

巨细胞病毒增强子提高人甲胎蛋白启动子效率的研究

叶景佳¹ 陈萍² 贾振宇^{3*} 李春春¹ 陈丽红¹ 曹江^{1*}

(¹浙江大学医学院附属第二医院临床研究中心, 杭州 310009; ²浙江大学医学院附属邵逸夫医院中心实验室, 杭州 310016; ³浙江省医学科学院, 杭州 310013)

摘要 人巨细胞病毒(CMV)早期转录增强子能够提高其他基因启动子的转录启动效率。CMV早期转录增强子对人甲胎蛋白(AFP)启动子的转录增强的作用及特异性的影响, 将决定其是否适用于肝癌靶向性基因治疗。作者利用PCR法分别克隆了人AFP增强子、启动子和CMV早期转录增强子, 构建了相应的pGL4.10荧光素酶报告基因载体, 与内参照pGL4.74质粒共转染人肝癌细胞Hep3B、HepG2、SMMC7721和人宫颈癌细胞HeLa、乳腺癌细胞Bcap37, 利用双荧光素酶检测系统检测分析了这些细胞中AFP增强子-启动子的效率。结果表明, CMV早期转录增强子能够明显增强AFP增强子-启动子在肝癌细胞中的效率(在Hep3B、HepG2和SMMC7721细胞中分别提高33.07、134.22和465.18倍), 但是也能提高AFP增强子-启动子在非肝癌细胞中的效率(在HeLa和Bcap37细胞中分别提高335.73和1096.81倍)。因此, CMV增强子虽然可以大大提高AFP增强子-启动子的效率, 但无特异性, 直接将其用于靶向AFP的肝癌基因治疗时可能会产生由于治疗基因在正常组织中的非特异表达而引起的副作用。

关键词 细胞特异性启动子; 甲胎蛋白; 巨病毒早期转录增强子; 基因治疗

Improvement of Human AFP Promoter Efficiency by CMV Early Enhancer

Ye Jingjia¹, Chen Ping², Jia Zhenyu^{3*}, Li Chunchun¹, Chen Lihong¹, Cao Jiang^{1*}

(¹Clinical Research Center, The 2nd Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China; ²Institute of Clinical Research, Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310016, China; ³Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

Abstract CMV early enhancer can be used to improve the efficiency of promoters of other genes. The impact of CMV early enhancer on the efficiency and specificity of AFP promoter determines whether it is suitable for AFP promoter in targeted gene therapy of hepatocyte carcinoma. In this study, human AFP enhancer/promoter and CMV early enhancer were cloned by PCR, and luciferase reporter vectors were constructed and transfected into hepatocyte carcinoma Hep3B, HepG2 and SMMC7721 cells, cervical carcinoma HeLa cells and breast cancer Bcap37 cells, with pGL4.74 vector as transfection control. Dual luciferase reporter assay was performed to analyze the efficiency of AFP promoter in these cells. The results showed that CMV early enhancer can markedly improve the efficiency of AFP enhancer/promoter in hepatocyte carcinoma cells (33.07-, 134.22- and 465.18-fold in Hep3B, HepG2 and SMMC7721 cells respectively), and can also improve the efficiency of AFP enhancer/promoter in non-hepatocyte cells significantly (335.73- and 1096.81-fold in HeLa and Bcap37 cells respectively). Therefore, the

收稿日期: 2012-11-22 接受日期: 2012-12-31

浙江省自然科学基金重点项目(批准号: LZ12H16003)和浙江省教育厅项目(批准号: Y200804137)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-88215459, E-mail: zhenyujia@yahoo.com; Tel: 0571-87315201, E-mail: caoj@zju.edu.cn

Received: November 22, 2012 Accepted: December 31, 2012

This work was supported by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Grant No.LZ12H16003) and Department of Education of Zhejiang Province (Grant No.Y200804137)

*Corresponding authors. Tel: +86-571-88215459, E-mail: zhenyujia@yahoo.com; Tel: +86-571-87315201, E-mail: caoj@zju.edu.cn

网络出版时间: 2013-03-20 14:15 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130320.1415.002.html>

CMV early enhancer improves the efficiency of AFP enhancer/promoter without cell-specificity. Side-effects may arise when applying CMV enhancer directly in AFP-targeted gene therapy of hepatocyte carcinoma due to nonspecific expression of therapeutic genes in normal tissues.

Key words cell specific promoter; alpha fetoprotein; CMV early transcription enhancer; gene therapy

肝癌是包括我国在内的发展中国家致死率较高的常见恶性肿瘤^[1-3], 目前尚缺乏有效的可明显提高治疗效果的手段。除了常规的手术和放化疗以外, 肿瘤生物治疗正发展成为一类有很好的临床应用前景的新手段, 其中利用肿瘤细胞特异性启动子作为表达调控元件进行的靶向性基因治疗是一种重要方式。由于肝癌细胞具有特异性地异常表达甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)的特性, 因此AFP基因的启动子常被用作肝癌基因治疗中目的基因特异性表达的调控手段。但和其他各种组织特异性启动子一样, AFP启动子在肝癌细胞中的启动效率总体上并不很高, 因此研究中常在AFP启动子前加上自身或其他各种增强子以提高其转录启动效率^[4-6]。

