

CMV 早期转录增强子对人癌胚抗原启动子效率的作用研究

陈琼姜¹ 贾振宇^{1*} 陈萍² 魏群² 张敏¹ 陈钧强¹ 张幸¹ 叶景佳³ 曹江²

(¹浙江省医学科学院, 杭州 310013; ²浙江大学邵逸夫临床医学研究所, 杭州 310016;

³浙江大学医学院附属第二医院临床实验研究中心, 杭州 310009)

摘要 为了探讨人巨细胞病毒(CMV)早期转录增强子用于癌胚抗原(CEA)阳性肿瘤的靶向基因治疗的意义, 我们参考有关文献利用 PCR 法分别克隆了 369 bp 的人 CEA 启动子和 531 bp 的 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 CEA 阳性的人肠癌细胞 LoVo、HT-29、SW620、肺癌细胞 A549、乳腺癌细胞 MCF7 和 CEA 阴性的肠癌细胞 SW480、宫颈癌细胞 HeLa、人肺成纤维细胞 LL47, 利用双荧光素酶检测系统检测分析了这些细胞中 CEA 重组启动子的效率。结果表明, 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)。因此上述 CMV 增强子虽然可以大大提高 CEA 启动子的效率, 但是对特异性有影响, 在将其用于 CEA 阳性肿瘤基因治疗时还需采用其它保证特异性的手段。

关键词 细胞特异性启动子; 癌胚抗原(CEA)启动子; 巨细胞病毒(CMV)早期转录增强子; 肿瘤基因治疗

恶性肿瘤是危害人类健康的一大凶手, 继手术、放射治疗和化学治疗之后, 包括基因治疗、免疫治疗等多种治疗方式在内的肿瘤生物治疗正在成为日益发挥强大作用的第四种治疗模式, 其中靶向性基因治疗是目前一个研究热点。应用肿瘤细胞特异性启动子调控目的基因表达是靶向性基因治疗的关键。以癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)启动子为目的基因的表达调控序列对 CEA 阳性肿瘤细胞有一定的靶向性^[1-5], 但总体而言 CEA 启动子的转录启动效率较低, 且因不同的肿瘤细胞表达 CEA 的水平高低而异, 因此在一定程度上限制了它的应用。如能提高 CEA 启动子的靶向启动效率将大大改善其目前应用状况, 对 CEA 阳性肿瘤的靶向性基因治疗具有重要意义。

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^[6]。对于 CEA 启动子而言, 虽然有个别研究报道^[7]表明 CMV 早期转录增强子可能增强 CEA 启动子的特异性转录作用, 但是我们在研究工作中发现这一增强作用似乎并不具有特异性。CMV 早期转录增强子究竟能否特异地提高 CEA 启动子的效率, 将决定其能否应用于相应的靶向性基因治

疗。为了明确这一关键问题, 本研究克隆了带有 CMV 早期转录增强子的 CEA 启动子, 利用目前广泛应用于启动子转录活性研究的高灵敏度生物荧光素酶报告系统^[8,9], 对该增强子对 CEA 启动子在多株不同的 CEA 阳性的肿瘤细胞与 CEA 阴性的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用于 CEA 启动子调控的肿瘤靶向性基因治疗提供参考依据。

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 DH-5 α 由本实验室保存。PCR 产物克隆载体 pMD19-T 购自 TaKaRa 公司, 双荧光素酶报告基因载体 pGL4.10 [luc2]、pGL4.74[hRluc/TK] 及双重荧光素酶活性检测试剂盒 Dual Luciferase Assay Kit 购自 Promega 公司。人肠癌细胞 LoVo、HT-29、SW620、SW480、肺癌细胞 A549、乳腺癌细胞 MCF7、宫颈癌细胞 HeLa 和人肺成纤维细胞 LL47 直接购自美国标准生物

