

GPC3 启动子报告基因载体构建与转录活性分析

金荣华 陈 曦 王美霞 张洪海 孙 玉 陈德喜

摘 要 **目的** 构建磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3(GPC3)启动子荧光素酶报告基因载体,并验证其转录活性。**方法** 以人类基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 GPC3 启动子基因片段,克隆到 pGL3 - Basic 荧光素酶报告基因载体上,通过转染 HepG₂ 细胞检测荧光素酶活性来验证 GPC3 启动子的转录活性。**结果** GPC3 基本启动子和全长启动子分别成功构建到 pGL3 - Basic 荧光素酶报告基因载体中,GPC3 基本启动子具有很强的转录活性,而全长启动子的转录活性比基本启动子高 4 倍以上。**结论** 成功构建了 GPC3 启动子荧光素酶报告基因载体,为研究 GPC3 转录调控提供了重要手段。

关键词 GPC3 启动子 报告基因 荧光素酶

Construction of GPC3 Promoter Reporter Gene Vector and Analysis of its Transcriptional Activity. Jin Ronghua, Chen Xi, Wang Meixia, Zhang Honghai, Sun Yu, Chen Dexi. Pharmacological Base of BeijingYouan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract Objective To construct glypican - 3 (GPC3) promoter luciferase reporter gene vector, and to analyze its transcriptional activity. **Methods** The human genomic DNA was extracted as template. GPC3 promoter gene fragment was amplified and cloned into PGL3 - Basic luciferase reporter gene vector. After HepG₂ cells being transfected, the transcriptional activity of GPC3 promoter was verified through the detection of luciferase activity. **Results** Basal GPC3 promoter and full - length GPC3 promoter were successfully constructed to PGL3 - basic luciferase reporter gene vector. GPC3 basal promoter had a strong transcriptional activity, while that of the full - length promoter was 4 times higher. **Conclusion** GPC3 promoter luciferase reporter gene vector was successfully constructed.

Key words Glypican - 3; Promoter; Reporter gene; Luciferase

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是我国最常见的恶性肿瘤之一,具有发现晚、发展快、治疗难、预后差的特点,由于确诊时往往已是中晚期,再加上大多患者伴有肝硬化,能够早期手术切除者仅占少数。所以早发现、早治疗就成为提高患者生存率的关键。近些年来研究发现,磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 (glypican - 3, GPC3) 是一种敏感性较好,特异性很高的一种新型肿瘤标志物,联合 AFP 血清检测可以提高 HCC 诊断敏感性。为研究 GPC3 表达机制,本实验构建了 GPC3 启动子荧光素酶报告基因载体,并分析了其转录活性。

材料与方 法

1. 材料:QIAamp DNA 提取试剂盒 (德国 QIAGEN);rTaq 酶、DNA Ladder 2000、DNA Ladder 15000、pMD18 - T 载体、T4 连接酶 (日本 takara);pGL3 - Basic 载体 (美国 Promega);感受

态细胞 JM109 (中国全式金);凝胶回收试剂盒 (中国百泰克);高浓度质粒小量提取试剂盒 (中国威格拉斯);Fugene 6 转染试剂 (瑞士 Roche);PCR 扩增仪 (德国 Eppendorf);DYY - 6C 型电泳仪 (美国 Bio - rad);Tanon 1600R 型凝胶成像仪 (中国天能);自动化管式发光检测仪 AutoLumat LB953 (德国 Berthold)。

2. 扩增 GPC3 启动子基因:采集 HCC 患者 EDTA 抗凝全血,按照 QIAamp DNA Blood Mini Kit 说明书进行操作,提取基因组 DNA。分析 GPC3 启动子序列 (图 1, Genbank ID: NG_009286.1),设计巢式 PCR 引物扩增片段 A,约 600bp (图 2A),并在第二轮 PCR 的正向引物中引入 BamHI 酶切位点。GPC3A - out - s:5' - CTTCTCCCAGAGCCAGTCAGAGCG - 3'; GPC3A - out - as:5' - CGCTCCTTCTTCCAGAGACTGCAGCCC - 3'; GPC3A - in - BamHI - s:5' - AGCGGACGGATCCTGGGAAGCCAAAT - 3'; GPC3A - in - as 5' - AGCAGCATCGCCACCACCAAGCAC - 3'。以人类基因组 DNA 为模板进行扩增,两轮 PCR 反应条件均为:94℃ 5min;94℃ 20s,55℃ 30s,72℃ 1min,30 个循环;72℃ 延伸 10min。另设计巢式引物扩增片段 B,约 1.5kb (图 2B),并在第 2 轮反向引物中引入 BamHI 酶切位点。GPC3B - out - s: GATCCGTCGGCTGGAGTCTCACT; GPC3B - out - as: GCATGCCTGCAGGTTCGACGATT; GPC3B - in - s: TGACCAAGCTTACGAATTCGAG; GPC3B - in - BamHI -

