

[文章编号] 1000-1182(2006)03-0269-04

放射诱导启动子介导CDglyTK基因 治疗Tca8113细胞的实验研究

余东升¹, 黄洪章¹, 谢谦¹, 王安训², 胡晓文¹, 刘习强¹

(1.中山大学附属第二医院 口腔颌面外科; 2.中山大学附属第一医院 口腔颌面外科, 广东 广州 510120)

[摘要] 目的 观察人工放射诱导启动子介导CDglyTK双自杀融合基因治疗Tca8113细胞的疗效, 为舌鳞癌治疗探索新的途径。方法 构建人工放射诱导启动子调控双融合自杀基因的真核表达质粒pcDNA3.1(+)/E-CDglyTK, 用脂质体为载体转染Tca8113细胞后予以3 Gy诱导放疗, 描绘细胞生长曲线, RT-PCR检测CDglyTK的表达, 流式细胞仪检测细胞的凋亡和增殖。结果 诱导放疗可显著增强双自杀基因CDglyTK对Tca8113细胞的毒性作用; RT-PCR半定量分析诱导放疗增强了CDglyTK基因的mRNA表达; 流式细胞检测发现治疗组细胞的凋亡指数明显高于对照组, 而增殖指数则低于对照组, 诱导放疗显著提升了这种差距。结论 人工合成放射诱导启动子可作为基因治疗中的分子开关调节CDglyTK基因在Tca8113细胞中靶向表达。低剂量放射性照射可显著提高放射诱导启动子调控的CDglyTK基因治疗Tca8113细胞的疗效。

[关键词] 放射诱导启动子; 放疗; 舌鳞癌

[中图分类号] R730.51 **[文献标识码]** A

Synthetic Radiation-inducible Promoter Mediated CDglyTK Gene in Treatment of Tca8113 Cells YU Dong-sheng¹, HUANG Hong-zhang¹, XIE Qian¹, WANG An-Xun², HU Xiao-wen¹, LIU Xi-qiang¹. (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] Objective To observe the therapeutic effect of CDglyTK gene mediated by synthetic radiation-inducible promoter in the treatment of Tca8113 cells. Methods CDglyTK gene in pCEA-CDglyTK was subcloned into pcDNA3.1(+) to construct plasmid pcDNA3.1(+)-CDglyTK, and then the synthetic radiation-inducible promoter in pMD18-T-E was inserted into pcDNA3.1(+)-CDglyTK to construct plasmid pcDNA3.1(+)/E-CDglyTK. The recombinant plasmid was transfected into Tca8113 cells by lipofectamine, and then exposed to 3 Gy irradiation. Cytotoxicity was evaluated by MTT. The expression of CDglyTK gene was detected by RT-PCR. The apoptosis and proliferation were examined by flow cytometry. Results The plasmid pcDNA3.1(+)/E-CDglyTK was constructed successfully. The comparative survival rate of Tca8113 cells was markedly decreased by induction irradiation. Up-regulation of CDglyTK expression was found in Tca8113 cells exposed to irradiation. The apoptosis index(AI) of Tca8113 cells exposed to irradiation was higher than that of Tca8113 cells without irradiation, the other way round, the proliferation index(PI) of Tca8113 cells exposed to irradiation was lower than that of Tca8113 cells without irradiation. Conclusion The synthetic radiation-inducible promoter can be served as a molecular switch to improve the expression of CDglyTK gene in Tca8113 cells, and low dose induction radiation can significantly improve the therapeutic efficiency.

[Key words] radiation-inducible promoter; radiation therapy; tongue squamous cell carcinoma

缺乏有效的靶向表达调控手段是自杀基因疗法

当前面临的关键问题之一。利用放射诱导启动子调控其下游治疗基因的靶向表达是近年来发现的一种放射-基因治疗新策略, 即通过精确定位放疗使自杀基因在靶组织中局限性表达, 将传统的放疗与基因治疗有机结合起来, 既减少放疗的剂量又能提高基因治疗的疗效。本研究采用人工放射诱导启动子调控的CDglyTK基因转染Tca8113细胞, 观察放疗增

[收稿日期] 2005-11-29; [修回日期] 2006-03-18

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30271423); 广东省自然科学基金资助项目 21865

