

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.11.005

hTERT 启动子的克隆及 hTERT 启动子 /SV40 增强子在食管癌细胞中的转录活性

唐小军,戴天阳,廖斌,詹福生

Cloning of hTERT Promoter and Transcriptional Activity of hTERT Promoter/SV40 Enhancer in Esophageal Cancer Cells

TANG Xiao-jun, DAI Tian-yang, LIAO Bin, ZHAN Fu-sheng

Department of Cardio-vascular & Thoracic surgery, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China

Abstract: Objective To clone core sequence of hTERT promoter, and study transcriptional activity of hTERT promoter/SV40 enhancer in esophageal cancer cell. **Methods** hTERT promoter was amplified from human genomic DNA using polymerase chain reaction (PCR); hTERT promoter was inserted into pGL3-Basic and pGL3-enhancer to construct luciferase gene expression driven by hTERT promoter (named as pGL3-hTERTp) or by hTERT promoter/SV40 enhancer (named as pGL3-hTERTp-SV40en), respectively. The recombinants were transiently transfected into esophageal cancer cells of Eca-109, EC1 and human embryo lung fibroblast MRC-5, respectively, then expression level of luciferase gene in transfected cells was studied to evaluate transcriptional activities of hTERT promoter and hTERT promoter/SV40 enhancer in esophageal cancer cells. **Results** A 213 bp core-sequence of hTERT promoter was cloned successfully, and DNA sequencing showed its sequence the same as that registered in GenBank; recombinants of pGL3-hTERTp and pGL3-hTERTp-SV40en were successfully constructed. hTERT promoter had transcriptional activity in esophageal cancer cells while no transcriptional activity in MRC-5 cells; The transcriptional level of hTERT promoter/SV40 enhancer in esophageal cancer cells was significantly higher than hTERT promoter alone. **Conclusion** hTERT promoter has selective transcriptional activity in esophageal cancer cells; SV40 enhancer could significantly elevate transcriptional level of hTERT promoter, and it could play an important role in targeting gene therapy for tumor.

Key words: hTERT; Promoter; SV40 enhancer; Esophageal cancer; Targeting expression

摘要:目的 克隆 hTERT 启动子核心序列,研究 hTERT 启动子/SV40 增强子在食管癌细胞中的联合转录活性。**方法** 以人基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 hTERT 启动子核心片段;将其分别插入荧光素酶基因报告质粒 pGL3-Basic 和 pGL3-Enhancer 中,构建 hTERT 启动子调控的表达载体 pGL3-hTERTp 和由 hTERT 启动子/SV40 增强子联合调控的表达载体 pGL3-hTERTp-SV40en,将上述重组质粒分别瞬时转染食管癌细胞 Eca-109、EC1 和人胚肺成纤维细胞 MRC-5,用荧光素酶检测试剂盒检测转染细胞中荧光素酶基因的表达水平并以此计算 hTERT 启动子和 hTERT 启动子/SV40 增强子在各种细胞中的转录活性。**结果** 克隆出长 213 bp 的 hTERT 启动子核心片段,DNA 测序结果与 GenBank 中 hTERT 启动子的碱基序列完全一致;成功构建真核表达载体 pGL3-hTERTp 和 pGL3-hTERTp-SV40en;hTERT 启动子在食管癌细胞 Eca-109 和 EC1 中均有转录活性,在 MRC-5 细胞中无明显转录活性;hTERT 启动子/SV40 增强子在食管癌细胞 Eca-109 和 EC1 中的转录活性显著高于 hTERT 启动子的单独转录活性。**结论** hTERT 启动子在食管癌细胞中具有靶向性转录活性,SV40 增强子能显著增强 hTERT 启动子在食管癌细胞中的转录活性,有可能作为肿瘤靶向性基因治疗的转录调控元件。

关键词: hTERT; 启动子; SV40 增强子; 食管癌; 靶向性表达

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A
文章编号: 1000-8578(2010)11-1230-04

