

· 研究原著 ·

文章编号:1000-2790(2005)12-1108-04

肿瘤细胞内特异表达 TRAIL 载体的构建及其在喉癌细胞株 Hepa2 中的表达

成诗银¹ 张惠中² 陈剑秋¹ 张 丽¹ 韩明坤¹ (第四军医大学唐都医院:¹耳鼻咽喉科,²中心实验室 陕西 西安 710038)

Cloning of secreted hTRAIL tumor – specific vector and expression in laryngeal carcinoma cell line Hepa2

CHENG Shi-Yin¹, ZHANG Hui-Zhong², CHEN Jian-Qiu¹, ZHANG Li¹, HAN Ming-Kun¹

¹Department of Otorhinolaryngology, ²Center Laboratory, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China

【Abstract】 AIM: To clone human soluble TRAIL cDNA and construct its eukaryotic expression vector to prepare a condition for targeted gene therapy. METHODS: The total RNA was extracted from human peripheral blood lymphocytes. TRAIL gene with interleukin 2 signal peptide was amplified by RT-PCR and cloned into the vector pGL3-181hTERT promoter downstream to form an eukaryotic vector. Expressing protein was identified by Western Blotting on laryngeal carcinoma cell line Hepa2. RESULTS: Sequence of 613 bp cDNA was obtained. Identified by enzyme digestion and sequence analysis, the recombinant eukaryotic expression vector for TRAIL gene had been successfully constructed. The results of the Western Blotting showed the transfected Hepa2 cell could express TRAIL protein. CONCLUSION: Successful construction of eukaryotic expression vector pGL3-181 hTERT/TRAIL provides the possibility for gene therapy of tumor.

【Keywords】 TRAIL, polymerase chain reaction, telomerase regions (genetics); promoter, gene expression

【摘要】目的:克隆人可溶性 TRAIL(sTRAIL)基因并构建肿瘤细胞特异性真核表达载体,为肿瘤基因治疗的靶向性奠定实验基础。方法:提取人外周血淋巴细胞总 RNA,采用 RT-PCR 扩增含有 IL-2 信号肽和 TRAIL 凋亡诱导功能区的融合基因,克隆入真核表达载体 pGL3-181 hTERT 肿瘤特异性端粒酶启动子的下游,构建可分泌表达 TRAIL 基因的真核表达载体 pGL3-181 hTERT/TRAIL。用 Western Blotting 鉴定喉癌细胞株 Hepa2 中表达产物。结果:RT-PCR 扩增得到了 613 bp 的

cDNA 片段。经酶切及测序鉴定,与 GenBank 中报道的 IL-2 信号肽和 TRAIL 凋亡诱导功能区 cDNA 序列完全一致,成功构建了肿瘤特异性高效分泌表达可溶性人 TRAIL 的重组真核表达载体 pGL3-181hTERT/TRAIL。Western Blotting 结果显示,获得的瞬时转染 TRAIL 在喉癌 Hepa2 肿瘤细胞中能有效表达。结论:重组真核表达载体 pGL3/TRAIL 的成功构建,为肿瘤基因治疗的靶向性提供了可行的理想工具。

【关键词】 TRAIL;聚合酶链反应;端粒;末端转移酶;启动区(遗传学);基因表达

【中图分类号】 R739.63 **【文献标识码】** A

0 引言

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)基因是分子量为 M_r 32500 II 型跨膜蛋白,属于肿瘤坏死因子超家族成员。由于 TRAIL 可以迅速诱导多种肿瘤细胞凋亡,而对正常细胞基本无影响^[1],故自发现以来一直被视为一极具潜力的特异性抗肿瘤分子。但是也有研究表明,人肝细胞、神经细胞等仍可对 TRAIL 诱导的凋亡敏感^[2-4]。人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)基因的启动子属于肿瘤特异性启动子^[5],对肿瘤细胞具有特异性,可在转录水平调控目的基因的表达,以确保对肿瘤细胞的杀伤,而正常组织细胞则不受到伤害,降低了基因治疗的毒副作用。为此,我们利用端粒酶启动子转录 TRAIL 基因,使其在转录水平特异性针对肿瘤细胞控制 TRAIL 基因表达。这一优点有望解决肿瘤基因治疗中靶向性问题。

