

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2007 )03-0287-04

· 短篇论著 ·

# Probasin 启动子的克隆及其在不同肿瘤细胞系中的表达活性

## Cloning of Probasin promoters and their expression in different tumor cell lines

张 翔,郝晓柯\*,刘家云,苏明权(第四军医大学西京医院检验科,西安 710032)

**[ 摘要 ]** **目的:** 构建 Probasin (PB) 启动子调控的 pGL3 表达载体, 比较两种不同组成形式的 Probasin 启动子的组织特异性和活性。**方法:** 提取大鼠前列腺组织 DNA, 通过 PCR 得到 Probasin 启动子(-426, +28bp) 序列, 并通过交叠 PCR 得到改造的 ARR2PB 序列, 分别插入 pGL3-Basic 表达载体, 同时构建 CMV 启动的荧光素酶载体 P3.1-LUC 作为阳性对照, 并用 pEGFP-N2 载体做转染效率对照, 用脂质体法把构建好的 PB-pGL3 载体、ARR2PB-pGL3 以及 P3.1-LUC 分别转染人前列腺癌细胞 LNCap、PC-3, 以及 HeLa 宫颈癌细胞和张氏肝细胞等 4 种不同的细胞系, 用荧光显微镜检测荧光素酶的表达量。**结果:** 经酶切鉴定及测序后证实所构建的载体正确。观察各个细胞系中转染 pEGFP-N2 后都有绿色荧光的表达; 荧光素酶在前列腺癌细胞系中的表达量高于其他组织来源的细胞系, 而且其中激素依赖性的 LNCap 细胞中的荧光素酶表达量明显高于非激素依赖性细胞 PC3; ARR2PB-pGL3 载体的荧光素酶表达量明显高于 PB-pGL3 载体。**结论:** 由 Probasin 启动子调控的 pGL3 表达载体具有前列腺组织特异性, 两种不同组成形式的 Probasin 启动子中以 ARR2PB 的启动活性为佳。

**[ 关键词 ]** 前列腺癌; 启动子; 基因治疗; Probasin 基因**[ 中图分类号 ]** R730.23 **[ 文献标志码 ]** A

近年来前列腺癌发病率逐年增高, 基因治疗前列腺癌是目前研究的热点, 而寻找高效特异的启动子则是基因治疗研究的关键。Probasin (PB) 启动子是自大鼠前列腺背外侧叶细胞核中分离出的一种蛋白质的调控序列<sup>[1]</sup>, 其调控作用具有前列腺组织特异性。利用这种组织特异性, 可以为前列腺癌的基因治疗提供有效的方法。本研究构建了由两种不同组成形式的 Probasin 启动子调控的荧光素酶表达载体, 转染至不同的细胞系, 并比较其组织特异性及活性, 为前列腺癌的基因治疗提供实验基础。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 主要试剂和细胞系

SD 大鼠, 雄性, 5~6 周龄, 体重 90 g, 购自第四军医大学实验动物中心(实验动物合格证号为: SCXK 军 2002-005); LNCap、PC-3 人前列腺癌细胞、HeLa 宫颈癌细胞、张氏肝细胞系和 *E. coli* DH5 $\alpha$  菌种为本室保存; 限制性内切酶 *Sac* I、*Hind* III、*Bam*H I 购自大连宝生物公司; 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒及荧光素酶检测试剂盒均购自 Promega 公司; 新生牛及胎牛血清为杭州四季青公司产品; RPMI 1640、DMEM 细胞培养液、Lipofectamine 2000 转染试剂及真核表达载体 pcDNA3.1-hisA 购自美国 Invitrogen 公司, 克隆载体 pMD18-T vector 购自大连宝生物公司, 荧光素酶载体 pGL3-Basic 由第四军医大学生化教研室张健博士惠赠。

