

• 基础研究 •

hTERT 启动子调控的 PUMA 重组腺病毒的构建与鉴定^{*}王 冬,周 琦[△],李雨聪

(重庆市肿瘤研究所妇瘤科,重庆 400030)

摘 要:目的 构建人端粒酶逆转录酶(hTERT)启动子调控的 PUMA 基因腺病毒载体(Ad-hTERT-PUMA)及带有增强型绿色荧光蛋白(EGFP)基因的腺病毒载体(Ad-hTERT-PUMA-EGFP)。方法 采用一系列的分子生物学技术将 p53 正向凋亡调控因子 PUMA 基因插入 hTERT 的启动子下游,再将 EGFP 为分子标记插入到 PUMA 基因下游,最终将构建好的载体装入腺病毒。双酶切实验证明重组腺病毒载体 Ad-hTERT-PUMA 和 Ad-hTERT-PUMA-EGFP 构建是否成功。结果 载体均成功转配腺病毒。转染 12 h 后,部分 HEK293 细胞出现了绿色荧光,可维持到 72 h。结论 成功构建重组腺病毒载体 Ad-hTERT-PUMA 和 Ad-hTERT-PUMA-EGFP。

关键词:端粒,末端转移酶;p53 正向凋亡调控因子;遗传学;腺病科

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.36.026

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)36-4430-03

Construction and verification of adenovirus containing the PUMA gene under the control of the hTERT promoter

Wang Dong, Zhou Qi[△], Li Yucong

(Department of Gynecological Oncology, Chongqing Cancer Institute, Chongqing 400030, China)

Abstract: Objective To construct the adenovirus vectors of Ad-hTERT-PUMA-EGFP containing human telomerase reverse transcriptase(hTERT), PUMA and enhanced green fluorescent protein (EGFP). **Methods** By a series of molecular biology techniques, PUMA gene was inserted into downstream of the hTERT promoter. And then EGFP was inserted into downstream of the PUMA in adenovirus vectors. Finally, recombinant adenovirus vector, Ad-hTERT-PUMA-EGFP was assembled into the adenovirus. **Results** Correct adenovirus loading vectors was verified by viral genome PCR technology. After 12 h of transfection, HEK293 cells showed green fluorescence in 72 h. **Conclusion** The correct structure of the adenovirus vectors containing PUMA gene and EGFP gene was identified by restriction enzyme analysis.

Key words: telomerase terminal transferase; p53 up-regulate modulator of apoptosis; genetics; adenoviridae

腺病毒可有效感染并裂解部分肿瘤细胞,且在正常细胞内不能复制,所以具有较好的安全性,可应用于肿瘤基因治疗。已证实,端粒酶在 85% 以上的人类肿瘤组织中活性上调,人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)的表达量与端粒酶活性成正比^[1-2]。hTERT 启动子已被用作靶向转录启动子进行基因治疗研究,并在骨肉瘤、结肠癌、肝癌等肿瘤进行了靶向基因治疗尝试^[3]。p53 正向凋亡调控因子(p53 up-regulated modulator of apoptosis, PUMA)在恶性肿瘤凋亡中的研究已成该领域的热点,其治疗效果可能优于 p53,有望成为更好的基因治疗工具^[4-6]。但由于缺乏靶向性,在杀灭肿瘤细胞的同时也导致正常组织细胞凋亡,从而限制了临床使用。本研究以 hTERT 系统及腺病毒为基础,构建了携带 PUMA 目的基因的条件复制型腺病毒载体系统,为 PUMA 在恶性肿瘤靶向治疗中的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶 Taq 酶购买于 NEB 公司,质粒提取试剂盒购买于碧云天公司,细胞培养相关试剂均购自 Gibco 公司。hTERT 启动子控制的腺病毒载体 Ad-hTERT 购自上海生物科技有限公司, hTERT 启动

子下游存在多克隆位点,人 PUMA 基因(NM 014417)购自长沙赢润生物技术有限公司,装载载体为 pUC57。绿色荧光蛋白(EGFP)来自 pEGFP-N1 质粒,购买于北京普博斯公司。设计 2 对引物,均由上海英骏生物技术有限公司合成。PUMA 基因:上游引物 P1:5'-ATG CGG CCG CGT CCT CAG CCC TCG C-3',带有限制性内切酶 *Not* I 的酶切位点;下游引物 P2:5'-CGG AAT TCT GCT GCT CCT CTT GTC TCC-3',带有 *Eco*R I 的酶切位点。EGFP 基因:上游引物 P3:5'-AGA ATC GCG CGG CCG CTG GCC CCT CCC TCG GG-3',带有 *Eco*RV 的酶切位点;下游引物 P4:5'-TAG ATC TGC TGC TCC TCT TGT CTC C-3',带有 *Bgl*III 的酶切位点。

