

CMVE-PEG3 启动子在前列腺癌 DU145 细胞中的活性鉴定

向磊¹, 李占魁¹, 邓科委¹, 李国权²

(1. 陕西省妇幼保健院, 陕西 西安 710003; 2. 第四军医大学西京医院, 陕西 西安 710032)

摘要: [目的] 比较 CMVE-PEG3p、PEG-3 启动子在 DU145 细胞中的启动活性, 为前列腺癌靶向性基因治疗提供依据。[方法] 用 PCR 法扩增 CMV 增强子、PEG-3 启动子; 在真核表达质粒 pShuttle-EGFP 基础上分别构建 2 种启动子调控的、以绿色荧光蛋白为目的基因的真核表达质粒 pShuttle-CMVE-PEG3p-EGFP、pShuttle-PEG3p-EGFP。将重组质粒用脂质体分别转染前列腺癌 DU145 细胞和人正常前列腺上皮细胞 RWPE-1, 72h 后用 Imagepro-Plus6.0 分析 2 种启动子在相同时间内启动绿色荧光蛋白的表达水平。[结果] 重组质粒在 DU145 细胞中观察到了绿色荧光, 在 RWPE-1 细胞中无绿色荧光。pShuttle-CMVE-PEG3p-EGFP 质粒在 DU145 细胞中表达强于 pShuttle-PEG3p-EGFP, 2 种质粒在 DU145 细胞中的荧光强度 (IOD) 分别为 246.22、130.93。[结论] 所克隆的 CMVE-PEG3p 启动子和 PEG-3 启动子在前列腺癌 DU145 细胞中均表现出肿瘤特异性, 其中 CMVE-PEG3p 启动子具有更强的启动效应, 有望开发成为前列腺癌靶向性基因治疗的工具。

主题词: CMV 增强子; PEG-3 基因; 启动子; DU145 细胞; 基因治疗

中图分类号: R737.25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)07-0548-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2013.07.B010

Detection of Transcriptional Activities of PEG-3 Promoter Modified by CMV Enhancer in Human Prostate Cancer DU145 Cells

XIANG Lei, LI Zhan-kui, DENG Ke-wei, et al.

(Maternal and Child Health Hospital of Shanxi Province, Xi'an 710003, China)

Abstract: [Purpose] To compare the transcriptional activities of tumor-specific CMVE-PEG3 promoter and PEG-3 promoter in human prostate cancer DU145 cells, to provide base for targeting gene therapy in human prostate cancer. [Methods] The fragment of CMVE-PEG3 promoter and PEG-3 promoter were amplified by PCR. The eukaryotic expression plasmids (pShuttle-CMVE-PEG3p-EGFP and pShuttle-PEG3p-EGFP) which have enhanced green fluorescence protein reporter gene and modulated by CMVE-PEG3 promoter and PEG-3 promoter respectively were constructed based on the pShuttle-EGFP. These recombinant plasmids were transfected into DU145 and RWPE-1 cells with liposome. After 72 hours, the expression level of green fluorescent target protein modulated by 2 promoters at the same time was analyzed by Imagepro-Plus6.0 software. [Results] The green fluorescent target protein was observed in transfected DU145 cells, but there was no green fluorescence in transfected RWPE-1 control cells. The pShuttle-CMVE-PEG3p-EGFP had higher expression activity than pShuttle-PEG3p-EGFP in DU145 cells and the strength rate (IOD) of green fluorescence of DU145 cells transfected by pShuttle-CMVE-PEG3p-EGFP and pShuttle-PEG3p-EGFP were 246.22 and 130.93 respectively. [Conclusion] Our data reveals that the cloned CMVE-PEG3 and PEG-3 promoter are tumor-specific, and the CMVE-PEG3 promoter has higher transcriptional activities in prostate cancer DU145 cells, and may serve as a useful tool for transcriptional targeting gene therapy of human prostate cancer.

