

放射诱导启动子的合成与鉴定及质粒 pcDNA3.1(+)/E-CDglyTK 的构建

余东升¹, 黄洪章², 潘朝斌², 王安训³, 王建广²(中山大学 1. 光华口腔医学院·附属口腔医院颌面外科, 2. 附属第二医院口腔科,
3. 附属第一医院口腔科, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】合成放射诱导启动子序列并构建其调控双自杀基因的真核表达质粒 pcDNA3.1 (+)/E-CDglyTK。【方法】利用人工寡核苷酸片段合成放射诱导启动子, 以绿色荧光蛋白(GFP)作为报告基因转染 Tca8113 细胞, 经流式细胞仪鉴定其辐射诱导特性。将 pCEA-CDglyTK 中双自杀基因 CDglyTK 亚克隆到 pcDNA3.1(+), 然后把合成启动子插入到 CDglyTK 上游构建质粒 pcDNA3.1(+)/E-CDglyTK 并酶切鉴定, 阳离子脂质体介导其转染舌鳞癌 Tca8113 细胞, RT-PCR 观察 CDglyTK 表达及诱导放疗的增效作用。【结果】合成启动子序列分析与设计序列完全一致; 低剂量放射线照射可诱导这种人工启动子增强 GFP 在 Tca8113 细胞中的表达; 重组质粒的酶切图谱与预期一致; 3 Gy 放疗显著增强 CDglyTK 在 Tca8113 细胞中的表达。【结论】成功合成放射诱导启动子并构建由其调控双自杀基因的真核表达质粒 pcDNA3.1(+)/E-CDglyTK, 为进一步研究肿瘤放射-基因治疗奠定了基础。

关键词: 放射诱导启动子; 自杀基因; 基因表达; CDglyTK

中图分类号: Q75; R738.05

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)05-0502-04

Synthesis of Radiation-inducible Promoter and Construction of Eukaryotic Cell Expression Recombinant pcDNA3.1(+)/E-CDglyTK

YU Dong-sheng¹, HUANG Hong-zhang², PAN Chao-bin², WANG An-xun³, WANG Jiang-guang²

(1. Department of Oral Maxillofacial Surgery, Hospital of Stomatology, 2. Department of Stomatology, The Second Affiliated Hospital, 3. Department of Stomatology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510055, China)

Abstract: 【Objective】To synthesize the radiation-inducible promoter and construct eukaryotic cell expression recombinant pcDNA3.1(+)/E-CDglyTK. 【Methods】The radiation-inducible promoters were synthesized with man-made complementary digonucleotides. The enhancer regions of the CMV IE gene promoter in pCGFP were replaced by the synthetic promoters to construct the reporter plasmids pE-GFP. Green fluorescence protein (GFP) gene was used as the reporter gene to analyze the radiation-inducible property. CDglyTK gene in pCEA-CDglyTK was subcloned into pcDNA3.1 (+), then the synthetic promoter was inserted before the CDglyTK gene. CDglyTK gene expression in Tca8113 was detected by RT-PCR. 【Results】DNA sequencing analysis proved that the sequence of the radiation-inducible promoter was totally consistent with the designing sequence. The GFP expression in Tca8113 cells transfected with pE-GFP was increased by induction of low dose γ -radiation. The digested product of recombinant pcDNA3.1 (+)/E-CDglyTK proved that the synthetic promoter and CDglyTK gene were subcloned into pcDNA3.1(+) exactly. 3 Gy induction therapy markedly increased CDglyTK gene expression. 【Conclusion】The synthetic promoters are responsive to low dose of ionizing radiation and the CArG elements can serve as a molecular switch to enhance down-stream gene expression. The pcDNA3.1 (+)/E-CDglyTK eukaryotic cell expression recombinant was successfully constructed.

