

· 研究原著 ·

文章编号:1000-2790(2005)12-1112-04

PSMA-IRES-FCY1-TK 真核表达载体的构建及在前列腺癌细胞中的表达

殷 纓¹ 路 凡² 苏明权¹ 郝晓柯¹(第四军医大学:¹西京医院检验科分子生物学实验室,²基础部生物化学与分子生物学教研室 陕西 西安 710033)**Construction of PSMA-IRES-FCY1-TK eukaryotic expression vector and its expression in prostate cancer cell line**YIN Ying¹, LU Fan², SU Ming-Quan¹, HAO Xiao-Ke¹¹Department of Clinical Laboratories Xijing Hospital, ²Department of Biochemistry & Molecular Biology, school of Basic Medicine. Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To construct the eukaryotic expression vector that specifically drives FCY1/TK double suicide gene by prostate-specific membrane antigen promoter(PSMAP) and to investigate the toxic effects of single or double gene on transfected prostate cancer cell line LNCaP after prodrug treatment. **METHODS**: Genomic DNA was extracted from benign prostate tissues and prostate-specific membrane antigen promoter(PSMAP) fragment was obtained by polymerase chain reaction(PCR). The pCMV promoter on eukaryotic expression vector pIRES was replaced by PSMA promoter and PSMAP-IRES vector was obtained. The recombinant plasmid PSMAP-IRES was identified by restriction analysis and DNA sequence. Then the gene FCY1 and TK was cloned into corresponding sites of PSMA-IRES and the pPSMA-IRES-FCY1-TK eukaryotic expression vector was obtained. Lipofection - mediated genetransfers were performed with the obtained vector and a control plasmid, pIRES, in human prostate cancer cell line LNCaP cells. RT-PCR was used to demonstrate successful transcription. The toxic effects of 5-FC, GCV, and both of them on transfected LNCaP cells were explored by MTT assay. **RESULTS**: A 1400 bp DNA fragment was amplified with PCR. Sequence and restriction analysis showed that PSMA promoter by amplified was identical with that of GenBank reported(GenBank accession number AF007544). The expression of suicide genes TK and FCY1 could be detected by RT-PCR. The growth inhibition rate (GIR) in double gene group were higher than that of single gene. ($P < 0.05$)

收稿日期 2005-02-28; 修回日期 2005-04-26

通讯作者 郝晓柯. Tel.(029) 83375455 Email. Haoxkg@fmmu.edu.cn
 作者简介 殷 纓 (1969-),女(汉族),江苏省常州市人. 硕士生(导师 郝晓柯). Tel.(029) 83050171 Email. YinYing@fmmu.edu.cn

CONCLUSION: pPSMA-IRES-FCY1-TK double suicide gene system has significant toxic effect on LNCaP cells *in vitro*, which was superior.

【Keywords】 prostate-specific membrane antigen(PSMA); FCY1 ;HSV-TK prostate ic neoplasms

【摘要】目的:构建前列腺特异性膜抗原(PSMA)启动子调控表达的FCY1/TK双自杀基因表达载体,并观察单、双自杀基因对前列腺癌细胞LNCaP的杀伤作用.方法:通过PCR方法扩增出基因组DNA中PSMA启动子,利用基因重组的方法,替换真核表达载体pIRES中的CMV启动子.测序正确后,再将自杀基因FCY1和HSV-TK分别克隆于载体pIRES的两个多克隆位点,构建真核表达载体pPSMA-IRES-FCY1-TK.将该载体转染LNCaP细胞,用RT-PCR的方法检测其转录,用MTT法检测前体药物5-氟胞嘧啶、丙氧鸟苷单一或联合使用对转染后的LNCaP细胞的杀伤作用.结果:PCR扩增出长1400 bp的PSMA启动子片段,经克隆至pIRES后酶切鉴定证实,并测序表明序列与GenBank(Accession Number AF007544)报道的一致. pPSMA-IRES-FCY1-TK经脂质体转染LNCaP细胞后,RT-PCR检测到FCY1和TK基因在该细胞中均有转录. MTT法检测表明5-FC与GCV联合使用,其细胞生长抑制率明显高于单独使用5-FC, GCV($P < 0.05$). 结论:pPSMA-IRES-FCY1-TK的双自杀基因体系对前列腺癌细胞LNCaP细胞的杀伤作用,明显优于单自杀基因体系.

