

# 两种启动子调控下PNP基因载体的构建和差异性表达

蔡晓坤, 林菊生, 刘址忠, 周鹤俊, 梁扩寰

蔡晓坤, 林菊生, 刘址忠, 周鹤俊, 梁扩寰, 华中科技大学附属同济医院  
消化内科肝病所 湖北省武汉市 430030

蔡晓坤, 男, 1973-11-09 生, 福建省惠安县人, 2002 年华中科技大学同济  
医学院博士生, 主要从事消化系统疾病的基因治疗研究。  
国家自然科学基金重点项目, No. 30330680

项目负责人: 林菊生, 430030, 湖北省武汉市解放大道 1095 号, 华中科技大  
学同济医学院附属同济医院肝病所。linjusheng2001@163.net

电话: 027-83662578 传真: 027-83662578

收稿日期: 2004-06-16 接受日期: 2004-07-15

## Construction of two vectors harboring PNP gene under control of two different promoters and their expression

Xiao-Kun Cai, Ju-Sheng Lin, Zhi-Zhong Liu, He-Jun Zhou,  
Kuo-Huan Liang

Xiao-Kun Cai, Ju-Sheng Lin, Zhi-Zhong Liu, He-Jun Zhou, Kuo-Huan  
Liang, Liver Disease Institute, Tongji Hospital, Tongji Medical College,  
Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei  
Province, China

Supported by Key Project of National Natural Science Foundation of  
China, No. 30330680

Correspondence to: Ju-Sheng Lin, Liver Disease Institute, Tongji Hospital,  
Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology,  
Wuhan 430030, Hubei Province, China. linjusheng2001@163.net

Received: 2004-06-16 Accepted: 2004-07-15

## Abstract

AIM: To construct two expression vectors carrying PNP gene under a cytomegalovirus (CMV) promoter and a hybrid  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) tissue-specific promoter, and to detect and analyze their expression in different cell lines.

METHODS: [HRE]AF promoter was inserted into pcDNA3.0 vector, and a recombinant vector controlled by the hybrid AFP promoter, p[HRE]AF, was constructed. Inserting PNP gene into pcDNA3.0 and p[HRE]AF vectors separately, two PNP gene expression vectors driven by two different promoters, pcDNA3.0/PNP and p[HRE]AF/PNP, were constructed by using recombinant DNA techniques. The recombinants were analyzed and identified by restriction enzymes, PCR and sequencing. pcDNA3.0/PNP and p[HRE]AF/PNP were transfected into human hepatocellular carcinoma cell lines by liposome-mediated method. The expression of PNP gene in four different cell lines was detected by RT-PCR method.

RESULTS: All target fragments were separately cloned into corresponding vectors. We detected the expression of PNP gene under the control of CMV promoter in all cell lines, and the tissue-specific expression of PNP gene under the control of [HRE]AF promoter in AFP positive and negative hepatocellular carcinoma cell line was positive.

CONCLUSION: Two expression vectors harboring PNP gene are novel effective vectors for human hepatocellular carcinoma gene therapy, and p[HRE]AF/PNP is a target-expressing vector in AFP positive, especially in AFP negative hepatocellular carcinoma cells.

cinoma gene therapy, and p[HRE]AF/PNP is a target-expressing vector in AFP positive, especially in AFP negative hepatocellular carcinoma cells.

Cai XK, Lin JS, Liu ZZ, Zhou HJ, Liang KH. Construction of two vectors harboring PNP gene under control of two different promoters and their expression. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(9):2036-2040

## 摘要

目的: 分别构建巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)通用启动子和甲胎蛋白( $\alpha$ -fetoprotein, AFP)杂合启动子[HRE]AF调控的PNP基因表达载体并检测、分析二者的差异表达。

方法: 将[HRE]AF启动子插入载体pcDNA3.0, 构建肝癌细胞特异表达载体p[HRE]AF; 将PNP基因分别插入pcDNA3.0和p[HRE]AF, 构建两种启动子调控的PNP基因表达载体pcDNA3.0/PNP和p[HRE]AF/PNP; 经酶切、PCR及测序鉴定各重组体。用脂质体介导法将两PNP基因载体转染不同细胞株, RT-PCR检测PNP基因在各细胞株中表达, 分析二者表达的特点。

