

· 基础研究 ·

靶向增强型 TK 表达载体在 鼻咽癌细胞中的作用研究

钱宇虹, 文 忠, 赖肖芬, 于超生, 关小芳

(南方医科大学珠江医院 耳鼻咽喉头颈外科, 广东 广州 510282)

摘要: **目的** 探讨 hTERT 启动子及 CMV 增强子双调控机制的增强型表达载体 pGL3-basic-EGFP-TK-hTERTp-CMV enhancer 在鼻咽癌细胞中的靶向杀伤效应。**方法** 构建靶向性增强型 hTERT 启动子及 CMV 增强子双调控 TK 表达载体 pGL3-basic-EGFP-TK-hTERTp-CMV enhancer, 并以单启动子载体 pGL3-basic-EGFP-TK-hTERTp 作为对照组, 分别转染端粒酶阳性的人鼻咽癌细胞株 5-8F、人乳腺癌细胞 MCF-7 (阳性对照) 及正常人血管内皮细胞 ECV (阴性对照)。荧光显微镜下观察其 TK 基因绿色荧光蛋白表达, 实时荧光定量 PCR 方法检测转染细胞中 TK 基因 mRNA 定量表达差异, Stretch PCR 法检测肿瘤细胞端粒酶活性, MTT 法分析杀灭鼻咽癌细胞的效果等作为检验指标。**结果** ①该增强型表达载体转染 5-8F 细胞及 MCF-7 细胞后的绿色荧光表达及 TK 基因的 mRNA 表达均强于单启动子 pGL3-basic-EGFP-TK-hTERTp 组; 而 ECV 细胞只有极微弱的绿色荧光和极弱的 TK 基因的 mRNA 表达。实时荧光定量 PCR 显示, 增强型载体组 A 值较对照组单启动子组明显增高, 是单启动子组的 2~5 倍。Stretch PCR 法检测转染前后 5-8F 细胞端粒酶活性明显被抑制。②加入 GCV 后增强载体组对鼻咽癌 5-8F 细胞及乳腺癌 MCF-7 细胞体外增殖均有明显抑制作用, 均高于单启动子载体组、不加 GCV 的增强型载体组、空载体组及空白对照组。**结论** 以 hTERT 启动子及 CMV 增强子双调控机制介导 TK 基因的新型靶向增强型表达载体能够高效靶向性杀灭鼻咽癌细胞, 这种新型高效靶向增强型载体有可能成为一种针对包括鼻咽癌在内的具有较为广泛抗癌谱的恶性肿瘤临床靶向基因治疗的新策略。

关键词: 增强型载体; 鼻咽癌; 肿瘤靶向基因治疗; 端粒酶

中图分类号: R739.62

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2010)03-0161-08

Effects of target-enhanced TK gene vector in nasopharyngeal carcinoma cells

QIAN Yu-hong, WEN Zhong, LAI Xiao-fen, et al.

(Department of Otolaryngology, Pearl River Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou 510282, China)

Abstract: **Objective** To explore the killing effect of enhanced TK vector regulated by hTERT promoter and CMV enhancer, pGL3-basic-EGFP-TK-hTERTp-CMV enhancer, in nasopharyngeal carcinoma cells. **Methods** pGL3-basic as a basic vector template, a target-enhanced TK vector, pGL3-basic-EGFP-TK-hTERTp-CMV enhancer, was cut, linked, and constructed by restriction enzymes (regulated by hTERT promoter and CMV enhancer). Mono-promoter vector, pGL3-basic-EGFP-TK-hTERTp, was chosen as control group; the vectors were transfected into telomerase (+) 5-8F cells of human nasopharyngeal carcinoma and telomerase (+) human MCF-7 cells of breast cancer (positive control) and telomerase (-) human vascular endothelial ECV cells (negative control) respectively. The expression of TK gene green fluorescent protein was

基金项目: 本课题受广东省科技计划项目资助 (课题编号: 2007B031003008)。

作者简介: 钱宇虹, 女, 副主任技师。

通讯作者: 文 忠, Email: wenzhong60@163.com.

observed under fluorescence microscope, the difference of quantitative expression of TK gene mRNA was detected with real-time fluorescent quantitative PCR; telomerase activity was determined with Stretch PCR in malignant tumour cells, and the killing effects of the vectors to the 5-8 F cells and MCF-7 cells were analyzed with MTT.

