

hTERT 启动子调控 rVBMDMP 基因 表达载体的构建与功能研究*

张志伟^{1, 2, 3)**} 贺修胜^{1, 2, 3)} 罗招阳^{1, 2, 3)} 李艳兰^{1, 2, 3)} 曹建国^{1, 4)}

⁽¹⁾ 南华大学医学院肿瘤研究所, 衡阳 421001; ⁽²⁾ 南华大学医学院病理学教研室, 衡阳 421001;

⁽³⁾ 南华大学肿瘤细胞与分子病理学湖南省高校重点实验室, 衡阳 421001; ⁽⁴⁾ 湖南师范大学医学院药理学教研室, 长沙 410013)

摘要 为了探讨端粒酶催化亚单位(hTERT)启动子调控重组血管基膜衍生多功能肽(rVBMDMP)基因表达抑制肺癌细胞生长的作用机制, 采用 PCR 方法, 克隆 hTERT 启动子核心区片段, 并检测其功能活性。然后, 构建 pLNSX/hTERT/rVBMDMP 逆病毒载体, 获取逆病毒, 感染肺癌 A549 细胞, 检测 hTERT 启动子调控 rVBMDMP 基因表达对细胞形态、细胞生长、细胞凋亡以及 Caspase-3 表达的影响。另外, 观察 hTERT 启动子调控 rVBMDMP 基因表达对裸鼠成瘤的抑制作用、瘤组织细胞的凋亡及 Caspase-3 表达情况。结果发现: a. hTERT 启动子核心区能调控 rVBMDMP 基因的表达($n=3$, $P<0.05$); b. hTERT 启动子调控 rVBMDMP 基因的表达具有抑制肺癌 A549 细胞的生长和裸鼠成瘤作用($n=6$, $P<0.05$); c. rVBMDMP 基因表达能促进肺癌 A549 细胞凋亡和 Caspase-3 蛋白表达。以上结果说明, hTERT 启动子调控 rVBMDMP 基因表达后, 通过提高 Caspase-3 的表达水平, 促进细胞凋亡而抑制肺癌 A549 细胞的生长。

关键词 hTERT 启动子, rVBMDMP 基因, 细胞凋亡, Caspase-3 蛋白

学科分类号 R320.67

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00503

端粒酶催化亚单位(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)在包括肺癌等绝大多数恶性肿瘤的发病中发挥重要作用。最近研究表明^[1-2], hTERT 启动子调控下的基因, 能特异性地在恶性肿瘤细胞中表达, 而正常组织细胞中表达非常低, 甚至不表达, 这为恶性肿瘤的特异性基因治疗提供了可能。重组血管基膜衍生多功能肽(recombinant vascular basement-derived multifunctional peptide, rVBMDMP)具有十分明显的选择性抑制肿瘤组织血管内皮细胞、杀伤肿瘤细胞及在肿瘤部位相对聚集三重功能^[3-4]。以上研究为开发靶向性治疗恶性肿瘤的临床用药提供了可能。为此, 我们通过体内、外实验探讨 hTERT 启动子调控 rVBMDMP 基因表达抑制肺癌细胞生长的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与细胞。 pLNSX 逆病毒质粒和 pGL2 质粒由南华大学医学院肿瘤研究所提供,

pUC19-VBMDMP 原核表达质粒由湖南师范大学医学院曹建国教授提供^[3-4]。病毒包装 PA317 细胞、人胚肾 293 细胞、人肺癌 A549 细胞、人脐静脉内皮 HUVEC-12 细胞、人肺成纤维 HFL1 细胞、人 B 淋巴 XJH 细胞、人正常肺上皮 BEAS-2B 细胞和人肝 L-02 细胞购于中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所, 上述细胞分别用含 10% 小牛血清(购自杭州四季青公司)的 RPMI 1640 或 DMEM (Gibco BRL 公司)培养基培养。

1.1.2 动物。 突变系 SPF 级 Balb/c-nu 裸小鼠 18 只, 5 周龄, 体重 14~16 g。饲养于屏障环境(百级无菌室)中, 饲料、饮水、垫料和笼具均经高压蒸汽灭菌后使用, 操作人员严格执行 SPF 级实验动物操作规程。裸小鼠提供单位为上海斯来克实验动

* 湖南省自然科学基金(07JJ6164)和湖南省重点学科建设项目(2006-180)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0734-8281075, E-mail: zhangzhiweichina@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-01-18, 接受日期: 2010-01-29

物有限责任公司，许可证编号：SCXK(沪)2009-0003.

1.1.3 试剂与引物. 实验所用内切酶均为 NEB 产品，连接酶、碱性磷酸酶购自宝灵曼(B.M.)公司；AMV Reverse Transcription 试剂盒、PCR 系列及荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司；G418 和 Lipofectamine 2000 脂质体购自 Invitrogen 公司；TUNEL 凋亡细胞检测试剂盒购自 TBDscience 公司；单克隆抗体(一抗和二抗)购自 Zymed Ltd；其他化学和生化试剂均为 Sigm 公司产品. PCR 引物(表 1)用 Primer5 软件设计，由上海英骏生物技术有限公司合成.

Table 1 Primer sequences used in PCR

Primer	Sequence(5'→3')	Product size/bp
Core domain of hTERT promoter	P1: AAA CTCGAG GATTTCGCGGGCAGACAG (Black italic letters represents an <i>Xho</i> I enzyme site)	267
	P2: AAA TTCGAACCTAGG CCACGTGCGCAGCAGGAG (Black italic letters represents <i>Hind</i> III and <i>Bam</i> H I enzyme site)	
Core domain of CMV promoter	P3: AAA CTCGAG ACGGGCCAGATATACGCGTTGACAT (Black italic letters represents an <i>Xho</i> I enzyme site)	643
	P4: AAA TTCGAACCTAGG GATAAGCCAGTAAGCAGTGGGTTCT (Black italic letters represents <i>Hind</i> III and <i>Bam</i> H I enzyme site)	
rVBMDMP	P5: CGGGATCCACAATGCCATTC	182
	P6: CCCAAGCTTTCTTTCTGGGTT	
β -Actin	P7: ACCGTGGAGAAGA GCTACGA	309
	P8: GTACTTGCGCTCAG AAGGAG	

