

A33启动子结肠癌特异性探究及SV40增强子对其转录活性影响

钟丹¹ 郑水娣¹ 谌贺宽子¹ 袁素敬¹ 章康健^{2*}

(¹浙江理工大学生命科学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018;

²中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 为了探究A33核心启动子结肠癌特异性及SV40增强子对其转录水平的影响, 该研究通过构建A33核心启动子和带SV40增强子的A33核心启动子(eA33)的荧光素酶报告基因载体pGL3-A33和pGL3-eA33, 与内参照pRL-SV40质粒共转染至不同的细胞系中, 利用双荧光素酶检测系统检测分析了A33和eA33启动子在不同细胞系中的转录活性。结果显示, A33核心启动子在结肠癌细胞系中具有转录活性低, 但结肠癌特异性好的特点, 而在其他类型癌细胞中基本没有活性。同时发现, eA33在各类癌细胞中的转录水平与A33相比, 均呈大幅度提高, 有显著性差异($P < 0.01$), 但SV40增强子能显著增强A33启动子转录活性的同时减低了其结肠癌特异性。这为靶向癌症基因一病毒治疗策略在结肠癌的生物治疗应用中寻找结肠癌特异性的启动子奠定了研究基础。

关键词 A33核心启动子; SV40增强子; 结肠癌特异性; 基因一病毒治疗

结肠癌在我国的发病率有逐年上升趋势, 目前, 结直肠癌已经是仅次于肺癌和胃癌的第3位常见恶性肿瘤^[1]。目前的传统治疗方法对不能手术切除的结肠癌效果欠佳, 因此, 积极探索新的结肠癌治疗方法具有重要意义。

癌症的靶向基因一病毒治疗策略(cancer targeting gene-viral therapy)已经成为一个研究热点^[2]。目前, 实现肿瘤基因一病毒的靶向性治疗主要是通过肿瘤组织特异性的启动子来调控病毒载体或治疗基因^[3], 从而使得重组基因一病毒对细胞的杀伤具有肿瘤选择性。目前, 针对结肠癌组织的靶向基因一病毒治疗策略主要选择癌胚抗原CEA启动子^[4-6], 研究结果显示, 尽管抗肿瘤效果较好, 但结肠癌组织特异性不够理想^[7], 这为寻找更好更具有结肠癌特异性的启动子提出了客观要求。

GPA33 (glycoprotein A33, A33), 是一个43 kDa大小的跨膜糖蛋白, Heath等^[8]在1997年发现其在95%以上的原发和转移结肠癌中过表达, 且Northern blot分析显示2.8 Kb大小的A33 mRNA只在结肠癌细胞系中显示A33抗原阳性, 在其他组织中几乎没有表达。目前, A33抗原已成为临床上单抗靶向治疗肠癌症研究的热点, 主要应用于单克隆抗体导向的放射免疫治疗(radioimmuno-therapy, RIT)^[9-12]和预设靶标的放

射免疫疗法(PRIT)^[13]的研究。上述结果预示, 跨膜糖蛋白A33基因的启动子能够应用于靶向基因一病毒治疗平台, 可能具有极好的结肠癌组织特异性。

另有越来越多的研究表明, 增强子可以通过增强启动子的转录水平进而提高基因的表达量^[14-15]。有研究报道, 人巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)增强子能够高效促进一些组织特异性基因启动子的转录活性, 从而显著提高这些靶基因的表达^[16]。也有报道称, 猿猴空泡病毒(simian vacuolating virus 40, SV40)增强子对异源基因的作用明显, 常常用于提高外源基因的表达^[17-18]。Cao等^[9]研究发现其对甲胎蛋白(alpha-fetoglobulin, AFP)启动子的作用明显, 将该复合启动子SV40-AFP用到靶向基因一病毒治疗平台, 对肝癌的靶向治疗具有良好的组织特异性。

对此, 考虑到启动子片段长短对启动子活性的影响, 本研究主要以A33基因的核心启动子(-100~+313)为研究对象并考察该区段启动子序列对靶基因的转录活性及其在结肠癌组织的特异性, 同时对该启动子进行人工修饰, 得到SV40增强子—A33复合启动

