

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.07.008

• 基础研究 •

# 淋巴瘤特异性高效基因表达载体survivin-VISA的构建与鉴定

罗 宁<sup>1</sup>, 肖志强<sup>2</sup>, 李建瓚<sup>1,2</sup>

**Construction and Digestion of Lymphoma-specific and High Efficient Gene Expression Vector survivin-VISA**

LUO Ning<sup>1</sup>, XIAO Zhiqiang<sup>2</sup>, LI Jianhuang<sup>1,2</sup>

1. Department of Oncology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2. Key Laboratory of Cancer Proteomics of Chinese Ministry of Health

Corresponding Author: LI Jianhuang, E-mail: jianhuang\_l@126.com

**Abstract: Objective** To construct lymphoma-specific and high efficient gene expression vector composed of the survivin promoter in the VP16-GAL4-WPRE integrated systemic amplifier system (S-VISA). **Methods** Three vectors, S-WPRE, S-TSTA and S-VISA, were constructed by gene recombination technology, comprised of different elements of woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element(WPRE), two-step transcriptional amplification(TSTA) and VISA under control of survivin promoter, respectively; PCR method and enzyme digestion were used to prove its correctness. Lymphoma cell lines Ramos, U937, Raji and hepatic cell line Chang Liver were transfected with these vectors by liposome to detect the luciferase activities. **Results** Expression vectors S-WPRE, S-TSTA and S-VISA were proved to be constructed correctly by PCR and enzyme digestion. Luciferase activity analysis showed that S-VISA achieved lymphoma-specific and high efficient expression of the target gene. **Conclusion** Lymphoma-specific and high efficient gene expression vector S-VISA is constructed successfully, which laid a good foundation for further study of lymphoma gene therapy.

**Key words:** survivin promoter; VP16-GAL4-WPRE integrated systemic amplifier(VISA); Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element(WPRE); Two-step transcriptional amplification(TSTA); Lymphoma

**摘要: 目的** 构建含survivin启动子及VP16-GAL4-WPRE整合型系统性放大系统(VISA)的淋巴瘤特异性高效基因表达载体survivin-VISA(S-VISA)。**方法** 应用基因重组技术构建含survivin启动子与土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)、二步转录放大系统(TSTA)和VISA系统分别构成的表达载体S-WPRE、S-TSTA和S-VISA,经PCR法及酶切鉴定。用脂质体法转染淋巴瘤细胞株Ramos、U937、Raji及人肝细胞株Chang Liver,检测荧光素酶活性。**结果** 表达载体S-WPRE、S-TSTA和S-VISA通过PCR法及酶切鉴定证明构建正确,荧光素酶活性检测表明S-VISA载体在淋巴瘤细胞中实现了目的基因特异性高效表达。**结论** 成功构建了含survivin启动子及VISA系统的淋巴瘤特异性高效基因表达载体S-VISA,为淋巴瘤基因治疗的进一步研究奠定了良好的基础。

**关键词:** survivin启动子; VP16-GAL4-WPRE整合型系统性放大系统(VISA); 土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE); 二步转录放大系统(TSTA); 淋巴瘤

**中图分类号:** R73-36 **文献标识码:** A

## 0 引言

近年来,我国恶性淋巴瘤的发病率不断增长,多种亚型的淋巴瘤患者5年生存率不足50%<sup>[1]</sup>。除了化疗、单克隆抗体治疗外,基因治疗

也是目前淋巴瘤治疗的研究热点之一。尽管肿瘤的基因治疗取得了许多成果,但仍然面临许多的问题与挑战,其中最主要的问题是目的基因靶向性较差与表达效率较低。本课题组前期研究已证实survivin启动子在淋巴瘤细胞中具有较高的特异性<sup>[2]</sup>,很大程度上解决了肿瘤基因治疗的靶向性问题,但是相对于通常使用的巨细胞病毒启动子(CMV)而言,survivin启动子的活性较弱,目的基因表达量不能满足临床治疗需要。

研究资料显示二步转录放大系统(two-step

收稿日期: 2013-05-22; 修回日期: 2013-10-21

基金项目: 湖南省自然科学基金资助课题(09jj5016)

