

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.05.006

## hTERT 启动子调控的异种抗原基因 $\alpha$ -1,3GT 表达载体的构建及其在肺癌细胞中的靶向表达

朱圣明<sup>1,2</sup>, 郑 鸿<sup>1</sup>, 秦 凤<sup>1</sup>, 王 宇<sup>1</sup>, 王 竹<sup>1</sup>, 骆志国<sup>2</sup>, 丁 璐<sup>2</sup>, 王艳萍<sup>1\*</sup> (1. 四川大学华西医院 肿瘤分子诊断研究室, 四川 成都 610041; 2. 郧阳医学院附属太和医院 肿瘤科, 湖北 十堰 442000)

**[摘要]** 目的: 构建人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)启动子调控的异种移植抗原  $\alpha$ -1,3 半乳糖基转移酶( $\alpha$ -1,3 galactosyltransferase,  $\alpha$ -1,3GT)基因真核表达载体, 研究其调控的  $\alpha$ -1,3GT 在肿瘤细胞中的靶向表达。方法: 将前期克隆并测序正确的猪  $\alpha$ -1,3GT 基因定向克隆到 pEGFP-hTERTp 质粒中, 构建  $\alpha$ -1,3GT 真核表达载体 pEGFP-hTERTp-GT。分别将 pEGFP-hTERTp-GT 和 CMV 启动子调控的  $\alpha$ -1,3GT 真核表达质粒 pEGFP-N1-GT 转染端粒酶阳性的人肺癌细胞 A549 及端粒酶阴性的正常人胚肺成纤维细胞 MRC-5。RT-PCR 检测转染细胞中  $\alpha$ -1,3GT mRNA 的表达, 免疫荧光法和流式细胞仪检测  $\alpha$ -gal 抗原的表达。结果: 成功构建了 pEGFP-hTERTp-GT 真核表达载体。转染 pEGFP-N1-GT 的 A549 和 MRC-5 中均有  $\alpha$ -1,3GT mRNA 的表达; 转染 pEGFP-hTERTp-GT 的 A549 中有  $\alpha$ -1,3GT mRNA 的表达, 而端粒酶阴性的 MRC-5 细胞中无  $\alpha$ -1,3GT mRNA 的表达。转染 pEGFP-N1-GT 的 A549 和 MRC-5 中均可表达异种移植抗原  $\alpha$ -gal; 转染 pEGFP-hTERTp-GT 质粒的 A549 中有  $\alpha$ -gal 的表达, 而 MRC-5 细胞中无  $\alpha$ -gal 的表达 ( $P < 0.01$ )。结论: hTERT 启动子调控的  $\alpha$ -1,3GT 基因能靶向性表达在端粒酶阳性的肺癌细胞中, 并合成异种移植抗原  $\alpha$ -gal。

**[关键词]** 人端粒酶逆转录酶; 肺肿瘤;  $\alpha$ -半乳糖基;  $\alpha$ -1,3 半乳糖基转移酶; 靶向性表达

**[中图分类号]** R735.9; R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2009)05-0452-06

## Construction of xenoantigen $\alpha$ -1, 3GT gene expression vector regulated by hTERT promoter and its targeting expression in human lung cancer cells

ZHU Sheng-ming<sup>1,2</sup>, ZHENG Hong<sup>1</sup>, QIN Feng<sup>1</sup>, WANG Yu<sup>1</sup>, WANG Zhu<sup>1</sup>, LUO Zhi-guo<sup>2</sup>, DING Jun<sup>2</sup>, WANG Yan-ping<sup>1\*</sup> (1. Institute of Tumor Molecular Diagnosis, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China; 2. Department of Oncology, Affiliated Taihe Hospital, Yunyang Medical College, Shiyan 442000, Hubei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To construct an xenoantigen synthetase  $\alpha$ -1,3 galactosyltransferase ( $\alpha$ -1,3GT) eukaryotic expression vector regulated by human telomerase catalytic subunit (hTERT) promoter, and to investigate its targeting expression of  $\alpha$ -1,3GT in lung cancer cell lines. **Methods:** Previously prepared and confirmed pig  $\alpha$ -1,3GT gene was inserted into pEGFP-hTERTp plasmid to construct eukaryotic expression vector pEGFP-hTERTp-GT. pEGFP-hTERTp-GT and pEGFP-N1-GT ( $\alpha$ -1,3GT eukaryotic expression vector under the control of CMV promoter) were transfected into telomerase-positive human lung adenocarcinoma A549 cells and telomerase-negative human embryonic lung fibroblast MRC-5 cells. 1,3-GT mRNA expression in the transfected cells was detected by RT-PCR. Expression of  $\alpha$ -gal antigen in transfected cells was examined by immunofluorescence and flow cytometry. **Results:** pEGFP-hTERTp-GT eukaryotic expression vector was successfully constructed. Both A549 and MRC-5 cells transfected with pEGFP-N1-GT showed expression of  $\alpha$ -1,3GT mRNA; A549 cells but not telomerase-negative MRC-5 cells expressed  $\alpha$ -1,3GT mRNA after transfection with pEGFP-hTERTp-GT. Furthermore, both A549 and MRC-5 cells transfected with pEGFP-N1-GT showed expression of xenoantigen  $\alpha$ -gal; A549 but not MRC-5 cells expressed xenoantigen  $\alpha$ -gal after transfection with pEGFP-hTERTp-GT ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:**  $\alpha$ -1,3GT gene under the regulation of hTERT promoter can be specifically expressed in telomerase-positive lung cancer cell lines, which can induce production of xenoantigen  $\alpha$ -gal.

