

文章编号 1006-8147(2017)01-0028-04

论 著

MDR1 启动子的活性研究

刘蕊

(天津医科大学第二医院药剂科, 天津 300211)

摘要 目的:克隆编码多药耐药基因-1(MDR1)中不同长度的启动子片段并探讨和比较其在乳腺癌细胞中的转录活性。方法:利用PCR扩增技术以MCF-7/ADR细胞基因组为模板克隆3种不同长度的启动子片段。pGL3-basic的启动区域中,构建一系列报告基因载体pGL3-MDR1Pn。以pGL3-control为阳性对照,分别将含不同长度的MDR1启动子的报告基因载体pGL3-MDR1Pn与pRL-TK以一定比例共转染到敏感的MCF-7细胞和耐阿霉素的MCF-7/ADR细胞,通过分析表达的荧光素酶的活性比较不同长度的启动子片段在这两种细胞中的转录活性。结果:酶切鉴定和测序验证了已将不同长度的MDR1启动子片段成功插入到荧光素酶报告基因载体pGL3-basic中,且克隆的片段中没有出现碱基突变。将表达载体转染细胞后活性检测结果显示,pGL3-MDR1P1、pGL3-MDR1P2和pGL3-MDR1P3在MCF-7中活性分别为阳性对照的 $(13.03\pm2.35)\%$ 、 $(14.60\pm3.57)\%$ 和 $(10.27\pm1.89)\%$;而在MCF-7/ADR中活性分别为阳性对照的 $(105.26\pm6.84)\%$ 、 $(59.08\pm4.95)\%$ 和 $(62.39\pm5.76)\%$ 。结论:成功克隆了MDR1启动子片段,并成功构建了荧光素酶报告基因载体pGL3-MDR1P。启动子的活性分析结果初步表明长度约为2 000 bp的MDR1P1在MCF-7/ADR中具有相对较高的特异性。

关键词 多药耐药基因-1;启动子;荧光素酶报告基因;活性鉴定

中图分类号 R965

文献标志码 A

Research on the activity of MDR1 promoter

LIU Rui

(Department of Pharmacy, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

Abstract **Objective:** To clone different lengths of promoter from multi-drug resistance gene 1 and analyze its activities in MCF-7 cells or MCF-7/ADR cells. **Methods:** According to a review about the transcriptional regulation to human multi-drug resistance gene 1, three fragments of MDR1 promoter from MCF-7/ADR cell were amplified by PCR, and then they were inserted into pGL3-basic, a luciferase reporter gene vector, to construct pGL3-MDR1Pn which were directed by MDR1 promoter. The different lengths of MDR1 promoter reporter gene vector pGL3-MDR1Pn and pRL-TK were co-transfected into MCF-7 cells or MCF-7/ADR cells in a certain proportion, where pGL3-control was a positive control. The transcriptional activity of MDR1 promoter at three different lengths in the two kinds of cells were compared by the luciferase activity. **Results:** The constructions of pGL3-MDR1Pn were determined by DNA sequencing. Compared with the positive control, the activities of pGL3-MDR1P1, pGL3-MDR1P2 and pGL3-MDR1P3 in MCF-7 were $(13.03\pm2.35)\%$, $(14.60\pm3.57)\%$ and $(10.27\pm1.89)\%$, respectively. But their activities in MCF-7/ADR were $(105.26\pm6.84)\%$, $(59.08\pm4.95)\%$ and $(62.39\pm5.76)\%$, respectively. **Conclusion:** The MDR1 promoter is cloned successfully and the luciferase reporter gene vectors pGL3-MDR1P are successfully constructed. These results show that MDR1P1 with 2 000 bp may have higher specificity in MCF-7/ADR cells than that in MCF-7 cells.

Key words MDR1; promoter; luciferase reporter gene; detection of activity

近些年来恶性肿瘤的发病率呈现逐年上升趋势,死亡率仅次于心脑血管疾病。化学药物治疗是恶性肿瘤综合疗法的方法之一。然而在恶性肿瘤的医治过程中产生的多药耐药(multidrug resistance, MDR)现象是导致化疗失败的主要原因之一。多药耐药是指肿瘤对一种抗肿瘤药物出现耐药的同时,会对其他许多结构不同、作用机制不同的抗肿瘤药物也产生交叉耐药现象^[1]。肿瘤多药耐药产生的机制多样,其中最重要的机制之一是由P-糖蛋白(P-

glycoprotein, P-gp)介导的。P-gp是一个ATP依赖性的药物外排泵,能利用ATP水解释放的能量主动将亲脂性化疗药物转运至细胞外,使得细胞内药物浓度低于有效浓度,从而致使肿瘤细胞产生多药耐药现象^[2]。而P-gp这种跨膜糖蛋白正是多药耐药基因1(MDR1)所编码的产物。文献报道P-gp的表达高低与乳腺肿瘤化疗后的耐药性呈一定的正相关性^[3],而一种蛋白的表达高低主要是由其相应启动子的转录活性决定的。P-gp的过量表达与MDR1基因启动子的活性上调有关,因此利用肿瘤耐药细胞中MDR1启动子异常的激活特性,可以实现对肿瘤