收稿日期: 2010-05-27 接受日期: 2010-09-07

浙江省科技厅(No.2008F1029)和浙江省卫生厅(No.007A086) 资助项目

* 通讯作者。Tel: 0571-88215459, E-mail: zhenyujia@yahoo.com

品收藏中心(American Type Culture Collection, ATCC), 保存于本实验室。

1.1.2 酶、抗体及其它试剂 各种限制性内切酶、连接酶和碱性磷酸酶等工具酶均购自 New England Biolab 公司, PCR 扩增试剂盒购自 TaKaRa 公司, 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 Lipo-fectamine 2000、DNA 分子量标准 1 Kb Plus DNA Ladder 购自 Invitrogen 公司, RPMI 1640 培养液、胎牛血清购自 Invitrogen 公司, BCA 蛋白定量试剂盒购自 Thermo 公司, 小鼠抗 CEA 单克隆抗体购自 Cell Signaling 公司, 小鼠抗 β -Actin 单克隆抗体购自 SANTA CRUZ 公司, 化学发光显色底物购自 Invitrogen 公司, 其它各种常规生物化学试剂购自 Sigma 公司和 Amresco 公司。

1.2 方法

1.2.1 CEA 启动子与 CMV 早期转录增强子的克隆

(1) CEA 启动子 收集生长旺盛的人肠癌细胞 SW620, 按参考文献提取基因组 DNA 并定量。以此基因组 DNA 为模板, 采用 PCR 法扩增 369 bp 的 CEA 启动子片段(Genbank 登录号 NT_011109.15 所列序列中第 14480462-14480830 位, CEA 基因的转录起始点的 -266 至 +102 位), 上游引物为: 5'-AGA TCT CCC GGG ACC CTG CTG GGT TTC-3' (斜体为引入的 *Bgl*III 位点), 下游引物为 5'-GGA TCC AGC TTG AGT TCC AGG AAC G-3' (斜体为引入的 *Bam*HI 位点), 扩增产物大小为 381 bp, PCR 条件为: 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 381 bp 的 PCR 产物, 将 4 μ l 回收的 PCR 产物与 1 μ l PCR 产物克隆载体 pMD19-T 按照使用说明建立连接体系, 于 16°C 连接过夜, 转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 涂布于含有 X-Gal、IPTG 和氨卞青霉素的琼脂糖平板, 提取转化子质粒 DNA, 用 *Bgl*III 和 *Bam*HI 双酶切检测有无 381 bp 的插入片段, 将有大小正确的插入片段的质粒 DNA 送至 Invitrogen 公司测序, 序列正确者即为 pMD19-T/CEA。

(2) CMV 早期转录增强子 参考有关文献, 以 pcDNA3.1(+) 质粒为模板, 采用 PCR 法扩增载体上第 235~765 位区域的 CMV 早期转录增强子, 5' 引物为: 5'-AGA TCT GAC ATT GAT TAT TGA CTA GT-3' (斜

体为引入的 *Bgl*III 位点)、3' 引物为: 5'-GGA TCC ATG GGG CGG AGT TGT TAC GA-3' (斜体为引入的 *Bam*HI 位点), PCR 条件为: 95°C, 5 min; 95°C, 30 s; 45°C, 45 s; 72°C, 45 s, 循环 30 次; 最后一个循环完成后于 72°C 继续反应 10 min。同上分离、回收 543 bp 的 PCR 产物, 克隆至 pMD19-T 载体并测序, 序列正确者即为 pMD19-T/CMVenhancer。

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

用 *Bgl*III 和 *Bam*HI 分别双酶切 pMD19-T/CEA 和 pMD19-T/CMVenhancer, 分离、回收两种插入片段, 将 CEA 启动子克隆至荧光素酶报告载体 pGL4.10 的 *Bgl*III 位点, 得到带有 CEA 启动子的荧光素酶报告载体 pGL4.10/CEA, 再将 CMVenhancer 插入 pGL4.10/CEA 的 *Bgl*III 位点, 得到带有 CMV 早期转录增强子的 CEA 启动子荧光素酶报告载体 pGL4.10/CMVenhancer-CEA。分别用 *Bgl*III 和 *Hind*III 双酶切鉴定的片段正确插入。以质粒提取试剂盒提取 pGL4.10/CEA 和 pGL4.10/CMVenhancer-CEA, 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, 对质粒 DNA 定量。