基金项目:首都医学发展科研基金 (2007 - 2050)

作者单位:100069 首都医科大学附属北京佑安医院药理基地 (金荣华、陈曦、王美霞);首都医科大学附属北京佑安医院感染中心实验室 (张洪海、孙玉、陈德喜)

as:CCCAGGATCCGTCCGCTAACG。以人类基因组 DNA 为模板进行扩增,两轮 PCR 反应条件均为:94℃ 5min;94℃ 20s,55℃ 30s,72℃ 1.5min,30 个循环;72℃ 延伸 10min。

3. pMD18 - GPC3 启动子载体构建:取上述扩增产物各 5μl,在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳 (120V, 15min), Tanon 1600R 型凝胶成像仪成像分析。如果出现目的条带 (图 2A、图 2B),则按照百泰克公司的凝胶回收试剂盒操作步骤进行回收。把 GPC3A 和 GPC3B 两个目的片段分别克隆到 pMD18 - T 载体上,用 BamHI 和 HindIII 双酶切鉴定 pMD18 - GPC3A (图 2C),用 KpnI 和 BamHI 双酶切鉴定 pMD18 - GPC3B (图 2D),阳性克隆送博迈得生物技术公司测序,做进一步验证。

4. pGL3 - GPC3 启动子报告基因载体构建:KpnI 和 HindIII 双酶切 pMD18 - GPC3A 载体回收 GPC3A 片段, KpnI 和 HindIII 双酶切 pGL3 - Basic 载体回收线性化载体,运用 T4 连接酶将两者进行定向连接, KpnI 和 HindIII 双酶切鉴定 (图 3A),阳性克隆进一步测序验证,正向插入克隆即为 pGL3 - GPC3 - 248 报告基因载体。KpnI 和 BamHI 双酶切 pGL3 - GPC3 - 248 载体使之线性化, KpnI 和 BamHI 双酶切 pMD18 - GPC3B 载体回收 GPC3B 片段,然后将两者定向连接, KpnI 和 HindIII 双酶切鉴定 (图 3B),阳性克隆进一步测序验证,正向插入克隆即为 pGL3 - GPC3 - full 报告基因载体。

5. HepG₂ 细胞转染与报告基因分析: HepG₂ 细胞在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度培养箱中培养至对数生长期。收集细胞,调整细胞浓度为 1 × 10⁴ 个/毫升,接种于 6 孔细胞培养板,每孔 2ml。细胞贴壁 12h 后,分 3 组转染 pGL3 - Basic、pGL3 - GPC3 - 248 和 pGL3 - GPC3 - full 质粒各 0.9μg,均加 0.1μg 的 pRSV β - gal 表达载体为标准参照,按 Fugene 6 转染说明书进行操作,转染比例是 3μl Fugene: 1μg 质粒。转染 36h 后收集细胞加入冰冷的裂解液中 (0.1mol/L K₂PO₄, 1mmol/L DTT, pH = 7.8),液氮冻融 3 次,4℃ 12000r/min 离心 20min 收集上清。配制荧光素酶反应液 (10mmol/L 荧光素, 25mmol/L glygly, 15mmol/L MgSO₄, 10mmol/L ATP, pH = 7.5),全自动管式可见光分析仪检测荧光素酶活性。相对荧光强度单位由 β - 半乳糖苷酶做标准参照,取 20μl 裂解物加入 β - gal 反应液 (1mg/ml CPRG, 50mmol/L K₂PO₄, 1mmol/L MgCl₂, pH = 7.8),37℃ 反应 20min,于 570nm 波长读取吸光度值。可见光强度与吸光度之比即为相对荧光强度。

