

建立稳定表达融合自杀基因 CD/UPRT. UL49 的 CNE-2 鼻咽癌细胞株*

卿菁^{1△} 赵素萍¹ 蒋卫红¹ 章华¹

[摘要] 目的:建立稳定表达融合自杀基因 CD/UPRT. UL49 的 CNE-2 鼻咽癌细胞株。方法:构建表达载体 pcDNA3.1(-)E6. BARF1p. CD/UPRT. UL49,经脂质体法转染 CNE-2 细胞,G418 和前体药物 5-氟胞嘧啶筛选出阳性克隆细胞并扩大培养。抽提阳性克隆细胞总蛋白质,Western-blotting 检测目的基因表达。结果:融合自杀基因 CD/UPRT. UL49 在 CNE-2 转染细胞内稳定表达。结论:本组通过脂质体转染技术,成功地建立了稳定表达融合 CD/UPRT. UL49 基因的 CNE-2 细胞株。

[关键词] 自杀基因;CD/UPRT. UL49;CNE-2 细胞;鼻咽肿瘤

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2014.03.010

[中图分类号] R739.63 **[文献标志码]** A

Construction of nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cell lines expressing stable fusion suicide gene CD/UPRT. UL49

QING Jing ZHAO Su ping JIANG Weihong ZHANG Hua

(Department of Otolaryngology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, 410008, China)

Corresponding author: QING Jing, E-mail: angelqingjing@hotmail.com

Abstract Objective: To construct nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cell lines expressing stable fusion suicide gene CD/UPRT. UL49. **Method:** The plasmids of pcDNA3.1(-)E6. BARF1p. CD/UPRT. UL49 was transfected into CNE-2 cells through lipofectamine, and the transfected CNE-2 cells were selected by G418 and prodrugs for getting the cells expressing fusion CD/UPRT. UL49 gene. The protein produced by the suicide gene was tested by Western-blotting in CNE-2 cells. **Result:** Suicide genes were expressed stably in CNE-2 cells. **Conclusion:** We constructed nasopharyngeal carcinoma cell lines CNE-2 expressing stable suicide gene through lipofectamin.

Key words suicide gene; CD/UPRT. UL49; CNE-2 cells; nasopharyngeal neoplasm

基因治疗很关键的一个问题是目的基因是否能在靶细胞内稳定表达并发挥治疗作用。间接体内疗法(ex vivo)需要将目的基因体外导入靶细胞,再将这种基因修饰过的细胞回输患者体内,使这种外源基因在体内表达,从而达到治疗目的。因此首先研究目的基因在靶细胞内的表达情况很重要。目的基因在靶细胞内表达分为瞬时表达和稳定表达两种,其中通过建立稳定表达目的基因的靶细胞系进行基因治疗的研究最为常见和重要。为此本研究将通过脂质体转染法将自杀基因导入鼻咽癌 CNE-2 细胞,通过 G418 和前体药物筛选出阳性克隆细胞扩大培养,应用 RT-PCR、Western-blotting 检测目的基因表达,建立稳定表达自杀基因的鼻咽癌 CNE-2 细胞系,为下一步进行体内鼻咽癌基因-放射治疗对鼻咽癌 CNE-2 细胞的杀伤作用奠

定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞和菌种:大肠杆菌 DH5 α 、鼻咽癌细胞系(CNE-2)由中南大学肿瘤研究所实验室保存。RPMI-1640 和 DMEM 细胞培养液购自 Gibco 公司,余培养试剂及 5-氟胞嘧啶(5-FC)、5-氟尿嘧啶(5-FU)均购自 Sigma 公司;Fugene 6 转染试剂盒购自罗氏公司;酶购自 TaKaRa 公司;质粒抽提、胶回收试剂盒和纯化试剂盒、逆转录试剂盒购自 Invitrogen 和 Promega 公司;脂质体 Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司;质粒大量抽提试剂盒购自 Qiagen 公司;测序材料及引物合成均由上海博尚公司完成。质粒:质粒表达载体 pcDNA3.1(-)E6. hTERTp. CD/UPRT. UL49 为胡璟博士构建。

1.2 方法

1.2.1 融合启动子的 PCR 引物设计 根据已知 E6 和 BARF1p 的全序列经 Primer Premier 5.0 软件分析设计引物, E6 上游引物: 5'-CGACGCG-

* 基金项目:国家自然科学基金(No:30672296)

¹ 中南大学湘雅医院耳鼻咽喉科(长沙,410008)