结果: 各目的片段均成功插入相应载体中, CMV启动子调控的PNP基因在各株细胞中均实现了表达, 而[HRE]AF启动子调控的PNP基因则在AFP阳性和阴性肝癌细胞中实现了组织特异性表达。

结论: 两PNP基因表达载体是肝癌基因治疗中新型、高效的治疗载体, p[HRE]AF/PNP还实现了在AFP阳性, 尤其是AFP阴性肝癌细胞中的靶向性表达。

蔡晓坤, 林菊生, 刘址忠, 周鹤俊, 梁扩寰. 两种启动子调控下 PNP 基因载体的构建和差异性表达. *世界华人消化杂志* 2004;12(9):2036-2040

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2036.asp>

## 0 引言

PNP/Mep-dR 系统是一种新型的自杀基因/前药系统, 其旁观者效应是所有已知系统中最强大的<sup>[1-5]</sup>, 将其应用于肝癌基因治疗将有效克服传统自杀基因系统表达产物旁观者效应弱的难题。我们首先利用该系统构建了一个 PNP 基因真核表达载体 -pcDNA3.0/PNP。而如何实现自杀基因的在 AFP 阳性, 尤其是 AFP 阴性肝癌细胞中的靶向表达则是该研究需要解决的另一难题。AF0.3则是 AFP 特异启动子调控基因转录所必须的最短序列<sup>[6]</sup>。他和人血管内皮细胞生长因子启动子上游的增强子序列 - 缺氧反应元件(HRE)<sup>[7-12]</sup>融合而成的甲胎蛋白杂合

启动子[HRE]AF 调控的自杀基因能够实现在 AFP 阳性, 尤其是阴性肝癌组织中的靶向性表达. 因此, 我们尝试将[HRE]AF 与 PNP 基因结合, 构建含特异启动子[HRE]AF 的表达载体 p[HRE]AF 和该启动子调控的 PNP 基因表达载体 p[HRE]AF/PNP; 同时检测和分析了两个 PNP 基因载体在不同细胞中的差异性表达, 预测了他们在肝癌基因治疗中的应用前景, 国内尚未见类似报道.

## 1 材料和方法

1.1 材料 真核表达载体 pcDNA3.0 购自 Invitrogen 公司, 含[HRE]AF 启动子的逆转录病毒载体 pLN[HRE]AFTK 由日本 Kyoto 大学 Akio Ido 教授赠送, 携 PNP 基因质粒 pTyr-PNP-2 美国 Pittsburgh 大学 David Barlett 教授惠赠; 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株由本所保存; 人 AFP 阳性及阴性肝癌细胞株 HepG2 和 SMMC7721, 人纤维肉瘤细胞株 HT1080, 人宫颈癌细胞株 Hela 均购自中国典型培养物保藏中心(CCTCC). 实验中所用的各种限制性内切酶、T4DNA 连接酶、逆转录酶、高保真 Taq 酶、DNA 片段回收试剂盒以及质粒纯化试剂盒均购自 Takara 公司; G418、胎牛血清、DMEM 培养基购自 Gibco/BRL 公司, 总 RNA 提取试剂盒 Trizol、脂质体 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; 各对引物均按 Genebank 公布序列加以设计, 引物中含相应酶切位点, PNP 基因上游引物起始密码子前掺入 Kozak 规则(方框内)<sup>[13-19]</sup>. PNP 基因上游引物 5' -GTCCACGA AGCTTACCATGGCTACC CCACACATTA-3', 下游引物 5' -GTTGTGGATCCT CACTCTTTA TCGCCAGCAGAAC-3'. [HRE]AF 启动子片段上游引物 5' -GTATATATACGTAGAG CTCTG GGCAGCTGGCCTAC-3', 下游引物 5' -GTATGTGG GTACCTGTTATTGGCACTGGT GGAAGC-3'.

1.2 方法 感受态制备, 目的基因酶切、回收和连接, 重组体转化, 内切酶图谱分析, 均按分子克隆<sup>[20]</sup>所述进行.