结 果

1. GPC3 启动子序列分析:根据美国国立卫生研究院 (NIH) 提供的启动子分析服务系统 (<http://www.ndsu.edu/pubweb/~mcclean/plsc731/cis-trans/cis-trans5.htm>) 分析显示 (图 1): GPC3 5' - UTR 的 -248 到 +16 为启动子区,存在两个 Sp1, 一个 AP2, 一个 HSV_IE_repeat 和 3 个 TFIID 结合序列。从 -1628 到 +342 存在包括 CREB, E2F1, c - Myc

等在内的多个潜在转录因子结合序列。

```

-1628 GGAGTCTCACTCTGTGCGCCCAAGCTGGAGTGCAGTAGTGCAGTCTCAGCT
-1568 CACTGCAACCTCTGCCCTCTGAGTTCAAGTGATTCTGCTGCTCAGCCTC
-1508 CCGAGTAGCTGGGATTACAGGCGGCTGCCACCGCCAGCTAATTTTTT
-1448 GTATTTTTTGGTAGAGACGGGTTTCCACCCTCTTGGCCAGGCTGGTCTTGA
-1388 ACTCCTGACCTCATGATCCACCGGCTCGGCTTCCCAAAGTGCTGGGATT
-1328 ACAGGCGTAGGCAACCGCTGCCCTGAGCAAGAGCTGGATTCTAATGGTG
-1268 AAATCTAAGCAGGAGAGGTGGGATTGGGTGTAGGATACCTTTCAAATAG
-1208 CTTCTACTCATCTATGAATAGGCTAGCTTTGGCTCAGTAATTTTGTCT
-1148 GTGTAAATGATTTCTAATGAGTATAGGCTGGCTTTAAGCCCTGGTATTTT
-1088 CTGTGTAACAGTAGTCTTGCTCTTGAAGGGCCACCTGGGACTGCTCG
-1028 TGCAGTAGATTTTCTTTAAGCCCAAGATCAGTGCTTTCTGACTT
-968 TGTGTGGCTCTACTGAATCAATCTAGCAAGCCACAGAGGCTTTCAGACT
-908 TTTAAGATACAATATTCAAAGGTGAGGCGAGGCTGTGAAAGCCAGCGGT
-848 CCCTGGCTGTCCCTGAACGCGACTATTTCGAGGTGGCTTTGAGAACCCG
-788 CTCAGAGCTGCTGTAGAGAAAGCTTCCCGGAAAGCTCCTCAGAGAGTAG
-728 AATGAGGAGGTGGATTGTGTGAAGGAACACCTGTGTGGCTCTGGTGT
-668 CCAGGAAAGAGCTGGCAAGCTGAAAGAGGCTGTGGCGAAGGAGGG
-608 GGACCTAAGTCAGGAGACCCCACTGCCCGCAGGAAGGATGAAAGGAGA
-548 CAAAAATCTTAAAGGAAAGAGCCCTCCAGGCTGTAGGCCAATGAGCGCG
-488 GGAAGGAGGATGAGGCTGGGGAACCTTCTCCAGAGCCAGTCAGAGCGGA
-428 CGGCTGCTGGGAGGCAATACGCGCTCGAGCCTGCAAGCCCTCTGCA
-368 TAGTTATGCCAGAGCGCCCTGTGTAGAGCGGCTGCGAGCGGGCAGCTGG
-308 CTCGGCTGCCGGAGCCACCGCGCGGCTCCGACCCTCTCTCGCACTG
-248 CCTTCGCCCGNCCCCGCGCGCGGTGCCCACTGGGCCCCGCGCGCTC
-188 CACGCGGNGNCCCCGACCCCGCGGCTACCGGCGCACAACCGCCACCG
-128 GNCCTTGGCGCGCGGCTGCTGGGNCCTGGCCGCTCCCTNCTGGMCCG
-68 NCCCCCCCCAGTNAGCCCCGGCTGCCCGCGCGCCCAACGGTTTCCCGCC
-8 CTCGCCAGCGCCCCAGGTAGCTGCAGGAAACTTTTTCAGCGGCTGGGTA
+53 GCAGCACGCTCTTGTCTCTCAGGCGCACTGCCAGGCTTGCCGAGTCTGT
+103 GGACTGCTCTCGCTCGGCTGCCACTCTCCGCGCTCTCCTAGCTCCCTG
+163 CGAAGCAGGATGGCGGAGCCGCTGCGCAGCCGCTGCTGTGTGGTGGCGAT
+223 GCTGCTCAGCTTGACTTCCCGGAGCAGCGCAGCCCCGCGCGCGCGC
+283 CGGACGCCACCTGTCAACCAAGTCCGCTCCTCTTCCAGAGACTGAGGCC
+342 GGACTCAAGTGGTGCCAGAACTCCCGTGCCAGGTGAGAGGGGTCCCT