1 材料和方法

1.1 材料 各种高保真 pfu 酶、限制性内切酶、Taq 酶、T4 DNA 连接酶、DMEM 培养基均购自 Takala 公司。阳离子脂质体 Lipofect AMINE™2000 购自 Invitrogen 公司。DNA 提取试剂盒购自上海基康公司。凝胶回收试剂盒和质粒抽取试剂盒(Promega Wizard Plus Minipreps DNA Purification System)购自 Promega 公司。淋巴细胞分离液购自中国科学院上海生物细胞研究所。IL-2、PHA(植物血凝素)购自上海华瞬生物工

收稿日期 2004-11-23; 修回日期 2004-12-19

作者简介:成诗银(1952-),男(汉族),重庆市人,硕士,博士生导师,教授,主任医师。Tel: (029)83377001 Email: TDZHANG@fmmu.edu.cn

程有限公司. Trizol 总 RNA 试剂盒、RT-PCR 试剂盒购自 GIBCO BRL 公司. Western Blotting 化学发光试剂盒购自 Santa Cruz 生物技术公司. 鼠抗人 TRAIL 单克隆抗体由第四军医大学免疫学教研室惠赠. 鼠抗人 β -actin 多克隆抗体、羊抗鼠 IgG/HRP 购自华美公司. 硝酸纤维素膜购自 Amersham 公司. 质粒 pGEM T Easy 购自 Takala 公司. 含有 hTERT 核心启动子的 pGL3-81 hTERT 质粒由日本 Kanzawa 大学 Satoru Kyo 教授惠赠. 大肠杆菌 JM109 及人喉癌细胞株 Hepa2、人宫颈癌细胞株 HeLa、人肝癌细胞株 SMMC-7721 为本室保存. 正常人肝细胞株 HL-7702 购自武汉大学细胞保藏中心并由本室保存.

1.2 方法

1.2.1 刺激人外周淋巴细胞增殖 清晨空腹静脉抽血 10 mL 利用淋巴细胞分离液分离纯化 PBL(外周血淋巴细胞), 用无血清的 DMEM 洗 2 次, 每次 1000 r/min 离心 10 min, 用含 50 mL/L 小牛血清的 DMEM 调整细胞浓度至 5.0×10^5 /mL, 加入 PHA 至终浓度为 20 mg/L, 置 37°C, 50 mL/L CO₂ 中培养 48 h; 离心, 去上清, 加入等体积的 PBS 重悬细胞; 用淋巴细胞分离液去除死细胞及细胞碎片, 获得纯化的 PBL; 用含 50 mL/L 小牛血清、IL-2(终浓度为 20 u/mL) 的 DMEM 培养 3 d.

1.2.2 淋巴细胞总 RNA 的提取 取上述增殖后的细胞 1×10^6 , 用 PBS 洗 2 次, 每次 1000 r/min 离心 10 min, 利用 Trizol 试剂抽提细胞总 RNA, 操作按说明书进行; 紫外分光光度计检查所提总 RNA 浓度和纯度, $A_{260}/A_{280} \approx 1.9$, 并用 11 g/L 变性甲醛琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性.

1.2.3 逆转录 逆转录反应体系的总体积为 20 μ L, 包括细胞 RNA 1 μ g, 1.25 μ L Oligod T(2.5 μ mol/L), 70°C 水浴 10 min 后, 立即冰浴 2 min. 补加 2 μ L dNTP(25 mmol/L) 4 μ L RT 缓冲液($\times 5$), M-MLV 逆转录酶 1 μ L(3334 nkat/L) 0.5 μ L RNase 抑制剂, 加 DEPC 水至 20 μ L, 于 42°C 水浴 1 h, 经 70°C 10 min 终止反应, -20°C 保存.

