

秩和检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 各处理组细胞膜 Na^+ , K^+ -ATP酶活性 正常对照、砷染毒组、磷酸钠高、低剂量组 Na^+ , K^+ -ATP酶含量分别为 (0.962 ± 0.081) , (0.544 ± 0.037) , (0.761 ± 0.067) 和 $(0.654 \pm 0.095) \text{ U}/(\text{mg protein} \cdot \text{h})$, 磷酸钠高、低剂量组细胞膜

表 1 不同处理组 Vero细胞膜磷脂含量比较 ($\bar{x} \pm s$, mg/mL, $n = 6$)

组别 (mg/L)	磷脂酰丝氨酸	磷脂酰胆碱	磷脂酰乙醇胺	神经鞘磷脂
正常对照组	0.087 ± 0.003	0.588 ± 0.105	0.127 ± 0.053	0.071 ± 0.029
砷染毒组	0.051 ± 0.018^a	0.240 ± 0.038^a	0.073 ± 0.030^a	0.047 ± 0.121^a
砷 + 磷酸钠				
2.20 + 69.00	0.083 ± 0.005^b	0.506 ± 0.073^b	0.101 ± 0.237^b	0.066 ± 0.003^b
2.20 + 17.25	0.074 ± 0.009^b	0.367 ± 0.053^{ab}	0.085 ± 0.007^a	0.058 ± 0.005^{ab}

注:与正常对照组比较, $aP < 0.05$ 与砷染毒组比较, $bP < 0.05$ 。

3 讨 论

本实验结果表明,磷酸钠可保护砷对细胞膜 Na^+ , K^+ -ATP酶和膜磷脂的损伤。这与砷和磷在元素周期表中同属一族,化学性质相似,均具有从负三价到正五价的价态变化,这大分子磷对无机砷有竞争作用使得进一步证明。砷中毒可使细胞膜的磷脂组分下降,可能与砷对抗氧化系统功能有关,也与砷本身能直接参与超氧阴离子的生成有关^[8]。膜磷脂组分改变对细胞功能具有重要影响^[9]。磷脂组成的脂质双层膜是各种物质进入细胞的屏障,补充磷酸钠可因磷竞争性减轻砷的毒性使膜磷脂损伤减轻。王萍等^[10]就磷与砷的竞争机制,在农业方面进行了相关研究,结果表明,砷与磷之间存在竞争,与本实验结果基本一致。磷酸钠可以竞争结合无机砷,减少砷置换的磷基团,从而减少砷取代正常生化反应中的磷酸和参与氧化磷酸化的过程,减轻对多种酶的活性抑制,起到保护作用。这也从另一方面提示砷对细胞的毒性作用机制可能是氧化与非氧化机制共同作用的结果。

参考文献

[1] Kapaj S, Feteroson H, Liber K, et al Human health effects from chronic arsenic poisoning—a review [J]. Environ Sci Health

Na^+ , K^+ -ATP酶活性高于砷染毒组 ($P < 0.05$)。

2.2 不同处理组 Vero细胞膜磷脂主要组分含量 (表 1) 砷染毒组 4种细胞膜磷脂含量均低于正常对照组 ($P < 0.05$), 磷酸钠高剂量组 4种磷脂含量分别高于砷染毒组; 磷酸钠低剂量组细胞膜磷脂酰丝氨酸、磷脂酰胆碱含量高于砷染毒组 ($P < 0.05$)。

2006 41: 2399–2428

[2] Xia Y, Liu J An overview on chronic arsenism via drinking water in PR China [J]. Toxicology 2004, 198: 25–29

[3] 孙鲜策, 蔡竹, 杨光, 等. 抗坏血酸对染砷小鼠肝脏氧化损伤拮抗作用 [J]. 中国公共卫生, 2009, 25(11): 1306–1308

[4] 王婷婷, 刘继文, 王生玲. 磷制剂对砷染毒细胞增殖抑制作用影响的实验研究 [J]. 地方病通报, 2007, 26(3): 1–4

[5] 王心如, 周宗灿. 毒理学基础 [M]. 5版, 北京: 人民卫生出版社, 2007: 121–125.