```

图 1 GPC3 启动子序列分析图

* 红色序列为启动子区,黑色序列为潜在转录因子结合区

2. GPC3 启动子 TA 克隆载体构建:根据启动子序列设计引物分两段进行 PCR 扩增, GPC3A 片段 (-250 + 350) 约 600bp (图 2A), 包括了 GPC3 基本启动子区 (-248 + 16), 与 pMD18 - T 载体实现 TA 克隆,经酶切鉴定 (图 2C) 和测序验证正确无误,获得目的克隆 pMD18 - GPC3A。GPC3B 片段 (-1700 + -250) 约 1.5kb (图 2B), 是 GPC3 启动子全长序列除外基本启动子所剩余的序列片段,与 pMD18 - T 载体实现 TA 克隆,经酶切鉴定 (图 2D) 和测序验证正确无误,获得目的克隆 pMD18 - GPC3B。为了便于构建 GPC3 启动子全长序列,特意在 GPC3A 片段 5' 末端和 GPC3B 片段 3' 末端引入了 BamHI 酶切位点。

3. GPC3 启动子报告基因载体构建: KpnI 和 Hind III 双酶切 pMD18 - GPC3A 载体,回收 GPC3A 片段,定向克隆到 pGL3 - basic (4.8kb) 荧光素酶报告基因载体中, KpnI 和 Hind III 双酶切鉴定 (图 3A), 测序验证正向插入者为目的克隆 pGL3 - GPC3 - 248。KpnI 和 BamHI 双酶切 pMD18 - GPC3B 载体,回收 1.5kb 的 GPC3B 片段,定向克隆到 pGL3 - GPC3 - 248 中,即把 GPC3B 插入到基本启动子上游,形成了 GPC3 全长启动子报告基因载体 pGL3 - GPC3 - full, KpnI 和 Hind III 双酶切鉴定 (图 3B), 出现约 2kb 大小片段,测序验证完全正确。