1.2.4 PCR 扩增目的基因 根据 GenBank 库中 TRAIL cDNA 的序列和 IL-2 信号肽序列及质粒 pGL3-181hTERT 序列, 设计出扩增 IL-2 信号肽基因与 TRAIL cDNA 片段融合基因的 3 条引物. 下游引物的 5' 端加 XbaI 酶切位点, 上游引物 2 的 5' 端加 Hind III 酶切位点. 引物序列为: 上游引物 1: 5' GCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACCTGTCAC AAACAGTGT GAGAGAAAGAGGTC 3'; 上游引物 2: 5' GCAAGCTTGGCATTCCGGTA CTGTTGGTAAA

GCCACCATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTG 3'; 下游引物: 5' GGCTCTAGA TTAGCCAACTAAAAAGG 3'. PCR 反应体系的总体积为 50 μ L, 其中含 10 \times Pyrobest Buffer 反应缓冲液 5 μ L, 10 μ mol/L 上下游引物各 2.5 μ L, 模板 5 μ L(上游引物 1 和下游引物 PCR 反应的模板为 TRAIL cDNA; 上游引物 2 和下游引物 PCR 反应的模板为上述纯化回收的 PCR 产物, 取 1 μ L 稀释 20 倍), 2.5 mmol/L 的 dNTP 4 μ L, Pyrobest DNA Polymerase(83.35 mkat/L) 0.125 μ L 及灭菌水 30.875 μ L. 上游引物 1 和下游引物的反应条件: 95°C 4 min 1 次, 94°C 45 s, 52°C 45 s, 72°C 1 min 共循环 35 次和 72°C 10 min, 4°C 10 min. 上游引物 2、下游引物的反应条件: 95°C 4 min 1 次, 94°C 60 s, 72°C 各 1 min 循环 35 次和 72°C 10 min, 4°C 10 min. 产物经 1.5 g/L 琼脂糖凝胶电泳初步鉴定.

1.2.5 测序载体 pGEM T Easy/TRAIL 构建及鉴定

扩增产物凝胶电泳后, 以 Promega 凝胶回收试剂盒操作说明, 回收扩增的 613 bp 目的片段. 回收产物进行末端添 A 反应, 反应总体积为 10 μ L, 6 μ L 回收产物、10 \times Taq Buffer 反应缓冲液 1 μ L, 4 mmol/L dATP 0.5 μ L, Taq 酶(33.34 mkat/L) 2.5 μ L, 置 70°C 15 min. 连接入 pGEM T Easy 载体中测序. 连接反应的总体积为 10 μ L, 其中含游扩增片段添 A 回收产物 3 μ L, pGEM T Easy 载体 1 μ L, T4 DNA 连接酶 1 μ L, 2 \times 连接反应缓冲液 5 μ L, 于 4°C 连接 16 h. 连接后的产物经 CaCl₂ 转化法转化 JM109 菌株. 转化菌用氨苄青霉素和蓝白斑进行双筛选, 挑取白色菌落. 经 Promega DNA Purification System 试剂盒说明提取质粒, 用 Hind III 和 Xba I 双酶切鉴定, T7 通用引物测序(上海基康公司), 以判定克隆出的融合基因片段的正确性.

1.2.6 肿瘤特异性 TRAIL 基因真核表达载体的构建 选取测序正确的载体 pGEM T Easy/TRAIL, 经 Hind III 和 Xba I 双酶切、低熔点凝胶电泳后, 回收 613 bp 的融合基因片段, 同时对空载体 pGL3-181 hTERT 也经上述处理后, 回收 3.3 kb 的载体大片段. 按目的基因和载体片段摩尔数比 3:1 进行连接后, 即构建成 pGL3-181 hTERT/TRAIL. 以连接产物转化大肠杆菌, 依次经扩大培养、提取质粒, 及 Hind III 和 Xba I 双酶切后, 用 pGL3-181 hTERT 载体的 RV primer3 引物和下游引物进行 PCR, 鉴定重组真核表达载体, 命名为 pGL3-181 hTERT/TRAIL.

