

# 寡核苷酸 Dbait 乏氧辐射双诱导重组质粒的构建及其对人宫颈癌 HeLa 细胞的乏氧放射增敏效应

温林春<sup>1</sup>, 陆锡燕<sup>1</sup>, 尤传文<sup>1</sup>, 辛 勇<sup>2</sup>, 章龙珍<sup>2</sup>

## Construction of pcDNA 3.1(+)-HRE-Egr-1-Dbait and Its Radiosensitization Effect on Human Cervical Cancer HeLa Cells in Hypoxia Response

WEN Linchun<sup>1</sup>, LU Xiyan<sup>1</sup>, YOU Chuanwen<sup>1</sup>, XIN Yong<sup>2</sup>, ZHANG Longzhen<sup>2</sup>

1. Department of Oncology, Suqian People's Hospital of Nanjing Drum Tower Hospital Group, Suqian 223800, China; 2. Department of Radiotherapy, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College

Corresponding Author: ZHANG Longzhen, E-mail: jsxzzlz@126.com

**Abstract: Objective** To construct recombinant eukaryotic expression vector pcDNA 3.1(+)-HRE-Egr-1-Dbait by hypoxia and radiation dual-induced promoter and to observe its radiosensitivity effect on HeLa cells in hypoxia response. **Methods** Egr-1 promoter elements were amplified from C57BL/6 nude mice by PCR. Dbait oligonucleotide and HRE enhancer elements were gained by chemical synthesis. The recombinant plasmid pcDNA 3.1(+)-HRE-Egr-1-Dbait was constructed by gene reconstruction. pcDNA 3.1(+)-HRE-Egr-1-Dbait was transfected into HeLa cells. Colony Formation Assay was used to detect the radiosensitivity effect transfectants. **Results** The recombinant plasmids pcDNA 3.1(+)-HRE-Egr-1-Dbait was constructed and identified by enzyme digestion and sequencing. The  $D_0$ ,  $D_q$ , SF2,  $\alpha/\beta$  value of HeLa cells in normal oxygen were 1.98, 0.93, 0.52, 11.12, respectively. The  $D_0$ ,  $D_q$ , SF2 value in hypoxia were 1.74, 1.46, 0.43, 15.82. OER value was 0.88. **Conclusion** We successfully constructed the combined eukaryotic expression plasmid vector pcDNA3.1(+)-HRE-Egr-1-Dbait characterized by radiation and hypoxia dual-induced promoter. And this expression vector could significantly increase the radiosensitivity of human cervical cancer HeLa cells in hypoxic response.

**Key words:** Hypoxia; Targeted therapy; Radiosensitivity; Cervical cancer

**摘要:目的** 构建携带新型放射增敏剂 Dbait 的乏氧辐射双诱导的重组质粒 pcDNA 3.1(+)-HRE-Egr-1-Dbait, 探讨乏氧条件下其对宫颈癌 HeLa 细胞的放射增敏作用, 为 Dbait 的基因靶向放射增敏治疗提供实验依据。 **方法** 从 C57BL/6 裸鼠肝组织扩增 Egr-1 启动子, 人工合成 HRE 增强子序列和新型寡核苷酸药物 Dbait, 通过基因重组分别将 Egr-1、HRE 和 Dbait 克隆入 pcDNA 3.1(+) 中, 获得重组质粒 pcDNA 3.1(+)-HRE-Egr-1-Dbait。转染宫颈癌 HeLa 细胞, 采用集落形成试验观察在常氧和乏氧状态下宫颈癌 HeLa 细胞的放射敏感度。 **结果** 真核表达重组质粒 pcDNA 3.1(+)-HRE-Egr-1-Dbait 构建成功并通过 PCR 和测序鉴定。在常氧情况下宫颈癌 HeLa 细胞的  $D_0$ 、 $D_q$ 、SF2、 $\alpha/\beta$  值分别为 1.98、0.93、0.52、11.12。在乏氧情况下宫颈癌 HeLa 细胞的  $D_0$ 、 $D_q$ 、SF2、 $\alpha/\beta$  值分别为 1.74、1.46、0.43、15.82, 氧增敏比 OER 为 0.88。 **结论** 成功构建了携带新型放射增敏剂 Dbait 的乏氧辐射双诱导的真核表达质粒 pcDNA 3.1(+)-HRE-Egr-1-Dbait, 并验证了其在宫颈癌 HeLa 细胞中的乏氧放射增敏效应。