1.2 方法

1.2.1 pGL2/hTERT-LUC(hTERT 启动子核心区域)质粒的重组. 以 293 细胞基因组 DNA 为模板，用引物 P1、P2 通过 PCR 扩增 hTERT 启动子的部分序列(−28~−277 bp 片段)，回收 PCR 产物，用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Hind* III 分别对 pGL2(Basic)质粒和纯化的 PCR 产物行双酶切，回收目的片段后连接，即 pGL2/hTERT-LUC 质粒. 另外，用 pCDNA3.1 质粒为模板，用引物 P3、P4 通过 PCR 扩增 CMV 启动子序列(232~819 bp 片段)，证实产物长度为 643 bp，回收 PCR 产物，用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Hind* III 分别对 pGL2(Basic)质粒和纯化的 PCR 产物行双酶切，回收目的片段后连接，即 pGL2/CMV-LUC 质粒，上述质粒均经 PCR 和酶切鉴定，送上海博亚公司进行测序.

1.2.2 hTERT 启动子功能活性检测. 将 400 ng pGL2/hTERT-LUC 和 pGL2/CMV-LUC 质粒分别转染不同的细胞(A549 细胞、HUVEC-12 细胞、HFL1 细胞、XJH 细胞、BEAS-2B 细胞、293 细胞、L-02 细胞)，实验以 pGL2-Control 为阳性对照，pGL2-Basic 为阴性对照，通过荧光素酶活性分析，检测 hTERT 启动子的转录活性. 实验共设

4 组，每组设 3 个平行孔. 48 h 后，按荧光酶活性检测试剂盒操作指南，在 TD-20/20 荧光检测仪进行检测，用校正值(测量值与酶标仪测定 β -gal 数值之商)表示 hTERT 启动子活化的相对活性(以平行孔的 $\bar{x} \pm s$ 表示)，本实验独立进行 3 次.

1.2.3 pLNSX/hTERT/rVBMDMP 逆病毒质粒的重组. 用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Hind* III 分别对 pLNSX 载体和 pGL-2/hTERT 质粒行双酶切，回收目的片段后连接，即 pLNSX/hTERT 逆病毒质粒. 然后，将 pLNSX/hTERT 逆病毒质粒和 pUC19-VBMDMP 质粒用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切，回收目的片段后连接，即 pLNSX/hTERT/rVBMDMP. 另外，用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Bam*H I 分别对 pLNSX/hTERT/rVBMDMP 质粒和 pGL-2/CMV 质粒行双酶切，回收目的片段后连接，即 pLNSX/CMV/rVBMDMP 逆病毒质粒，上述质粒均经 PCR 和酶切鉴定.

1.2.4 感染性逆转录病毒的制备和感染. 参照文献[5]进行，将 pLNSX/CMV/rVBMDMP、pLNSX/hTERT/rVBMDMP 和 pLNSX/hTERT 质粒分别转染 PA317 细胞，600 mg/L G418 筛选 2 周后，汇合克隆扩大培养，获得稳定产逆病毒的 PA317 细胞

系. 收集浓缩病毒液, 测定病毒浓度后备用. 将 A549 细胞种入 6 孔板培养, 分别用 RV-CMV/rVBMDMP、RV-hTERT/rVBMDMP 和 RV-hTERT 逆病毒和 8 mg/L 聚凝胺 37℃ 孵育(感染) A549 细胞(即 A549-CMV/rVBMDMP、A549-hTERT/rVBMDMP 和 A549-hTERT), 每组 3 孔, 感染 6 次(4 h/次, 间隔 8 h/次), 连续 1 周光镜观察细胞形态变化. 最后, 随机选取 10 个视野, 每个视野计数 200 个细胞, 统计漂浮和死亡细胞数, 并计算死亡率($\%$)=(死亡细胞的均数/200) $\times$ 100%. 另外, 用 RT-PCR 和 Western blotting 检测 rVBMDMP 在 A549 细胞中的表达.

1.2.5 免疫荧光试验. 参照文献[6]制备细胞爬片, 用甲醇: 丙酮(1:1)固定、洗片、干燥后用抗 rVBMDMP 多抗标记 1 h (37℃), 洗片后用 FITC 标记的羊抗兔二抗标记 1 h (37℃), 洗涤后甘油封片, 于荧光显微镜下观察, 拍照.

1.2.6 RT-PCR. 收集细胞, 按 Trizol 试剂操作程序抽提细胞总 RNA, 用紫外分光光度计和凝胶电泳检测 RNA 的浓度、纯度和质量, 分装冻存于 -70℃. RT-PCR 按照 AMV 逆转录试剂盒操作步骤进行逆转录. 然后取 RT 产物 3 μ l, 加入 P5 与 P6 引物和内对照 P7 与 P8 引物分别各 1 μ l (10 μ mol/L), 设 30 μ l PCR 反应体系, 在 PCR 仪中扩增, 用 1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物.

1.2.7 Western blotting 检测蛋白质表达. 收集细胞, 制备蛋白质, 测定浓度后, 以各泳道 80 μ g 的总蛋白进行 10% SDS- 不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜、封闭, 一抗(1:1 000)及抗 β -actin 单抗(1:2 000)4℃ 孵育过夜, 洗膜后, HRP 标记的羊抗兔二抗(1:1 000)孵育、洗膜、发光、曝光、显影、定影以及分析结果.

1.2.8 流式细胞仪 (FCM) 检测. RV-CMV/rVBMDMP、RV-hTERT/rVBMDMP 和 RV-hTERT 逆病毒感染 A549 细胞 1 周后, 分别收集 A549-CMV/rVBMDMP 细胞、A549-hTERT/rVBMDMP 细胞和 A549-hTERT 细胞, 制成单细胞悬液, PBS 洗 3 次, 70%预冷的乙醇 4℃ 至少固定 2 h, 调整细胞浓度为 10^6 个/ml. 送北京鼎国生物公司用流式细胞仪(Becton Dickson 公司)测定细胞凋亡情况.