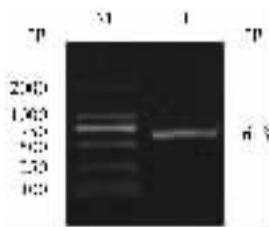
1.2.7 真核细胞瞬时转染 于 10 cm 培养皿分别将人喉癌细胞株 Hepa2、人宫颈癌细胞株 HeLa、人肝癌细胞株 SMMC-7721 和正常人肝细胞株 HL-7702 在

DMEM-10 中按 2×10^7 培养至次日对数期,细胞融汇至 80% 时,按试剂盒中的操作说明,在阳离子脂质体 Lipofect AMINE 介导下,分别以 pGL3-181 hTERT / TRAIL 及空载体 pGL3-181 hTERT 转染上述四种细胞. 孵箱培养 5 h 后,细胞换含小牛血清 DMEM-20 培养基中培养,24 h 后,再换含小牛血清 DMEM-10 培养基继续培养.

1.2.8 SDS-PAGE 电泳和 Western Blotting 鉴定表达产物 将上述转染细胞培养 48 h,收集上清及细胞,置于 -70°C 24 h. 真空干燥器对上清进行浓缩、蛋白质初步纯化. 分别对上清纯化产物及细胞进行 SDS-PAGE 电泳(12% 浓缩胶,4% 分离胶),5 h 后进行考马斯亮蓝染色. 电泳产物分别经 3 h 和 40 min 电转移至硝酸纤维素膜上. 50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 4 h, PBS 漂洗 3 次,分别加入鼠抗人 TRAIL 单抗及作为内参照的 β -actin 多克隆抗体,室温反应 1 h, PBS 漂洗 3 次,再加入羊抗鼠 IgG/HRP,室温再次反应 1 h, PBS 漂洗 3 次后,将膜浸入等体积混合的 Western Blotting 化学发光试剂 A 液和 B 液中 2 min,暗室中将膜贴在 X 胶片上曝光数秒, X 胶片上冲洗后,经凝胶成像系统打印.

2 结果

2.1 目的基因 TRAIL cDNA 的扩增 通过 RT-PCR 扩增得到带有 IL-2 信号肽基因的 TRAIL 诱导凋亡功能区 cDNA 片段,琼脂糖凝胶电泳显示片段大小为 613 bp,无杂带,特异性好,符合预期结果(Fig 1).

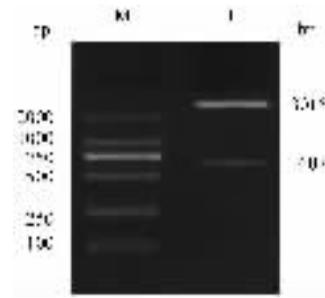


M : DL2000 marker ; 1 : TRAIL cDNA.

Fig 1 Identification of PCR product of TRAIL cDNA by agarose gel electrophoresis

图 1 人 TRAIL cDNA PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳鉴定

2.2 pGEM T Easy /TRAIL 克隆的鉴定 PCR 产物进行末端加 A 反应和连接、转化,筛选出 pGEM T Easy/TRAIL,双酶切及 DNA 序列测定的结果显示,所克隆的 TRAIL cDNA 序列与 GenBank 中序列完全相同,表明人可溶性 TRAIL cDNA 克隆成功(Fig 2).

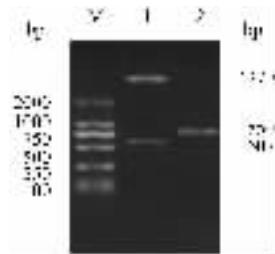


M : DL2000 marker ; 1 : pGEM T Easy/TRAIL/ Hind III + Xba I .