1.2.3 细胞转染 人肠癌细胞 LoVo、HT-29、SW620、SW480、肺癌细胞 A549、乳腺癌细胞 MCF7、宫颈癌细胞 HeLa 和人肺成纤维细胞 LL47 培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 5% CO₂, 37°C。细胞密度达 80%~90% 时传代。

收集生长旺盛的上述细胞并悬浮于培养液中, 调至 4 \times 10⁵ 细胞/ml, 接种于 24 孔板, 2 \times 10⁵ 细胞/500 μ l 孔, 培养过夜。按照转染试剂说明书, 分别取 1 μ g 上述纯化的带 CEA 启动子的荧光素酶报告载体 pGL4.10/CEA、pGL4.10/CMVenhancer-CEA 及不带启动子的 pGL4.10, 与 10 ng 的内参质粒 pGL4.74 混合, 用无血清培养液稀释至 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 以形成转染复合物; 逐滴加入 24 孔板的细胞中, 混匀后置培养箱中培养。每种转染设三重孔。

1.2.4 荧光素酶活性检测 按双重荧光素酶活性检测试剂盒说明书进行双重荧光素酶活性检测。转染 24 h 后的细胞, 用预冷的 PBS 洗两遍, 然后加 100 μ l Passive Lysis Buffer 于冰浴中裂解细胞 15 min; 移至微量离心管, 在漩涡振荡器上充分振荡, 4°C 下 13 000 rpm 离心 15 s; 取 20 μ l 上清与 100 μ l LAR II 混匀, 以荧光分光光度计检测 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, 记录水母荧光素酶活性。以萤火虫荧光素活性 / 水母荧光素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, 计算各不同报告载体的相对荧光素酶活性。

1.2.5 细胞系中 CEA 蛋白水平检测 细胞系 LoVo、HT-29、SW620、SW480、A549、MCF7、HeLa 和 LL47 培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 5% CO₂, 37℃。细胞密度达 70%~80% 时收集细胞, 裂解于裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH6.8, 2% SDS)中, 用 BCA 蛋白质定量试剂盒按照说明书测定细胞裂解液中的总蛋白浓度; 用 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)方法分离 20 μ g 细胞总蛋白, 并将蛋白转移到 PVDF 膜上, 于含 5% 脱脂奶粉的 PBST (PBS, 0.1% Tween-20) 封闭缓冲液室温下封闭 1 h, 用稀释于含 3% 脱脂奶粉的 PBST 中小鼠抗 CEA 或 Actin 单克隆抗体在 4℃ 孵育过夜, 洗涤后再与稀释于含 3% 脱脂奶粉的 PBST 中的 HRP-羊抗鼠 IgG 于室温下反应 1 h, 再洗涤, 加化学发光显色底物反应液, 反应 5 min 后在 Alpha Innotech 化学发光凝胶成像仪中显带。

2 结果

2.1 CEA 启动子和 CMV 早期转录增强子的克隆

经 PCR 扩增, 分别从人肠癌细胞基因组 DNA 和 pcDNA3.1(+) 克隆到 381 bp 的人 CEA 启动子和 543 bp 的 CMV 早期转录增强子, 分别见图 1 和图 2。将 CMV 早期转录增强子插入 pMD19-T/CEA 的 *Bgl*III 位点, 利用 *Bam*HI 与 *Bgl*III 双酶切可以获得带有 CMV 早期转录增强子的重组 CEA 启动子。

2.2 荧光素酶报告基因载体的构建

分别将上述克隆的 CEA 启动子和 CMV 早期转录

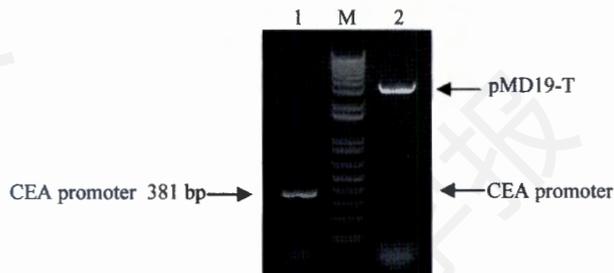


Fig.1 Cloning of CEA promoter

1: PCR product; M: 1 Kb Plus DNA marker; 2: *Bam*HI and *Bgl*III double digestion of pMD19-T/CEA.