收稿日期: 2011-06-10 接受日期: 2011-08-09

浙江理工大学基金(No.1016819-Y)资助项目

*通讯作者。Tel: 021-54921139, Fax: 021-54921126, E-mail: zhang-kangjian@sibs.ac.cn

子片段(以下简称eA33), 并通过克隆及转染等方法, 进行A33核心启动子结肠癌转录活性和特异性实验及探究SV40增强子对其转录水平的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 *E.coli* DH5 α 菌株、pAT2载体、pGL3-basic载体、内参照pRL-SV40载体、pGL3-CMV载体为本实验室保存。

1.1.2 细胞株 人结肠癌LS174T、HCT116、HT29、SW480、SW620; 肺癌A549; 宫颈癌Hela; 肝癌细胞系7404; 正常肺上皮细胞BEAS-2B; 人胚肺成纤维细胞MRC-5; 以上细胞株均购于中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所细胞库。

1.1.3 培养基(液) LB培养基和RPMI1640培养液购自上海生工, FBS购自杭州四季青生物工程公司。

1.1.4 主要试剂 Dual-luciferase reporter Kit (Promega公司); LipofectamineTM 2000 Transfection Reagent (Invitrogen公司); KOD-plus-Neo和Ligation high连接酶(TOYOBO公司); DNA marker: Trans2K DNA Marker和1 Kb DNA Ladder (TransGen公司); 限制性内切酶 *Xho* I、*Hind* III (大连宝生物工程公司); 总RNA提取试剂Trizol (Invitrogen公司), ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit、SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix-Plus-(TOYOBO公司), 其余试剂均为国产分析纯。

1.1.5 仪器 NanoDrop 2000微量紫外分光光度计, Gel imaging system tanon 2500凝胶成像仪, Applied biosystems 7500荧光定量PCR仪。

1.2 方法

1.2.1 基因合成及鉴定 Gene Bank查询人类A33基因组序列, 通过NCBI (national center for biotechnology information)上已收录的A33 cDNA (Accession NM005814.1)和基因组DNA (Accession AL158837.14)序列, 从而确定A33核心启动子序列。利用基因合成的方法, SV40增强子通过ACTGC连接子连接到A33核心启动子的5'端, 得到复合启动子eA33, 同时在eA33启动子5'端和3'端分别加上了*Xho* I和*Sna*B I酶切位点。合成的eA33复合启动子片段连接在pUC-57载体上, 构成pUC57-eA33质粒。

利用PCR法从pUC57-eA33中扩增出A33和eA33启动子序列(表1和表2), PCR扩增片段经琼脂糖电泳后回收纯化, 并连接到pAT2载体上, 然后进行测序鉴定。

1.2.2 A33启动子报告基因载体的构建 将荧光素酶报告基因pGL3-basic载体用*Xho* I和*Hind* III双酶切, 回收约5 000 bp条带。同时将之前构建的pAT2-A33和pAT2-eA33分别都用*Xho* I和*Hind* III进行双酶切, 再经琼脂糖凝胶电泳, 分别回收约400 bp和650 bp的条带。使之分别在Ligation high连接酶的作用下与pGL3-basic载体以10:1的浓度比, 于16 °C连接1 h。使

表1 启动子片段扩增引物

Table 1 Primers for amplifying two promoter fragments

DNA片段	引物(普通PCR, 5'-3')	温度(°C)
Fragments	Primers (regular PCR, 5'-3')	T _m (°C)
A33	<i>Xho</i> I-F: <u>CTC GAG CAG CAA ATA TGG GCA AC</u>	59.6
	<i>Hind</i> III-R: <u>AAG C TT CTG TCA CTG GCA GCC TCC</u>	61.8
eA33	<i>Xho</i> I-F: <u>CTC GAG GGC CTG AAA TAA CC</u>	52.9
	<i>Hind</i> III-R: <u>AAG CTT CTG TCA CTG GCA GCC TCC</u>	61.8

下划线是限制性酶切位点。

The underscores were the sites for restriction digest.