近来有文献报道, 巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)的早期转录增强子可用于构建重组启动子, 对一些组织特异性启动子而言能极大地提高其转录起始效率且保持其特异性^[7]。我们也发现已经有一些利用该增强子来提高AFP启动子特异性转录的报道^[8-10], 但是我们在类似的研究工作中发现这一增强作用似乎并不具有特异性。

为了明确CMV早期转录增强子能否特异性地提高AFP启动子的效率这一关键问题, 以确定其是否适用于肝癌靶向性基因治疗, 本研究首先克隆了

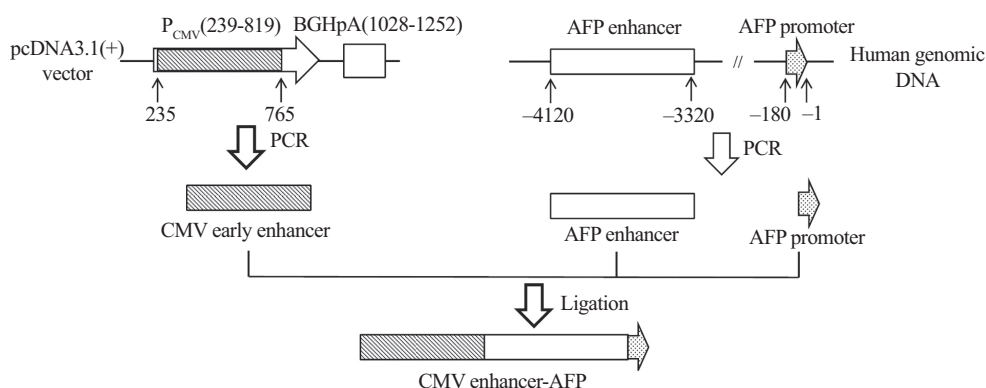
人AFP基因的增强子和启动子以组成较高效率的AFP特异性重组启动子, 再组合以CMV早期转录增强子(图1), 利用目前广泛应用于启动子转录活性研究的双荧光素酶报告系统^[11-12], 对该增强子对AFP启动子在多种不同的AFP表达程度不一的肝癌和其他非肝癌肿瘤细胞中的转录效率进行了定量分析, 为CMV早期转录增强子究竟能否直接用于AFP启动子调控的肝癌靶向性基因治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和细胞系 大肠杆菌菌株DH5 α 和含CMV早期转录增强子的质粒pMD19-T/CMVenhancer^[13]由本课题组保存。PCR产物克隆载体pGEM-T Easy Vector System I、双荧光素酶报告基因载体pGL4.10[luc2]、pGL4.74[hRluc/TK]及双荧光素酶活性检测试剂盒Dual Luciferase Assay Kit购自Promega公司。人肝癌细胞Hep3B、HepG2、SMMC7721、乳腺癌细胞Bcap37和宫颈癌细胞HeLa均为本课题组保存。

1.1.2 酶、抗体及其他试剂 各种限制性内切酶、连接酶和碱性磷酸酶等工具酶均为New England Biolab公司产品, PCR扩增试剂盒、DNA分子标



标注的数字分别为pcDNA3.1(+)载体序列中碱基编号或人基因组DNA中AFP基因转录起始点上游碱基编号。

Numbers show base-count positions in pcDNA3.1(+) vector sequence or upstream of AFP gene transcription initiation site in human genomic DNA.

图1 CMV早期转录增强子-AFP重组启动子转录调控元件构建示意图

Fig.1 Schematic illustration of construction of CMV early enhancer-AFP promoter transcription regulatory element

准DL2000均为TaKaRa公司产品, 质粒提取试剂盒QIAGEN Plasmid Mini Kit、凝胶片段回收试剂盒QIAquick Gel Extraction Kit购自Qiagen公司, 转染试剂Lipofectamine 2000、DNA分子量标准1 Kb Plus DNA Ladder、RNA提取试剂Trizol购自Invitrogen公司。RPMI 1640培养液、胎牛血清购自Invitrogen公司, 其他各种常规生物化学试剂购自Sigma公司和Amresco公司。M-MLV逆转录酶、dNTPs、荧光定量PCR试剂GoTaq qPCR Master Mix购自Promega公司。