作者单位: 1. 410008 长沙, 中南大学湘雅医院肿瘤科,

2. 中南大学湘雅医院卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室

通信作者: 李建瓚, E-mail: jianhuang\_l@126.com

作者简介: 罗宁(1989-), 女, 硕士, 主要从事恶性肿瘤的基础与临床研究

transcriptional amplification, TSTA) 和土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件 (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element, WPRE) 能通过不同方式增强目的基因表达。TSTA系统是一种嵌合型转录因子, 由酵母GAL4-DNA结合域、I型单纯疱疹病毒即刻早期反式作用因子VP16激活结构域及含有5个GAL4结合域和E4TATA盒的启动元件G5E4T组成<sup>[3]</sup>。WPRE是一种基因转录后调控因子。应用基因重组技术构建的含VP16-GAL4与WPRE的整合型系统性基因表达信号扩增器(VP16-GAL4-WPRE integrated systemic amplifier, VISA)可以大幅提高目的基因的表达效率。本研究中我们拟构建survivin启动子与WPRE、TSTA和VISA系统分别构成的表达质粒, 通过比较淋巴瘤细胞转染后的荧光素酶表达水平, 选择在淋巴瘤细胞中具有较高表达效率的信号放大系统, 为进一步研究淋巴瘤基因治疗奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒 pGL3-Survivin质粒由本科室唐友红博士惠赠<sup>[2]</sup>, pCMVgDWPRE质粒由意大利帕尔马大学Dr Gaetano Donofrio惠赠<sup>[4]</sup>, TSTA-NSN质粒由美国加州大学洛杉矶分校医学院Dr Mike Carey惠赠<sup>[5]</sup>, pGL3-CMV、pGL3-Basic质粒购自Promega公司。

1.1.2 细胞 人淋巴瘤Ramos、U937、Raji细胞株购自上海麦莎生物科技有限公司, 人肝细胞株Chang Liver购自中科院上海生命科学院细胞所。

1.1.3 试剂 实验所用内切酶均为NEB(New England Biolabs公司)产品, 连接酶(宝灵曼B.M公司), DNA连接酶、luciferase assay system试剂盒、TD-20/20荧光检测计(Promega公司)。新生小牛血清(杭州四季青生物公司), DMEM、RPMI 1640培养液(美国Gibco公司), 质量小量提取试剂盒(美国Omega公司)、胶回收试剂盒(TaKaRa公司), Lipofectamine 2000脂质体购自Invitrogen公司。

### 1.2 方法

1.2.1 WPRE基因扩增 根据pCMVgDWPRE质粒序列设计WPRE上下游引物, 由上海英骏生物技术有限公司合成。上游引物序列为: 5'-TGTCTAGA ATCAACCTCTGGATTAC-3', 下游引物序列为: 5'-CATCTAGACCAGGCGGGGAGGCGGC-3', 上、下游引物5'端带有Xba I酶切位点(用下划线标示)。以pCMVgWPRE质粒为模板扩增WPRE基因, PCR反应条件为: 95℃ 5 min; 94℃ 30 s,

55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30个循环; 72℃ 8 min。反应结束后, 取PCR产物5 μl电泳, 并送上海生工生物工程技术有限公司作DNA测序。

1.2.2 pGL3-Survivin-WPRE (S-WPRE) 载体构建 WPRE基因PCR产物经Xba I酶切、纯化后, 应用T4 DNA连接酶与pGL3-Survivin载体经Xba I酶切、纯化后的产物进行连接, 构建成S-WPRE载体, 经PCR及Xba I酶切鉴定并送上海英骏生物技术有限公司纯化测序。

1.2.3 pGL3-Survivin-TSTA (S-TSTA) 载体的构建 Kpn I和Nhe I双酶切TSTA-NSN和pGL3-survivin质粒, 回收约6 000 bp的TSTA载体片段和约1 000 bp的survivin启动子片段, 用T4 DNA连接酶连接, 构建成S-TSTA载体, 利用PCR及双酶切(Kpn I/Nhe I)鉴定。

