

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.02.003

热激蛋白 70B' 启动子调控的热诱导型载体 pHSP-shTERT 的构建及其对乳腺癌 MCF-7 细胞的抑制效应

李岩琦¹, 李静², 李海霞², 王雪芳², 朱燕², 叶凡², 张振中², 任雪玲²(1. 郑州大学医院 内科, 河南 郑州 450001; 2. 郑州大学 药学院 药物分析系, 河南 郑州 450001)

[摘要] **目的:** 构建靶向端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)的热激蛋白(heat shock protein, HSP)70B' 启动子调控的热诱导型 RNAi 表达载体, 观察热诱导条件下其在人乳腺癌 MCF-7 细胞内的 RNAi 效应及其对 MCF-7 细胞增殖和凋亡的影响。**方法:** PCR 扩增 HSP70B' 启动子序列, 用其构建热诱导型靶向 TERT 的重组载体并转染 MCF-7 细胞, 倒置荧光显微镜和流式细胞术检测 GFP 的表达, 优化转染和热诱导条件; 以未经热诱导的转染细胞为对照组, RT-PCR 和 Western blotting 检测重组载体转染与热诱导对 MCF-7 细胞内 GFP 与 TERT 的 mRNA 和蛋白表达的影响; MTT 实验和流式细胞术分别检测对 MCF-7 细胞增殖与凋亡的影响。**结果:** 成功构建热诱导型重组载体 pHSP-GFP、pHSP-shGFP 和 pHSP-shTERT; 在最适热诱导条件(42 °C、40 min)下, 共转染质粒 pHSP-shGFP 和 pCMV-GFP 的 MCF-7 细胞中 GFP 表达量显著低于对照组($t = -48.35, P = 0.00043$)。pHSP-shTERT 转染组 MCF-7 细胞内 TERT mRNA [$(12.24 \pm 1.96)\% \text{ vs } (80.18 \pm 2.28)\%$; $t = -286.5, P = 0.000012$]和蛋白 [$(1.64 \pm 0.42)\% \text{ vs } (63.45 \pm 3.12)\%$; $t = -31.37, P = 0.001$]的表达均显著下调, 细胞存活率显著下降 [$(58.93 \pm 2.95)\% \text{ vs } (91.22 \pm 4.16)\%$; $t = 15.747, P = 0.004$], 细胞凋亡率显著提高 [$(40.97 \pm 4.80)\% \text{ vs } (8.33 \pm 1.14)\%$; $t = -11.672, P = 0.007$]。**结论:** 靶向 TERT 的 pHSP-shTERT 载体可以在热诱导条件下实现 MCF-7 细胞内靶基因的沉默, 从而抑制 MCF-7 细胞的生长, 诱导该细胞的凋亡。

[关键词] 热激蛋白; 70B; 启动子; 热诱导; RNA 干扰; 乳腺癌; MCF-7 细胞; 绿色荧光蛋白; 端粒酶逆转录酶

[中图分类号] R737.9; Q78

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)02-0130-06

Construction of an HSP 70B' promoter-driven heat-inducible vectors pHSP-shTERT and its anti-proliferative effect in breast cancer MCF-7 cells

Li Yanqi¹, Li Jing², Li Haixia², Wang Xuefang², Zhu Yan², Ye Fan², Zhang Zhenzhong², Ren Xueling²(1. Internal Medicine, Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan, China; 2. Department of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a novel heat-inducible RNAi vector under the control of the heat shock protein 70B' (HSP70B') promoter and to examine the vector's activities in RNAi induction and proliferation and apoptosis regulation in MCF-7 cells under the condition of heat shock. **Methods:** An HSP70B' promoter-driven heat-inducible RNAi vectors against telomerase reverse transcriptase (TERT), pHSP-shTERT, was constructed through PCR-amplification of the HSP70B' promoter and subsequent subcloning. MCF cells were optimally transfected with this vector with GFP as an indicator and flow cytometric analysis as a confirmatory assay. Untransfected MCF-7 cells were used as a control. TERT mRNA and protein levels were analyzed by RT-PCR and Western blotting, respectively. Cell proliferation and apoptosis were determined by MTT assay and flow cytometry, respectively. **Results:** As compared with control cells, cells transfected with newly constructed vector pHSP-shTERT had significantly lower levels of TERT mRNA [$(12.24 \pm 1.96)\% \text{ vs } (80.18 \pm 2.28)\%$; $t = -286.5, P = 0.000012$] and protein [$(1.64 \pm 0.42)\% \text{ vs } (63.45 \pm 3.12)\%$; $t = -31.37,$