Fig 2 Restrictive enzyme digestion analysis of pGEM T Easy/TRAIL

图 2 pGEM T Easy/TRAIL 的酶切鉴定

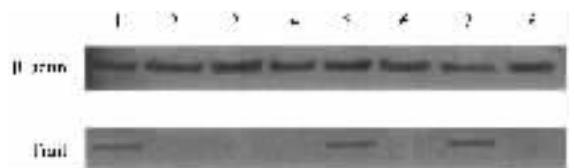
2.3 pGL3 - 181 hTERT/TRAIL 的成功构建 用 Hind III 和 Xba I 双酶切,从测序载体 pGEM Easy T / TRAIL 上切下带有 IL-2 信号肽的融合基因片段,亚克隆入真核表达载体 pGL3-181hTERT 端粒酶启动子的下游,取阳性克隆经上述同样双酶切及 PCR 反应鉴定. 结果表明,融合基因 TRAIL 已插入质粒 pGL3-181hTERT 中,构建成分泌表达 TRAIL 基因的重组真核表达载体 pGL3-181hTERT/TRAIL(Fig 3).



M : DL2000 marker ; 1 : pGL3 - 181hTERT/TRAIL/ Hind III + Xba I ; 2 : pGL3-181hTERT/TRAIL amplified by PCR.

Fig 3 Identification of recombinant eukaryotic expression vector pGL3-181 hTERT/TRAIL by restrictive enzyme digestion and PCR

图 3 重组真核表达载体 pGL3-181 hTERT/TRAIL 的酶切及 PCR 鉴定



1 : Hepa2 + pGL3-181 hTERT/TRAIL ; 2 : Hepa2 + pGL3-181 hTERT ; 3 : HL-7702 + pGL3-181 hTERT/TRAIL ; 4 : HL-7702 + pGL3-181 hTERT ; 5 : HeLa + pGL3-181 hTERT/TRAIL ; 6 : HeLa + pGL3-181 hTERT ; 7 : SMMC-7721 + pGL3-181 hTERT/TRAIL ; 8 : SMMC-7721 + pGL3-181 Htert.

Fig 4 Western Blotting analysis

图 4 Western Blotting 印迹分析

2.4 转染及表达 瞬时转染后的上清,行 SDS-PAGE 电泳和 Western Blotting 免疫印迹,在 M_r 18 000 处附近有一条带,显示所表达的蛋白为人可溶性 TRAIL 蛋白。作为内参照组的细胞均有 β -actin 蛋白的表达 (Fig 4)。

3 讨论

目前,在肿瘤治疗的传统疗法不尽人意的情况下,肿瘤的基因治疗给人们带来了新的希望。但基因治疗的特异性和高效性、时序性仍需要进一步完善和成熟,以便能够通过导入目的基因,高效、持续杀伤肿瘤细胞而对正常细胞没有不良影响。TRAIL 在很多组织细胞中表达,尤其在一些刺激因子作用下,TRAIL 的表达明显增加。研究发现,尽管 TRAIL 的表达与 T、B 等免疫细胞的增殖分化有关^[6],但更使人感兴趣的是其可广泛介导多种组织来源的肿瘤细胞发生凋亡。目前已证实 TRAIL 可以杀伤白血病细胞、乳腺癌细胞、结直肠癌肿瘤细胞、黑色素细胞、恶性胶质瘤细胞、前列腺癌细胞及 HIV 患者的淋巴细胞,因此 TRAIL 被认为是一种很有前途的广谱抗癌药物。

端粒酶是目前已知的最为广谱的肿瘤分子标记物。研究发现,67%~96% 的原发性头颈部肿瘤有端粒酶活性表达,100% 头颈部鳞癌细胞系存在阳性表达^[7]。hTERT 基因的启动子已被证实,在 90% 以上的人类肿瘤组织中活性上调,在正常细胞和非永生细胞中是没有活性的^[8],而在喉癌的发生及其早期即具有活性^[9],故近年来已成为肿瘤基因治疗中靶向性的研究热点。