1.2.9 绘制生长曲线. 将 A549 细胞接种于 96 孔板中(每孔 1×10^4), 用 RV-hTERT、RV-hTERT/rVBMDMP 和 RV-CMV/rVBMDMP 逆病毒和 8 mg/L 聚凝胺 37℃ 孵育(感染)A549 细胞, 6 次(4 h/次,

间隔 8 h/次), 分为 A549-CMV/rVBMDMP 组、A549-hTERT/rVBMDMP 组和 A549-hTERT 组, 每组设 3 个平行孔, 隔天用 MTT 法进行检测, 每次重复测量 3 次, 取平均值代表测量值, 用校正值(每次测量值与第 1 天的测量值之商)代表细胞生长曲线的测量值, 总共检测 8 天, 将细胞的校正值绘制在坐标纸上, 即得出细胞的生长曲线, 本实验独立进行了 3 次.

1.2.10 裸鼠成瘤试验. 用无血清 RPMI 1640 稀释 A549 细胞接种于裸鼠背部皮下, 每只注射 5×10^6 细胞 (200 μ l), 每组 6 只, 共 3 组(即 A549-CMV/rVBMDMP 组、A549-hTERT/rVBMDMP 组和 A549-hTERT 组). 接种后每天定时观察裸鼠精神、饮食等基本状况, 接种 2 周后, 建立 A549 细胞裸鼠成瘤模型, 瘤内注射 RV-hTERT/rVBMDMP 浓缩逆病毒, q.d. $\times$ 20 天连续观察, 每 3 天测量长径和短径, 并计算肿瘤体积(=短径² $\times$ 长径 $\times$ 0.52), 分析对肿瘤生长的抑制情况. 5 周后, 处死裸鼠, 取瘤称重, 计算抑瘤率($\%$), 抑瘤率=(hTERT 组瘤重-hTERT/rVBMDMP 组瘤重)/hTERT 组瘤重 $\times$ 100%. 最后取瘤组织切片证实并检测 rVBMDMP 基因的表达、瘤组织细胞的凋亡及 Caspase-3 蛋白的表达.

1.2.11 TUNEL 法检测移植瘤组织细胞凋亡. 按照试剂盒操作步骤, 石蜡包埋的切片常规脱蜡, 蛋白酶 K 室温 15~30 min, TUNEL 混合溶液, 37℃ 60 min, 转化剂 -POD, 37℃ 30 min, DAB 溶液显色, 光镜下分析结果. 阳性判断标准: 凋亡细胞核着色, 呈棕黄色或黄色颗粒状. 计数 200 个细胞, 计算凋亡细胞的百分率为凋亡指数. 凋亡指数小于 5%为阴性反应, 大于 5%而小于 25%为弱阳性反应, 大于 25%而小于 50%为中等阳性反应, 大于 50%者为强阳性反应.

1.2.12 统计学分析. 应用 SPSS13.0 统计软件包进行 *t* 检验. 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义.

2 结 果

2.1 重组 pGL2/hTERT-LUC 质粒的酶切鉴定

通过 PCR 扩增获取的 CMV 和 hTERT 启动子片段, 构建了 pGL2/CMV-LUC 和 pGL2/hTERT-LUC 质粒, 质粒经 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定得到了证实(图 1), 经测序结果证实序列完全正确.

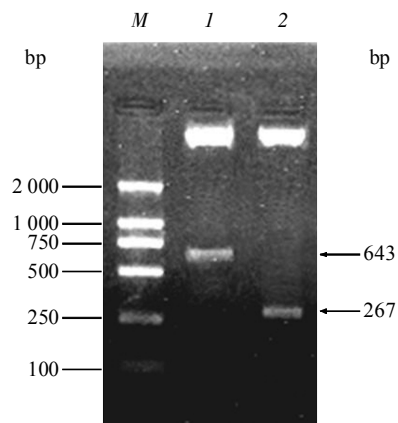


Fig. 1 The pGL2/hTERT-LUC plasmids digested by the *Xho* I and *Hind* III restrictive enzyme
M: Marker; 1: pGL2/CMV-LUC plasmid digested by the *Xho* I and *Hind* III restrictive enzyme; 2: pGL2/hTERT-LUC plasmid digested by the *Xho* I and *Hind* III restrictive enzyme.

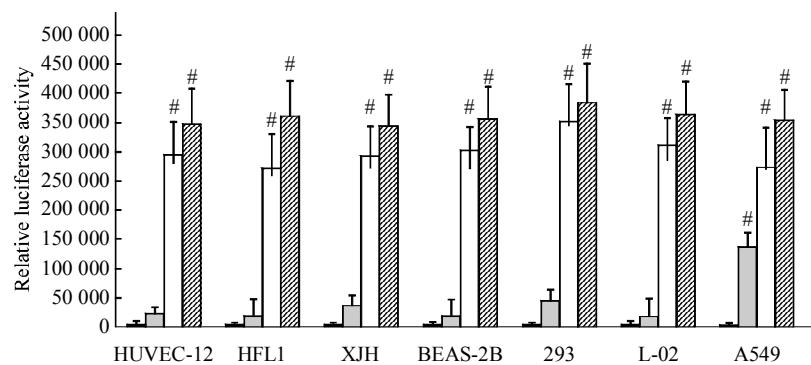


Fig. 2 Analyzed transactivation of hTERT promotor in A549 cells
Values are $\bar{x} \pm s$ deviations(SD). ($n=3$, $^{\#}P < 0.005$, vs pGL2-Basic). ■: pGL2-Basic; □: pGL2-hTERT; □: pGL2-CMV; ▨: pGL2-Control.

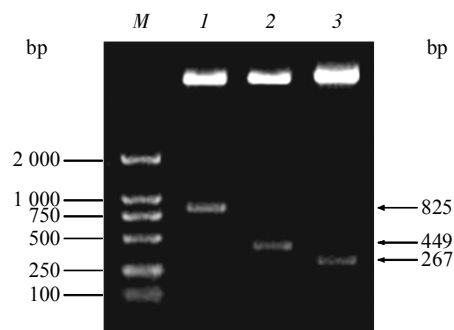


Fig. 3 The pLNSX/hTERT/rVBMDMP retroviral plasmids digested by the *Xho* I and *Hind* III restrictive enzyme
M: Marker; 1: pLNSX/CMV/rVBMDMP retroviral plasmid digested by the *Xho* I and *Hind* III restrictive enzyme; 2: pLNSX/hTERT/rVBMDMP retroviral plasmid digested by the *Xho* I and *Hind* III restrictive enzyme; 3: pLNSX/hTERT retroviral plasmid digested by the *Xho* I and *Hind* III restrictive enzyme.