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 381273451)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 381273451)

[作者简介] 李岩琦(1964-),女,河南省郑州市人,主治医师,主要从事内科疾病的治疗与研究。E-mail: drs1998@126.com

[通信作者] 任雪玲(Ren Xueling, corresponding author), E-mail: renxueling@zzu.edu.cn

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20140331.1720.003.html>

$P=0.001$), significantly decreased cell viability ($[58.93 \pm 2.95]\%$ vs $[91.22 \pm 4.16]\%$; $t=15.747$, $P=0.004$) and significantly higher apoptosis rate ($[40.97 \pm 4.80]\%$ vs $[8.33 \pm 1.14]\%$; $t=-11.672$, $P=0.007$). **Conclusions:** The novel heat inducible vector pHSP-shTERT constructed against *TERT* was effective to silence the *TERT* gene and suppress the proliferation and induce the apoptosis of MCF-7 cells under the condition of heat shock.

[**Key words**] heat shock protein(HSP); 70B'; promoter; heat-inducible; RNAi; breast cancer; MCF-cells; GFP; telomerase reverse transcriptase(TERT)

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(2): 130-135]

RNA 干扰(RNAi)已成为肿瘤基因治疗的主要技术之一^[1],但是如何实现 RNAi 技术的靶向性已成为其临床应用的关键问题之一^[2]。通过特定启动子调控治疗基因的表达已成为实现基因治疗靶向性的有效途径与方法^[3]。本课题组在前期研究^[4]中设计并构建得到载脂蛋白 A-I 调控的 RNAi 表达载体,实现了 RNAi 的肝组织特异性。本研究尝试构建诱导启动子调控的 RNAi 表达载体,实现特定条件下的 RNAi 效应。热激蛋白(heat shock protein, HSP)是自然界中广泛存在的一类热应激蛋白,当机体内细胞或组织温度升高后会导致热休克反应,从而导致 HSP 表达量的急速增长^[5]。研究^[6]显示,HSP 表达量的增加属于转录调控机制。因此,HSP 启动子可以在特定条件下调控外源基因的表达,从而实现基因治疗的靶向性^[7-8]。70B'是常见的 HSP 启动子之一,当正常细胞受到加热、缺氧等刺激时,HSP70B'的表达量可以成千倍地增加^[9]。研究^[10]表明,端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)是肿瘤生物治疗的理想作用靶点,通过抑制 TERT 的表达可以抑制肿瘤细胞的生长。因此,本研究构建 HSP70B'启动子调控的靶向 *TERT* 的 RNAi 表达载体,观察热诱导条件下其在人乳腺癌 MCF-7 细胞内的 RNAi 效应及其对 MCF-7 细胞增殖和凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人乳腺癌 MCF-7 细胞由河南省医学科学研究所惠赠。GFP 表达载体 pCMV-GFP、分别靶向 GFP 和 TERT 的 RNAi 表达载体 pCMV-shGFP 和 pCMV-shTERT 由本实验室构建并保存,大肠杆菌 Top 10 由本实验室保存。T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶以及 pfu DNA 聚合酶均购自 Promega 公司,限制性内切酶 *Pst* I、*Vsp* I、*Bam*H I 等均购自 Fermentas 公司,DMEM 培养基和胎牛血清购自 Hyclone 公司,引物合成及 DNA 测序由北京三博远志生物技术公司完成。

1.2 HSP70B' 启动子的 PCR 扩增

根据 GenBank 数据库中 HSP70B'启动子序列(GenBank No. NT004487)设计引物:上游引物 5'-GGC ATT AAT AGC CCG GAG GAG CTA GAA CCT-TCC-3',下游引物 5'-CCC GCT AGC TTC TTG TCG-GAT GCT GGA GGC-3'。以 MCF-7 细胞基因组为模板进行 PCR 扩增,扩增产物经酚抽提法纯化并经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测鉴定。

