

## 人端粒酶逆转录酶基因启动子调控 表达载体的构建和鉴定

马黎丽<sup>1</sup>, 陈昌杰<sup>2</sup>, 杨清玲<sup>2</sup>, 章 尧<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的: 构建并鉴定人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 基因启动子调控的荧光素酶基因表达载体。方法: 用巢式 PCR 方法克隆 hTERT 序列长约 1 100 bp 的启动子片段, 经测序无误后将其插入荧光素酶基因报告载体中, 构建 pGL3-hTERTp 重组质粒, 转化 JM190 细菌得到大量含有 hTERT 启动子的荧光素酶重组质粒。用双酶切和 PCR 法鉴定重组质粒, 并送测序鉴定。结果: 经过酶切和 PCR 法鉴定成功地构建了携带 hTERT 启动子的重组荧光素酶基因报告载体。结论: 成功获得由 hTERT 启动子调控的荧光素酶基因表达载体, 为研究 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对 HL-60 细胞端粒酶作用的分子机制打下基础。

**[关键词]** 白血病, 髓母细胞性; 基因表达; 人端粒酶逆转录酶; 启动子; 荧光素酶基因表达载体

**[中国图书资料分类法分类号]** R 733.71; Q 343.1 **[文献标识码]** A

### Construction and identification of a expression vector driven by human telomerase reverse transcriptase gene promoter

MA Li-li<sup>1</sup>, CHEN Chang-jie<sup>2</sup>, YANG Qing-ling<sup>2</sup>, ZHANG Yao<sup>2</sup>

(1. Research Center of Clinical Laboratory, 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology,  
Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

**[Abstract]** **Objective:** To construct and identify the expression vector which contains a luciferase gene driven by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene promoter. **Methods:** The fragment of hTERT promoter about 1 100 bp was acquired by nested PCR amplification, the correct sequence was inserted into the luciferase gene expression vector. In order to get a lot of containing hTERT promoter luciferase recombinant, the construction of pGL3-hTERTp recombinant was transformed into JM190 bacteria. Restriction endonuclease and PCR were used to identify the recombinant and sequencing. **Results:** After identifying which used restriction endonuclease and PCR method, we successfully constructed the recombinant of hTERT promoter luciferase gene expression vector. **Conclusions:** A novel recombinant luciferase gene expression vector driven by hTERT promoter is made successfully, and the newly constructed recombinant is useful for study the molecular mechanism that As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> inhibits the expression of telomerase of HL-60 cells.

**[Key words]** leukemia, myeloblastic; gene expression; human telomerase reverse transcriptase; promoter; luciferase gene expression vector

人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 是端粒酶活性的主要决定因素, 在绝大部分肿瘤细胞中高表达, 而在大部分正常体细胞中不表达<sup>[1,2]</sup>, 目前认为其表达与肿瘤细胞永生化的关系最为密切。1992 年哈尔滨医科大学第一附属医院开始单用三氧化二砷(As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 治疗急性早幼粒细胞白血病(APL) 取得良好效果。我们实验室前期研究证实对 HL-60 细胞端粒酶 hTERT mRNA 的表达呈下调效应, 且 hTERT mRNA 表达的抑制与 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 浓度呈一定的量效关系, 并呈现时间和剂量的依赖性<sup>[3]</sup>, 但是 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 抑制 HL-60 细胞端

粒酶活性及 hTERT 表达的具体分子机制还不清楚。为此, 我们克隆了 hTERT 启动子的活性片段, 并将其插入到报告载体 pGL3-basic 中, 构建了 pGL3-hTERTp 重组载体用于转染 HL-60 细胞检测其表达活性, 为研究 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 以端粒酶为作用靶点的抗急性早幼粒细胞白血病治疗提供理论和实验依据。

### 1 材料与方 法

1.1 材料 大肠埃希菌 JM190 由本实验室冻存。人白血病细胞系 HL-60 细胞株, 购自中国科学院细胞研究所。

1.2 主要试剂 EX TaqDNA 聚合酶及其相应 GC Buffer、DNA marker DL 2000、限制性内切酶, 均为 TaKaRa 公司产品; T4 DNA 连接酶购自 MBI 公司; PMD18-T 载体购自上海生工公司; pGL3-basic 荧光素酶基因表达载体由陈余清教授惠赠; 质粒小量提取纯化试剂盒、PCR 产物切胶回收试剂盒, 购自 Takara 公司; RPMI1640 培养基为四季青公司产品;