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 30270589, No. 30470762)。Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30270589, No. 30470762)

**[作者简介]** 朱圣明(1979-),男,湖北十堰人,硕士,助教,主要从事肿瘤靶向基因治疗研究

\* 通信作者( Corresponding author)。E-mail: huyongwp@vip.sina.com

[ **Key words** ] human telomerase reverse transcriptase ( hTERT ); lung neoplasms;  $\alpha$ -galactosyl (  $\alpha$ -gal );  $\alpha$ -1,3 galactosyltransferase; targeting expression

[ Chin J Cancer Biother, 2009, 16( 5 ): 452-457 ]

$\alpha$ -半乳糖基(  $\alpha$ -galactosyl,  $\alpha$ -gal )是广泛存在于猪、牛等非灵长类动物细胞表面糖脂和糖蛋白分子上的 Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-R 碳链结构。由于  $\alpha$ -gal 合成所需的  $\alpha$ -1,3 半乳糖基转移酶(  $\alpha$ -1,3galactosyltransferase,  $\alpha$ -1,3*GT* )的缺陷,人、猿及旧世界猴不表达  $\alpha$ -gal,但人体中存在着大量能特异性结合  $\alpha$ -gal 的天然抗体<sup>[1]</sup>。研究证实猪器官移植到人体后,人体血清内预存的抗体迅速和表达  $\alpha$ -gal 的猪组织细胞结合,通过补体依赖的细胞毒作用( complement dependent cytotoxicity, CDC ),引发强烈的宿主抗移植超急性排斥反应<sup>[2]</sup>。鉴于此,可通过基因导入,在人肿瘤细胞上重新表达异种移植抗原  $\alpha$ -gal,利用人体天然存在的抗体及补体,诱发类似于异种移植排斥反应的抗肿瘤效应<sup>[3,4]</sup>。

如何使  $\alpha$ -gal 抗原只在肿瘤细胞中表达,以避免血清对正常组织的损伤,即靶向性问题,是此治疗策略最终用于人体治疗必须解决的问题。近年来,越来越多的研究者认为<sup>[5]</sup>,利用启动子在转录水平上调控目的基因特异性表达来实现肿瘤靶向治疗具有很好的可行性和可靠性。据报道<sup>[6]</sup>90% 以上的肿瘤细胞端粒酶呈现阳性表达,而大多数正常细胞端粒酶表达阴性。在端粒酶 3 个组成部分中,人端粒酶逆转录酶( human telomerase reverse transcriptase, hTERT )只在肿瘤细胞中表达。因此,利用 hTERT 启动子调控目的基因在肿瘤细胞中靶向表达,有望成为肿瘤靶向治疗的重要手段之一。

本研究将全长的猪  $\alpha$ -1,3*GT* 基因定向插入到 hTERT 启动子下游,成功构建了 hTERT 启动子调控的  $\alpha$ -1,3*GT* 真核表达载体 pEGFP-hTERT-GT,转染正常人胚肺成纤维细胞 MRC-5 和人肺癌细胞 A549 后,利用 RT-PCR、荧光显微镜及流式细胞仪检测 hTERT 启动子调控  $\alpha$ -1,3*GT* 表达的肿瘤靶向性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞株、细菌和质粒

大肠杆菌 JM109 由四川大学华西医院肿瘤分子诊断实验室提供。端粒酶阳性的人肺癌细胞株 A549<sup>[7]</sup>用含有 15% 新生小牛血清的 RPMI 1640 培养基培养。端粒酶阴性的人胚肺成纤维细胞株 MRC-5<sup>[7]</sup>购自中国典型培养物保存中心,用含有 15% 新生小牛血清的 DMEM 培养基培养。pMD18-

T- $\alpha$ -1,3*GT* 是含版纳微型猪  $\alpha$ -1,3*GT* 基因的载体,pEGFP-N1-GT 是 CMV 启动子调控的  $\alpha$ -1,3*GT* 表达质粒,pEGFP-hTERTp 是 hTERT 启动子调控的 EGFP 表达质粒,上述 3 个质粒均为本课题组在前期工作中构建<sup>[8-9]</sup>。

