

·技术研究·

AFP启动子介导胸苷激酶表达载体的构建及其特异性表达

岳殿超¹, 李宝金², 徐辉雄^{1*}, 张泷涓³, 王 瑛⁴, 吕明德⁴

(1. 中山大学附属第一医院影像医学部, 广东 广州 510080; 2. 广州市第八人民医院肝胆外科, 广东 广州 518080;
3. 中山大学附属第一医院外科实验室, 广东 广州 510080; 4. 中山大学附属第一医院超声科, 广东广州 510080)

摘要:【目的】构建 AFP 启动子介导 HSV-TK 基因表达载体,并对其在肝癌细胞中特异性表达进行分析。【方法】采用 PCR 法扩增人 AFP 基因启动子。回收纯化后克隆入 pBluescript II KDR-TK 相同克隆位点,切取 AFP-TK 片段,然后通过酶联反应插入到 pEGFP-C1 中,构建成 pEGFP-C1-AFP-TK。对获得的片段进行鉴定、细胞靶向和外源基因表达的鉴定。【结果】序列分析表明,该启动子含 300 bp 核苷酸,与已报道的序列比较,100%相符。限制性酶切分析,重组质粒 pEGFP-C1-AFP-TK 已经克隆 AFP 启动子。RT-PCR 及 Western blotting 分析 pEGFP-C1-AFP-TK 转染后的 HepG2 细胞后,表明 TK 基因在 mRNA 水平上能有有效的表达,裂解后的 HepG2 细胞膜蛋白中有相对分子质量约 61 ~ 83 ku 大小的特异性条带。【结论】人肝细胞癌(HepG2)靶向性质粒 pEGFP-C1-AFP-TK 构建成功。

关键词: AFP 启动子; HepG2 细胞; 靶向表达; 单纯疱疹病毒-胸腺嘧啶激酶 1

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-3554(2009)05-0591-04

Recombined and Construction of Human Alpha-fetoprotein Eukaryotic Expression Vector Plasmid pEGFP-C1-AFP-TK

YUE Dian-chao¹, LI Bao-jin², XU Hui-xiong^{1*}, ZHANG Long-juan³, WANG Ying⁴, LV Ming-de⁴

(1. Medical Imaging Department, 3. Surgery Laboratory, 4. Ultrasonic Department, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080; 2. Hepatobiliary Department of Guangzhou 8th Hospital, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】 To construct the herpes simplex virus thymidine kinase type 1 (HSV-1-TK) expression vector with alpha-fetoprotein (AFP) expression gene as starter, and analyzing its specific expression. 【Method】 The AFP promoter was amplified by means of PCR. It was purified and cloned on the cloning site of pBluescript II KDR-TK. Then the AFP-TK fragment was obtained and inserted into pEGFP-C1 with T4 DNA ligase. The obtained fragment was identified for its cell targeting and exogenous genes expression. HepG2 genome DNA was extracted as template to amplify the AFP sequence (300 bp). Its PCR product was then conjugated with pMD-18, then amplified and extracted. The pMD-18-AFP was digested, and then the fragment was cloned into pBluescriptII KDR-TK. Then to produce the whole expressing fragment of AFP-TK which was inserted into the pEGFP-C1. Then the construction of pEGFP-C1-AFP-TK finished. The gene product was sent for sequencing evaluation. And the expression of pEGFP-C1-AFP-TK in HepG2 cells and ECV 304 cells was evaluated. And its mRNA expression was also evaluated. 【Result】 The sequence analysis proved that the promoter contained 300 bp nucleic acid which was 100% consistency with literatures. The result of restriction endonuclease analysis demonstrated that the recombined pEGFP-C1-AFP-TK was cloned within the AFP as an AFP promoter. The results of RT-PCR and Western blotting from the HepG2 cells transfected with pEGFP-C1-AFP-TK demonstrated that TK mRNA was expressed effectively. The lysis from the HepG2 cells was a specific band of 61-83 ku. The pEGFP-C1-AFP-TK was transcribed in HepG2 cells and expressed in HepG2 mRNA effectively. 【Conclusion】 The plasmid of pEGFP-C1-AFP-TK specific for HepG2 cells was successfully constructed.