收稿日期: 2009-08-13; **修回日期:** 2010-01-22

作者单位: 646000 四川泸州,泸州医学院附属医院胸外科

作者简介: 唐小军(1973-),男,博士,主治医师,主要从事胸部肿瘤的基础和临床研究

0 引言

端粒酶是一种 RNA 依赖的 DNA 多聚酶。端粒酶的激活是细胞获得永生化和(或)恶性变的重要机制。端粒酶在 85% 以上的恶性肿瘤细胞中呈阳性表达,而在除干细胞和生殖细胞外的所有成年人正常细胞中无表达。对端粒酶的深入研究揭示,端粒酶催化亚单位(hTERT)是端粒酶的组成成分之一,其表达水平是端粒酶活性的决定性因素,hTERT 基因表达水平主要受其启动子在转录水平上的调控^[1-2]。近年来,许多研究者将 hTERT 启动子作为基因转录调控元件,用于肿瘤靶向性基因治疗的研究,取得令人瞩目的进展。

然而,hTERT 启动子在多数肿瘤细胞中的转录活性比较低,难以使治疗基因高水平表达,无法获得高效的抗肿瘤效果。增强子(enhancer)是调节基因表达水平的一种重要的顺式作用元件,它具有高效、远距离作用和无方向性等特点。因此,如果将合适的增强子引入肿瘤靶向性基因治疗,可以大大增强治疗基因的表达水平,从而提高对肿瘤的治疗效果。我们以人基因组 DNA 为模板,PCR 扩增了长 213 bp 的 hTERT 启动子核心片段(hTERTp),并将其分别定向克隆至荧光素酶基因质粒 pGL3-Basic 和 pGL3-enhancer 中,构建 hTERT 启动子调控的荧光素酶基因表达载体 pGL3-hTERTp 以及 hTERT 启动子/SV40 增强子共同调控的表达载体 pGL3-hTERTp-SV40en,并研究 hTERT 启动子和 hTERT 启动子/SV40 增强子在食管癌细胞 Eca-109、EC1 和人胚肺成纤维细胞株 MRC-5 中的转录活性,为 hTERT 启动子/SV40 启动子调控的食管癌靶向性基因治疗研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

食管癌细胞 Eca-109、EC1、人胚肺成纤维细胞株 MRC-5 及人胚肾细胞 293(HEK293)购自中国典型培养物保藏中心;荧光素酶基因报告质粒 pGL3-Basic、pGL3-Control、pGL3-Enhancer 和荧光素酶检测试剂盒 Dual-GloTM Luciferase Assay System 为 Promega 公司产品;细胞培养所用 RPMI1640 培养液为 Gibco 公司产品;脂质体转染试剂盒 lipofectamineTM 2000 为 Invitrogen 公司产品;基因组 DNA 和质粒 DNA 小量抽提 UltraPureTM 试剂盒为赛百盛公司产品;限制性核酸内切酶、DNA 连接试剂盒 Ligation Kit Ver. 2. 1、pMD18-T 载体、LATAqTMDNA 聚合酶及其相应 GC Buffer 为 Takara 公司产品;克隆 hTERTp 的引物由上海英骏技术有限公司合成。主要实验设备有:Thermo

Hybaid 公司的 PX2 型 96 孔 PCR 扩增仪,芬兰 WALLAC 公司的 VICTOR21420 Multilabel Counter 荧光素检测仪,法国 Jouan 公司的 Jouan IGO-150 二氧化碳培养箱。

1.2 实验方法

1.2.1 hTERT 片段的扩增及鉴定 根据 GeneBank 中 hTERT 基因序列设计引物:上游引物 5'-AAA ACG CGT CAGGACCGCGCTCCCCAC-3' 在 5' 端引入限制性内切酶 *Mlu* I 的酶切位点,下游引物:5'-AAA AGA TCT CGACCGCAGCGCTGCCTGAAAC-3',在 5' 端引入限制性内切酶 *Bgl* II 的酶切位点,酶切位点均用下划线表示。对数生长期的人胚肾细胞 293,数量约 5×10^6 ,按照 DNA 提取试剂盒说明提取细胞基因组 DNA,并以此为模板,PCR 扩增 hTERTp。反应条件为:95℃ 变性 5min,94℃ 45s,55℃ 30s,72℃ 45s,35 个循环,最后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定其长度,并用 PCR 产物回收试剂盒回收纯化。取 4μl 纯化产物电泳,鉴定其长度。用 T 载体试剂盒将回收的 PCR 产物克隆入 pMD18-T 载体,反应条件为 16℃,2h,重组载体命名为 pMD18-T-hTERTp,送上海英骏技术有限公司作 DNA 测序。