[收稿日期] 2008-06-26

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(KJ2008A052)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 临床检验诊断学实验中心, 2. 生物化学与分子生物学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 马黎丽(1981-), 女, 硕士研究生。

[通讯作者] 章 尧, 研究生导师, 教授, 本刊第 5 届常务编委。

其他试剂为国产分析纯试剂;所有引物由上海生工公司合成。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 PCR 扩增 hTERT 启动子** 以酚氯仿方法提取 HL-60 细胞基因组 DNA 作为模板。由于 hTERT 启动子序列中 GC 含量极高,为提高扩增效率和特异性,采用巢式 PCR 法进行扩增,自行设计外套和内套两对引物,并在内套引物上、下游 5' 端分别加入限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Hind* III 的酶切位点。外套引物为:上游 5'-GAAGTTTCTCGCCCTTAGATCCA AAC-3', 下游 5'-ACCAGCTCCTCAGCGACGACACC T-3'; 内套引物为:上游 5'-GGTACCAGTCTGGATT CCTGGGAAGTCC-3', 下游 5'-AAGCTTCAGCGCTGC CTGAAACTCGC-3' (画线部分为酶切位点)。第 1 轮 PCR 扩增体系为 50  $\mu$ l, 含 2  $\times$  GC Buffer 25  $\mu$ l, 4.0  $\mu$ l dNTPs, 外套引物上下游各 2.0  $\mu$ l, 模板 DNA 1.0  $\mu$ l, Ex Taq 聚合酶 0.5  $\mu$ l。PCR 条件:94  $^{\circ}$ C 3 min 后,5 个循环:94  $^{\circ}$ C 40 s,72  $^{\circ}$ C 90 s;10 个循环:94  $^{\circ}$ C 40 s,67  $^{\circ}$ C 90 s;30 个循环:94  $^{\circ}$ C 40 s,60  $^{\circ}$ C 40 s,72  $^{\circ}$ C 90 s;最后 72  $^{\circ}$ C 7 min;第 2 轮 PCR 扩增体系同上,仅将第 1 轮扩增产物稀释 100 倍作为模板,以内套引物进行扩增。PCR 条件:94  $^{\circ}$ C 3 min, 94  $^{\circ}$ C 40 s,60  $^{\circ}$ C 40 s,72  $^{\circ}$ C 90 s,进行 20 个循环,最后 72  $^{\circ}$ C 7 min,1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

**1.3.2 目的基因的克隆及测序** 感受态大肠埃希菌 JM109 的制备及连接产物的转化,均按常规方法进行。将 PCR 产物用低熔点的琼脂糖凝胶 (15 g/L) 电泳分离后,用切胶回收试剂盒回收纯化。将纯化的 PCR 产物以 A-T 连接方式克隆入 pDM18-T 载体。以连接产物按常规方法转化感受态的大肠埃希菌 JM109,然后涂布于含有氨苄西林 (100 mg/L) 的 LB 琼脂平板上,于 37  $^{\circ}$ C 培养 15 h。随机挑取白色菌落,提取质粒用 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定含有插入片断的质粒后,并进行 DNA 序列分析 (由大连宝生物公司完成)。

**1.3.3 表达载体的构建** 将重组 T 载体及 pGL3-basic 荧光素酶基因表达载体,分别用 *Kpn* I 和 *Hind* III 进行双酶切 (4 h),并经低熔点琼脂糖凝胶 (15 g/L) 电泳分离双酶切产物后,用切胶回收试剂盒回收并纯化。将经双酶切并回收的 PCR 产物和 pGL3-basic 荧光素酶基因表达载体,用 T4 DNA 连接酶于 22  $^{\circ}$ C 下连接 2 h,65  $^{\circ}$ C 灭活 10 min,将 hTERT 基因的启动子定向插入 pGL3-basic 荧光素酶基因表达载体中,即构建成 pGL3 hTERT/promoter 表达载体。

**1.3.4 表达载体的鉴定** 将重组质粒 pGL3 hTERT/promoter 用 *Kpn* I 和 *Hind* III 进行双酶切,以重组质粒 pGL3 hTERT/promoter 为模板,用内套引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增。

