

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.01082

· 论 著 ·

外源性 *Muc1*、*Survivin* 和 *Nanog* 基因启动子在结肠癌干细胞中的表达活性

杜 敏¹, 葛海燕², 徐 彬^{1*}

1. 同济大学附属第十人民医院普外科, 上海 200072

2. 同济大学附属东方医院普外科, 上海 200120

[摘要] **目的** 探讨结肠癌干细胞中不同基因启动子的活性, 寻找可能用于结肠癌干细胞靶向治疗的启动子。**方法** 应用流式细胞仪分选人结肠癌 HCT116 细胞系中 CD133⁺CD44⁺ 标记的肿瘤干细胞。采用 PCR 技术获取 *Nanog*、*Muc1* 和 *Survivin* 基因启动子并分别克隆入 pGL3-basic 质粒。将含有启动子的 pGL3-basic 质粒和 pGL3-control 质粒分别与 pRL-sv40 共转染结肠癌细胞 (HCT116、SW620、HT29)、结肠癌干细胞 (CD133⁺CD44⁺ HCT116) 及人正常肝细胞 (QSG7701), 通过检测双荧光素酶活性以测定启动子活性。**结果** pGL3-basic-*Nanog*、pGL3-basic-*Muc1*、pGL3-basic-*Survivin* 经测序鉴定正确。HCT116 细胞系中 CD133⁺CD44⁺ 细胞比率约占 42.2%。双荧光素酶活性检测显示: 在 HCT116、SW620、HT29 和 CD133⁺CD44⁺ HCT116 细胞中, *Muc1* 与 *Survivin* 均表现出了较强的活性, 而在正常细胞 QSG7701 中活性较低。**结论** *Muc1*、*Survivin* 启动子可能是用于靶向结肠癌干细胞治疗的有效候选启动子。

[关键词] *Muc1*; *Nanog*; *Survivin*; 启动子; 结肠肿瘤干细胞; 肿瘤**[中图分类号]** R 735.35 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)10-1082-04

Expression of exogenous *Muc1*, *Survivin* and *Nanog* gene promoters in colon cancer stem cells

DU Min¹, GE Hai-yan², XU Bin^{1*}

1. Department of General Surgery, The Tenth People's Hospital of Shanghai, Tongji University, Shanghai 200072, China

2. Department of General Surgery, East Hospital, Tongji University, Shanghai 200120, China

[Abstract] **Objective** To study the activities of different gene promoters in colon cancer stem cells and to search for effective promoter for targeted therapy of colon cancer stem cells. **Methods** CD133⁺CD44⁺ cells were sorted from cell line HCT116 by flow cytometry. *Nanog*, *Muc1* and *Survivin* gene promoters were amplified by PCR and were separately cloned into pGL3-basic plasmid. pGL3-basic-promoter plasmid or pGL3-basic-control plasmid together with plasmid pRL-sv40 were co-transfected into colon cancer cell lines (HCT116, SW620, and HT29), CD133⁺CD44⁺ HCT116 cells, and normal human liver cell line QSG7701. And then promoter activity was examined by dual-luciferase assays. **Results** The constructed pGL3-basic-*Nanog*, pGL3-basic-*Muc1* and pGL3-basic-*Survivin* were confirmed correct by sequencing. We found that 42.2% of HCT116 cells were CD133⁺CD44⁺ cells. Dual-luciferase activity detection showed that *Muc1* and *Survivin* promoters had strong activities in both colon cancer cells and CD133⁺CD44⁺ HCT116 cells, and they had low activities in normal cells QSG7701. **Conclusion** *Survivin* and *Muc1* promoters may serve as effective candidate for targeted treatment of colon cancer stem cells.