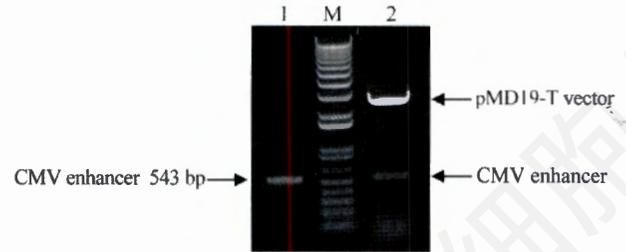


Fig.2 Cloning of CMV early transcriptional enhancer
1: PCR product; M: 1 Kb Plus DNA marker; 2: *Bam*HI and *Bgl*III double digestion of pMD19-T/CMV enhancer.

增强子用于构建荧光素酶报告基因载体, 分别得到带有 CEA 启动子和带有 CMV 增强子的 CEA 启动子荧光素酶报告基因载体, 见图 3。

2.3 CMV 早期转录增强子对 CEA 启动子效率的作用

用 Western blot 方法检测培养的肠癌细胞 LoVo、HT-29、SW620、SW480、肺癌细胞 A549、乳腺癌细胞 MCF7、宫颈癌细胞 HeLa 和人肺成纤维细胞 LL47 中 CEA 的蛋白水平, 以 β -Actin 蛋白水平作为各细胞系等量蛋白的参照(图 4), 结果显示这些细胞系具有不同的内源性 CEA 蛋白表达情况。

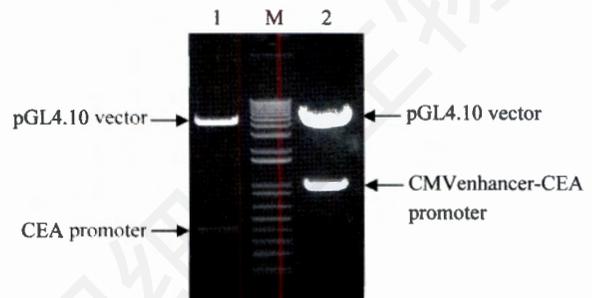


Fig.3 Identification of luciferase reporter vectors containing CEA promoters

1: *Bgl*III and *Hind*III double digestion of pGL4.10/CEA; M: 1 Kb Plus DNA marker; 2: *Bgl*III and *Hind*III double digestion of pGL4.10/CMV enhancer-CEA.

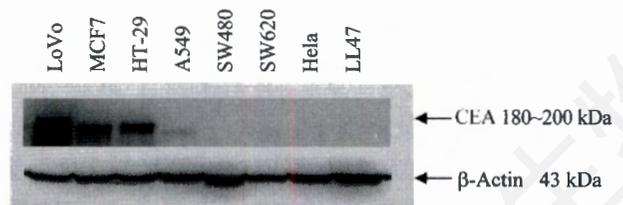


Fig.4 Carcinoembryonic antigen (CEA) protein level in different cell lines by immunoblotting

以单独的CEA启动子荧光素酶报告基因载体和带有CMV早期转录增强子的重组CEA启动子的荧光素酶报告基因载体分别转染上述细胞后,各个转染细胞的相对荧光素酶活性见图5及表1。

上述结果显示,CMV转录增强子能显著提高CEA的启动活性,在CEA高表达的人肠癌细胞LoVo中提高了7.46倍、CEA中等表达的乳腺癌细胞MCF7中提高了67.45倍、CEA中等表达的肠癌细胞HT-29中提高了23.12倍、CEA低表达的肺癌细胞A549中提高了70.16倍、CEA低表达的肠癌细胞SW620提高了7.93倍,但是在Western blot检测中显示CEA阴性的肠癌细胞SW480、宫颈癌细胞HeLa与人肺成纤维细胞LL47中也分别提高了30.22、76.40和24.01倍。这说明参考有关文献克隆的531 bp的CMV转录增强子对369 bp的CEA转录活性的增强作用与细胞中CEA的表达水平没有相关性,这一增强作用弱化了CEA启动子的特异性。