[作者简介] 余东升(1969-), 湖北人, 讲师, 博士, 现在中山大学光华口腔医学院工作

[通讯作者] 黄洪章, Tel: 020-81332507

效作用, 为舌鳞癌的治疗探索新途径。

1 材料和方法

1.1 材料

载人工放射诱导启动子的真核表达质粒 pMD18-T-E (本课题组前期研究构建^[1]), pCEA-CDglyTK (中山大学法医学系提供), pcDNA3.1 (+) (中山大学李芳萍提供), 各种限制性内切酶及连接酶 (Roche公司, 瑞士), Lipofectamine TM Reagent (Promega公司, 美国), Tca8113细胞 (原上海第二医科大学何荣根惠赠), Omniscript™ RT-PCR System (Gene公司, 美国), FACSCalibur型流式细胞仪 (Becton Dickinson公司, 美国); PRIMVS型直线加速器 Siemens公司, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 构建质粒pcDNA3.1 (+)/E-CDglyTK EcoR和Hind Ⅱ双酶切质粒pCEA-CDglyTK得双自杀基因CDglyTK片段, 将其插入pcDNA3.1 (+)多克隆位点得到重组子pcDNA3.1 (+)-CDglyTK; 用Nhe Ⅰ和Hind Ⅱ对pMD18-T-E进行双酶切, 得到含放射诱导启动子序列的DNA片段, 将其插入到重组子pcDNA3.1 (+)-CDglyTK中CDglyTK上游, 得到载有放射诱导启动子调控双自杀基因的真核表达质粒pcDNA3.1 (+)/E-CDglyTK。

1.2.2 细胞培养与转染 采用DMEM培养液于5% CO₂培养箱中37 ℃下培养Tca8113细胞。转染步骤: 将Tca8113细胞以1×10⁵个/孔接种6孔板, 细胞生长到80%左右融合时开始转染。将2 μg质粒pcDNA3.1 (+)/E-CDglyTK溶解至100 μL无血清DMEM培养液中, 同时将20 μL Lipofectamine™ Reagent用无血清DMEM培养液稀释至100 μL。将两种稀释溶液混合摇匀, 室温孵育45 min, 加800 μL无血清DMEM培养液混匀。2 mL无血清DMEM培养液漂洗细胞, 将上述混合液加至培养孔内细胞表面, 每孔1 mL, 37 ℃、5%CO₂条件下孵育5 h。加等量20%胎牛血清DMEM培养液继续孵育24 h, 次日弃旧液, 换10%胎牛血清DMEM培养液培养。

1.2.3 MTT法描绘生长曲线 将转染细胞按4×10³个/孔接种96孔板, 将细胞随机分为以下6组。A组: 不作特殊处理, 作为对照组; B组: 单纯加5-氟胞嘧啶 5-fluorocytosine, 5-FC) 和丙氧鸟苷 (ganciclovir, GCV); C组: 单纯pcDNA3.1 (+)/E-CDglyTK转染; D组: 单纯诱导放疗; E组: pcDNA3.1 (+)/E-CDglyTK转染并加5-FC和GCV; F组: 诱导放疗加pcDNA3.1 (+)/E-CDglyTK转染并加5-FC和GCV。5-FC和GCV浓度分别为50 mg/L和5 mg/L; 加药后培

养12 h后予以3 Gy放疗。MTT法测OD值, 每天1次, 共5次。

1.2.4 RT-PCR检测CDglyTK的mRNA表达 将转染后的细胞按5×10⁴个/孔接种6孔板, 分为2组, 每组设10个复孔, 一组常规培养, 另一组在接种后36 h给予细胞3 Gy放射线照射。2组细胞继续培养48 h后, RT-PCR检测CDglyTK的mRNA表达。CDglyTK融合基因片段1.3 kb, P₁: 5'-TGTCGAATAAACGC-TTTACAAAC-3', P₂: 5'-AACGTTTGTAAATGATGG-CTTCTG-3'; -actin片段750 bp, P₁: 5'-GGTCGG-AGTCAACGGATTTGGTCG-3', P₂: 5'-CCTCCGAC-GCCTGCTTACCAC-3'。采用Gene公司Omniscript™ RT-PCR System两步法进行。PCR条件: 95 ℃预变性5 min, 94 ℃变性30 s, 58 ℃退火30 s, 72 ℃延伸1 min, 35个循环, 72 ℃延伸8 min。实验过程中严格控制各项可变因素, 如引物、模板用量等。取10 μL PCR产物在1%凝胶中电泳, 70 V、60 min后, 凝胶成像系统扫描分析灰度值, 以CDglyTK与-actin条带灰度均值的比值表示CDglyTK基因的表达水平。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡与增殖 将转染细胞按5×10⁴个/孔接种6孔板, 分为2组 (治疗组和对照组), 每组设20个复孔。治疗组培养24 h后加入5-FC和GCV, 浓度分别为50 mg/L和5 mg/L; 对照组不加5-FC和GCV。对照组和治疗组各有一半细胞 (10个孔细胞) 在培养12 h接受3 Gy放射线照射, 所有细胞培养3 d后常规碘化丙啶染色, 流式细胞仪检测凋亡指数 (apoptosis index, AI) 和增殖指数 (proliferation index, PI)。