[6] Dodge JT, Mitchell TV, Hanahan DJ The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes [J]. Arch Biochem Biophys, 1963, 100(1): 119–132.

[7] 邱敬芝. 磷制剂抗砷毒性作用实验研究 [D]. 新疆医科大学, 2006: 12

[8] 王茜, 贾汉, 李树林. 砷对小鼠肝脏磷脂的影响及 VE 的保护作用 [J]. 中国公共卫生, 2004, 20(8): 961–962

[9] 黄沛力, 王晖, 张淑华, 等. Mn^{2+} 和 Mn^{3+} 对大鼠肝细胞膜的毒性作用 [J]. 毒理学杂志, 2007, 21(6): 481–482

[10] 王萍, 胡江, 冉伟, 等. 提高供磷可缓解砷对番茄的胁迫作用 [J]. 土壤学报, 2008, 45(3): 503–509

收稿日期: 2010-05-17 (解学魁编辑 孔繁学校对)

【实验研究】

人甲状腺鳞癌细胞中端粒酶启动子功能分析*

张蕾¹, 金辉², 田力¹, 李伟伟¹, 李鹏飞¹

摘 要: 目的 观察不同长度的人端粒酶催化亚单位 (hTERT) 的启动子对启动增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 能力的差异, 评价启动子启动功能与长度的关系。方法 克隆 4 段不同长度的端粒酶基因起始位点 (ATG) 上游序列长约 2 068、1 135、333 和 142 bp 的启动子片段, 通过观察 EGFP 的荧光强度, 确定启动效率。结果 显微镜观察荧光亮度及荧光分光光度计检测荧光强度随着启动子长度的缩短而减弱, 荧光强度由高至低依次为 8 56、7 81、6 88、3 62。结论 人端粒酶的表达强度及端粒酶的活性变化与其启动子的长度有关, 而肿瘤细胞的端粒酶表达相对增强, 可通过下调启动子活性, 为肿瘤的靶向性基因治疗提供新思路。

关键词: 端粒酶启动子; 荧光蛋白; SW 579

中图分类号: R 73–35 文献标志码: A 文章编号: 1001-0580(2011)02-0217-03

Function of hTERTp in SW 579 cells ZHANG Lei JIN Hui TIAN Li et al Department of Biochemistry, School of Basic

* 基金项目: 辽宁省教育厅项目 (05L142)
作者单位: 1. 辽宁医学院基础学院生化教研室, 辽宁 锦州 121000 2. 辽宁医学院附属第三医院
作者简介: 张蕾 (1974–), 女, 辽宁锦州人, 副教授, 博士, 主要从事分子病发病机制的研究。

Medicine, Liaoning Medical College (Jinzhou 121000 China)

Abstract Objective To clone DNA sequence of human telomerase reverse transcriptase promoter (hTERTp) and to explore the function of the promoter in promoting enhanced green fluorescence protein (EGFP) and the relationship between promoter length and function. **Methods** The hTERT promoter of 2068bp, 1135bp, 333bp, 142bp were amplified. The hTERT promoters were inserted into upstream of EGFP to reconstruct four recombinant plasmids and transfected into the SW 579 cells. Then the fluorescence intensity was detected and the promoter rate was identified. **Results** The promoter efficiency of four eukaryotic plasmids decreased with the shortening of the promoter length with the fluorescent intensity of 8.56, 7.81, 6.88 and 3.62 from high to low. **Conclusion** The human telomerase reverse transcriptase expression and activity change are correlated with the length of the promoter. The research gives a way for tumor gene therapy by down regulation of the activity of hTERTp.