Subject words: CMV enhancer; PEG-3; promoter; DU145 cells; gene therapy

PEG-3 (progression-elevated gene-3) 是近几年发现的靶向肿瘤细胞的特异性基因, 其启动子能对大

部分不同组织来源 (如胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、恶性畸胎瘤、神经母细胞瘤、恶性黑色素瘤和乳腺癌等) 的肿瘤细胞实现靶向性基因表达^[1-10]。通过 PEG-3 实现基因药物对肿瘤细胞的选择性识别与攻击, 从而克服肿瘤靶向性治疗的关键障碍。为了进一步加

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30800275)

通讯作者: 李国权, 主治医师, 博士; 第四军医大学西京医院核医学科, 陕西省西安市长乐西路 15 号 (710032); E-mail: lgqby@sina.com。

收稿日期: 2012-11-30; **修回日期:** 2013-01-21

强 PEG-3 启动子的活性, 我们通过构建 CMVE-PEG3p 这一嵌合启动子系统来增强 PEG-3 启动子的靶向转录活性, 为建立活性更高的肿瘤特异性启动子系统奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

pShuttle-EGFP、pEGFP-N1 由本室保存; 大肠杆菌 DH5 α 由本室收藏。

1.1.2 细胞株

前列腺癌 DU145 细胞和人正常前列腺上皮细胞 RWPE-1 由本室保存。

1.1.3 主要试剂

真核细胞基因组提取试剂、DNA 聚合酶、DNA Marker DL2000、质粒提取试剂、DNA 连接试剂、胶回收试剂、反应产物回收试剂等购自 Takara 公司, 真核转染试剂 Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司, T4 DNA Ligase 购自 NEB 公司, 限制性内切酶购自 MBI 公司, DNA Marker IV 购自天根生物技术有限公司。DMEM 培养基、K-SFM 培养基及胎牛血清购自美国 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 pShuttle-PEG3p-EGFP 质粒的构建及鉴定

根据 GenBank(NM133546)中大鼠 *myd116* 基因序列相关信息及文献[12]的研究, 设计一对 PEG-3 启动子最小活性区域的引物 P1 和 P2, 并在引物的上下游分别加入 *Mlu* I 和 *Nhe* I 酶切位点, 引物序列如下 (下划线示酶切位点): 上游引物 5'-CGACGCGT ATTTCACTGTTGTTTCCTC-3'; 下游引物 5'-CTAGCTAGC GTCCGGTTCGGTTTGCCAA-3'。从大鼠尾部组织提取基因组 DNA, 用上述引物 PCR 扩增 PEG3p, 反应条件为: 94℃ 5min、94℃ 30s、64℃ 30s、72℃ 30s, 共 35 个循环, 72℃ 5min。329bp PCR 产物和 pShuttle-EGFP 经 *Mlu* I 和 *Nhe* I 双酶切, 用胶回收试剂盒回收目的片段, 然后进行连接, 连接产物转化至 DH5 α 中扩增, 挑取单克隆, 提取质粒, 命名为 pShuttle-PEG3p-EGFP 质粒, 经 *Mlu* I 和 *Nhe* I 双酶切鉴定后, 由上海生工对克隆的“PEG-3 基因”片段作序列测定。

1.2.2 pShuttle-CMVE-PEG3p-EGFP 构建及鉴定

PCR 扩增 CMV 增强子片段及 PEG3p 片段, 通过重叠 PCR 将两个片段拼接在一起, 形成 CMVE-PEG3p 片段, 然后构建至 pShuttle-PEG3p-EGFP 上, 取代原有的 PEG3p。