**关键词:** 乏氧; 靶向; 放射增敏; 宫颈癌

**中图分类号:** R737.33; R730.55 **文献标识码:** A

## 0 引言

基因-放射治疗 (gene-radiotherapy) 是利用放

射线来诱导目的基因在肿瘤体内的靶向表达, 是近年来肿瘤放射治疗的一个新策略。作用机制是指将可经放射线诱导表达并对肿瘤具有杀伤作用的基因转入肿瘤细胞, 然后对肿瘤实施局部放疗, 诱导基因表达, 通过射线和基因的双重作用杀伤肿瘤<sup>[1-3]</sup>。乏氧是导致实体瘤对放射线抗拒的主要原因, 本研究利用缺氧性增强子序列缺氧反应元件 (hypoxia response elements, HRE) 和具有辐射诱导活性的早期生长反应基因-1 (early growth response gene-1, Egr-

收稿日期: 2012-02-09; 修回日期: 2012-05-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81071831)

作者单位: 1. 223800 江苏宿迁, 南京鼓楼医院集团宿迁市人民医院肿瘤科; 2. 徐州医学院附属医院放疗科

通信作者: 章龙珍, E-mail: jsxzzlz@126.com

作者简介: 温林春 (1981-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事常见肿瘤的放射治疗研究

1) 首先构建乏氧辐射双敏感嵌合性启动子 HRE/Egr-1 诱导寡核苷酸药物 Dbait, 并观察该重组质粒在乏氧条件下对宫颈癌 HeLa 细胞的辐射增敏效应。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

脂质体 lipofectamine TM 2000 购自 Invitrogen 公司, pMD18-T 载体、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶及 DNA Marker 购自 Takara 公司, pcDNA 3.1 (+) 质粒和大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由徐州医学院肿瘤生物治疗实验室保存。dNTP 与 DNA 电泳凝胶回收试剂盒购自上海生工公司, PCR 引物由上海生工合成。PCR 试剂盒及 DNA 亚克隆系列试剂盒购自 QIAGEN 公司。宫颈癌 HeLa 细胞购自上海细胞生物研究所。

### 1.2 Egr-1 启动子的克隆及鉴定

取 C57BL/6 小鼠肝脏, 制成单细胞悬液, 煮沸 15 min, 离心取上清液。根据 PubMed 的 C57B16/6 小鼠基因组序列由上海生工合成上下游引物。上游引物: 5'-GACCCGGAAACGCCATATAAGGAGCAGGA-3'; 下游引物: 5'-CCAAGTTCTGCGCGCTGGGATCTCTC-3'。PCR 反应条件: 97 $^{\circ}$ C 7 min 变性; 然后 94 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。电泳鉴定 PCR 产物, 并回收, 连入 pMD18-T 载体, 送上海生工测序。

### 1.3 HRE 增强子的克隆及鉴定

3 个串联 HRE 核苷酸链的合成: 首先, 将 3 个 HRE 核苷酸序列串联排布, 然后根据其序列人工设计合成首尾二段、5' 端分别带有 *Nru* I 和 *Bgl* II 酶切位点, 3' 端部分互补的单链核苷酸序列(上游: 5'-ACGCGTCGAAGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACCTCTCGACCTACCGCCGTTCGAAGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGAC-3'; 下游: 5'-AGATCTAACGGCCGTAGGTCGAGAGGTCAGACAGGCTGTGTGAGACAGCACGTAGGGCTTCGAACGGCCGGTAGGTCGAGAGGTCAGACAGGCTGTGTG-3')。然后, 将此上下游 DNA 片段混合, 在 Taq DNA 聚合酶、dNTP 和 Mg $^{2+}$  存在的条件下进行 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min、50 $^{\circ}$ C 退火 45 s 和 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 合成两端带有限制性内切酶酶切位点 *Nru* I 和 *Bgl* II 的含 3 个串联 HRE 的双链 DNA。产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收, 然后克隆入 pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  后, 利用蓝白斑筛选挑取阳性克隆进行 DNA 序列测定。

### 1.4 寡核苷酸药物 Dbait 的合成

首先根据 Dbait 药物中放射增敏活性最强的 Dbait 32Hc 序列, 合成两条互补的单核苷酸序列:

正义链: 5'-CTGTGCCACAACCCAGCAAACAA GCCTAGA-3', 反义链: 5'-TCTAGGCTTGTTTG CTGGGTTGTGGGCACAGC-3'。退火形成互补双链, 并进行硫代修饰, 提高体内的生物活性。

### 1.5 重组质粒 pcDNA 3.1(+)-HRE-Egr-1-Dbait 的构建

利用双酶切将三个片段分别装入 pcDNA3.1 (+) 真核表达质粒中。首先, 利用 *Bgl* II 和 *Nru* I 双酶切位点将 HRE 亚克隆入 pcDNA3.1(+)-CMV 增强子区域中; 其次, 利用 *Nru* I 和 *Hind* III 位点将 Egr-1 亚克隆入 pcDNA3.1(+)-启动子区域中; 最后, 利用 *Eco*R I 和 *Nde* I 将 Dbait 亚克隆入 pcDNA3.1(+)-启动子下游。送上海生工测序鉴定。

### 1.6 细胞培养及转染

人宫颈癌 HeLa 细胞加入含 10% 灭活胎牛血清的 DMEM 高糖培养液, 置于 37 $^{\circ}$ C 饱和湿度 5% CO $_2$  培养箱中培养, 收集对数生长期单层细胞。将 HeLa 细胞分为对照组、转染组、乏氧 + 转染组、照射 + 转染组、乏氧 + 照射 + 转染组。转染按脂质体转染试剂盒说明书进行, 转染后再培养 48 h。各组分别予相应乏氧及照射处理, 采用美国 Varian 公司的 6 MV-X 射线照射, 皮源距为 100 cm, 剂量率 4 Gy/min, 照射野 15 cm  $\times$  30 cm。乏氧采用密封培养瓶接三通管, 定期冲入氮气。

### 1.7 细胞集落形成实验

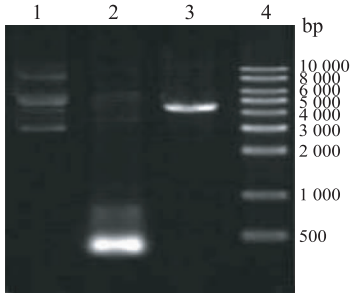
待培养瓶中的宫颈癌 HeLa 细胞铺满瓶底 80%~90% 时, 用 Lipofectamine TM 2000 将质粒转染入细胞内, G418 抗性筛选, 经筛选过的细胞在培养瓶中扩大培养, 胰酶消化, 按梯度稀释法将细胞稀释到一定的浓度接种到已有少量培养液的 60 mm 培养皿中(按 0、2、4、6、8、10 Gy 分别为 100、400、1 000、2 000、10 000、20 000 个), 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$  的恒温培养箱中培养过夜, 之后将培养皿放入 2.5% 氧浓度的缺氧培养箱中继续培养 48 h, 给予培养皿中的细胞照射, 照射后将细胞放入常氧培养箱中培养 7 天, 用无菌的 PBS 洗涤细胞 2 次, 用 95% 酒精配制的 1% 结晶紫染色细胞 20 min, 显微镜下计数细胞数  $\geq$  50 的克隆数, 每组计数 3 孔, 取其平均数计算克隆形成率和存活分数。实验重复 3 次。利用 Graphpad Prism 5.0 软件分别根据单击多靶模型和线性二次模型(L-Q 模型)分别拟合 HeLa 细胞辐射后细胞存活曲线, 单击多靶模型  $SF = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$  求出  $D_0$ 、 $D_q$ 、 $N$ 、 $SF_2$  等参数值, 其中,  $D$  为照射剂量(Gy),  $D_0$  代表平均致死量,  $N$  为外推数,  $D_q$  代表准阈剂量,  $D_q = D_0 \times \ln N$ ,  $SF_2$  为 2 Gy 照射后细胞存活分数。线性二次模型  $SF = e^{-\alpha D - \beta D^2}$  求出  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\alpha/\beta$ 。根据  $D_0$  值或  $SF_2$  值计算放射增敏比(Sensitization Enhancement Ratio, SER)和氧增强比(Oxygen Enhancement Ratio, OER),  $SER =$  单纯