1.2.1 含[HRE]AF 特异启动子表达载体的构建 将 pcDNA3.0 用 Bgl II 和 Hind III 酶切后回收约 4.6 kb 片段, 以 pLN[HRE]AFTK 为模板, 利用[HRE]AF 引物行 PCR 反应, 所获[HRE]AF 片段经 Bgl II 和 Hind III 酶切后回收 0.7 kb 片段, 按载体: 目的基因为 1:5 的比例混合, T4DNA 连接酶 16 °C 连接过夜, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 快提质粒作酶切和 PCR 鉴定, 筛选出正确插入了 [HRE]AF 启动子的重组载体 p[HRE]AF.

1.2.2 CMV 通用启动子调控下 PNP 基因表达载体的构建 以 pTyr-PNP-2 为模板, PNP 引物扩增 PNP 基因. PCR 产物经 EcoR I 和 Xho I 酶切后回收约 720 bp 的片段, 同样用 EcoR I 和 Xho I 酶切 pcDNA3.0, 回收 5.4 kb 片段, 连接、转化和鉴定方法同前, 筛选出正确插入了 PNP 基因的重组载体 pcDNA3.0/PNP.

1.2.3 [HRE]AF 启动子调控下 PNP 基因表达载体的构建 分别扩增含 pcDNA3.0/PNP 和 p[HRE]AF 的重组菌, 小

提两种质粒, 经 EcoR I 和 Xho I 酶切 pcDNA3.0/PNP 后回收约 720 bp 的片段, 同样用 EcoR I 和 Xho I 酶切 p[HRE]AF, 回收约 5.3 kb 的大片段, 以同样方法进行连接和转化, 筛选出正确插入 PNP 基因的表达载体 p[HRE]AF/PNP.

1.2.4 测序及序列分析 酶切及 PCR 鉴定正确的含 p[HRE]AF 和 pcDNA3.0/PNP 单菌落由上海申友生物技术公司测序, 然后用 Primer2.0 软件分析 GeneBank 报道序列与克隆序列的差异.

1.2.5 细胞培养及 DNA 转染 四株细胞均在含 50 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养, 并于 37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下生长. 用质粒纯化试剂盒提取 pcDNA3.0/PNP 和 p[HRE]AF/PNP 两种质粒, 二者的含量和纯度测定按分子克隆所述. DNA 转染: 各株细胞均以  $2 \times 10^5$  /孔接种于 24 孔板, 加入无抗生素培养液 500  $\mu$ L, 使转染时细胞达到 90% 融合. DNA 转染: 载体 1  $\mu$ g 稀释于无血清 DMEM 至终体积 50  $\mu$ L, 取 Lipofectamine 2000 2  $\mu$ L 稀释于无血清 DMEM 48  $\mu$ L, 轻轻振摇 5 min, 混合二者, 室温下静置 20 min. 无血清 DMEM 洗细胞 2 次, 加入不含血清 DMEM 0.4 mL, 按 100  $\mu$ L/孔逐滴加入复合物, 同时轻轻振摇培养板, 充分混匀液体. 37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>、饱和湿度下培养 6 h. 吸弃培养液, 无血清培养液洗涤一次. 每孔加入等体积 200 mL/L 胎牛血清的培养液, 继续培养至 48 h.

1.2.6 抗性克隆的筛选 48 h 后, 吸弃培养液, 各孔改用分别添加了各株细胞相应筛选浓度 G418 的常规培养液稀释细胞, 继续培养. 同时各细胞株设立未转染 DNA 的对照组. 各孔每隔 2-4 d 换液 / 次, 12-15 d 后, 各株细胞对照组陆续完全死亡. 收获各株细胞的抗性克隆, 传代培养.

1.2.7 RT-PCR 检测 PNP 基因在各株细胞中的表达 将各细胞株的 2 种抗性克隆分为正常和缺氧组<sup>[6]</sup>, 均按  $2 \times 10^5$  细胞 / 孔接种于 24 孔板, 每个克隆设 4 个复孔, 于含 G418 维持浓度的常规培养液中 37 °C, 50 mL/L 培养至细胞 80% 融合. 正常组继续在原有条件下培养, 缺氧组则移至 10 mL/L O<sub>2</sub>, 50 mL/L CO<sub>2</sub>, 940 mL/L N<sub>2</sub> 条件下培养. 24 h 后用 Trizol 抽提各孔细胞的总 RNA, 以 Oligo(dT) 为引物合成 cDNA. 然后以 cDNA 为模板, PNP 基因上下游引物行 PCR,  $\beta$ -actin 为内参, 上游引物 5' -TCCTCCCTGGAGAAGAGCTA-3', 下游引物 5' -AGTACTTGCCTCAGGAGGA-3'.