1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒质粒的构建及鉴定 聚合酶链式反应(PCR)合成带有 *Not* I 和 *Eco*R I 限制性内切酶酶切位点的 PUMA 基因,按分子克隆常规程序将上述 PCR 产物和腺病毒载体 Ad-hTERT 进行 DNA 的酶切、连接与转化,将 PUMA 基因先行插入 Ad-hTERT 下游的多克隆位点,完成重组腺病毒载体 Ad-hTERT-PUMA 的构建。PCR 合成带有 *Eco*RV 和 *Bgl*III 限制性内切酶酶切位点的 EGFP 基因,按分子克隆常规

^{*} 基金项目:重庆市卫生局课题(2011-2-366)。 作者简介:王冬(1969~),本科,主任医师,主要从事妇科肿瘤研究。 [△] 通讯作者, Tel: 13708384529; E-mail: qizhou9128 @163.com。

程序将上述 PCR 产物和重组腺病毒载体 Ad-hTERT-PUMA 进行 DNA 的酶切、连接与转化,将 EGFP 基因先行插入 Ad-hTERT-PUMA 下游的多克隆位点,完成重组腺病毒 Ad-hTERT-PUMA-EGFP 的构建。

1.2.2 重组腺病毒的制备 2 种重组腺病毒质粒酶切鉴定正确后,采用 Lipofect AMINE2000 转染试剂转染 HEK293 细胞获得重组腺病毒。

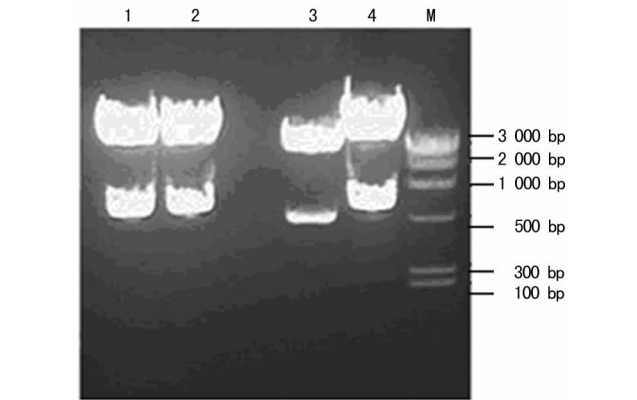
1.2.3 重组腺病毒 PCR 鉴定 参照 DNA 提取试剂盒说明书的流程提 Ad-hTERT-PUMA 和 Ad-hTERT-PUMA-EGFP 病毒基因组,以其作为模板,进行 PCR 扩增。1.8% 的琼脂糖凝胶电泳验证。以正常 HEK293 细胞为阴性对照。

1.2.4 重组腺病毒的扩增与纯化 用成功构建的重组腺病毒感染 HEK293 细胞,得到扩增的病毒粗提液,按照病毒纯化柱说明书的流程纯化病毒。

1.2.5 重组腺病毒的转染实验 将纯化好的病毒 Ad-hTERT-PUMA-EGFP 用 DMEM 稀释为不同病毒浓度,感染 80%~90% 汇合度的 HEK293 细胞 90 min,其间每隔 15 min 轻轻晃动培养皿,吸出病毒液,加入新鲜的 DMEM 培养基,用显微镜观察重组腺病毒的转染情况。

2 结 果

2.1 目的基因的克隆以及质粒的构建 以购买的质粒为模板,用 PCR 的方法克隆 PUMA 和 EGFP 基因。将 PUMA 基因通过限制性内切酶 *Not* I 和 *Eco*R I 连接到 hTERT 启动子控制的腺病毒载体 Ad-hTERT 的 hTERT 启动子下游。通过 *Hind* III+*Eco*R I 的双酶切验证,得到 4 523 bp 和 685 bp 的 2 个条带,确定质粒 Ad-hTERT-PUMA 构建成功。同理,将 EGFP 基因通过限制性内切酶 *Not* I 和 *Eco*R I 连接到质粒 Ad-hTERT-PUMA 中 PUMA 的下游,并通过 *Not* I + *Xba* I 的双酶切验证,得到 4 521、685 bp 的 2 个条带,见图 1。其中 3 泳道为非特异性产物,确定质粒 Ad-hTERT-PUMA-EGFP 构建成功。

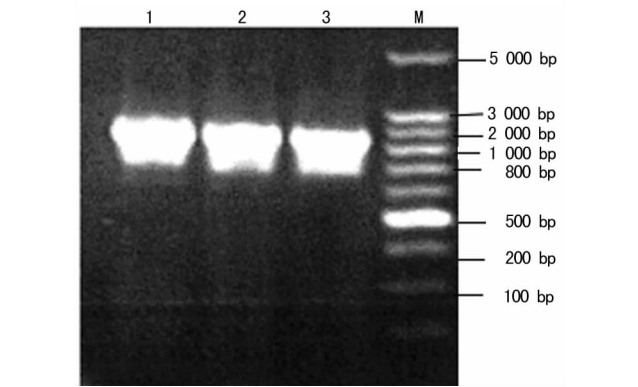


M: DNA 分子标记物;1、2: *Hind* III 及 *Eco*R I 酶切 Ad-hTERT-PUMA ;3、4: *Not* I 及 *Xba* I 酶切 Ad-hTERT-PUMA-EGFP。