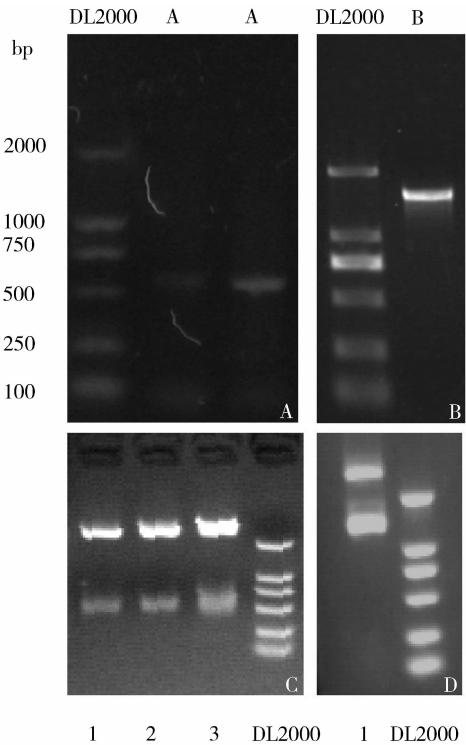


图 2 GPC3 启动子 PCR 扩增及 TA 克隆酶切鉴定图

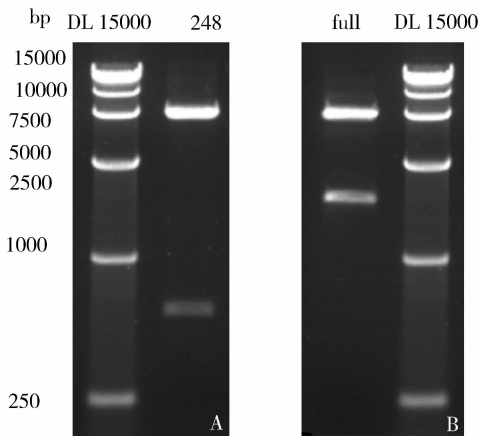


图 3 PGL3 - GPC3 启动子报告基因载体酶切鉴定图

4. HepG₂ 细胞转染与转录活性分析: 为了发现 GPC3 的基本启动子和潜在转录因子调控序列, 我们分别转染含全长启动子序列的 pGL3 - GPC3 - full 和含有基本启动子序列的 pGL3 - GPC3 - 248 到 HepG₂ 细胞。报告基因结果显示(图 4), pGL3 - GPC3 - 248 具有较强的启动报告基因的转录活性, 为 pGL3 - basic 的 4 倍。pGL3 - GPC3 - full 则达到 pGL3 - basic 的 12 倍。

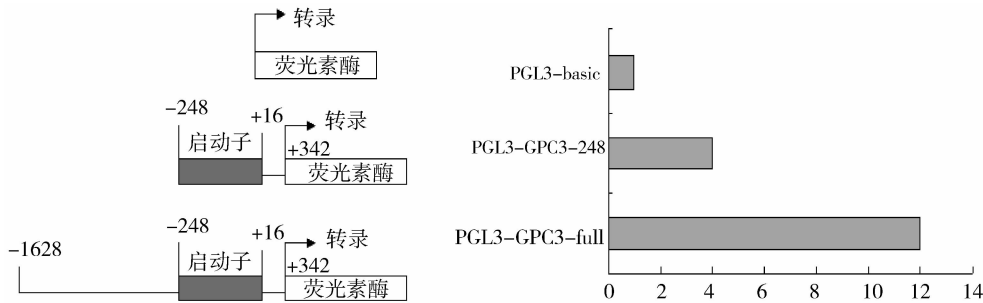


图 4 不同长度启动子报告基因活性对比图

讨 论

磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 是一类分布在细胞膜表面的蛋白聚糖, 属于糖基磷脂酰肌醇锚定细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白多糖家族, 它通过一个糖基化磷脂酰肌醇连接在细胞膜的表面。GPC3 的表达方式与生长因子及其受体表达方式一致, 能通过一系列细胞表面受体传导的信号来调节细胞形态和各种细胞行为, 如黏附、增生、迁移、存活和分化^[1]。Hsu 等^[2]于 1997 年最先报道了 GPC3 在 HCC 中有异常表达。很多报道显示, GPC3 mRNA 作为 HCC 的肿瘤标志物其敏感性大多数在 75% 左右, 且特异性高, 在肝脏非恶性组织中, 如除外癌旁组织, 则基本未发现明显的 GPC3 mRNA 表达^[3]。外周血检测 GPC3 蛋白诊断 HCC 的

敏感性为 40% ~ 50%, 特异性在 90% 以上, 虽然敏感性较低, 但其浓度与 AFP 浓度及肿瘤大小无相关性, 在 AFP 阴性的肝癌尤其是早期肝癌的诊断中发挥重要作用^[4]。研究显示 AFP 联合 GPC3 血清检测对 HCC 诊断敏感性可达 82%, 因此 GPC3 是一种敏感性较好, 特别是特异性很高的新型 HCC 标志物^[5]。此外有研究发现 GPC3 蛋白可以调节组织的生长和分化, 且在膨胀性生长和浸润性生长的肝癌中表达有差异^[6]。弄清 GPC3 为何表达上调以及如何解释个体表达差异对我们认识 HCC 发生和发展具有重要意义。为研究 GPC3 表达调控因素, 我们构建了 GPC3 启动子的荧光素酶报告基因载体。

通过报告基因研究发现, pGL3 - GPC3 - 248 启

动报告基因的转录活性是 pGL3 - basic 的 4 倍, pGL3 - GPC3 - full 则达到 pGL3 - Basic 的 12 倍(图 4)。说明 GPC3 的 5' - 上游序列从 +342 到 -248bp 能够启动荧光素酶的转录。当 GPC3 的 5' - 上游序列从 -248 延伸到 -1628bp 时, GPC3 启动的荧光素酶活性会显著增强, 提示 GPC3 5' - 上游序列的 -248 到 -1628bp 之间存在潜在的转录因子。启动子序列分析显示 CREB、E2F1、c - myc 等一系列转录因子结合位点可能存在于基本启动子之外的序列内。由此我们成功克隆了 GPC3 启动子序列并连接到报告基因载体上, 这对我们进一步研究转录因子对 GPC3 的转录调节提供了一个非常好的研究工具。

