酸序列与其他甾体激素受体的同源性低; 该区完整性的破坏可导致 AR 无法与目的基因结合。因此, 本研究选择此区的 cDNA 序列作为构建 AR 反义 RNA 逆转录病毒载体的插入片段, 载体表达的反义 RNA 与 AR mRNA 互补结合后, 可阻断翻译的进行, 并可进一步被细胞内的 RNA 酶 III(针对双链 RNA)水解, 从而使细胞雄激素受体水平下降。采用反义 RNA 抑制 AR 表达, 目前国内外尚未见文献报道。

我们通过 PCR 的方法扩增了外显子 B 和 C 的绝大部分。PCR 在载体构建中应用较为广泛, 本研究通过在正、反向引物的 5′端设计上特定的限制性内切酶位点, 而在扩增产物的两端引进对应于载体的酶切位点, 引进的酶切位点可确保插入片段能够反向插入到逆转录病毒载体的多克隆位点。这样, 采用相同的限制性内切酶双酶切 pLXSN 和 PCR 扩增产物, T4 DNA 连接酶连接, 将 AR cDNA 片段定向亚克隆至 pLXSN, 从而构建出含有反向插入片段的重组逆转录表达载体, 后者在真核细胞内, 在 5' LTR 启动子和增强子的驱动下, 可以转录出 AR 反义 RNA。

本研究采用逆转录病毒载体 pLXSN 作为 AR 反义 RNA 表达载体。逆转录病毒载体的特点是细胞感染率高, 导入的基因拷贝数多, 外源基因表达稳定[10]。pLXSN 由美国 Miller[11] 改造而成, 并获得美国 FDA 临床试验许可证, 是目前较好的逆转录病毒载体。本实验挑取的 PA317 克隆, 其上清病毒滴度足以用于各种目的的实验。经 RT-PCR 鉴定, 上清中的逆转录病毒含 AR 目的片段。我们下一步的工作是用含逆转录病毒的上清感染前列腺癌细胞, 观察 AR 反义 RNA 对 AR 表达的抑制作用和对细胞生长的抑制作用, 本研究为下一步的工作奠定了基础。

参考文献:

[1] Kyprianou N, Isaacs J T. Quantal relationship between prostatic dihydrotestosterone and prostatic cell content: critical threshold concept[J]. Prostate, 1987, 11(1): 41—50.

[2] Beato M, Herrlich P, Schutz G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot[J]. Cell, 1995, 83(6): 851—857.

[3] Kallioniemi O P, Visakorpi T. Genetic basis and clonal evolution of human prostate cancer[J]. Adv Cancer Res, 1996, 68(1): 225—255.

[4] Koivisto P, Kolmer M, Visakorpi T, *et al*. Androgen receptor gene and hormonal therapy failure of prostate cancer[J]. Am J Pathol, 1998, 152(1): 1—9.

[5] Parker S L, Tong T, Bolden S, *et al*[J]. Cancer statistics, 1996. CA Cancer J Clin, 1996, 46(1): 5—27.

[6] 刘耀庭, 李秀霞, 程　伟. 泌尿外科肿瘤发病情况的变化[J]. 临床泌尿外科杂志, 1997, 12(1): 47—49.

[7] Mangelsdorf D J, Thummel C, Beato M, *et al*. The nuclear receptor superfamily: the second decade[J]. Cell, 1995, 83(6): 835—839.

[8] Brinkmann A O, Jenster G, Kuiper G G, *et al*. The human androgen receptor: structure/function relationship in normal and pathological situations [J]. J Steroid biochem Mol Biol, 1992, 41(3—8): 361—368.

[9] Lubahn D B, Brown T R, Simental J A, *et al*. Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(23): 9 534—9 538.

[10] Mulligan R C. The basic science of gene therapy[J]. Science, 1993, 260(5 110): 926—932.

[11] Miller A D, Rosman G J. Improved retroviral vectors for gene tranfer and expression[J]. Biotechniques, 1989, 7(9): 980—982.

(编辑　汪勤俭)

(上接 640 页)

天腹泻数次甚至数 10 次, 病人腹痛及精神状态随之好转。两组中无消化道出血、肺部感染、胰腺假性囊肿等并发症发生。治疗过程中康复指标(从施他宁或清胰汤联合治疗开始)见表 1。

表 1　两组病例的康复指标比较

组别	n	开始排便时间(h)	体温恢复时间(d)	血淀粉酶恢复时间(d)	平均住院时间(d)
A 组	10	111.40±23.36	14.40±2.99	22.60±4.72	35.10±4.31
B 组	7	15.14±5.98*	7.86±1.77*	13.14±3.24*	19.00±4.32*

*: $P<0.001$ 与 A 组比较

3　讨论

重症急性胰腺炎的治疗观念及策略已发生很大变化, 除胰周脓肿必须行手术治疗外, 非手术治疗几乎已取代传统的早期手术治疗[2], 本组 17 例 SAP 采用非手术治疗, 效果满意。

施他宁为 SAP 提供了一种强有力的非手术治疗手段, 挽救了不少 SAP 病人的生命, 其作用机制主要是抑制胰酶和胃酸的分泌。据我们观察, 在应用施他宁 3 d 左右, 病情开始稳定, 表现为病人腹痛缓解及上腹腰背紧迫感减轻, 血淀粉酶下降或不再升高。虽然施他宁用于治疗 SAP 效果较好, 但由于胃肠功能恢复较慢, 病程仍较长。

SAP 时肠运动抑制, 肠腔扩张, 毒素和微生物聚积, 致肠粘膜缺血、缺氧, 屏障功能破坏, 细菌和内毒素从肠道进入血循环和器官, 导致坏死胰腺的感染和多脏器损害。动物实验表明, 所有的出血坏死性胰腺炎的严重损害均与细菌感染有关[3]。"攻里通下"对阻止其恶性循环极为重要。中药清胰汤具有良好的"攻里通下"作用, 其中起导泻作用的主要成分是大黄, 大黄的有效成分为大黄蒽醌, 该成分能直接刺激肠粘膜和奥尔巴赫神经节(肠肌丛神经节), 进而促进肠蠕动和发挥导泻作用[4], 使肠道内细菌数量下降, 减少了内源性细菌移位, 排出了内毒素, 并能保护肠粘膜。因此, 清胰汤在治疗中发挥肠道去污、减少内源性细菌易位以及促进肠蠕动等方面可能具有重要作用。本组治疗结果表明, 肠鸣音恢复是 SAP 病情好转的重要征象, 常规方法联合施他宁、清胰汤治疗能迅速改善 SAP 病情, 促进恢复, 缩短疗程和提高治愈率。

关键词: 胰腺炎, 重症; 药物疗法; 生长抑素; 大黄
中图法分类号: R576.053　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 中华医学会外科学会胰腺学组. 急性胰腺炎的临床诊断及分级标准[J]. 中华外科杂志, 1997, 35(12): 773—775.

[2] 刘胜利, 陈　峰, 杨德同, 等. 急性胰腺炎的非手术治疗[J]. 中国普通外科杂志, 1998, 8(3): 172—174.

[3] Marotta F, Geng T C, Wu C C, *et al*. Bacterial translocation in the cause of acute pancreatitis: beneficial role of nonabsorbable antibiotics and lactitol enemas [J]. Digestion, 1996, 57(6): 446—452.

[4] 陈晓理, 冉瑞图. 大黄治疗坏死性胰腺炎的机理探讨[J]. 华西医大学报, 1996, 27(4): 418—421.

(编辑　潘式文)

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