## 2 结果

**2.1 PCR 扩增 hTERT 启动子** PCR 扩增结果表明出现的特异性条带大小约 1 100 bp,与预期片段大小相一致 (见图 1)。

**2.2 pMD-18T-hTERTp 的酶切鉴定及 DNA 序列分析** 结果用 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切 pMD-18T-hTERTp,分别在 1 100 bp 和 2 700 bp 位置得到清晰的 DNA 条带 (见图 2),与理论结果相符合。DNA 测序结果显示,我们克隆的 hTERTp 序列与 GenBank (Accession No. 097365) 中 hTERTp 序列完全一致,长度为 1 084 bp。

**2.3 表达载体的酶切鉴定及 PCR 鉴定** 重组质粒 pGL3 hTERT/promoter 经 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切后,进行电泳分离,出现大小约为 1 100 bp 的条带 (见图 3)。以重组质粒 pGL3 hTERT/promoter 为模板,用内套引物 P1、P2 作为引物进行 PCR 扩增。取 PCR 产物进行电泳,出现大小约为 1 100 bp 的特异条带 (见图 4)。

**2.4 重组载体测序结果** 序列测定表明重组载体插入片段与 hTERT 启动子一致,且插入方向正确 (见图 5)。

## 3 讨论

端粒酶是一种逆转录酶,能以自身 RNA 为模板逆转录合成端粒的核糖核酸酶,其主要功能是在染色体末端添加端粒序列,使端粒维持在一定长度。端粒酶的激活是恶性肿瘤发生过程中的后期现象,使肿瘤细胞的端粒不再缩短而得以维持,从而获得了“永生性”。人端粒酶包括 3 个重要部分,即人端粒酶 RNA、人端粒酶相关蛋白和人端粒酶催化亚单位。近来的研究结果证实,端粒酶活性的调控机制对肿瘤的发生、发展及细胞衰老、永生性都起着重要作用。端粒酶活性的表达和调控对阐明肿瘤形成和发展进而应用于临床诊断和治疗都具有重要意义<sup>[4]</sup>。研究显示,端粒酶在 85% 以上的肿瘤细胞中呈现阳性表达,而在几乎所有的成人体细胞中不表达<sup>[5]</sup>。在端粒酶的组成成分中,hTERT 是端粒酶活性的决定性因素,在肿瘤发展过程中端粒酶活性与 hTERT 的过表达相关。hTERT 是近年来在端粒酶研究中发现的端粒酶激活的限速因素,通过对其启动子的调节而对 hTERT 的转录进行调节是主要的

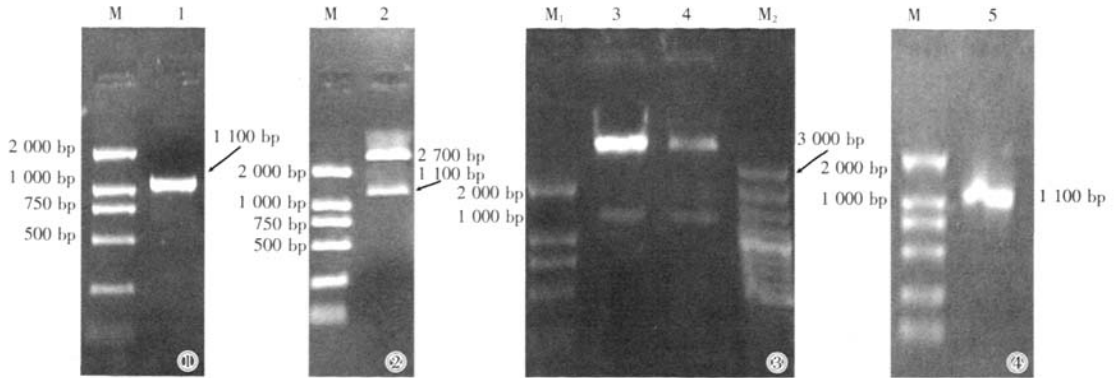
M, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>: DNA Marker; 1-4: 双酶切产物; 5: hTERT promoter

图1 hTERT启动子PCR产物 图2 PMD-18T-hTERTp质粒双酶切鉴定 图3 重组质粒pGL3hTERT/promoter双酶切鉴定  
图4 重组质粒做模板的PCR产物