Key words: radiation-inducible promoter; suicide gene; gene expression; CDglyTK

[J SUN Yat-sen(Med Sci), 2005,26(5):502-505]

早期生长反应因子 1 (early growth response-1, Egr-1)启动子序列中的高度保守碱基重复序列 CC

收稿日期: 2004-12-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271423); 广东省自然科学基金资助项目(021865)

作者简介: 余东升(1969-), 男, 湖北安陆人, 博士, 讲师; 黄洪章, 教授, 通信作者, 课题负责人。

(A/T)₆GG 是放射反应模体 (motif), 亦称为 CArG 元件, 可直接感受电离辐射的刺激而诱导其下游基因表达^[1-3]。利用该启动子的放射诱导性来调控其下游治疗基因的靶向表达是近年来发现的一种放射-基因治疗新策略。Weichselbaum 等^[4]将 Egr-1 启动子与 TNF- α 的 cDNA 连接转染肿瘤细胞后, 应用放射线照射成功诱导肿瘤细胞中 TNF- α 表达量显著增加。近来, Marples^[2]报道人工合成单纯含有若干串联的 CArG 元件的 DNA 序列具有与野生型 Egr-1 启动子相同的放射诱导功能, 提示以 CArG 元件为基础而合成的放射诱导启动子有望在基因靶向治疗中发挥分子开关作用。有研究发现 HSV-TK/GCV 及 CD/5-FC 自杀基因治疗系统对 Tca8113 细胞 (口腔鳞癌细胞系) 及其移植瘤有较强的杀伤作用和体内抑瘤作用, 但研究也发现两自杀基因系统并不能完全抑制肿瘤, 同时该治疗缺乏靶向性^[5]。为了提高口腔鳞癌自杀基因治疗的靶向性及疗效, 本研究旨在合成放射诱导启动子并鉴定其放射诱导性, 然后构建放射诱导启动子调控双自杀基因的真核表达质粒, 用以进一步开展放射-基因治疗。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

本实验所用寡核苷酸链由 Songon 公司 (上海) 合成; T-A 克隆质粒载体系统及 T₄DNA 连接酶购自大连 Takara 公司; pCGFP (8225bp) 及 pCEA-CDglyTK 由中山大学法医系提供, pcDNA3.1 (+) 为 Invitrogen 公司出产; 各种限制性内切酶购自 Roche 公司; 质粒 DNA 抽提试剂盒及回收试剂盒为 Gene 公司产品; Lipofectamine™ Reagent 购自 Promega 公司, 大肠杆菌 DH5 及口腔鳞癌 Tca8113 细胞株由本实验室提供; 培养液 RPMI-1640 和胎牛血清为 Hyclone 产品。

1.2 放射诱导启动子的人工合成及序列测定

互补的两条寡核苷酸链 5'-AGATCTGCTAGC (CCATATAAGG)₆TCGCGAA-3 和 5'-TCGCGA (CC TTATATGG)₆GCTAGCAGATCTA-3 各 0.01 nmol 溶于 10 μ L 三蒸水中, 加热到 55 $^{\circ}$ C 维持 5 min 后自然冷却至室温。合成 DNA 序列包含有 6 个串连的 CArG 结构域, 为以后进一步研究需要, 我们在其上游加有 Bgl I 和 Nhe I 酶切位点, 下游加有 Nru I 酶切位点, 同时在 3 端加了一个碱基 A。按照 Takara 公司 pMD18-T vector kit 操作说明将合成启动子序列克隆到 T-vector, 送上海申友公司进

行序列测定。

1.3 人工放射诱导启动子放射诱导特性的鉴定

将经测序确定的合成启动子亚克隆到质粒 pCGFP, 构建含有该启动子启动 GFP 的报告质粒, 称为 pE-GFP, 进行酶切鉴定和序列测定。阳离子脂质体 Lipofectamine™ Reagent 脂质体介导 pE-GFP 转染舌鳞癌细胞 Tca8113, 用 1、3、5、10 Gy 五组剂量 ⁶⁰Co γ -线进行诱导照射, 对照组 Tca8113 细胞转染同种质粒进行但不行照射。细胞 GFP 表达水平用 Becton Dickinson 流式细胞仪 CellQuest 软件分析, 以对照组 Tca8113 细胞 GFP 表达荧光强度作为基准, 放射诱导后各组 GFP 表达水平用其倍增数表示。