#### 1.2 PB 和 ARR2PB 启动子的克隆

提取 SD 大鼠前列腺基因组 DNA, 设计正义引物为: 5'-cgtctagAAGCTTCCACAAGTGCATTAGCC-3'; 反义引物为: 5'-acgaccggtCTGTAGGTATCTGGACCTCACTG-3', 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 69 °C 1 min, 72 °C 45 s, 33 个循环; 72 °C 10 min; PCR 产物约 454 bp, 克隆到 T 克隆载体 pMD18-T vector 中并测序鉴定。然后以得到的 PB 启动子为模版, 以 PCR 的方法扩增, 引物 P1 5'-cgtctaga ATGATAGCATCTTGTTTC-3' 和引物 P2 5'-ACATGATGACTA ACATTGTGTTCAT-3', 反应条件为 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 45 s, 72 °C 45 s, 33 个循环; 72 °C 10 min; PCR 产物约 149 bp。再以 PB 启动子为模版, 以 PCR 的方法扩增, 引物 P3 5'-ATGACA-CAATGT TAGTCATCATGT-3' 和引物 P4 5'-acgaccggtCTGTAGGTATCTGGACCTCACTG-3', 反应条件为 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 56 °C 45 s, 72 °C 45 s, 33 个循环; 72 °C 10 min; PCR 产物约 314 bp。将以上所得两产物等摩尔混合作为模版, 分别以引物 P1 和 P4 做交叠 PCR (overlap-PCR), 反应条件为 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 65 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 32 个循环; 72 °C 7 min; PCR 产物约 463 bp, 克隆到 pMD18-T vector 中并测序鉴定。测序结果与正确的 ARR2PB 启动子序列核对。

**[ 作者简介 ]** 张 翔 (1980-), 女, 湖南长沙人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤分子生物学的研究

\* Corresponding author. E-mail: haoxkg@fmmu.edu.cn

### 1.3 荧光素酶报告基因载体的构建及鉴定

把含有 PB 和 ARR2PB 启动子正确序列的载体 pMD18-T vector 和 pGL3-Basic 空载体首先用 *Sac* I、*Hind* III 切割,经 T4 DNA 连接酶连接,连接产物转化感受态细胞, Amp 抗性筛选阳性克隆,摇菌扩增质粒,经限制性内切酶 *Sac* I、*Hind* III 酶切鉴定。然后用 *Hind* III、*Bam*H I 双酶切荧光素酶载体 pGL3-Basic,把切下的约 2 000 bp 的荧光素酶基因片段和经过同样双酶切的由 CMV 启动子调控的 pcDNA3.1hisA 载体用 T4 连接酶连接,构建由 CMV 启动子启动的对照载体,连接产物转化感受态大肠杆菌扩增质粒,经 *Hind* III、*Bam*H I 切割鉴定。

### 1.4 细胞培养

LNCap、PC3 人前列腺癌细胞, HeLa 宫颈癌细胞用 RPMI 1640 培养液;张氏正常肝细胞系用 DMEM 培养液,除 LNCap 细胞使用胎牛血清外,细胞培养条件均为含 10% 新生牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的培养液,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 下培养,常规传代。实验用细胞均为对数生长期。

### 1.5 重组质粒转染细胞

将 LNCap、PC3、HeLa 以及张氏正常肝细胞按每孔  $5 \times 10^4$  铺 24 孔板,待细胞长至 90% 时按照 Lipofectamine 2000 产品说明书将重组载体 PB-pGL3、ARR2PB-pGL3 以及 P3.1-LUC 转染至各种细胞,以 pGL3-Basic 空载体作为阴性对照并设未转染对照,每孔加质粒 0.8 μg、脂质体 2 μl。以上各组细胞均同步共转染 pRL-TK 海肾荧光素酶质粒进行内对照,用量每孔 0.1 μg。同时将 pEGFP-N2 载体转染上述各细胞系作为转染效率的对照。转染 6 h 后将无血清无抗生素的培养液换为完全培养液。