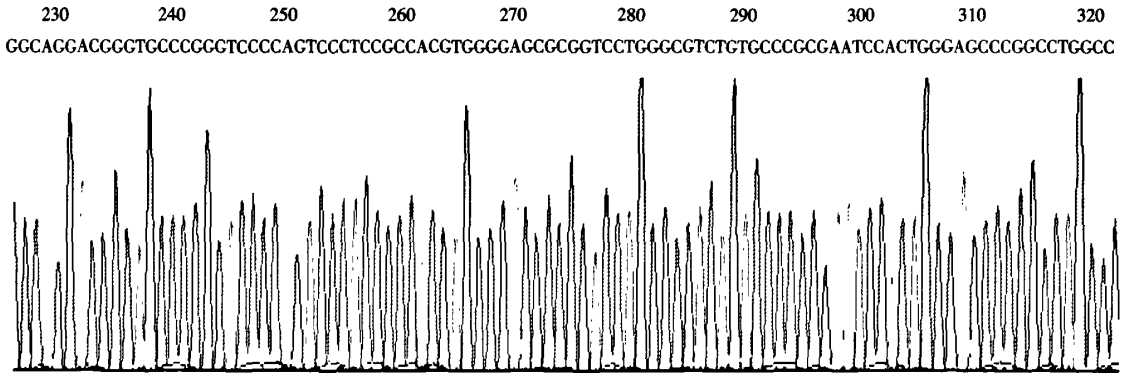


图5 重组质粒测序图

调节方式。因而, hTERT 基因表达的调控, 是端粒酶活性调控的中心环节。自  $As_2O_3$  被用于治疗早幼粒细胞白血病取得良好疗效后, 有关  $As_2O_3$  抑制端粒酶活性的报道不少<sup>[6]</sup>, 研究结果显示在不同的造血细胞恶性肿瘤中,  $As_2O_3$  可以通过活性氧类 (reactive oxygen species, ROS) 来抑制端粒酶活性<sup>[7]</sup>, 也可通过抑制影响端粒酶活性的转录因子 c-myc 和 Sp1 来抑制端粒酶活性。本实验室先前研究也已证实, 一定浓度的  $As_2O_3$  可明显抑制 HL-60 细胞端粒酶活性, 这很可能就是砷剂能有效治疗 APL 的分子机制之一。为了进一步揭示  $As_2O_3$  对 HL-60 细胞端粒酶 hTERT 作用的具体分子机制, 为  $As_2O_3$  的抗急性早幼粒细胞白血病治疗提供理论和实验依据。本实验采用巢式 PCR 方法克隆了位于转录起始位点上游 1 126 bp 到 43 bp 之间, 长度为 1 084 bp 的 hTERT 启动子片段, DNA 测序结果与 GenBank 中 hTERTp 序列完全一致, 该段序列中 GC 含量为 71.5%, 与文献报道相似<sup>[8,9]</sup>。由于 hTERT 启动子序列 GC 含量高, 我们在 PCR 过程中采用了

Takara 公司生产的针对高 GC 含量 DNA 序列的 Ex Taq 聚合酶和 GC Buffer。本研究将克隆的 hTERT 启动子插入到荧光素酶报告质粒 pGL3-basic 的荧光素酶基因上游, 构建成 pGL3-hTERTp 重组质粒, 经酶切鉴定及测序证实构建成功。重组载体构建的成功为我们以后进一步研究  $As_2O_3$  除了可通过抑制转录因子 c-myc 和 Sp1 来抑制端粒酶活性外, 是否还作用于其它的转录因子抑制 hTERT 表达, 提供了良好的工具。

#### [参 考 文 献]

- [1] Hirvonen R, Talvensaar-Mattila A, Pääkkö P, et al. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in T(1-2)NO breast carcinoma [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2003, 77(1): 85-91.
- [2] Yang JH, Briggs WH, Libby P, et al. Small mechanical strains selectively suppress matrix metalloproteinase-1 expression by human vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(11): 6 550-6 555.
- [3] 章尧, 赵燕, 陈昌杰. 三氧化二砷对 HL-60 细胞凋亡及其端粒酶 hTERT-mRNA 表达影响的实验研究 [J]. *中国药理学通报*, 2003, 19(2): 206-209.