[Key words] *Muc1*; *Nanog*; *Survivin*; promoter; colonic neoplasms; neoplastic stem cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(10):1082-1085]

新的观念认为, 结肠癌干细胞是结肠癌转移复发的根源^[1]。针对结肠癌干细胞的治疗将极有希望杀灭结肠癌。结肠癌干细胞富集于 CD133、CD44 阳性标记的结肠癌细胞中^[2-4]。由于溶瘤病毒介导的

靶向病毒基因治疗能有效感染休眠期的癌细胞, 并且在某些肿瘤干细胞中显示出了极其有效的治疗作用^[5], 因此可以设想采用病毒靶向治疗结肠癌是极具前景的。在该治疗策略中, 靶向性是关键。我们

[收稿日期] 2012-02-23 **[接受日期]** 2012-09-12**[基金项目]** 国家自然科学基金 (81001007), 同济大学附属第十人民医院优秀青年基金 (10RQ105), Supported by National Natural Science Foundation of China (81001007) and Fund for Outstanding Youth of Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University (10RQ105).**[作者简介]** 杜 敏, 博士生. E-mail: dumintongji@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-6630588, E-mail: pfdbs1@yahoo.com.cn

期望找到一个可以在结肠癌细胞及结肠癌干细胞中具有相对高活性而在正常细胞中活性较低的启动子, 来启动病毒的复制, 使其复制局限于肿瘤细胞和肿瘤干细胞。为此, 本研究通过分析 *Nanog*、*Muc1* 和 *Survivin* 基因启动子在 CD133⁺CD44⁺ HCT116 人结肠癌细胞系中的活性, 试图寻找有效的能用于靶向结肠癌干细胞治疗的启动子。

1 材料和方法

1.1 主要材料和仪器 人结肠癌细胞系 HCT116、SW620、HT29 以及质粒 pGL3-basic、pGL3-control、pRL-sv40、pGL3-basic-*Survivin* (含有人 *Survivin* 启动子) 由中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所刘新垣课题组惠赠; DNA 凝胶回收试剂盒、人基因组 DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒、感受态大肠杆菌 DH5 α 购于天根公司; DNA Fragment purification Kit Ver 2.0 试剂盒、限制性内切酶 *Bgl* II、*Mlu* I、T₄ DNA 连接酶购于 TaKaRa 公司; KOD-plus 高保真酶购于 ToYoBo 公司; Lipofectamine 2000 购于 Invitrogen 公司; 双荧光素酶检测试剂盒购于 Promega 公司; CD133-PE 抗体购于美天旎公司; CD44-APC 抗体购于 BD 公司; 胎牛血清、DMEM 高糖培养基购于 HyClone 公司; 胰蛋白酶、青链霉素购于索莱宝公司; 人正常肝细胞系 QSG7701、含有人 *Muc1* 启动子的质粒 pDRIVE03-DF3(h)v02 由本课题组保存。流式细胞分选仪为 BD 公司 BD FACSAria II 型; 酶标仪为 BioTek 公司多功能检测仪 Synergy2。

1.2 *Nanog* 和 *Muc1* 启动子的克隆和重组质粒的构建 *Nanog* 启动子的克隆: 应用 NCBI 查找 *Nanog* 基因启动子序列, 根据文献报道的活性部分^[6-8], 应用 Primer Premier 5.0 设计两端带有 *Mlu* I、*Bgl* II 酶切位点的引物, 应用 PCR 从人全基因组扩增出带 *Mlu* I、*Bgl* II 酶切位点的人 *Nanog* 启动子序列, 命名为 *Nanog*-620。*Muc1* 启动子的克隆: 以 pDRIVE03-DF3(h)v02 为模板, 以两端带有 *Mlu* I、*Bgl* II 酶切位点的引物, 通过 PCR 克隆出带 *Mlu* I、*Bgl* II 酶切位点的人 *Muc1* 启动子序列, 命名为 *Muc1*-769。重组质粒的构建: 以 *Mlu* I、*Bgl* II 双酶切 *Nanog*-620、*Muc1*-769、pGL3-Basic, 酶切产物纯化回收后, 分别将各启动子序列亚克隆入载体质粒 pGL3-Basic 中, 命名为 pGL3-basic-*Nanog*、pGL3-basic-*Muc1*。

1.3 结肠癌干细胞的分选 HCT116 细胞培养于含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 DMEM 高糖培养液。细胞达 80% 融合时, 用 0.25% 胰酶消化, 计数细