The above - mentioned indexes were chosen to evaluate the killing effects of enhanced TK vector. **Results**

① Strong expression of TK gene green fluorescent protein and TK mRNA was displayed in enhanced - vector transfected 5-8 F cell line and MCF-7 cell line, while that in the mono-promoter transfected cell lines and ECV cells transfected by enhanced TK vector was weak. Real-time fluorescent quantitative PCR also showed that the A-value of enhanced TK vector group was higher than that of the control group. Stretch PCR showed that the telomerase activity in the 5-8 F cell line transfected by enhanced TK vector was inhibited. ② After adding GCV, obvious cell growth inhibition was observed in pGL3-basic-EGFP-TK-hTRETp-CMV enhancer transfected 5-8 F cell line and MCF-7 cell line, which was more obvious than those of pGL3-basic-EGFP-TK-hTRETp, pGL3-basic-EGFP-TK-hTRETp-CMV without GCV group, pGL3-basic-EGFP group and the blank control.

Conclusion Target-enhanced TK vector regulated by hTERT promoter and CMV enhancer can effectively kill 5-8 F cells of human nasopharyngeal carcinoma with good specificity, which indicates this target-enhanced TK gene vector may be useful in the strategy of target gene therapy of malignant tumours including nasopharyngeal carcinoma.

Key words: Enhanced TK gene vector; Nasopharyngeal neoplasm; Gene target therapy; Telomerase

肿瘤靶向基因治疗成为今后肿瘤基因治疗的方向,理想的靶向治疗载体应是靶向性好,且杀伤细胞作用强。笔者前期研究发现,采用针对端粒酶的 hTERT 启动子调控 TK 自杀基因的肿瘤特异表达体系(hTERT/TK/pGL3),能够在体内外特异性杀灭鼻咽癌细胞及其裸鼠移植瘤,而对正常对照细胞及裸鼠肝肾无明显损伤^[1,2]。在上述研究中发现,hTERT 启动子调控 TK 基因的靶向系统虽然杀肿瘤细胞的靶向性好,但细胞杀伤效应比对照组的无选择性的以巨细胞病毒原核启动子(CMV)调控 TK 基因的非靶向性载体细胞杀伤性要弱。为此,笔者对原有载体进行了改进,在不影响靶向性的前提下增加一个 CMV 增强子,连同一个 hTERT 启动子组成双调控机制共同调控 TK 基因,该新型靶向增强型载体带有绿色荧光报告基因 EGFP,即 pGL3-basic-EGFP-TK-hTRETp-CMV enhancer,TK 与 EGFP 为共表达。为探讨这种增强型靶向载体的作用效应,本研究以鼻咽癌细胞为主,对该增强型靶向载体杀灭肿瘤细胞的效应及其 TK 基因、端粒酶活性状态进行实验研究分析。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 增强型靶向载体及构建方法 以

pGL3-basic 空载体为模板,构建 pGL3-basic-EGFP-TK-hTRETp-CMV enhancer 质粒载体。具体方法如下:对 NCBI 上已经提交的 TK 基因序列(NCBI 登录号为 AY575228)进行分析,TK 基因可通过 Xho I 和 Hind III 酶切位点插入,同时在设计引物时去除终止子 TGA,使 TK 基因与 EGFP 基因融合。以 pGL3-basic 空载体为骨架,选择合适的酶切位点,分别连入 hTERT 基因的核心启动子区(278 bp)、TK 目的基因(1131 bp)及人 CMV 增强子(406 bp),同时为了检测方便可将 pGL3-basic 载体上的 luc 基因(荧光素酶)换成 EGFP 基因(增强型绿色荧光蛋白),从而获得 pGL3-basic-EGFP-TK-hTRETp-CMV enhancer 载体。

1.1.2 效应细胞 人鼻咽癌细胞 5-8 F、人乳腺癌细胞 MCF-7 及正常人血管内皮细胞 ECV 均由南方医科大学细胞生物学教研室惠赠。常规培养,生长状态良好。

1.1.3 主要试剂及仪器 ①试剂:胎牛血清购自杭州四季青公司;T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 Hind III 和 Xho I、PCR 试剂盒及荧光定量 PCR 试剂盒均购自大连宝生物工程有限公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自美国 Sigma 公司;GCV 购自 ROCH 公司;脂质体 Lip2000、DMR IE2C 及 RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司;端粒酶活性检测试剂盒购自南京凯基公司,质粒 DNA 中

量提取试剂盒购自合广东达生生物公司;克隆 TK 基因 PCR 引物由上海英俊生物技术有限公司合成。②仪器:CO₂ 细胞培养箱(美国 SHELL LAB 公司);低温高速台式离心机(美国 ICE 公司);T-Gradient Thermoblock PCR 仪(德国 Biometra 公司);Startfax 2100 酶标仪(美国);3900 台式高通量 DNA 合成仪、9700 PCR 仪、7500 全自动荧光定量 PCR 仪(均购自美国 ABI 公司)、HC-3018R 高速冷冻离心机(科大创新);紫外分光光度计(日本岛津公司),荧光显微镜为 NIKON ECLIPSE TE2000-U。