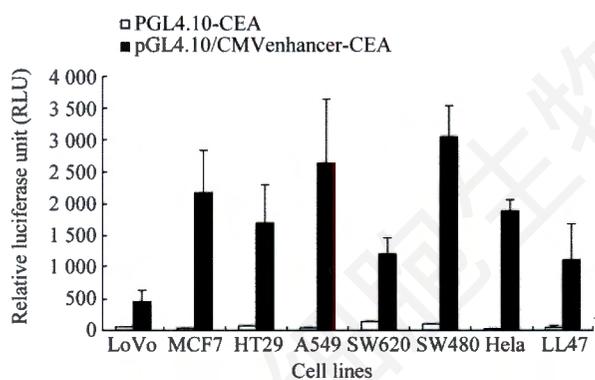


Fig.5 Effect of CMV early transcriptional enhancer on transcription activity of two recombinant CEA promoters in different cell lines

The column represents mean relative luciferase units (RLU) from three replicates and the bar represents the s.d..

3 讨论

靶向性是肿瘤基因治疗一个非常重要的方面,即在特异性杀伤肿瘤细胞的同时对正常细胞没有伤害。目前基因治疗靶向性研究包括使目的基因靶向性地在肿瘤细胞中表达。

CEA (carcino-embryonic antigen, CEA)是一种胚胎性抗原,是人类胚胎发育阶段细胞合成的正常成分,在胚胎发育后期合成逐渐减少,出生后逐渐消失,或仅存留极微量。当正常细胞转化为肿瘤细胞时,这类抗原重新合成。CEA在包括肠癌、胃癌、肺癌、乳癌等常见肿瘤的多种肿瘤中均有表达,其启动子亦被用于靶向性基因治疗研究^[1-5]。但由于其启动效率低,限制了其调控的外源基因的表达效率,从而影响基因治疗的效果。为了解决这一问题,Nyati等^[4]在CEA基因转录起始点上游连接一CEA转录增强序列,发现可提高CEA启动子的特异性启动效率8~30倍;Guo等^[5]将CEA启动子置于四个线性串连的核因子κB DNA结合位点的下游,将CEA的启动效率提高了3~8倍;但是与常用的无靶向性启动子相比启动效率仍相差较多。

Nettelbeck等^[10]构建了一个正向自身调节环:单纯疱疹病毒的VP16蛋白与一种DNA损伤修复所需的DNA聚合酶的抑制酶LexA融合形成的融合蛋白VP-LexA,由内皮细胞特异性启动子vWF或胃肠道肿瘤特异性表达的SI基因的启动子启动表达;表达的VP-LexA蛋白结合于七个重复串连位于vWF或SI上游的DNA结合位点LexA,有效提高了vWF的转录活性23~67倍或SI的转录活性14~37倍,同时保持vWF或SI的细胞特异性不变。Iyer等^[11]采用两步转录扩增法,即前列腺特异性抗原(PSA)启动子启动由一个酵母转录激活蛋白Gal4与两个单纯疱疹病毒的VP16

Table 1 Transcription efficiency of two recombinant CEA promoters in different cells

Cell lines	pGL4.10/CEA (Relative luciferase unit) ±s.d.	pGL4.10/CMVenhancer-CEA (Relative luciferase unit) ±s.d.	Folds increase (pGL4.10/CMVenhancer- CEA versus pGL4.10/CEA) ±s.d.
LoVo	53.49±2.35	452.61±177.05	8.46±3.31
MCF7	31.76±3.90	3 174.22±666.44	68.45±20.98
HT-29	70.07±5.72	1 690.25±606.32	24.12±8.65
A549	37.10±10.72	2 640.41±1 006.52	71.16±27.13
SW620	134.85±6.49	1 203.57±257.54	8.93±1.91
SW480	97.90±4.58	3 056.44±481.18	31.22±4.91
Hela	24.34±3.30	1 884.11±177.61	77.40±7.30
LL47	44.54±28.78	1 113.77±566.90	25.01±12.73

The data represent mean relative luciferase units (RLU) from three replicates±s.d..

