

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2005 )04-0258-04

## 尿路斑块蛋白 Ib 启动子启动 Smac 表达的膀胱癌特异性及活性

廖贵益, 曾甫清, 岳相辉, 杜岳锋, 汪 良 ( 华中科技大学同济医学院附属协和医院泌尿外科, 武汉 430022 )

[ 摘 要 ] **目的:** 研究尿路斑块蛋白 Ib 启动子启动 Smac 表达的膀胱癌特异性及活性。**方法:** 采用 RT-PCR 和免疫组化方法分别检测膀胱癌细胞株 BIU-87 和其他多种非膀胱癌细胞株在转染含尿路斑块蛋白 Ib 启动子和 Smac 基因的真核表达质粒 pcDNA3-UpIb promoter-Smac 前后 Smac mRNA 和蛋白质的表达变化。**结果:** BIU-87 在转染后 Smac mRNA 的表达比转染前增强约 2.1 倍, Smac 蛋白表达阳性细胞率也由转染前的约 25.6% 增加为转染后的约 70.5%; 非膀胱癌细胞株转染前后 Smac mRNA 及蛋白质的表达没有显著性变化。**结论:** 尿路斑块蛋白 Ib 启动子启动 Smac 表达具有膀胱癌靶向性及相当启动活性, 为膀胱癌的靶向基因治疗研究奠定了基础。

[ 关键词 ] 尿路斑块蛋白; 线粒体促凋亡蛋白; 膀胱癌; 膀胱肿瘤

[ 中图分类号 ] R737.14 [ 文献标识码 ] A

## The Bladder Cancer-Specificity and Activity of the Expression of Smac Gene Promoted by UPIb Promoter

LIAO Gui-yi, ZENG Fu-qing, YUE Xiang-hui, DU Yue-feng, WANG Liang ( Department of Urology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China )

[ Abstract ] **Objective:** To investigate the bladder cancer-specificity and activity of the expression of Smac gene promoted by UpIb promoter. **Methods:** Smac mRNA and protein were detected in BIU87 cell line and many other non-bladder cancer cell lines before and after transfection with pcDNA3-UpIb promoter-Smac including UpIb promoter and Smac gene by RT-PCR and immunohistochemical method, respectively. **Results:** The expression of Smac mRNA in BIU87 cell line increased about 2.1 times after transfection. The Smac protein positive cell rate of BIU-87 cell line was about 25.6% before transfection and it increased to about 70.5% after transfection. There was no significant difference about the expression of Smac mRNA and protein in non-bladder cancer cell lines before and after transfection. **Conclusions:** UpIb promoter could promote the expression of Smac gene with bladder cancer-specificity and considerable activity, which laid the foundation of target gene therapy for bladder cancer.

[ Key words ] Uroplakin; Smac; bladder cancer; bladder neoplasm

我们采用 RT-PCR 和免疫组化方法分别检测膀胱癌细胞株 BIU-87 和其他多种非膀胱癌细胞株在转染含尿路斑块蛋白 Ib( uroplakins Ib, UpIb )启动子和 Smac ( second mitochondria derived activator of caspase, caspase 的第二个线粒体激活因子 )基因的真核表达质粒 pcDNA3-UpIb promoter-Smac 前后 Smac mRNA 和蛋白质的表达变化, 以研究 UpIb 启动子启动 Smac 表达的膀胱癌特异性及活性。

### 1 材料与方

#### 1.1 细胞株、pcDNA3-UpIb promoter-Smac 质粒

人膀胱癌细胞株( BIU-87 )、人肾小管上皮细胞株( HMC)、人宫颈癌细胞株( HeLa)、人骨髓瘤细胞株( MG63)、人乳腺癌细胞株( MFC)、人前列腺癌细胞株( PC-3)和人胚肺成纤维细胞株( MRC-5)均由协和医院中心试验室常规保存。含有人类 Smac 全长基因的

[ 基金项目 ] 国家自然科学基金( 基金编号 30271301 )

[ 作者简介 ] 廖贵益( 1973- ), 男, 湖北人, 在读博士, 主要从事膀胱肿瘤方面的研究, E-mail: liaoguiyi2@sina.com

[ 通讯作者 ] 曾甫清, E-mail: zengfuqing@hotmail.com

真核表达质粒 pcDNA3.1-Smac 由美国 Wang Xiaodong 博士惠赠。UpIb 启动子由本课题组前期克隆并鉴定。将 pcDNA3.1-Smac 中本身的人类巨细胞病毒(CMV)和 T7 启动子切除,替换为 UpIb 启动子购建新质粒 pcDNA3-UpIb promoter-Smac,已由本课题组前期完成。