1.2 靶向载体的效应分析

1.2.1 TK 基因绿色荧光蛋白表达分析

将对数生长期的细胞 5-8F 及对照组细胞 MCF-7、ECV (1×10^6 /孔)接种到六孔细胞培养板中,每种细胞两孔,12 h 后(密度约为 80%)采用 Lip2000 分别转染 pGL3-basic-EGFP-TK-hTRETp-CMV enhancer 及 pGL3-basic-EGFP-TK-hTRETp 质粒,每孔的 DNA 用量(4 μ g)、细胞数(1×10^6 /孔)均保持一致。具体转染方法参照其说明书进行。转染 24 h 后,在荧光显微镜下观察 TK 基因绿色荧光蛋白量的表达差异。

1.2.2 荧光定量 PCR 检测转染 pGL3-basic-EGFP-TK-hTRETp-CMV enhancer、pGL3-basic-EGFP-TK-hTRETp 及 pGL3-basic-EGFP 后 TK 基因的 mRNA 的表达水平分析 5-8F 及 MCF-7 细胞经六孔板分别转染 pGL3-basic-EGFP-TK-hTRETp-CMV enhancer、pGL3-basic-EGFP-TK-hTRETp 及 pGL3-basic-EGFP 质粒(具体转染方法参照 Lip2000 说明书进行),48 h 后 Trizol 抽提总 RNA,取 4 μ l RNA 模板做逆转录反应,荧光定量 PCR 检测 TK 基因的存在和表达情况。所用上游引物:5'-AGC AAG AAG CCA CGG AAG TC-3',下游引物:5'-AGT TGC GTG GTG GTG GTT TT-3';H- β -actin 上游引物:5'-GCA TGG GTC AGA AGG ATT CCT-3',下游引物:5'-TCG TCC CAG TTG GTG ACG AT-3'。依据方法计算各组 A 值,并进行统计学检验。

1.2.3 5-8F 细胞端粒酶活性检测分析

将对数生长期的细胞 5-8F (1×10^6 /孔)接

种到六孔培养板中,12 h 后分别转染质粒 pGL3-basic-EGFP-TK-hTRETp-CMV enhancer 或加入 GCV,48 h 后对该肿瘤细胞(ECV 细胞做阴性对照)进行端粒酶检测。采用 Stretch PCR 法检测,具体操作参考其说明书。

1.2.4 效应细胞体外抑制(MTT)实验分析 将对数生长期细胞 5-8F 及 MCF-7 1×10^5 /孔接种到 96 孔细胞培养板中,每种细胞设置 6 个复孔,并设 4 个对照组及 1 个实验组进行实验,即空白对照组,细胞不做任何干预措施;空载体加 GCV 组;增强型载体组,不加 GCV;单启动子载体加 GCV 组及增强型载体加 GCV 组。转染 12 h 后,空载体加 GCV 组、单启动子载体加 GCV 组及增强型载体加 GCV 组中加入前体药物,预实验调整至最佳终浓度均为 10 μ g/ml,72 h 后进行 MTT 实验。细胞存活率=(实验孔 OD 值/对照孔 OD 值) $\times 100\%$,最终的实验结果以相对细胞存活率反映,即设定空白对照组的细胞存活率为 100%,得出其他组的相对存活率。采用 SPSS 统计分析软件进行数据分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计分析软件包进行数据处理,实验数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,显著性检验采用单因素方差分析及 q 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 增强型靶向载体构建、酶切及测序鉴定见图 1~3。

2.2 效应细胞转染增强型载体后荧光显微镜下观察 TK 基因绿色荧光蛋白表达

转染增强型 pGL3-basic-EGFP-TK-hTRETp-CMV enhance 质粒的 5-8F 细胞及 MCF-7 细胞均有很强的绿色荧光表达,转染单启动子 pGL3-basic-EGFP-TK-hTRETp 质粒的 5-8F 细胞也有较强绿色荧光,但其强度明显较前者弱,转染增强型 pGL3-basic-EGFP-TK-hTRETp-CMV enhance 质粒的 ECV 细胞几乎看不到荧光表达(图 4)。