1.3 热诱导型 RNAi 载体 pHSP-shTERT 的构建

HSP70B'启动子片段定向插入到 pCMV-GFP 载体的 *Vsp* I / *Nhe* I 位点中,构建得到 HSP70B'启动子调控的 GFP 报告载体 pHSP-GFP;插入到 RNAi 表达载体 pCMV-shGFP 的 *Bgl* II / *Pst* I 酶切位点,得到靶向 GFP 的基因沉默载体 pHSP-shGFP。

根据 *hTERT* mRNA 靶序列(5'-TTC CGC CAG-GTG TCCTGC CTG AAG GAG CT-3')设计 shRNA 模板序列,经化学合成得到含有 shRNA 模板序列的 DNA 寡核苷酸链,插入到 RNAi 载体 pCMV-shGFP 的 *Eco*R I / *Xba* I 酶切位点,构建得到靶向 *TERT* 的 RNAi 载体 pCMV-shTERT。以 HSP70B'的启动子替换载体 pCMV-shTERT 的 CMV 启动子,得到热诱导型 RNAi 载体 pHSP-shTERT。

1.4 体外细胞转染和热诱导条件的优化

按照体外转染试剂 ExGen500 的操作说明,将热诱导型 GFP 表达载体 pHSP-GFP 转染至 MCF-7 细胞,转染 24 h 后在不同温度(38 ~ 42 °C)下培养不同时间(20 ~ 60 min),继续在常规条件下培养 24 h,倒置荧光显微镜观察 GFP 的表达,选择最适热诱导温度与时间进行下一步实验。

1.5 流式细胞术检测 pHSP-shGFP、pCMV-GFP 共转染与热诱导对 MCF-7 细胞 GFP 表达的影响

将热诱导型 RNAi 载体 pHSP-shGFP 与 GFP 表达载体 pCMV-GFP 按照质量比 1:1 共转染至 MCF-7 细胞,转染 24 h 后 42 °C 热诱导 40 min;以未经热诱导的 MCF-7 转染细胞为对照组。转染 48 h 后,胰酶消化细胞,加入 3 ml 培养基吹打成单细胞悬液。400 × *g* 离心 10 min 收集细胞,以 PBS 洗涤,最后以

1 ml PBS 重悬成单细胞悬液, 流式细胞仪检测 GFP 表达效率。

1.6 RT-PCR 检测 RNAi 载体转染与热诱导对 MCF-7 细胞 GFP 与 TERT mRNA 表达的影响

按细胞 1.2×10^4 个/孔将对数生长期的 MCF-7 细胞接种于 96 孔板, 共转染 pHSP-shGFP 与 pCMV-GFP 或转染 pHSP-shTERT, 24 h 后 42 °C 热诱导 40 min, 以未经热诱导的 MCF-7 转染细胞作为对照组。转染 48 h 后, 胰酶消化收集细胞, 采用 TRIzol 法提取总 RNA。首先取 2 μ l RNA 进行逆转录, 然后采用特异性引物进行 PCR 扩增。GFP 引物: 上游 5'-CTGGTTCGAGCTGGACGGCGAC-3'; 下游 5'-CGTCCTCCTTGAAGTCGATGC-3'。TERT 引物: 上游 5'-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3'; 下游 5'-CACGACGTAGTCCATGTTCA-3'。肌动蛋白(β -actin)引物: 上游 5'-CTGGGACGACATGGAGAAAA-3', 下游 5'-AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC-3'。PCR 产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7 Western blotting 检测 pHSP-shTERT 转染与热诱导对 MCF-7 细胞 TERT 蛋白表达的影响

MCF-7 细胞转染 pHSP-shTERT 并经热诱导培养后, 胰酶消化、收集细胞; 以未经热诱导的 MCF-7 转染细胞为对照组。加入 RIPA 裂解液, 冰浴条件下提取蛋白。BCA 法进行蛋白定量, 采用 SDS-PAGE 法进行垂直电泳分析, 经转膜、封闭后, 加入 TERT 抗体(1:1 000)和 β -actin 抗体(1:2 000)于 4 °C 温育 12 h。TBST 洗涤后加入二抗, 室温反应 1 h。然后以 ECL 法进行显影、定影, 采用 Quantity One 软件进行蛋白质条带的密度分析。