### 1.2 pcDNA3-UpIb promoter-Smac 质粒转染细胞

各细胞株用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基进行常规培养。取每一细胞株对数生长期的细胞各接种 2 个六孔板,第 1 板不作转染作为转染前组,第 2 板备转染 pcDNA3-UpIb promoter-Smac 质粒作为转染后组。第 2 天待细胞至 90%~95% 满,取各细胞株的第 2 板按照 Lipofectamine 2000 转染试剂盒(Invitrogen 产品)转染 pcDNA3-UpIb promoter-Smac 质粒,取转染后第 2 天细胞进行试验。

### 1.3 RT-PCR 检测各细胞株转染前后 Smac mRNA 的表达

按照 Trizol 试剂(购自上海生物工程技术有限公司)操作说明提取各孔细胞的总 RNA。逆转录和 PCR 两步法完成。取 2  $\mu$ g 总 RNA 建立逆转录体系,之后取 2  $\mu$ g cDNA 建立 PCR 体系。PCR 循环条件为:加 Taq 酶前 95 $^{\circ}$ C 5 min,加 Taq 酶后 94 $^{\circ}$ C 45 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,29 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。Smac 引物设计参照文献[1],P1:5'-ATG CTC GAG GCG TTG ATT GAA GCT ATT ACT GAA TAT-3',P2:5'-AGC CGG ATC CTC AAA TGG GTA AGA GCA GCT GTA CAG AGT-3'。内参照基因为人  $\beta$ -actin,引物设计参照文献[2],P1:5'-AAACACCCCAGCCATG TACCT-3',P2:5'-GTGCTGCTGAAGCTGTAGC-3'。Smac 引物和  $\beta$ -actin 引物均由上海捷倍思基因技术有限公司合成。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,MGIAS-1 000 多媒体凝胶成像系统(购自深圳华锐科技公司)进行灰度分析并拍照,以 Smac 条带与相应  $\beta$ -actin 条带的灰度比值表示 Smac mRNA 的表达强度。分别检测各细胞株每板中的每孔细胞,取 6 孔的平均值。

### 1.4 免疫组化检测各细胞株转染前后 Smac 蛋白的表达

细胞爬片的制备:在将各细胞株接种到 6 孔板前,将经常规准备、1 cm $\times$ 1 cm 的盖玻片置入各板的每个孔中。之后的实验步骤同上述 1.2,转染后第 2 天取出细胞爬片,4% 甲醛固定备免疫组化检测。

#### 1.4.1 细胞爬片的免疫组化检测

免疫组化检测采用过氧化物酶标记的链霉卵白素(streptavidin/peroxidase, SP)法。兔抗人 Smac 多克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品,工作浓度 1:100。SP 试剂盒和 DAB 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公

司。SP 免疫组化实验参照说明书操作。以胃癌组织阳性切片作为阳性对照,磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照。结果显示,细胞质内出现特异性棕黄色或棕褐色染色为阳性标准。Smac 蛋白表达以细胞染色比率和强度进行判断:(-):细胞无着色;(±):细胞质内微弱染色;(+):细胞质的 10%~90% 中度或强染色;(++):细胞质内中度或强染色 >90%。( - ~ ± ) 为阴性表达,( + ~ ++ ) 为阳性表达。每张爬片随机取 5 个高倍视野( $\times 200$ ),计数每个视野阳性细胞数,求 5 个视野的均值为每张爬片中阳性细胞率。分别检测每细胞株 6 孔中的细胞爬片,取 6 孔的平均值代表该细胞株的阳性细胞率。

### 1.5 统计学方法

两小样本均数间的比较应用方差分析和 *t* 检验,采用 spss11.0 软件。

## 2 结果

### 2.1 RT-PCR 检测各细胞株转染 pcDNA3-UpIb promoter-Smac 质粒前后 Smac mRNA 的表达

各细胞株转染前后均可见 Smac (437 bp)和  $\beta$ -actin (227 bp)条带,BIU-87 在转染后 Smac 条带的亮度增加,而其他细胞株在转染前后条带亮度无明显变化(图 1)。进一步行 Smac 条带与  $\beta$ -actin 条带灰度比值分析,各细胞株组平均灰度比值结果见表(1),BIU-87 在转染后灰度比值增强约 2.1 倍( $P < 0.05$ ),而其他细胞株转染后灰度比值无显著变化( $P > 0.05$ )。可见,BIU-87 转染 pcDNA3-UpIb promoter-Smac 质粒后 Smac mRNA 的表达显著增加,而其他非膀胱癌细胞株转染 pcDNA3-UpIb promoter-Smac 后 Smac mRNA 的表达无显著变化,表明 UpIb 启动子启动 Smac 表达具有膀胱癌细胞特异性,能够使膀胱癌细胞中 Smac 的表达增强约 2.1 倍。