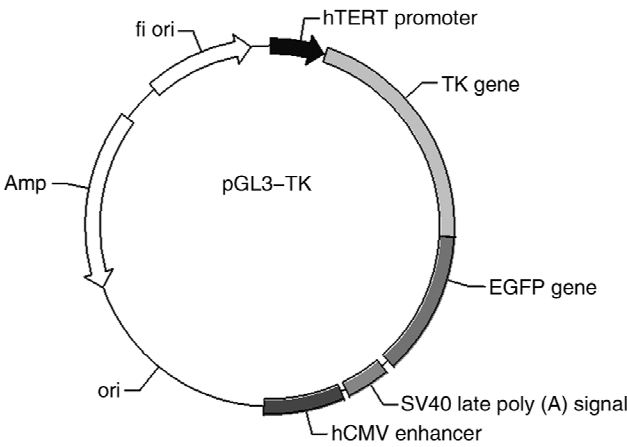


图 1 增强型载体构建模式图

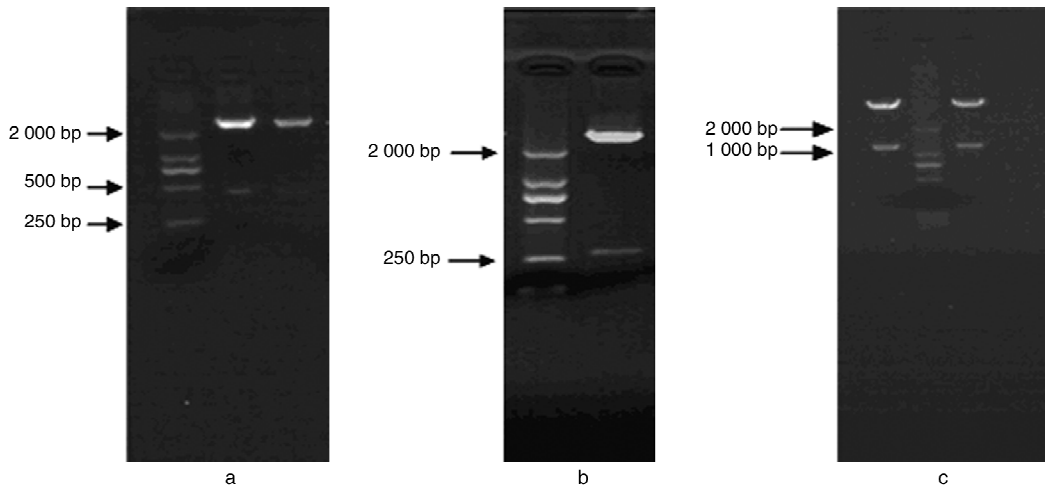


图 2 增强型载体酶切鉴定图 (a 为 CMV 酶切结果,大小约 400 bp;b 为 hTERTp 酶切结果,大小约为 260 bp;c 为 TK 酶切结果,大小约为 1130 bp,结果显示片段大小均与理论值一致)

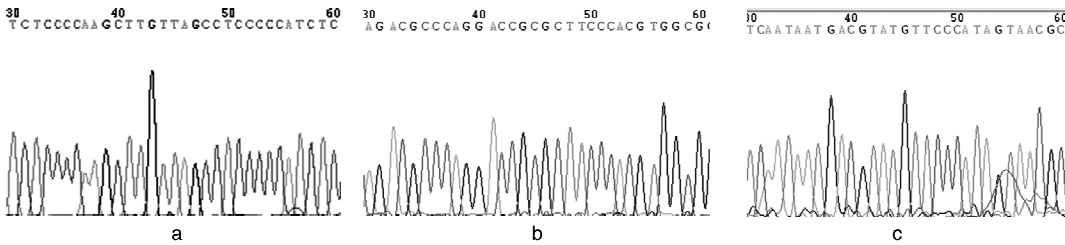


图 3 TK 基因、hTERTp 及 CMV 增强子测序结果 (a 为 TK 基因 30 ~ 60 bp;b 为 hTERT 基因 30 ~ 60 bp;c 为 CMV 基因 30 ~ 60 bp 测序结果)

2.3 荧光定量 PCR 检测转染后 TK 基因 mRNA 表达

质粒 pGL3-basic-EGFP-TK-hTRETp-CM-Venhance 转染 5-8 F 及 MCF-7 细胞和质粒

pGL3-basic-EGFP-TK-hTRETp 转染 5-8 F 细胞均有 TK 基因的表达,但前两者的 TK 基因 mRNA 表达强度均高于后者 ($P < 0.01$),质粒 pGL3-basic-EGFP 转染 5-8 F 细胞中无 TK