表2 启动子片段PCR扩增程序(A33和eA33)

Table 2 PCR procedure for amplifying two promoter fragments (A33 and eA33)

DNA片段	PCR扩增程序
Fragments	PCR procedures
A33	94 °C, 2 min; 98 °C, 10 s; 55 °C, 30 s; 68 °C, 15 s; 30 cycles; 68 °C, 10 min
eA33	94 °C, 2 min; 98 °C, 10 s; 50 °C, 30 s; 68 °C, 25 s; 30 cycles; 68 °C, 10 min

A33和eA33启动子片段连接进pGL3-basic载体中, 将酶切鉴定正确的重组质粒进一步测序鉴定。

将两种重组质粒、空载体pGL3-basic和内参照pRL-SV40载体转化的阳性菌株, 在LB培养基中37 °C摇床培养过夜, 进行质粒大量提取, 并用NanoDrop 2000微量紫外分光光度计对其进行D值浓度测定。

1.2.4 细胞培养 实验细胞为: 5株结肠癌细胞系LS174T、HT29、HCT116、SW480、SW620, 肺癌细胞系A549, 宫颈癌细胞系Hela, 肝癌细胞系7404, 正常肺上皮细胞BEAS-2B, 人胚肺成纤维细胞MRC-5。培养方法按ATCC标准方法进行。

1.2.5 荧光定量PCR (1) 总RNA制备。收获细胞 $(1\sim5)\times 10^7$, 移入1.5 mL离心管中, 分别加入1 mL Trizol, 按试剂说明书中操作步骤进行RNA提取。经凝胶电泳后, 使用NanoDrop分光光度计检测提取总RNA的质量和浓度, 要求 D_{260}/D_{280} 比值在1.8~2.0。并计算RNA含量。

(2) cDNA的合成。反应体系20 μ L, 根据RT逆转录试剂盒说明书中操作步骤进行逆转录。合成的cDNA置于-20 °C保存备用。

(3) 引物的合成。根据Origene网站中Homo sapiens gene GPA33和GAPDH的荧光定量PCR引物序列合成。目的基因片段长度分别为115 bp和131 bp。

表3 A33基因荧光定量PCR引物(qPCR)

Table 3 Primers for A33 gene fragments (qPCR)		
DNA片段	引物(5'-3')	温度(°C)
Fragments	Primers (5'-3')	Tm (°C)
A33	F: TGA CAA CGG CAC CTA CGA GTG T	56.9
	R: GAT GCC GCA TTC TGG TTT GGA G	60.3
GAPDH	F: GTC TCC TCT GAC TTC AAC AGC G	53.2
	R: ACC ACC CTG TTG CTG TAG CCA A	58.2

(4) PCR反应。待测样品均按SYBR® Green Realtime PCR Master Mix-Plus说明书中进行, 总体积为20 μ L, 每个反应做3个复孔。反应条件为: 预变性95 °C, 1 min; 95 °C, 10 s; 58 °C, 15 s; 72 °C, 15 s; 共40个循环。每次反应均做空白对照(不加模板的反应系统)排除污染可能。反应结束后, 电脑自动分析荧光信号并将其转换为各目的基因的起始拷贝数和Ct值。为了控制样本mRNA质量的变异, 同时检测看家基因GAPDH表达。

1.2.6 双荧光素酶检测 (1) 转染。瞬时转染采用脂质体Lipofectamine™ 2000, 具体转染方法参照其说明书进行。每次转染均用96孔板, 每个样品设3个复孔。转染体系如下: Lipofectamine™ 2000脂质体0.2 μ L, 待检或对照质粒200 ng, pRL-SV40质粒(内对照) 4.0 ng, DMEM培养液50 μ L。每个实验重复3次。

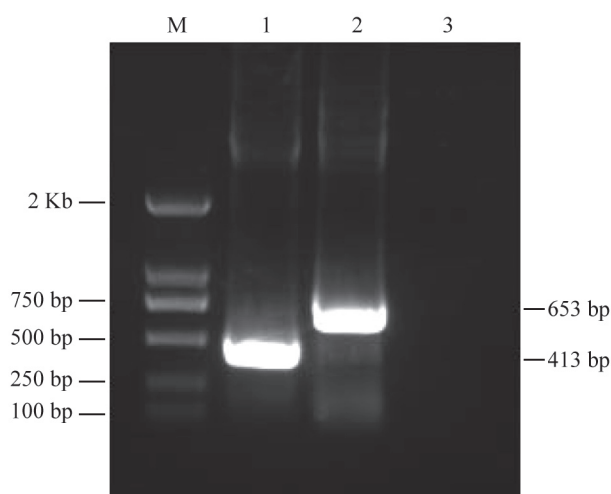
(2) 双荧光素酶活性检测及分析。转染48 h后, 向96孔板中的每个试验孔中加入20 μ L Passive Lysis Buffer (PLB), 缓慢摇动15 min之后按照双荧光素酶活性分析试剂盒操作手册进行检测。各孔细胞之间的转染效率通过pRL-SV40活性进行校正。样品校正转染效率后的活性, 通过以下公式计算得到各样品相对于阳性对照SV40启动子的相对活性。相对荧光活性值=[样品(pGL3-A33 or pGL3-eA33)荧光值-阴性对照(pGL3-basic)荧光值]/阳性对照(pGL3-control)荧光值。