【关键词】前列腺特异性膜抗原;FCY1;HSV-TK;前列腺肿瘤

【中图分类号】R737.25 **【文献标识码】**A

0 引言

采用自杀基因治疗肿瘤是目前肿瘤基因治疗中广泛应用并具有较好临床前景的方法.晚期前列腺癌患者一般经过雄激素去势治疗,在缺少雄激素的情况下,由前列腺特异性抗原(PSA)启动子介导的基因转录水平很低,这就限制了该方法在雄激素去势治疗患者中的应用^[1].国内叶传忠等^[2]将PSA启动子联合TK基因用于前列腺癌基因治疗,以前列腺特异性膜抗原(PSMA)为启动子的针对前列腺癌的单自杀基因治疗国外已有报道^[3,4],为能最大程度地杀伤肿瘤细胞,且对经去势治疗的前列腺癌患者有效,我们选

用雄激素非依赖性 PSMA 启动子构建 FCY1/TK 双自杀基因表达载体,旨在为进一步的基因治疗研究奠定实验基础.

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌 DH5 α 为本室保存;载体 pIRES 为第二军医大学长海医院检验科沈茜主任惠赠;pLTKcSN 为上海肿瘤研究中心朱景德教授惠赠;pDC312 D-FCY1 为第四军医大学西京医院骨科李立文博士惠赠;E. Z. N. A Tissue DNA Kit II 试剂盒为 Omega 公司产品;质粒提取试剂盒为 Promega 公司产品;Trizol 试剂为 Gibco 公司产品;胶回收试剂盒为 Qiagen 公司产品;各种限制性内切酶、Porybest 聚合酶、T4DNA 连接酶均为 Takara 公司产品;5-FC 为 Sigma 公司产品;GCV 为广东阳江制药有限公司产品;前列腺癌细胞 LNCaP 购自上海细胞所;宫颈癌细胞 Hela 细胞由生物化学与分子生物学教研室路凡博士惠赠.

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取及 PCR 扩增 PSMA 启动子 取增生前列腺组织,用 E. Z. N. A Tissue DNA Kit II 试剂盒提取入基因组 DNA,紫外分光光度计定量.根据文献 [5] 及 GenBank 已知序列 (Accession Number AF007544) 设计引物,在 5' 端引入 Bgl II 酶切位点,在 3' 端引入 SacI 酶切位点.引物由上海赛百盛生物工程公司合成.上游引物:GCA GAT CTA GTC ACT ATT ATT AGC CAT CTC,下游引物:TAG AGC TCT CCA GTT TCT CCA CCA CA.用上述引物进行 PCR 扩增,反应体系组成:基因组 DNA 模板 2 μ L,引物各 25 pmol,2.5 mmol/L dNTP 2 μ L,10 \times PCR 缓冲液 5 μ L,Porybest DNA 聚合酶 1 μ L,再用去离子水补至 50 μ L.循环参数为 94 $^{\circ}$ C 5 min 后,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30 s,经过 35 个循环.PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定.

1.2.2 PSMA 启动子替换载体 pIRES 中 CMV 启动子 将载体 pIRES 和 PSMA 启动子的 PCR 产物同时用 Bgl II 和 SacI 双酶切,目的片段分别经琼脂糖凝胶分离、纯化后,用 T4 连接酶连接,转化 DH5 α .所得质粒 DNA 用 Bgl II,SacI 进行双酶切鉴定.将阳性克隆命名为 pPSMA-IRES 并送上海基康生物工程公司,用自行设计的测序引物从两端和中间进行测序鉴定.测序上游引物:TTA CGG TTC CTG GCC TTT TG.下游引物:GCA CTG ACT GCG TTA GCA AT.中间引物:GAC AGG CGG ATC ACG AAG.