2.2 hTERT 启动子在不同细胞中的转录活性分析

经 β - 半乳糖苷酶测定值校正后反应 CMV 和 hTERT 启动子活性的相对荧光素酶值, 结果显示, CMV 启动子在肺癌 A549 细胞和非肺癌细胞中均具有较高的转录活性, hTERT 启动子仅在肺癌 A549 细胞中具有一定的转录活性, 而在非肺癌细胞中活性较低. 结果说明 hTERT 启动子转录活性具有细胞选择性, 而 CMV 启动子则没有(图 2, $n=3$, $P < 0.05$).

2.3 重组 pLNSX/hTERT/rVBMDMP 逆病毒质粒的鉴定

重组质粒 pLNSX/CMV/rVBMDMP, pLNSX/hTERT/rVBMDMP 和 pLNSX/hTERT 经 *Xho* I 、 *Hind* III 双酶切(图 3)和 PCR 鉴定(结果未显示)证实, 得到与目的片段大小一致的电泳条带.

2.4 稳定产逆病毒 PA317 细胞系的建立

将 pLNSX/CMV/rVBMDMP, pLNSX/hTERT/rVBMDMP 和 pLNSX/hTERT 逆病毒质粒分别转染 PA317 细胞, G418 筛选后融合克隆, 经 RT-PCR (结果未显示)和免疫荧光染色(图 4, 为了便于观

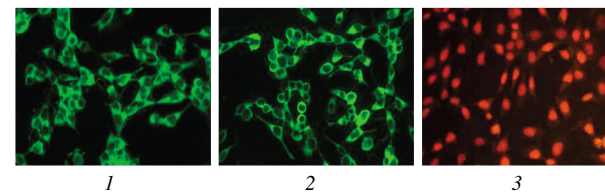


Fig. 4 Immunofluorescence detection of PA317-hTERT/rVBMDMP cells

1: PA317-CMV/rVBMDMP; 2: PA317-hTERT/rVBMDMP; 3: PA317-hTERT.

察, PA317-hTERT 细胞在实验最后用 EB 染色, 显示细胞核)鉴定, 获得稳定产逆病毒的 PA317 细胞系, 收集浓缩病毒, 测定病毒浓度后备用.

2.5 hTERT 和 CMV 启动子调控 rVBMDMP 基因表达的比较

用 RV-CMV/rVBMDMP 和 RV-hTERT/rVBMDMP 逆病毒感染 A549 细胞、HUVEC-12 细胞、HFL1 细胞、XJH 细胞、BEAS-2B 细胞、293 细胞和 L-02 细胞后, 经 RT-PCR 检测 rVBMDMP 的表达, 结果表明, hTERT 启动子调控 rVBMDMP 基因仅在 A549 细胞中高表达(图 6), 而 CMV 启动子调控 rVBMDMP 基因在上述细胞中均高表达, 没有明显区别(图 5), 结果提示, hTERT 启动子调控 rVBMDMP 基因表达具有一定的细胞选择.

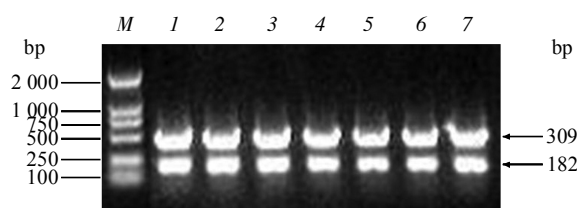


Fig. 5 The expression of rVBMDMP gene regulated by CMV promoter in different cells detected by RT-PCR

M: Marker; 1: HUVEC-12 cells; 2: HFL1 cells; 3: XJH cells; 4: BEAS-2B cells; 5: 293 cells; 6: L-02 cells; 7: A549 cells.

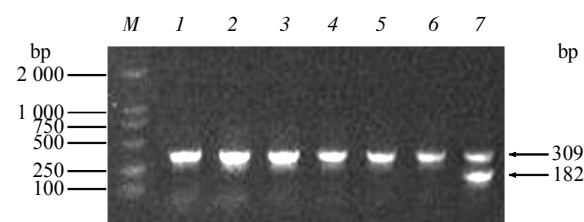


Fig. 6 The expression of rVBMDMP gene regulated by hTERT promoter in different cells detected by RT-PCR

M: Marker; 1: HUVEC-12 cells; 2: HFL1 cells; 3: XJH cells; 4: BEAS-2B cells; 5: 293 cells; 6: L-02 cells; 7: A549 cells.

2.6 A549 细胞中 rVBMDMP 表达检测

RV-CMV/rVBMDMP、RV-hTERT/rVBMDMP 和 RV-hTERT 逆病毒感染 A549 细胞后, 经 RT-PCR (结果未显示) 和 Western blotting 检测 rVBMDMP 的表达, 结果显示, A549-CMV/rVBMDMP 细胞和 A549-hTERT/rVBMDMP 细胞中

存在 rVBMDMP 表达, 而 A549-hTERT 细胞为阴性(图 7), 说明 hTERT 启动子可以调控 rVBMDMP 基因在 A549 细胞中表达.

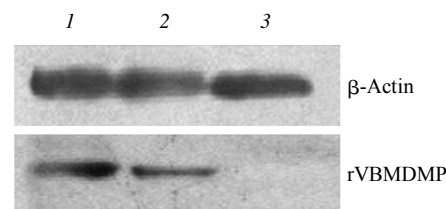


Fig. 7 The expression of rVBMDMP protein in A549-hTERT/rVBMDMP cells detected by Western blotting

1: A549-CMV/rVBMDMP cells; 2: A549-hTERT/rVBMDMP cells; 3: A549-hTERT cells.