统计学处理 采用双样本假设 *t* 检验, 用 SAS6.12 for Windows 软件进行统计学分析. 结果显示: 在 pcDNA3.0/PNP 中, CMV 启动子调控下的 PNP 基因在四株细胞系中均顺利实现表达. 缺氧条件下, pcDNA3.0/PNP 中 PNP 基因的表达在各株细胞中较正常条件变化均不明显. p[HRE]AF/PNP 中的 PNP 基因则在 AFP 阳性(HepG2) 和阴性(SMMC7721) 肝癌细胞中都实现了靶向性表达, 在其他两株细胞中均未检测到 PNP 基因表达. 正常条件

下,[HRE]AF 仅调控 PNP 基因在两株肝癌细胞株中微弱表达,而在缺氧条件下,其调控的基因表达在 HepG2 和 SMMC7721 细胞中分别较正常条件提高了 3 倍 ( $P<0.01$ ) 和 7.4 倍 ( $P<0.01$ ),均接近于 CMV 启动子调控的基因表达水平(表 1, 图 10).

表 1 pcDNA3.0/PNP 和 p[HRE]AF/PNP 稳定转染细胞后 PNP mRNA 的 RT-PCR 半定量分析结果

细胞类型	随机单位(% , mean $\pm$ SD)			
	pcDNA3.0/PNP		p[HRE]AF/PNP	
	正常	缺氧	正常	缺氧
HepG2	208.13 $\pm$ 10.82	214.06 $\pm$ 11.50	50.43 $\pm$ 4.83	204.55 $\pm$ 6.00
SMMC7721	204.13 $\pm$ 8.73	210.38 $\pm$ 9.39	24.38 $\pm$ 3.98	202.88 $\pm$ 5.90
Hela	185.74 $\pm$ 13.68	190.27 $\pm$ 10.07	0	0
HT1080	184.62 $\pm$ 9.84	188.51 $\pm$ 10.54	0	0

7 6 5 4 3 2 1

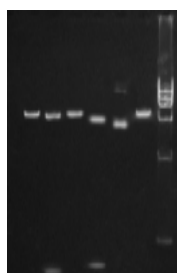


图 1 含[HRE]AF 启动子的表达载体 p[HRE]AF 酶切图谱. 1: DL15000 Marker; 2: pcDNA3.0 Nde I; 3: p[HRE]AF Nde I; 4: pcDNA3.0 Nde I / Hind III; 5: p[HRE]AF Nde I / Hind III; 6: pcDNA3.0 Nde I / Bgl II; 7: p[HRE]AF Nde I / Bgl II.

## 2 结果

2.1 重组载体的酶切鉴定 Nde I, Hind III, Bgl II 分别酶切 p[HRE]AF 和 pcDNA3.0, 产生的酶切片段(图 1), 说明[HRE]AF 片段已经正确插入 pcDNA3.0 中. Bgl II、Not I、Xho I 酶切 pcDNA3.0/PNP 和 pcDNA3.0, p[HRE]AF/PNP 和 p[HRE]AF(图 2、3), 表明 PNP 基因已经正确插入 pcDNA3.0 和 p[HRE]AF 中.

7 6 5 4 3 2 1

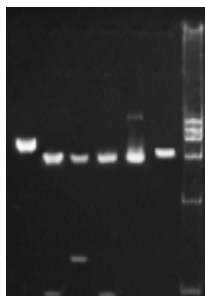


图 2 PNP 基因表达载体 pcDNA3.0/PNP 的酶切图谱. 1: DL15 000 Marker; 2: pcDNA3.0 Not I; 3: pcDNA3.0/PNP Not I; 4: pcDNA3.0 Bgl II / Xho I; 5: pcDNA3.0/PNP Bgl II / Xho I; 6: pcDNA3.0 Not I / Bgl II; 7: pcDNA3.0/PNP Not I / Bgl II.

2.2 重组载体的 PCR 鉴定 以 p[HRE]AF 为模板,[HRE]

AF 引物行 PCR, 扩增[HRE]AF 片段, 条件同前; 以 pcDNA3.0/PNP 和 p[HRE]AF/PNP 为模板, PNP 引物行 PCR, 扩增 PNP 基因, 条件同前; 图 4、5 说明各片段均已正确插入载体中.