基因 mRNA 的表达;质粒 pGL3 -basic -EGFP - TK -hTRETp - CMVenhance 转染 ECV 细胞中 TK

基因 mRNA 有极弱的表达(图 5 ,表 1)。

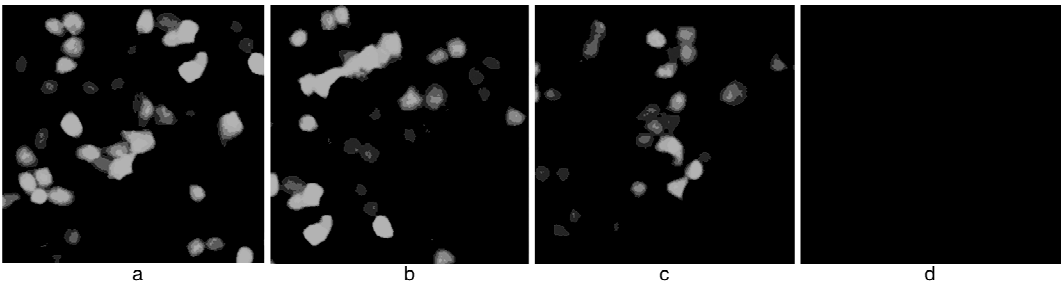


图 4 TK 基因绿色荧光蛋白表达(× 100)(a 为增强型载体转染 5-8F 细胞; b 为增强型载体转染转染 MCF-7 细胞; c 为单启动子转染 5-8F 细胞; d 为增强型载体转染 ECV 细胞)

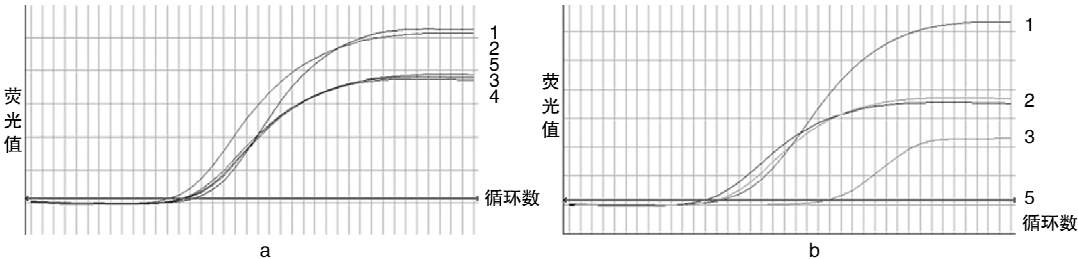


图 5 荧光定量 PCR 检测转染后 TK 基因 mRNA 表达(a 为 H-β-actin 样本扩增曲线图其中 1 :质粒 pGL3 -basic -EGFP -TK -hTRETp -CMV 转染 5-8 F 细胞; 2 :质粒 pGL3 -basic -EGFP -TK -hTRETp -CMV 转染 MCF-7 细胞; 3 :质粒 pGL3 -basic -EGFP -TK -hTRETp -CMV 转染 ECV 细胞; 4 :质粒 pGL3 -basic -EGFP 转染 5-8 F 细胞; 5 :质粒 pGL3 -basic -EGFP -TK -hTRETp 转染 5-8 F 细胞。 b 为 H-HER-TK 样本扩增曲线图其中 1 :质粒 pGL3 -basic -EGFP -TK -hTRETp -CMV 转染 5-8 F 细胞; 2 :质粒 pGL3 -basic -EGFP -TK -hTRETp -CMV 转染 MCF-7 细胞; 3 :质粒 pGL3 -basic -EGFP -TK -hTRETp 转染 5-8 F 细胞; 4 :质粒 pGL3 -basic -EGFP 转染 5-8 F 细胞(未见曲线); 5 :质粒 pGL3 -basic -EGFP -TK -hTRETp -CMV 转染 -ECV 细胞

表 1 H -β- actin 及 H -HER- TK 样本扩增数值结果及 A 值*

| Sample Name | Qty1 (β-actin) | Qty2 (TK) | A 值 (Qty2 / Qty1) |
|-------------|------------------|--------------|---------------------|
| 1 | 6. 67E + 07 | 2. 78E + 08 | A1 4. 16792 |
| 2 | 4. 50E + 07 | 1. 13E + 08 | A2 2. 51111 |
| 3 | 7. 76E + 07 | 2. 17E + 05 | A3 0. 00279639 |
| 4 | 8. 21E + 07 | Undetermined | A4 未见表达 |
| 5 | 1. 69E + 08 | 1. 39E + 08 | A5 0. 822485 |

注:样品 1、2、3、4、5 组分别对应图 5(a) 1、2、3、4、5 和表 1 中 A1、A2、A3、A4 及 A5。Sample Name 栏对应的是样本编号;数值表示意义:例 1. 00E + 06 表示 1. 00 × 10⁶,结果按表格中 Quantity 列下的数值(即拷贝数)分析,用 B 表示,即 B = 拷贝数/μl cDNA。考虑到各个样本总 RNA 浓度的差异,最终计算结果按下列公式换算:A = B₁(目的基因) ÷ B₂(内参基因),A 值才是统计时最终需要的数值。以上的数值和曲线图是三次实验的均数值。