### 1.6 PB 和 ARR2PB 启动子组织特异活性的测定

转染 48 h 后, PBS 洗涤,按荧光素酶检测试剂盒操作步骤处理细胞,收集上清。依次加入 20 μl 细胞裂解物和 100 μl LAR (Luciferase Assay Reagent, Promega),用荧光素酶测定仪检测上述各种细胞系荧光素酶的表达量,每次测定重复 3 次。每组细胞重复 3 次实验。测定值用 pRL-TK 海肾荧光素酶值进行转染效率的校正。

### 1.7 统计学处理

SPSS 10.0 软件进行分析,采用两小样本 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 PB 和 ARR2PB 启动子的获得

经 PCR 和交叠 PCR 获得 PB 启动子和 ARR2PB 启动子分别扩增出大小为 454 bp 和 463 bp 的片段

(图 1)。将两段产物克隆入 pMD18-T 载体后,测序结果表明,与 GenBank 中启动子序列完全一致。

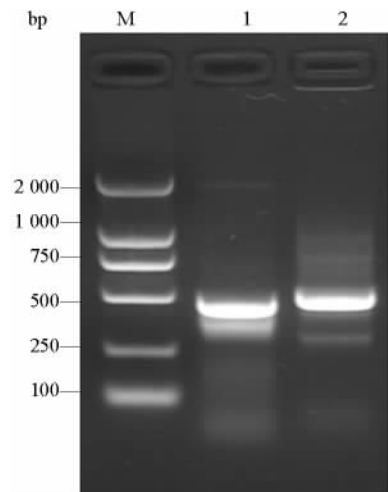


图 1 SD 大鼠 Probasin 启动子基因的 PCR 产物  
M: DNA marker; 1: PB 启动子; 2: ARR2PB 启动子

### 2.2 PB-pGL3、ARR2PB-pGL3 和 P3.1-LUC 载体的成功构建

PB 和 ARR2PB 启动子与 pGL3-Basic 经过酶切、连接、转化等步骤后,经限制性内切酶 *Sac* I、*Hind* III 切割分别释放出 454 bp 和 463 bp 的启动子片段;而构建的 P3.1-LUC 载体经限制性内切酶 *Hind* III、*Bam*H I 切割出一条约 2 000 bp 的片段,与荧光素酶基因片段相符(图 2),证实载体构建成功。

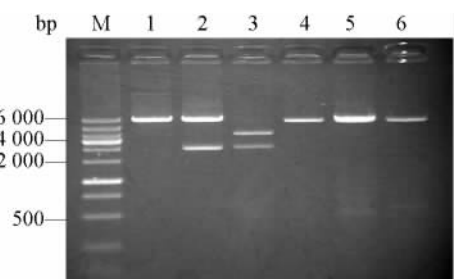


图 2 构建 P3.1-LUC、PB-pGL3 和 ARR2PB-pGL3 荧光素酶载体的酶切鉴定

M: DNA marker; 1: pcDNA3.1hisA; 2: 经 *Bam*H I / *Hind* III 酶切的 P3.1-LUC; 3: 经 *Bam*H I / *Hind* III 酶切的 pGL3-Basic; 4, 5: 经 *Sac* I / *Hind* III 酶切的 pGL3-Basic、PB-pGL3; 6: 经 *Sac* I / *Hind* III 酶切的 ARR2PB-pGL3

### 2.3 PB 和 ARR2PB 启动子的前列腺组织特异性

结果(图 3)显示,荧光素酶在前列腺癌细胞系的表达量高于其他组织来源细胞系( $P < 0.05$ ), HeLa 宫颈癌细胞和张氏肝细胞中几乎看不到荧光素酶表达。在前列腺细胞系中,激素依赖性 LNCap 细

胞中的荧光素酶明显高于非激素依赖性细胞 PC3 ( $P < 0.05$ ),说明启动子受雄激素的调控。比较 PB 和 ARR2PB 两个启动子的荧光素酶的表达,后者表达量明显高于前者 ( $P < 0.05$ )。