1.2.7 统计学处理 采用SPSS统计软件对各样品的相对活性数据进行t检验、方差分析。 $P<0.05$ 为有统计学显著性差异。

2 结果

2.1 目的基因的克隆及测序

以合成基因质粒pUC57-eA33为模板, 分别克隆出A33和eA33核心启动子片段, 分别为413 bp和653 bp (图1)。且测序鉴定序列正确。



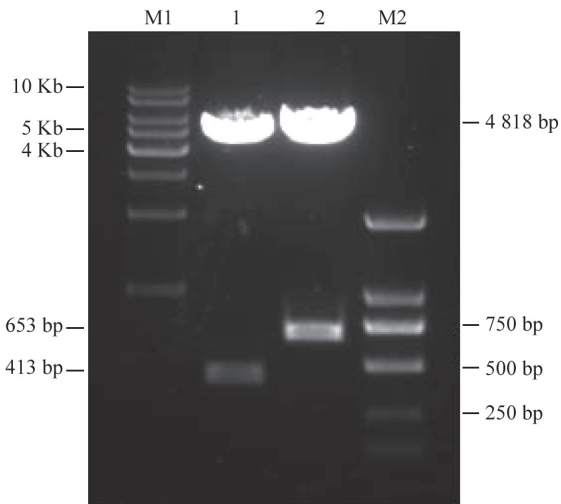
M: Trans2K DNA marker; 1: A33片段; 2: eA33片段; 3: 阴性对照。

M: Trans2K DNA marker; 1: fragment A33; 2: fragment eA33; 3: negative control.

图1 PCR扩增A33和eA33片段琼脂糖凝胶电泳鉴定
Fig.1 Electrophoretic analysis of fragment A33 and eA33 amplified by PCR

2.2 启动子报告基因载体酶切及测序鉴定

回收经 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切得到的 A33 和 eA33 片段和 pGL3-basic 载体的相应条带, 经 Ligation high 连接酶连接后转化 *E. coli* DH5 α 感受态细菌, 再经 *Xho* I 和 *Hind* III 酶切鉴定, 两种重组质粒分别释放出 413 bp 和 653 bp 大小的片段(图2)。测序结果亦证实启动子报告基因载体构建成功。



M1: 1 Kb DNA ladder; M2: Trans2K DNA marker; 1: A33 和 pGL3-basic 片段; 2: eA33 和 pGL3-basic 片段。

M1: 1 Kb DNA ladder; M2: Trans2K DNA marker; 1: fragment A33 and pGL3-basic; 2: fragment eA33 and pGL3-basic.

图2 A33、eA33和pGL3-basic双酶切琼脂糖凝胶电泳鉴定
Fig.2 Electrophoretic analysis of fragment A33、eA33 and pGL3-basic by restriction analysis

2.4 A33核心启动子在不同组织细胞系中的转录水平及SV40增强子对其的影响

如表4所示: A33核心启动子在结肠癌细胞系中具有特异性表达的特性, 尤其是在LS174T细胞中表达极高, 而在其他细胞系(肝癌7404、宫颈癌Hela、肺癌A549和正常肺上皮细胞BEAS-2B)中表达量极低。然而, 尽管A33核心启动子在LS174T细胞系的相对荧光活性值为36.34, 但在其余四株结肠癌细胞系的活性值均小于5, 处于一个低转录水平。而带有SV40增强子的质粒pGL3-eA33的相对荧光活性比pGL3-A33均有显著水平的提高($P < 0.05$), 尤其是在SW480 ($P < 0.001$)细胞系中。eA33这一启动子系统尽管显著地提高了A33核心启动子在结肠癌细胞系中的转录水平, 但在其他非结肠癌细胞系中也有明显的增强效应, 且根据平均值计算, 数据显示在结肠癌中A33核心启动子的转录水平只提高了2.6~68.9倍, 而在非结肠癌7404细胞系中提高了51.4倍、Hela提