2. 4 端粒酶活性检测结果

转染 pGL3 -basic -EGFP - TK -hTRETp - CMV

前后 5 - 8 F 细胞端粒酶均呈阳性 , 转染 pGL3 -basic -EGFP - TK -hTRETp - CMV 加 GCV

后 5 - 8 F 细胞端粒酶活性明显受抑制 (图 6)。

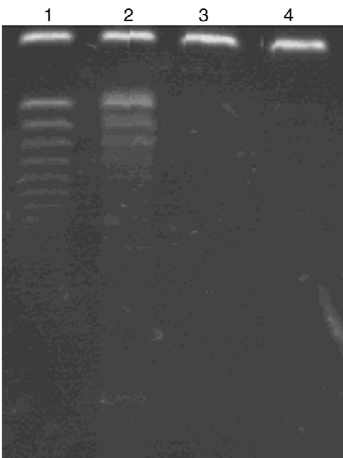


图 6 增强型载体转染鼻咽癌 5-8F 细胞及对照细胞前后端粒酶表达

1. 增强型载体 (无 GCV) 转染 5-8F 细胞; 2. 5-8F 细胞未转染组 (阳性对照); 3. CV 细胞组 (阴性对照); 4. 增强型载体 + GCV 转染 5-8F 细胞

2.5 增强型靶向载体体外杀灭鼻咽癌细胞作用效应

MTT 结果显示, 转染增强型载体后鼻咽癌 5-8F 细胞及乳腺癌 MCF-7 细胞生长明显被抑制, 相对细胞存活率分别为 37.0% 及 46.2%, 与转染单启动子载体组及其他载体对照组比较差异有统计学意义, 提示 hTERT 启动子及 CMV 增强子双调控机制介导 TK 基因/GCV 自杀基因系统, 具有明显的杀瘤效果 (表 2, 3)。

表 2 MTT 法检测增强型载体联合前体药物杀伤鼻咽癌 5 - 8F 细胞存活率 (× 100 %)

| 组别 | 生存率 |
|--------------------|---------------|
| 1. 空白对照组 | 1 |
| 2. 空载体 + GCV 组 | 0.984 ± 0.009 |
| 3. 增强型载体组 (不加 GCV) | 0.982 ± 0.010 |
| 4. 单启动子载体 + GCV 组 | 0.533 ± 0.020 |
| 5. 增强载体 + GCV 组 | 0.370 ± 0.024 |

注: 5 与 3 比较, $P = 0.001$; 4 和 5 同对照组 (1, 2, 4 组) 分别比较 P 均 = 0.000

表 3 MTT 法检测增强型载体联合前体药物杀伤乳腺癌 MCF - 7 细胞存活率 (× 100 %)

| 组别 | 生存率 |
|--------------------|---------------|
| 1. 空白对照组 | 1 |
| 2. 空载体 + GCV 组 | 0.987 ± 0.006 |
| 3. 增强型载体组 (不加 GCV) | 0.984 ± 0.011 |
| 4. 单启动子载体 + GCV 组 | 0.515 ± 0.025 |
| 5. 增强型载体 + GCV 组 | 0.462 ± 0.049 |

注: 5 与 3 比较, $P = 0.001$; 4 和 5 同对照组 (1, 2, 3 组) 分别比较 P 均 = 0.000

3 讨论

肿瘤的分子靶向治疗成为目前肿瘤治疗研究的一个方向, 曾经风靡一时的自杀基因 (TK 及 CD 基因) 因其杀伤细胞作用没有选择性, 使进一步应用受到限制。采用肿瘤特异性启动子调控自杀基因的分子靶向系统再次成为肿瘤治疗的有力武器。在众多的靶向表达载体中, 如何在不影响靶向性的前提下提高该靶向载体的杀伤效应成为探讨的一个课题。以往文献报道应用的一些单启动子靶向载体相对解决了对肿瘤的靶向性的问题, 但在杀伤肿瘤细胞效应方面还不尽如人意。Takeda 等^[3] 利用构建的 hTERT 启动子控制下的疱疹病毒 TK 基因肿瘤特异表达载体 (Ad hTERT/TK), 能特异性杀伤未分化甲状腺癌及移植瘤, 同时能增强 GCV 对该瘤的敏感性。通过裸鼠肝组织病理学及血清酶学检查发现, 肝脏及全身未发现有毒性反应, 而用作对照的巨细胞病毒立即早期启动子 (CMV) 调控下的 TK 基因表达载体, 不但能杀伤移植瘤, 同时造成明显的正常肝组织病理改变, 血清酶学检查发现肝功能受到损害。说明该肿瘤特异表达系统具有较高的特异杀伤肿瘤细胞的能力。此外, hTERTp 还能与包括 TK 基因在内的一些杀肿瘤因子构建成肿瘤特异表达载体, 特异性诱导肿瘤细胞凋亡。有研究^[4-8] 报道, 分别构建 hTERTp/TK、Caspase 8、TRAIL 及 Bax 肿瘤特异表达载体, 转导入肿瘤细胞后能特异性增强抗癌前体药物 GCV 对肿瘤细胞的敏感性, 并杀伤肿瘤细胞或诱导肿瘤细胞凋亡, 而对正常对照细胞无影响, 因而开拓了