1.2 方法

1.2.1 AFP增强子和启动子的克隆

根据参考文献[14], 在人基因组DNA序列(GenBank Accession Number NT_006216)上确定821 bp的AFP增强子和180 bp的AFP启动子区域, 分别设计引物, AFP增强子上游引物为: 5'-AGA TCT CAG ATT GAA TTA TTT GCC TGT CA-3'(斜体为另加的酶切位点, 下同), 下游引物为: 5'-GGA TCC TAG GAA GTT TTC GCA ATA ATA C-3', 扩增产物总长应为833 bp; AFP启动子上游引物为: 5'-AGA TCT GCC CCA AAG AGC TCT GTG T-3', 下游引物为: 5'-GGA TCC AAA TCA TGC TGA AAT TCT TTT ATA CTC-3', 扩增产物总长应为191 bp。收集生长旺盛的人肝癌细胞HepG2, 按参考文献[15]提取基因组DNA并定量。以此基因组DNA为模板, 采用PCR法分别扩增人AFP基因的增强子和启动子, PCR条件均为: 95 °C变性5 min, 然后进行30个循环的扩增: 95 °C, 30 s; 58 °C, 30 s; 72 °C 30 s。最后一个循环完成后于72 °C继续反应10 min。用1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳分离PCR产物, 用凝胶片段回收试剂盒按照说明书操作回收预期大小的目的PCR产物, 并与pGEM-T Easy载体按照使用说明建立连接体系以克隆相应片段, 于16 °C连接过夜, 转化感受态大肠杆菌DH5 α , 涂布于含有氨苄青霉素的LB琼脂平板, 提取转化子质粒DNA, 用*Bgl* II和*Bam*H I双酶切检测有无相应大小的插入片段, 将有预期大小插入片段的质粒DNA送至Invitrogen公司测序, 序列正确者分别命名为pGEM-T Easy/AFPenhancer(含AFP增强子)和pGEM-T Easy/AFPpromoter(含AFP启动子)。

1.2.2 带有含CMV早期转录增强子、AFP增强子-启动子的荧光素酶报告载体的构建

首先用*Bgl* II和*Bam*H I双酶切pGEM-T Easy/AFPenhancer, 分离、

回收833 bp的AFP增强子片段, 插入pGEM-T Easy/AFPpromoter的*Bgl* II位点, 用*Bgl* II和*Bam*H I双酶切鉴定是否有正确连接的1 018 bp的AFP增强子-启动子组合的重组启动子片段, 获得后将1 018 bp的该片段插入pGL4.10的*Bgl* II位点, 用*Bgl* II和*Hind* III双酶切鉴定插入方向, 得到带有AFP重组启动子的荧光素酶报告基因质粒pGL4.10/AFP。再用*Bgl* II和*Bam*H I双酶切pMD19-T/CMVenhancer, 分离、回收543 bp的CMV早期转录增强子片段, 插入pGL4.10/AFP的*Bgl* II位点, 用*Bgl* II和*Hind* III双酶切鉴定插入方向, 得到带有CMV早期转录增强子的AFP重组启动子荧光素酶报告基因质粒pGL4.10/CMVenhancer-AFP。提取、纯化两种荧光素酶报告基因质粒pGL4.10/AFP和pGL4.10/CMVenhancer-AFP, 溶解于无菌水中, 在紫外分光光度计上测定260 nm处光吸收值进行定量。

1.2.3 细胞转染

人肝癌细胞Hep3B、HepG2、SMMC7721、乳腺癌细胞Bcap37和宫颈癌细胞HeLa培养于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液中, 5% CO₂, 37 °C。取生长旺盛的上述细胞调至4 \times 10⁵/mL, 接种于24孔板, 每孔2 \times 10⁵/500 μ L, 培养过夜。分别取1 μ g上述纯化的带AFP增强子-启动子的荧光素酶报告载体pGL4.10/AFP、pGL4.10/CMVenhancer-AFP及不带启动子的pGL4.10质粒, 分别与10 ng的内参质粒pGL4.74混合, 用无血清培养液调至50 μ L, 再各取2 μ L转染试剂Lipofectamine 2000用无血清培养液稀释至50 μ L, 将稀释的DNA和转染试剂混合均匀, 室温放置20 min形成转染复合物后逐滴加入24孔板的细胞中, 混匀后置培养箱中培养。每种转染设3复孔。

1.2.4 荧光素酶活性检测

按照双荧光素酶活性检测试剂盒说明进行共转染报告基因质粒和内参质粒后细胞内萤火虫荧光素酶(firefly luciferase)和海肾荧光素酶(renilla luciferase)的活性检测: 转染24 h后的细胞用预冷的PBS洗两遍, 然后用100 μ L Passive Lysis Buffer冰浴下裂解细胞15 min; 移至微量离心管并充分振荡, 4 °C下13 000 r/min离心15 s; 取20 μ L上清至100 μ L LARII混匀, 在化学发光检测仪GloMax™ 20/20(Promega公司)上检测10 s, 记录萤火虫荧光素酶活性; 加入100 μ L Stop&Glo试剂, 混匀后再检测10 s, 记录海肾荧光素酶活性。以萤火虫荧光素酶活性/海肾荧光素酶活性作为相对荧光素酶活性单位(relative luciferase unit, RLU), 以不带启动子的

pGL4.10转染细胞的相对荧光素酶活性为背景, 计算分别用pGL4.10/AFP和pGL4.10/CMVenhancer-AFP两种报告基因转染的各种细胞中的相对荧光素酶活性, 分析CMV早期转录增强子对AFP增强子-启动子转录效率及特异性的影响。