2.7 rVBMDMP 表达对 A549 细胞形态的改变

分别用 RV-CMV/rVBMDMP、RV-hTERT/rVBMDMP 和 RV-hTERT 逆病毒感染 A549 细胞 (6 次, 4 h / 次, 间隔 8 h / 次), 光镜观察细胞形态. 随机选取 10 个视野, 每个视野计数 200 个细胞, 统计漂浮和死亡细胞数, 结果显示 A549-hTERT/rVBMDMP 和 A549-CMV/rVBMDMP 细胞较 A549-hTERT 细胞漂浮和死亡明显增多(表 2, $n=3$, $P < 0.05$).

Table 2 Statistics of natant and died A549-hTERT/rVBMDMP cells

Cells	Number of natant and died cell	Death rate/%
A549-CMV/rVBMDMP	76±23 [#]	38.0
A549-hTERT/rVBMDMP	43±12 [#]	21.5
A549-hTERT	14±8	7.0

[#]A549-CMV/rVBMDMP and A549-hTERT/rVBMDMP versus A549-hTERT, $P < 0.05$.

2.8 rVBMDMP 对 A549 细胞生长的影响

将分别感染的 A549 细胞 (A549-CMV/rVBMDMP 组、A549-hTERT/rVBMDMP 组和 A549-hTERT 组)隔天用 MTT 法进行检测, 连续检测 8 天, 绘制出细胞的生长曲线. 经绘制的生长曲线和统计分析, A549-hTERT/rVBMDMP 细胞和 A549-CMV/rVBMDMP 细胞较 A549-hTERT 细胞的生长明显减慢(图 8, $n=3$, $P < 0.05$).

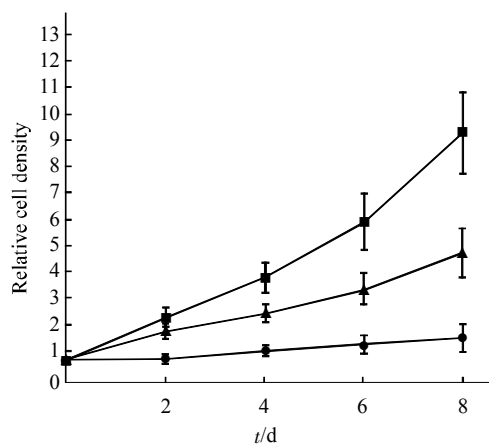


Fig. 8 Growth curve of A549-hTERT/rVBMDMP cells

●—●: A549-CMV/rVBMDMP cells; ▲—▲: A549-hTERT/rVBMDMP cells; ■—■: A549-hTERT cells.

2.9 rVBMDMP 表达对 A549 细胞凋亡的改变

分别收集 A549-CMV/rVBMDMP 细胞、A549-hTERT/rVBMDMP 细胞和 A549-hTERT 细胞, 采用 FCM 检测细胞的凋亡率, 结果显示 A549-CMV/rVBMDMP 细胞和 A549-hTERT/rVBMDMP 细胞较 A549-hTERT 细胞凋亡率明显增加(图 9, $n=3$, $P<0.05$). 另外, 经 DNA 凝胶电泳检测细胞凋亡, 结果显示 A549-CMV/rVBMDMP 细胞和 A549-hTERT/rVBMDMP 细胞中可见明显的 DNA 梯状条带(图 10). 同时, 通过 Western blotting 检测细胞中 Caspase-3 蛋白的表达, 结果显示, A549-CMV/rVBMDMP 细胞和 A549-hTERT/rVBMDMP 细胞中 Caspase-3 的表达较 A549-hTERT 细胞中明显增加(图 11).

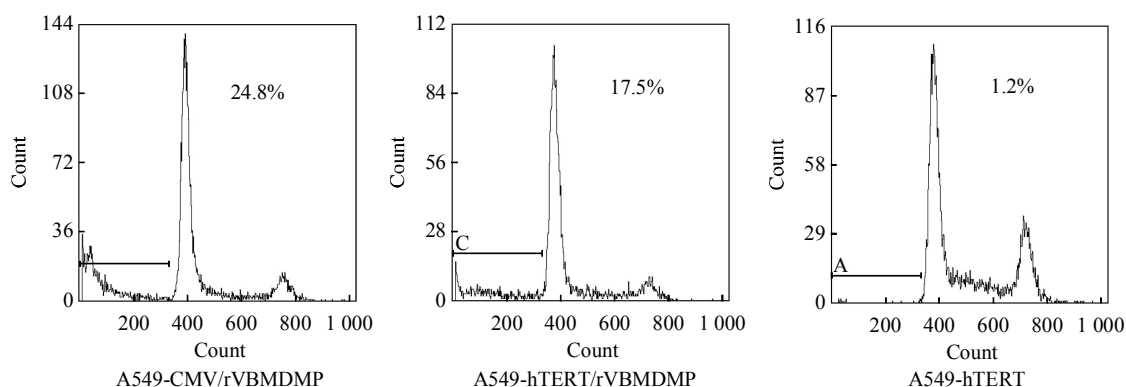


Fig. 9 FCM detected apoptotic rate of A549 cells of rVBMDMP protein expression

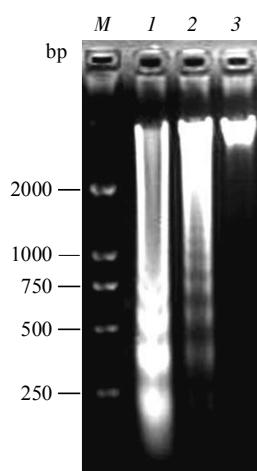


Fig. 10 DNA gel electrophoresis observed apoptotic in A549 cells of rVBMDMP protein expression

M: Marker; 1: A549-CMV/rVBMDMP cells; 2: A549-hTERT/rVBMDMP cells; 3: A549-hTERT cells.

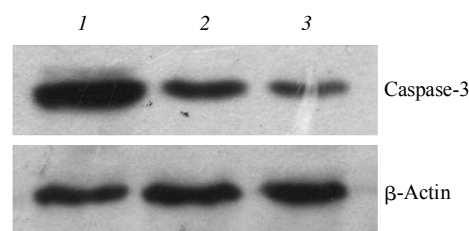


Fig. 11 The Caspase-3 protein expression in A549-hTERT/rVBMDMP cells detected by Western blotting

1: A549-CMV/rVBMDMP cells; 2: A549-hTERT/rVBMDMP cells; 3: A549-hTERT cells.