[△] 现在浙江省宁波市第一医院耳鼻咽喉科(浙江宁波, 315010)

通信作者:卿菁, E-mail: angelqingjing@hotmail.com

TACCCGGAAACGCCATATA-3'; E6 下游引物: 5'-CGACCACTACGACTACTGCCAAGTTCTG-C-3'; BARF1p 上游引物: 5'-GATCCCAGCGC-CAGA ACTTGGGAGGAG-3'; BARF1p 下游引物: 5'-CCGGAATTCTTATTCATTTACAAAG-AT-3'。分别用 PCR 方法扩增 E6 和 BARF1p, 然后通过重叠 PCR 方法使 E6 和 BARF1p 重叠, E6 下游 3'端的 20 个 bp 和 BARF1p 上游 5'端的 20 个 bp 形成 E6 下游和 BARF1p 上游互补的共同引物。

1.2.2 PCR 反应条件 E6 PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 40 s, 35 个循环, PCR 产物长度为 444 bp。BARF1p PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 40 s, 35 个循环, PCR 产物长度为 684 bp。25 μ l 反应体系: 3 μ l 模板 DNA、2 μ l dNTP (2.5 mmol/L)、2.5 μ l 10X 缓冲液、0.5 μ l E6 上游引物 (20 μ mmol/L)、0.5 μ l BARF1p 下游引物 (20 μ mmol/L)、0.2 μ l Phusion™ DNA Polymerase 聚合酶、16.3 μ l 无菌双蒸水。割胶回收目的基因片段进行纯化。送上海 Invitrogen 公司测序 (T7/SP6 正反向测序)。

1.2.3 表达质粒的构建 用 EcoRI 和 Mlu 内切酶酶切回收 E6. BARF1p 目的片段和质粒载体 pcDNA3.1(-)E6. hTERTp. CD/UPRT. UL49, 将酶切产物经 1g/L 凝胶电泳后再次切胶回收, 获得带有线性目的基因和载体后, 在 T4 DNA 连接酶作用下于 4℃ 连接过夜。将连接产物转化至感受态 DH5 α , 涂布含氨苄青霉素的 LB 培养液, 37℃ 培养过夜, 选取阳性克隆接种于 LB 液体培养液, 37℃ 培养过夜, 按照试剂盒, 利用 SPIN 法进行质粒抽提。

1.2.4 重组质粒酶切鉴定及测序 双酶切后, 电泳初步鉴定, 并选取初步鉴定正确的菌液送上海 Invitrogen 公司测序 (T7/SP6 正反向测序), 将测序结果通过 blast 比对, 完全正确的质粒命名为 pcDNA3.1(-)E6. BARF1p. CD/UPRT. UL49。取测序正常的菌液重新摇菌, 按照试剂盒, SPIN 法抽提质粒 DNA。

1.2.5 G418 筛选目的基因转染 CNE-2 细胞稳定株 人鼻咽癌细胞 CNE-2 在 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱用含 10% 小牛血清 RPMI1640 培养液正常培养, 2~3 d 传代 1 次, 待细胞状态较好时, 提前 2 d 将细胞以 1 \times 10⁵ 接种到 6 孔板中, 细胞在转染前 24 h 换液培养, 调整细胞密度使之在转染时达 70%~80% 的汇合度。进行 G418 正筛选转染细胞和 5-FC 负筛选转染细胞后, 将该组细胞扩大培养进行下一步的分子生物学实验鉴定。

1.2.6 Western-blotting 检测 CD/UPRT. UL49 融合蛋白 Western-blotting 鉴定 CD/UPRT. UL49 融合基因的表达, 并进行蛋白质的提取、定量蛋白质的提取, 完成蛋白质定量, 最终行 SDS-PAGE 电泳、转膜和封闭。检测到蛋白的细胞克隆继续扩大培养, 冻存一部分细胞待到下一步使用。

2 结果

2.1 融合启动子 E6. BARF1p 的测序结果

CCCAATATGGCCCTGCCGCTTCCGGCT-CTGGGAGGAGGGGCGAGCGGGGGTTGGGG-CGGGGCAAGCTGGGA ACTCCAGGCGCCT-GGCCCGGAGGCCACTGCTGCTGTTCCAAT-ACTAGGCTTTCAGGAGCCTGAGCGCTCGC-GATGCCGAGCGGGTTCGAGGGTGGAGGT-GCCCACCACTCTTGATGGGAGGGCTTCA-CGTC ACTCCGGGTCTCCCGGCCGGTCCCTT-CCATATTAGGGCTTCTGCTTCCCATATA-TGGCCATGTACGTCACGGCGGAGGCGGGC-CCGTGCTG