作者简介 刘蕊(1989-),女,药师,学士,研究方向:临床药学;
E-mail:Li35227007@163.com。

耐药细胞的靶向基因治疗。王向玲等^[4]构建的MDR1启动子驱动的CD-TK双自杀基因载体对多药耐药白血病细胞具有靶向杀伤作用。而王波等^[5]对其建立的MDR1启动子调控的CD-TK双自杀基因系统在胶质瘤耐药细胞中的研究表明这种特异性启动子调控的自杀基因治疗能够进行选择性特异性杀伤。目前大多文献报道有关MDR1启动子的活性研究中,克隆的启动子片段长度范围大部分是在-198~+43(241bp)。本研究根据文献^[6]克隆了3个不同长度的MDR1启动子片段,其中包括大多文献报道的长度为241bp的MDR1启动子片段。通过研究比较它们的活性,以寻找活性更好或更具靶向性的MDR1启动子片段,为靶向性治疗耐药肿瘤提供一定的实验基础。

1 材料与方法

1.1 载体与感受态 pMD19-T simple vector 购自大连宝生物工程有限公司,质粒 pGL3-basic vector、pGL3-control vector 及 pRL-TK 购自 Promega 公司。大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自北京索莱宝科技公司。

1.2 主要试剂 TaqDNA 聚合酶、pfuDNA 聚合酶购自上海申能博彩生物公司;限制性内切酶 *Nhe* I、*Kpn* I 购自 NEB 生物技术(北京)有限公司;T4 DNA 连接酶、Trans2K plus DNA Marker 购自北京全式金生物技术有限公司。Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen。血液基因组提取试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒、片段回收试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;质粒小提取试剂盒、无内毒素质粒小提取试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自 Promega 公司。

1.3 细胞培养 人乳腺癌细胞系 MCF-7 及其耐阿霉素耐药细胞株 MCF-7/ADR 购自中国医学科学院血液学研究所,用含 10% FBS 及 2 mmol/L 谷氨酰胺的 DMEM 培养基于 5% CO₂、37 °C 饱和湿度条件下培养。

1.4 不同长度的MDR1启动子的扩增 根据文献^[6]中有关对MDR1启动子转录活性的调节的报道,克隆3个不同长度的MDR1启动子片段:(1)-1904~+43(1947 bp);(2)-986~+43(1029 bp);(3)-198~+43(241 bp)。并将这3种启动子命名为MDR1Pn ($n=1, 2, 3$; 分别代表不同长度的启动子片段),以MCF-7/ADR细胞中提取的基因组为扩增模板,上游引物分别为 primer 1:5-GCGCGGTACC GTCAGTG GAGCAAAGAAATGG-3、primer 2:5-GCGCGGTACC

GGAAA CA TCCTCAGACTATGC-3 和 primer 3:5-GCGCGGTACCCTAGAGAGGTGCAACGGAAGC;下游引物均为 primer 4:5-GCGCGCTAGC GCGGCCT CTGCTTCTTTGAGC-3(下划线部分分别为 *Kpn* I 和 *Nhe* I 酶切位点)。所扩增片段回收后与T载体连接构建中间载体 T-MDR1Pn,转化至感受态 DH5 α 后通过菌液 PCR 筛选阳性克隆,选择测序正确的菌种保存备用。