1.8 MTT 法检测 pHSP-shTERT 转染与热诱导对 MCF-7 细胞增殖的影响

实验组 MCF-7 细胞转染 pHSP-shTERT 载体并经热诱导培养后, 弃去培养基, 加入含有 0.5 mg/ml MTT 的新鲜培养基, 继续培养 4 h, 弃去培养基, 加入 100 μ l/孔二甲亚砷, 测定 570 nm 的光密度(D)值。以未经热诱导的转染载体 pHSP-shTERT 的 MCF-7 细胞作为对照组, 未经转染的 MCF-7 细胞为空白对照组, 仅加入培养基的孔为空白组, 空白对照组和空白组未经热诱导。每孔设 3 复孔, 取平均 D 值计算细胞存活率。细胞存活率(%) = $(D_{\text{实验组}} - D_{\text{空白组}}) / (D_{\text{空白对照组}} - D_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

1.9 流式细胞术检测 pHSP-shTERT 转染与热诱导对 MCF-7 细胞凋亡的影响

实验组 MCF-7 细胞转染 pHSP-shTERT 载体并经热诱导培养后, 胰酶消化并收集细胞。以 400 μ l

结合缓冲液重悬细胞, 加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI, 避光反应 15 min, 流式细胞仪测定细胞凋亡。实验中未转染载体 pHSP-shTERT 且未经热诱导的 MCF-7 转染细胞为对照组。MCF-7 细胞空白对照组、未经热诱导的转染载体 pHSP-shTERT 的 MCF-7 细胞对照组进行相似处理。

1.10 统计学处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 20.0 统计软件, 两样本的均数比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HSP70B' 启动子的扩增和重组载体的成功构建

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果(图 1A)显示, 在 400 bp 和 500 bp 之间有一条特异性 DNA 条带, 与 HSP70B' 启动子理论值(416 bp)一致, 且图中未见其他非特异性条带。pHSP-GFP 的酶切鉴定结果(图 1B)显示, 在 800 bp 处和 3 000 bp 处出现两条目的 DNA 条带, 与理论酶切结果(865 bp, 3 685 bp)相一致。酶切阳性克隆进一步经测序验证, 结果与 GenBank 中序列完全一致。

热诱导型 RNAi 表达质粒 pHSP-shGFP 和 pHSP-shTERT 的酶切鉴定结果(图 1C)显示, 在 1 kb 处和 8 kb 处出现目的 DNA 条带, 与理论酶切结果(pHSP-shGFP: 936 bp 和 6 853 bp; pHSP-shTERT: 946 bp 和 6 853 bp)相一致。以上鉴定结果提示, 热诱导型 RNAi 载体 pHSP-shGFP 和 pHSP-shTERT 构建成功。

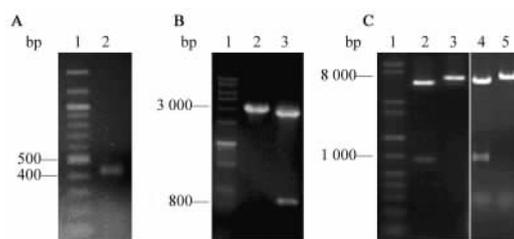


图 1 热诱导型重组载体的构建与鉴定

Fig. 1 Construction and identification of heat-inducible recombinant vectors

A: Analysis of PCR product of HSP70B' promoter.

1: DNA marker, 2: PCR product;

B: Analysis of pHSP-GFP. 1: DNA marker. 2: pHSP-GFP;

3: pHSP-GFP digested by *Pst* I; C: Analysis of heat-inducible

RNAi vectors pHSP-shGFP and pHSP-shTERT; 1: DNA marker,

2: pHSP-shGFP digested by *Vsp* I/*Bam*H I; 3: pHSP-shGFP;

4: pHSP-shTERT digested by *Vsp* I/*Bam*H I; 5: pHSP-TERT

2.2 pHSP-GFP 的体外转染与热诱导表达

荧光显微镜观察结果(图 2)显示,随着诱导温度的不断提高,GFP 的表达量不断增加。当诱导温度达到 42 °C 时,GFP 的表达量明显增加;当培养时间达到 40 min 时,GFP 的表达量几乎达到最大;继续延长培养时间,GFP 的表达量没有明显增加,但细胞形态开始变化,细胞活性明显减弱。确定最佳热诱导条件为 42 °C 诱导 40 min,采用此条件进行后续实验。