测序结果与设计序列 100% 吻合。测序图谱如图 1, 证实启动子融合成功。

2.2 融合基因序列 CD/UPRT. UL49 的测序结果

GCAATCATGGTGACAGGGGGAATGGC-AAGCAAGTGGGATCAGAAGGGTATGGAC-ATTGCCTATGAGGAGGCGGCCTTAGGTTA-CAAAGAGGGTGGTGTTCCTATTGGCGGAT-GTCTTATCAATAACAAAGACGGAAGTGT-CTCGGTCTGTTGTCACAACATGAGATTTCA-AAAGGGATCCGCCACACTACATGGTGAGA-TCTCCACTTTGGAAA ACTGTGGGAGATTA-GAGGGCAAAGTGTACAAAGATA CCACTTT-GTATACGACGCTGTCTCCATGCGACATGT-GTACAGGTGCCATCATCAT

测序结果与设计序列 100% 吻合。测序图谱如图 2, 证实携带目的基因的质粒 pcDNA3.1(-)E6. BARF1p. CD/UPRT. UL49 构建成功。

2.3 Western-blotting 结果

鉴定转染质粒载体 pcDNA3.1(-)E6. BARF1p. CD/UPRT. UL49 在 CNE-2 细胞中目的基因的表达。

转染 48 h 后, 裂解细胞收集蛋白, Western-blotting 证实, 各放射剂量组检测到 CD/UPRT. UL49 融合蛋白的表达, 与预期大小一致, 野生型 CNE-2 阴性对照组未扩增出特异性条带 (图 3)。

经过 0 Gy、2 Gy、4 Gy、6 Gy、10 Gy 剂量的照射后, 培养 48 h 所得的 Western-blotting 结果, 由结果看出, 随着照射剂量的增加该蛋白含量递增, 且在剂量由 2 Gy 升至 4 Gy 时, 蛋白含量增加较快, 可能与剂量依赖性激活有关。