7 6 5 4 3 2 1

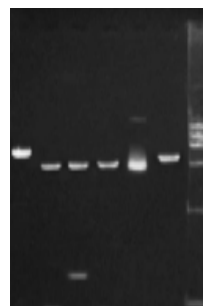


图 3 PNP 基因表达载体 p[HRE]AF /PNP 的酶切图谱. 1: DL15 000 Marker; 2: p[HRE]AF Not I; 3: p[HRE]AF /PNP Not I; 4: p[HRE]AF Bgl II / Xho I; 5: p[HRE]AF /PNP Bgl II / Xho I; 6: p[HRE]AF Not I / Bgl II; 7: p[HRE]AF /PNP Not I / Bgl II.

1 2 3

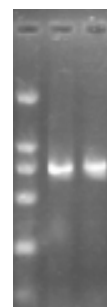


图 4 [HRE]AF 片段的 PCR 鉴定. 1: DL2 000; Marker; 2: 阳性对照; 3: p[HRE]AF.

1 2 3 4

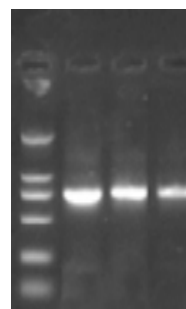


图 5 两个重组载体中 PNP 基因的 PCR 鉴定. 1: DL2 000 Marker; 2: 阳性对照; 3: pcDNA3.0/PNP; 4: p[HRE]AF/PNP.

2.3 重组载体的测序鉴定 经双向测序表明, 各重组体中都插入了相应的目的片段, pcDNA3.0/PNP 中所克隆的 PNP 基因 *EcoR* I 位点和起始密码子间掺入了 Kozak 规则. Primer2.0 软件分析报道序列与克隆序列的差异: PNP 基因 DNA 序列 663 位的碱基 C 突变为 A. 在 PNP 基因全长序列中无终止密码子出现, 可以翻译成为连续的氨基酸, 基因可以表达. 而[HRE]AF 片段的序列与 GeneBank 报道一致.

2.4 各株细胞中 PNP 基因的表达 RT-PCR 的产物各取 3  $\mu$ L 行 20g/L 琼脂糖凝胶电泳(图 6-9). 应用 UVP 凝胶图像扫描系统对 PNP 基因及  $\beta$ -actin 条带进行灰度扫描并计算二者的比值(表 1, 图 10)以随机单位 =  $A_{\text{pnp}}/A_{\beta\text{-actin}} \times 100\%$  表示.

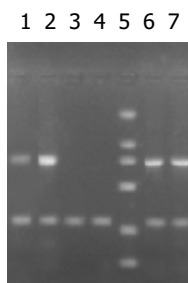


图 6 两个重组载体中 PNP 基因在 HepG2 细胞株的表达. 1: p[HRE]AF /PNP 正常; 2: p[HRE]AF /PNP 缺氧; 3: 阴性对照正常; 4: 阴性对照缺氧; 5: DL2 000 Marker; 6: pcDNA3.0/PNP 正常; 7: pcDNA3.0/PNP 缺氧.

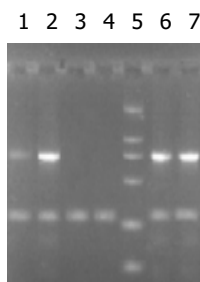


图 7 两个重组载体中 PNP 基因在 SMMC7721 细胞株的表达. 1: p[HRE]AF /PNP 正常; 2: p[HRE]AF /PNP 缺氧; 3: 阴性对照正常; 4: 阴性对照缺氧; 5: DL2 000 Marker; 6: pcDNA3.0/PNP 正常; 7: pcDNA3.0/PNP 缺氧.

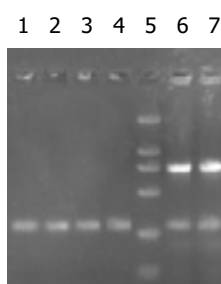


图 8 两个重组载体中 PNP 基因在 Hela 细胞株的表达. 1: p[HRE]AF /PNP 正常; 2: p[HRE]AF /PNP 缺氧; 3: 阴性对照正常; 4: 阴性对照缺氧; 5: DL2000 Marker; 6: pcDNA3.0/PNP 正常; 7: pcDNA3.0/PNP 缺氧.