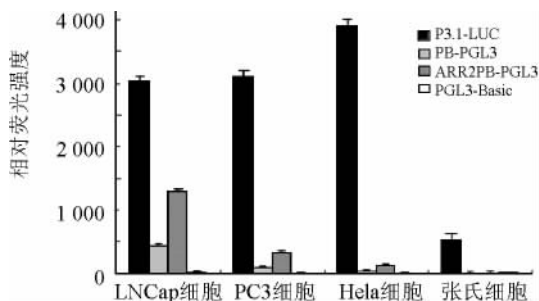


图3 PB 和 ARR2PB 启动子在不同细胞系中的表达活性

### 3 讨论

近年来的研究发现,可以通过组织或细胞特异性启动子来调控基因的特异性表达。外源性治疗用的目的基因在导入细胞后,靶细胞内存特异的转录激活因子可作用于其组织特异性的启动子激活治疗基因的转录,使之表达;而其他非靶细胞导入这些细胞的外源基因不表达。目前,肿瘤特异性启动子调控目的基因进行肿瘤治疗研究已有报道,被选择用于靶向性表达的启动子多为那些在特定肿瘤细胞中过表达或特异性表达蛋白基因的启动子,如黑色素瘤中的酪氨酸酶(Tyr)基因启动子、结直肠癌及肺癌中的癌胚抗原(CEA)基因启动子、肝细胞癌中的甲胎蛋白(AFP)基因启动子等。另外,Jian 等<sup>[2]</sup>利用人端粒逆转录酶(hTERT)基因启动子介导 Bax 基因靶向性抗肿瘤也大大完善了其他一些启动子的不足。

Probasin 是一种自大鼠背外侧叶前列腺细胞核中分离出的蛋白质。氨基酸序列分析表明它属于 lipocalin 超家族(一种配体转运蛋白)。免疫组织化学研究表明,这种蛋白质位于前列腺上皮细胞内和前列腺分泌液中<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>表明 PB 结构基因全长为 17.5 kb,包含有 7 个外显子,6 个内含子及 426 bp 的上游调节序列,而其 5'端的片段(-426 至 +28 bp)主要调控着 PB 的表达。因此,国外学者将-426 至 +28 bp 的 PB 基因片段称为 rPB 启动子。实验证实 PB 启动子可以驱动外源基因在活体前列腺组织内或体外培养的前列腺细胞特异的表达并受到雄激素调节,因而被应用于前列腺癌基因治疗的研究中。人们已用含有 Probasin 基因的启动子驱动 SV40 大 T 抗原的载体转入小鼠胚胎细胞成功地建立了前列腺癌动物模型( TRAMP )<sup>[5]</sup>,还有人用同样

方法使 Cre 基因特异地在前列腺组织中表达。吕英谦等<sup>[6]</sup>将 Probasin 基因启动子和在前列腺癌细胞中高表达成纤维细胞生长因子(FGF)8b 反义 cDNA 克隆到逆转录病毒载体中,使前列腺癌细胞生长增殖速度减慢,体外侵袭能力下降。

为了提高启动子的活性,研究了不同连接形式的 PB 启动子<sup>[7-8]</sup>。ARR2PB 包含两个雄激素反应区,实验证明可以专一地作用于前列腺组织并且有很强的被雄激素诱导的能力<sup>[9]</sup>,目前是一种很好组成形式的调控前列腺基因表达的 PB 启动子,它比其他形式的启动子活性更高<sup>[10]</sup>。