乏氧或常氧  $D_0$ /转染 + 乏氧或常氧  $D_0$ , OER = 单纯或转染乏氧照射  $D_0$ /单纯或转染常氧  $D_0$  值。

## 2 结果

### 2.1 辐射诱导 Egr-1 启动子 PCR 扩增及鉴定

Egr-1 启动子 PCR 扩增产物电泳在 500 bp 处可见一清晰条带,与预期的 Egr-1 启动子的大小相符,见图 1。

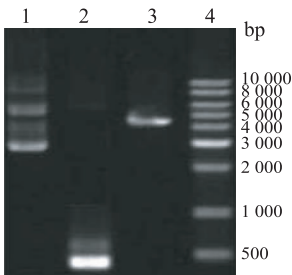


1:pcDNA 3.1;2:Egr-1 fragment; 3: pcDNA 3.1 digested by *EcoR* I;4:10 000 bp DNA marker

图 1 辐射诱导 Egr-1 启动子 PCR 扩增  
Figure 1 PCR amplification of radiation induced promoter Egr-1

### 2.2 乏氧诱导 HRE 增强子的合成及 PCR 鉴定

乏氧诱导 HRE 增强子序列采用人工合成两条寡核苷酸退火而得,通过 PCR 鉴定成功,见图 2。



1:pcDNA 3.1;2:HRE fragment; 3:pcDNA 3.1 digested by *EcoR* I;4:10 000 bp DNA Marker

图 2 乏氧增强子 HRE 的 PCR 扩增  
Figure 2 Restriction enzyme digestion of hypoxia enhancer HRE

### 2.3 重组质粒 pcDNA 3.1(+)-HRE-Egr-Dbait 的成功构建及鉴定

通过 DNA 亚克隆构建的具有辐射和乏氧双诱导特性的重组真核表达质粒 pcDNA 3.1(+)-HRE-Egr-1-Dbait 的测序结果完全正确。

### 2.4 重组质粒 pcDNA3.1-HRE-Egr-1-Dbait 对宫颈癌 HeLa 细胞放射敏感度的影响

集落形成实验结果显示:(1)在常氧情况下,HeLa 细胞的  $D_0$ 、 $D_q$ 、SF2、 $\alpha/\beta$  值分别为 2.50、1.43、0.65、7.41;HeLa 细胞与 pcDNA 3.1(+)-HRE-Egr-1-Dbait 质粒共转染后,其  $D_0$ 、 $D_q$ 、SF2、 $\alpha/\beta$  值分别为 1.98、0.93、0.52、11.12,两者的 SER 为 1.26,见图 3、5。(2)在乏氧情况下,HeLa 细胞的  $D_0$ 、 $D_q$ 、SF2、 $\alpha/\beta$

值分别为 2.52、1.47、0.66、7.24,质粒转染组细胞各参数值分别为 1.74、1.46、0.43、15.82,两者之间的 SER 为 1.45,见图 4、6。(3)未处理的宫颈癌 HeLa 细胞的 OER 为 1.01,pcDNA 3.1(+)-HRE-Egr-1-Dbait 质粒转染后的 OER 为 0.88。

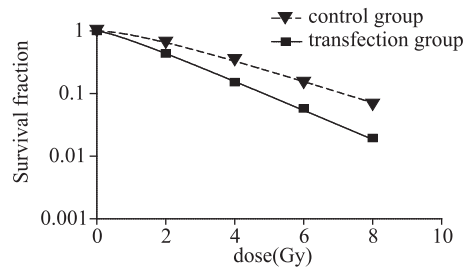


图 3 常氧状态下转染后宫颈癌 HeLa 细胞的放射剂量-存活曲线(多靶单击模型)  
Figure 3 The HeLa cell survival curve fitted by multitarget one-hit model in common oxygen

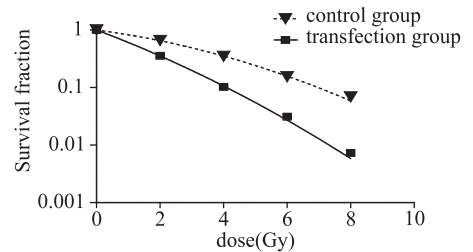


图 4 乏氧状态下转染后宫颈癌 HeLa 细胞的放射剂量-存活曲线(多靶单击模型)  
Figure 4 The HeLa cell survival curve fitted by multitarget one-hit model in hypoxia oxygen