Key words hTERTp; GFP; SW 579

肿瘤细胞端粒酶 (hTERT) mRNA 表达水平与端粒酶活性呈正相关,而启动子的激活是细胞永生的关键一步,因此端粒酶启动子 (hTERTp)的调节就显得尤为重要,主要是在转录水平对 hTERT 启动子的调节^[1-2]。本研究采用 PCR 方法分别克隆了 hTERTp-2068-1135-333和-142bp的 DNA 序列,并将其替换绿色荧光蛋白质粒 pEGFP-N1上游的启动子,转染入甲状腺鳞癌细胞株 SW 579中,通过观察启动增强型绿色荧光蛋白 (EGFP)的能力强弱,确认启动子的启动活性,评价不同长度的启动子功能,以便为研究以 hTERTp为靶点的肿瘤靶向性基因治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 荧光蛋白质粒 pEGFP-N1(美国 Promega公司); L15培养基(美国 GIBCO 公司);质粒小量提取纯化试剂盒、Marker和纯化试剂盒(北京威格拉斯技术有限公司);大肠埃希菌 DH 5 α 限制性内切酶 AseI、BamHI、Taq聚合酶、DNA 连接试剂盒(大连 TaKaRa 公司);Lipofectamine 2000、Trizol(美国 Invitrogen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 hTERTp 的 PCR 扩增及鉴定 根据 GenBank (AF098956)中 hTERTp序列设计 2对引物。P1:上游引物 5'-GCA CCCATAATA CTGGGGTGTCTTC-3',下游引物 5'-CGCGCTCGCACAGCCTCTG-3';P2:上游引物:5'-TAATTA-ATCTGTCTCTG CGGTTGTGCCG G-3'下游引物:5'-CGG-GATCCGAGCG CA CGG CTCGGCAG-3';P2引物 5端分别引入限制性内切酶 AseI 和 BamHI 的酶切位点(下划线表示)。先以人类基因组为模板,以 P1为引物,退火 65.5℃,使用 LA-Taq及其 GC Buffer进行 PCR 反应,扩增产物为 2068 bp 再以第 1次 PCR 产物为模板,以 P2为引物,退火 66℃进行 PCR 反应,扩增目的片段为 1135 bp。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,并用 PCR 产物回收试剂盒回收纯化。其余 333bp和 142bp两段序列为 Takara公司合成。

1.2.2 pEGFP-hTERTp重组质粒的构建 用 AseI 和 BamHI 双酶切带酶切位点的 PCR 产物,用 PCR 产物纯化试剂盒回收 4条目的 DNA 条带;用 AseI 和 BamHI 双酶切 pEGFP-N1质粒 (pEGFP-N1原有的启动子被切掉),酶切产物回收;上述 2种回收产物按质量比为 4:1作连接反应,16℃过夜,构建重组质粒。用 AseI 和 BamHI 双酶切和 PCR2种方法鉴定,并进行 DNA 序列分析。

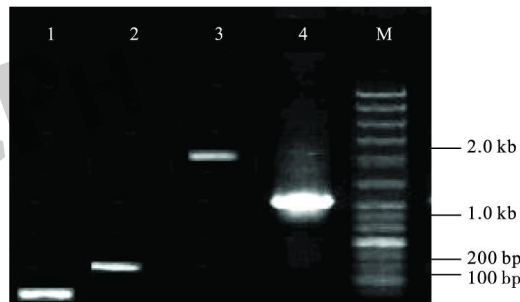
1.2.3 细胞培养及重组质粒的转染 Sw579细胞系,常规培养,按照 Invitrogen公司的脂质体说明书将 4个重组质粒分别转染细胞数目大致相等的受体细胞 Sw579中,为获得稳定转染,用终浓度 700 μ g/mL 的 G418 选择培养液进行选择培养筛选,获得的稳定转染细胞进行荧光强度检测。

1.2.4 观察并检测荧光强度 荧光显微镜观察,荧光分光光度计 (Hitachi F-4500)对稳定转染的 pEGFP-hTERTp 的 SW 579 细胞进行荧光定量分析。采用冻融法提取蛋白后测定,以同一基准总蛋白量(用德国 BioPhotometer测定)比较各组荧光强度,每一实验重复 6次,以各实验组荧光测定值减去空白组(未转任何质粒)荧光测定值作为用于统计分析的数值。