1.2.3 双自杀基因克隆入表达载体 pDC312 D-FCY1 和 pPSMA-IRES 的 MCSA 同时经 NheI 和 EcoRI

双酶切,分别将目的片段胶回收,T4 连接酶连接,转化 DH5 α ,提质粒 PCR 鉴定,上游引物:GAA TGG CAA GCA AGT GGG AT;下游引物:CAA CAA CAA CCT CGT GAC CT.得到的阳性克隆命名为 pPSMA-IRES-FCY1.将 pPSMA-IRES-FCY1 载体的 MCSB 经 SamI 单酶切,pLTKcSN 经 EcoRI 单酶切,加入 Klenow 片段补平经酶切形成的 EcoRI 黏端.再在 pPSMA-IRES-FCY1 载体酶反应液中加入 XhoI,在 pLTKcSN 酶反应液中加入 SalI,胶回收后用 T4 连接 pPSMA-IRES-FCY1 载体片段和 TK 片段,转化 DH5 α ,所得质粒用自行设计的 MCSB 引物作 PCR 鉴定,上游引物:AAA ACA CGA TGA TAA GCT TGC,下游引物:TCA TGT CTG CTC GAA GCA TT.得到的阳性克隆命名为 pPSMA-IRES-FCY1-TK.

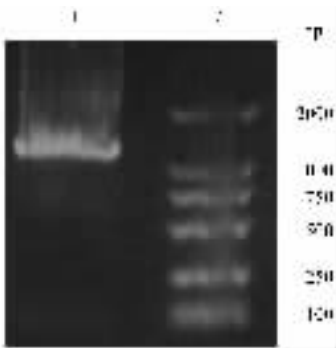
1.2.4 pPSMA-IRES-FCY1-TK 瞬时表达 将前列腺癌细胞 LNCaP 细胞、宫颈癌细胞 Hela 细胞按每孔 5×10^5 铺 24 孔板,待细胞长至 80% 时进行转染,操作按照 Lipofectamine²⁰⁰⁰ 说明书.pPSMA-IRES-FCY1-TK 和空载体 pIRES 质粒由 V-gene 公司超纯质粒试剂盒提取,每孔加 1 μ g 质粒和 1 μ L 脂质体,转染 4 h 后,换完全培养基继续培养.每 24 h 1 次,重复 3 次.提取细胞 RNA,反转录为 cDNA,再经 RT-PCR 检测 FCY1 和 HSV-TK 基因的转录,FCY1 上游引物:GAA TGG CAA GCA AGT GGG AT.下游引物:CAA CAA CAA CCT CGT GAC CT.HSV-TK 上游引物:CCA GGT CGC AGA TCG TCG GTA T.下游引物:ACA TCG ACC GCC TGG CCA AA.

将经重组载体和空载体分别转染的前列腺癌细胞 LNCaP 细胞按 1×10^4 /孔接种于 96 孔板,GCV 浓度按照 0.01,0.1,1,10 和 100 ng/L,5-FC 按照 10,20,40,80 和 160 ng/L 分别加入细胞中,每个浓度设 3 个复孔,作用 72 h 后,加入 5 g/L MTT 20 μ L 作用 4 h,再加入 DMSO 150 μ L,于 570 nm 测吸光值.细胞生长抑制率 (GIR) 按下式计算:GIR (%) = (1 - $A_{\text{实验孔}} / A_{\text{对照孔}}$) \times 100%.比较不同药物浓度下,对重组载体转染组 5-FC 联合 GCV 使用与单独使用 5-FC,GCV 相比,其 GIR 的差别,以及它们分别与空载体转染组 GIR 的差别.

统计学处理:采用 S-PLUS 软件,5-FC 联合 GCV 使用与单独使用 5-FC,GCV 相比,采用方差分析.重组载体转染组在不同药物作用下各自与空载体转染组 GIR 的比较,如样本数据方差齐性,采用 *t* 检验,如方差不齐,采用 *t'* 检验. $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义.