1.2.4 pGL3-survivin-VISA (S-VISA) 载体构建 (1) pGL3-G5E4T-WPRE载体的构建: 根据TSTA-NSN质粒序列设计G5E4T片段上下游引物, 由上海英骏生物技术有限公司合成。上游引物序列为: 5'-TGGGTACCTGCCTGCAGGTCCGGAG-3', 下游引物序列为: 5'-GGTCGACTTACTTAG ATCGCAGATT-3', 上下游引物5'端分别带有Kpn I、Sal I酶切位点(用下划线标识)。以TSTA-NSN为模板扩增G5E4T。PCR反应条件为: 95℃ 5 min; 94℃ 30 s, 53.5℃ 30 s, 72℃ 30s 30个循环, 72℃ 8 min。反应结束后, 取PCR产物5 μl电泳分析结果。Kpn I和Sal I双酶切G5E4T片段PCR产物, 连入Kpn I和Xho I双酶切的S-WPRE载体(Sal I酶切后的末端可以和Xho I酶切后的末端钝性连接)构建成pGL3-G5E4T-WPRE过渡载体。利用Kpn I及Hind III酶切鉴定(因钝性连接后Xho I已被破坏)。(2) S-VISA载体的构建: Kpn I和Sal I双酶切pGL3-S-TSTA和pGL3-G5E4T-WPRE载体, 回收约4 800 bp的S-TSTA片段(保留了survivin启动子、除G5E4T外的TSTA系统和部分载体序列)和约2 800 bp的G5E4T-WPRE片段(保留了G5E4T、荧光素酶编码基因、WPRE和poly A序列)。用T4 DNA连接酶连接, 构建成S-VISA载体。利用PCR及双酶切(Kpn I/Sal I)鉴定。

1.2.5 质粒转染与荧光素酶检测 取对数生长期的Ramos细胞及Chang Liver细胞, 用脂质体法分别瞬时转染重组质粒pGL3-CMV(阳性对照组)、pGL3-survivin/S-WPRE/S-TSTA/S-VISA(实验组)和pGL3-basic(阴性对照组), 转染方法按照Lipofectamine 2000操作说明进行。48 h按照luciferase assay system

试剂盒的步骤进行细胞裂解液制备,并用TD-20/20 荧光检测计进行荧光素酶检测。

1.3 统计学方法

本实验中所有数据均采用均数±标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示。应用SPSS16.0软件,各组数据进行分析比较,以  $\alpha = 0.05$  为检验标准。多组间比较采用One-Way ANOVA检验,多个样本均数间两两比较采用S-N-Kq检验法,相关分析采用直相关计算Pearson相关系数,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 WPRE序列测序结果

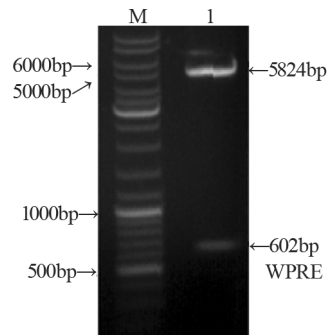
以pCMVgWPRE质粒为模板扩增WPRE基因,扩增产物进行测序,所得序列结果(图略)与GenBank报道的完全一致。

2.2 重组载体的鉴定

重组载体S-WPRE、S-TSTA及S-VISA的酶切鉴定,见图1~3。同时测序结果显示S-WPRE载体构建成功。

2.3 荧光素酶活性分析

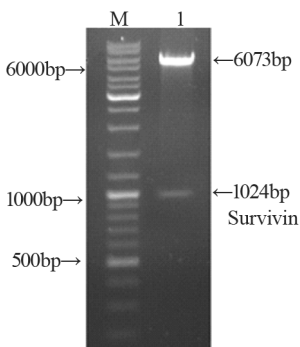
以pGL3-CMV为阳性对照(100%), pGL3-Basic



S-WPRE:pGL3-survivin-WPRE; Lane1: S-WPRE vector digested by *Xba* I ; M:MBI DNA ladder SM0331

图1 重组载体S-WPRE酶切鉴定图

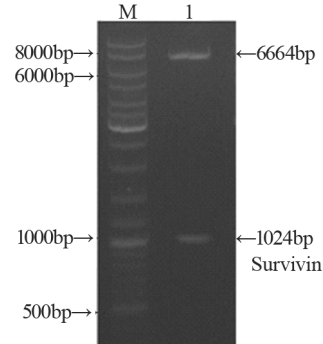
Figure1 Restriction enzyme digestion analysis of recombinant vector S-WPRE



S-TSTA: pGL3-survivin-TSTA; Lane1: S-TSTA vector digested by *Kpn* I and *Nhe* I ; M: MBI DNA ladder SM0331