### 1.2 主要实验试剂和设备

RPMI 1640、DMEM 培养基、脂质体转染试剂盒 lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 和总 RNA 提取试剂盒 TRIzol 均为 Invitrogen 公司产品,质粒 DNA 小量抽提 Ultra-Pure<sup>TM</sup> 试剂盒为赛百盛公司产品,M-MLV 逆转录酶为 Promega 产品,KOD-Plus DNA 多聚酶系日本 Toyobo 公司产品,限制性核酸内切酶以及 DNA 连接试剂盒 DNA Ligation Kit 均为 Takara 公司产品,DNA 回收试剂盒为 V-gene 公司产品,荧光素标记的植物凝集素( fluorescence isothiocyanate conjugated griffonia simplicifolia isolectin B4, FITC-BS-IB4 )为 Vector 公司产品。荧光倒置显微镜为 Olympus IX -71 型。

### 1.3 pEGFP-hTERTp-GT 真核表达载体的构建

图 1 为 pEGFP-hTERTp-GT 构建示意图。将含有 pEGFP-hTERTp 和 pMD18-T- $\alpha$ -1,3*GT* 质粒的菌种活化,抽提质粒,*Eco*R I 和 *Kpn* I, 37 °C 双酶切过夜。pMD18-T- $\alpha$ -1,3*GT* 双酶切产物经琼脂糖凝胶电泳,回收约 1.1 kb 的  $\alpha$ -1,3*GT* 基因片段。纯化回收酶切后的 pEGFP-hTERTp 骨架载体。将上述 pMD18-T- $\alpha$ -1,3*GT* 酶切产物与 pEGFP-hTERTp 酶切骨架载体以  $\alpha$ -1,3*GT*: pEGFP-hTERTp 为 3: 1 的摩尔比,16 °C 连接过夜。取连接反应液 10  $\mu$ l 转化感受态细菌 JM109,用 SOC 培养液 37 °C 恒温箱培养 1 h 后,涂布于含 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 平板,37 °C 培养过夜。挑取单菌落,于含 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养液中,37 °C 恒温振荡培养过夜,抽提质粒。*Eco*R I 和 *Kpn* I 双酶切法,*Eco*R I、*Kpn* I 单酶切法和 PCR 法鉴定 pEGFP-hTERTp-GT。同时活化含质粒 pEGFP-N1-GT 的菌种,分别扩增和抽提质粒 pEGFP-N1-GT、pEGFP-hTERTp-GT 备用。

### 1.4 细胞转染

在 96 孔培养板内按  $1 \times 10^4$ /孔和  $2 \times 10^4$ /孔分别接种 A549 和 MRC-5 细胞,用不含抗生素但含 15% 小牛血清的 DMEM 培养基培养 24 h,至细胞铺满孔底 95% 时,用不含血清和抗生素的 DMEM 培养基洗 2 次。按每孔 0.2  $\mu$ g 质粒/0.5  $\mu$ l 脂质体,用

无血清、无抗生素的 DMEM 培养基分别稀释脂质体和 pEGFP-hTERTp-GT 质粒至 25  $\mu$ l, 室温 5 min。将稀释后的脂质体和质粒混合并轻柔混匀, 室温静置 20 min。加入脂质体-DNA 混合物 50  $\mu$ l/孔, 轻轻混匀。培养 6 h 后向孔中加入等体积的含 30% 小牛血清的无抗生素 DMEM 培养基, 24 h 后直接免疫法观察转染细胞中  $\alpha$ -gal 的表达。在 30 cm<sup>2</sup> 培养瓶中用 pEGFP-hTERTp-GT 和 pEGFP-N1-GT 转染 A549 和 MRC-5 细胞, 转染 48 h 后用于  $\alpha$ -1,3GT mRNA 表达的分析或流式细胞仪检测  $\alpha$ -gal 的表达水平。

