

[文章编号] 1007-385X(2005)02-0145-04

survivin 启动子的克隆及在 HeLa 细胞中的特异生物活性

吴 冰, 王 燕, 任继鸿, 赵 辉, 张利潮, 张惠中 (第四军医大学唐都医院中心实验室, 西安 710038)

[摘 要] 目的: 构建带有 survivin 启动子的 pGL3Basic 真核表达载体, 探讨 survivin 启动子在 HeLa 细胞中的特异表达活性。方法: 采用 PCR 技术扩增 survivin 启动子, 插入 pGL3Basic 载体, 构建携带 survivin 启动子的 pGL3Basic 真核表达载体 (pGL3Basic/ Survp)。纯化 pGL3Basic/ Survp 质粒, 用脂质体法转染 HeLa 细胞和正常血管内皮细胞 ECV304, 48 h 后收集转染细胞与荧光素酶底物反应, 检测荧光素酶活性。结果: 成功克隆 1 kb survivin 基因启动子, 并构建了携带有 survivin 基因启动子的 pGL3Basic 真核表达载体, 转染后的 HeLa 细胞荧光素酶活性为 2074.2 ± 78.5 , 而 ECV304 荧光素酶活性为 9.7 ± 1.1 。结论: 成功克隆的 survivin 启动子在 HeLa 细胞中表现出较高的肿瘤特异性活性, 为进一步开发肿瘤的靶向基因治疗奠定了基础。[关键词] survivin 基因; 启动子; 基因治疗; HeLa 细胞 [中图分类号] R730.51 [文献标识码] A

Molecular Cloning of Survivin Gene Promoter and Detecting Its Specific Activity in HeLa Cell

WU Bing, WANG Yan, REN Ji-hong, ZHAO Hui, ZHANG Li-chao, ZHANG Hui-zhong (Department of Clinical Diagnosis, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

[Abstract] Objective: To construct pGL3Basic eukaryotic expression vector containing survivin promoter gene and explore the activity of this survivin promoter in Hela cells. Methods: The survivin gene promoter was amplified by polymerase chain reaction and cloned into pGL3Basic vector to construct pGL3Basic eukaryotic expression vector containing survivin gene promoter (pGL3Basic/surp). The purified pGL3Basic/surp was transiently transfected into HeLa cell and vessel endothelial cell line EVC304 using liposome transfection reagent and the activity of survivin gene promoter was determined by adding luciferase substrate into transfected cells 48 hours later. Results: About 1 kb gene fragment was amplified by PCR method from Hela cell genomic DNA and pGL3Basic/surp vector was constructed successfully. The activity of luciferase reporter gene was 2074.2 ± 78.5 in Hela and 9.7 ± 1.1 in EVC304 48 hours after transfection of pGL3Basic/surp vector. Conclusion: The high specific activity of constructed survivin promoter eukaryotic expression vector might be a potential therapeutic reagent for the treatment of malignant tumor. [Key words] surviving; promoter; gene therapy; HeLa cell

利用组织和细胞特异性启动子调控目的基因在靶细胞中特异性的表达, 是解决基因治疗中存在的靶向性问题的一个有效途径^[1]。survivin 是 IAP 家族的新成员。survivin 反义核酸能够降低癌细胞内 survivin 基因的表达, 诱导癌细胞凋亡^[2-3]。其最大特点为 survivin 在多种肿瘤细胞系中高表达^[4], 而不表达于相应的正常组织^[5]。因此, 研究者认为 survivin 启动子可用作肿瘤靶向治疗的工具, 启动下游杀伤基因特异性表达于肿瘤细胞, 从而避免损伤正常细胞。通过以 HeLa 细胞基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 survivin 基因启动

子片断, 构建了携带有 survivin 基因启动子的 pGL3Basic 荧光素酶真核表达载体, 通过转染 HeLa 肿瘤细胞和 ECV304 以探讨 survivin 基因启动子在肿瘤细胞中的特异性表达活性。本实验以此为基础, 研究