我们通过 PHA 对正常人外周血淋巴细胞的刺激而诱导 TRAIL 大量表达,显示出正常 T 细胞的扩增增殖可能与 TRAIL 有关。利用 RT-PCR 扩增得到带有 IL-2 信号肽的 TRAIL 基因,成功地构建了重组 pGL3-181 hTERT/TRAIL 载体,以其转染 Hepa2 细胞后,表达的 TRAIL 可分泌到细胞外。利用端粒酶及其基因启动子的活性在肿瘤细胞和正常细胞中表达的差异,

以 hTERT 启动子作为调控序列来控制凋亡基因的表达,将其严格地控制在肿瘤细胞中,实现转录水平的特异性调控而对正常人肝细胞无影响。因此,重组 pGL3-181 hTERT/TRAIL 载体的构建,为喉癌的靶向性基因治疗创造了一定条件。

【参考文献】

- [1] Gazitt Y. TRAIL is a potent inducer of apoptosis in myeloma cells derived from multiple myeloma patients and is not cytotoxic to hematopoietic stem cells [J]. *Leukemia*, 1999, 13: 1817-1824.
- [2] Jo M, Kim TH, Seol DW, et al. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand [J]. *Nat Med*, 2000, 6: 564-567.
- [3] Lamhamedi-Cherradi SE, Zheng S, Maguschak K, et al. Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL-/- mice [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4: 255-260.
- [4] Taimr P, Higuchi H, Kocova E, et al. Activated stellate cells express the TRAIL receptor-2/death receptor-5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis [J]. *Hepatology*, 2003, 37: 87-95.
- [5] Takakura M, Kyo S, Kanaya T, et al. Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells [J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 551-557.
- [6] Mariani SM, Krammer PH. Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage [J]. *Eur J Immunol*, 1998, 28(3): 973-982.
- [7] 刘剑锋,陶泽璋,杨强,等.头颈部鳞癌及癌旁组织端粒酶活性检测 [J]. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 2000, 14(6): 246-248.
Liu JF, Tao ZZ, Yang Q, et al. Telomerase activity in human head and neck squamous cell carcinoma and adjacent tissues [J]. *J Clin Otorhinolaryngo (China)*, 2000, 14(6): 246-248.
- [8] Gonzalez-Quevedo R, de Juan C, Massa MJ, et al. Detection of telomerase activity in human carcinomas using a trap-ELISA method: Correlation with hTR and hTERT expression [J]. *Int J Oncol*, 2000, 16(3): 623-628.
- [9] Luzar B, Poljak M, Marin IJ, et al. Telomerase reactivation is an early event in laryngeal carcinogenesis [J]. *Mod Pathol*, 2003, 16(9): 841-848.

编辑 王小仲

· 期刊文摘 · 一氧化氮合酶在肝癌缺血再灌注后细胞凋亡中的作用

(赵佐庆,陈洪茂,刘福兰.中华实验外科杂志,2004;21(12):1441-1442)

目的:研究缺血再灌注后肝癌组织中一氧化氮(NO)及一氧化氮合酶(NOS)在细胞凋亡中的作用。方法:建立肝脏肿瘤和缺血再灌注模型,除测定NO和NOS含量外,并以荧光脱氧核苷酸末端转移酶介导的dUTP缺口末端标记法(TUNEL)观察其细胞凋亡情况。结果:缺血再灌注后,两种组织中的NO均呈下降趋势,而总一氧化氮合酶(NOS)明显升高($P < 0.01$)。肝脏组织中的诱导型一氧化氮合酶(iNOS)含量明显降低,但肝癌组织中iNOS含量明显升高($P < 0.05$)。肝癌组织的凋亡细胞明显多于肝脏组织($P < 0.01$)。结论:缺血再灌注后肝脏组织和肝癌组织的NO、iNOS的改变是造成细胞凋亡的重要因素且对肝癌组织的影响更为显著。