1.4 构建真核表达质粒 pcDNA(+)-3.1/E-CDglyTK

扩增抽提并纯化 pCEA-CDglyTK, 用 EcoR I 和 Hind III 酶切得双自杀基因 CDglyTK, 将其亚克隆到 pcDNA3.1 (+) 得重组子 pcDNA3.1 (+)/CDglyTK; 然后对 T-Vector 按照设计酶切位点 Bgl I 和 Nru I 进行酶切, 将其中放射诱导启动子插入到重组子 pcDNA3.1 (+)/CDglyTK 中 CDglyTK 上游, 最后得到放射诱导启动子调控双自杀基因的真核表达质粒 pcDNA3.1 (+)/E-CDglyTK 并进行酶切鉴定。

1.5 RT-PCR 检测 CDglyTK 表达

用阳离子脂质体介导 pcDNA3.1 (+)/E-CDglyTK 转染舌鳞癌 Tca8113 细胞, 然后给予 3 Gy 的放射线照射, 继续培养 40 h 后 RT-PCR 检测 CDglyTK 的 mRNA 表达, 并与未经照射的对照组相比较。CDglyTK 基因的上游引物为 5'-TGTCG AATAAACGCTTTACAAAC-3', 下游引物为 5'-AACGTTTGTAAATGATGGCTTCTG-3', 产物长 1 200 bp。内参 β -actin 的上游引物为 5'-GGTCGGAG TCAACGGATTTGGTCG-3', 下游引物为 5'-CCTCCG ACGCCTG CTTCACCAC-3'。PCR 反应参数为: 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后, 94 $^{\circ}$ C 30 s、58 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 个循环。以 CDglyTK 基因 RT-PCR 电泳条带的灰度值与 β -actin 条带灰度值的比值表示 CDglyTK 基因表达强度。

2 结果

2.1 合成放射诱导启动子测序报告

T-A 克隆菌液送上海申友进行启动子测序, 结果与设计序列完全一致, 为: 5'-AGATCTGCT AGCCCATATAAGGCCATATAAGGCCATATAAGGC CATATAAGGCCATATAAGGCCATATAAGGTCGCG AA-3'。

2.2 pE-GFP 测序鉴定

pE-GFP 测序合成放射诱导启动子被插入到 pCGFP 中 Xba 和 Sal 两酶切位点之间, 见图 1。

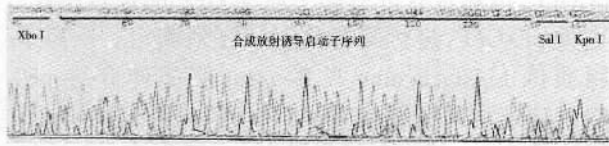


图 1 pE-GFP 测序图谱

Fig.1 Sequence analysis of the synthetic promoter (pE-GFP)

2.3 GFP 的表达

质粒转染 Tca8113 细胞并放射线照射 40 h 后流式细胞仪计数, 发射光波长 514 nm, 激发光波长 488 nm, 每一样品 GFP 表达是由细胞荧光强度与同样质粒转染未照射时细胞荧光强度的比值来表示, 结果表明含有 6 个串联 CARg 结构域的人工启动子在放射线照射下能增强其下游的 GFP 表达。不同剂量放射线照射后基因表达倍增情况见图 2, GFP 表达水平对放射诱导的剂量有依赖性, 但并不是放射剂量越高 GFP 表达越强, 3 Gy 照射量诱导性最强, 荧光强度达到对照组的 161%, 当诱导剂量超过 3 Gy 时, GFP 荧光强度反而下降。

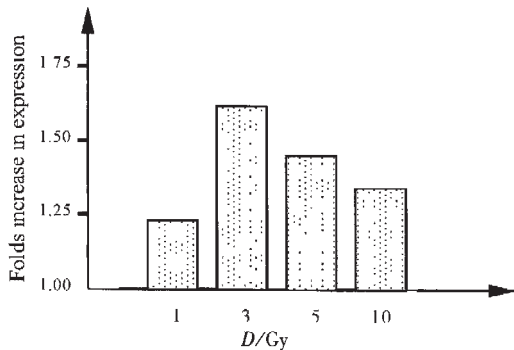


图 2 不同剂量诱导照射转染 pE-GFP 的 Tca8113 细胞后 GFP 表达

Fig.2 Fold increase of GFP expression in Tca8113 cells after pE-GFP transfection and irradiation with different doses