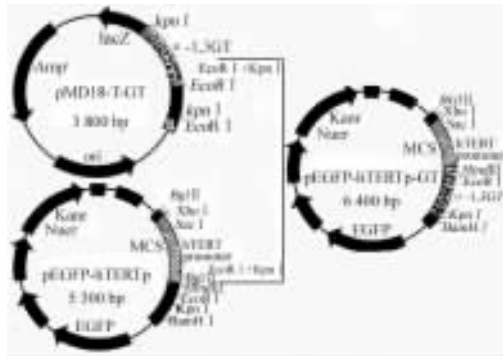


图 1 pEGFP-hTERTp-GT 载体构建示意图

Fig.1 Schematic diagram of pEGFP-hTERTp vector

### 1.5 检测 $\alpha$ -1,3GT 的表达

1.5.1 RT-PCR 检测  $\alpha$ -1,3GT mRNA 的表达 取上述转染细胞及未转染细胞, PBS 洗 2 遍, 3 mmol/L EDTA 消化细胞, TRIzol 提取总 RNA。紫外分光光度计测 D260/D280, 以总 RNA 为模板, 逆转录后, 根据 Genebank 中猪  $\alpha$ 1,3-GT 的 CDS 序列 (NM\_213810) 及人内对照 ( $\beta$ -actin) CDS 设计扩增引物, F1: 5'-TCAATGCTGCTTGCTCTCA-3', R1: 5'-TAGTGCCTTCCCATA-3' (扩增 300 bp 的  $\alpha$ -1,3GT 片段); F2: 5'-GACTACCTCATGAAGATC-3', R2: 5'-GATCCACATCTGCTGGAA-3' (扩增 500 bp 的  $\beta$ -actin 片段)。以逆转录得到的 cDNA 模板进行 PCR 反应, 条件如下: 94  $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94  $^{\circ}$ C 30 s, 50  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 33 个循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5.2 直接免疫荧光法观察转染细胞中  $\alpha$ -gal 的表达 植物凝集素 FITC-BS-IB4 能和  $\alpha$ -gal 特异性结合, 故本实验采用荧光素标记的凝集素 (FITC-BS-IB4, 1 mg/ml) 检测转染细胞中  $\alpha$ -gal 的表达。取上述 96 孔板中转染的 A549 细胞和 MRC-5 细胞, PBS 洗 2 次, 加入用 RPMI 1640 培养基按 1:50 稀释后的 FITC-BS-IB4 100  $\mu$ l, 室温下避光孵育 15 min。PBS

洗 2 遍, 于倒置荧光显微镜下观察转染细胞中  $\alpha$ -gal 的表达情况。

1.5.3 流式细胞仪分析细胞中  $\alpha$ -gal 的表达 3 mmol/L 的 EDTA 消化收集 30 cm<sup>2</sup> 培养瓶中的转染细胞悬液, 1% BSA-PBS 液洗涤。每  $1 \times 10^6$  细胞加入含 8 g FITC-BS-IB4 的 1% BSA-PBS 液 300  $\mu$ l, 重悬细胞, 4  $^{\circ}$ C 避光 1.5 h; 1% BSA-PBS 洗涤细胞数次。加入 300  $\mu$ l 甲醛固定液 (1% BSA-PBS 液 + 1% 多聚甲醛) 重悬细胞, FACS 上机检测。每组细胞设置 3 个平行对照, 计算平均阳性率。

### 1.6 统计分析处理

数据用均数  $\pm$  标准差表示, 采用软件 SPSS13.0 进行 t 检验分析。

## 2 结果

### 2.1 表达载体 pEGFP-hTERTp-GT 的鉴定

pEGFP-hTERTp-GT 单酶切鉴定显示其大小约 6.4 kb, 双酶切电泳鉴定显示大小分别约 5.3 kb 和 1.1 kb 的 DNA 条带, 以 pEGFP-hTERTp-GT 质粒为模板的 PCR 得到 1.1 kb 的 DNA 条带, 上述结果与预期相符 (图 2)。

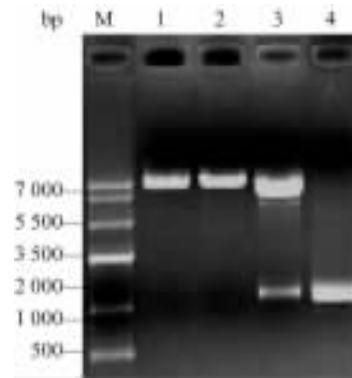


图 2 pEGFP-hTERTp-GT 的酶切和 PCR 鉴定

Fig.2 Identification of pEGFP-hTERTp-GT by endonuclease digestion and PCR

M: DNA maker; 1: EcoR I; 2: Kpn I; 3: EcoR I and Kpn I; 4: PCR of  $\alpha$ -1,3GT

### 2.2 hTERT 启动子调控 $\alpha$ -1,3GT mRNA 在端粒酶阳性 A549 细胞中的靶向表达

转染 pEGFP-N1-GT 的端粒酶阴性的 MRC-5 细胞和端粒酶阳性的 A549 细胞中均有  $\alpha$ -1,3GT mRNA 的表达; 而转染 pEGFP-hTERTp-GT 后, 仅在 A549 细胞中有  $\alpha$ -1,3GT mRNA 表达, 端粒酶阴性的 MRC-5 细胞中无此基因的表达 (图 3)。