胞并分为 4 组: none、CD133-PE 对照、CD44-APC 对照、CD133-PE/CD44-APC。1 000 r/min (离心半径 16 cm) 离心 5 min, 吸尽上清, 用 80 μ l PBS 重悬细胞, CD133-PE 对照管中加入 CD133-PE-isotype (10 μ l/5 \times 10⁶ 细胞); CD44-APC 对照管中加入 CD44-APC-isotype (20 μ l/5 \times 10⁶ 细胞); CD133-PE/CD44-APC 管中加入 CD133-PE、CD44-APC 抗体 (分别 10 μ l/5 \times 10⁶ 细胞、20 μ l/5 \times 10⁶ 细胞)。暗室 4 $^{\circ}$ C 孵育细胞 30 min, 用 1~2 ml 预冷 PBS 洗涤细胞 2~3 次, 加入 500 μ l PBS 重悬细胞, 过滤入流式管中, 流式细胞分选仪分选 CD133⁺CD44⁺ 细胞。

1.4 启动子转染及活性检测 将 1 \times 10⁶ HCT116、SW620、HT29 细胞、CD133⁺CD44⁺ HCT116 细胞及 QSG7701 细胞铺于 24 孔板, 24 h 后, 细胞密度长至 80% 以上。用 Lipofectamine 2000 试剂转染细胞, 每孔分别转染 0.4 μ g 报告基因质粒 (pGL3-basic-*Muc1*、pGL3-basic-*Nanog*、pGL3-basic-*Survivin* 或 pGL3-control) 和 0.04 μ g 内标质粒 (pRL-sv40), 6 h 后换用含 4% FBS 的细胞培养液。48 h 后收集细胞, PBS 洗 1 次, 按照双荧光素酶检测试剂盒操作说明, 用 1 \times Reporter Lysis Buffer 100 μ l/孔裂解细胞, 室温震荡 15 min, 收集细胞裂解液。应用酶标仪检测反应物发光强度。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 组间比较采用 *t* 检验, 检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 启动子鉴定 以 *Mlu* I、*Bgl* II 双酶切 pGL3-basic-*Nanog*、pGL3-basic-*Muc1* 质粒, 可获得约 620 bp 及 769 bp 条带 (图 1)。测序 pGL3-basic-*Nanog*、pGL3-basic-*Muc1*、pGL3-basic-*Survivin* 质粒, 比对 NCBI 启动子序列, 结果正确。

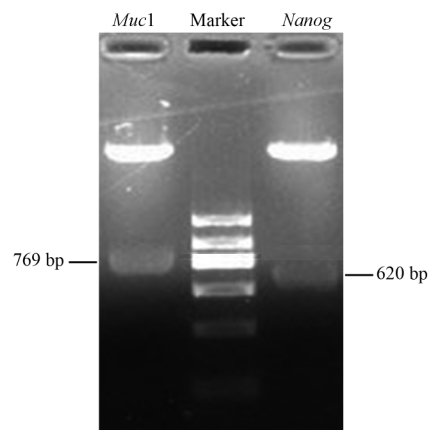


图 1 *Nanog*、*Muc1* 启动子酶切鉴定
Fig 1 Identification of *Nanog* and *Muc1* promoter by enzyme digestion