1.2.5 逆转录-实时荧光定量PCR检测细胞内源性AFP mRNA水平 在10 cm培养皿中培养各种细胞, 至80%~90%汇合时, 吸弃培养液, 冰浴下用预冷的PBS洗3次, 然后直接加1 mL Trizol试剂裂解细胞, 反复吹打后移至ependorf管中, 按照试剂说明书提取总RNA并定量。取1 μ g总RNA用M-MLV逆转录酶在25 μ L体系中进行cDNA合成反应, 取2.5 μ L反应产物利用GoTaq qPCR Master Mix(Promega公司)在50 μ L体系中进行实时荧光定量PCR检测。AFP检测引物为上游: 5'-ACC TCG TCG GAG CTG ATG G-3', 下游: 5'-TGG CCT CCT GTT GGC ATA TG-3'。内参照GAPDH检测引物为上游: 5'-CTT AGC ACC CCT GGC CAA G-3', 下游: 5'-GAT GTT CTG GAG AGC CCC G-3'。PCR条件均为: 95 $^{\circ}$ C变性5 min, 然后进行40个循环的扩增: 95 $^{\circ}$ C, 30 s; 62 $^{\circ}$ C, 15 s; 72 $^{\circ}$ C 15 s。在Applied Biosystems公司的StepOne Plus荧光定量PCR仪上检测, 分析扩增曲线和融解曲线以确保反应特异性, 以GAPDH为内参照分析AFP相对表达水平(Δ Ct)。

2 结果

2.1 AFP增强子和启动子的克隆

以人肝癌细胞HepG2基因组DNA为模板, 经PCR扩增, 得到833 bp的人AFP增强子和191 bp的启动子片段, 与pGEM-T Easy载体连接后转化大肠杆菌DH5 α , 提取转化子质粒DNA, *Bgl* II和*Bam*HI双酶切显示分别有相应大小的插入片段(图2和图3), DNA测序证实均完全与预期的序列(GenBank accession number NT_006216中相应序列)相符。

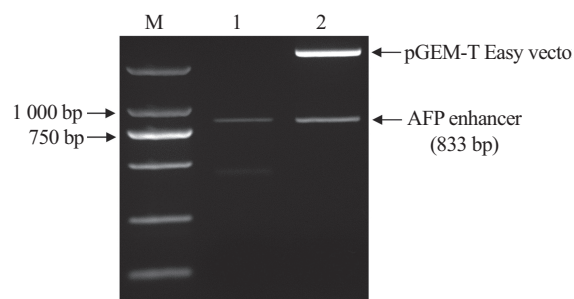
2.2 荧光素酶报告基因载体的构建

将上述克隆的833 bp的AFP增强子片段插入pGEM-T Easy/AFPpromoter的*Bgl* II位点, 转化子质粒经*Bgl* II和*Bam*HI双酶切鉴定, 获得正确连接的1 018 bp的AFP增强子-启动子组合片段(图4)。先后将此AFP重组启动子和CMV早期转录增强子插入荧光素酶报告基因pGL4.10载体, 分别得到带有AFP重组启动子和带有CMV增强子的AFP重组启动子荧光

素酶报告基因载体, 经*Bgl* II和*Hind* III双酶切鉴定, 正确的pGL4.10/AFP质粒应出现4 223 bp、653 bp和384 bp三条带, pGL4.10/CMVenhancer-AFP应出现4 223 bp、927 bp和653 bp三条带, 结果表明, 两个载体均构建正确(图5)。

2.3 CMV早期转录增强子对CEA启动子效率的作用

我们建立了逆转录-实时荧光定量PCR方

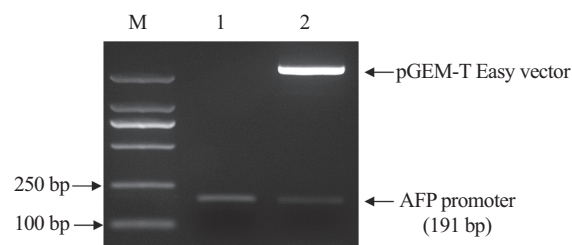


M: DL2000 DNA分子量标记; 1: 纯化的PCR产物; 2: *Bgl* II和*Bam*HI双酶切转化子质粒。

M: DL2000 DNA marker; 1: purified PCR product; 2: plasmid of transformant double-digested by *Bgl* II and *Bam*HI.

图2 AFP增强子的克隆

Fig.2 Cloning of AFP enhancer

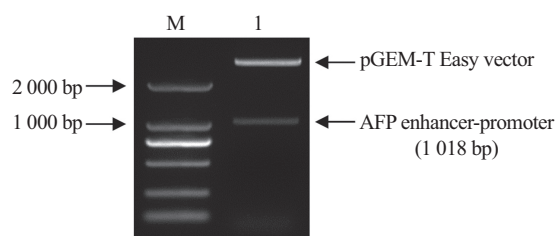


M: DL2000 DNA分子量标记; 1: 纯化的PCR产物; 2: *Bgl* II和*Bam*HI双酶切转化子质粒。

M: DL2000 DNA marker; 1: purified PCR product; 2: plasmid of transformant double-digested by *Bgl* II and *Bam*HI.