图2 重组载体S-TSTA酶切鉴定图

Figure2 Restriction enzyme digestion analysis of recombinant vector S-TSTA



S-VISA: pGL3-survivin-VISA; Lane1: S-VISA vector digested by *Kpn* I and *Nhe* I ; M: MBI DNA ladder SM0331

图3 重组载体S-VISA酶切鉴定图

Figure3 Restriction enzyme digestion analysis of recombinant vector S-VISA

为阴性对照,荧光素酶检测结果,见表1。转染S-WPRE后Ramos、U937、Raji及chang liver细胞的荧光素酶表达水平均明显低于转染pGL3-CMV细胞 ( $P < 0.01$ ); 转染S-TSTA、S-VISA后Ramos、U937、Raji细胞的荧光素酶表达水平均高于转染pGL3-CMV细胞 ( $P < 0.01$ ), 而Chang Liver细胞中的表达水平低于转染pGL3-CMV细胞 ( $P < 0.01$ )。

转染S-VISA后Ramos、U937、Raji细胞中的荧光素酶表达水平高于转染S-TSTA细胞 ( $P < 0.05$ ), 而在Chang Liver细胞中表达水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

3 讨论

目前应用于淋巴瘤基因治疗的目的基因表达量较低,不能满足治疗基因高水平表达的需求。因此,提高目的基因在淋巴瘤细胞中的表达水平成为进一步临床应用所需要解决的问题。

目的基因表达要经过基因激活、转录、翻译等多个阶段,这些阶段受到多种调节因素影响。组织特异性启动子能驱动转录因子VP16-GAL4,增强下游目的基因表达,VP16-GAL4增强的转录信号通过与G5E4T结合而再次放大,进一步提高目的基因表达水平。Iyer等<sup>[6]</sup>在前列腺癌LNCaP细胞系中应用TSTA系统来增强前列腺特异性抗原启动子的转录活性,驱动荧光素酶基因及突变型I型单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV1)胸苷激酶(HSV1-sr39tk)基因,结果显示荧光素酶活性提高了约50倍,HSV1-sr39tk活性提高了约12倍。Song等<sup>[7]</sup>研究表明,含人端粒酶反转录酶启动子(human telomerase reverse transcriptase promoter, hTERTp)与TSTA的重组质粒能使hTERTp在hTERTp阳性卵巢癌细胞中的转录活性提高200倍左右,进而促进靶基因表达

表1 S-VISA、S-TSTA、S-WPRE及pGL3-CMV在不同细胞中的荧光素酶活性

Table1 The luciferase activities of recombinant vectors S-VISA, S-TSTA, S-WPRE and pGL3-CMV in different cells

Cell lines	Relative luciferase activity					
	pGL3-CMV(%)	pGL3-survivin(%)	S-WPRE(%)	S-TSTA(%)	S-VISA(%)	pGL3-basic(%)
Ramos	100	5.38±1.84	8.51±2.17	264.78±68.69	475.07±116.94	5.73±0.67
U937	100	4.75±1.42	11.37±3.26	228.45±78.27	641.73±187.28	7.69±0.71
Raji	100	2.62±0.55	9.46±3.38	331.67±142.43	670.88±135.01	4.47±0.43
Chang	100	0.74±0.21	1.65±0.23	1.69±0.46	4.24±1.22	0.48±0.07

增强。本研究结果也证实TSTA系统促进了淋巴瘤 Ramos、Raji、U937细胞中的荧光素酶表达，其表达水平高于转染pGL3-CMV的细胞。

WPRE是一种转录后调控因子，将其插入目的基因下游可以增强目的基因mRNA转录后蛋白的翻译，增加目的基因编码蛋白的表达量。Sims等<sup>[8]</sup>在鼠神经细胞中将WPRE插入目的基因下游，实验结果显示目的基因编码蛋白表达量提高了8倍。Mariati等<sup>[9]</sup>研究证实WPRE在人胚肾HEK293细胞中的转录后调控作用。本研究结果显示单独转染WPRE促进荧光素酶表达的能力弱于CMV启动子。