Key word: alpha-fetoprotein promoter; HepG2 cells; targeting expression; herpes simplex virus thymidine kinase type 1

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(5): 591-594]

收稿日期: 2009-02-18

基金项目: 国家自然科学基金(30300082); 国家自然科学基金(30470467); 广东省自然科学基金(04009360)。

作者简介: 岳殿超, 博士, 副主任医师, E-mail: dianchaoy@hotmail.com; * 通信作者, 徐辉雄, 研究员, 项目负责人, E-mail: xuhuixiong@hotmail.com

随着分子生物学技术的不断进展,人们对肿瘤分子机制研究的不断深入,利用肿瘤与正常组织基因及调控区域的结构差异,从分子水平特异性杀伤肿瘤细胞的基因治疗成为肿瘤治疗中极具应用潜力的新策略^[1-2]。组织特异性启动子由于其在不同组织细胞中的活性相差很大,因此可驱动目的基因在靶器官组织中的特异性表达,实现基因治疗的靶向性,避免了对其它器官的不良反应^[3]。人甲胎蛋白(α -fetoprotein, AFP)的胎肝特异表达由其启动子的组织特异性决定,绝大部分肝细胞癌组织具有恢复 AFP 表达的特性,因此,利用 AFP 基因启动子构建的载体系统具备肝癌细胞靶向性成为可能。本文利用肿瘤与正常组织中间的这种特异性差异原理,设计了肝肿瘤细胞特异性启动子-AFP 启动子,构建含 AFP 启动子介导的胸苷激酶(HSV1-TK, TK)的真核表达载体并检测目的基因在肝肿瘤细胞中的靶向表达,为肝肿瘤进一步组织特异及靶向治疗提供新的手段。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 主要试剂 *Hind* III, *Xho* I, *Sal* I 限制性内切酶, T4 DNA 连接酶, DNA Marker (DGL2000, λ DNA/*Hind* III), *Taq* 酶、pMD-18 及 DNA 纯化试剂盒 (TaKaRa, 大连)。质粒提取试剂盒, 琼脂糖凝胶回收 DNA 片段试剂盒 (QIAGEN 公司)。小量基因组 DNA 快速抽提试剂盒 DNAfast2000 (上海飞捷生物技术公司, 上海)。胰蛋白胍, 酵母提取物, 琼脂, 氨苄青霉素, 卡那霉素, DMEM (Gibco 公司, 美国)。胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司, 杭州)。其它均为化学分析纯。

1.1.2 载体、菌株和细胞系 含 KDR-TK 基因的质粒 pBluescript II KDR-TK, 真核表达载体 pEGFP-C1, 大肠杆菌 DH5 α 和人肝癌细胞株 HepG2 由本实验保存。

1.2 实验方法

1.2.1 人肝癌细胞株 HepG2 的培养 HepG2 复苏后, 置于 DMEM 培养液 (含 10% 胎牛血清) 中, 在 37 $^{\circ}$ C、含体积百分数为 5% CO₂ 的条件下培养。

1.2.2 AFP 启动子片段的 PCR 扩增 抽提人肝癌细胞 HepG2 的基因组 DNA, 以其为模板进行

PCR, 扩增人 AFP 基因启动子序列 300 bp。上游引物为: ATCTCGAGCAAAGAGCTCTGTGTCCTTG, 下游引物为: GCAAGCTTGCTTGTAGTTATTTTGTATTGG。引物的 5' 端分别设计 *Xho* I 和 *Hind* III 位点, 所扩增产物预计为 300 bp。PCR 反应参数为 94 $^{\circ}$ C 45 s, 48 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环。

1.2.3 PCR 产物的回收 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳确定所需的产物, 然后利用凝胶回收试剂盒回收所需的 PCR 产物。

1.2.4 重组质粒 pMD-18-AFP 的构建 回收 PCR 产物与 pMD-18 载体进行联结 (连接) 反应。将上述联结反应产物转入 DH5 α 感受态细胞中, 转化大肠杆菌。次日挑取转化克隆, 小量扩增, 提取质粒 DNA, 送上海生物技术工程公司进行测序, 将测序正确的质粒命名为 pMD-18-AFP。