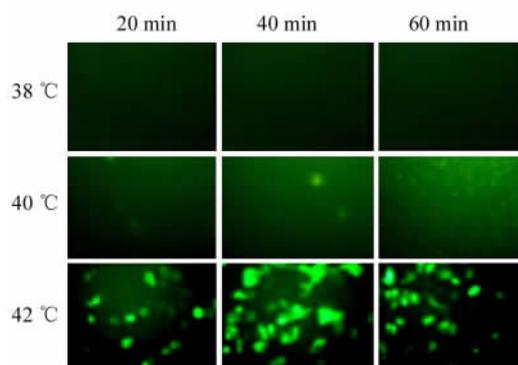


图 2 MCF-7 细胞热诱导条件的优化(×200)
Fig. 2 Optimization of heat-shock conditions in MCF-7 cells(×200)

2.3 pHSP-shGFP 的体外转染产生对 GFP mRNA 的 RNAi 效应

RT-PCR 结果(图 3)显示,与对照组相比,转染实验组中 GFP mRNA 的表达率下降了(72.08 ± 0.79)%。流式细胞仪检测(图 4)显示,实验组中 GFP 的表达率显著低于未经热诱导的对照组 [(17.12 ± 0.47)% vs (87.40 ± 2.92)% ; $t = -48.35, P = 0.00043$]。

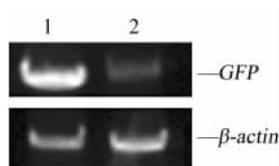


图 3 pHSP-shGFP 在 MCF-7 细胞内对 GFP mRNA 产生 RNAi 效应
Fig. 3 pHSP-shGFP vector produced a RNAi effect on GFP mRNA in MCF-7 cells

1: Transfected MCF-7 cells without heat shock
2: Transfected MCF-7 cells with heat shock

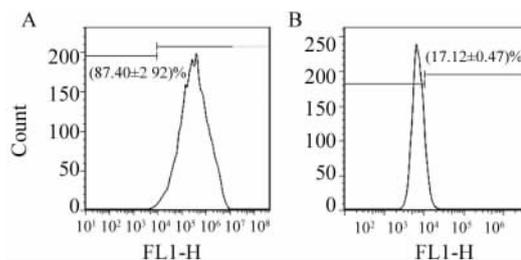


图 4 流式术检测 pHSP-shGFP 转染后 MCF-7 细胞 GFP 的表达

Fig. 4 Expression of GFP in MCF-7 cells transfected with HSP-shGFP detected by FCM

A: Transfected MCF-7 cells without heat shock
B: Transfected MCF-7 cells with heat shock

2.4 pHSP-shTERT 转染并热诱导抑制 MCF-7 细胞 TERT mRNA 和蛋白的表达

RT-PCR 检测结果(图 5A)显示,与未经热诱导的对照组相比,当细胞在 42 °C 培养 40 min 后, MCF-7 细胞内 TERT mRNA 的表达显著下调 [(12.24 ± 1.96)% vs (80.18 ± 2.28)% ; $t = -286.5, P = 0.000012$]。Western blotting 检测结果(图 5B)显示,实验组中靶基因蛋白表达效率显著下降 [(1.64 ± 0.42)% vs (63.45 ± 3.12)% ; $t = -31.37, P = 0.001$]。

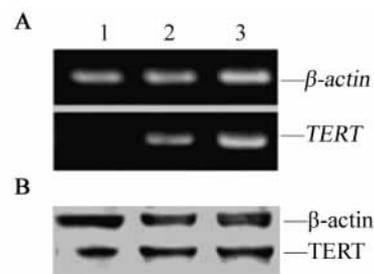


图 5 pHSP-shTERT 转染后热诱导抑制 MCF-7 细胞 TERT mRNA 和蛋白的表达

Fig. 5 Expression of TERT mRNA and protein in MCF-7 cells was restrained by hHSP-shTERT transfection and thermal induction

A: RT-PCR; B: Western blotting. 1: Transfected MCF-7 cells with heat shock; 2: Transfected MCF-7 cells without heat shock, 3: Un-transfected MCF-7 cells