1.2.6 统计学处理 采用SAS6.04软件对配对资料样本均数进行方差分析。

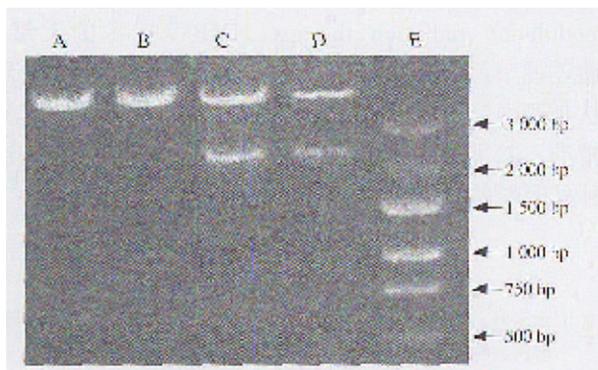
2 结果

2.1 重组质粒的鉴定

EcoR 和Hind Ⅱ双酶切pcDNA3.1 (+)-CDglyTK可见2.5 kb的CDglyTK基因片段 (图1)。重组质粒pcDNA3.1 (+)/E-CDglyTK测序报告证实Nhe Ⅰ和Hind Ⅱ两酶切位点间成功插入人工放射诱导启动子。

2.2 生长曲线

各组细胞的生长曲线见图2, 单纯加药及单纯转染pcDNA3.1 (+)/E-CDglyTK对细胞生长无明显影响, 它们的生长曲线与对照组十分接近。单纯3 Gy的诱导放疗对细胞生长有一定影响, 第3天时对细胞生长抑制最为明显, 但随后的2 d细胞出现恢复性生长。转染后加药对细胞有一定的抑制作用, 放射诱导则使抑制效应进一步加强。



A: pcDNA3.1(+); B: EcoR 和 Hind 双酶切pcDNA3.1(+); C和D: EcoR 和Hind 双酶切pcDNA3.1(+)/E-CDglyTK; E: 250 bp Marker

图 1 pcDNA3.1(+)/E-CDglyTK酶切鉴定

Fig 1 Identification of recombinant plasmid pcDNA3.1(+)/E-CDglyTK by EcoR and Hind

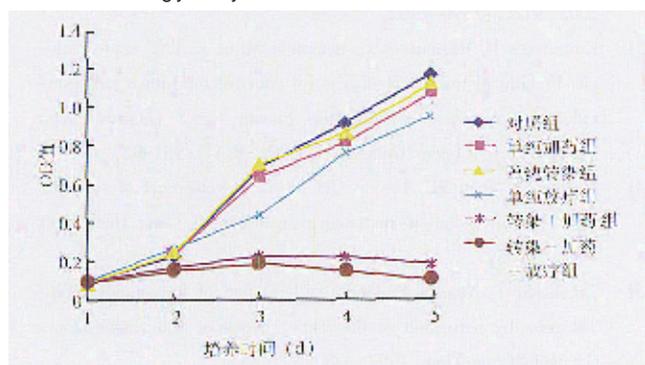
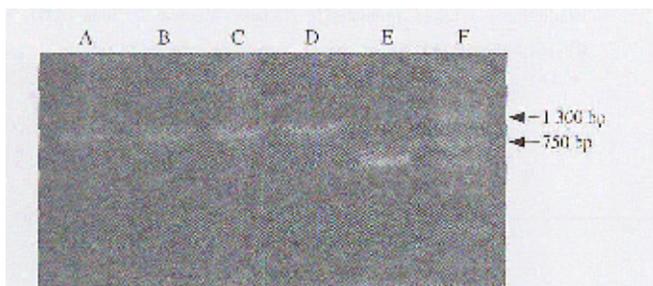