本实验成功克隆(-426 pb, +28 pb)的 PB 启动子,并且通过交叠 PCR 技术连接两个雄激素反应区(ARR)得到了 ARR2PB 启动子。为了观察比较启动子的活性,把得到的两个启动子克隆入 pGL3-Basic 载体。pGL3-Basic 载体含有荧光素酶基因序列,并且载体本身不包含启动子,克隆入启动子后可用荧光素酶定量直观地比较两个启动子的活性及其在各种不同种类细胞系中表达的组织特异性,灵敏度很高,从而克服了用荧光显微镜观察绿色荧光不能定量的不足。检测结果证实,ARR2PB 启动子的活性明显高于 rPB 启动子,它们都有前列腺的组织特异性,只在前列腺癌细胞中表达,而在其他种类的癌细胞系以及正常组织的细胞中检测到荧光素酶的量很低,几乎不表达;并且它们在激素依赖性的前列腺细胞中表达明显高于非激素依赖的前列腺癌细胞,说明两者都受到雄激素的诱导调节。在克隆得到的两个启动子中,ARR2PB 启动子在活性方面要优于 rPB 启动子,其原因可能是由于 ARR2PB 启动子包含有两个雄激素反应区,对雄激素的反应更加敏感所致。而有相关文献<sup>[8]</sup>报道,构建了包含 3 个雄激素反应区的 ARR3tk 启动子,虽然活性比 rPB 启动子高了几近 10 倍,但其针对前列腺组织的特异性也大大下降了。如何在提高启动子启动活性的同时还保持其较高的组织特异性是目前正待解决的问题。综合比较,ARR2PB 在高活性的同时还保留了较高的组织特异性,因此是一种比较理想的 Probasin 启动子,在下一步的实验中可以选择 ARR2PB 启动子来进一步研究其他方面的功能。

### [参考文献]

- [1] Matuo Y, Nishi N, Negi T, et al. Isolation and characterization of androgen-dependent non-histone chromosomal protein from dorsolateral prostate of rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1982, 109(2): 334-340.
- [2] Gu J, Kagawa S, Takakura M, et al. Tumor-specific transgene ex-

- pression from the human telomerase reverse transcriptase promoter enablestargeting of the therapeutic effects of the Bax gene to cancer [ J ]. *Cancer Res*,2000 ,60( 19 ):5359-5364.
- [ 3 ] Spence AM, Sheppard PC, Davie JR, *et al.* Regulation of a bifunctional mRNA results in synthesis of secreted and nuclear probasin [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989 ,86( 20 ): 7843-7847.
- [ 4 ] Greenberg NM, DeMayo FJ, Sheppard PC, *et al.* The rat probasin gene promoter directs hormonally and developmentally regulated expression of a heterologous gene specifically to the prostate in transgenic mice[ J ]. *Mol Endocrinol* ,1994 , 8( 2 ): 230-239.
- [ 5 ] Greenberg NM, DeMayo F, Finegold MJ . Prostate cancer in transgenic mouse[ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1995 , 92( 8 ): 3439-3443.
- [ 6 ] 吕英谦, 毛泽斌, 周艳艳, 等. 组织特异性启动子介导的反义 FGF8bRNA 对前列腺癌细胞生长增殖能力的影响[ J ]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2002,18( 6 ):755-761.
- [ 7 ] Yu D, Jia WW, Gleave ME, *et al.* Prostate-tumor targeting of gene expression by lentiviral vectors containing elements of the probasin promoter[ J ]. *Prostate*, 2004 , 59( 4 ): 370-382.
- [ 8 ] Snoek R, Bruchovsky N, Kasper S, *et al.* Differential transactivation by the androgen receptor in prostate cancer cells [ J ]. *Prostate*,1998 , 36( 4 ): 256-263.
- [ 9 ] Zhang J, Thomas TZ, Kasper S, *et al.* A small composite probasin promoter confers high levels of prostate-specific gene expression through regulation by androgens and glucocorticoids *in vitro* and *in vivo*[ J ]. *Endocrinology* 2000,141( 12 ): 4698-4710.
- [ 10 ] Kakinuma H, Bergert ER, Spitzweg C, *et al.* Probasin promoter ( ARR2PB )-driven, prostate-specific expression of the human sodium iodide symporter ( h-NIS ) for targeted radioiodine therapy of prostate cancer[ J ]. *Cancer Res*,2003 , 63( 22 ): 7840-7844.
- [ 收稿日期 ] 2007 -01 -30 [ 修回日期 ] 2007 -04 -30  
[ 本文编辑 ] 王莹