蛋白融合形成的融合蛋白 GAL4-VP2 的表达, 表达的 GAL4-VP2 转而与位于目的基因上游的五个串连连接的 Gal4 位点结合, 从而提高了目的基因表达水平 6~8 倍。Nettelbeck 与 Iyer 等的方法需要构建两个转录调控元件。

最近有研究报道^[6,12], 人巨细胞病毒(Cytomegalovirus, CMV)启动子上游的转录增强子能够高效促进一些人细胞特异性启动子的活性。Gruh 等^[6]报道, CMV 早期转录增强序列分别插入到人心钠素(ANF)、人心室肌球蛋白轻链(MLV2v)和 II 型肺泡上皮细胞表面活性蛋白(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。与以往的研究相比, CMV 转录增强子具有结构小、容易克隆、体外整合到肿瘤特异性启动子上游比较方便、对启动子活性的增强效果最强、且能保持启动子的细胞特异性等特点。李富骊等^[7]将 CMV 早期转录增强序列与 CEA 启动子重组, 可特异性地在 CEA 阳性的肺癌细胞 A549 中启动自杀基因的表达, 而在 CEA 阴性的人支气管上皮细胞株 16HBE 中则没有启动自杀基因的表达。但本研究的结果表明, 参考有关文献克隆的 531 bp 的 CMV 早期转录增强子对 369 bp 的 CEA 启动子转录效率确实具有极显著的增强作用, 但这一增强作用对 CEA 启动子的特异性却也有明显影响。

从基因转录调控区的结构来看, 心钠素(ANF)基因的 5' 区域(-700 bp 至 -380 bp)对 ANF 启动子的活性具有重要作用调节序列, 其中的 CArG 结构的活性与是否与心肌细胞特异性调节因子形成复合物有关, 糖(肾上腺)皮质激素刺激 ANF 的转录, 而 fos 与 jun 蛋白则阻遏 ANF 的转录^[13,14]。心室肌球蛋白轻链(MLV2v)基因启动子的特异性由两个正向调节序列 HF-1a 与 HF-1b/MEF-2、一个负向调节序列 HF-3 调控^[15,16]。EF1_A/YB-1 蛋白和一个 p30 蛋白与 HF-1a 特异性结合, 一个新的 C₂H₂ 锌指蛋白和一个转录因子 RSRF 家族成员 MEF2 则与 HF-1b/MEF-2 特异性结合, 从而调控 MLV2v 启动子的细胞特异性活性。II 型肺泡上皮细胞表面活性蛋白(SP-C)基因转录起始点的 5' 上游的 320 个碱基对区域与 TNF- α 结合后, SP-C 基因表达受到抑制^[17]。糖(肾上腺)皮质激素对 SP-C 基因表达的具有重要的调控作用^[18]。心钠素(ANF)、心室肌球蛋白轻链(MLV2v)、II 型肺泡上皮细胞表面活性蛋白(SP-C)基因的转录, 即启动子的活性由各

自不同的细胞特异性因子调控。

而与这些基因的表达调控有所不同的是, 在人肺癌细胞中 CEA 基因 5' 区域一些位点的甲基化程度明显降低^[19,20], 因此 CEA 启动子的活性在一定程度上由其甲基化状态调控。因此, 当由外源 ANF、MLV2v、SP-C 启动子控制的外源基因进入相应的特异性组织细胞中后, 特异性组织细胞中的相应转录因子与 ANF、MLV2v、SP-C 启动子上游的特异调节序列结合, 调节其启动的外源基因的表达, 显示出组织细胞的特异性。而由外源 CEA 启动子控制的外源基因进入肿瘤细胞或非肿瘤细胞后, 由于外源 CEA 启动子不像与内源性的 CEA 启动子具有特有的与细胞类型相对应的特殊甲基化状态, 因此, 由外源 CEA 启动子控制的外源基因的表达水平与肿瘤细胞或非肿瘤细胞类型、肿瘤细胞内源性 CEA 表达水平没有相关性。因而 CMV 转录增强子在提高外源 CEA 启动子带动的外源基因的表达水平的同时却无法保持肿瘤细胞的特异性。