图 1 重组腺病毒质粒酶切鉴定

2.2 重组腺病毒的制备及 PCR 验证 将 Ad-hTERT-PUMA-EGFP 质粒线性化后电转化 BJ5183-Ad-1 感受态细胞进行细菌内同源重组,获得 Ad-hTERT-PUMA-EGFP 重组腺病毒。通过试剂盒提取重组腺病毒 DNA,以 P1 和 P4 为上下游引物进行 PCR,得到条带位于 1 000 bp 和 2 000 bp 之间,见图

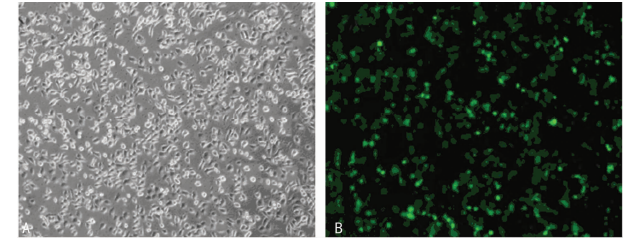
2,与 PCR 理论产物 1 531bp 相接近,证实质粒携带 Ad-hTERT-PUMA-EGFP 重组质粒的腺病毒构建成功。



M: DNA 分子标记物;1~3: Ad-hTERT-PUMA-EGFP PCR 产物。

图 2 重组腺病毒的 PCR 检测

2.3 重组腺病毒转染实验 通过荧光倒置显微镜观察 Ad-hTERT-PUMA-EGFP 重组腺病毒成功转染 HEK293 细胞。将重组腺病毒转染后,HEK293 细胞形态改变。光镜下可见到原本紧密生长的 HEK293 细胞,部分变圆,体积变大,甚至漂浮于培养液中(见图 3A)。在转染 12 h 后,部分细胞出现了绿色荧光,维持到 72 h(见图 3B)。通过研究不同时间的细胞的相对绿色荧光强度,发现 6、12、18、24、36、48 h 的相对绿色荧光总强度逐步提高,48 h 最强。待培养 48 h 后,相对绿色荧光强度逐步降低。



A: 明场;B: 为绿色荧光激发。

图 3 转染 Ad-hTERT-PUMA-EGFP 腺病毒 12 h 后的 HEK293 细胞(×100)

3 讨 论

从来源上分类,常用的基因转移和基因治疗载体有病毒载体和非病毒载体,目前大多数基因治疗仍以病毒介导为主。腺病毒载体是应用广泛的病毒载体,其用于基因导入具有以下优点^[4-8]:(1)体外稳定性好,便于制备与纯化;(2)可插入的外源基因较大,一般为 6~8 kbp,属大容量载体;(3)宿主细胞广泛,可转染分裂和非分裂细胞;(4)增殖率高,重组病毒在辅助细胞中可获得大量的增殖;(5)外源基因表达效率高;(6)由于病毒不整合至细胞宿主染色体,不会诱发癌变。但同时存在部分缺陷:(1)瞬时表达,外源基因不能大量持续表达;(2)载体自行复制能力不能控制;(3)具有一定的免疫源性。

采用腺病毒载体进行基因治疗的研究中,恶性肿瘤中端粒酶相关研究是热点。正常情况下,除生殖细胞和干细胞外,体细胞中端粒酶的活性受到严格的限制,而 85% 以上的恶性肿瘤中端粒酶的都有激活的现象^[4]。研究证实,端粒酶的活性主要由 hTERT 来决定,而 hTERT 基因表达的调控主要发生在

转录水平上^[9-10],所以可以通过使用 hTERT 启动子来调控基因的表达,实现下游目的基因肿瘤特异性增长。

研究发现,几乎一半的人类肿瘤均存在抑癌基因的失活,而 p53 依赖的凋亡途径是大部分肿瘤都存在的共同发病机制。目前,p53 诱导凋亡的具体机制尚未完全阐明,大多研究认为是通过在转录水平激活不同的靶向促凋亡基因来实现^[11-12]。其中,位于线粒体外膜的 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)基因家族尤其是 PUMA 基因至关重要。