图 2 各组细胞生长曲线

Fig 2 Growth curves of Tca8113 cells on different condition

2.3 RT-PCR结果

RT-PCR产物凝胶电泳图谱见图3, 放射诱导后细胞CDglyTK基因的mRNA表达水平比未经放射诱导时有一定程度增强, 计算机图像分析电泳图片扫描灰度值结果为: 无放射诱导组 0.528 ± 0.071 , 伴放射诱导组 0.835 ± 0.132 , 两组灰度值的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



A和B: 未放疗诱导组; C和D: 放疗诱导组; E: -actin; F: 250 bp Marker

图 3 RT-PCR检测CDglyTK基因的mRNA表达

Fig 3 Expression of mRNA of CDglyTK gene

2.4 细胞凋亡和增殖指数

流式细胞仪检测细胞凋亡和增殖结果见表1。无论有无放射诱导, 治疗组细胞的AI均明显高于对照组 ($P < 0.01$), 而PI则明显低于对照组 ($P < 0.01$)。

对照组放疗引起AI和PI的改变无统计学意义 ($P > 0.05$), 而治疗组放疗引起AI和PI的改变则有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 流式细胞仪检测细胞凋亡和增殖结果 n=10, %, $\bar{x} \pm s$

Tab 1 The values of PI and AI measured by flow cytometry (n=10, %, $\bar{x} \pm s$)

分组	凋亡指数		增殖指数	
	无放射	有放射	无放射	有放射
对照组	2.98 ± 0.39	4.23 ± 0.41	54.22 ± 6.97	48.02 ± 5.70
治疗组	26.80 ± 2.71	37.45 ± 5.79	34.22 ± 4.61	24.10 ± 3.00

3 讨论

3.1 放射诱导启动子结构与功能

早期生长反应因子1基因 (early growth response-1, Egr-1) 参与细胞的多种辐射效应。尽管Egr-1基因对辐射敏感的机制尚不十分清楚, 但Egr-1基因的调控程序 (启动子) 的辐射可诱导性却很明确, 可感受电离辐射等因素刺激诱导下游基因表达^[2-3]。研究发现^[2-3], 一种含有10个碱基的高度保守CC(A/T)₆GG的结构域 (亦称CARg盒) 与辐射诱导密切相关, 该结构域有3种形式: CCATATATGG、CCATATAAGG和CCTTATTGG, 均可直接感受放射线刺激诱导其下游基因表达。为了探明Egr-1启动子序列中CARg盒以外的DNA序列结构如Sp-1转录因子结合序列和cAMP反应序列在放射诱导中的作用, Scott等^[2]调改CARg盒间隔距离及Sp-1转录因子结合序列的位置, 结果发现辐射诱导效率无明显影响。Marples等^[4]则发现人工合成含有若干串联CARg结构域的DNA序列具有类似的放射诱导功能, 甚至这种合成的启动子较野生型Egr-1启动子有更强的诱导能力。这种人工合成放射诱导序列与野生Egr-1启动子相比, 结构相对简单, 消除了野生型Egr-1启动子中一些转录序列的影响, 如SP-1转录因子、AP-1和cAMP反应元件相关蛋白, 作用更专一。并能灵活应用于基因治疗载体中提高目的基因的表达, 可以根据需要调整CARg盒的数目, 通过提高其放射诱导性减少临床诱导放疗剂量, 保护正常组织并降低照射副作用。有学者还发现CARg盒经放射线重复照射可多次发挥其诱导性, 刺激下游基因持续表达, 可克服目的基因表达短而无法达到治疗效果的缺陷。本课题组前期研究成功合成了含有6个串联CARg盒 (CCATATAAGG) 的放射诱导启动子并鉴定了其辐射可诱导性, 为本实验奠定了基础。