图3 AFP启动子的克隆

Fig.3 Cloning of AFP promoter



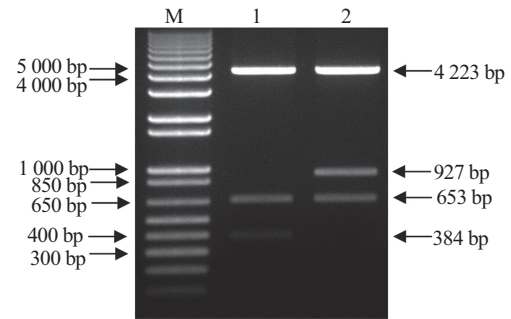
M: DL2000 DNA分子量标记; 1: *Bgl* II和*Bam*HI双酶切转化子质粒。
M: DL2000 DNA marker; 1: plasmid of transformant double-digested by *Bgl* II and *Bam*HI.

图4 AFP增强子-启动子组合

Fig.4 Combination of AFP enhancer and promoter

法, 对肝癌Hep3B、HepG2、SMMC7721细胞、乳癌Bcap37细胞和宫颈癌HeLa细胞本身的AFP表达情况进行了检测。从荧光定量PCR扩增曲线和融解曲线(图6)来看, 我们建立的检测细胞中AFP基因和内参照GAPDH基因表达的方法是可靠的。从检测结果(表1)可以看出, 肝癌Hep3B细胞中AFP相对表达最高, 其他几种细胞中AFP相对表达都较低。

以单独的AFP重组启动子荧光素酶报告基因载体(pGL4.10/AFP)和带有CMV早期转录增强子的AFP重组启动子的荧光素酶报告基因载体(pGL4.10/CMVenhancer-AFP)分别转染肝癌细胞、乳癌和宫颈癌细胞后, 各个转染细胞的相对荧光素酶活性见图7及表2。结果显示, CMV早期转录增强子既

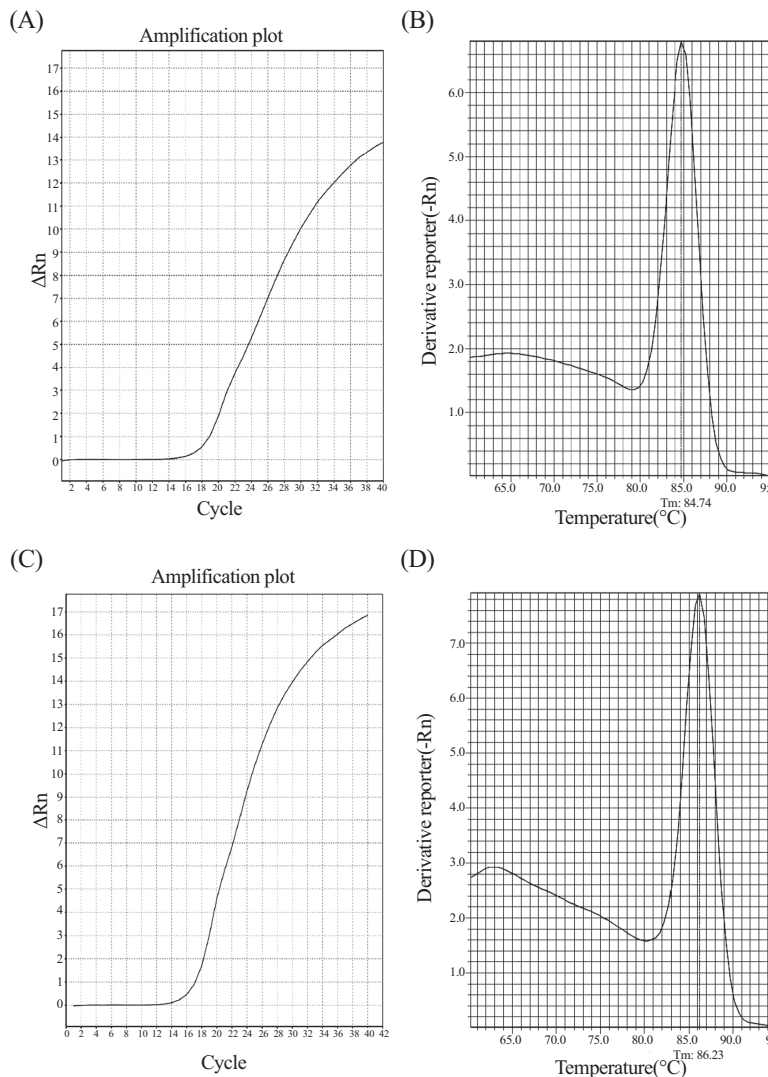


M: 1 Kb Plus DNA分子量标记; 1: *Bgl* II和*Hind* III双酶切pGL4.10/AFP; 2: *Bgl* II和*Hind* III双酶切pGL4.10/CMVenhancer-AFP。

M: 1 Kb Plus DNA marker; 1: pGL4.10/AFP double digested by *Bgl* II and *Hind* III; 2: pGL4.10/CMVenhancer-AFP double digested by *Bgl* II and *Hind* III.

图5 荧光素酶报告基因载体的构建

Fig.5 Construction of luciferase reporter vectors



A: AFP扩增曲线; B: AFP扩增融解曲线; C: GAPDH扩增曲线; D: GAPDH融解曲线。

A: amplification plot of AFP; B: melting curve of AFP amplification; C: amplification of GAPDH; D: melting curve of GAPDH amplification.