1.2.5 pEGFP-C1-AFP-TK 的构建 pMD-18-AFP 经 *Xho* I/*Hind* III 酶切后, 得到一个约 0.3 kb 大小的 AFP 基因启动子序列, 经低熔点琼脂糖凝胶回收纯化后克隆入 pBluescript II KDR-TK 中相同酶切位点, 然后用 *Xho* I/*Sal* I 酶切, 从中取下 AFP-TK 完整表达盒, 并将其以相同克隆位点插入到 pEGFP-C1 中, 构建成 pEGFP-C1-AFP-TK。

1.2.6 pEGFP-C1-AFP-TK 的酶切鉴定 pEGFP-C1-AFP-TK 经 *Xho* I/*Hind* III 酶切后, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.7 细胞培养 将人脐静脉血管内皮细胞 ECV304 和人肝癌细胞 HepG2 分别置于 DMEM 培养液 (含 100 mL/L 胎牛血清) 中, 在 37 $^{\circ}$ C、含体积百分数为 5% CO₂ 的条件下培养。

1.2.8 SonoVue 介导超声辐照介导 pEGFP-C1-AFP-TK 质粒转染 HepG2 细胞 根据我们既往的方法^[4-5], 将 1 000 μ L HepG2 细胞或 ECV304 细胞悬液/孔加入 pEGFP-C1-AFP-TK 30 μ L/孔, 同时加入 2% 超声造影剂 SonoVue 100 μ L/孔。然后进行超声辐照, 其超声辐照强度为 1 MHz、1 W/cm²、1 min。

1.2.9 外源基因表达的鉴定 用 RT-PCR 分析外源基因的表达, 细胞总 RNA 的提取参照 TRIzol 说明书进行。用 Western blotting 方法分析外源基因在 ECV304 及 HepG2 中的蛋白表达: 参照《分子克隆实验指南》(3 版) 提取胞质蛋白。以 β_2 -actin 的水平作为等量蛋白质上样对照, 取 50 μ g 蛋白质样品进行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 完毕后

蛋白转移到硝酸纤维膜上。室温封闭 2 h 后,然后在膜中加入 1:1 000 稀释的山羊抗人 TK-抗 4 ℃ 孵育过夜, TBST (20 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 140 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20) 洗涤后加入溶有兔抗山羊二抗的封闭液, 室温摇床孵育 2 h, TBST 洗涤后经 ECL 化学发光试剂孵育, 暗室内 X 线底片感光成像。

2 结果

2.1 AFP 的 PCR 产物扩增

PCR 产物电泳结果表明, 扩增产物的大小 300 bp, 与预计 AFP 启动子大小相一致(图 1)。

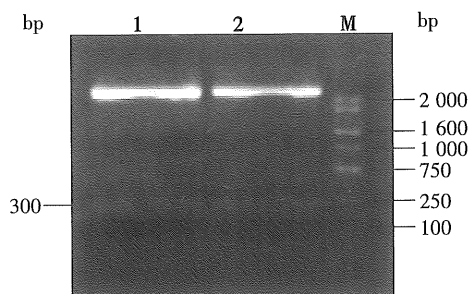


图 1 pMD-18-AFP 电泳图

Fig.1 The electrophoresis map of pMD-18-AFP

Lane 1-2: pMD-18-AFP(*Xho* I /*Hind* III); M: DGL2000

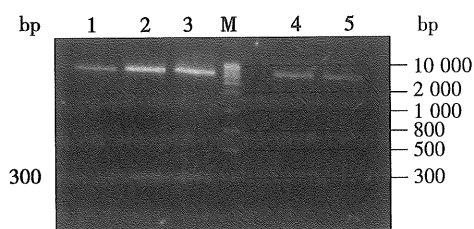


图 2 pEGFP-C1-AFP-TK(*Hind* III)质粒电泳图

Fig.2 The electrophoresis map of pEGFP-C1-AFP-TK (*Hind* III) plasmid

Lane 1-3: pMD-18-AFP(*Xho* I /*Hind* III); Lane 4: pEGFP-AFP-TK(*Xho* I); Lane 5: pEGFP-AFP-TK(*Hind* III); M: 1 kb Ladder DNA marker