1.3 统计分析 采用 SAS软件进行实验数据的多重比较和差异显著性检验。

2 结果

2.1 PCR 产物电泳结果(图 1) 以人类基因组为模板,PCR 扩增 hTERTp 经琼脂糖凝胶电泳,得到清晰的 4条目的 DNA 片段,与预期结果吻合。



注: M: Marker 1: 142 bp 2: 333 bp 3: 2068 bp 4: 1135 bp
图 1 人类基因组 hTERTp PCR 的电泳结果

2.2 pEGFP-hTERTp重组质粒的鉴定

2.2.1 酶切鉴定 PCR 产物经酶切鉴定与预期结果相符。

2.2.2 测序鉴定 构建的 hTERTp序列与 hTERTp原始序列 (AF098956)进行比对,测序结果说明获得的 4段启动子 DNA 片段序列与原始序列同源性 100%,表达载体构建成功。

2.3 观察并检测荧光强度(图 2) 转染后 4种长度的启动子均能启动 EGFP 的表达,荧光显微镜观察均发出绿色荧光,平均每个视野 (10 $\times$ 10) 发光细胞数随启动子强度的降低而减少,分别为 78.45、28.5。图 2结果表明,随着启动子的缩短,启动 EGFP 发光的能力越差,EGFP 的相对发光强度值越低。

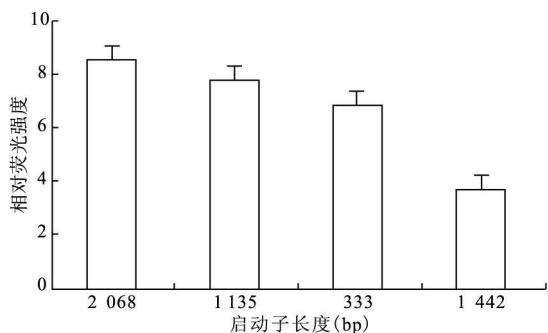


图 2 荧光分光光度计检测不同长度端粒酶启动子发光强度

3 讨 论

hTERT 基因表达的调控是端粒酶活性调控的中心环节^[3],从启动子序列上分析,hTERT 启动子含有 2 个 E-box (CACGTG),分别位于-165~-160和-49~-44 bp^[4],是 MHLHZ 转录因子 Myc/Max/Mad 网络系统的结合位点,直接联系癌基因激活与端粒酶活化。hTERT 启动子还存在 2 个雌激素反应元件^[4],6 个转录因子 SP1 结合位点,1 个位于-873GGGCGG-868,其他 5 个位点位于 2 个 E-box 之间的 GC 盒(-110~-102-88~-83-56~-48-36~-28 和-7~-2 bp),这些位点都能与 Sp1 作用,若其突变将下调 hTERT^[5]。不同长度的启动子含有不同的转录因子结合位点,结合位点的多少,种类可能决定了启动子启动强度的不同^[6],本研究设计的 4 种长度启动子片段包含不同的调控位点 1 135 bp 片段包含上述所有的 E-box 和 6 个转录因子 SP1 结合位点,333 bp 启动子包含 2 个 E-box 和 5 个 SP1 结合位点;142 bp 启动子包含 1 个 E-box 和 5 个 SP1 结合位点;而 2068 bp 的启动子包含上述所有调控位点之外还包括远端其他未知的重要调控位点,这也解释了本研究随着启动子序列长度的下降,启动绿色荧光蛋白表达的能力依次下降的结果。

选择应用强 hTERTp 驱动肿瘤相关因子凋亡或表达增强,可以获得对癌细胞生长明显的抑制和诱导凋亡的作

用^[7],也为研究 hTERTp 功能和为临床基因治疗肿瘤提供了新思路。

参考文献

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

[2] Wooten-Blanks LG, Song P, Senkal CE, et al Mechanisms of ceramide-mediated repression of the human telomerase reverse transcriptase promoter via deacetylation of Sp3 by histone deacetylase1 [J]. FASEB, 2007 21: 3386-3397