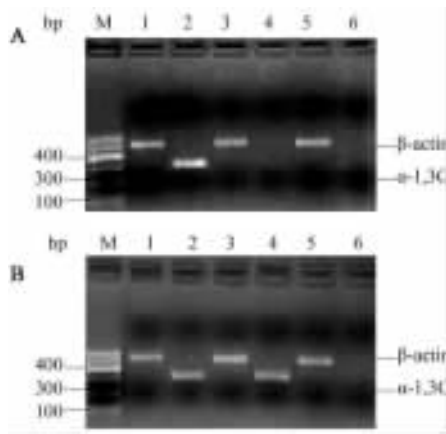


图3 MRC-5 和 A549 转染细胞中  $\alpha$ -1,3GT mRNA 的表达  
**Fig. 3 Expression of  $\alpha$ -1,3GT mRNA in transfected MRC-5 and A549 cells**  
 A: MRC-5; B: A549; M: Maker; 1, 2: pEGFP-N1-GT; 3, 4: pEGFP-hTERTp-GT; 5, 6: Untransfected cells

### 2.3 hTERT 启动子调控 $\alpha$ -1,3GT 基因在端粒酶阳性 A549 细胞中靶向合成 $\alpha$ -gal

端粒酶阳性的 A549 细胞和端粒酶阴性的 MRC-5 细胞中分别转染质粒 pEGFP-hTERTp-GT 和 pEGFP-N1-GT 后,倒置荧光显微镜下观察发现(图4):转染 pEGFP-N1-GT 的 A549 和 MRC-5 细胞膜上均有 FITC-BS-IB4 的结合,提示  $\alpha$ -gal 的表达;转染 pEGFP-hTERTp-GT 的 A549 细胞上有  $\alpha$ -gal 的表达,而 MRC-5 细胞膜上无  $\alpha$ -gal 的表达。流式细胞仪的结果(图5)也显示:转染 pEGFP-N1-GT 的 A549 细胞和 MRC-5 细胞上  $\alpha$ -gal 表达百分率分别为(50.6%  $\pm$  3.9)%和(29.7%  $\pm$  3.9)%;转染 pEGFP-hTERTp-GT 的 A549 细胞可检测高达到(37.1%  $\pm$  4.1)%的  $\alpha$ -gal 表达,而端粒酶阴性的 MRC-5 细胞上仅有本底水平的  $\alpha$ -gal 表达( $P < 0.05$ )。

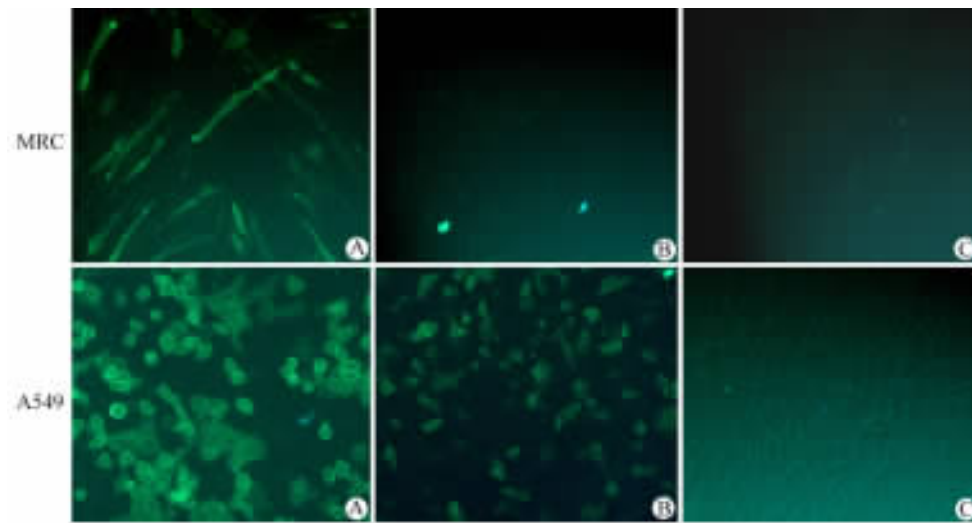


图4 MRC-5 和 A549 转染细胞中  $\alpha$ -gal 的表达(  $\times 100$  )  
**Fig. 4 Expression of  $\alpha$ -gal in transfected MRC-5 and A549 cells(  $\times 100$  )**  
 A: pEGFP-N1-GT; B: pEGFP-hTERTp-GT; C: Untransfected cells