2.2 结肠癌干细胞分选结果 应用流式细胞仪分选 CD133⁺ CD44⁺ HCT116 细胞,得到的 CD133⁺

CD44⁺ HCT116 细胞约占 42.2%(图 2)。

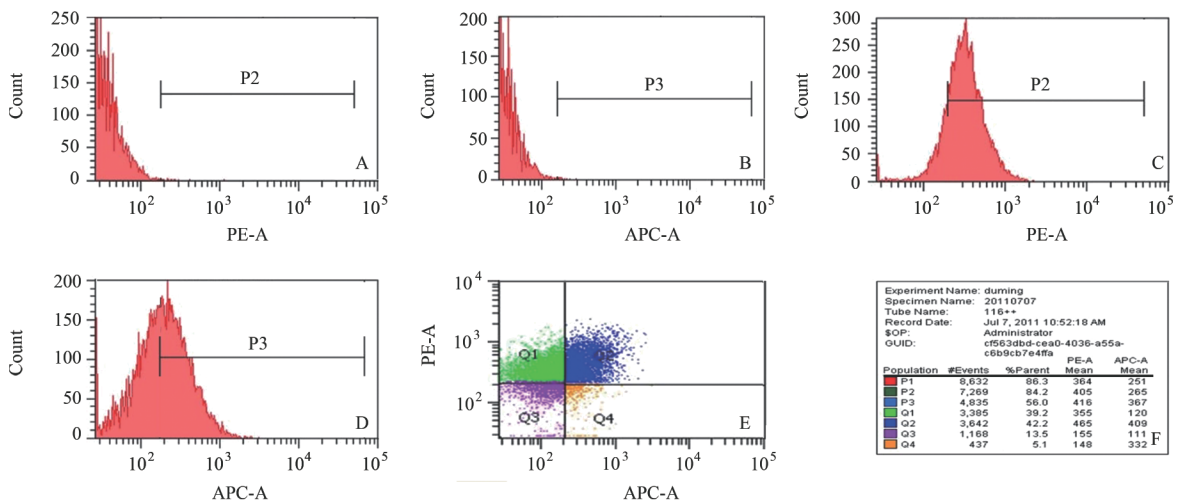


图 2 流式细胞术分选 CD133⁺ CD44⁺ HCT116 细胞

Fig 2 CD133⁺ CD44⁺ HCT116 cells sorted by flow cytometry

A: CD133-PE-isotype (P2); B: CD44-APC-isotype (P3); C: CD133-PE⁺ (P2); D: CD44-APC⁺ (P3); E: CD133⁺ CD44⁺ (Q2); F: Date table

2.3 各细胞中启动子活性 由图 3 可见,在 HCT116、SW620、HT29 结肠癌细胞中,pGL3-basic-*Survivin* 组启动子活性分别约为 pGL3-control 组的 43%、50%、39%,pGL3-basic-*Muc1* 组启动子活性分别约为 pGL3-control 组的 29%、55%、35%,而 pGL3-basic-*Nanog* 组启动子活性在 3 种细胞中均较低。在 CD133⁺ CD44⁺ HCT116 结肠癌细胞中,pGL3-basic-*Muc1* 组启动子活性约为 pGL3-control 组的 38%,pGL3-basic-*Survivin* 组启动子活性约为 pGL3-control 组的 20%,而 pGL3-basic-*Nanog* 组启动子活性较低。在正常对照 QSG7701 细胞中,3 个启动子均表现出较低的活性。*Survivin* 启动子与 *Muc1* 启动子在 HCT116、SW620、HT29、CD133⁺ CD44⁺ HCT116 细胞中均表现出比 QSG7701 细胞中高的活性($P < 0.05$)。

3 讨论

溶瘤腺病毒能感染分裂期和非分裂期细胞,具有潜在的治疗癌症干细胞的价值^[5]。靶向肿瘤干细胞是开展肿瘤新治疗的关键所在。而溶瘤病毒靶向肿瘤干细胞的特性,可以通过改造病毒获得,采用肿瘤干细胞特异性的启动子控制溶瘤病毒复制是方法之一。为此,我们首先通过流式分选技术分选结肠癌干细胞。由于 CD133⁺、CD44⁺ 细胞与 CD133⁺ 细胞相比,体外培养更易成球,体内具有更强的成瘤性,故 CD133⁺ CD44⁺ 结肠癌细胞更具有干细胞特性^[9]。在结肠癌细胞系 HCT116 中,我们发现 CD133⁺ CD44⁺ 肿瘤干细胞比例较高,可达 40% 以上,因此我们选择了 CD133⁺ CD44⁺ HCT116 用于结肠癌干细胞启动子活性的分析。