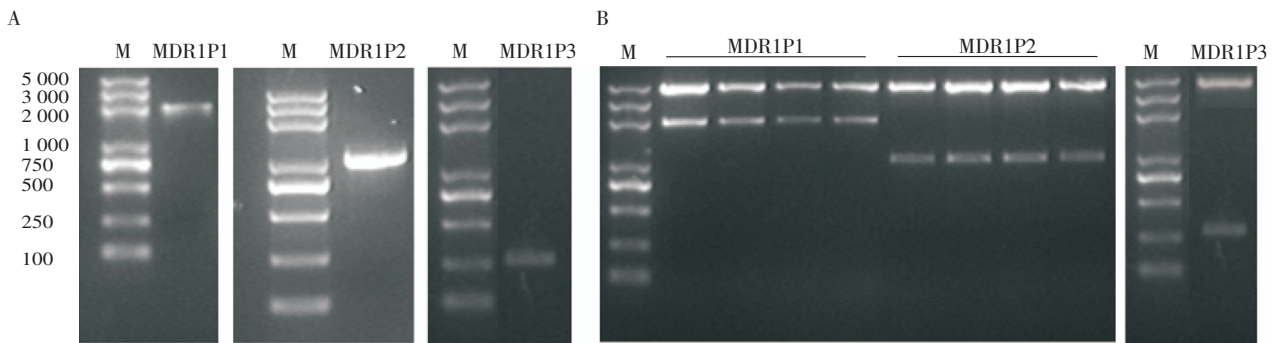
1.5 表达载体 pGL3-MDR1Pn 的构建及鉴定 将质粒 pGL3-basic vector 和中间载体 T-MDR1Pn 分别用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Nhe* I 进行双酶切,将回收的不同长度的启动子片段分别按照一定比例与线性空载体 pGL3-basic 在 T4 连接酶作用下连接。将连接产物转化至 DH5 α 后通过菌液 PCR 筛选阳性克隆,并用 *Kpn* I 和 *Nhe* I 进行双酶切鉴定。

1.6 MDR1Pn 的活性检测 用无内毒素质粒小提试剂盒分别提取质粒 pGL3-MDR1Pn、pGL3-basic、pGL3-control 和 pRL-TK。按照双荧光酶报告基因试剂盒操作步骤,以 pGL3-control 为阳性对照,将 pGL3-MDR1Pn 与海肾荧光素酶载体 pRL-TK (作为内参,校正转染效率)以质量比为 40:1 的比例分别共转染至 MCF-7 细胞和 MCF-7/ADR 细胞中。转染后 48 h,收集细胞并转移至 15 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 8 min,弃上清液,用 PBS 洗涤 1 次后,再次离心弃上清液。向细胞沉淀加入 100 μ L 细胞裂解液,并转移至 1.5 mL EP 管中,振荡约 30 min 后,12 000 r/min 离心 5 min,然后将上清液转移至新的 EP 管中。取 20 μ L 上清于发光管中,加入 100 μ L 荧光素酶测试试剂 II (LAR II),立即在化学发光检测仪上检测;再往同一发光管中加入 100 μ L Stop & GloTM 试剂,立即测定并记录数据。

1.7 统计学处理 使用 SPSS-17.0 统计软件对数据进行分析,数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 ANOVN LSD 或 Dunnett posthoc 进行检验。当 $P < 0.05$ 时认为差异具统计学意义, $P < 0.01$ 时认为具有高度统计学意义。

2 结果

2.1 表达载体 pGL3-MDR1Pn 的构建及鉴定 以 MCF-7/ADR 细胞的基因组为模板,扩增了长度分别为 1947 bp、1029 bp 和 241 bp 的 MDR1 启动子片段(图 1A)。片段连入 T 载体后,测序结果与模板序列一致。接着将测序正确的启动子片段经过酶切、连接等插入目的表达载体 pGL3-basic,以构建由不同长度启动子片段操纵表达萤火虫荧光素酶报告基因的载体 pGL3-MDR1Pn,双酶切鉴定结果表明载体构建成功(图 1B)。