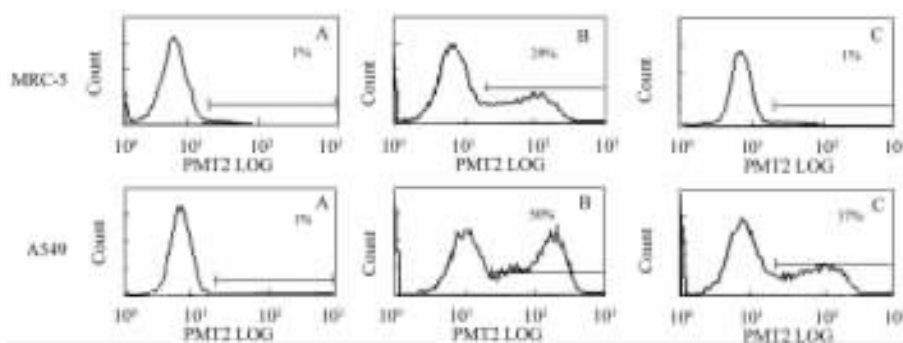


图5 流式细胞仪检测 MRC-5 和 A549 转染细胞中  $\alpha$ -gal 的表达  
**Fig. 5 Expression of  $\alpha$ -gal in transfected MRC-5 and A549 cells as detected by FACS**  
 A: Untransfected cells; B: pEGFP-N1-GT; C: pEGFP-hTERTp-GT

### 3 讨论

人体由于负责催化合成  $\alpha$ -gal 抗原的酶基因  $\alpha$ -1,3GT 的突变而不表达  $\alpha$ -gal, 但在长期进化过程中, 人体含有  $\alpha$ -gal 特异性抗体 (anti-gal)<sup>[10]</sup>。 $\alpha$ -gal 和 anti-gal 在人体的特殊分布阻碍了异种器官移植的应用, 当猪的器官如肝脏, 移植到人体后, 人体预存的 anti-gal 抗体迅速和猪组织的  $\alpha$ -gal 结合, 通过 CDC 途径引发严重的免疫排斥反应。

在异种器官移植中寻求各种手段克服这一排斥反应的同时, 一些研究者尝试通过  $\alpha$ -1,3GT 基因的导入策略, 在人肿瘤细胞上表达外源性  $\alpha$ -gal 表位, 模拟异种器官移植排斥反应的机制, 用于肿瘤治疗<sup>[11-13]</sup>。本研究在前期工作中<sup>[8]</sup>, 从版纳微型猪肝脏中提取总 RNA, RT-PCR 扩增出  $\alpha$ -1,3GT cDNA 全长序列并克隆到测序载体, 构建了 CMV 启动子调控的猪  $\alpha$ 1,3-GT 真核表达载体 pEGFP-N1-GT。测序结果显示: 版纳微型猪  $\alpha$ -1,3GT cDNA 全长 1 116 bp, 与小鼠、牛的  $\alpha$ 1,3-GT 序列高度同源<sup>[14]</sup>, 与普通家猪  $\alpha$ -1,3GT cDNA 四种异构体中最完整的序列完全一致<sup>[15]</sup>。在此基础上本研究构建了 hTERT 启动子调控的猪  $\alpha$ 1,3-GT 真核表达载体 pEGFP-hTERTp-GT。将上述两种不同启动子调控的  $\alpha$ 1,3-GT 表达质粒转染至端粒酶阳性的人肺癌细胞株 A549 中, 发现在转染 pEGFP-hTERTp-GT 和 pEGFP-N1-GT 的 A549 细胞中分别有 (37.1%  $\pm$  4.1)% 和 (50.6%  $\pm$  5.2)% 的细胞表达  $\alpha$ -gal 抗原。

$\alpha$ -1,3GT 基因作为一个有效的目的基因, 导入到肿瘤细胞中可表达  $\alpha$ -gal, 从而与人体天然 anti-gal 抗体结合, 激活补体, 显示出一定的抗肿瘤疗效<sup>[16-18]</sup>。但和其他目的基因如肿瘤自杀基因、凋亡基因用于肿瘤基因治疗一样, 存在肿瘤靶向性问题, 即如何使  $\alpha$ -gal 抗原只在肿瘤细胞上表达。 $\alpha$ -gal 在正常组织中的非特异性表达, 不仅会产生类似异种器官移植的强烈排斥反应, 使正常组织受到损伤, 还会增强正常细胞的免疫原性, 引起严重的自身免疫性疾病, 如 Graves' 病等<sup>[19-20]</sup>。因此, 积极探索靶向性更强的基因表达方式是  $\alpha$ -gal 用于肿瘤基因治疗必须解决的难题之一。

近年来, 端粒酶被认为是特异性好、表达谱广的肿瘤标记物。在目前已发现的端粒酶的几个主要组成成分中, 端粒酶逆转录酶 (hTERT) 只在肿瘤细胞中特异性表达, hTERT 的表达水平和肿瘤细胞端粒酶的活性具有很高的一致性。研究 hTERT 的上游调控结构时发现, hTERT 基因在转录水平上受多种