2.10 裸鼠成瘤实验

为进一步从体内实验论证上述结果, 将 A549 细胞接种裸鼠, 接种 2 周后, 建立 A549 成瘤模型, 每天瘤内注射浓缩逆病毒, 每 3 天测量长径和短径, 并计算肿瘤体积, 观察对肿瘤生长的抑制情

况(图 12). 5 周后, 处死裸鼠, 测肿瘤体积并称其重量 (表 3). 结果亦显示 rVBMDMP 表达能抑制 A549 细胞的生长.

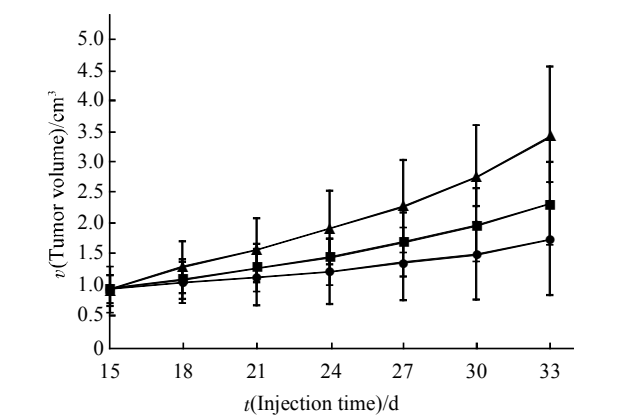


Fig. 12 Growth curve of transplanted tumor inhibited by expression of rVBMDMP gene regulated by hTERT promotor
●—●: A549-CMV/rVBMDMP; ■—■: A549-hTERT/rVBMDMP; ▲—▲: A549-hTERT.

Table 3 Comparison of transplanted tumor volume and weight

Groups	Tumor volume/cm ³	Tumor weight/g
A549-CMV/rVBMDMP	1.78±0.93 [#]	1.15±0.78 [*]
A549-hTERT/rVBMDMP	2.37±0.68 [#]	1.68±0.53 [*]
A549-hTERT	3.46±1.15	2.45±0.91

[#]. *A549-CMV/rVBMDMP and A549-hTERT/rVBMDMP versus A549-hTERT, *P* < 0.05.

2.11 裸鼠移植瘤的组织形态变化
3 组移植瘤组织经病理切片检查, 均为低分化鳞状细胞癌, 并可见不同程度的病理性核分裂像及凋亡细胞, A549-CMV/rVBMDMP 组和 A549-hTERT/rVBMDMP 组的凋亡细胞较 A549-hTERT 组多(图 13).

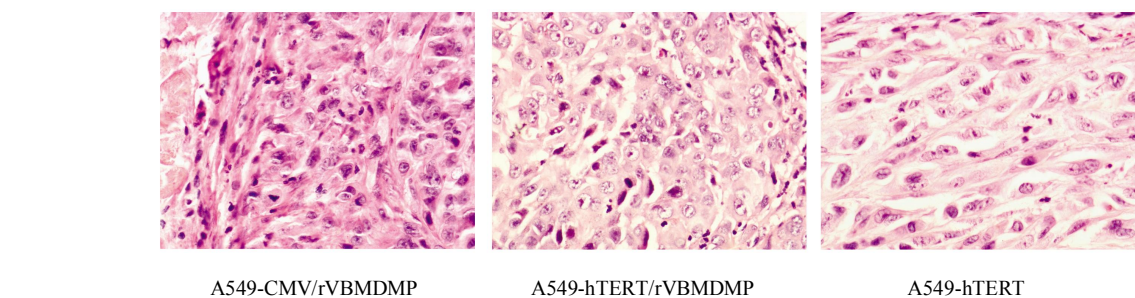


Fig. 13 H.E. staining of transplanted tumor tissue in the nude mice
10×40

2.12 裸鼠移植瘤组织细胞凋亡分析
移植瘤组织石蜡切片, TUNEL 法检测(DAB 染色)细胞凋亡. 结果显示: A549-CMV/rVBMDMP 组部分细胞核呈棕黄色颗粒状, 凋亡呈强阳性反

应; A549-hTERT/rVBMDMP 组部分细胞核呈黄色颗粒状, 凋亡呈中等阳性反应; A549-hTERT 组细胞核呈紫蓝色, 凋亡呈阴性反应(图 14).

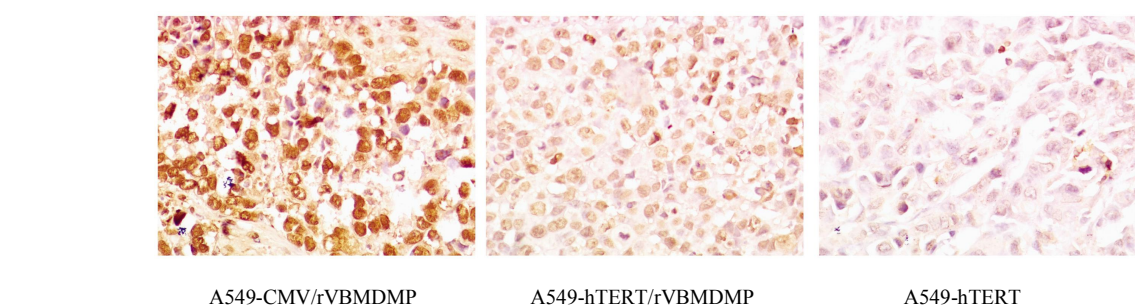


Fig. 14 Tissue apoptosis of transplanted tumor detected by TUNEL method
10×40

2.13 裸鼠移植瘤组织中 rVBMDMP 蛋白和 Caspase-3 蛋白的表达

Western blotting 分析 3 组移植瘤组织中 rVBMDMP 蛋白和 Caspase-3 蛋白的表达情况. 结果显示, A549-CMV/rVBMDMP 组和 A549-hTERT/rVBMDMP 组中 rVBMDMP 蛋白表达均为阳性, 而 A549-hTERT 组表达为阴性(图 15). 另外, A549-CMV/rVBMDMP 组和 A549-hTERT/rVBMDMP 组中 Caspase-3 蛋白表达较 A549-hTERT 组表达水平高. 结果提示, rVBMDMP 蛋白能上调 Caspase-3 蛋白表达水平.