Xie等<sup>[10]</sup>利用TSTA和WPRE构建出VISA系统表达载体，以胆囊收缩素A受体（CCKAR）启动子作为胰腺癌特异性启动子介导荧光素酶报告基因转染胰腺癌细胞及正常胰腺导管上皮细胞，结果显示，使用C-VISA作为基因表达载体驱动报告基因表达的效率明显高于使用C-TSTA及单独使用CCKAR启动子。Sher等<sup>[11]</sup>在肺癌基因治疗研究中发现，在鼠肺癌TC-1细胞中联合了VISA系统的survivin启动子活性持续性增强，S-VISA的启动子活性比单独的survivin启动子提高了17倍，并且其促进目的基因表达的效率明显高于CMV启动子。卵巢癌基因治疗研究中得出类似的结论<sup>[12]</sup>。本研究也发现S-VISA能促进荧光素酶表达，且效率高于CMV启动子，与前述研究结果一致。

在本研究中，我们成功构建了S-WPRE、S-TSTA及S-VISA表达质粒，以其转染淋巴瘤细胞，荧光素酶检测结果表明，相对于CMV、S-WPRE和S-TSTA，S-VISA在淋巴瘤细胞Ramos、U937、Raji中驱动荧光素酶表达具有明显的优势，同时保持了survivin启动子的淋巴瘤特异性，证实了Survivin启动子和VISA放大系统的联合可以作为一种淋巴瘤特异性高效基因表达载体，为进一步研究淋巴瘤基因治疗提供了良好的实验依据和新的思路。

参考文献:

[1] Murawski N, Zwick C, Pfreundschuh M. Unresolved issues in diffuse large B-cell lymphomas[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2010, 10(3):387-402.

[2] Tang YH, Zhong MZ, Liu W, *et al.* Clone of the Survivin promoter and its specific transcriptional activity in human lymphoma cells[J]. Bai Xue Bing-Lin Ba Liu, 2010, 19(2): 84-7. [唐友红, 钟美佐, 刘巍, 等. 人类生存蛋白启动子的克隆及其在淋巴瘤细胞中的转录活性研究[J]. 白血病·淋巴瘤, 2010, 19(2): 84-7.]

[3] Ray S, Paulmurugan R, Patel MR, *et al.* Noninvasive imaging of therapeutic gene expression using a bidirectional transcriptional amplification strategy[J]. Mol Ther, 2008, 16(11):1848-56.

[4] Donofrio G, Cavirani S, Vanderplasschen A, *et al.* Recombinant bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) expressing glycoprotein D of BoHV-1 is immunogenic and elicits serum-neutralizing antibodies against BoHV-1 in a rabbit model[J]. Clin Vaccine Immunol, 2006, 13(11):1246-54.

[5] Zhang L, Adams JY, Billick E, *et al.* Molecular engineering of a two-step transcription amplification(TSTA) system for transgene delivery in prostate cancer[J]. Mol Ther, 2002, 5(3):223-32.

[6] Iyer M, Wu L, Carey M, *et al.* Two-step transcriptional amplification as a method for imaging reporter gene expression using weak promoters[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(25):14595-600.

[7] Song Y, Shen K, He CX. Construction of autocatalytic caspase-3 driven by amplified human telomerase reverse transcriptase promoter and its enhanced efficacy of inducing apoptosis in human ovarian carcinoma [J]. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, 2007, 42(9):617-22. [宋悦, 沈铿, 何春霞. 人端粒酶逆转录酶启动子-二步转录增强系统调控下的活性半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3的构建及其对卵巢上皮性癌的治疗作用[J]. 中华妇产科杂志, 2007, 42(9):617-22.]

[8] Sims K, Ahmed Z, Gonzalez AM, *et al.* Targeting adenoviral transgene expression to neurons[J]. Mol Cell Neurosci, 2008, 39(3):411-7.

[9] Mariati, Ho SC, Yap MG, *et al.* Evaluating post-transcriptional regulatory elements for enhancing transient gene expression levels in CHO K1 and HEK293 cells[J]. Protein Expr Purif, 2010, 69(1):9-15.

[10] Xie X, Xia W, Li Z, *et al.* Targeted expression of BikDD eradicates pancreatic tumors in noninvasive imaging models[J]. Cancer Cell, 2007, 12(1):52-65.

[11] Sher YP, Liu SJ, Chang CM, *et al.* Cancer-targeted BikDD gene therapy elicits protective antitumor immunity against lung cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2011, 10(4): 637-47.

[12] Xie X, Hsu JL, Choi MG, *et al.* A novel hTERT promoter-driven E1A therapeutic for ovarian cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8(8):2375-82.

[编辑: 黄园玲; 校对: 刘红武]