2.5 pHSP-shTERT 转染并热诱导影响 MCF-7 细胞的增殖和凋亡

MTT 检测结果显示,与未热诱导对照组相比,当细胞经 42 °C 热诱导 40 min 后,细胞存活率显著

下降[(58.93 ± 2.95)% vs (91.22 ± 4.16)% ; $t = 15.747, P = 0.004$]; 流式细胞术检测结果(图6)显

示, 实验组细胞凋亡率明显升高[(40.97 ± 4.80)% vs (8.33 ± 1.14)% ; $t = -11.672, P = 0.007$]。

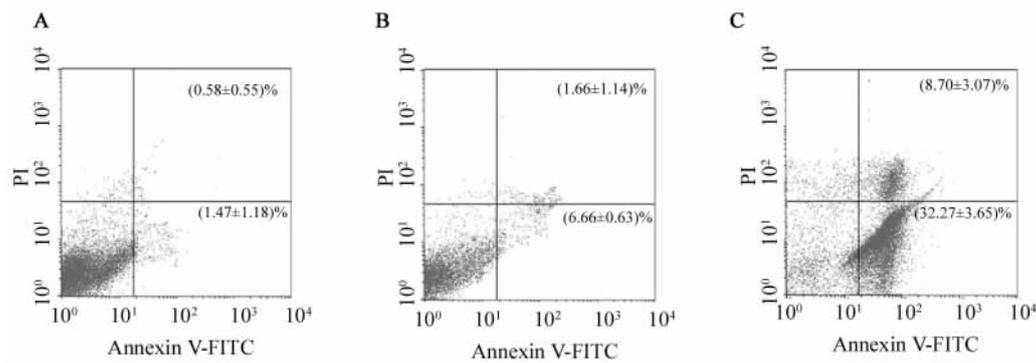


图6 转染 pHSP-shTERT 可以在热激条件下促进 MCF-7 细胞的凋亡

Fig. 6 pHSP-shTERT transfection promoted the apoptosis of MCF-7 cells under the condition of heat shock

1: Transfected MCF-7 cells with heat shock; 2: Transfected MCF-7 cells without heat shock; 3: Un-transfected MCF-7 cells

3 讨论

HSP70B'是 HSP70 家族中重要的一员, 它不仅在多种应激状态下的细胞内高表达^[11-12], 而且可以作为分子伴侣参与蛋白质的合成、折叠、装配等过程^[13]。由于 HSP70B'的表达需要热诱导转录因子的参与, 因此 HSP70B'启动子可作为热诱导启动子调控外源基因的表达^[14-16]。研究^[17]显示, HSP70B'启动子的热诱导性与其结构密切相关。HSP70B'启动子缺乏典型的 TATA box 和 CAAT box 序列, 但是它含有 GATA box 和 GAA/TTC box, 而且含有四个热激元件保守重复序列 GAA/TCC, HSP70B'启动子的热诱导性受到这四个热激元件调控, 因此, 本研究选择 -299 ~ +18 bp 区域作为 HSP70B'启动子的克隆目标。

本研究以 GFP 作为报告蛋白^[18], 通过绿色荧光的表达考察 HSP70B'启动子的活性。首先, 以 HSP70B'启动子替换 GFP 表达载体 pCMV-GFP 上 CMV 启动子, 构建热诱导型的绿色荧光表达载体 pHSP-GFP; 然后, 将重组载体 pHSP-GFP 转染 MCF-7 细胞, 通过优化得到最佳热诱导条件: 42 °C 温育 40 min。接着将 HSP70B'启动子替换 RNAi 表达载体 pCMV-RNAi 上的 CMV 启动子。由于载体 pCMV-RNAi 上含有靶向 GFP 的 shRNA 序列, 因此构建的重组载体 pHSP-RNAi 就是以 HSP70B'调控的以 GFP 为靶点的 RNAi 表达载体。将重组载体 pHSP-RNAi 与绿色荧光表达载体 pCMV-GFP 共转染至 MCF-7 细胞, 转染 48 h 后, 细胞内有大量 GFP 的表