[3] 陈伟,陆祥,舒小林,等. 砷对大鼠生精细胞及端粒酶逆转录酶表达影响 [J]. 中国公共卫生, 2008 24(11): 1382-1383

[4] Kyo S, Takakura M, Taira T, et al Sp1 cooperates with Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT) [J]. Nucleic Acids Res 2000 28(3): 669-677

[5] Kyo S, Takakura M, Kanaya T, et al Estrogen activates telomerase [J]. Cancer Res 1999 59(23): 5917-5921.

[6] Cong YS, Wen J, Bacchetti S. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter [J]. Hum Mol Genet 1999 8(1): 137-142

[7] 张明,辛晓燕,李红梅,等. hTERT 启动子驱动的 TRAIL 诱导宫颈癌细胞的凋亡作用 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007 23(7): 638-640

收稿日期: 2010-06-15 (宋艳萍编辑 孔繁学校对)

【论 著】

VDR 基因多态性与环境交互作用对体能影响*

胡明月¹,李 婧²,包其郁²,杨新军¹, 丁¹

摘 要:目的 探讨维生素 D 受体(VDR)基因遗传多态性与环境交互作用对青少年体能发育影响。方法 随机抽取浙江省绍兴市 17~18 周岁青少年 212 名进行体格检查及问卷调查,对 VDR 基因进行 PCR 扩增,采用基因测序技术检测基因多态性,以多分类有序 Logistic 模型分析体能发育的影响因素和交互作用。结果 维生素 D 受体基因 BsmI 位点的多态性与体育锻炼存在交互作用,交互作用系数为 3.208。Tn9I 位点的多态性与体育锻炼、睡眠时间以及学校对体育锻炼的重视等均存在交互作用,交互作用系数分别为 2.499、1.936 和 1.987。结论 青春期体能发育中,维生素 D 受体基因多态性与环境因素存在交互作用。

关键词:维生素 D 受体;基因多态性;环境因素;交互作用;体能

中图分类号:R 179 文献标志码:A 文章编号:1001-0580(2011)02-0219-02

Interactive effect of vitamin D receptor gene polymorphism and environmental factors on physical development among adolescents HU Ming-yue, LI Jing, BAO Qi-yu, et al Department of Preventive Medicine, School of Environmental Science and Public Health, Wenzhou Medical College (Wenzhou 325035 China)

Abstract Objective To investigate interactive effect of vitamin D receptor(VDR) gene polymorphism and environmental factors on physical development among adolescents **Methods** Totally 212 adolescents at age of 17 to 18 years were randomly selected from senior high schools of Shaoxing city for physical examination and questionnaire survey. Polymerase chain reaction(PCR) and DNA sequencing were performed to analyze the VDR genotype. The relationship between VDR gene polymorphism and environmental factors on physical development was analyzed with ordinal logistic regression analysis **Results** The results showed that the interactive effect existed in BsmI gene site polymorphism and physical exercise with an interaction index value of 3.208. The interactive effect existed in Tn9I gene site polymorphism and physical exercise, sleeping time, the importance of physical exercise advocated by the school with the interaction index value of 2.499, 1.936 and 1.987, respectively. **Conclusion** VDR gene polymorphism and environment factors show an interactive effect on physical development among adolescents

Key words vitamin D receptor; gene polymorphism; environmental factors; interaction; physical development

* 基金项目:浙江省医药卫生科研基金项目(2007B134);浙江省温州市科技局科研基金项目(Y20070054)

作者单位:1.温州医学院环境与公共卫生学院预防医学系,浙江温州 325035 2.温州医学院分子生物学研究中心

作者简介:胡明月(1974-),女,浙江温州人,副教授,硕士,主要从事预防医学教学与科研。

通讯作者:丁力, E-mail ding@wzmc.edu.cn