根据 GenBank 所报道 CMVE 和 PEG-3 序列设计 2 对引物, CMVE 上游引物 CMVE-f: 5'-CGACGCGT-CGCGTTACATAACTTACG-3', 下游引物 CMVE-r: 5'-AGATCT CAAAACAAACTCCATTGACG-3', 以上引物分别含有 *Mlu* I 和 *Bgl* II 限制性酶切位点, 产物 421bp; PEG-3 上游引物 PEG3p-f: 5'-GGGAGTTTGTGTTTG A-GATCT ATTTCACTGTTGTTTCCTC-3', 下游引物 PEG3p-r: 5'-CTA GCTAGC GTCCGGTTCGGTTTGC-CAA-3', 以上引物分别含有 *Bgl* II 和 *Nhe* I 限制性酶切位点, 产物 341bp。以 pEGFP-N1 为模板, CMVE-f、CMVE-r 为引物, PCR 扩增 CMVE 片段, 反应条件: 94℃ 预变性 5min、94℃ 变性 20s、51℃ 退火 25s、72℃ 延伸 25s, 共 30 个循环, 72℃ 延伸 3min; 以 pShuttle-PEG3p-EGFP 为模板, PEG3p-f、PEG3p-r 为引物, PCR 扩增 PEG3p 片段。反应条件: 94℃ 预变性 5min、94℃ 变性 20s、54℃ 退火 25s、72℃ 延伸 25s, 共 30 个循环, 72℃ 延伸 3min; 将上述两个 PCR 产物混在一起作为模板, 以 CMVE-f、PEG3p-r 为引物, PCR 扩增 CMVE-PEG3p 片段。反应条件: 94℃ 预变性 5min、94℃ 变性 20s、60℃ 退火 25s、72℃ 延伸 45s, 共 30 个循环, 72℃ 延伸 3min, 反应混合物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 用胶回收试剂回收 742bp CMVE-PEG3p PCR 产物。用 *Mlu* I 和 *Nhe* I 将 CMVE-PEG3p 的 PCR 产物及 pShuttle-PEG3p-EGFP 双酶切, 然后进行连接。连接产物转化至 DH5 α 中, 挑取单克隆, 经培养后提取质粒, 命名为 pShuttle-CMVE-PEG3p-EGFP 质粒, 经 *Mlu* I 和 *Nhe* I 双酶切鉴定后, 由上海生工对克隆的“CMVE-PEG3p 基因”片段作序列测定。

1.2.3 质粒转染及表达

分别复苏前列腺癌 DU145 细胞和人正常前列腺上皮细胞 RWPE-1, 分别培养在含 10% 胎牛血清的 DMEM 及 K-SFM 培养液中; 转染前 1 d, 将细胞悬液接种到 24 孔板上 (1 $\times$ 10⁵ 个/孔), 于 37℃、5%CO₂ 恒温培养箱中培养 24h 后, 细胞株生长至对数生长期 (85% 融合度), 用脂质体分别将 pShuttle-CMVE-

PEG3p-EGFP、pShuttle-PEG3p-EGFP、pShuttle-EGFP 质粒转化上述 2 种细胞,其中 pShuttle-EGFP 质粒为研究转化率及阳性表达的对照质粒,均作复孔,质粒用量为 1 μ g/孔。转染过程严格按 Lipofectamine2000 说明书进行。转染 72h 后在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况、拍照。实验重复 3 次。

1.2.4 转录活性分析

用 Imagepro-Plus6.0 分析上述质粒分别转化前列腺癌 DU145 细胞和人正常前列腺上皮细胞 RWPE-1 后的荧光照片,通过计算每个具有荧光的细胞的平均积分光密度(integrated optical density, IOD)间接比较 2 种启动子启动绿色荧光蛋白基因的表达水平。

2 结果

2.1 重叠 PCR 扩增 CMVE-PEG3p 基因片段

以 CMVE 和 PEG-3p 两个 PCR 产物混在一起作为模板,以 CMVE-f、PEG3p-r 为引物,PCR 扩增得到的产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析可见大小约 742bp 的 DNA 条带(Figure 1),与预期大小相符。

2.2 重组 pShuttle-PEG3p-EGFP 质粒的双酶切鉴定及 DNA 序列分析结果

重组 pShuttle-PEG3p-EGFP 质粒经 *Mlu* I 和 *Nhe* I 双酶切后,1% 琼脂糖凝胶电泳,可见 312bp 的 PEG-3 启动子基因小片段,②、③为正确克隆,结果与预期相符(Figure 2)。DNA 测序结果显示,所克隆的 312bp 的 PEG-3 启动子基因序列与 GenBank 报道的序列完全一致。