靶向杀伤肿瘤细胞或定向诱导肿瘤细胞凋亡的新领域。以上单启动子介导的各种自杀基因或凋亡基因载体的杀伤肿瘤细胞的效应还需进一步提高。

为了增强靶向载体的杀肿瘤细胞效应,提高靶向治疗载体活性,有文献报道通过采用双自杀基因的方法或者双启动子或一个启动子加一个增强子或双增强子等方法来实现。Kong 等^[9]采用腺病毒介导的 TK/CD 双自杀基因能在体外有效杀灭乳腺癌细胞,能达到提高杀伤肿瘤细胞效果的作用。而 Huang 等^[10]证实,TK/CD 也有增强肿瘤放疗敏感性的作用。将自杀基因治疗与放疗结合,以提高杀瘤作用强度。Liao 等^[11]发现,hTERT 启动子结合放射治疗也能增强其基因治疗疗效。王氏^[12]探讨了采用 hTERT 启动子及 CMV 增强子双调控双自杀基因 TK 加 CD 对 5 种肿瘤细胞靶向杀伤作用效果的比较研究,结果显示在正常成纤维细胞中这些载体均不能有效表达,而在肿瘤细胞中 hTERT 启动子能介导基因表达,但效率不高,增强子能使基因表达增强 3 ~ 26 倍,特别是单独 CMV 增强子和 SV40 2 CMV 双增强子使荧光素酶表达提高 20 ~ 26 倍,是常用的 CMV 增强子/启动子的 2 ~ 7 倍,完整 CMV 增强子/启动子对 hTERT 启动子的活性影响因不同细胞而异。CMV 增强子不影响 hTERT 的靶向性。作者认为,增强子能显著增强 hTERT 启动子的转录活性,并对其肿瘤特异性无影响。CMV、增强子/hTERT 启动子是高效特异的通用调控元件,用于靶向性肿瘤基因治疗具有巨大潜力。文章还指出,hTERT/CMV 双启动子不能增加载体的活性,可能存在双启动子之间相互干扰而降低作用效应的问题。王氏^[13]对 HeLa 细胞的研究,结果显示增强子能使 hTERT 启动子活性提高 6 ~ 13 倍,其中 SV 40-CMV 双增强子/hTERT 启动子的活性最高,达到 CMV 增强子/启动子的近 3 倍;体外转染 pH r-SCT/CDTKG 后可检测到 CD/TK 的 mRNA 的表达;细胞上清中 5-FU 最高浓度为 50.83 $\mu\text{g}/\text{ml}$;当 5-FC 浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$,GCV 浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,HeLa 细胞的相对细胞存活率为 48.7%。文章最后认为,SV 40-

CMV 双增强子联合 hTERT 启动子能高效靶向调控 CD/TK 融合自杀基因杀伤宫颈癌细胞,因而是一种很有前景的基因治疗宫颈癌的策略。Song 等^[14]采用 hTERT 启动子及 SV40 增强子调控 TK 基因的 SB 系统能够选择性杀灭肝癌细胞,且 SV40 能够增强 TK 启动子的活性。我们尝试在原来已构建成功的 hTERT 单启动子和 TK 基因载体上增加一个 CMV 增强子,以达到在转录后水平增强 hTERT 启动子的活性及其下游 TK 基因活性的目的。

本实验在前期工作的基础上对表达载体进行了改良构建,成功构建的双调控机制介导 TK 基因的增强型表达载体,即分别连接上 hTERT 启动子和 CMV 增强子,这样可以大大提高该靶向载体的作用效应。通过对该增强型靶向载体的效应分析发现,该增强型表达载体转染鼻咽癌 5-8F 细胞及乳腺癌 MCF-7 细胞均有很强的荧光表达及 TK 基因的 mRNA 表达,单启动子 pGL3-basic-EGFP-TK-hTERTp 亦有较强的荧光表达,但比增强型表达载体要弱,而 ECV 细胞几乎没有绿色荧光。实时荧光定量 PCR 显示,增强型载体组 A 值较对照组明显增高,是单启动子组的 2 ~ 5 倍。加入 GCV 后,pGL3-basic-EGFP-TK-hTERTp-CMV enhancer 对鼻咽癌 5-8F 细胞及乳腺癌 MCF-7 细胞体外增值均有明显抑制作用,细胞相对存活率分别为 37.0% 和 46.2%,均强于单启动子组 pGL3-basic-EGFP-TK-hTERTp 及空载体组 pGL3-basic-EGFP3 及空白对照组,细胞相对存活率分别为 53.3%、51.5%、98.4%、98.7% 及 100% ($P = 0.000$),而 pGL3-basic-EGFP-TK-hTERTp-CMV enhancer 转染 ECV 细胞无明显抑制作用。以上说明在不影响载体靶向性的前提下,与单启动子载体比较,增强型 TK 载体杀伤肿瘤细胞的效应明显提高。