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30371445); 陕西省社发计项目(2003K10G44)
[作者简介] 吴 冰(1975-), 男, 甘肃省天水市人, 住院医师, 硕士生, 主要从事肿瘤基因治疗的研究
Email : wbb1124@ yahoo. com. cn
[通讯作者] 张惠中, Email : huizhong@ public. xa. sn. cn

了 survivin 启动子的克隆及在 HeLa 细胞中的特异性表达活性。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

PTC-100 Pelitier Thermal Cycler PCR 仪(MJ Research 公司), TD-20/20 光度计(美国 TD 公司), Uvp GDS-8000 凝胶图像分析仪(英国 Uvp 公司)。质粒提取试剂盒(Wizard plus Minipreps DNA Purification System), PCR 回收试剂盒(Wizard PCR Preps DNA Purification System), pGEM - Teasy 载体连接试剂盒, pGL3-Basic 载体, pGL3-promoter 载体均为 Promega 公司产品。Pyrobest DNA polymerase 酶和限制性内切酶 Sma I、Sac I 及 Hind III 均为 Takara 公司产品, Lipofectamine2000 购自 Introvigen 公司, DL2000DNA Marker 及琼脂糖凝胶购自鼎国生物技术有限公司。HeLa 细胞为本实验室保存, ECV 304 为唐都医院妇产科实验室惠赠, 宿主菌株大肠杆菌 JM109 为本实验室保存。

1.2 HeLa 细胞基因组 DNA 的提取

HeLa 细胞培养于含 10% 小牛血清的完全 1640 培养液, 置 37℃, 5% CO₂ 培养箱。胰蛋白酶消化后离心收集细胞, 弃尽上清, 采用经典的酚 - 氯仿法提取 HeLa 细胞基因组 DNA。

1.3 引物设计及 PCR 扩增

根据 GeneBank 数据库提供的 survivin 基因启动子序列及 pGL3Basic 载体上的酶切位点设计引物: 上游引物带有 Sac I 酶切位点 5 - gcc gag ctc ctg gcc ata gaa cca gag aag tga - 3, 下游引物带有 Hind III 酶切位点 5 - gcc aag ctt cca cct ctg cca acg ggt ccc gcg - 3。引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

以 1 μg HeLa 基因组 DNA 为模板, Pyrobest DNA polymerase 2.5 U, 10 mmol/L dNTP 8 μl, 10 pmol/L 上下游引物各 4 μl, 补水到 100 μl。循环参数为 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 90 s, 58℃ 退火 90 s, 72℃ 延伸 90 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 7 min。取扩增 DNA 样品在 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳 0.5 h, 凝胶图像分析仪分析结果。

1.4 survivin 基因启动子的获得及鉴定

用 PCR 回收试剂盒回收大小约 1 kb 上述 PCR 产物, 用 survivin 基因启动子中的 Sma I 单一酶切位点进行初步酶切鉴定。用 T4DNA 连接酶将 PCR 纯化产物与 pGEM-Teasy 载体相连, 命名为 T/Surp, 将连接好的载体转化 Jm109 感受态大肠杆菌, 蓝白筛选, 取阳性克隆接种于含 5 ml Amp 的 LB 培养液中, 37℃ 振荡过夜。取 800 μl 菌液送上海基康生物技术有限公司测序。

1.5 survivin 基因启动子真核表达载体的构建及细胞

转染

用 Sac I 和 Hind III 分别双酶切 PGL3-basic 载体和 T/Surp 载体, 分别回收目的片断。将回收的 PGL3-basic 线性载体和带有相同酶切位点的 survivin 启动子基因用 T4 DNA 连接酶连接, 构建携带 survivin 基因启动子的 pGL3Basic 真核表达载体, 命名为 pGL3Basic/Surp。转化 Jm109 感受态大肠杆菌扩增, 提质粒行 Sac I 和 Hind III 内切酶酶切鉴定。