图6 实时荧光定量PCR扩增方法的建立

Fig.6 Establishment of Real-time quantitative PCR assay

表1 不同细胞内AFP相对表达水平

Table 1 Relative expression level of AFP in different cell lines

细胞系 Cell lines	AFP/GAPDH(Δ Ct)
Hep3B	0.183 933
HepG2	-14.473 6
SMMC7721	-15.381 8
HeLa	-10.059 9
Bcap37	-14.011 5

可以大大提高肝癌细胞中AFP重组启动子的效率(在Hep3B、HepG2和SMMC7721细胞中分别提高33.07、134.22和465.18倍),也能提高非肝癌肿瘤细胞中AFP重组启动子的效率(在HeLa和Bcap37细胞中分别提高335.73和1096.81倍)。因此,CMV增强子虽然可以大大提高AFP重组启动子的效率,但无特异性。

3 讨论

肿瘤的临床治疗已进入根据患者肿瘤细胞的生物学特性而进行个体化靶向性治疗时代^[16-17],肝癌的治疗也如此^[18]。肿瘤基因治疗本身即是在分子水平以特定的目的基因针对肿瘤细胞进行治疗,在靶向性治疗方面有其独特的优势。对于肿瘤基因治疗这一总体上仍处于研究阶段的治疗模式而言,靶向性基因治疗的一个非常重要的策略是使目的基因靶向性地在肿瘤细胞中表达,而利用肿瘤细胞特异性启动子调控目的基因的表达是实现这一策略的手段,如利用肿瘤细胞中各种高表达的生存素(survivin)、端粒酶逆转录酶活性亚基(telomerase reverse transcriptase, TERT)、中期因子(midkine, MK)、癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)以及本研究中使用的AFP等基因的启动子^[19]。

肝癌细胞特异性地表达AFP,这一特点使得AFP启动子被大量用于肝癌基因治疗研究。肝癌细

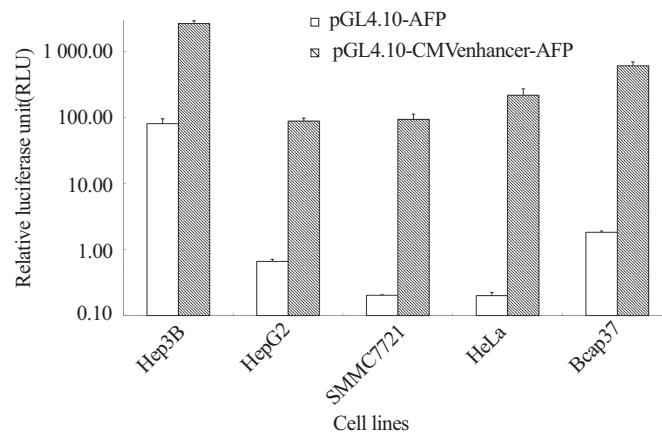


图7 不同细胞中CMV早期转录增强子对AFP重组启动子的增强作用

Fig.7 Effect of CMV early transcriptional enhancer on transcription activity of AFP enhancer-promoter in different cell lines

表2 不同荧光素酶报告基因载体转染后细胞内相对荧光素酶的活性

Table 2 Relative luciferase activity in cells transfected by different luciferase reporter vectors

细胞系 Cell line	pGL4.10/AFP	pGL4.10/CMVenhancer-AFP	升高倍数 Fold increased
Hep3B	81.50±14.95	2 695.41±267.30	33.07±9.88
HepG2	0.66±0.05	89.09±9.77	134.22±24.38
SMMC7721	0.20±0.00	94.55±19.22	465.18±86.66
HeLa	0.20±0.02	220.28±55.35	1 096.81±215.50
Bcap37	1.84±0.09	616.48±87.72	335.73±36.17

表中数据为3复孔的平均相对荧光素酶活性(RLU)±S.D.。

The data are represented as mean relative luciferase units(RLU) from three replicates±S.D..

胞有AFP表达,说明细胞内AFP启动子是活化的且有较多相应的转录因子,基于此,靶向基因治疗时如果将治疗基因(如抑癌基因)置于AFP启动子调控下导入肝癌细胞,则可在肝癌细胞内表达治疗基因,发挥治疗作用;而在正常细胞中则不会有效地转录治疗基因,不会影响正常细胞。

但是和其他一些组织特异性启动子一样,AFP启动子的转录启动效率相对于其他一些在细胞内持续性表达的结构基因或功能基因(如 β -Actin、GAPDH等管家基因)或其它基因工程表达载体上所用的启动子(如SV40启动子等)来说则并不是很高^[20],而且由于不同的肝癌细胞中AFP的表达水平有高有低,使得AFP启动子在哪些不同的肝癌细胞中的转录启动效率不一,从而影响其调控的目的基因的表达效率和所发挥的作用,最终导致基于AFP启动子的靶向性肝癌基因治疗的效果不一,尤其是对一些AFP表达水平较低的肝癌细胞的基因治疗效果较差。不同的肝癌细胞中AFP表达水平高低不一,说明其中AFP启动子活化情况及细胞内转录相关因子情况不同,因此,要提高靶向性肝癌基因治疗的效果,必须提高特异性启动子的转录启动效率。目前,在很多研究中采用AFP启动子与其自身增强子^[4]或其他一些序列如SV40增强子^[5]、乙肝病毒增强子2(HBV enhancer II)^[6]、缺氧反应元件(hypoxia response element, HRE)^[21-22]等方式来提高其效率。