2 结果

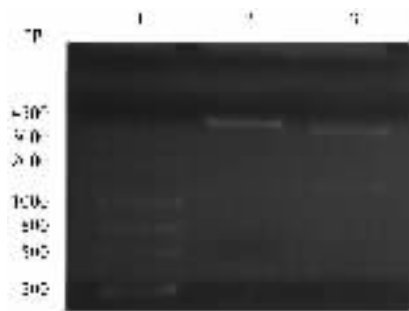
2.1 PSMA 启动子的扩增和克隆 PSMA 启动子的 PCR 产物电泳后可见 1400 bp 区域有一条强荧光条带与 PSMA 大小相符(Fig 1). PSMA-IRES 经 *Bgl* II 和 *Sac*I 双酶切鉴定, 电泳可见 5350 bp 和 1400 bp 两条特异片段(Fig 2). 将 PSMA-IRES 送上海基康生物工程公司用自行设计的引物测序, 测序结果与 GenBank (Accession number AF007544)序列相符.



1 : Amplification of PSMA promoter ; 2 :DNA marker DL2000.

Fig 1 Eletrophoretic analysis of PCR products PSMA promoter

图1 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析



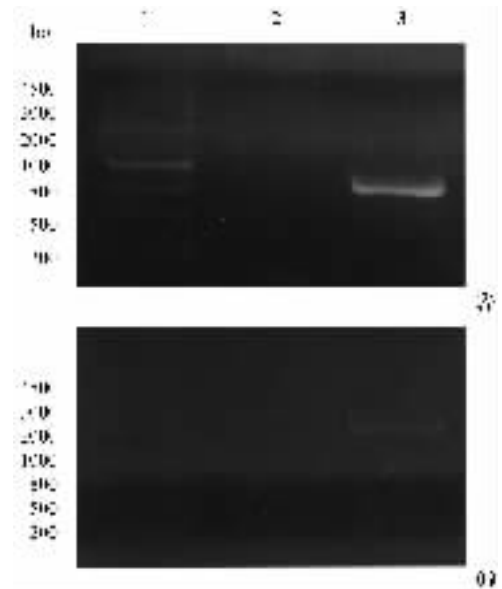
1 :DNA marker III ; 2 :Recombinant plasimd pPSMA-IRES ;3 :Recombinant plasimd pPSMA-IRES identified with *Bgl*II and *Sac*I.

Fig 2 Recombinant plasimd of pPSMA-IRES identified with *Bgl*II and *Sac*I digestion

图2 重组质粒 pPSMA-IRES 的 *Bgl*II 和 *Sac*I 双酶切鉴定

2.2 重组表达载体的构建及鉴定 重组质粒 pPSMA-IRES-FCY1 作 PCR 鉴定 ,可见 800 bp 特异性条带(Fig 3A). pPSMA-IRES-FCY1-TK 作 PCR 鉴定 ,可见 2300 bp 特异性条带(Fig 3B).

2.3 pPSMA-IRES-FCY1-Tk 瞬时表达 重组载体 pPSMA-IRES-FCY1-TK 转染的 LNCaP 细胞 ,可检测到 FCY1 的 381 bp 片段(196 ~ 576)和 HSV-TK 的 457 bp 片段(38 ~ 495) ;转染的 Hela 细胞 检测无此条带.