转录因子的调节, 其上游调控区具有强启动子活性, 且启动子活性与端粒酶活性具有很高的一致性。因此, hTERT 启动子逐渐成为近年来备受关注的表达谱广、活性相对较强的肿瘤特异性启动子。王艳萍等<sup>[21]</sup>将自杀基因 HSV-TK 置于 hTERT 启动子的调控下, 在端粒酶阳性的 A549 细胞中靶向表达了 TK 基因; Gu 等<sup>[22]</sup>报道了, hTERT 启动子调控的 Bax 基因在肿瘤细胞中靶向表达, 诱导肿瘤细胞的凋亡, 显著抑制裸鼠体内移植瘤的生长, 同时避免了 Bax 基因非特异性表达对正常细胞的毒性损伤。

为探索在肺癌细胞上靶向表达  $\alpha$ -gal 表位的可行性, 本研究将版纳微型猪的  $\alpha$ -1,3GT 基因置于 hTERT 启动子的下游, 成功构建了真核表达性载体 pEGFP-hTERTp-GT。转染正常人胚肺成纤维细胞 MRC-5 和人肺癌细胞 A549, hTERT 启动子驱动的  $\alpha$ -1,3GT 基因在肺癌细胞中靶向表达  $\alpha$ -1,3GT mRNA 并合成  $\alpha$ -gal 抗原, 而在正常 MRC-5 细胞中不表达; CMV 启动子调控的  $\alpha$ -1,3GT 基因在肺癌细胞和正常细胞中均可表达  $\alpha$ -1,3GT mRNA 并合成  $\alpha$ -gal。

虽然 hTERT 启动子相比 CMV 启动子具有明显的肿瘤靶向性, 但基因治疗不仅要实现靶向性, 高效性也尤为重要。本研究中, 转染质粒 pEGFP-N1-GT 的 A549 细胞  $\alpha$ -gal 表达率达 (50.6%  $\pm$  5.2)% , 而转染质粒载体 pEGFP-hTERTp-GT 的只有 (37.1%  $\pm$  4.1)% , 这与本课题前期的工作<sup>[7]</sup>及 Tanyi 等<sup>[23]</sup>的报道一致。提示除寻找更有效的目的基因和更高效的基因导入方法外, 如何增强启动子的活性也是一个亟待解决的难题。将增强子和 hTERT 启动子联合、CMV/SV40 启动子和 hTERT 启动子联合, 或者人工合成 hTERT 启动子可能是提高 hTERT 启动子活性的有效途径<sup>[24-25]</sup>, 这需要对 hTERT 启动子的转录调控机制作进行更加深入地研究。

### [参考文献]

- [1] 刑力, 郭礼和. 利用人的天然抗体抗肿瘤 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2001, 8(1): 67-69.
- [2] Cooper DK. Identification of alpha gal as the major target for human anti-pig antibodies [J]. Xenotransplantation, 2009, 16(1): 47-49.
- [3] Galili U, Wigglesworth K, Abdel-Motal UM. Intratumoral injection of alpha-gal glycolipids induces xenograft-like destruction and conversion of lesions into endogenous vaccines [J]. J Immunol, 2007, 178(7): 4676-4687.
- [4] Galili U. The alpha-gal epitope and the anti-gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy [J]. Immunol Cell Biol, 2005, 83(6): 674-686.
- [5] 齐荣, 蔡莹, 李兵华, 等. 腺相关病毒携带 hTERT 启动