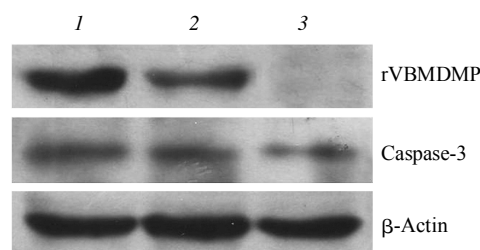


Fig. 15 Analyzed expression of rVBMDMP protein and Caspase-3 protein in the transplanted tumor tissue

1: A549-CMV/rVBMDMP; 2: A549-hTERT/rVBMDMP; 3: A549-hTERT.

3 讨 论

自从提出以抑制肿瘤血管形成为靶标作为治疗肿瘤的有效措施以来^[7], 人们发现了许多抑制肿瘤生长的血管新生抑制因子, 如血管抑素、内皮抑素和肿瘤抑素(tumstatin)等, 其中 tumstatin 的发现最受关注. Tumstatin 是 IV 型胶原 $\alpha 3$ 链活性非胶原区 1 (28 ku) 片段. IV 型胶原的每一条 α 链由 3 个区域组成: 氨基端的 7S 区、分子中央的胶原区和羧基端的非胶原区 1(NC1)^[8]. Tumstatin 能通过上调和活化 Caspase-3 诱导增殖的内皮细胞凋亡^[9-10].

rVBMDMP 基因是人工合成 IgG3 上游铰链区序列连接 Tumstatin 74~98 氨基酸肽和 197~215 氨基酸肽序列的融合基因, 其产物具有抑制肿瘤血管内皮细胞增殖和肿瘤细胞增殖双重效应^[3-4], 是一种多肽类抗肿瘤候选药物(已获专利, 专利号: 1594580A). 我们的研究显示, rVBMDMP 表达后可在体外有效抑制肺癌 A549 细胞的生长, 而其随着 rVBMDMP 表达量的升高和时间延长, 这种抑制作用更加明显(图 8), 进一步证实了以往的研

究^[3-4]. 为了进一步了解 rVBMDMP 抑制肺癌 A549 细胞生长的作用机制, 我们通过 FCM 和 DNA 凝胶电泳检测发现, rVBMDMP 表达后可有效诱导 A549 细胞凋亡(图 9, 10), 因此推测, rVBMDMP 诱导 A549 细胞凋亡可能是其抑制细胞生长的作用机制之一.

细胞凋亡主要有 2 条独立的凋亡途径, 一条是通过死亡受体激活途径, 死亡受体即细胞膜表面的某些蛋白质, 它们能与携带凋亡信号的专一性配体结合, 并迅速将凋亡信号转导至细胞内而诱导细胞凋亡. 另一条通路是线粒体 - 细胞色素 c 途径, 线粒体释放的细胞色素 c 能与 Apaf-1 及 Caspase-9 形成复合体(凋亡小体), 在 dATP 和 ATP 存在下激活 Caspase-3, 启动 Caspase 级联反应, 诱导细胞凋亡. 为了解 rVBMDMP 诱导 A549 细胞凋亡的机制, 我们检测了 rVBMDMP 基因表达后 Caspase-3 的水平, 结果发现 rVBMDMP 可上调 Caspase-3 蛋白的表达(图 11), 因此推测 rVBMDMP 诱导 A549 细胞凋亡的可能与其促 Caspase-3 蛋白表达有关.

另外, 裸鼠成瘤实验同样证实, 移植瘤组织中 rVBMDMP 表达升高后, 移植瘤生长减慢(图 12), 细胞凋亡率也增加(图 13, 14), 且 rVBMDMP 表达升高后 Caspase-3 蛋白表达上调(图 15). 因此, 我们推测 rVBMDMP 可能通过上调 Caspase-3 蛋白表达介导细胞凋亡, 实现对肺癌 A549 细胞生长的抑制. 至于 rVBMDMP 可能通过其他途径抑制细胞的生长, 尚需我们进一步深入研究.

hTERT 启动子位于 hTERT 基因 5' 侧 4.8 ku 片段内富含 GC 区, 其位于 hTERT 转录起始点上游近端约 180~208 bp 片段称为启动子核心区域, 该区域序列中 -208~-150 之间的 59 bp 负责最高的启动子活性^[11-12]. 因此, 我们选择性地克隆了 hTERT 启动子核心区域(同时克隆了 CMV 启动子作为阳性对照), 并对其在不同细胞中活性进行了分析(图 2), 结果显示, hTERT 启动子仅在肺癌 A549 细胞中具有一定的活性, 而其他非肿瘤细胞中活性较低, 而 CMV 启动子在不同细胞中均具有较高的转录活性, 没有细胞选择性. 为了进一步证实上述结果, 我们比较 hTERT 和 CMV 启动子调控 rVBMDMP 基因在不同细胞中的表达情况, 结果显示, hTERT 调控 rVBMDMP 基因仅在 A549 细胞中高表达(图 6), 而 CMV 调控 rVBMDMP 基因在不同细胞中均高表达, 没有明显区别(图 5), 结果同样也提示 hTERT 调控 rVBMDMP 基因表达

具有一定的细胞选择性, 可以进行后续实验.

在端粒酶复合体中, 端粒酶活性及 hTERT 在包括肺癌等 90% 以上人类恶性肿瘤中高表达^[13-14], 其中 hTERT 是特异性最强的调控端粒酶活性的亚单位之一. 因此, 利用端粒酶及 hTERT 与恶性肿瘤的特异性关系, hTERT 启动子操纵 rVBMDMP 基因可实现对肿瘤细胞的靶向性杀伤. 我们在体外细胞实验和体内裸鼠实验均显示, 在肺癌 A549 细胞中, hTERT 启动子可促使 rVBMDMP 基因的表达(图 6, 7, 15), 发挥对瘤细胞的生长抑制作用(图 8, 12). 然而, hTERT 调控 rVBMDMP 基因在组织中的特异性将是我们下一步研究的目标. 总之, hTERT 启动子调控 rVBMDMP 基因表达载体的建立, 为深入研究其对肺癌细胞靶向性杀伤和其作用机制提供了可能, 亦为今后临床应用打下了坚实的基础.