本实验构建的增强型靶向载体提高了杀肿瘤细胞效应,且在构建方法上连入 EGFP 荧光蛋白,在检测方法上同时引入荧光定量 PCR 方法,不但能够显示 TK 基因的表达,还能够进行定量分析,并采用乳腺癌、单启动子载体等做对照,使实验结果更具说

服力。此外,还分析了该增强型靶向载体在杀灭肿瘤细胞的同时,也能抑制肿瘤细胞的端粒酶活性。但载体作用效应的改进是不断完善提高的,相信今后还有更好的方法构建出更高效应的靶向治疗载体。

pGL3-basic-EGFP-TK-hTERTp-CMV 增强型靶向载体,对鼻咽癌及乳腺癌等端粒酶阳性的恶性肿瘤有明显的靶向杀灭作用,说明该增强型靶向载体有较广泛的抗肿瘤谱。在目前肿瘤分子靶向治疗研究中,pGL3-basic-EGFP-TK-hTERTp-CMV 增强型靶向治疗载体的成功构建及作用研究将为包括鼻咽癌在内的恶性肿瘤临床靶向基因治疗的应用打下良好的基础。

参考文献:

- [1] 牟少凤,文忠,郭梦和,等. hTERT 启动子调控 TK 基因靶向性杀伤鼻咽癌移植瘤的实验研究[J]. 解放军医学杂志,2009,2(34):155-158.
- [2] 徐芳,文忠,邱元正,等. hTERTp/TK 基因靶向性杀伤鼻咽癌细胞的实验研究[J]. 南方医科大学学报,2010,30(4):695-699.
- [3] Takeda T, Inaba H, Yamazaki M, et al. Tumor-specific gene therapy for undifferentiated thyroid carcinoma utilizing the telomerase reverse transcriptase promoter[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003,88(8):3531-3538.
- [4] Song JS, Kim HP, Yoon WS, et al. Adenovirus-mediated suicide gene therapy using the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter induced apoptosis of ovarian cancer cell line[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2003,67(11):2344-2350.
- [5] Gu J, Andreeff M, Roth JA, et al. hTERT promoter induces tumor-specific Bax gene expression and cell killing in syngenic mouse tumor model and prevents systemic toxicity[J]. Gene Ther, 2002,9(1):30-37.
- [6] Komata T, Kondo Y, Kanzawa T, et al. Caspase-8 gene therapy using the human telomerase reverse transcriptase promoter for malignant glioma cells[J]. Hum Gene Ther, 2002,13(9):1015-1025.
- [7] Bortolanza S, Qian C, Kramer KG, et al. An oncolytic adenovirus controlled by a modified telomerase promoter is attenuated in telomerase-negative cells, but shows reduced activity in cancer cells[J]. J Mol Med, 2005,83(9):736-747.
- [8] Jacob D, Davis J, Zhu H, et al. Suppressing orthotopic pancreatic tumor growth with a fiber modified adenovector expressing the TRAIL gene from the human telomerase reverse transcriptase promoter[J]. Clin Cancer Res, 2004,10(10):3535-3541.
- [9] Kong H, Huang ZH, Li Q, et al. Adenovirus-mediated double suicide gene selectively kills breast cancer MCF-7 cells in vitro[J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2008,28(6):907-910.
- [10] Huang SY, Zhang DS, Han JQ, et al. Radiosensitization and anti-tumour effects of cytosine deaminase and thymidine kinase fusion suicide gene in human adenoid cystic carcinoma cells[J]. J Int Med Res, 2009,37(2):479-490.
- [11] Liao ZK, Zhou FX, Luo ZG, et al. Radio-activation of hTERT promoter in larynx squamous carcinoma cells: an 'indirected-activator' strategy in radio-gene-therapy[J]. Oncol Rep, 2008,19(1):281-286.
- [12] 王丽娜,李卓,薛志刚,等. 用原核增强子提高 hTERT 启动子介导的基因表达[J]. 中华肿瘤防治杂志,2006,13(15):1125-1130.
- [13] 王丽娜,张雅坤,周银,等. 增强型自杀基因载体治疗宫颈癌的体外实验研究[J]. 中国医学工程,2006,14(6):567-575.
- [14] Song J, Kim C, Ochoa ER. Sleeping Beauty-mediated suicide gene therapy of hepatocellular carcinoma[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2009,73(1):165-168.

(修回日期:2010-05-17)