- 子调控的 TRAIL 基因特异性杀伤肿瘤细胞 [ J ]. 癌症, 2008, 27( 10 ): 1026-1033.
- [ 6 ] 裴庆山, 刘吉勇, 孙欣欣. 反义端粒酶 RNA 基因对裸鼠肝癌移植瘤的抑制作用 [ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2009, 16( 1 ): 63-66.
- [ 7 ] 王艳萍, 唐小军, 陈晓禾, 等. hTERT 启动子的克隆及其在端粒酶阳性肺癌细胞中的靶向转录活性研究 [ J ]. 四川大学学报: 医学版, 2006, 43( 4 ): 497-501.
- [ 8 ] 朱圣明, 王艳萍, 郑 鸿, 等. 中国近交系版纳猪  $\alpha$ -1,3-半乳糖基转移酶基因的克隆及其真核表达载体的构建 [ J ]. 生物医学工程学杂志, 2009, 26( 2 ): 360-365.
- [ 9 ] 朱圣明, 王艳萍, 陈小禾, 等. hTERT 启动子驱动的 EGFP 真核表达载体的构建及其在肺癌细胞中的靶向表达 [ J ]. 医学研究生学报, 2007, 20( 2 ): 123-127.
- [ 10 ] Macher BA, Galili U. The Gal alpha 1, 3 Gal beta 1, 4GlcNAc-R ( alpha-Gal ) epitope: a carbohydrate of unique evolution and clinical relevance [ J ]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1780( 2 ): 75-88.
- [ 11 ] Link CJ, Seregina T, Atchison R, *et al.* Eliciting hyperacute xenograft response to treat human cancer: Alpha ( 1,3 ) galactosyltransferase gene therapy [ J ]. Anticancer Res, 1998, 18( 4 ): 2301-2308.
- [ 12 ] Xing L, Xia G, Fei J, *et al.* Adenovirus-mediated expression of pig alpha ( 1, 3 ) galactosyltransferase reconstructs Gal alpha ( 1,3 ) gal epitope on the surface of human tumor cells [ J ]. Cell Res, 2001, 11( 2 ): 116-124.
- [ 13 ] Aubert M, Crotte C, Bernard JP, *et al.* Decrease of human pancreatic cancer cell tumorigenicity by alpha1, 3 galactosyltransferase gene transfer [ J ]. Int J Cancer, 2003, 107( 6 ): 910-918.
- [ 14 ] 刑 力, 郭礼和. 异种器官移植中的 Gal  $\alpha$ ( 1,3 )Gal 抗原表位的研究进展 [ J ]. 细胞生物学杂志, 2001, 23( 4 ): 191-195.
- [ 15 ] Vanhove B, Goret F, Soullou JP, *et al.* Porcine  $\alpha$  1,3-galactosyltransferase: tissue-specific and regulated expression of splicing isoforms [ J ]. Biochim Biophys Acta, 1997, 1356( 1 ): 1-11.
- [ 16 ] Yoshimura N, Sawada T, Furusawa M, *et al.* Expression of xenotransformed human cancer cells to be susceptible to antibody-mediated cell killing [ J ]. Cancer Lett, 2001, 164( 2 ): 155-160.
- [ 17 ] Lanteri M, Ollier L, Giordanengo V, *et al.* Designing a HER2/neu promoter to drive  $\alpha$  1,3 galactosyltransferase expression for targeted anti- $\alpha$ Gal antibody-mediated tumor cell killing [ J ]. Breast Cancer Res, 2005, 17( 4 ): 487-494.
- [ 18 ] Unfer RC, Hellrung D, Link CJ Jr. Immunity to the  $\alpha$  ( 1,3 ) galactosyl epitope provides protection in mice challenged with colon cancer cells expressing  $\alpha$ ( 1,3 ) galactosyl-transferase: a novel suicide gene for cancer gene therapy [ J ]. Cancer Res, 2003, 63( 5 ): 987-993.
- [ 19 ] Gazzinelli RT. Natural anti-gal antibodies prevent, rather than cause, autoimmunity in human Chagas' disease [ J ]. Res Immunol, 1991, 142( 2 ): 164-167.
- [ 20 ] Thall A, Etienne-Deefer J, Winand RJ, *et al.* The alpha-gal aetiosyl epitope on human normal and autoimmune thyroid cells [ J ]. Autoimmunity, 1991, 10( 2 ): 81-87.
- [ 21 ] 王艳萍, 唐小军, 周清华, 等. 人端粒酶催化亚单位启动子调控自杀基因 HSV-TK 靶向性表达治疗肺癌的体内外实验研究 [ J ]. 四川大学学报: 医学版, 2008, 39( 5 ): 701-705.
- [ 22 ] Gu J, Kagawa S, Takakura M, *et al.* Tumor-specific transgene expression from the human telomerase reverse transcriptase promoter enables targeting of the therapeutic effects of the Bax gene to cancers [ J ]. Cancer Res, 2000, 60( 19 ): 5359-5364.
- [ 23 ] Tanyi JL, Lapusin R, Eder A, *et al.* Identification of tissue- and cancer-selective promoters for the introduction of genes into human ovarian cancer cells [ J ]. Gynecol Oncol, 2002, 85( 3 ): 451-458.
- [ 24 ] Song JS. Activity of the human telomerase catalytic subunit ( hTERT ) gene promoter could be increased by the SV40 enhancer [ J ]. Biosci Biotechnol Biochem, 2004, 68( 8 ): 1634-1639.
- [ 25 ] Davis JJ, Wang L, Dong F, *et al.* Oncolysis and suppression of tumor growth by a GFP-expressing oncolytic adenovirus controlled by an hTERT and CMV hybrid promoter [ J ]. Cancer Gene Ther, 2006, 13( 7 ): 720-723.
- [ 收稿日期 ] 2009-06-20 [ 修回日期 ] 2009-08-28
- [ 本文编辑 ] 徐红梅

## 本期广告目次

沈阳三生制药有限责任公司 .....	封二
东胜创新生物科技有限公司 .....	封三
碧迪医疗器械有限公司 .....	封四
德国美天旎生物技术有限公司 .....	前插页 I
浙江康莱特药业有限公司 .....	前插页 II
上海医元生物基因发展有限公司 .....	后插页 II