另外, 从结果中可以看出, 各种细胞内源性 CEA 的表达与荧光素酶报告基因显示的 CEA 启动子的转录启动效率并不完全一致, 这是因为内源性 CEA 的表达是由 CEA 基本启动子(basal promoter)序列、增强子(enhancer)和抑制子(silencer)序列等的甲基化(methylation)程度和染色体水平的组蛋白乙酰化(acetylation)情况以及转录因子水平等多层次调控的^[19,20], 而本文克隆的是基本启动子序列。出于基因治疗载体容量、构建策略等多种因素考虑, 目前用作肿瘤基因治疗靶向性调控序列的均为 CEA 基本启动子, 其转录启动能力仅受与该序列结合的转录相关因子水平影响, 所以会表现出与内源性表达水平不完全一致的情况。

因此, 虽然有文献报道 CMV 早期转录增强子在 A549 和 16HBE 细胞中可以特异性地提高 CEA 启动子的效率, 但本工作在更多的 CEA 阳性和阴性细胞中的研究结果表明, 参考有关文献克隆的 531 bp 的 CMV 早期转录增强子对 369 bp 的 CEA 启动子的转录增强作用并不与 CEA 蛋白表达平行, 因此该增强作用不具有特异性。CMV 转录增强子在用于 CEA 启动子调控的 CEA 阳性肿瘤基因治疗时应注意其非特异性作用的影响, 包括可能的副作用。从改进特异性的角度出发, 可考虑采用在该组合中引入其它由肿瘤细胞特异性转录因子结合的序列, 在增强 CEA 启动子活性的同时保持其肿瘤细胞的特异性, 这一设想需要进一

步研究证实。

参考文献(References)

- 1 王 艳, 李 岩, 崔 刚。癌胚抗原启动子调控的白细胞介素-2/干扰素融合基因的原核及真核表达载体的构建。中华消化杂志 2006; 26(6): 399-403.
- 2 Reinblatt M, Pin RH, Fong Y. Carcinoembryonic antigen directed herpes viral oncolysis improves selectivity and activity in colorectal cancer. *Surgery* 2004; 136(3): 579-84.
- 3 Li Y, Chen Y, Dilley J, T Arroyo T, Ko D, Working P, *et al.* Carcinoembryonic antigen-producing cell-specific oncolytic adenovirus, OV798, for colorectal cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 2003; 2(10): 1003-9.
- 4 Nyati MK, Sreekumar A, Li S, Zhang M, Rynkiewicz SD, Chinnaiyan AM, *et al.* High and selective expression of yeast cytosine deaminase under a carcinoembryonic antigen promoter-enhancer. *Cancer Res* 2002; 62(8): 2337-42.
- 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 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.
- 7 李富骊, 何建行, 邱 源。靶向治疗肺癌双自杀基因 HSV2TK/CD 真核表达载体的构建。中国癌症杂志 2007; 17(1): 37-40.
- 8 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.
- 9 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.
- 10 Nettelbeck DM, Jérôme V, Müller R. A strategy for enhancing the transcriptional activity of weak cell type-specific promoters. *Gene Therapy* 1998; 5: 1656-64.
- 11 Iyer M, Salazar FB, Wu L, Carey M, Gambhir SS. Bioluminescence imaging of systemic tumor targeting using a prostate-specific lentiviral vector. *Hum Gene Ther* 2006; 17(1): 125-32.
- 12 Day CP, Rau KM, Qiu L, Liu CW, Kuo HP, Xie X, *et al.* Mutant Bik expression mediated by the enhanced minimal topoisomerase IIalpha promoter selectively suppressed breast tumors in an animal model. *Cancer Gene Ther* 2006; 13(7): 706-19.
- 13 McBride K, Robitaille L, Tremblay S, Argentin S, Nemer M. fos/jun repression of cardiac-specific transcription in quiescent and growth-stimulated myocytes is targeted at a tissue-specific cis element. *Mol Cell Biol* 1993; 13(1): 600-12.
- 14 Argentin S, Ardati A, Tremblay S, Lihmann I, Robitaille L, Drouin J, *et al.* Developmental stage-specific regulation of atrial natriuretic factor gene transcription in cardiac cells. *Mol Cell Biol* 1994; 14(1): 777-90.
- 15 Zou Y, Chien KR. EFIA/YB-1 is a component of cardiac HF-1A binding activity and positively regulates transcription of the myosin light-chain 2v gene. *Mol Cell Biol* 1995; 15(6): 2972-82.
- 16 Small EM, Krieg PA. Molecular regulation of cardiac chamber-specific gene expression. *Trends Cardiovasc Med* 2004; 14(1): 13-8.
- 17 Bachurski CJ, Pryhuber GS, Glasser SW, Kelly SE, Whitsett JA. Tumor necrosis factor- α inhibits surfactant protein C gene transcription. *J Biol Chem* 1995; 270(33): 19402-7.
- 18 Mendelson CR, Boggaram V. Hormonal control of the surfactant system in fetal lung. *Annu Rev Physiol* 1991; 53: 415-40.
- 19 Tran R, Kashmiri SV, Kantor J, Greiner JW, Pestka S, Shively JE. Correlation of DNA hypomethylation with expression of carcinoembryonic antigen in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 1988; 48(20): 5674-9.
- 20 Boucher D, Cournoyer D, Stanners CP, Fuks A. Studies on the control of gene expression of the carcinoembryonic antigen family in human tissue. *Cancer Res* 1989; 49(4): 847-52.