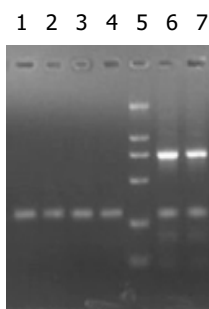


图 9 两个重组载体中 PNP 基因在 HT1080 细胞株的表达. 1: p[HRE]AF /PNP 正常; 2: p[HRE]AF /PNP 缺氧; 3: 阴性对照正常; 4: 阴性对照缺氧; 5: DL2000 Marker; 6: pcDNA3.0/PNP 正常; 7: pcDNA3.0/PNP 缺氧.

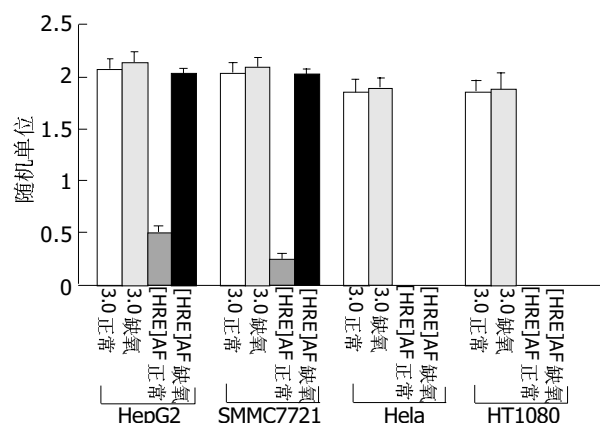


图 10 两重组载体稳定转染后 PNP 基因 mRNA RT-PCR 半定量分析示意图.

### 3 讨论

在我国, 肝癌是一种高发的恶性肿瘤<sup>[21-23]</sup>, 现有治疗技术对其难以取得理想疗效, 因而基因治疗作为治疗肝癌的新手段成为人们的研究热点. 自杀基因疗法是肿瘤基因治疗的重要途径之一<sup>[24-27]</sup>. 运用该疗法治疗肝癌时, 旁观者效应的强弱是决定其疗效的一个关键性因素. 目前应用最为广的自杀基因系统是单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-tk)基因/GCV 系统和大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶(CD)基因/5-FC 系统, 治疗肝癌已取得了一定的进展. 但两系统共同缺陷就在于旁观者效应较弱, 对周围未转染的肿瘤细胞不能产生广泛的旁杀伤, 使大多数瘤细胞得以存活, 疗效有限. 因此, 我们采用了一种新型的自杀基因系统 - PNP/Mep-dR 系统, 他是目前已知的旁观者效应最为强大的自杀基因 / 前药系统, 首先构建了通用启动子 CMV 调控的 PNP 基因表达载体 - pcDNA3.0/PNP. 肝癌自杀基因疗法有待突破的另一难点是实现自杀基因在肝癌组织, 尤其是 AFP 阴性肝癌组织中的靶向性表达. 通用启动子调控的自杀基因在杀伤肝癌细胞的同时也会杀伤转染了该基因的正常肝细胞, 副作用较大. 而传统 AFP 启动子调控的自杀基因对 AFP 阳性肝癌细胞有较好杀伤效果, 但对 AFP 阴性肝癌细胞则缺乏疗效. 为此, 我们又构建了 HRE 增强子<sup>[7-12]</sup>和 AFO.3 片段融合而成甲胎蛋白杂合启动子[HRE]AF 调控下的 PNP 基因表达载体 - p[HRE]AF/PNP, 并比较了他与 pcDNA3.0/PNP 在四细胞株中的差异性表达. 从基因转染后各细胞株中目的基因表达情况看(图 6-10): 在 CMV 调控下, PNP 基因在四细胞株中均可表达. 如将其应用于肝癌的治疗, 杀伤作用是非特异的, 在杀伤癌细胞的同时, 还可能会累及周围正常组织. 而[HRE]AF 调控的 PNP 基因则在 AFP 阳性和阴性肝癌细胞中都实现了特异性表达, 在其他细胞中则未检测到表达, 提示 [HRE]AF 仅在肝癌细胞中具转录活性. 因此, p[HRE]AF/PNP 的将实现对不同类型肝癌细胞的杀伤, 大大拓展了 AFP 启动子应用于肝癌靶向性基因治疗的范围.