(1) 胰蛋白酶消化 HeLa 细胞和 ECV 304 细胞, 计数, 传代于 12 孔细胞培养板中, 每孔 2.0×10^5 个细胞, 各加无血清 DMEM 培养液 800 μl, 待细胞数达到 70% 孔底面积时, 用 pGL3Basic/Surp 和带有 SV40 启动子的对照载体 pGL3-promoter 分别转染 HeLa 和 ECV304 细胞, 每组 3 孔。(2) 用无血清 DMEM 各 300 μl 分别稀释 6 μg 的 survivin-pGL3Basic 和 pGL3-promoter 质粒, 同时用无血清 DMEM 600 μl 稀释 12 μl Lipofectamine 2000。(3) 将质粒稀释液分别与 Lipofectamine 2000 稀释液混匀, 室温放置 30 min 形成 DNA - Lipofectamine2000 复合物。(4) 分别将 100 μl 上述混合液加入 12 孔细胞培养板中, 置于 37℃, 5% CO₂ 培养 48 h。测定荧光素酶的活性。

1.6 荧光素酶活性检测及统计学处理

收集 12 孔板细胞, 弃上清, PBS 洗 2 次, 加入细胞裂解液 100 μl, 室温放置 10 min, 收集细胞, 12 000 g 于 4℃ 离心 2 min, 收集上清。每孔取 20 μl 上清加入 100 μl 荧光素酶反应底物, 在 TD-20/20 光度计上测定相对荧光值, 延迟 2 s, 积分时间 10 s。荧光素酶活性以均值 ± 标准误 (x ± s) 表示。

2 结果

2.1 PCR 扩增 survivin 启动子

以 HeLa 细胞基因组 DNA 为模板, PCR 扩增得到产物, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析可见大小约 1 kb 的特异性条带。用 Sma I 单一酶切可切成 500 bp 左右片断, 结果符合 survivin 启动子基因特征(图 1)。同时测序证实 survivin 启动子基因序列与 GeneBank 中报道完全一致。

2.2 重组表达质粒 T/Surp 和 pGL3Basic/Surp 酶切鉴定

T/Surp 和 pGL3Basic/Surp 重组质粒经 Sac I 和 Hind III 双酶切后均可见到线性载体片断和大小约 1 kb 的 survivin 启动子基因片断(图 2)。测序证实启动子序列完全正确。

2.3 Survivin 启动子调控荧光素酶报告基因表达活性检测

重组表达质粒 pGL3Basic/ Surp 转染 HeLa 细胞 48 h 后,测定荧光素酶活性为 2074.2 ± 78.5 ,而转染 ECV304 血管内皮细胞荧光素酶活性仅为 9.7 ± 1.1 。带有 SV40 启动子的对照载体 pGL3-promoter 质粒转染 HeLa 细胞 48 h 后,荧光素酶活性为 267.0 ± 17.9 。

在 HeLa 细胞中,survivin 基因启动子的荧光素酶活性约为 SV40 启动子荧光素酶活性的 7.5 倍,说明 survivin 基因启动子有较高的启动活性(表 1)。

图 1 survivin 启动子及 Sma I 单酶切鉴定

Fig.1 survivin promoter and digestion analysis with Sma I

1: Survivin promoter digested by Sma I ; 2: Survivin DNA marker; 3: DNA marker

图 2 T/Surp 质粒和 pGL3Basic/ Surp 质粒经 Sac I 和 HindⅢ双酶切

Fig.2 Restriction enzyme digestion analysis of plasmid T/Surp and pGL3Basic/ Surp

1: pGL3Basic/Surp digested by Sae I and HindⅢ ;

2: T/Surp digested by Sae I and HindⅢ ;

3: DL2000 DNA marker

3 讨 论

近年来,肿瘤的基因治疗成为肿瘤防治研究的一

个活跃领域。为了让目的杀伤基因能选择性的表达于肿瘤靶细胞中,从而准确地杀伤肿瘤细胞,保护正常组织,减少毒副作用,对目的基因表达的肿瘤细胞的特异性需要提高。用肿瘤特异性启动子启动目的基因特异性表达于肿瘤细胞是目前常用的方法之一。