Nanog 基因是维持干细胞生长和自我更新的重要基因^[10],该基因与肿瘤的发生发展密切相关^[11],并在多种肿瘤组织中高表达^[12],而在已经分化的成体细胞中表达极低或者无表达^[13]。*Muc1* 是黏蛋白家族中的一种 I 型跨膜蛋白,其在腺癌中表达增高^[14],并与其恶性程度相关^[15],而在正常组织中呈低表达。*Survivin* 基因作为一种凋亡抑制蛋白,在肝癌、肺癌、结肠癌等肿瘤组织中表达增强,而在相应的正常组织中呈低表达或不表达^[16-17]。研究表明 *Nanog*、*Muc1* 及 *Survivin* 均在结肠癌等肿瘤细胞中高表达^[12, 14, 17],并且在人骨肉瘤分离出的侧群细胞中检测到 *Nanog* 高表达^[18],*Muc1* 在神经胶

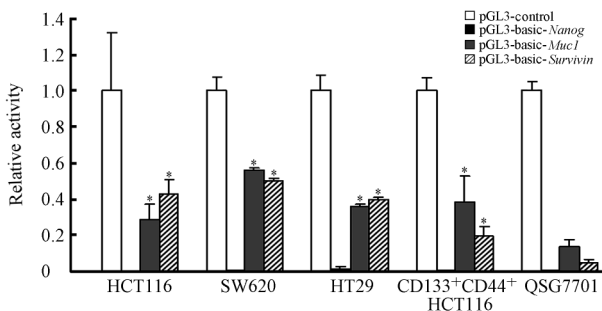


图 3 双荧光素酶检测启动子活性
Fig 3 Activity detection of promoter by dual-luciferase assay

* $P < 0.05$ vs QSG7701; $n = 3, \bar{x} \pm s$

质瘤干细胞和乳腺癌干细胞中也具有较高的表达^[19-20]。鉴于上述资料,我们认为这 3 个基因的启动子有可能在结肠癌干细胞及结肠癌细胞中具有高活性,而在正常组织细胞中活性低,可能具有用于靶向溶瘤腺病毒治疗的潜能。

通过双荧光素酶检测启动子活性分析,我们发现 *Nanog* 启动子在 HCT116、SW620、HT29 细胞中活性均很低,与预期不符,分析其活性低的原因可能是因为细胞环境的不同:是否有其他基因表达产物作用于 *Nanog* 启动子区域,而使得 *Nanog* 启动子具有高活性,而在本实验细胞中并无该基因的表达而造成 *Nanog* 启动子在该细胞中无法具有高启动活性? 或者该段启动子虽在既往实验的细胞系中具有高活性,但在本实验细胞中也许需要不同的调控元件才能表现出高活性? 这些疑问需要通过进一步对 *Nanog* 启动子进行进一步的深入研究而获得解答。

同时,我们也发现 *Survivin* 和 *Muc1* 启动子活性在 CD133⁺CD44⁺ HCT116 结肠癌细胞和普通结肠癌细胞中活性较高,而在正常细胞中活性极低。这表明 *Muc1* 和 *Survivin* 对结肠癌干细胞具有较好的特异性,可能可以作为靶向溶瘤腺病毒治疗的启动子,进一步应用于靶向肿瘤结肠癌干细胞的治疗。目前启动子用于靶向治疗的要求尚无定量的标准,理论上在肿瘤细胞中的活性与在正常细胞的中活性差距越大越好。本研究发现 *Survivin* 启动子在肿瘤细胞和干细胞中与正常细胞的比值约为 10 倍和 5 倍,差距最为明显。我们后续使用 *Survivin* 启动子控制 E1A 区,缺失 E1B55KD 基因、构建出携带治疗基因 LCN2 的具有双靶向性的溶瘤腺病毒 Ad-*Survivin*-ZD55-LCN2,在 HCT116 细胞中,我们检测到 Ad-*Survivin*-ZD55-LCN2 可在其中复制杀死肿瘤细胞并高表达 LCN2 蛋白,而在被感染正常细胞中 LCN2 的表达量极低(资料待发表)。说明 *Survivin* 启动子活性足以启动病毒在 HCT116 细胞中的复制,当然 *Survivin* 启动子用于靶向治疗的价值仍有待进一步深入研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Boman B M, Huang E. Human colon cancer stem cells; a new paradigm in gastrointestinal oncology[J]. J Clin Oncol, 2008, 26:2828-2838.