达。但是当转染细胞在 42 °C 条件下温育 40 min 后, GFP 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著下降。结果表明, 在热激条件下, HSP70B'启动子可以调控靶向 GFP 的 shRNA 的表达, 从而下调 GFP mRNA 表达, 从而实现热诱导条件下的 RNAi 效应。

为进一步检测热诱导型 RNAi 表达载体应用于肿瘤基因治疗的可行性, 本研究构建了靶向人 TERT 的热诱导型 RNAi 表达载体。TERT 的表达与端粒酶的活性密切相关, 而端粒酶在约 85% 的恶性肿瘤细胞中表达, 在正常细胞中几乎不表达。端粒酶的激活是恶性肿瘤发生、发展过程中的关键因素^[19-20]。已有研究^[10, 21]表明, 采用翻译核苷酸技术或 RNAi 技术抑制 TERT 的表达可以显著抑制肿瘤细胞的增殖。在本研究中, 构建得到了靶向 TERT 的热诱导型 RNAi 表达载体 pHSP-TERT, 该载体通过热激作用不但可以显著下调靶基因的表达, 实现 RNAi 效应; 同时能够有效抑制人乳腺癌细胞的生长, 显著诱导该细胞凋亡, 表现出肿瘤治疗活性, 这为热诱导应用于肿瘤靶向基因治疗的进一步研究奠定了实验基础。

[参考文献]

[1] 蔡艳玲, 罗小玲, 葛连英, 等. pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA 对结直肠癌 SW480 细胞裸鼠移植瘤的抑制 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2012, 19(1): 72-76.
 [2] Wang L, Shi J, Zhang H, et al. Synergistic anticancer effect of RNAi and photothermal therapy mediated by functionalized single-walled carbon nanotubes [J]. Biomaterials, 2013, 34(1): 262-274.
 [3] Li W, Li DM, Chen K, et al. Development of a gene therapy

- strategy to target hepatocellular carcinoma based inhibition of protein phosphatase 2A using the α -fetoprotein promoter enhancer and pgk promoter: An vitro and in vivo study [J/OL]. BMC Cancer, 2012, 12: 547-556.
- [4] Ren X, Ma Y, Xu M, et al. Construction, modification and evaluation of apolipoprotein A-I promoter-driven shRNA expression vectors against hTERT [J]. Plasmid, 2011, 65(1): 42-50.
- [5] 朱静, 马云宝. 热休克蛋白的研究与临床应用 [J]. 标记免疫分析与临床, 2008, 15(5): 332-334.
- [6] Wu C. Heat shock transcription factors: Structure and regulation [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 1995, 11: 441-469.
- [7] Chen P, Kanehira K, Sonezaki S, et al. Detection of cellular response to titanium dioxide nanoparticle agglomerates by sensor cells using heat shock protein promoter [J]. Biotechnol Bioeng, 2012, 109(12): 3112-3118.
- [8] Fogar P, Navaglia F, Basso D, et al. Heat-induced transcription of diphtheria toxin A or its variants, CRM176 and CRM197: Implications for pancreatic cancer gene therapy [J]. Cancer Gene Ther, 2010, 17(1): 58-68.
- [9] 黄倩, 李川源. 使用热休克蛋白基因启动子调控靶基因在肿瘤局部表达 [J]. 中华病理学杂志, 2001, 30(3): 198-202.
- [10] Zhang W, Xing L. RNAi gene therapy of SiHa cells via targeting human TERT induces growth inhibition and enhances radiosensitivity [J]. Int J Oncol, 2013, 43(4): 1228-1234.
- [11] Jostins L, Ripke S, Weersma RK, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease [J]. Nature, 2012, 491(7422): 119-124.
- [12] Huang F, Huang JP, Pan JY, et al. Intracellular heat shock protein 70: A possible therapeutic target for preventing postoperative atrial fibrillation [J]. Pharmazie, 2012, 67(9): 747-755.
- [13] Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, et al. Heat shock proteins in cancer: Chaperones of tumorigenesis [J]. Trends Biochem Sci, 2006, 31(3): 164-172.
- [14] Lee YJ, Galoforo SS, Battle P, et al. Replicating adenoviral vector-mediated transfer of a heat-inducible double suicide gene for gene therapy [J]. Cancer Gene Ther, 2001, 8(6): 397-404.
- [15] Vilaboa N, Voellmy R. Regulatable gene expression systems for gene therapy [J]. Curr Gene Ther, 2006, 6(4): 421-438.
- [16] Cebrión V, Martín-Saavedra F, Gómez L, et al. Enhancing of plasmonic photothermal therapy through heat-inducible transgene activity [J]. Nanomedicine, 2013, 9(5): 646-656.
- [17] Noonan EJ, Place RF, Giardina C, et al. HSP70B' regulation and function [J]. Cell Stress Chaperones, 2007, 12(4): 393-402.
- [18] Rreington SJ. Green fluorescent protein: A perspective [J]. Protein Sci, 2011, 20(9): 1509-1519.
- [19] Lokody I. Biomarkers: TERT marks recurrence of urothelial cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(1): 11.
- [20] Bojesen SE, Pooley KA, Johnatty SE, et al. Multiple independent variants at the TERT locus are associated with telomere length and risks of breast and ovarian cancer [J]. Nat Genet. 2013, 45(4): 371-384.
- [21] Xie M, Chen Q, He S, et al. Silencing of the human TERT gene by RNAi inhibits A549 lung adenocarcinoma cell growth in vitro and in vivo [J]. Oncol Rep, 2011, 26(4): 1019-1027.
- [收稿日期] 2013 - 12 - 04 [修回日期] 2014 - 02 - 22
[本文编辑] 黄静怡