2.3 在不同组织细胞系中的A33基因mRNA表达水平的检测

如图3所示, 在结肠癌细胞系LS174T、LOVO、HT29、HCT116、SW480、SW620中表现mRNA高表达, 而在其他癌细胞系中的表达水平极低, 只有LS174T细胞的1/100~1/40, 经统计分析, A33基因在结肠癌和其他癌细胞及正常肺组织细胞中的mRNA表达水平差异有统计学意义($P < 0.05$)。

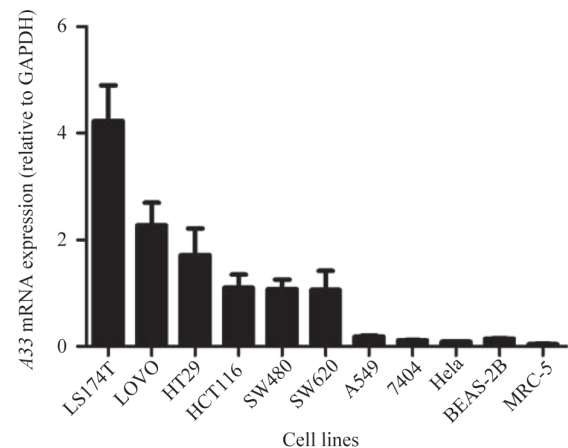


图3 A33在人的不同组织细胞系中的mRNA表达水平检测
Fig.3 Detection of A33 mRNA expression in different human cell lines

高了416.8倍、A549提高了1 333.5倍, 甚至在正常细胞株BEAS-2B细胞系中提高了41 640倍(图4)。这表明, SV40增强子具有明显增强A33启动子转录活性的同时却又有显著降低其结肠癌特异性的特点。

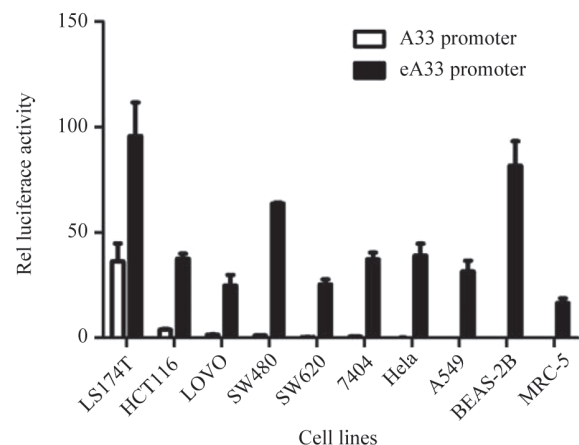


图4 A33核心启动子在人的不同组织细胞系中的转录水平及SV40增强子对其的影响
Fig.4 Detection of A33 promoter's specifically transcriptional activity in different human cell lines and the influence when combined with SV40 enhancer

表4 荧光报告基因质粒的相对荧光活性值(pGL3-A33 and pGL3-eA33)
Table 4 Relative luciferase activity of two reporter gene vectors
(pGL3-A33 and pGL3-eA33)

细胞系 Cell lines	pGL3-A33	pGL3-eA33
LS174T	36.338 790±8.561 134	95.768 650±15.915 320
HCT116	3.933 521±0.415 538 3	37.675 380±2.396 973
LOVO	1.620 386±0.022 087 34	24.944 210±5.050 087
SW480	1.147 883±0.204 863 4	63.660 400±0.502 347 8
SW620	0.368 684 8±0.084 063 7	25.435 400±2.408 184
7404	0.725 556±0.093 729 38	37.269 660±3.343 068
Hela	0.094 036 65±0.033 375 77	39.192 240±5.563 558
A549	0.023 661 07±0.013 528 68	31.552 690±5.193 391
BEAS-2B	0.001 960 563±0.000 799 104	81.639 470±11.727 540
MRC-5	0.009 689 767±0.001 245 095	16.572 190±2.226 865

