遗传 HEREDITAS (Beijing) 2011 年 8 月, 33(8): 879－885
ISSN 0253-9772 www.chinagene.cn

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00879

白血病细胞中不同启动子驱动外源基因表达能力差异分析

周雁, 黄秋花

上海交通大学医学院附属瑞金医院, 上海血液学研究所, 医学基因组学国家重点实验室, 上海 200025

摘要: 为了分析不同启动子在白血病细胞中驱动外源基因表达能力的差异, 文章选择了 4 种含不同启动子 EF1α、PGK、Ubiquitin 和 CMV 驱动的 GFP 报告基因的慢病毒载体, 用以感染 4 种不同的白血病细胞株——NB4、HL60、Kasumi 和 THP1, 利用荧光显微镜、流式细胞仪和荧光定量 PCR 的方法检测其 GFP 表达效率, 发现 EF1α 启动子驱动 GFP 表达的能力最强, CMV 最弱, PGK 和 Ubiquitin 则介于两者之间。该结果提示在白血病细胞中研究基因功能时, 应根据不同的研究需求选择最为合适的启动子。

关键词: 启动子; GFP 报告基因; 慢病毒载体; 白血病细胞

Exploration of the variance in exogenous gene expression driven by the different promoters in leukemia cells

ZHOU Yan, HUANG Qiu-Hua

State Key Laboratory of Medical Genomics, *Shanghai Institute of Hematology*, *Ruijin Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine*, *Shanghai* 200025, *China*

Abstract: To investigate the variance in exogenous gene expression driven by the different promoters in leukemia cells, four GFP reporter lentivirus vectors carrying different promoters, including EF1α, PGK, Ubiquitin and CMV, were selected. Leukemia cell lines NB4, THP1, HL60 and Kasumi were infected with lentivirus produced from these reporter vectors, respectively. Then, fluorescence microscope, flow cytometry and fluorescence quantitative PCR were used to detect the GFP expression strength. The results of this study clearly showed that the expression levels of the reporter genes with four different promoters were significantly different. Among them, EF1α drove the highest level of GFP expression, while CMV promoter induced the lowest level. Our results suggested that promoters should be carefully chosen in order to get the appropriate exogenous expression level in leukemia cells according to the study need.

Keywords: promoters; GFP reporter gene; lentivirus vectors; leukemia cells

自然界的生物能够根据自身需要及环境的改变, 定时、定位及定量地表达所需的基因产物。基因表达受生物体内各种理化因素的调节控制, 在 DNA 水平、转录水平、转录后水平、翻译水平、翻译后加

收稿日期: 2011–06–15; 修回日期: 2011–07–29
基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(编号：2009CB825604)资助
作者简介: 周雁, 硕士研究生, 专业方向：生物化学与分子生物学。E-mail: asheley_joe1203@126.com
通讯作者: 黄秋花, 研究员, 博士生导师, 研究方向：正常与疾病造血调控相关基因的表观遗传学研究。E-mail: HQH10632@rjh.com.cn

工、运输及定位等各个环节进行精细的调控。在这一系列过程中涉及到启动子、终止子、UTR 序列等调控元件，这些调控元件中，启动子的作用尤为重要。启动子就像“开关”，决定基因的活动，控制基因表达的起始时间和表达的程度。根据调控不同类型 RNA 的表达，启动子可分为 3 类，即 rRNA 基因启动子(I 型)、mRNA 基因启动子(Ⅱ型)和 tRNA 基因启动子(Ⅲ型)，其中 I 型和Ⅲ型启动子位于转录起始位点的上游，结构相对简单；根据作用方式及功能则可将启动子分为组成型启动子、诱导型启动子和组织特异型启动子。一般的观念认为在组成型启动子调控下的结构基因表达水平、表达时间以及表达部位无明显的差异，如常见的巨细胞病毒(CMV)启动子[1]、CAG 启动子(包含 CMV 立即早期增强子和鸡 β-肌动蛋白启动子)[2]、延伸因子(EF1α)启动子[3]、磷酸甘油激酶(PGK)启动子[4]和泛素(Ubiquitin)启动子[5,6]等等。因此当我们在细胞中研究某一基因功能时常常选择上述组成型启动子驱动基因的表达，其中最为常用的是 CMV 启动子。然而，事实上在某些细胞中这些组成型启动子驱动的基因表达强度存在着差异，如在小鼠胚胎干细胞中 CMV 启动子驱动基因的表达能力很弱，而伴随着细胞的分化，CMV 驱动基因的表达能力明显增加[3]。因此在目的细胞中筛选最适启动子是非常必要的。