2.2 序列测定

挑取酶切阳性的克隆进行 DNA 序列测定, 应用 Blast 软件与 Genebank 中人 AFP 启动子序列进行同源性比较, 同源性为 100%。本实验中克隆 AFP 启动子基因全长为 300 bp, 测序结果与 Genebank 中所报道的人 AFP 启动子序列, 完全

相符。

2.3 pEGFP-C1-AFP-TK 重组质粒酶切鉴定

经 *Sal* I 和 *Xho* I 双酶切后, pEGFP-C1-AFP-TK 在凝胶电泳上显示 2 个片段, 分别为 300 bp 和 8 kb, 证明重组质粒中已经克隆入为 AFP 启动子。

2.4 SonoVue 介导超声辐照介导 pEGFP-C1-AFP-TK 质粒转染 HepG2 细胞

根据我们既往的方法, 24 h 后经流式细胞仪检测 HepG2 细胞 GFP 瞬时转染表达效率(8.4 ± 0.7)%。ECV304 细胞未能测出 GFP 瞬时转染。

2.5 RT-PCR 分析外源基因的表达

采用 TRIzol 试剂盒, 抽提 ECV304 及 HepG2 细胞总 RNA, 进行 RT-PCR 反应, 可见扩增的片段(图 3)。表明 TK 基因在 mRNA 水平上能有效的表达。

Western blotting 方法分析外源基因的表达通过 Western blotting 检测超声辐照介导 pEGFP-C1-AFP-TK 质粒转染 ECV304 及 HepG2 后的 TK 蛋白表达, 如图 3 显示, 受感染的 HepG2 能够表达 TK 蛋白, 裂解后的 HepG2 细胞膜蛋白中有相对分子质量约 61 ~ 83 ku 大小的特异性条带。而感染后 ECV304 不表达 TK 蛋白。

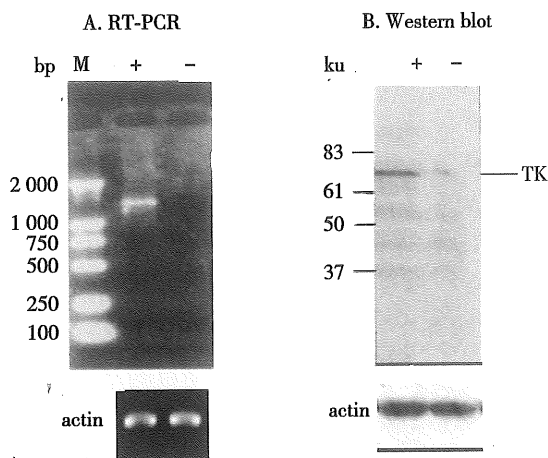


图 3 Western blot 检测超声辐照介导 pEGFP-C1-AFP-TK 质粒转染 ECV304 或 HepG2 后的 TK 蛋白表达

Fig.3 Western blot protein expression of pEGFP-C1-AFP-TK transcribed ECV304 or HepG2 cells intervened with ultrasound exposure

3 讨论

自杀基因是指存在于细菌、病毒和真菌中的

一类基因,其编码的酶能活化一些抗感染药物前体,从而产生细胞毒作用。由于这类酶并不存在于哺乳动物中,因此,前体药物对哺乳动物细胞通常是低毒或无毒的^[6]。自杀基因治疗系统种类较多,其中以单纯疱疹病毒 I 型胸苷激酶/丙氧鸟苷(HSV1-TK/GCV)系统与胞嘧啶脱氨酶/5 氟胞嘧啶(CD/5-FU)系统在肝癌自杀基因治疗中应用最为广泛,尤其前者被证明较其它系统更高效、更广泛、更安全,且不容易产生耐药性^[7-8]。1995年,HSV1-TK/GCV系统首次被引入肝癌的基因治疗中,并证明能以剂量依赖的方式诱导GCV对肝癌细胞的杀伤作用^[9]。Gerolami等人构建了由CMV启动子调控的含TK基因的腺病毒载体AdCMV-TK,转染人肝癌细胞及非肝癌细胞,并用GCV处理。结果发现,该重组腺病毒能有效抑制细胞生长,但没有特异性,且对非肝癌细胞产生毒性作用^[10]。因此,只有确保自杀基因仅在肿瘤细胞内而不在周围正常细胞中表达,才能起到杀伤肿瘤细胞而不损害正常细胞的治疗目的。