### 2.2 免疫组化检测各细胞株转染前后 Smac 蛋白的表达

Smac 蛋白阳性着色为细胞质内出现特异性棕黄色或棕褐色染色。BIU-87 在转染前大部分细胞的胞浆微弱着色,少数细胞为阳性着色,而转染后胞浆阳性着色的细胞数明显增多(图 2)。其他各细胞株在转染前后胞浆阳性着色的细胞数未见明显增多。进一步细胞染色比率和强度分析各细胞株转染前后阳性细胞率见表(2),BIU-87 转染 pcDNA3-UpIb promoter-Smac 质粒后与转染前比阳性细胞率显著增加( $P < 0.05$ ),而其他各细胞株转染前后阳性细胞率无显著变化( $P > 0.05$ )。

**表 1 RT-PCR 产物凝胶电泳分析各细胞株转染前后 Smac 条带与  $\beta$ -actin 条带的平均灰度比值**  
**Tab.1 The average density ratio of Smac band to  $\beta$ -actin band by gel electrophoresis analysis for RT-PCR product of every cell line before and after transfection( $\bar{x} \pm s$ )**

Average density ratio	BIU-87	HMC	Hela	MG63	MFC	PC-3	MRC-5
Before transfection	0.2525 $\pm$ 0.0307	0.6548 $\pm$ 0.0204	0.3002 $\pm$ 0.0140	0.2994 $\pm$ 0.0221	0.2541 $\pm$ 0.0108	0.3119 $\pm$ 0.0801	0.7102 $\pm$ 0.0904
	0.7859 $\pm$ 0.0501 $\Delta$	0.7105 $\pm$ 0.0121*	0.3115 $\pm$ 0.0210*	0.3012 $\pm$ 0.0112*	0.2987 $\pm$ 0.0305*	0.3058 $\pm$ 0.0801*	0.6997 $\pm$ 0.0112*

$\Delta P < 0.05, * P > 0.05$

**图 1 RT-PCR 检测各细胞株转染 pcDNA3-UpIb promoter-Smac 质粒前后 Smac mRNA 的表达**  
**Fig.1 The expression of Smac mRNA in every cell line before and after transfection with plasmid pcDNA3-UpIb promoter-Smac**

M: Marker; 1: BIU-87; 2: HMC; 3: Hela;  
 4: MG63; 5: MFC; 6: PC-3; 7: MRC-5

### 3 讨论

近年来已经明确,肿瘤发生不仅与细胞异常增殖有关,而且与细胞凋亡障碍密切相关<sup>[3]</sup>。线粒体途径

是细胞凋亡通路的重要途径之一,Smac 是新近发现的一种由线粒体释放的凋亡相关蛋白<sup>[1,4]</sup>。当线粒体接受凋亡信号后,Smac 蛋白的线粒体定位信号肽被切除,形成有活性的 Smac 蛋白释放入细胞胞质中,成熟的 Smac 蛋白可以特异结合凋亡抑制蛋白(IAPs, inhibitor of apoptosis),如 XIAP,解除 IAPs 对于 caspase3, caspase9 等的活性抑制作用,从而促进凋亡。而肿瘤包括膀胱癌普遍存在 Smac 的表达降低,因此,提高膀胱肿瘤细胞中 Smac 的表达可望通过促进凋亡达到治疗肿瘤的目的。

按照上述思路,本课题组在以前的研究中将含有人类 Smac 全长基因的真核表达载体 pcDNA3.1-Smac 质粒转染人膀胱癌 T24 细胞株,观察到 Smac 表达明显增强及显著的促癌细胞凋亡作用<sup>[5]</sup>,表明通过基因转染可提高膀胱癌细胞中 Smac 的表达并有相当的抗癌效用。但 pcDNA3.1-Smac 质粒中调控 Smac 表达的是在真核细胞中普遍具有较高启动活性的 CMV/T7<sup>[6]</sup>启动子,缺乏膀胱癌特异性,不能靶向膀胱癌细胞表达 Smac 而特异性地促进膀胱癌细胞凋亡,也会在正常细胞中表达 Smac 对正常细胞产生损伤。因此,CMV/T7 启动子调控的 pcDNA3.1-Smac 表达质粒对 Smac 的表达缺乏膀胱癌定向性。

**表 2 转染前后各细胞株平均 Smac 蛋白阳性细胞率**

**Tab.2 The mean Smac protein positive cell rate of every cell line before and after transfection( $\bar{x} \pm s$ )**

Smac protein positive cell rate	BIU-87	HMC	Hela	MG63	MFC	PC-3	MRC-5
Before transfection	25.6% $\pm$ 5.1%	78.2% $\pm$ 3.2%	28.9% $\pm$ 3.2%	31.8% $\pm$ 3.3%	22.8% $\pm$ 3.1%	29.5% $\pm$ 2.4%	80.1% $\pm$ 4.3%
	70.5% $\pm$ 4.3% $\Delta$	77.7% $\pm$ 3.4%*	32.1% $\pm$ 4.1%*	29.7% $\pm$ 2.2%*	25.6% $\pm$ 4.4%*	28.7% $\pm$ 3.1%*	78.8% $\pm$ 5.2%*