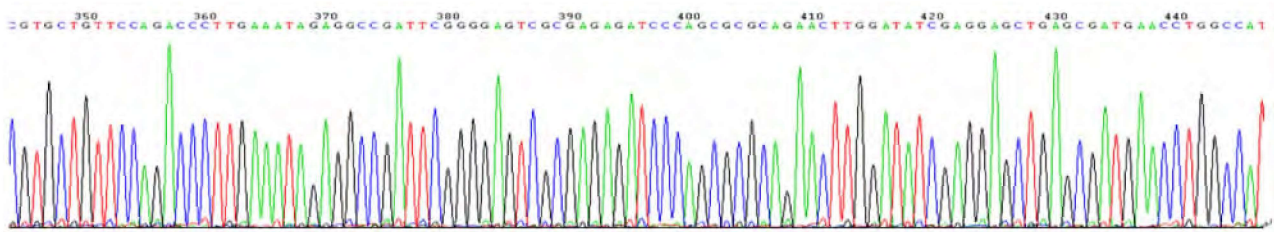


图 1 融合启动子 E6.BARF1p 的测序图谱

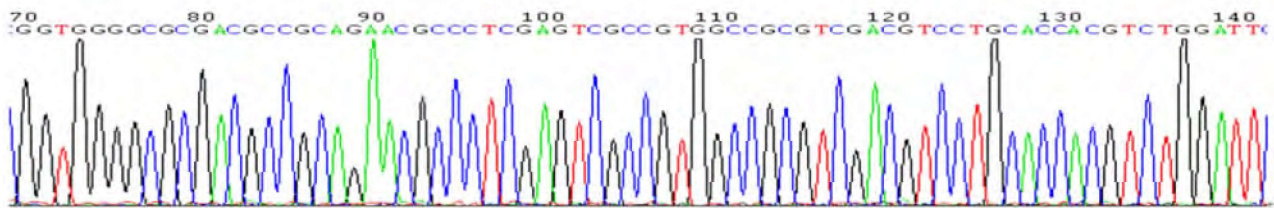


图 2 目的基因序列 CD/UPRT.UL49 的测序图谱

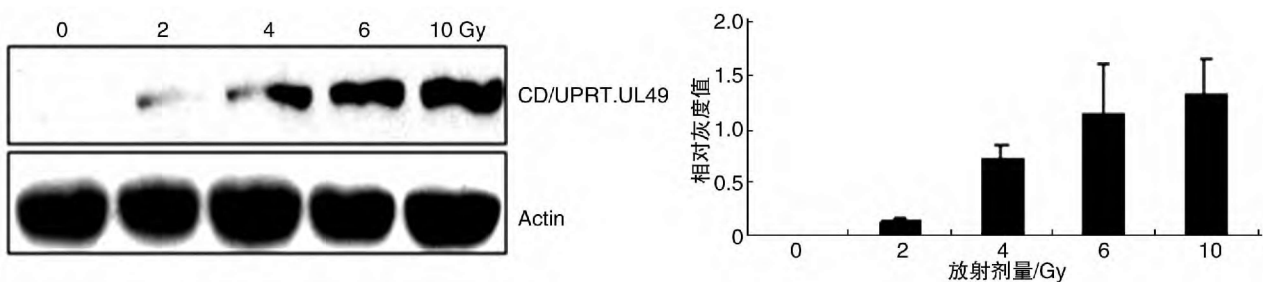


图 3 CNE-2 细胞中融合蛋白 CD/UPRT.UL49 的 Western-Blotting 图

3 讨论

将基因治疗与放射治疗结合,可以增加鼻咽癌的放射敏感性、提高放射疗效、降低放射线的使用剂量,尤以自杀基因 CD/UPRT 效果显著。胞嘧啶脱氨酶(cytosine deaminase,CD)将 5-FC 转化为有毒的 5-FU,随后形成 5'-氟尿苷酸(5'-fluoro uridine monophosphate,5-FuTP)或 5'-氟脱氧尿苷酸(5'-fluorodeoxyuridylate,5-FduTP),前者可以整合到 RNA,干扰 RNA 合成;后者抑制腺苷酸合成酶,干扰 DNA 的合成,导致细胞死亡^[1]。UPRT 基因的产物则能直接将 5-FU 转化为 5-FuMP,然后转化为 5-FduMP 和 5-FuTP,从而减少了多种竞争酶对 5-FU 的降解^[2]。基于尿嘧啶磷酸核糖基转移酶(uracil phosphoribosyltransferase, UPRT)能明显增强肿瘤细胞对 5-FU 的敏感性,CD 和 UPRT 共表达时则可能产生杀伤肿瘤细胞的协同效应。然而如能进一步提高肿瘤的瘤内转染效率,增加基因转染的靶向性,如 EB 病毒编码的潜伏膜蛋白-1 的调控序列来调节自杀基因的肿瘤特异性表达^[3-4],进行鼻咽癌放射-基因治疗,可望有更好的临床应

用前景。因此,深入探讨如何增强 CD/UPRT 基因对鼻咽癌细胞的靶向性杀伤有重要的研究意义和临床应用价值。

利用启动子预测软件预测 EBV 裂解期中的早期基因的启动子(BamH I A rightward open reading frame-1 promoter,BARF1p),并利用荧光素酶报告基因系统验证该启动子的活性及其在 NP69 细胞和 CNE-2 细胞中表达的差异,结果提示 BARF1p 具有启动子活性且具有肿瘤细胞相对特异性^[5],联合唐瑶云博士等人所发现的早期生长反应因子-1(Early growth response-1,Egr-1)即内含 6 个放射敏感片段 E6[E6 代表含 6 个放射诱导性的基因序列:CC(A+T)6GG],在放射以及缺氧情况下可以大幅度提高其启动效应^[6],本实验进一步构建融合启动子 E6.BARF1p,以提高自杀基因的靶向性的同时,用 I 型单纯疱疹病毒 UL49 基因编码的 VP22 蛋白提高细胞的转导率,VP22 具有转运蛋白质的结构基础是其特定的蛋白质转导结构域^[7](protein transduction domain,PTD),PTD 是富含碱性氨基酸的短肽,可以形成 α -螺旋是这些氨

基酸序列的特点,由于 α -螺旋一面是亲水残基,一面是疏水残基,所以此类结构使得含 PTD 的蛋白易于穿越细胞的膜组织。利用该 PTD 将与之结合的化合物、肽、反义肽核酸或与之融合表达的全长蛋白质通过非受体依赖方式运送至细胞内的一种技术称为蛋白转导技术^[8],最终进一步提高自杀基因 CD/UPRT 的表达强度,达到杀伤肿瘤细胞的目的。