目的基因的靶向性传导表达对肝癌的治疗极重要。AFP是一种大分子糖蛋白,主要由胎儿肝细胞和卵黄囊产生,出生后AFP的合成逐渐停止,但当肝细胞发生癌变时,这种胚胎抗原的基因被激活,可重新产生大量的AFP。约60%~70%肝癌患者血清AFP水平升高。因此,AFP启动子具有肝癌细胞特异性,可驱动自杀基因靶向表达治疗肝癌^[11]。本试验中,我们构建的AFP启动子是一个紧位于AFP基因上游的长为300bp区域,AFP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。Ido等在体外实验中证明300bp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^[12]。0.3kb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。

我们通过酶联反应构建了真核表达质粒pEGFP-C1-AFP-TK,利用超声辐照强将上述质粒转染人肝癌细胞株HepG2及人血管内皮细胞株ECV304,RT-PCR及Western blot的结果表明TK基因只在AFP阳性细胞HepG2中表达,而人血管内皮细胞株ECV304则不表达。因此,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,为肝肿瘤的组织特异及靶向治疗提供有力手段。

参考文献:

- [1] 黄嘉凌,刘燕艳,刘然义,等. 肝癌特异性 HSV-TK/CD 基因表达质粒的构建及其杀伤活性 [J]. 中山大学学报:医学科学版,2005,26(2):142-145.
- [2] 谭万龙,谢毅,郑少斌,等. 胞嘧啶脱氨酶和胸苷激酶融合双自杀基因系统对膀胱癌细胞体外杀伤作用 [J]. 热带医学杂志,2006,6(05):480-483.
- [3] 李娟,白增亮. 甲胎蛋白基因表达调控及其在肝癌基因治疗中的应用 [J]. 药物生物技术,2007,14(4):297-301.
- [4] 岳殿超,徐辉雄,吕明德,等. 声诺维(SonoVue)增强超声辐照对 HepG2 细胞膜通透性的影响 [J]. 中国医学影像技术,2005,21(4):510-512.
- [5] 汤庆,徐辉雄,吕明德,等. 声诺维联合超声辐照增强绿色荧光蛋白质粒转染血管内皮细胞的实验研究 [J]. 中国超声医学杂志,2005,21(5):328-331.
- [6] 王天宝,汪建平,董文广,等. CEA 启动子启动双自杀基因与单自杀基因对 Lovo 细胞杀伤作用的比较 [J]. 中山大学学报:医学科学版,2005,26(3):308-311.
- [7] 季加孚. 肝癌的分子生物学诊断与基因治疗的现状与存在的问题 [J]. 中华医学杂志,2003,83(9):724-725.
- [8] Tsuchiyama T, Nakamoto Y, Sakai Y, et al. Optimal amount of monocyte chemoattractant protein-1 enhances antitumor effects of suicide gene therapy against hepatocellular carcinoma by M1 macrophage activation [J]. *Cancer Sci*, 2008,99(10):2075-2082.
- [9] 顾健人. 肝癌的基因治疗:瓶颈与前景 [J]. 中华肝脏病杂志,2002,10(6):406-409.
- [10] Gerolami R, Cardoso J, Lewin M, et al. Evaluation of HSV-TK gene therapy a rat model of chemically induced hepatocellular carcinoma by intratumoral and intrahepatic artery routes [J]. *Cancer Res*, 2000,60(4):993-1001.
- [11] 郝萍,王东林. 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 [J]. 第三军医大学学报,2004,26(20):1857-1859.
- [12] 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 a-fetoprotein gene promoter [J]. *Cancer Res*, 1995,55(14):3105-3109.