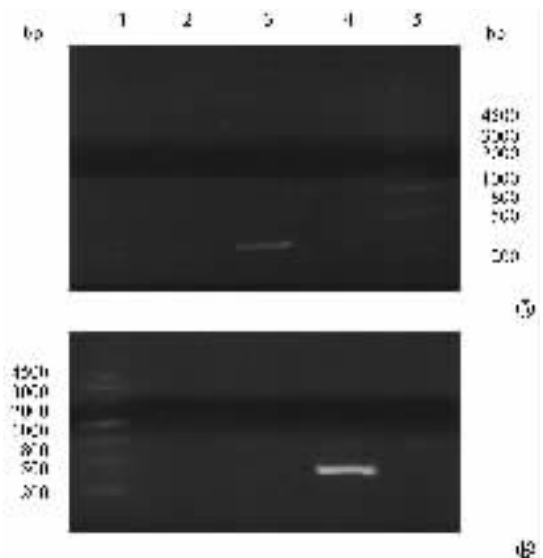


A : 1 :DNA marker III ; 2 :Negative ; 3 :pPSMA-IRES-FCY1 PCR products.

B : 1 :DNA marker III ; 2 : Negative ; 3 :PSMA-PIRES-FCY1-TK PCR products.

Fig 3 Indentification of pPSMA-IRES-FCY1-TK by PCR

图3 重组质粒 pPSMA-IRES-FCY1-TK 的 PCR 鉴定



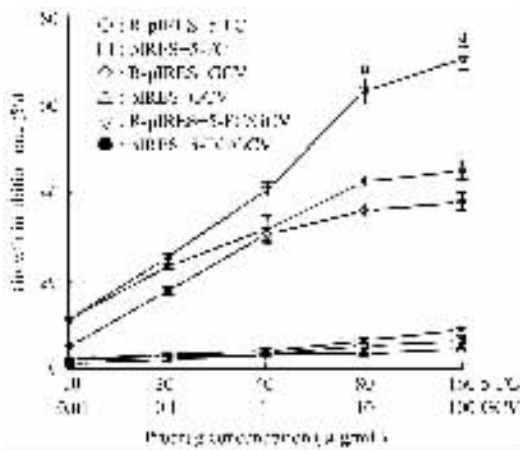
A : 1 : FCY1 cDNA of Hela cell(R-pIRES) 2 : FCY1 cDNA of Hela cells (pIRES) ;3 :FCY1 cDNA of LNCaP cell(R-pIRES) ;4 : FCY1 cDNA of LNCaP cells (pIRES) ;5 : DNA marker III .

B : 1 :DNA marker III ; 2 :TK cDNA of Hela cells(R-pIRES) 3 :TK cDNA of Hela cells (pIRES) ;4 :TK cDNA of LNCaP cells (R-pIRES) 5 : TK cDNA of LNCaP cells (pIRES) .

Fig 4 Electrophoretic analysis of the RT-PCR final product (R-pIRES :Recombined vector pPSMA-IRES-FCY1-TK ;pIRES : Empty vector pIRES.)

图4 RT-PCR 终产物电泳分析

空载体 pIRES 转染 LNCaP 细胞、Hela 细胞经 RT-PCR 检测均无此条带 (Fig 4 A, B)。与空载体转染组相比, 重组载体 pPSMA-IRES-FCY1-TK 转染组的生长抑制率 (GIR) 明显增高 ($P < 0.05$, Fig 5)。当 5-FC、GCV 浓度分别为 160 mg/L, 100 mg/L 时 5-FC 联合 GCV 使用组的 GIR 为 $(70.3 \pm 5.3)\%$, 单独使用 5-FC 组 GIR 为 $(45.0 \pm 4.1)\%$, 单独使用 GCV 组 GIR 为 $(27.9 \pm 4.2)\%$ 。表明 5-FC 联合 GCV 作用于经重组载体 pPSMA-IRES-FCY1-TK 转染的 LNCaP 细胞, 其生长抑制率明显高于单独使用 5-FC、GCV 组, 且差异显著 ($P < 0.05$)。



The results were expressed as the $\bar{x} \pm s$; R-pIRES: Recombined vector pPSMA-IRES-FCY1-TK; pIRES: Empty vector pIRES; * $P < 0.05$ vs corresponding pIRES group in the same drug concentration; The two-tailed student *t* test is used to get the statistic.