参 考 文 献

- [1] Kim R H, Kim R, Chen W, *et al.* Association of hsp90 to the hTERT promoter is necessary for hTERT expression in human oral cancer cells. *Carcinogenesis*, 2008, **29**(12): 2425-2431
- [2] Xie X, Hsu J L, Choi M G, *et al.* A novel hTERT promoter-driven E1A therapeutic for ovarian cancer. *Mol Cancer Ther*, 2009, **8**(8): 2375-2382
- [3] Wu Y H, Cao J G, Xiang H L, *et al.* Recombinant vascular basement-membrane-derived multifunctional peptide inhibits angiogenesis and growth of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2009, **15**(14): 1744-1750
- [4] Cao J G, Peng S P, Sun L, *et al.* Vascular basement membrane-derived multifunctional peptide, a novel inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2006, **38**(7): 514-521
- [5] 张志伟, 张 琼, 余艳辉, 等. EB 病毒 LMP1-CTAR₃ 对 NP69 细胞增殖和蛋白表达的影响. *生物化学与生物物理学进展*, 2009, **36**(5): 580-586
- [6] Zhang Z W, Zhang Q, Yu Y H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(5): 580-586
- [6] 张志伟, 张 琼, 余艳辉, 等. Epstein-Barr 病毒潜伏性膜蛋白 1 CTAR3 缺失突变体的构建与功能分析. *微生物学报*, 2008, **48**(10): 1308-1313
- [7] Zhang Z W, Zhang Q, Yu Y H, *et al.* *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, **48**(10): 1308-1313
- [7] Chakroborty D, Sarkar C, Basu B, *et al.* Catecholamines regulate tumor angiogenesis. *Cancer Res*, 2009, **69**(9): 3727-3730
- [8] Eikesdal H P, Sugimoto H, Birrane G, *et al.* Identification of amino acids essential for the antiangiogenic activity of tumstatin and its use in combination antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(39): 15040-15045
- [9] Li Y J, Sun L C, He Y, *et al.* The anti-tumor properties of two tumstatin peptide fragments in human gastric carcinoma. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, **30**(9): 1307-1315
- [10] Eikesdal H P, Sugimoto H, Birrane G, *et al.* Identification of amino acids essential for the antiangiogenic activity of tumstatin and its use in combination antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(39): 15040-15045
- [11] Padmanabhan P, Otero J, Ray P, *et al.* Visualization of telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter activity using a trimodality fusion reporter construct. *J Nucl Med*, 2006, **47**(2): 270-277
- [12] Xie X, Hsu J L, Choi M G, *et al.* A novel hTERT promoter-driven E1A therapeutic for ovarian cancer. *Mol Cancer Ther*, 2009, **8**(8): 2375-2382
- [13] Zinn R L, Pruitt K, Eguchi S, *et al.* hTERT is expressed in cancer cell lines despite promoter DNA methylation by preservation of unmethylated DNA and active chromatin around the transcription start site. *Cancer Res*, 2007, **67**(1): 194-201
- [14] Terrin L, Rampazzo E, Pucciarelli S, *et al.* Relationship between tumor and plasma levels of hTERT mRNA in patients with colorectal cancer: implications for monitoring of neoplastic disease. *Clin Cancer Res*, 2008, **14**(22): 7444-7451

Construction and Function Study of Expression Vector of rVBMDMP Gene Regulated by hTERT Promotor*

ZHANG Zhi-Wei^{1,2,3)**}, HE Xiu-Sheng^{1,2,3)}, LUO Zhao-Yang^{1,2,3)}, LI Yan-Lan^{1,2,3)}, CAO Jian-Guo^{1,4)}

¹⁾ Cancer Research Institute of Medical College, University of Southern China, Hengyang 421001, China;

²⁾ Department of Pathology of Medical College, University of Southern China, Hengyang 421001, China;

³⁾ University Key Laboratory of Cancer Cellular and Molecular Pathology in Hunan Province, Hengyang 421001, China;

⁴⁾ Department of Pharmacology of Medical College, Hunan Normal University, Changsha 410013, China)

Abstract To investigate action mechanism of the expression of rVBMDMP gene regulated by hTERT promotor inhibited cell growth of lung cancer, the Core domain of hTERT promotor was obtained by PCR and its function activity was detected. Then, retroviral vector of pLNSX/hTERT/rVBMDMP was recombined, and lung cancer A549 cells were infected by the collected retrovirus. Further, it was observed that expression of rVBMDMP gene regulated by hTERT promotor influenced cellular morphous, cell growth, cell apoptosis and expression of Caspase-3 protein. Moreover, it was observed that expression of rVBMDMP gene regulated by hTERT promotor inhibited the growth of transplanted tumor in the nude mice, the cellular apoptosis of tumor tissue and the expression of Caspase-3 protein. The results showed: a. The Core domain of hTERT promotor can regulate the expression of rVBMDMP gene ($n=3$, $P < 0.05$); b. Expression of rVBMDMP gene regulated by hTERT promotor was able to inhibit the growth of lung cancer A549 cells and transplanted tumor in nude mice ($n=6$, $P < 0.05$); c. The expression of rVBMDMP gene promoted the apoptosis of lung cancer A549 cells and the expression of Caspase-3 protein. These results suggested that expression of rVBMDMP gene regulated by hTERT promotor inhibited the growth of lung cancer A549 cells because it enhanced expression level of Caspase-3 protein to increase cell apoptosis.

Key words hTERT promotor, rVBMDMP gene, cell apoptosis, Caspase-3 protein

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00503

*This work was supported by grants from The Hunan Provincial Natural Science Foundation of China (07JJ6164) and The Construct Program of The Key Discipline in Hunan Province (2006-180).

**Corresponding author.

Tel: 86-734-8281075, E-mail: zhangzhiweichina@yahoo.com.cn

Received: January 18, 2010 Accepted: January 29, 2010