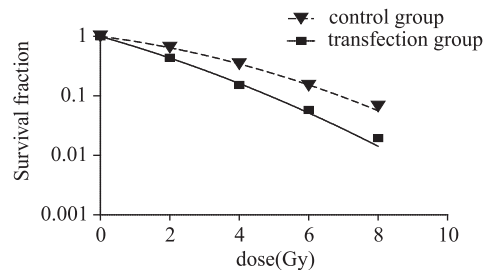


图 5 常氧状态下转染后宫颈癌 HeLa 细胞的放射剂量-存活曲线(线性二次模型)  
Figure 5 The HeLa cell survival curve fitted by linear quadratic model in common oxygen

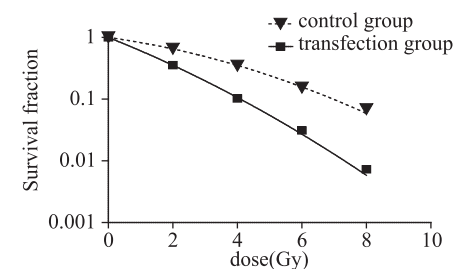


图 6 乏氧状态下转染后宫颈癌 HeLa 细胞的放射剂量-存活曲线(线性二次模型)  
Figure 6 The HeLa cell survival curve fitted by linear quadratic model in hypoxia oxygen

### 3 讨论

乏氧是恶性肿瘤尤其是实体瘤的一个重要恶性特征,针对肿瘤乏氧区域的基因靶向放射治疗是目前肿瘤放射治疗领域的研究热点<sup>[4]</sup>。乏氧靶向基因放射治疗充分体现了研究思路从“拟氧克服乏氧”增敏到“利用乏氧”增敏的转变,该治疗方法主要是利用肿瘤乏氧特性,在射线的作用下诱导目的基因或药物在肿瘤乏氧区域高效表达,从而发挥该基因或药物的辐射增敏作用<sup>[5]</sup>。该方法可对目的基因或药物进行时间和空间的调控,在提高肿瘤乏氧区域靶向杀伤的同时,可有效减少周围正常组织的辐射损伤,符合肿瘤放射治疗的目的与要求<sup>[6]</sup>。为此,本实验依据具有乏氧诱导特性的 HRE、具有辐射诱导特性的 Egr-1 和新型放射增敏剂 Dbait 能特异性抑制 DNA 辐射损伤后的整条信号通路修复的特性<sup>[7-9]</sup>,采用基因重组的方法构建具有乏氧/辐射双诱导活性的 pHRE-Egr-1-Dbait 重组质粒,在乏氧及辐射的条件下,HRE/Egr 嵌合启动子能诱导 Dbait 基因的高效表达,从而发挥 Dbait 的辐射增敏作用,并通过体外克隆形成实验,证实该质粒能显著提高乏氧状态下宫颈癌 HeLa 细胞的放射敏感度。

其中,寡核苷酸药物 Dbait 是法国学者 Quanz 等<sup>[10]</sup>近几年报道一种新型放射增敏剂,Dbait 分子是一类寡核苷酸药物,长度只有几十个碱基大小。Dbait 药物作为分子“诱饵”,模拟 DNA 双链断裂,紊乱 DNA 损伤修复的非末端连接修复途径,启动细胞凋亡,进而促使癌细胞自杀。Quanz 等<sup>[11]</sup>研究发现药物联合放疗能消灭 75%~90% 的癌细胞,而单纯放疗组,仅能摧毁 30%~50% 的癌细胞。显示了很好的应用前景。

我们的结果表明:在常氧状态下,pHRE-Egr-1-Dbait 转染组的生存分数明显低于单纯照射组,对照组与转染组的  $D_0$  值分别为 2.5037、1.9849, $\alpha/\beta$  值分别为 7.42、11.12,均显示 pHRE-Egr-1-Dbait 转染 HeLa 细胞后的辐射敏感度明显提高,SER 为 1.26。同样,在乏氧状态下 pHRE-Egr-1-Dbait 转染组的放射敏感度也明显高于单纯照射组,对照组和转染组的  $D_0$  值 2.5239、1.7406 和  $\alpha/\beta$  值 7.24、15.82,SER 为 1.45。最后,我们比较了 pHRE-Egr-1-Dbait 转染后 HeLa 细胞在乏氧和常氧状态下的辐射敏感度,常氧和乏氧状态下的  $D_0$  值为 1.9849 和 1.7407, $\alpha/\beta$  值为 11.12 和 15.82,OER 为 0.88。结果提示乏氧辐射双诱导 pHRE-Egr-1-Dbait 重组质粒能够明显提高宫颈癌乏氧细胞的放射敏感度。常规肿瘤细胞的氧增强比为 2~3,本研究的 OER 为 0.88,表明本研究构建的重组质粒能逆转乏氧这一实体瘤的不利因素为有利因素,增加乏氧细胞的