Fig 5 Toxic effect of 5-FC and GCV on LNCaP

图5 不同浓度 5-FC 和 GCV 对 LNCaP 细胞的生长抑制率

3 讨论

前列腺癌是男性常见的恶性肿瘤,在我国其发病率已居泌尿生殖系恶性肿瘤增长的首位。前列腺癌的基因治疗中,常选用组织特异性启动子来避免正常组织的损伤。PSMA 为前列腺特异表达,其增高可作为前列腺癌的病程进展指标。由于 PSMA 的水平是由雄激素负调节,经过雄激素去势治疗的患者,其血浆中 PSMA 表达增高。

我们成功克隆 PSMA 启动子,经测序分析与 GenBank 报道的一致。经酶切及 PCR 鉴定,证实真核表达载体 pPSMA-IRES-FCY1-TK 的成功构建。我们用 PSMA 启动子替换 pIRES 中的 CMV 启动子,构建的 pPSMA-IRES-FCY1-TK 为双顺反子真核表达载体,

其启动子可同时调控位于其后的 FCY1 和 TK 的转录与表达。利用脂质体转染法将该质粒转染入前列腺癌细胞中,证实该载体可以特异地在前列腺癌细胞中转录和表达。本实验结果表明双自杀基因系统对前列腺癌细胞的杀伤效果较单自杀基因系统更佳,这是由于两个自杀基因系统协同作用,增加了对肿瘤细胞的抑制作用。使用双自杀基因载体,亦可解决单自杀基因系统对前体药物的耐药问题^[6],即当细胞对一种前体药物耐药时,可通过另一种前体药物起作用。相比国内已报道的针对前列腺癌的自杀基因研究^[2],我们所构建载体含有 PSMA 启动子,因此可用于经去势治疗的前列腺癌患者的基因治疗,靶向性好,适用范围广。由于组织特异性启动子介导的基因表达效率低于 CMV 启动子^[7],提示 PSMA 启动子的表达能力有待进一步提高,下一步实验可在 PSMA 启动子的上游增加增强子序列,以期得到更好的治疗效果。

【参考文献】

- [1] Klee GG, Goodmanson MK, Jacobsen SJ, et al. Highly sensitive automated chemiluminometric assay for measuring free human glandular kallikrein-2 [J]. *Clin Chem*, 1999; 45(10): 8060-8069.
- [2] 叶传忠, 俞 纓, 苏 兵, 等. 带 PSA 启动子的 *hytk* 基因在前列腺癌细胞中的表达 [J]. *中华泌尿外科杂志* 2002 23(10): 625-627.
- [3] Ye CZ, Yu Y, Su B, et al. Hytk gene expression promoted by PSA promoters in prostate carcinoma cell lines [J]. *Chin J Urol*, 2002; 23(10): 625-627.
- [4] Uchida A, O'Keefe DS, Bacich DJ, et al. *In vivo* suicide gene therapy model using a newly discovered prostate-specific membrane antigen promoter/enhancer: A potential alternative approach to androgen deprivation therapy [J]. *Urology* 2001 58(2): 132-139.
- [5] Shusei I, Takushi T, Takeshi O, et al. Treatment efficiency of a suicide gene therapy using prostate-specific membrane antigen promoter/enhancer in a castrated mouse model of prostate cancer [J]. *Cancer Sci*, 2004 95(4): 367-370.
- [6] O'Keefe DS, Su SL, Bacich DJ, et al. Mapping, genomic organization and promoter analysis of the human prostate-specific membrane antigen gene [J]. *Biochim Bio Acta*, 1998 1443(1): 113-127.
- [7] Cool V, Pirotte B, Gerard C, et al. Curative potential of herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer in rats with 9 L gliosarcoma [J]. *Hum Gene Ther*, 1996 7(5): 627-635.
- [8] Shusei I, Takushi T, Satoshi S, et al. Development of gene therapy using prostate-specific membrane antigen promoter/enhancer with Cre Recombinase/LoxP system for prostate cancer cells under androgen ablation condition [J]. *Jpn J Cancer Res*, 2002 93(10): 1154-1163.