2.3 重组 pShuttle-CMVE-PEG3p-EGFP 质粒的双酶切鉴定及 DNA 序列分析结果

重组 pShuttle-CMVE-PEG3p-EGFP 质粒经 *Mlu* I 和 *Nhe* I 双酶切后,1% 琼脂糖凝胶电泳,可见 742bp 的 CMVE-PEG3p 启动子基因小片段,结果与预期相符(Figure 3)。DNA 测序结果显示,所克隆的 742bp 的 CMVE-PEG3p 启动子基因序列与目的序列完全一致。

2.4 肿瘤特异性启动子调控表达活性检测

重组质粒 pShuttle-CMVE-PEG3p-EGFP、pShuttle-PEG3p-EGFP、pShuttle-EGFP 转化 DU145 细胞和人正常前列腺上皮细胞 RWPE-1 72h 后,在荧光显

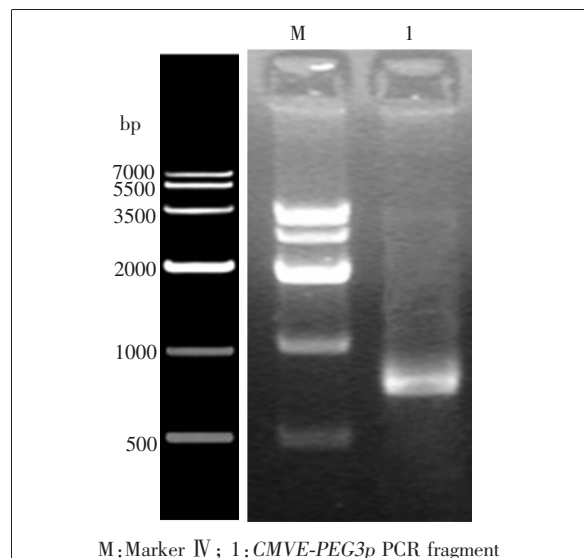


Figure 1 Amplification CMVE-PEG3p fragment by overlapping PCR

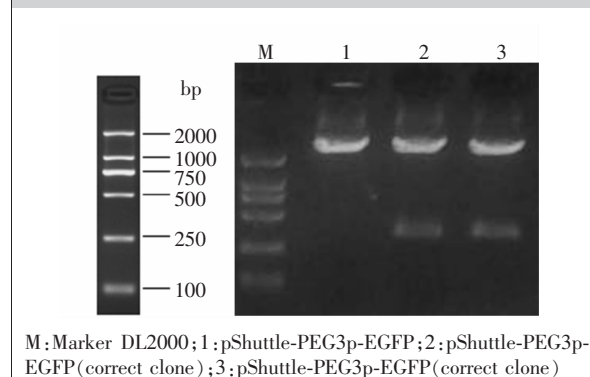


Figure 2 The recombinant plasmid (pShuttle-PEG3p-EGFP) was verified by double enzyme digestion