3 讨论

靶向性是实现癌症基因—病毒治疗成败的一个关键因素,在特异性杀伤肿瘤细胞的同时对正常细胞不会造成伤害。目前,实现靶向性基因—病毒治疗主要是通过肿瘤组织特异性启动子来引导下游治疗基因的表达。许多肿瘤组织特异性启动子已被人类所认识,如前列腺特异抗原启动子^[20]、肝癌的甲胎蛋白启动子^[21]、肝素结合细胞因子启动子^[22]、酪氨酸酶启动子^[23]、胰腺癌特异抗原CCKAR启动子^[24]等。

本研究在此基础上根据NCBI上收录的A33基因启动子序列,开展了A33核心启动子(-100~+313)的转录活性及结肠癌特异性探究实验。结果显示,A33核心启动子在LS174T结肠癌细胞系中表现出极高的转录水平,尽管在其余四株结肠癌细胞系(LOVO、HCT116、SW620、SW480)的活性值均处于一个低转录水平,但在其他癌症细胞如肝癌、肺癌、宫颈癌及正常细胞中几乎没有活性。同时,进行了不同细胞系中A33基因mRNA表达水平的检测,结果显示A33 mRNA在结肠癌细胞中具有较高的表达水平,与其他癌细胞系相比具有显著差异。这些结果表明,A33核心启动子是一个极好的结肠癌特异性启动子,可以应用到结肠癌的靶向基因—病毒治疗策略中,为以后相关研究提供良好的实验参考。同时,eA33在不同肿瘤细胞中的转录活性实验结果表明,通过SV40增强子明显增强A33启动子的转录活性的同时又显著降低了其结肠癌特异性,这样的复合启动子eA33不适合应用到靶向基因—病毒治疗系统中。

针对这样的实验结果,我们进行了进一步的实验设想,若要在增强A33启动子转录活性的同时保证其结肠癌特异性,其他的增强子或人工修饰方式值得进一步探究:(1)将SV40增强子换成结肠癌特异性增强子,或一些不会影响A33启动子结肠癌特异性的广谱性增强子,能够在增强A33核心启动子活性的同时保持其结肠癌特异性,从而能够在结肠癌中特异性启动肿瘤抑制基因的表达,进行结肠癌靶向性治疗;(2)改变增强子的位置:SV40增强子是最早发现的病毒增强子,它可以提高很多宿主细胞的基因表达的水平^[25]。在张维铭等^[26]的实验中,hTERT-SV40这一启动子系统是将hTERT启动子克隆在pGL3-enhancer质粒(在pGL3-basic载体的基础上在载体的polyA下游引入了SV40增强子)中,实验结果表明,hTERT启动子联合SV40增强子即hTERT-SV40启动子系统在肿瘤细胞中的转录活性是hTERT启动子的2~3倍,在正常细胞中,两者的转录活性均很低,差异无统计学意义($P>0.05$),说明在这一hTERT-SV40启动子系统中,SV40增强子不但能够增强hTERT核心启动子的活性,且不影响其肿瘤特异性;(3)其他人工修饰方式:有研究用化学合成方法在野生型hTERT核心启动子片段的3'端接入3个E-box(CACGTG)元件,双荧光素酶检测显示该元件能够在不影响hTERT启动子在癌细胞中的转录活性的同时降低其在正常细胞的转录活性。体内和体外实验都表明,该元件控制表达的腺病毒CNHK300能够在hTERT阳性细胞系中选择性复制,产生良好的抗癌效果^[27-28]。

参考文献 (References)