## · 科技动态 ·

## 树突状细胞通过交互提呈 IL - 15 预激活 NK 细胞

自然杀伤(NK)细胞又称大颗粒淋巴细胞,在机体的抗感染免疫以及肿瘤免疫中发挥着重要的作用。然而在生理和不同病理条件下,NK细胞活化的细胞和分子机制尚不清楚。该文作者利用树突状细胞(DCs)特异性删除小鼠模型,首次在体内证实了NK细胞同B细胞、T细胞一样,也需要归巢进入引流淋巴结;NK细胞在淋巴结中由DCs预激活后回到外周发挥效应功能。在这一过程中DCs发挥着不可或缺的作用,而DC表面表达的IL-15R $\alpha$ 和其自身分泌的IL-15相互作用是该效应中重要的分子机制。

作者首先证明了DCs在NK细胞活化过程中的必要性。用TLR的配体刺激野生型小鼠后能够预激活NK细胞,使后者能够杀伤靶细胞及分泌IFN- $\gamma$ ;但在DCs剔除的小鼠却不能,在李斯特菌和病毒感染的DCs剔除小鼠中也不能够检测到效应性NK细胞。同样,剔除小鼠由CD16介导的NK细胞抗体依赖细胞介导的ADCC功能也受到损伤,提示在NK细胞的预激活中高表达CD11c的DCs是必需的。由于在DCs敲除的同时也剔除了巨噬细胞的两个亚群,但是将巨噬细胞过继回输到这种DCs剔除小鼠体内,发现NK的杀伤活性并没有恢复。相反,回输了野生型小鼠DCs之后,NK细胞则重新表现出对靶细胞的杀伤以及分泌IFN- $\gamma$ 的功能,提示巨噬细胞在NK细胞的预激活中并不是必需的。为证明NK细胞自身表达的TLR并没有参与NK的预激活,作者构建了一种嵌合体小鼠,其体内NK细胞一半是野生型的,另一半是MyD88<sup>-/-</sup>或Ticam<sup>-/-</sup>NK细胞,发现TLR信号通路缺陷的NK细胞表现出与野生型完全一致的生物学特性。综上所述,提示只有DCs细胞才是NK细胞预激活中所必需的。

作者进一步研究了DCs对NK细胞预激活效应发生的场所。实验观察到小鼠在局部受到炎症信号的刺激后,外周NK细胞特异性向引流淋巴结归巢,8h后在肝肺等外周器官能够检测到具有杀伤活性的NK细胞,而用抗CD62L的抗体阻断了NK进入淋巴结之后,在外周没有能够发现效应性NK细胞,提示NK细胞必需进入引流淋巴结,在淋巴结中与DCs相互作用后才能被预激活,然后到外周发挥效应功能。

作者最后对DCs预激活NK细胞的分子机制进行了研究。发现在IFN $\alpha$ R缺陷的小鼠用各种TLR的配体刺激后,不能够观察到NK细胞的预激活,在DCs与NK细胞的共培养体系中阻断了I型干扰素信号后NK细胞也不能被激活,提示I型干扰素信号在DC预激活NK细胞中是不可或缺的。为排除NK细胞自身干扰素信号的作用,作者在体外分离纯化了小鼠NK细胞,用高浓度I型干扰素刺激也不能够激活,IFN $\alpha$ R缺陷的NK细胞回输到野生型小鼠后也能够正常被预激活,说明I型干扰素信号必须通过DCs的中介发挥作用。在体外实验中,IFN $\alpha$ R缺陷的DCs不能够预激活NK细胞,进一步证实了作者的观点。同时还发现,I型干扰素能够刺激DCs上调IL15R $\alpha$ 的表达和IL-15的分泌,DC细胞正是通过交互递呈IL-15,对NK起到了预激活作用。

NK细胞作为一种固有免疫系统的淋巴细胞,并不像我们以前设想的那样能够直接杀伤靶细胞,而是同介导获得性免疫的T细胞一样需要DCs的预激活作用。NK细胞的预激活能够最大程度地发挥其免疫监视作用,从而对基于NK细胞的免疫治疗有着重要的指导作用。