放射敏感度。本研究结果与魏玲等<sup>[12]</sup>研究结果相似,本研究的 OER 偏大,原因可能为我们的乏氧处理持续时间较短,没有达到足够的乏氧处理要求,所以设计更完美乏氧装置,并能够精确调控乏氧水平是本实验需要进一步解决的问题。为解决肿瘤放疗的乏氧问题提供一条有效的途径。

以上结果表明,辐射乏氧双诱导 HRE/Egr-1 嵌合启动子能够靶向性诱导寡核苷酸 Dbait 在肿瘤乏氧区域高效表达,改善乏氧细胞的放射敏感度。该研究思路可明显减弱乏氧对肿瘤放射治疗的不利影响,并创新性地将乏氧这一不利因素转化为肿瘤治疗的有利因素,为进一步提高肿瘤乏氧的放射敏感度、提高放射治疗的疗效作出贡献。

### 参考文献:

- [1] Weichselbaum R, Kufe R, Advani S, *et al.* Molecular targeting of gene therapy and radiotherapy[J]. *Acta Oncol*, 2001, 40(6):735-8.
- [2] Huang M, Miao ZH, Ding J. Repair pathways in response to DNA double-strand breaks[J]. *Prog in Phys Sci*, 2007, 38(4):592-7. [黄敏,缪泽鸿,丁健. DNA 双链断裂损伤修复系统研究进展[J]. *生理科学进展*, 2007, 38(4):592-7.]
- [3] Weichselbaum RR, Hallahan DE, Beckett MA, *et al.* Gene therapy targeted by radiation preferentially radiosensitizes tumor cells [J]. *Cancer Res*, 1994, 54(16):4266-9.
- [4] Datta R, Rubin E, Sukhatme YP, *et al.* Ionizing radiation Activates transcription of the EGR-1 gene via CA<sub>T</sub>G elements [J]. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 1992, 89(21):10149-53.
- [5] Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(10):721-32.
- [6] Greco O, Marples B, Dachs GU, *et al.* Novel chimeric gene promoters responsive to hypoxia and ionizing radiation[J]. *Gene Ther*, 2002, 9(20):1403-11.
- [7] Scott SD, Joiner MC, Marples B. Optimizing radiation responsive gene promoters for radiogenetic cancer therapy[J]. *Gene Ther*, 2002, 9(20):1396-402.
- [8] Marples B, Scott SD, Hendry JH, *et al.* Development of synthetic promoters for radiation mediated gene therapy[J]. *Gene Ther*, 2000, 7(6):511-7.
- [9] Wang WD, Chen ZT, Li DZ, *et al.* HSV-TK gene therapy of lung adenocarcinoma xenografts using a hypoxia/radiation dual sensitive promoter[J]. *Ai Zheng*, 2004, 23(7):788-93. [王卫东,陈正堂,李德志,等. 缺氧/辐射双敏感性启动子调控 HSV-TK 表达对肺癌移植瘤的作用[J]. *癌症*, 2004, 23(7):788-93.]
- [10] Quanz M, Berthault N, Roulin C, *et al.* Small-Molecule drugs mimicking DNA damage: a new strategy for sensitizing tumors to radiotherapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(4):1308-16.
- [11] Quanz M, Chassoux D, Berthault N, *et al.* Hyperactivation of DNA-PK by double-strand break mimicking molecules disorganizes DNA damage response[J]. *PLoS One*, 2009, 4(7):e6298.
- [12] Wei L, Song XR, Sun JJ, *et al.* Effects of TK adenovirus vector regulated by hypoxia and radiation combined with radiotherapy on growth of transplanted tumors of breast cancer in nude mice[J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2010, 37(3):259-62. [魏玲,宋现让,孙菊杰,等. 乏氧射线双调控的 TK 腺病毒载体联合放疗抑制乳腺癌移植瘤的生长[J]. *肿瘤防治研究*, 2010, 37(3):259-62.]

[编辑:刘红武;校对:安 凤]