肝癌在体内生长时, 血管生成速度不及癌细胞生

长速度,癌细胞长期处于缺氧状态.在本实验中,我们将一组细胞置于缺氧( $O_2$  10 mL/L)条件培养,以模拟肝癌在体内实际生长状况并观察两载体在缺氧条件下的转录活性变化<sup>[6]</sup>.结果表明,CMV对缺氧状态不敏感,而[HRE]AF转录活性在缺氧条件下却显著提高,这一点在AFP阴性肝癌细胞中尤为明显.这可能是由于HRE的活性在缺氧条件下显著提高<sup>[7-12]</sup>,而AFP启动子的转录活性又主要取决于其5'增强子的活性<sup>[6]</sup>.在缺氧条件下,HRE活性大为提高,激活下游AFP启动子.因此,在缺氧条件下,[HRE]AF调控的自杀基因能够在两种肝癌细胞中靶向、高效表达<sup>[6]</sup>,这一特性在[HRE]AF启动子应用于肝癌的体内治疗时将尤其有意义.

为避免PCR过程中出现突变,我们采用了高保真Taq酶,结果令人满意:克隆的PNP基因中虽有一个位点发生突变,但他位于密码子第三位碱基,对氨基酸的翻译无影响,二者均为苏氨酸;克隆的[HRE]AF片段与文献报道序列一致.

在利用自杀基因治疗肿瘤时,自杀基因的高表达对于疗效的提高同样至关重要.为此,我们在克隆的PNP基因的起始密码子之前掺入了Kozak规则,他能在翻译水平调控基因表达,使目的基因在真核细胞中的表达显著提高<sup>[13-19]</sup>.CMV是目前最强的启动子,而[HRE]AF在常规条件下虽然较CMV启动子为弱,但在缺氧条件下,其转录活性将显著提高.同时,考虑到PNP/Mep-dR系统本身的强大的杀伤效应及Kozak序列对基因表达的显著促进作用,将有效保证pcDNA3.0/PNP和p[HRE]AF/PNP的杀伤效能.总之,本研究初步建立了两个新型PNP自杀基因载体,为进一步拓宽AFP启动子和PNP/Mep-dR系统在肝癌的靶向性基因治疗中的应用范围打下了坚实的基础.