1.2.2 重组质粒的构建和鉴定 用 *Mlu* I 和 *Bgl* II 双酶切 pMD18-T-hTERTp,酶切产物用 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳,用 PCR 产物纯化试剂盒回收约 210 bp 大小的 DNA 片段,用 Ligation Kit Ver. 2. 1 DNA 连接试剂盒与 *Mlu* I 和 *Bgl* II 双酶切的 pGL3-Basic 质粒作连接反应,两种片段的摩尔比为 4:1,反应条件为 16℃,2h。将连接反应液转化感受态 JM-109 大肠杆菌,用含 50mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养液板筛选,挑选阳性菌落,用含 50mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养液扩增,用质粒纯化试剂盒制备少量质粒,重组质粒命名为 pGL3-hTERTp,用酶切和 PCR 进行鉴定;相同方法将 hTERT 启动子插入含 SV40 增强子的质粒 pGL3-Enhancer 多克隆位点 *Mlu* I 和 *Bgl* II 之间,获得 hTERT 启动子和 SV40 增强子共同调控的荧光素酶基因表达载体 pGL3-hTERTp-SV40en。

1.2.3 hTERT 启动子转录活性检测 以 pGL3-Control 为阳性对照,pGL3-Basic 为阴性对照,检测 hTERT 启动子和 hTERT 启动子/SV40 增强子在食管癌细胞株 Eca-109、EC1 和人胚肺成纤维细胞株 MRC-5 中的转录活性。过程如下:将 Eca-109 和 EC1 细胞株(1.5×10^4 个/孔)和 MRC-5 细胞(2.5×10^4 个/孔)接种到 96 孔培养板,24h 后细胞株生长至对数生长期(50%~80%融合度),用脂质体法分别将质粒 pGL3-Basic、pGL3-Control、pGL3-

hTERTp 和 pGL3-hTERTp-SV40en 与内对照质粒 pRL-CMV 共转染上述细胞,待检质粒每孔 0.1 μ g,内对照质粒 pRL-CMV 每孔 0.025 μ g,Lipofectamine™ Reagent 每孔 0.5 μ l,转染过程严格按脂质体说明书进行;转染 48 小时后用双荧光素酶报告基因检测系统检测转染细胞中报告基因 Luciferase 表达水平。用无血清、无双抗 RPMI1640 培养液洗细胞 2 次,然后每孔加无血清 RPMI1640 培养液 40 μ l,再加 Luciferase 试剂 40 μ l,轻轻振荡混匀 10 分钟后在化学发光仪中检测萤火虫荧光素酶 (firefly luciferase) 活性,然后每孔加 Stop & Glo 试剂 40 μ l,轻轻振荡混匀 10 分钟后检测海肾荧光素酶 (Renilla luciferase) 活性。每组重复 6 孔,每组细胞的荧光素酶活性以 6 孔测得值的平均数表示,并计算萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性比值为报告基因的表达水平。以 pGL3-Control 的活性为 1,pGL3-hTERTp 和 pGL3-hTERTp-SV40en 活性与 pGL3-Control 活性的比值为相对转录活性。

2 结果

2.1 hTERTp 扩增结果

以人胚肾细胞 293 基因 DNA 为模板,PCR 扩增 hTERTp 核心片段,PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳,得到大小约 210 bp 的 DNA 片段,见图 1,测序结果显示:本研究克隆的 hTERT 启动子核心序列与 GenBank 中 hTERT 启动子序列完全一致,5' 端和 3' 端分别位于转录起始位点 (ATG) 上游 -257 bp 和 -45bp,长度为 213bp,见图 2。