人巨细胞病毒启动子是目前真核细胞表达载体中表达效率最高、应用最广的一个启动子,其高效的转录是由上游的早期转录增强子来达到的,因此该增强子也被用来提高其他启动子的转录启动效率。最近的报道显示,CMV早期转录增强序列分别插入到人心钠素(human atrial natriuretic factor, hANF)、人心室肌球蛋白轻链(human ventricular myosin light chain, MLC2v)和II型肺泡上皮细胞表面活性蛋白[type II alveolar epithelial cell(AT-2)-specific human surfactant protein C, SP-C]的启动子的上游,可在相应的特异性组织细胞中显著提高这些启动子调控的基因的表达,幅度从44倍至1 881倍,而在非特异性组织细胞中仅提高7倍^[7],因此该增强子也被用来提高肝癌靶向性基因治疗研究中AFP启动子的效率^[8-10]。

但是,由于CMV早期转录增强子本身的作用是不具有细胞特异性的,在一些情况下会使相应的启

动子丧失其组织细胞特异性^[13],因此有必要明确该增强子是否可用于以AFP启动子为表达调控元件的肝癌靶向性基因治疗。

启动子是基因表达的基本调控元件,而增强子则可以显著提高启动子的启动效率的表达调控元件。人的AFP基因启动子的5'侧翼有一个增强子区域,有多个肝细胞核因子(hepatocyte nuclear factor, HNF)结合位点,可以特异性地提高AFP启动子的效率^[14]。因此,在本研究中我们首先克隆了人AFP启动子,同时还克隆了具有多个HNF结合位点的AFP增强子,组成比单纯的AFP启动子效率更高且具有肝癌细胞特异性的重组AFP启动子,再分析CMV早期转录增强子对这一重组AFP启动子在肝癌细胞和非肝癌细胞中的特异性是否有影响。

本研究中所用的两种报告基因载体(pGL4.10携带萤火虫荧光素酶报告基因,内参质粒pGL4.74携带海肾荧光素酶基因)是在同一块24孔板上采用同样的方法转染、收集、检测的。由于细胞内无内源性荧光素酶基因,检测到的荧光素酶只能通过外源转染的载体表达,在相同处理及检测手段的情况下,其活性差异仅反映不同载体的差异。

本研究的结果显示,CMV早期转录增强子虽然能够极大地提高带有多个特异性肝细胞核因子结合位点的AFP重组启动子在肝癌细胞中的效率(最高465.18倍),在非肝癌细胞中的效率也被大大提高(高达1 096.81倍)。这一现象与该增强子对另一种肿瘤特异性基因癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)的启动子的作用相似,CMV增强子能够明显增强CEA启动子在CEA阳性细胞中的效率(提高7.46至70.16倍),但是也能提高CEA启动子在CEA阴性细胞中的效率(提高24.01至76.40倍)^[13]。虽然CEA启动子效率可以被大大提高,但丧失了其特异性。在另一项以慢病毒为载体、以绿荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)为报告基因的研究中也发现,利用CMV早期转录增强子可以提高人心钠素启动子在心肌细胞中的作用,但也使得其在成纤维细胞、内皮细胞和平滑肌细胞中会有较强的非特异性表达^[7]。

在肿瘤基因治疗中常采用比一般质粒转染效率更高的病毒感染方法,使得载体能够更有效地进入细胞。本研究中采用质粒转染方法得到的实验结果,如果采用病毒载体,将可使更多的细胞表达报告

基因,能明显地反映出这一增强作用。

因此,在肝癌靶向性基因治疗中如果直接将CMV早期转录增强子应用于AFP启动子组合,可能会引起目的基因在非肝癌细胞中的泄露表达,从而导致副作用。如何在利用CMV早期转录增强子这一高效增强子的同时保持AFP启动子本身的组织细胞特异性,是目前需要解决的一个关键问题。通过研究肝癌细胞特异性转录因子的表达情况、在相应的调控序列上增加肝癌细胞特异性转录因子结合位点,联合采用其他肝癌细胞特异性表达调控元件等手段都可能增强其表达肝癌细胞特异性,都是可以尝试的解决方式。这一问题的解决将大大推动肝癌的靶向性基因治疗研究。

参考文献 (References)