· 科技动态 ·

SIRT2 介导的组蛋白 H3K18 去乙酰化在细菌感染中的作用

组蛋白的乙酰化修饰常参与基因转录的正向调控,与之相对的组蛋白去乙酰化过程常介导基因的沉默。组蛋白的去乙酰化过程由组蛋白的去乙酰化酶(histone deacetylases, HDAC)催化完成。在哺乳动物中,HDAC 分为三类,第一类包括 HDAC-1、2、3、8,第二类包括 HDAC-4、5、7、9、10,第三类为 sirtuin(SIRT)家族,包括 SIRT1~7 七个成员。

法国巴斯德研究所病原宿主相互作用实验室长期致力于探讨病原体与宿主的相互作用,尤其是李斯特菌感染过程中细菌对宿主染色体结构的影响。较早研究发现,李斯特菌感染后宿主细胞组蛋白 H3 发生了去乙酰化。后续研究发现,在感染过程中是 H3K18 位点发生了去乙酰化,同时也在感染小鼠体内证实了该发现。该成果发表在 2013 年 8 月出版的 *Science* 杂志上,作者采用 HDAC 阻断剂、siRNA 干扰和突变体失活转染手段检测发现,是 SIRT2 催化了 H3K18 的去乙酰化。SIRT2 主要分布在细胞质,其在感染中可以转位到细胞核,这种转位依赖于李斯特菌的毒力因子 InlB、宿主细胞的 c-Met 受体及其下游 PI3K/AKT 信号通路。阻断此通路后,感染情况下 SIRT2 就不能转位到细胞核,且 H3K18 的乙酰化水平不会降低。同时,细胞的转录组分析发现,共有 272 个 SIRT2 依赖的基因在感染过程中下调这一结果以芯片进行了验证。最后,用李斯特菌感染敲除 SIRT2 的小鼠,发现其脾脏中李斯特菌数量减少,且 H3K18 乙酰化水平没有降低。综上,作者认为,在李斯特菌感染过程中,通过释放毒力因子 InlB 与宿主细胞 c-Met 受体结合,激活了下游 PI3K/AKT 信号通路,使得 SIRT2 从细胞质移位到细胞核,介导了 H3K18 的去乙酰化,调控了相关基因的表达,从而参与细菌对宿主的感染。

该研究揭示了感染过程中细菌可以直接影响宿主的组蛋白修饰,且这种修饰不同于以往报道的 PRR 信号(如 TLR 信号、RIG-I 信号等)对组蛋白修饰的影响。另外,该论文也首次报道了 SIRT2 特定调控 H3K18 的去乙酰化,并且在感染过程中发生了从胞质到胞核的转位。该项工作为深入理解病原体和宿主相互作用提供了一个全新的视角。

[赵锴 摘译, 张迁 审阅. Eskandarian HA, Impens F, Nahori MA, et al. *Science*, 2013, 341(6145): 1238858.]