2.4 重组质粒 pcDNA3.1 (+)/E-CDglyTK 酶切鉴定

pcDNA3.1 (+)/E-CDglyTK 经 EcoR 和 Hind 酶切得到两清晰条带, 一条为 2.5 kb 的 CDglyTK, 一条为 5.5 kb 含有放射诱导启动子的载体, 表明 CDglyTK 被成功装载, 见图 3。pcDNA3.1 (+)/E-CDglyTK 经 Nhe 单酶切后同样得到两条带, 证实合成启动子被插入, 因为 pcDNA(+).3.1 自

身只有一个 Nhe 位点, 只有当含有 Nhe 位点的启动子序列被插入后 Nhe 单酶切才可能出现两条带, 且两 Nhe 酶切位点相距约 0.96 kb, 见图 3。

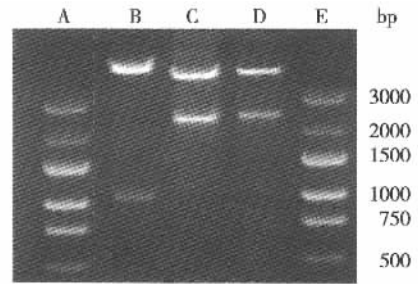


图 3 pcDNA3.1(+)/E-CDglyTK 酶切鉴定

Fig.3 Identification of recombinant plasmid pcDNA3.1 (+)/E-CDglyTK by restriction endonucleases

Lane A and E: DNA marker; Lane B: pcDNA3.1(+)/E-CDglyTK digested by Nhe ; Lane C and D: pcDNA3.1 (+)/E-CDglyTK digested by EcoR 和 Hind

2.5 RT-PCR 结果

RT-PCR 检测结果见图 4, 诱导放疗组细胞 CDglyTK 基因 RT-PCR 产物灰度值为 0.873 ± 0.091, 而对照组细胞中为 0.532 ± 0.075。结果显示, 舌鳞癌 Tca8113 细胞经脂质体转染重组质粒 pcDNA3.1(+)/E-CDglyTK 后, CDglyTK 基因可在该细胞中有效表达, 经两样本均数比较 u 检验, 3 Gy 诱导放疗后显著增强了 CDglyTK 表达水平 (u= 5.83, P< 0.01)。

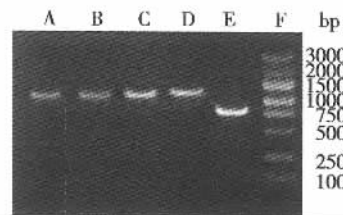


图 4 CDglyTK 基因 RT-PCR 结果

Fig.4 Result of RT-PCR of CDglyTK gene

A and B: control group; C and D: induction therapy group; E: - actin; F: DNA marker

3 讨论

3.1 放射诱导启动子与基因靶向表达

转移基因的表达调控是当今基因治疗研究中亟待解决的关键技术之一。为了使转移的治疗基因仅在肿瘤组织中靶向表达, 防止其对正常组织细胞的损伤, 迫切需要有合适的转移基因体内靶向表达调控手段。近年来有学者利用 Egr-1 启动子

构建辐射诱导基因表达调控系统,并取得了一定的实验效果^[6]。利用该启动子放射诱导特点构建放射诱导基因表达调控系统,它具有如下的优点^[7]:

将基因治疗和放射治疗有机地结合起来;通过准确的定位照射,达到肿瘤靶向治疗;与转录靶向调控机制比较,更适用于多种肿瘤的基因治疗,具有广谱性、简便性,易于临床推广应用;利用亲肿瘤放射性核素作为诱导剂,可望用于转移性肿瘤的基因治疗;电离辐射还可通过提高质粒与细胞基因组之间的非同源重组率,促进质粒整合于细胞基因组等途径显著促进质粒性载体介导的基因转移,并可延长基因的表达时间。为了弄清该启动子放射诱导机制,有学者详细分析人和 BALB/c 鼠 Egr-1 启动子序列,结果发现一种含有 10 个碱基的高度保守 CC(A/T)₆GG 的结构域(亦称 CArG 元件)与辐射诱导密切相关,在人启动子中含有 4 个 CArG 元件,小鼠中 6 个,这种结构域有三种排列形式:CCATATATGG、CCATATAAGG 和 CCTTATTTGG,均可直接感受放射线刺激诱导其下游基因表达,是放射诱导的主要反应模体(motif)。最近,Marples^[2]报道人工合成含有若干串联 CArG 结构域的 DNA 序列具有与野生型 Egr-1 启动子相似的放射诱导功能,甚至这种合成的启动子有更强的诱导能力。本研究结果支持上述观点。CArG 元件作为放射诱导反应模体在放射诱导过程中发挥主导作用,可作为放射诱导分子开关用于治疗基因载体的构建。本研究发现诱导放射剂量为 3 Gy 时,诱导作用最强,随着放射量的增加其诱导作用反而下降,这可能与辐射过大对细胞造成损伤所致。

3.2 构建重组质粒 pcDNA3.1(+)/E-CDglyTK 的意义

放射-基因治疗作为一种新的治疗模式把基因治疗与传统的放疗有机结合在一起,其含义是将可经放射线诱导表达并对肿瘤具有杀伤作用的基因转入肿瘤细胞,对肿瘤局部进行放疗,诱导目的基因定向表达,射线和基因的双重作用达到对肿瘤的靶向治疗。对于不具备辐射诱导特性的基因,将可感受辐射刺激的调控序列与之偶联赋予

其辐射诱导特性。Ralph 等将 Egr-1 启动子与肿瘤坏死因子(TNF)相连用于转染实验动物骨髓 HL525 细胞后将其注射到具有放射抗性的人鳞癌细胞 SG-20B 移植瘤内,放射治疗后疗效较对照组有显著提高。CArG 元件作为一种能赋予下游基因辐射诱导活性的分子开关,该启动子与自杀基因的偶联具有良好的应用前景。本研究构建重组质粒 pcDNA3.1(+)/E-CDglyTK,并证实低剂量的诱导放疗可显著增强 CDglyTK 在 Tca8113 细胞中的表达。我们相信借助日趋完善的三维立体强调适形照射技术可有效控制肿瘤组织照射范围与剂量,从而调控自杀基因靶向表达,提高疗效并减少对正常组织的损伤,为进一步开展放射-基因治疗奠定了基础。

参考文献:

- [1] Scott SD, Joiner MC, Marples B. Optimizing radiation-responsive gene promoters for radio-genetic cancer therapy [J]. *Gene Ther*, 2002, 9(20):1396-402.
- [2] Marples B, Scott SD, Hendry JH, et al. Development of synthetic promoters for radiation-mediated gene therapy [J]. *Gene Ther*, 2000, 7(6):511-7.
- [3] Marples B, Greco O, Joiner MC, et al. Molecular approaches to chemo-radiotherapy [J]. *Eur J Cancer*, 2002, 38(2):231-9.
- [4] Weichselbaum RR, Hallahan ED, Beckett MA, et al. Gene therapy targeted by radiation preferentially radiosensitizes tumor cells [J]. *Cancer Res*, 1994,54(16):4266-9.
- [5] 王安训, 黄洪章. 腺病毒介导 HSV-TK/GCV 系统治疗口腔鳞癌机理的研究[J]. *中山医科大学学报*, 2002,23(1):53-7.
- [6] Kawashita Y, Ohtsuru A, Kaneda Y, et al. Regression of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo by radiosensitizing suicide gene therapy under the inducible and spatial control of radiation[J]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(9):1509-19.
- [7] Paillard F. The control of transgene expression with radiation [J]. *Hum Gene Ther*, 1998, 9(10):1393-4.

(编辑 刘清海)