- Jemal A, Bray F, Center M, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90.
- 郑荣寿, 张思维, 吴良有, 李光琳, 赵平, 赫捷, 等. 中国肿瘤登记地区2008年恶性肿瘤发病和死亡分析. *中国肿瘤(Zheng Rongshou, Zhang Siwei, Wu Liangyou, Li Guanglin, Zhao Ping, He Jie, et al. Report of incidence and mortality from China cancer registries in 2008. China Cancer)* 2012; 21(1): 1-12.
- 吴菲, 林国桢, 张晋昕. 我国恶性肿瘤发病现状及趋势. *中国肿瘤(Wu Fei, Lin Guozhen, Zhang Jinxin. An overview of cancer incidence and trend in China. China Cancer)* 2012; 21(2): 81-5.
- Kim KI, Park JH, Lee YJ, Lee TS, Park JJ, Song I, et al. *In vivo* bioluminescent imaging of α -fetoprotein-producing hepatocellular carcinoma in the diethylnitrosamine-treated mouse using recombinant adenoviral vector. *J Gene Med* 2012; 14(8): 513-20.
- 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.
- Hsieh YJ, Liu RS, Hwu L, Ke CC, Wang FH, Wang HE, et al. Cre/loxP system controlled by specific promoter for radiation-mediated gene therapy of hepatoma. *Anticancer Res* 2007; 27(3B): 1571-9.
- 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: 21-32.
- 李青春, 梁淑娟, 王雪净, 刘艳艳, 王焕芹, 张素华. AFP启动子调控的小鼠IL-1 β 重组载体的构建及其在肝癌H22细胞中的表达. *细胞与分子免疫学杂志(Li Qingchun, Liang Shujuan, Wang Xuejing, Liu Yanyan, Wang Huanqin, Zhang Suhua. Establishment of AFP promoter operated murine IL-1 β recombinant vector and its expression in H22 cells. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology)* 2009; 25(7): 603-5.
- 刘艳艳, 梁淑娟, 王焕芹, 张素华, 肖伟玲, 吴慧娜. 肝癌细胞特异性IL-1 α 反义RNA对小鼠移植肝癌的抑制. *中国肿瘤生物治疗杂志(Liu Yanyan, Liang Shujuan, Wang Huanqin, Zhang Suhua, Xiao Weiling, Wu Huina. Hepatocarcinoma specific IL-1 α anti-sense RNA inhibits implanted hepatocarcinoma in mice. Chinese Journal of Cancer Biotherapy)* 2009; 16(3): 253-7.
- 张鹤文, 刘霆, 王志明. 肝细胞癌新型靶向基因治疗体系的构建及应用研究. *生物医学工程学杂志(Zhang Gewen, Liu Ting, Wang Zhiming. Construction and application of a novel gene-traget therapy system in hepatocellular carcinoma. Journal of Biomedical Engineering)* 2012; 29(3): 563-7.
- Hasselbach L, Haase S, Fischer D, Kolberg HC, Stürzbecher HW. Characterisation of the promoter region of the human DNA-repair gene Rad51. *Eur J Gynaecol Oncol* 2005; 26(6): 589-98.
- Shifera AS, Hardin JA. Factors modulating expression of *Renilla luciferase* from control plasmids used in luciferase reporter gene assays. *Anal Biochem* 2010; 396(2): 167-72.
- 陈琼姜, 贾振宇, 陈萍, 魏群, 张敏, 陈钧强, 等. CMV早期转录增强子对人癌胚抗原启动子效率的作用研究. *中国细胞生物学学报(Chen Qiongjiang, Jia Zhenyu, Chen Ping, Wei Qun, Zhang Min, Chen Junqiang, et al. Study on the effect of human CMV early transcriptional enhancer on human CEA promoter. Chinese Journal of Cell Biology)* 2010; 32(5): 726-32.
- Nakabayashi H, Koyama Y, Suzuki H, Li HM, Sakai M, Miura Y, et al. Functional mapping of tissue-specific elements of the human α -fetoprotein gene enhancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 318: 773-85.
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 6.4-6.12.
- de Palma M, Hanahan D. The biology of personalized cancer medicine: Facing individual complexities underlying hallmark capabilities. *Mol Oncol* 2012; 6(2): 111-27.
- Awada A, Vandone AM, Aftimos P. Personalized management of patients with solid cancers: Moving from patient characteristics to tumor biology. *Curr Opin Oncol* 2012; 24(3): 297-304.
- Miki D, Ochi H, Hayes CN, Aikata H, Chayama K. Hepatocellular carcinoma: Towards personalized medicine. *Cancer Sci* 2012; 103(5): 846-50.
- Fukazawa T, Matsuoka J, Yamatsuji T, Maeda Y, Durbin ML, Naomoto Y. Adenovirus-mediated cancer gene therapy and virotherapy(review). *Int J Mol Med* 2010; 25(1): 3-10.
- Ye X, Liang M, Meng X, Ren X, Chen H, Li ZY, et al. In-sulation from viral transcriptional regulatory elements enables improvement to hepatoma-specific gene expression from adenovirus vectors. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 307(4): 759-64.
- Kwon OJ, Kim PH, Huyn S, Wu L, Kim M, Yun CO. A hypoxia- and alpha-fetoprotein-dependent oncolytic adenovirus exhibits specific killing of hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res* 2010; 16(24): 6071-82.
- Ido A, Uto H, Moriuchi A, Nagata K, Onaga Y, Onaga M, et al. Gene therapy targeting for hepatocellular carcinoma: Selective and enhanced suicide gene expression regulated by a hypoxia-inducible enhancer linked to a human alpha-fetoprotein promoter. *Cancer Res* 2001; 61(7): 3016-21.