3.2 放射增效与靶向表达

自杀基因治疗研究中存在的一个突出问题是如

何调控自杀基因仅在肿瘤组织中靶向表达，防止其对正常组织的损伤。用放射诱导启动子来调控其下游治疗基因的靶向表达是近年来发现的一种放射-基因治疗新策略^[9]，将传统的放疗与基因治疗有机结合起来，既减少大剂量放疗的副作用，又提高了自杀基因的毒性作用。Greco等^[9]用Egr-1启动子联合缺氧反应性序列 hypoxia responsive elements, HREs)来增强一种名为辣根过氧化物酶 horseradish peroxidase, HRP)的自杀基因的表达，增加细胞对前体药物吲哚乙酸 indole-3-acetic acid, IAA)的敏感性，可有效解决肿瘤内缺氧细胞对放射线不敏感的问题。Marples等^[7]在利用放射诱导启动子调控自杀基因的靶向表达方面的研究作了许多有益的尝试，证实了该方案的可操作性，Egr-1启动子可充当放射-基因分子开关。双功能自杀基因CDglyTK是目前已知的细胞毒性作用最强的自杀基因之一^[9]，用作基因治疗时，靶向性表达对提高治疗的安全性及疗效极为重要。本实验利用人工合成的放射诱导启动子调控双自杀基因CDglyTK治疗Tca8113细胞，经细胞毒性实验、RT-PCR检测mRNA表达水平、流式细胞仪检测细胞凋亡和增殖进行综合评价，结果证实低剂量放射诱导能有效提高自杀基因的治疗效果。

值得特别指出的是这种放射线照射外源性因素调节的基因靶向性表达，不同于宿主自身转录水平的调控机制，更适用于多种肿瘤的基因治疗，具有广谱性、简便性，易于临床推广应用等优点。用肿瘤特异性抗原启动子或增强子来介导治疗基因的靶向表达往往应用范围有限，如AFP启动子介导自杀基因仅对AFP阳性细胞起作用，对AFP阴性细胞则不能发挥作用，由于肿瘤种类繁多，各有其自身特点，治疗方案因个性化的需要而复杂多变，实际操作非常困难；另一方面，肿瘤特异性蛋白一般仅按生理需求量表达，难以达到治疗的需要。而放射线照射靶向则与之不同，随着强调适性形放疗 intensity

modulation radiation therapy, IMRT)技术的发展，通过调节照射野内各点的输出剂量率确保照射野形状与靶区完全一致，可使自杀基因的靶向表达更为精准，基因表达的强弱和时间调节更方便，所以这种外源性的调节机制备受青睐。

[参考文献]

[1] 余东升, 黄洪章, 潘朝斌, 等. 放射诱导调控序列的合成及其辐射诱导特性的鉴定[J]. 口腔颌面外科杂志, 2004, 14 (1): 1-2. (YU Dong-sheng, HUANG Hong-zhang, PAN Chao-bin, et al. Synthesis of radiation-inducible promoter and identification of its radiation-inducibility[J]. Chinese J Oral Maxillofacial Surgery, 2004, 14 (1): 1-2.)

[2] Scott SD, Joiner MC, Marples B. Optimizing radiation-responsive gene promoters for radiogenetic cancer therapy[J]. Gene Ther, 2002, 9 (20): 1396-1402.

[3] Rasmussen H, Rasmussen C, Lempicki M, et al. TNF erade biologic: Preclinical toxicology of a novel adenovector with a radiation-inducible promoter, carrying the human tumor necrosis factor alpha gene[J]. Cancer Gene Ther, 2002, 9 (11): 951-957.

[4] Marples B, Scott SD, Hendry JH, et al. Development of synthetic promoters for radiation-mediated gene therapy[J]. Gene Ther, 2000, 7 (6): 511-517.

[5] Takahashi T, Namiki Y, Ohno T. Induction of the suicide HSV-TK gene by activation of the Egr-1 promoter with radioisotopes [J]. Hum Gene Ther, 1997, 8 (7): 827-833.

[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): 1403-1411.

[7] Marples B, Greco O, Joiner MC, et al. Molecular approaches to chemo-radiotherapy[J]. Eur J Cancer, 2002, 38 (2): 231-239.

[8] 魏道严, 戴冰冰, 陈诗书. 放射诱导经Egr-1启动子调控的腺病毒介导CDglyTK基因的肿瘤靶向表达[J]. 中华医学杂志, 2001, 81 (16): 999-1003. (WEI Dao-yan, DAI Bing-bing, CHEN Shi-shu. Tumor targeted expression of adenovirus mediated CDglyTK gene regulated by irradiation via Egr-1 promoter[J]. National Medical J China, 2001, 81 (16): 999-1003.)

(本文编辑 汤亚玲)

本刊对“ 通讯作者 ” 有关事宜的声明

请作者投稿时注意：凡文章内注明通讯作者的稿件，与稿件相关的一切事宜 包括邮寄稿件收稿单、退稿、退修稿件、作者校样、版面费、稿费等) 均与通讯作者联系；如文内未注明通讯作者的文章，按照国际惯例，有关稿件的一切事宜均与第一作者联系，特此声明。