本研究选择通过稳定转染建立携带 E6. BARF1p. CD/UPRT. UL49 自杀基因体系的 CNE-2 细胞株,为进行鼻咽癌的基因-放射治疗体外和体内实验奠定基础。

参考文献

- [1] SPANO J P, BUSSON P, ATLAN D, et al. Nasopharyngeal carcinomas: an update[J]. *Eur J Cancer*, 2003,39:2121-2135.
- [2] PAK M W, TO K F, LO Y M, et al. Nasopharyngeal carcinoma in situ (NPCIS)-pathologic and clinical perspectives[J]. *Head Neck*, 2002,24:989-995.
- [3] SANCHEZ-PEREZ L, KOTTKE T, DANIELS G A, et al. Killing of normal melanocytes, combined with heat shock protein 70 and CD40L expression, cures large established melanomas[J]. *J Immunol*, 2006,177:4168-4177.
- [4] BOSENBERG M, MUTHUSAMY V, CURLEY D P, et al. Characterization of melanocyte-specific inducible Cre recombinase transgenic mice[J]. *Genesis*, 2006,44:262-267.
- [5] 卿菁,赵素萍,蒋卫红,等. BARF1 基因的启动子活性及其在鼻咽癌细胞中肿瘤特异性分析研究[J]. *现代实用医学*, 2013, 25(5):492-494.
- [6] 唐瑶云,肖健云,赵素萍. 靶向性质粒表达载体 pcDNA3.1(-)CMV Egr-1. CDglyTK 的构建及转染研究[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2003, 9(1): 34-37.
- [7] BOENICKE L, CHU K, PAULS R, et al. Efficient dose-dependent and time-dependent protein transduction of pancreatic carcinoma cells in vitro and in vivo using purified VP22-EGFP fusion protein[J]. *J Mol Med(Berl)*, 2003,81:205-213.
- [8] XIONG F, XIAO S, YU M, et al. Enhanced effect of microdystrophin gene transfection by HSV-VP22 mediated intercellular protein transport[J]. *BMC Neurosci*, 2007,8:50-50.

(收稿日期:2013-03-26)

(上接第 177 页)

而处于 G₂/M 期的细胞下降。细胞凋亡率检测结果显示:5-FU、大蒜油、大蒜油+5-FU 均能诱导 ACC-M 细胞凋亡,5-FU 和大蒜油无明显差异,而大蒜油联合 5-FU 诱导作用明显增强,说明大蒜油+5-FU 可有效诱导 ACC-M 细胞的凋亡。

参考文献

- [1] 张志愿. 口腔颌面外科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社, 2012:369-370.
- [2] 谭向荣,葛明华. 头颈部腺样囊性癌的治疗进展[J]. *中国肿瘤*, 2011,20(11):847-849.
- [3] 王学辰. 腮腺腺样囊性癌的治疗进展[J]. *中国癌症杂志*, 2008,18(8):710-713.
- [4] 张翠丽,曾涛,赵秀兰,等. 大蒜油与顺铂对人卵巢癌 SKOV₃ 细胞生长抑制的联合作用[J]. *毒理学杂志*, 2010,24(2):116-119.
- [5] RAJPUT S, MANDAL M. Antitumor promoting potential of selected phytochemicals derived from spices: a review[J]. *Eur J Cancer Prev*, 2012,21:205-215.
- [6] ICIEK M, KWIECIEN I, WLODEK L. Biological properties of garlic and garlic-derived organosulfur compounds [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2009,50:247-265.
- [7] ZHANG W, HA M, GONG Y, et al. Allicin induces apoptosis in gastric cancer cells through activation of both extrinsic and intrinsic pathways[J]. *Oncol Rep*, 2010,24:1585-1592.
- [8] BAT-CHEN W, GOLAN T, PERI I, et al. Allicin purified from fresh garlic cloves induces apoptosis in colon cancer cells via Nrf2[J]. *Nutr Cancer*, 2010, 62: 947-957.
- [9] TSUBURA A, LAI Y C, KUWATA M, et al. Anti-cancer effects of garlic and garlic-derived compounds for breast cancer control[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2011,11:249-253.
- [10] PADILLA-CAMBEROS E, ZAITSEVA G, PADILLA C, et al. Antitumoral activity of allicin in murine lymphoma L5178Y[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2010, 11: 1241-1244.
- [11] 吴发印,陈琼,周鹤峰,等. 大蒜素对黏液表皮样癌细胞株抑制作用的研究[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2010,24(21):987-989.

(收稿日期:2013-03-20)