Study on the Effect of Human CMV Early Transcriptional Enhancer on Human CEA Promoter

Qiong-Jiang Chen¹, Zhen-Yu Jia^{1*}, Ping Chen², Qun Wei², Min Zhang¹, Jun-Qiang Chen¹,
Xing Zhang¹, Jing-Jia Ye³, Jiang Cao²

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

Abstract In order to explore the probability of Cytomegalovirus (CMV) early transcriptional enhancer in targeted gene therapy for carcinoembryonic antigen (CEA) positive cancers, CEA promoter (369 bp) and CMV early transcriptional enhancer (531 bp) were cloned by PCR using genomic DNA of human colon carcinoma SW620 cells and pcDNA3.1 (+) plasmid as template, respectively according to literatures. CEA promoter and CMV early transcriptional enhancer were subcloned into luciferase reporter vector pGL4.10 to obtain pGL4.10-CEA and pGL4.10-CMV-CEA, and co-transfected with transfection-efficiency normalization vector pGL4.74 into CEA-positive human colon carcinoma LoVo, HT-29, SW620, lung carcinoma A549 cells, breast carcinoma MCF7 cells and CEA-negative colon carcinoma SW480 cells, cervix carcinoma HeLa cells and lung fibroblast LL47 cells. The transcription initiation efficiencies of CEA promoter in these cells were analyzed by Dual Luciferase Assay system and relative luciferase unit (RLU) was used to evaluate the expression efficiency. The results showed that CMV early transcriptional enhancer up-regulated CEA promoter transcriptional activity significantly by 7.46 to 70.16 folds in the above CEA-positive cancer cells, however, it also up-regulated CEA promoter transcriptional activity in CEA-negative HeLa and fibroblast cells by 24.01 to 76.40 folds. Therefore, the above CMV enhancer can greatly up-regulate CEA promoter transcriptional activity, but may attenuate the specificity of CEA promoter. The side effect of the nonspecificity of CEA promoter with CMV early transcriptional enhancer should be considered for targeted gene therapy of CEA-positive cancer. Combination of other ways such as tissue-specific transcription factor-binding sites in the upstream regulatory region are needed for maintaining the specificity of CEA promoter when utilizing CMV early transcriptional enhancer in targeted gene therapy of CEA-positive cancer.

Key words cell specific promoter; carcino-embryonic-antigen (CEA) promoter; cytomegalovirus (CMV) early transcriptional enhancer; cancer gene-therapy

Received: May 27, 2010 Accepted: September 7, 2010

This work was supported by the Foundation of Department of Science & Technology of Zhejiang Province(No.2008F1029) and Foundation of Public Health of Zhejiang Province(No.2007A086)

*Corresponding author. Tel: 86-571-88215459; E-mail: zhenyujia@yahoo.com