- 1 Jie JZ, Wang JW, Qu JG, Hung T. Suppression of human colon tumor growth by adenoviral vector-mediated NK4 expression in an athymic mouse model. *World J Gastroenterol* 2007; 13(13): 1938-46.
- 2 刘新垣. 一种抗癌新策略——肿瘤的基因病毒治疗. *中国肿瘤生物治疗杂志* 2001; 8(1): 1.
- 3 Park CW, Park YM, Lee GT, Lee Y, Woo S, Cha JY, *et al.* Targeting of herapeutic gene expression to the liver by using liver-type pyruvate kinase proximal promoter and the SV40 viral enhancer active in multiple cell types. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314(1): 131-7.
- 4 吴文溪, 沈历宗, 刘新垣, 许德华, 丁强, 华一兵. 癌胚抗原启动子控制胞嘧啶脱氨酶基因体外对结肠癌细胞专一性杀伤. *中国肿瘤生物治疗杂志* 2003; 10(1): 5-8.
- 5 Guo X, Evans TR, Somanath S, Armesilla AL, Darling JL, Schatzlein A, *et al.* *In vitro* evaluation of cancer-specific NF-kappaB-CEA enhancer-promoter system for 5-fluorouracil prodrug gene therapy in colon cancer cell lines. *Br J Cancer* 2007; 97(6): 745-54.
- 6 Sagawa T, Takahashi M, Sato T, Sato Y, Lu Y, Sumiyoshi T, *et al.* Prolonged survival of mice with multiple liver metastases of human colon cancer by intravenous administration of replicable E1B-55K-deleted adenovirus with E1A expressed by CEA promoter. *Mol Ther* 2004; 10(6): 1043-50.
- 7 Tanaka T, Kanai F, Okabe S, Yoshida Y, Wakimoto H, Hamada H, *et al.* Adenovirus-mediated prodrug gene therapy for carcinoma-embryonic antigen-producing human gastric carcinoma cells *in vitro*. *Cancer Res* 1996; 56(6): 1341-5.
- 8 Heath JK, White SJ, Johnstone CN, Catimel B, Simpson RJ, Moritz RL, *et al.* The human A33 antigen is a transmembrane glycoprotein and a novel member of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(2): 469-74.
- 9 Almqvist Y, Orlova A, Sjostrom A, Jensen HJ, Lundqvist H, Sundin A, *et al.* *In vitro* characterization of 211 At-labeled antibody A33-a potential therapeutic agent against metastatic colorectal carcinoma. *Cancer Biother Radiopharm* 2005; 20(5): 514-23.
- 10 Scott AM, Lee FT, Jones R, Hopkins W, MacGregor D, Cebon JS, *et al.* A phase I trial of humanized monoclonal antibody A33 in patients with colorectal carcinoma: Biodistribution, pharmacokinetics, and quantitative tumor uptake. *Clin Cancer Res* 2005; 11(13): 4810-7.
- 11 Welt S, Divgi CR, Real FX, Yeh SD, Garin-Chesa P, Finstad CL, *et al.* Quantitative analysis of antibody localization in human metastatic colon cancer: A phase I study of monoclonal antibody A33. *J Clin Oncol* 1990; 8(11): 1894-906.
- 12 Welt S, Ritter G, Williams C Jr, Cohen LS, John M, Jungbluth A, *et al.* Phase I study of anticancer humanized antibody A33. *Clin Cancer Res* 2003; 9(4): 1338-46.
- 13 Ackerman ME, Chalouni C, Schmidt MM, Raman VV, Ritter G, Old LJ, *et al.* A33 antigen displays persistent surface expression. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57(7): 1017-27.
- 14 Gill DR, Smyth SE, Goddard CA, Pringle IA, Higgins CF, Colledge WH, *et al.* Increased persistence of lung gene expression using plasmids containing the ubiquitin C or elongation factor 1alpha promoter. *Gene Ther* 2001; 8(20): 1539-46.
- 15 Tani K, Lin T, Hibino H, Takahashi K, Nakazaki Y, Takahashi S, *et al.* Transduction of LacZ gene into leukemia cells using viral vectors of retrovirus and adenovirus. *Leukemia* 1995; 9(Suppl 1): S64-5.
- 16 Gruh I, Wunderlich S, Winkler M, Schwanke K, Heinke J, Blomer U, *et al.* Human CMV immediate-early enhancer: A useful tool to enhance cell-type-specific expression from lentiviral vectors. *J Gene Med* 2008; 10(1): 21-32.
- 17 Dean DA, Dean BS, Muller S, Smith LC. Sequence requirements for plasmid nuclear import. *Exp Cell Res* 1999; 253(2): 713-22.
- 18 Song JS. Adenovirus-mediated suicide SCLC gene therapy using the increased activity of the hTERT promoter by the MMRE and SV40 enhancer. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005; 69(1): 56-62.
- 19 Cao X, Yang M, Wei RC, Zeng Y, Gu JF, Huang WD, *et al.* Cancer targeting gene-viro-therapy of liver carcinoma by dual-regulated oncolytic adenovirus armed with TRAIL gene. *Gene Ther* 2011; 18(8): 765-77.
- 20 Rodriguez R, Schuur ER, Lim HY, Henderson GA, Simons JW, Henderson DR. Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: A selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res* 1997; 57(13): 2559-63.
- 21 Hallenbeck PL, Chang YN, Hay C, Golightly D, Stewart D, Lin J, *et al.* A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Hum Gene Ther* 1999; 10(10): 1721-33.
- 22 Adachi Y, Reynolds PN, Yamamoto M, Wang M, Takayama K, Matsubara S, *et al.* A midkine promoter-based conditionally replicative adenovirus for treatment of pediatric solid tumors and bone marrow tumor purging. *Cancer Res* 2001; 61(21): 7882-8.
- 23 Nettelbeck DM, Rivera AA, Balague C, Alemany R, Curiel DT. Novel oncolytic adenoviruses targeted to melanoma: Specific viral replication and cytolysis by expression of E1A mutants from the tyrosinase enhancer/promoter. *Cancer Res* 2002; 62(16): 4663-70.
- 24 Xie X, Xia W, Li Z, Kuo HP, Liu Y, Ding Q, *et al.* Targeted expression of BikDD eradicates pancreatic tumors in noninvasive imaging models. *Cancer Cell* 2007; 12(1): 52-65.
- 25 Ou YC, Gardner TA, Kao C, Zhou HE, Chung LW. A potential for tissue restrictive gene therapy in renal cell carcinoma using MN/CA IX promoter. *Anticancer Res* 2005; 25(2A): 881-6.
- 26 张维铭, 薛丽英, 徐垚, 邢军, 耿鑫, 王栋, 等. SV40增强子修饰提高人端粒酶逆转录酶启动子的转录活性. *中华病理学杂志* 2006; 35(11): 691-3.
- 27 杨应斌, 蔡绍哲, 于淑惠, 杨力, 李军, 余松涛. E-box元件修饰端粒酶核心启动子序列及体外转录活性分析. *中国生物化学与分子生物学报* 2009; 25(6): 510-4.
- 28 Su CQ, Sham J, Xue HB, Wang XH, Chua D, Cui ZF, *et al.* Potent antitumoral efficacy of a novel replicative adenovirus CNHK300 targeting telomerase-positive cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130(10): 591-603.