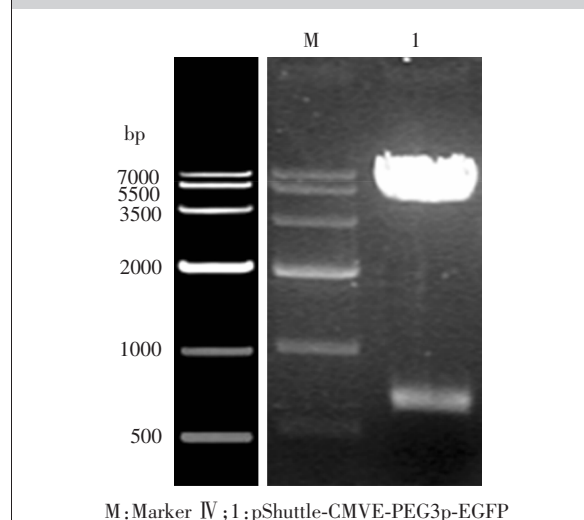
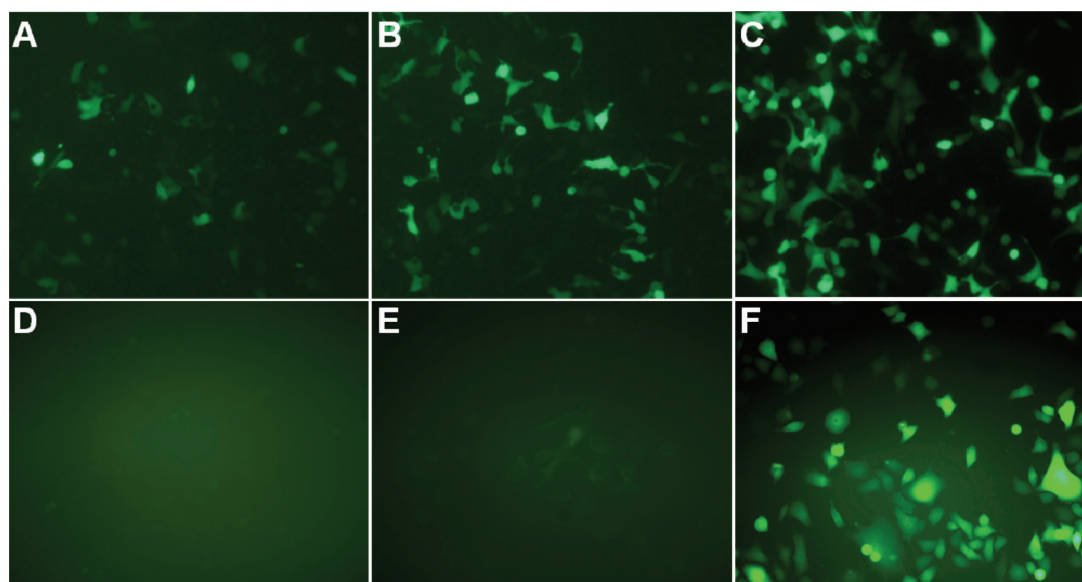


Figure 3 The recombinant plasmid (pShuttle-CMVE-PEG3p-EGFP) was verified by double enzyme digestion



A: pShuttle-PEG3p-EGFP plasmids were transfected into DU145 cells with liposome.
B: pShuttle-CMVE-PEG3p-EGFP plasmids were transfected into DU145 cells with liposome.
C: pShuttle-EGFP plasmids were transfected into DU145 cells with liposome.
D: pShuttle-PEG3p-EGFP plasmids were transfected into RWPE-1 cells with liposome.
E: pShuttle-CMVE-PEG3p-EGFP plasmids were transfected into RWPE-1 cells with liposome.
F: pShuttle-EGFP plasmids were transfected into RWPE-1 cells with liposome.

Figure 4 Fluorescence staining results($\times 20$) of pShuttle-PEG3p-EGFP, pShuttle-CMVE-PEG3p-EGFP, and pShuttle-EGFP after transfected into DU145 and RWPE-1 cells

显微镜下可见 2 种重组质粒转化的 DU145 细胞呈现出强度不同的绿色荧光, 其中 pShuttle-CMVE-PEG3p-EGFP 绿色荧光强于 pShuttle-PEG3p-EGFP, 2 种质粒转化的 RWPE-1 细胞均没有绿色荧光。对照质粒(pShuttle-EGFP) 转化 2 种细胞后均可见很强的绿色荧光(Figure 4)。用 Imagepro-Plus6.0 软件分析不同启动子启动绿色荧光表达的强度, 结果表明, 在 DU145 细胞中 2 种肿瘤特异性启动子所调控的真核表达质粒均启动了表达, 其中 CMVE-PEG3p 启动活性最强, PEG-3 启动子次之, 但它们在 DU145 细胞中的启动能力均低于 pShuttle-EGFP 质粒中的 CMV 启动子, 启动活性分别约为 CMV 启动子的 32.45%、61.02%(Table 1)。