# 基因芯片技术筛选血管瘤发生相关基因

张莉<sup>1</sup>, 张成书<sup>1</sup>, 王君<sup>1</sup>, 李旭文<sup>1</sup>, 葛树星<sup>1</sup>, 李光早<sup>1</sup>, 林晓曦<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的: 利用基因芯片技术寻找血管瘤与正常组织之间差异表达的基因, 初步探索血管瘤的发生机制。方法: 将 14 112 条 cDNA 用点样仪点在特制玻片上制备成表达谱芯片, 将来自同一患儿的血管瘤组织和正常组织的 mRNA 分别逆转录为 cDNA, 标记 Cy3 和 Cy5 两种荧光, 制备成 cDNA 探针, 与表达谱芯片杂交, 通过计算机扫描、数据处理筛选出差异表达的基因。结果: 血管瘤组织与正常组织共有 249 个差异表达基因, 其中下调基因 122 个, 上调基因 127 个。上调基因主要与细胞增生、血管形成、免疫细胞的黏附、细胞周期相关蛋白等有关; 下调基因主要与细胞凋亡、肿瘤抑制等有关。结论: 细胞增生相关基因的上调与凋亡相关基因的下调, 导致细胞增生与凋亡失调, 可能是引起血管瘤发病的原因。

**[关键词]** 血管瘤; 基因芯片; 发病机制

**[中国图书资料分类法分类号]** R 732.2 **[文献标识码]** A

## Identification of differentially expressed genes in proliferating hemangiomas by cDNA microarray analysis of gene expression profiles

ZHANG Li<sup>1</sup>, ZHANG Cheng-shu<sup>1</sup>, WANG Jun<sup>1</sup>, LI Xu-wen<sup>1</sup>, GE Shu-xing<sup>1</sup>, LI Guang-zao<sup>1</sup>, LIN Xiao-xi<sup>2</sup>

(1. Department of Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004;

2. Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Shanghai 9th Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200011, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the differentially expressed genes of proliferating hemangiomas and normal tissue by cDNA microarray analysis of gene expression profiles and to identify the key disease related genes. **Methods:** Samples were processed from total RNA and purified to mRNA, which was reverse transcribed and hybridized onto Biodoor Genechip expression microarrays. Gene expression analysis were performed to determine the differences between the proliferating hemangiomas and the normal tissue. **Results:** In proliferating hemangioma, 122 genes were up-regulated and 127 genes were down-regulated. Those over-expressed gene were mainly related to cell proliferation, angiogenesis, and immune cell adhesion, cell cycle-related protein, while the less-expressed genes were mainly related to cell apoptosis and tumor suppression. **Conclusions:** Over-expression of genes related to cell proliferation and less-expression of cell apoptosis related genes lead to imbalance between cell proliferation and apoptosis, which probably lead to the occurrence of hemangiomas.

**[Key words]** hemangioma; gene chip; pathogenesis

血管瘤是婴幼儿最常见的良性肿瘤, 发病率约 1%, 其发生机制与血管形成有关, 但确切机制尚不

明确。目前对血管瘤发病机制的研究方法多采用免疫组化、原位杂交、RT-PCR、DD-RT-PCR 等, 研究者选择几个与血管形成有关的因子进行研究, 虽然得出的结果证实了血管瘤的发生、发展与血管发生有关<sup>[1]</sup>, 但不能从整体上找出血管瘤发生、发展的途径和其分子机制, 得出的结果也犹如“盲人摸象”, 很难找出其发病机制的根本环节。本研究利用基因芯片技术大规模、高通量地对增生期血管瘤组织与其周围正常组织差异表达基因进行整体研究, 探讨血管瘤的发生机制。

[收稿日期] 2008-07-26

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(2005kj282)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院第一附属医院 整形外科, 安徽 蚌埠 233004; 2. 上海交通大学医学院附属第九人民医院 整复外科, 上海 200011

[作者简介] 张莉(1965-), 女, 博士, 研究生导师, 副主任医师, 副教授。

[4] Gu J, Fang B. Telomerase promoter-driven cancer gene therapy [J]. *Cancer Biol Ther*, 2003, 2(4 Suppl 1):64-70.

[5] Hahn WC. Role of telomeres and telomerase in the pathogenesis of human cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(10):2 034-2 043.

[6] Zhou C, Boggess JF, Bae-Jump V, et al. Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity by arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in endometrial carcinoma cells[J]. *Gynecol Oncol*, 2007, 105(1): 218-222.

[7] Zhang TC, Schmitt MT, Mumford JL. Effects of arsenic on

telomerase and telomeres in relation to cell proliferation and apoptosis in human keratinocytes and leukemia cells *in vitro*[J]. *Carcinogenesis*, 2003, 24(11):1 811-1 817.

[8] Horikawa I, Cable PL, Afshari C, et al. Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(4):826-830.

[9] 黄君健, 李杰之, 林坚, 等. 人端粒酶催化亚基 hTERT 基因启动子的克隆[J]. *生物技术通讯*, 1999, 10(3):167-170.