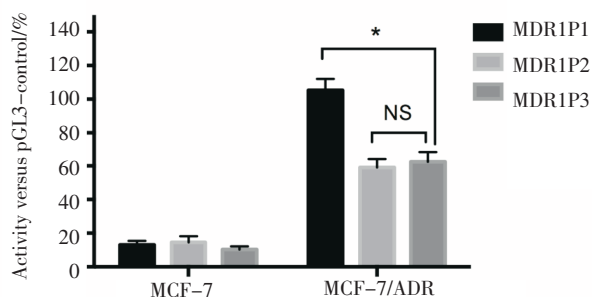


A. 不同长度的 MDR1 启动子片段的 DNA 琼脂糖凝胶电泳图; B. *Kpn* I 和 *Nhe* I 双酶切鉴定 pGL3-MDR1Pn 结果电泳图

图 1 表达载体 pGL3-MDR1Pn 的构建及鉴定

Fig 1 Construction and identification of pGL3-MDR1Pn

2.2 MDR1Pn 的活性检测 将构建好的荧光素酶报告基因载体与 pRL-TK 分别共转染至 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞中, 培养 48 h 后裂解细胞并对表达的荧光素酶的活性进行检测。结果显示 3 种不同长度的启动子片段在 MCF-7 细胞中的活性均较低, pGL3-MDR1P1、pGL3-MDR1P2、pGL3-MDR1P3 在 MCF-7 中活性分别为阳性对照的 $(13.03 \pm 2.35)\%$ 、 $(14.60 \pm 3.57)\%$ 和 $(10.27 \pm 1.89)\%$; 而在耐药细胞株 MCF-7/ADR 中 3 种不同长度启动子的活性分别为阳性对照的 $(105.26 \pm 6.84)\%$ 、 $(59.08 \pm 4.95)\%$ 和 $(62.39 \pm 5.76)\%$ 。其中长度为 1947 bp 的 MDR1P1 的活性明显高于长度为 241 bp 的 MDR1P3 ($P < 0.01$)。而与 MDR1P3 相比, 长度为 1029 bp 的 MDR1P2 在耐药细胞 MCF-7/ADR 中的活性没有明显差异(图 2)。



* $P < 0.01$, NS 无明显差异

图 2 双荧光酶报告基因检测 MDR1 启动子活性

Fig 2 Dual luciferase reporter gene MDR1 promoter activity

3 讨论

近年来, 国内外针对肿瘤多药耐药这一现象做了很多研究, 包括多药耐药的机制、多药耐药的逆转以及寻找对肿瘤细胞具有特异性的启动子等。目前对启动子的研究比较热门, 因为找出一种对靶细胞具有很高特异性的启动子的应用前景很大。如在端粒酶阳性的肿瘤细胞中, hTERT 核心启动子被明显激活, 而在端粒酶阴性的正常细胞中, 则明显受

到抑制, 这表明 hTERT 启动子具有潜在的肿瘤靶向的特异性^[7]。对多药耐药细胞系的研究表明, MDR1 基因的表达调控可以发生在 DNA、RNA 和蛋白质水平, 而其启动子活性的激活是导致 MDR1 高表达的主要原因^[8]。如文献报道由 NF- κ B/p65 和 c-fos 转录因子形成的复合物对 MCF-7 的 MDR1 启动子的活性具有负性调控作用, 而在 MCF-7/ADR 中则没有^[9]。Labialle 等^[6]对 MDR1 的转录调节进行了综述, 其中总结了一些反式作用因子对启动子活性的调节如 HSE、NF-R1、NF-R2、AP1、HSF-1、TCF 等。李长龙等^[10]对 MDR1 启动子的研究克隆出的是长度为 241 bp 的片段, 其它大部分研究的也是该长度的 MDR1 启动子片段。本研究在此基础上克隆了另外两个不同长度的 MDR1 启动子, 其中较长的约为 2 000 bp, 这一长度中涵盖了 HSF-1、TCF 的作用位点。TCF-4 与 β -连环蛋白形成的复合物被报道是 hMDR1 基因转录的激活剂, 它可以促进结直肠癌中这种基因早期的不正常表达^[11]。

报告基因是研究启动子活性的主要方法之一, 它是一种编码可被检测的蛋白质或酶的基因^[12]。通常使用的报告基因有 β -半乳糖苷酶(β -Gal)、葡萄糖醛酸糖苷酶(GUS)、荧光素酶(LUC)^[13]。如今, 以北美萤火虫为来源的荧光素酶基因的应用最为广泛, 该基因编码能够产生出 550 个氨基酸的荧光素酶蛋白^[14]。荧光素酶是在氧气存在的条件下能够使底物发光的一类酶, 该类酶与底物的结合特异性很强, 并且灵敏度高, 因为没有激发光的非特异性干扰, 信噪比较高, 因此具有其他报告基因无法取代的优势^[15]。

在实际应用萤火虫荧光素酶定量基因表达时, 一般采用第二个报告基因来降低实验的变化因素。但传统的共报告基因(比如 β -Gal, GUS)不够便利, 因此本实验使用由 Promega 公司提供的双荧光素酶报告基因测试系统。在本实验中我们将克隆的启动子片段插入到萤火虫荧光素酶报告基因载体

pGL3-basic 中,与海肾荧光素酶报告基因载体 pRL-TK 共转染至细胞中。其中以 pRL-TK 为内对照使测试不被实验条件变化所干扰。应用此方法,可以减少内在的变化因素所降低的实验准确性。

参考文献:

- [1] 王清,刘倩,张学梅. P-糖蛋白及其逆转肿瘤细胞多药耐药性的研究进展[J]. 中国执业药师, 2013, 10(3): 33
- [2] Binkha Thlan Z, Lavasa NIFAR A. P-glycoprotein inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer: current status and future perspectives[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2013, 13(3): 326
- [3] Wang X M, Li L, Cui Q, et al. Quantitative detection of peripheral MDR genes in breast cancer before chemotherapy and their clinical significances[J]. Chinese-German J Clin Oncol, 2008, 11(7): 641
- [4] 王向玲,纪春岩,马道新,等. MDR1 启动子驱动的 CD-TK 双自杀基因载体对耐药 K562 细胞的体外靶向杀伤作用[J]. 中华血液学杂志, 2006, 27(11): 757
- [5] 王波,王志云,王成伟,等. MDR1 启动子调控的双自杀基因靶向杀伤耐药胶质瘤细胞的研究[J]. 山东大学学报, 2008, 46(1): 15
- [6] Labialle S, Gayet L, Marthinet E, et al. Transcriptional regulators of the human multidrug resistance 1 gene, recent views[J]. Biochem Pharmacol, 2002, 64(5/6): 943
- [7] 贺赛,孙学军,郑见宝,等. hTERT, CEA 及 CMV 启动子在结肠癌细胞株中的转录活性比较[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(1): 78
- [8] 林燕真,程通,张雅丽,等. 肿瘤细胞特异启动子 hTERT 介导的靶向 MDR1 基因的 RNAi 用于逆转卵巢癌细胞 MDR 的研究[J]. 中国医学创新, 2015, 12(34): 9
- [9] Ogretmen B, Ahmad R S. Negative regulation of MDR1 promoter activity in MCF-7, but not in multidrug resistant MCF-7/Adr, cells by cross-coupled NF-kappa B/p65 and c-Fos transcription factors and their interaction with the CAAT region [J]. Biochemistry, 1999, 38(7): 2189
- [10] 李长龙,萨晓婴. MDR1 基因单靶点双荧光素酶报告基因系统的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(9): 28
- [11] Tesshi Y, Asako S T, Yasuyoshi N, et al. Transactivation of the multidrug resistance 1 gene by T-cell factor 4/beta-catenin complex in early colorectal carcinogenesis[J]. Cancer Res, 2000, 60(17): 4761
- [12] 李海平,高波,余宗涛. MDR1 基因的表达与肝癌生物学行为指标的关系[J]. 现代肿瘤医学, 2013, 21(1): 129
- [13] 况守龙,胡廷章. 启动子的克隆和研究方法[J]. 重庆工学院学报, 2007, 21(1): 136
- [14] Greer L F 3rd, Szalay A A. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review[J]. Luminescence, 2002, 17(1): 43
- [15] 吴胜昔,陈永文,朱广倍,等. B7-H1 启动子荧光素酶报告基因载体的构建及活性检测[J]. 基础医学与临床, 2014, 34(7): 957

(2016-04-19 收稿)

(上接第 16 页)

- next step for eradication[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(27): 8998
- [17] Piao R L, Liu Y, Tian D, et al. Adefovirdipivoxil modulates cytokine expression in Th1/Th2 cells in patients with chronic hepatitis B[J]. Mol Med Rep, 2012, 5(1): 184
- [18] Zhang Y, Zhang Y, Gu W, et al. Erratum to: Th1/Th2 cell differentiation and molecular signals[J]. Adv Exp Med Biol, 2014, 841: E1
- [19] Milich D R. Influence of T-helper cell subsets and crossregulation in hepatitis B virus infection[J]. J Viral Hepat, 1997, 4(Suppl 2): 48
- [20] Bertolotti A, D'elios M, Boni C, et al. Different cytokine profiles of intraphepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections[J]. Gastroenterology, 1997, 112(1): 193
- [21] Maini M K, Boni C, Lee C K, et al. The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection[J]. J Exp Med, 2000, 191(8): 1269
- [22] Bertolotti A, Maini M K. Protection or damage: a dual role for the virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in hepatitis B and C infection[J]. Curr Opin Microbiol, 2000, 3(4): 387
- [23] Li X, Liu X, Tian L, et al. Cytokine-Mediated immunopathogenesis of hepatitis B virus infections[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2016, 50(1): 41
- [24] Guidotti L, Chisari F. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response[J]. Annu Rev Immunol, 2001, 19: 65
- [25] Guidotti L, Ando K, Hobbs M, et al. Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(9): 3764

(2016-06-29 收稿)