#### 4 参考文献

- Deharvengt S, Wack S, Uhring M, Aprahamian M, Hajri A. Suicide gene/prodrug therapy for pancreatic adenocarcinoma by E. coli purine nucleoside phosphorylase and 6-methylpurine 2'-deoxyriboside. *Pancreas* 2004;28:E54-64
- Gadi VK, Alexander SD, Waud WR, Allan PW, Parker WB, Sorscher EJ. A long-acting suicide gene toxin, 6-methylpurine, inhibits slow growing tumors after a single administration. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304:1280-1284
- McCart JA, Wang ZH, Xu H, Hu Y, Park B, Alexander HR, Bartlett DL. Development of a melanoma-specific adenovirus. *Mol Ther* 2002;6:471-480
- Krohne TU, Shankara S, Geissler M, Roberts BL, Wands JR, Blum HE, Mohr L. Mechanisms of cell death induced by suicide genes encoding purine nucleoside phosphorylase and thymidine kinase in human hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Hepatology* 2001;34:511-518
- Gadi VK, Alexander SD, Kudlow JE, Allan P, Parker WB, Sorscher EJ. In vivo sensitization of ovarian tumors to chemotherapy by expression of E. coli purine nucleoside phosphorylase in a small fraction of cells. *Gene Ther* 2000;7:1738-1743
- Ido A, Uto H, Moriuchi A, Nagata K, Onaga Y, Onaga M, Hori T, Hirano S, Hayashi K, Tamaoki T, Tsubouchi H. Gene therapy targeting for hepatocellular carcinoma: selective and enhanced suicide gene expression regulated by a hypoxia-inducible enhancer linked to a human alpha-fetoprotein promoter. *Cancer Res* 2001;61:3016-3021
- Wakisaka N, Kondo S, Yoshizaki T, Muroso S, Furukawa M, Pagano JS. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces synthesis of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Mol Cell Biol* 2004;24:5223-5234
- Yang L, Cao Z, Li F, Post DE, Van Meir EG, Zhong H, Wood WC. Tumor-specific gene expression using the survivin promoter is further increased by hypoxia. *Gene Ther* 2004;11:1215-1223
- Roth U, Jungermann K, Kietzmann T. Modulation of glucokinase expression by hypoxia-inducible factor 1 and upstream stimulatory factor 2 in primary rat hepatocytes. *Biol Chem* 2004;385:239-2347
- Goyal P, Weissmann N, Grimminger F, Hegel C, Bader L, Rose F, Fink L, Ghofrani HA, Schermuly RT, Schmidt HH, Seeger W, Hanze J. Upregulation of NAD(P)H oxidase 1 in hypoxia activates hypoxia-inducible factor 1 via increase in reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2004;36:1279-1288
- Lee MJ, Kim JY, Suk K, Park JH. Identification of the hypoxia-inducible factor 1 alpha-responsive HGTD-P gene as a mediator in the mitochondrial apoptotic pathway. *Mol Cell Biol* 2004;24:3918-3927
- Takahashi R, Kobayashi C, Kondo Y, Nakatani Y, Kudo I, Kunitomo M, Imura N, Hara S. Subcellular localization and regulation of hypoxia-inducible factor-2alpha in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;317:84-91
- Qin S, Tang H, Zhao LS, He F, Lin Y, Liu L, He XM. Cloning of HBsAg-encoded genes in different vectors and their expression in eukaryotic cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:1111-1113
- Houston FA, Wilson V, Jennings CE, Owen CJ, Donaldson P, Perros P, Pearce SH. Role of the CD40 locus in Graves' disease. *Thyroid* 2004;14:506-509
- Ozelo MC, Origa AF, Aranha FJ, Mansur AP, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF, Pollak ES, Arruda VR. Platelet glycoprotein Ibalph polymorphisms modulate the risk for myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2004;92:384-386
- FitzGerald PC, Shlyakhtenko A, Mir AA, Vinson C. Clustering of DNA sequences in human promoters. *Genome Res* 2004;14:1562-1574
- Yang L, Chen J, Chang CC, Yang XY, Wang ZZ, Chang TY, Li BL. A stable upstream stem-loop structure enhances selection of the first 5'-ORF-AUG as a main start codon for translation initiation of human ACAT1 mRNA. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2004;36:259-268
- Takeda M, Obayashi K, Kobayashi A, Maeda M. A unique role of an amino terminal 16-residue region of long-type GATA-6. *J Biochem (Tokyo)* 2004;135:639-650
- Nakajima Y, Kimura T, Suzuki C, Ohmiya Y. Improved expression of novel red- and green-emitting luciferases of Phrixothrix railroad worms in mammalian cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004;68:948-951
- Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. Molecular cloning A laboratory Manual 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000:1-40
- 李明松, 袁爱力, 张万岱, 刘思德, 吕爱民, 周殿元. 树突状细胞体外诱导抗肝癌免疫. *世界华人消化杂志* 1999;7:139-140
- 李谨革, 周永兴, 连建奇, 贾战生, 冯志华. 核酶对人HCC细胞内HBcAg的抑制作用. *世界华人消化杂志* 1999;7:73-75
- 靳雪源, 张玲霞, 楼敏, 谢建芳. 肝靶向基因给药系统AsOR-PL+PEG-PEI的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:364-367
- Wang J, Lu XX, Chen DZ, Li SF, Zhang LS. Herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir suicide gene therapy for human pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:400-403
- Zhang JH, Wan MX, Yuan JY, Pan BR. Construction and identification of recombinant vectors carrying herpes simplexvirus thymidine kinase and cytokine genes expressed in gastric carcinoma cell line SGC7901. *World J Gastroenterol* 2004;10:26-30
- Shi ZX, Wang HL, Hu K, Feng EL, Yao X, Su GF, Huang PT, Huang LY. Identification of alkA gene related to virulence of Shigella flexneri 2a by mutational analysis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2720-2725
- Kan QC, Yu ZJ, Lei YC, Hao LJ, Yang DL. Lethiferous effects of a recombinant vector carrying thymidine kinase suicide gene on 2.2.15 cells via a self-modulating mechanism. *World J Gastroenterol* 2003;9:2216-2220