Investigation of A33 Promoter's Specifically Transcriptional Activity in Colorectal Cancer and the Influence When Combined with SV40 Enhancer

Zhong Dan¹, Zheng Shuidi¹, Shenghe Kuanzi¹, Yuan Sujing¹, Zhang Kangjian^{2*}

¹*Xin Yuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;*

²*Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institute of Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)*

Abstract In order to investigate A33 core promoter's specifically transcriptional activity in colorectal cancer (CRC) and to identify its transcriptional activity combined with SV40 enhancer, the transcriptional regulatory elements were constructed by appending a SV40 enhancer 5' to the A33 core promoter (eA33), and then we constructed two luciferase reporter gene vectors which containing A33 promoter and eA33 promoter, pGL3-A33 and pGL3-eA33, and made them co-transfected with transfection-efficiency normalization vector pRL-SV40 into different cell lines by liposome transfection. The transcriptional activity of A33 and eA33 promoter was analyzed by Dual-Luciferase Assay system and relative luciferase unit (RLU) was used to evaluate the expression efficiency. The results showed that A33 promoter performs high CRC specific expression but low transcriptional activity, and showed barely any activity in other types of cancer cells. Meanwhile, the eA33 promoter's transcriptional activity is slightly stronger than the A33 promoter's in all kinds of cell lines. Therefore, the SV40 enhancer is able to greatly up-regulate A33 promoter transcriptional activity, and by the meantime, attenuate the CRC specific of A33 promoter. It will definitely provide useful information for targeted gene-viro-therapy of CRC.

Key words A33 core promoter; SV40 enhancer; CRC specific expression; gene-viro-therapy

Received: June 10, 2011 Accepted: August 9, 2011

This work was supported by the Zhejiang Sci-Tech University Grant (No.1016819-Y)

*Corresponding author. Tel: 86-21-54921139, Fax: 86-21-54921126, E-mail: zhangkangjian@sibs.ac.cn