参考文献

1 Baumhoer D, Tornillo L, Stadlmann S, *et al.* Glypican 3 expression in human nonneoplastic, preneoplastic, and neoplastic tissues: a tissue microarray analysis of 4,387 tissue samples. *Am J Clin Pathol*, 2008,

129:899 - 906

- 2 Hsu HC, Cheng W, Lai PL. Cloning and expression of a developmentally regulated transcript MXR7 in hepatocellular carcinoma: biological significance and temporospatial distribution. *Cancer Res*, 1997, 57 (22):5179 - 5184
- 3 Zhu ZW, Friess H, Wang L, *et al.* Enhanced glypican - 3 expression differentiates the majority of hepatocellular carcinomas from benign hepatic disorders. *Gut*, 2001, 48:558 - 564
- 4 Shirakawa H, Kuronuma, Nishimura Y, *et al.* Glypican - 3 is a useful diagnostic marker for a component of hepatocellular carcinoma in human liver cancer. *Int J Oncol*, 2009, 34: 649 - 656
- 5 Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, *et al.* Glypican - 3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 306:16 - 25
- 6 Ligato S, Mandich D, Cartun RW. Utility of glypican - 3 in differentiating hepatocellular carcinoma from other primary and metastatic lesions in FNA of the liver: an immunocytochemical study. *Mod Pathol*, 2008, 21: 626 - 631

(收稿:2010 - 04 - 27)

碳酸氢钠联合塞来昔布预防伊立替康相关腹泻的临床观察

吴梅红 王 宁 王雅杰

摘 要 **目的** 观察碳酸氢钠片联合塞来昔布预防伊立替康所致腹泻的疗效。**方法** 回顾性分析了 2009 年 7 月 ~ 2010 年 3 月笔者科室经治的接受含伊立替康方案化疗并采用碳酸氢钠片联合塞来昔布预防腹泻方案的晚期结直肠癌患者病例资料, 比较腹泻及其他不良反应的差异, 其中预防组 ($n=14$), 化疗前 1 天开始口服碳酸氢钠和塞来昔布 (碳酸氢钠片 0.5g, 每天 3 次; 塞来昔布 200mg, 每天 1 次), 连用 5 天; 对照组 ($n=21$), 无特殊预防用药。两组在化疗期间均常规用托烷司琼等止吐, 化疗后如出现腹泻按规定给予盐酸洛哌丁胺及蒙脱石散剂治疗, 必要时给予生长抑素及静脉补液支持。每周化疗过程中均予以监测不良反应的发生及程度。**结果** 给予碳酸氢钠联合塞来昔布显著降低了腹泻的发生率 (预防组 9.33%, 对照组 27.54%, $P<0.005$), 同时也减少了骨髓抑制等其他不良反应的发生, 差异有统计学意义。**结论** 碳酸氢钠片联合塞来昔布胶囊口服能安全有效地预防伊立替康相关腹泻, 同时也减少了骨髓抑制等其他不良反应的发生。

关键词 伊立替康 腹泻 预防 碳酸氢钠片 塞来昔布

Clinical Observation of Sodium Bicarbonate Combined with Celecoxib for Prevention of Irinotecan Diarrhea Induced by Irinotecan. Wu Meihong, Wang Ning, Wang Yajie. Department of Oncology, Changhai Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract Objective To observe the therapeutic effects of sodium bicarbonate combined with celecoxib for irinotecan - induced diarrhea. **Methods** A total of 35 patients with advanced colorectal cancers were allotted into prevention group ($n=14$) and control group ($n=21$) from July 2009 to March 2010 in our hospital. All patients received the chemotherapy including irinotecan. The prevention group received sodium bicarbonate combined with celecoxib before the use of irinotecan for 4d, while the control group received routine treat-

基金项目:上海市重点学科项目资助(B905)

作者单位:200433 上海,第二军医大学附属长海医院肿瘤科

通讯作者:王雅杰,电子邮箱:yajiewa0459@163.com