3 讨论

随着现代分子生物学技术的发展, 肿瘤的靶向性基因治疗已成为前列腺癌防治研究的一个热点, 基因治疗能否成功应用于临床实践的关键要素是能否提高治疗基因的靶向性和表达效率, 以保证治疗的安全性和有效性。要达到上述目的, 就需要高效特异的肿瘤启动子, PEG-3 是通过 E11 或 E11-NMT 致癌后的大鼠组织的消减杂交获得的基因^[11], PEG-3 基因的表达依赖其启动子的激活。Su 等^[12,13]克隆 PEG-3 基因的启动子对致癌性转化导致 PEG-3 的靶向肿瘤的表达机制进行了研究。在人体多种肿瘤细胞中广泛存在激活 PEG-3 启动子的反式作用因子, 而在正常组织细胞中却很少。因此 PEG-3 启动子能在人类大部分不同组织来源的肿瘤细胞中特异性表达, 且能释放细胞凋亡

Table 1 Average integral optical density of each cell expressing EGFP

No*		pShuttle-PEG3p-EGFP	pShuttle-CMVE-PEG3p-EGFP	pShuttle-EGFP
1	IOD/Cell**	125.16	247.51	401.12
2	IOD/Cell	139.35	239.79	412.63
3	IOD/Cell	128.27	251.36	396.75
Average IOD		130.93	246.22	403.50

*: experimental repetition times; **: IOD/Cell average integral optical density of each cell expressing EGFP.

诱导因子和生长抑制因子特异性地作用于肿瘤细胞。研究者们通过突变分析,证明了 *PEG-3* 启动子的肿瘤特异性必须依赖两种转录因子 *AP-1* 和 *PEA-3* 的辅助才能达到^[14]。更为重要的是,目前这两种转录因子在正常组织细胞中没有检测到,而在肿瘤细胞内却大量的存在,因此使 *PEG-3* 启动子具有肿瘤特异性。

为了进一步加强 *PEG-3* 启动子的活性,在基因治疗的研究中对其进行修饰。嵌合性启动子是在天然启动子的基础上,整合一些启动子/增强子序列中的正性或负性调控表达元件,以提高天然启动子的表达活性和特异性,*CMV* 增强子可以提高很多宿主细胞基因表达的水平。

众所周知,*CMV* 启动子是一种广谱高效的启动子,但是非肿瘤特异性,所以要发现既具有肿瘤特异性又具有 *CMV* 启动子高表达效率的启动子才能达到抗肿瘤的治疗目的。为了评价 *CMVE-PEG3p* 启动子的肿瘤特异性及表达效率,我们将其与 *PEG-3* 启动子、*CMV* 启动子作比较,构建了 *pShuttle-CMVE-PEG3p-EGFP* 和 *pShuttle-PEG3p-EGFP* 质粒。通过脂质体将两者转入前列腺癌 DU145 细胞和人正常前列腺上皮细胞 RWPE-1 中,通过绿色荧光蛋白的表达强度来研究 2 种启动子在两种细胞中的肿瘤特异性及转录活性。分析 *CMV* 增强子对 *PEG-3* 启动子转录的影响。实验结果表明,我们构建的 *CMVE-PEG3p* 和 *PEG-3* 启动子在 RWPE-1 对照细胞中转录活性均很低,而在前列腺癌 DU145 细胞中可见绿色荧光蛋白,说明具有肿瘤特异性。用 *pShuttle-EGFP* 质粒为对照质粒,通过 Imagepro-Plus6.0 软件分析转染 72h 的 DU145 细胞的绿色荧光蛋白表达水平,实验结果表明,*CMVE-PEG3p* 在 DU145 细胞中启动表达的绿色荧光最强,其活性约为 *pShuttle-EGFP* 质粒中 *CMV* 启动子活性的 61.02%,*PEG-3* 启动子次之,其活性约为对照质粒中 *CMV* 启动子活性的 32.45%,实验结果表明,*CMV* 增强子不但能够增强 *PEG-3* 启动子的活性,而且不影响其肿瘤特异性。