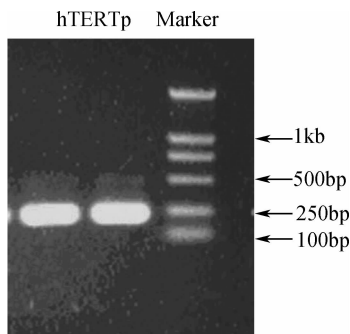


图 1 hTERTp 的 PCR 产物电泳图

Figure 1 Electrophoresis of hTERTp PCR products

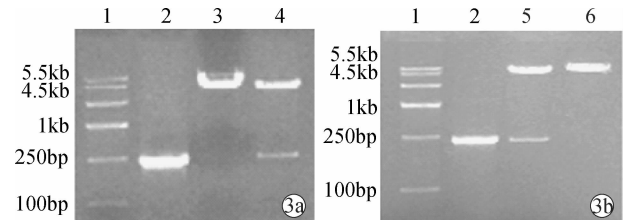
-277	GATTCGCGGG	CACAGACGCC	CAGGACCGCG	CTCCCCACGT	GGCGGAGGGA	CTGGGGACCC
-217	GGGCACCCGT	CCTGCCCTT	CACCTTCCAG	CTCCGCCTCC	TCCGCGCGGA	CCCCGCCCCG
-157	TCCCGACCCC	TCCCGGGTCC	CCGGCCAGC	CCCTCCGGG	CCCTCCAGC	CCCTCCCTT
-97	CCTTCCGCG	GCCCCCCTT	CTCCTCGCGG	CGGAGTTTC	AGGCAGCGCT	GCGTCTGCT
-37	GCGCACGTGG	GAAGCCCTGG	CCCCGGCCAC	CCCCGCGATG	CCGCGCGCTC	

图 2 hTERT 启动子克隆测序结果

Figure 2 DNA sequence of hTERT promoter (the italic letters are core sequence of hTERT promoter that we cloned)

2.2 重组质粒 pGL3-hTERTp 和 pGL3-hTERTp-SV40en 鉴定结果

分别以重组质粒 pGL3-hTERTp 和 pGL3-hTERTp-SV40en 为模板,PCR 获得大小为 213 bp 的 DNA 条带,与目的条带大小一致,pGL3-hTERTp 和 pGL3-hTERTp-SV40en 质粒用 *Mlu* I 和 *Bgl* II 双酶切,电泳得到与载体片段和插入片段相一致的条带,分别为 4.8kb、5.1kb 和 213 bp,与理论值相符,提示重组成功,见图 3。



1. DNA marker; 2. PCR; 3. single-digestion; 4. double-digestion; 5. double-digestion; 6. siggle-digestion

3a: indentification of pGL3-hTERTp; 3b: identification of pGL3-hTERTp-SV40en

图 3 重组质粒 pGL3-hTERTp 和 pGL3-hTERTp-SV40en 鉴定结果

Figure 3 Identification of recombinant of pGL3-hTERTp and pGL3-hTERTp-SV40en

2.3 不同转录元件在食管癌细胞和正常细胞中转录活性

以 pGL3-Control 为阳性对照,hTERT 启动子在食管癌 Eca-109 和 EC1 中的转录活性分别为 0.32 和 0.40,而 hTERT 启动子和 SV40 增强子共同转录活性在食管癌 Eca-109 和 EC1 中分别为 1.25 和 1.46;在 MRC-5 细胞中,hTERT 启动子和 hTERTp/SV40en 均无明显转录活性,见图 4。

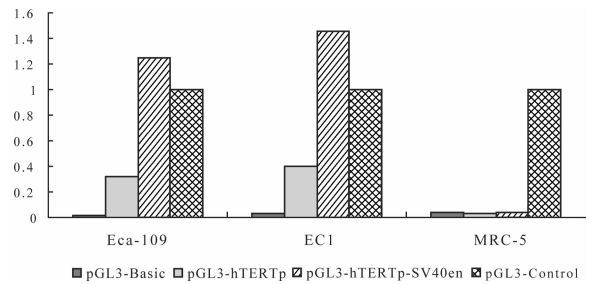


图 4 不同转录元件在食管癌细胞 Eca-109、EC1 和正常细胞 MRC-5 中的相对转录活性

Figure 4 Relative transcriptional activities of different transcriptional elements in Eca-109 and MRC-5 cells