表 1 HeLa 和 ECV304 用 pGL3Basic/ Surp 或 pGL3-promoter 转染 48 h 后荧光素酶活性测定

Tab.1 The expression efficiency of luciferase reporter gene in HeLa or ECV304transfected with pGL3Basic/ Surp or pGL3-promoter after 48 h

Plasmid	Cells	Activity of luciferase			
		1	2	3	$\bar{x} \pm s$
pGL3Basic/ Surp	HeLa	2138.2	1986.5	2097.8	2074.2 ± 78.5
pGL3Basic/ Surp	ECV304	9.8	10.7	8.6	9.7 ± 1.1
pGL3-promoter	HeLa	258.1	287.6	255.4	267.0 ± 17.9
pGL3- promoter	ECV304	23.5	21.6	22.9	22.7 ± 0.9

肿瘤特异表达基因启动子调控目的基因进行肿瘤治疗研究已有报道(如癌胚抗原基因启动子^[6]、端粒酶基因启动子^[7]等),但由于其均为弱启动子,目前尚未见到应用于临床的报道。细胞凋亡抑素(survivin)在多数恶性肿瘤中高表达,由于其表达量远高于端粒酶且在相应的正常组织细胞中没有表达,说明该基因启动子的应用有可能提高肿瘤细胞内目的基因表达水平,从而起到特异和高效治疗作用。

本试验从 HeLa 细胞基因组中通过 PCR 的方法成功扩增了 1 kb 大小 survivin 启动子片断,构建了 pGL3Basic/ Surp 荧光素酶真核表达载体,通过转染 HeLa 细胞和并以 ECV304 正常血管内皮细胞作为对照,survivin 启动子在 HeLa 肿瘤细胞活性很强,而在血管内皮正常细胞活性极低。另一方面,通过与 SV40 启动子活性的比较发现,在 HeLa 细胞中,survivin 基因启动子的荧光素酶活性约为 SV40 启动子荧光素酶活性的 7.5 倍,从而表明了本试验所构建的 survivin 启动子在肿瘤细胞具有较强的启动活性,应该能够满足肿瘤基因治疗的活性要求,同时大小为 1 kb 的启动子片段能够方便的克隆到各类病毒性载体,为本课题组利用 survivin 启动子启动反义基因进行肿瘤的治疗奠定了一定的基础。

[参考文献]

[1] Nettelbeck DM, Jerome V, Muller R. Gene therapy: designer promoters for tumour targeting[J]. Trends Genet, 2000, 16(4): 174-181.

[2] 陈 涛, 贾玉容, 赵铁军, 等. 反义寡核苷酸抑制 survivin 基因表达及肝癌细胞生长的研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2004, 11(3): 187-190.

[3] 冯立民, 王建立, 乌新林, 等. 单独及联合转染 survivin 和 bcl-2 反义寡核苷酸诱导胆囊癌细胞凋亡的研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2004, 11(4): 248-251.

[4] Adida C, Crotty PL, McGrath J, *et al.* Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation[J]. *Am J Pathol*, 1998, 152(1): 43-49.

[5] Konno R, Yamakawa H, Utsunomiya H, *et al.* Expression of survivin and Bcl-2 in the normal human endometrium[J]. *Mol Hum Reprod*, 2000, 6(6): 529-534.

[6] Scholz IV, Cengic N, Baker CH, *et al.* Radioiodine therapy of colon cancer following tissue-specific sodium iodide symporter gene transfer[J]. *Gene Ther*, 2005, 12(3): 272-280.

[7] Jacob D, Davis JJ, Zhang L, *et al.* Suppression of pancreatic tumor growth in the liver by systemic administration of the TRAIL gene driven by the hTERT promoter[J]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12(2): 109-115.

[收稿日期] 2004 - 12 - 09

[修回日期] 2005 - 03 - 20

[本文编辑] 韩 丹