我们构建的 *CMVE-PEG3p* 这一增强子—启动子系统在前列腺癌 DU145 细胞中表现出了较好的肿瘤特异性,为进一步构建以该启动子为调控序列、肿瘤自杀基因等抗肿瘤基因为目的基因的真核表达质粒奠定了基础。

参考文献:

- [1] Emdad L, Sarkar D, Su ZZ, et al. Progression elevated gene-3 (PEG-3) induces pleiotropic effects on tumor progression: modulation of genomic stability and invasion[J]. J Cell Physiol, 2005, 202(1):135-146.
- [2] Sarkar S, Azab BM, Das SK, et al. Chemoprevention gene therapy (CGT): novel combinatorial approach for preventing and treating pancreatic cancer[J]. Curr Mol Med, 2012. [Epub ahead of print]
- [3] Greco A, Di Benedetto A, Howard CM, et al. Eradication of therapy-resistant human prostate tumors using an ultrasound-guided site-specific cancer terminator virus delivery approach[J]. Mol Ther, 2010, 18(2):295-306.
- [4] Sarkar D, Lebedeva IV, Su ZZ, et al. Eradication of therapy-resistant human prostate tumors using a cancer terminator virus[J]. Cancer Res, 2007, 67(11):5434-5442.
- [5] Emdad L, Sarkar D, Lebedeva IV, et al. Ionizing radiation enhances adenoviral vector expressing mda-7/IL-24-mediated apoptosis in human ovarian cancer[J]. J Cell Physiol, 2006, 208(2):298-306.
- [6] Jiang XL, Du LL, Yang S, et al. Suppression of teratocarcinoma growth by soluble TRAIL gene expression driven by the progression-elevated gene-3 promoter[J]. Cancer Biol Ther, 2009, 8(15):1517-1524.
- [7] Van Maerken T, Sarkar D, Speleman F, et al. Adenovirus-mediated hPNPase (old-35) gene transfer as a therapeutic strategy for neuroblastoma[J]. J Cell Physiol, 2009, 219(3):707-715.
- [8] Bhang HE, Gabrielson KL, Larterra J, et al. Tumor-specific imaging through progression elevated gene-3 promoter-driven gene expression[J]. Nat Med, 2011, 17(1):123-129.
- [9] Sarkar D, Su ZZ, Park ES, et al. A cancer terminator virus eradicates both primary and distant human melanomas[J]. Cancer Gene Ther, 2008, 15(5):293-302.
- [10] Das SK, Sarkar S, Dash R, et al. Chapter One-Cancer terminator viruses and approaches for enhancing therapeutic outcomes[J]. Adv Cancer Res, 2012, 115:1-38.
- [11] Su ZZ, Shi Y, Fisher PB. Subtraction hybridization identifies a transformation progression-associated gene PEG-3 with sequence homology to a growth arrest and DNA damage-inducible gene[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(17):9125-9130.
- [12] Su Z, Shi Y, Fisher PB. Cooperation between AP1 and PEA3 sites within the progression elevated gene-3 (PEG-3) promoter regulate basal and differential expression of PEG-3 during progression of the oncogenic phenotype in transformed rat embryo cells[J]. Oncogene, 2000, 19(30):3411-3421.
- [13] Su Z, Shi Y, Friedman R, et al. PEA3 sites within the progression elevated gene-3 (PEG-3) promoter and mitogen-activated protein kinase contribute to differential PEG-3 expression in Ha-ras and v-raf oncogene transformed rat embryo cells[J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(8):1661-1671.
- [14] Sarkar D, Su ZZ, Vozhilla N, et al. Dual cancer-specific targeting strategy cures primary and distant breast carcinomas in nude mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(39):14034-14039.