3 讨论

用 hTERT 启动子作为基因转录调控元件的肿瘤靶向性基因治疗,是近年来肿瘤研究的热点之一。与 AFP、CEA 和 PSA 等启动子相比,hTERT 启动子具有应用范围广的优点。大量研究显示,hTERT 启动子在包括肺癌、肝癌、卵巢癌和神经胶质瘤等多种恶性肿瘤细胞中有转录活性,并被成功应用于构建凋亡相关基因 Caspase-6、自杀基因 HSV-TK 等不同抗癌基因的肿瘤特异性表达载体的构建,用于肺癌、肝癌、卵巢癌和神经胶质瘤等多种恶性肿瘤靶向性基因治疗的研究^[3-5]。我们在以往的研究中也发现,hTERT 启动子在多种肺癌细胞中有高低不同的转录活性,并能调控 TK 基因在肺癌细胞中靶向性表达^[6-7]。虽然 hTERT 启动子适用范围广泛,但它在多数肿瘤细胞中的转录活性比较弱,以其作为转录调控元件,难以实现治疗基因在肿瘤细胞中的高水平表达,因此难以获得强有力的抗肿瘤效果。我们的前期研究也显示,以猿猴病毒 40(Simian virus 40,SV40)启动子的转录活性为对照,hTERT 启动子在 8 种肺癌细胞株中的平均转录活性只有 0.25,最高者仅 0.54^[6]。在基因表达的转录过程中,启动子是有效转录起始所必需的调节元件,但它只能维持低水平的基础转录,其转录水平还受多种顺式作用元件的调节,其中的增强子对启动子的转录活性具有显著增强作用。增强子对基因转录的调节作用具有以下特点:(1)具有远距离效应。它可以增强远处启动子的转录,甚至相距 10kb 以上也能发挥作用;(2)无方向性。无论在靶基因的上游,下游或内部都可发挥增强转录的作用;(3)无物种和基因的特异性,可以接到异源基因上发挥作用^[8]。因此,如果在肿瘤靶向性基因治疗系统中引入合适的增强子序列,可以大大增强治疗基因在肿瘤细胞中的表达水平,提高抗肿瘤效果。SV40 增强子是功能和结构研究最清楚的增强子,Song JS 等^[9]的研究显示,SV40 增强子能增强 hTERT 启动子在小细胞肺癌中的转录活性,使 hTERT 启动子调控的 HSV-TK/GCV 治疗系统获得更强的抗癌效应。

食管癌是我国的常见肿瘤,目前传统治疗方法,效果仍十分不理想,5 年存活率仅 20%~30%。探索食管癌的新疗法,具有重要现实意义。本研究显示,hTERT 启动子在 Eca-109 和 EC1 两种食管癌

细胞株中均有转录活性,而在端粒酶阴性的 MRC-5 中无活性,表明 hTERT 启动子有可能用于食管癌靶向性基因治疗的转录调控元件;以阳性对照 SV40 启动子的转录活性为 1,hTERT 启动子/SV40 增强子在食管癌细胞株 Eca-109 和 EC1 中的转录活性分别为 1.25 和 1.46,显著高于 hTERT 启动子单独转录活性(分别为 0.32 和 0.40),也高于作为阳性对照的 SV40 启动子的转录水平;同时,hTERT 启动子/SV40 增强子在正常细胞 MRC-5 中无明显转录活性,提示 SV40 增强子能明显提高 hTERT 启动子的转录活性,但不影响其转录的肿瘤特异性。

本研究结果说明,hTERT 启动子/SV40 增强子在食管癌细胞中具有选择性的高水平转录活性,有可能用于食管癌靶向性基因治疗,值得进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Hahn WC, Meyerson M. Telomerase activation, cellular immortalization and cancer[J]. *Ann Med*,2001,33(2):123-129.
- [2] 漆涌,任勇,陶莹,等. 重组 TFAR19 蛋白对鼻咽癌 CNE-1 细胞端粒酶活性和细胞凋亡的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*,2006,13(6):452-456.
- [3] Cong YS, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*,2002,66(3):407-425.
- [4] Udono M, Fujiki T, Yamashita M, et al. Construction of a regulatable cancer-specific adenoviral expression system using human telomerase reverse transcriptase gene promoter[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*,2008,72(6):1638-1641.
- [5] 唐小军,王艳萍,周清华,等. 端粒酶催化亚单位基因启动子调控 Hsv-tk/GCV 系统对肺癌细胞 A549 选择性杀伤作用的研究[J]. *中华医学遗传学杂志*,2007,24(2):148-152.
- [6] Zhang Y, Ma H, Zhang J, et al. AAV-mediated TRAIL gene expression driven by hTERT promoter suppressed human hepatocellular carcinoma growth in mice[J]. *Life Sci*,2008,82(23-24):1154-1161.
- [7] 王艳萍,唐小军,陈晓禾,等. hTERT 启动子的克隆及其在端粒酶阳性肺癌细胞中的靶向转录活性研究[J]. *四川大学学报(医学版)*,2006,37(4):497-501.
- [8] Yaniv M. Small DNA tumor viruses and their contributions to our understanding of transcription control [J]. *Virology*,2009,384(2):369-374.
- [9] Song JS. Adenovirus-mediated suicide SCLC gene therapy using the increased activity of the hTERT promoter by the MMRE and SV40 enhancer [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*,2005,69(1):56-62.

[编辑:刘红武;校对:周永红]