$\Delta P < 0.05, * P > 0.05$

图2 BIU-87 转染前后 Smac 蛋白表达染色图(×200)

**Fig.2 The staining pattern of Smac protein in BIU-87 cells before and after transfection**

(cells cultured on slide, sp, ×200)

A: Before transfection; B: After transfection

现在转基因治疗中,一个重要的问题是基因的定向性表达。目前主要有两个战略,一是用基因工程手段改造基因运载体,使它可识别靶细胞表面的抗原或者受体决定簇;另一是选用细胞专一性的基因表达调控元件,使基因只能在一定靶细胞中表达。尿路斑块蛋白(uroplakins, Ups)是尿路移行上皮腔面存在的一种特有的分化特异性糖蛋白,包括 Up I, Up II, Up III, 其中 Up I 有两种异构体,Up I a 和 Up I b。2002 年 Jonathon Olsburgh 等<sup>[7]</sup>对 UpIb 的基因结构与启动子进行了研究,发现自第一外显子往 5' 方向的总共 234 bp 的系列(含第一外显子)有高启动活性。另外,UpIb 启动子短小,易于将其克隆并其重组到表达载体。因此我们将 pcDNA3.1-Smac 中的 CMV 和 T7 启动子切除替换为 UpIb 启动子,构建成了 UpIb 启动子调控 Smac 表达的新质粒 pcDNA3-UpIb promoter-Smac,欲使之具有膀胱癌定向表达的特性。

本实验从 mRNA 和蛋白质水平分别检测膀胱癌细

胞株 BIU-87 转染 pcDNA3-UpIb promoter-Smac 质粒前后 Smac 的表达,转染后 Smac mRNA 的表达较转染前增强约 2.1 倍,Smac 蛋白表达阳性细胞率也由转染前的约 25.6% 增加为转染后的约 70.5%。表明新构建的质粒 pcDNA3-UpIb promoter-Smac 能在膀胱癌细胞中成功表达 Smac,并有相当的表达活性。本实验同时还选择人宫颈癌细胞株、人骨髓瘤细胞株、人乳腺癌细胞株、人前列腺癌细胞株及正常细胞株人肾小管上皮细胞株、人胚肺成纤维细胞株为对象,检测它们在转染 pcDNA3-UpIb promoter-Smac 质粒前后 Smac mRNA 及蛋白的表达没有显著性变化。提示 UpIb 启动子在其他非膀胱癌细胞中不会启动 Smac 的表达,具有膀胱癌特异性。

总之,本实验提示新构建的质粒 pcDNA3-UpIb promoter-Smac 既能够在膀胱癌细胞中成功高效表达 Smac,又具有膀胱癌定向表达的特性,该靶向表达质粒配合凋亡诱导药物的应用可望成为有应用前景的膀胱癌靶向基因治疗措施。

**[ 参 考 文 献 ]**

- [ 1 ] Du C, Fang M, Li Y, *et al.* Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition[ J ]. *Cell*, 2000, 102( 1 ): 33-42.
- [ 2 ] Sarzani R, Salvi F, Pietrucci F, *et al.* Absence of somatic mutations in natriuretic peptide receptor type a gene in human aldosterone-secreting adenomas[ J ]. *J Mol Endocrinol*, 2003, 31( 6 ): 317-326.
- [ 3 ] Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy[ J ]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55( 3 ): 178-194.
- [ 4 ] Gulbins E, Dreschers S, Bock J. Role of mitochondria in apoptosis[ J ]. *Exp Physiol*, 2003, 88( 1 ): 85-90.
- [ 5 ] 曾甫清,汪良,陈方敏,等. 线粒体促凋亡蛋白促进化疗药物诱导膀胱癌细胞凋亡的分子学机理研究[ J ]. *中华泌尿外科杂志*, 2004, 25( 10 ): 655-658.
- [ 6 ] 李月琴,朱嘉明,李弘剑,等. T7 启动子具有真核生物聚合酶 II 顺式作用因子的功能[ J ]. *遗传学报*, 2000, 5( 27 ): 455-461.
- [ 7 ] Olsburgh J, Weeks R, Selby P, *et al.* Human uroplakin I b gene structure and promoter analysis[ J ]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1576( 1-2 ): 163-170.

[ 收稿日期 ] 2005 - 09 - 10

[ 修回日期 ] 2005 - 10 - 10

[ 本文编辑 ] 王莹