因此本研究首次尝试构建了 hTERT 启动子控制的 PU-MA 腺病毒载体端粒酶逆转录酶 Ad-hTERT-PUMA,克服 PUMA 的上述缺陷。通过常规的分子生物学技术将 PUMA 和报告基因 EGFP 依次插入 hTERT 启动子下游,通过双酶切实验均已验证质粒载体制备成功。该实验利用 EGFP 作为一个报告基因,为在以后的研究工作中讨论其体内分布并对其生物安全性的评价有一定的初步考察作用。通过转染 HEK293 细胞,验证 Ad-hTERT-PUMA-EGFP 在转染 12 h 后 HEK293 细胞内有明显的绿色荧光出现。

目前,PUMA 在肿瘤治疗中的研究才刚刚起步,由于 PU-MA 在杀灭肿瘤细胞的同时,正常组织细胞也会凋亡,限制了 PUMA 的应用。所以,本研究希望通过构建 hTERT 启动子控制的 PUMA 腺病毒载体,避免上述缺陷,为 PUMA 基因治疗在临床中的应用提供可能和依据。

参考文献:

[1] Hernandez-Alcoceba R, Pihlaja M, Wicha MS, et al. A novel, conditionally replicative adenovirus for the treatment of breast cancer that allows controlled replication of E1a-deleted adenoviral vectors[J]. Hum Gene ther,2000, 11(14):2009-2024.

[2] Hong SS, Habib NA, Franqueville L, et al. Identification of adenovirus (ad) penton base neutralizing epitopes by use of sera from patients who had received conditionally replicative ad (add1520) for treatment of liver tumors [J]. J Virol,2003,77(19):10366-10375.

[3] Onimaru M, Ohuchida K, Nagai E, et al. Combination with low-dose gemcitabine and hTERT-promoter-dependent conditionally replicative adenovirus enhances cytotoxicity through their crosstalk mechanisms in pancreatic cancer[J]. Cancer Lett,2010,294(2):178-186.

[4] Majumdar AS, Hughes DE, Lichtsteiner SP, et al. The telomerase reverse transcriptase promoter drives efficacious

tumor suicide gene therapy while preventing hepatotoxicity encountered with constitutive promoters[J]. Gene Ther,2001,8(7):568-478.

[5] Jacob D, Bahra M, Schumacher G, et al. Gene therapy in colon cancer cells with a fiber-modified adenovector expressing the TRAIL gene driven by the hTERT promoter [J]. Anticancer Res,2004,24(5A):3075-3079.

[6] Middelburg R, de Haas RR, Dekker H, et al, Fuentes-Alburo A, et al. Induction of p53 up-regulated modulator of apoptosis messenger RNA by chemotherapeutic treatment of locally advanced breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2005,11(5):1863-1869.

[7] Pastor DM, Irby RB, Poritz LS. Tumor necrosis factor alpha induces p53 up-regulated modulator of apoptosis expression in colorectal cancer cell lines[J]. Dis Colon Rectum,2010,53(3):257-263.

[8] Gurzov EN, Germano CM, Cunha DA, et al. p53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) activation contributes to pancreatic beta-cell apoptosis induced by proinflammatory cytokines and endoplasmic reticulum stress [J]. J Biol Chem,2010,285(26):9910-9920.

[9] Bougel S, Lhermitte B, Gallagher G, et al. Methylation of the hTERT Promoter: A Novel Cancer Biomarker for Leptomeningeal Metastasis Detection in Cerebrospinal Fluids[J]. Clin Cancer Res,2013,19(8):2216-2223.

[10] Hsu CG, Wang PH, Ko JL, et al. Concurrent high expression of human telomerase reverse transcriptase and human nonmetastatic clone 23 in high-grade squamous intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of uterine cervix[J]. Int J Gynecol Cancer,2007,17(4):851-857.

[11] Qiao B, Chen Z, Hu F, et al. BMI-1 activation is crucial in hTERT-induced epithelial-mesenchymal transition of oral epithelial cells[J]. Exp Mol Pathol,2013,95(1):57-61.

[12] Zhao F, Huang W, Ousman T, et al. Triptolide induces growth inhibition and apoptosis of human laryngocarcinoma cells by enhancing p53 activities and suppressing E6-mediated p53 degradation [J]. PLoS One, 2013, 8 (11):e80784.

(收稿日期:2013-09-20 修回日期:2013-10-14)

医学统计工作的基本内容

按工作性质及其先后顺序,可将医学统计工作分为实验设计、收集资料、整理资料、分析资料。实验设计是开展某项医学研究工作的关键,包括医学专业设计和统计学设计,医学专业设计的内容包括研究对象纳入和排除标准、样本含量、获取样本的方法、分组原则、观察(检测)指标、统计方法等。收集资料的方法包括各种试验、检测或调查,要求资料完整、准确、及时、有足够数量、具有代表性和可比性等。整理资料包括原始资料的检查与核对、对资料进行分组与汇总等。分析资料即对资料进行统计学分析,包括进行统计描述和统计推断。