- [2] Horst D, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A. CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer[J]. Brit J Cancer, 2008, 99:1285-1289.
- [3] Fan X, Ouyang N, Teng H, Yao H. Isolation and characterization of spheroid cells from the HT29 colon cancer cell line[J]. Int J Colorectal Dis, 2011, 26:1279-1285.
- [4] Sanders M A, Majumdar A P. Colon cancer stem cells: implications in carcinogenesis[J]. Front Biosci, 2011, 16:1651-1662.
- [5] Nandi S, Lesniak M S. Adenoviral virotherapy for malignant brain tumors[J]. Expert Opin Biol Ther, 2009, 9:737-747.
- [6] Fischer Y, Ganic E, Ameri J, Xian X, Johannesson M, Semb H. NANOG reporter cell lines generated by gene targeting in human embryonic stem cells[J]. Plos One, 2010, 5:e12533.
- [7] Pereira L, Yi F, Merrill B J. Repression of Nanog gene transcription by Tcf3 limits embryonic stem cell self-renewal[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26:7479-7491.
- [8] Rodda D J, Chew J L, Lim L H, Loh Y H, Wang B, Ng H H, et al. Transcriptional regulation of Nanog by Oct4 and Sox2[J]. J Biol Chem, 2005, 280:24731-24737.
- [9] Pang R, Law W L, Chu A C, Poon J T, Lam C S, Chow A K, et al. A subpopulation of CD26⁺ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer[J]. Cell Stem Cell, 2010, 6:603-615.
- [10] Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells[J]. Cell, 2003, 113:643-655.
- [11] Jeter C R, Badeaux M, Choy G, Chandra D, Patrawala L, Liu C, et al. Functional evidence that the self-renewal gene NANOG regulates human tumor development[J]. Stem Cells, 2009, 27:993-1005.
- [12] Ben-Porath I, Thomson M W, Carey V J, Ge R, Bell G W, Reggev A, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors[J]. Nat Genet, 2008, 40:499-507.
- [13] Hart A H, Hartley L, Ibrahim M, Robb L. Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human[J]. Dev Dyn, 2004, 230:187-198.
- [14] Finn O J, Gantt K R, Lepisto A J, Pejavar-Gaddy S, Xue J, Beatty P L. Importance of MUC1 and spontaneous mouse tumor models for understanding the immunobiology of human adenocarcinomas[J]. Immunol Res, 2011, 50(2-3):261-268.
- [15] Taylor-Papadimitriou J, Burchell J, Miles D W, Dalziel M. MUC1 and cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1455(2-3):301-313.
- [16] Kelly R J, Lopez-Chavez A, Citrin D, Janik J E, Morris J C. Impacting tumor cell-fate by targeting the inhibitor of apoptosis protein survivin[J]. Mol Cancer, 2011, 10:35.
- [17] Lladser A, Sanhueza C, Kiessling R, Quest A F. Is survivin the potential Achilles' heel of cancer? [J]. Adv Cancer Res, 2011, 111:1-37.
- [18] Yang M, Yan M, Zhang R, Li J, Luo Z. Side population cells isolated from human osteosarcoma are enriched with tumor-initiating cells[J]. Cancer Sci, 2011, 102:1774-1781.
- [19] Doloff J C, Jounaidi Y, Waxman D J. Dual E1A oncolytic adenovirus: targeting tumor heterogeneity with two independent cancer-specific promoter elements, DF3/MUC1 and hTERT [J]. Cancer Gene Ther, 2011, 18:153-166.
- [20] Engelmann K, Shen H, Finn O J. MCF7 side population cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the tumor antigen MUC1[J]. Cancer Res, 2008, 68:2419-2426.