与一些贴壁生长的肿瘤细胞株相比，白血病细胞株的外源基因导入一直是一个难题，即使在选择病毒介导的基因导入时，其表达效率往往也很难达到理想的状态。需要引起我们注意的是，当细胞表达效率低时，不应该排除可能是因为所选的启动子在目的细胞中驱动基因表达能力低的缘故。在这种情况下，即使大部分细胞中已导入基因，我们却很难通过 Western blotting 及流式等手段检测到。因此本研究通过分析慢病毒载体介导的不同启动子在几种白血病细胞中驱动绿色荧光蛋白(GFP)表达的能力差异，筛选驱动外源基因表达最合适的启动子，为白血病细胞中的基因功能研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

人急性早幼粒细胞白血病细胞株(NB4)、人红细胞白血病细胞株(Kasumi)、人原髓细胞白血病细胞株(HL60)和人急性单核细胞白血病细胞株(THP1)均由本实验室保存，用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 (Gibco)传代培养。

1.1.2 慢病毒包装并感染细胞

由上海鸣鸿生物有限公司将 EF1α、PGK、Ubiquitin 和 CMV 4 个启动子驱动的 GFP 报告基因载体包装成慢病毒并分别感染 NB4、Kasumi、HL60 和 THP1 细胞株，含 CMV 启动子的慢病毒载体购自 SBI 公司，其余载体由上海鸣鸿生物有限公司在此基础上改建而成。

1.1.3 引物

引物均由 Invitrogen 公司合成。引物序列：

GAPDH: F: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC, R: GAAGATGGTGATGGGATTTC;

GFP: F: ACGTAAACGGCCACAAGTTC, R: AAGTCGTGCTGCTTCATGTG。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞仪分析感染细胞的 GFP 表达强度

包装好的慢病毒感染 NB4、THP1 、HL60 和 Kasumi 细胞株(细胞起始数量相同)，72 h 左右荧光显微镜下观察可见大部分细胞表达荧光，各收集 2×10^5 细胞，800 r/min 离心 5 min，弃上清，用 1×PBS 洗 1 遍，用 200 μL 1×PBS 重悬细胞，然后用流式细胞仪检测 GFP 阳性细胞的比例，并通过流式细胞分析软件 FlowJo 计算该 GFP 阳性细胞群的几何均数(Geometric Mean)即表达强度。

1.2.2 荧光定量 PCR 检测感染细胞中 GFP 的 mRNA 表达水平

收集 2×10^6 病毒感染后的 NB4 细胞用 Trizol 法(Invitrogen)抽提细胞总 RNA，取 1 μg RNA 逆转录成 cDNA，取 5 ng cDNA 溶液为模板进行荧光定量 PCR(TaKaRa)扩增 GFP 基因。磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)在多数人类细胞株中的表达是恒定的，故而用作内对照。

1.2.3 全反式维甲酸(ATRA)处理慢病毒感染的 NB4 细胞

在 6 孔板中同步加入 5 组起始数量相同的慢病毒感染的 NB4 细胞平行培养，按每组最终药物处理

时间为 72 h、48 h、24 h、12 h、0 h 的顺序依次先后加入 10^{-6} mol/L ATRA(Sigma), 72 h 后同步在荧光显微镜下观察其 GFP 荧光强度变化并收集细胞做流式检测。

2　结果与分析

2.1　不同启动子驱动的 GFP 报告基因在 NB4 细胞中的表达

将含不同启动子驱动的 GFP 报告基因的慢病毒载体包装成慢病毒感染 NB4 细胞，慢病毒载体框架见图 1。72 h 后用流式细胞仪检测，测得 GFP 阳性比例分别为：EF1α：95%; PGK：92%; Ubiquitin：81%; CMV：82%, 提示这 4 种病毒感染 NB4 细胞的效率相近(图 2A)。4 组细胞荧光显微镜下均可观察到绿色荧光，但荧光强度存在显著差异，其中 EF1α 最强, CMV 最弱, PGK 和 Ubiquitin 介于两者之间(图 2B), 为了排除所选视野引起的误差，用流式细胞仪分别检测不同启动子驱动 GFP 表达的效率(图 2C), 并分析其 GFP 阳性细胞群的荧光强度几何均数，测得其值分别为：EF1α：482; PGK：199; Ubiquitin：172; CMV：73, 与荧光显微镜下观察所得结果一致。同时，选择荧光定量 PCR 检测不同感染组细胞 GFP 基因的 mRNA 表达水平，扣除感染效率不同产生的差异后(GAPDH 的 Ct 值×感染效率), 其结果亦显示 4 个启动子在 NB4 细胞中驱动外源基因的能力存在显著差异，EF1α 驱动能力最强，CMV 最弱(图 2D)。

2.2　不同启动子驱动的 GFP 报告基因在不同分化阶段的 NB4 细胞中的表达

Hong 等[3]发现在小鼠胚胎干细胞的不同分化阶段 CMV 启动子驱动基因表达的强度有所不同，为了验证 CMV 启动子在不同分化阶段的 NB4 细胞中是否也存在这一特性，本研究在上述不同病毒感染的 NB4 细胞中加入 10^{-6} mol/L ATRA 诱导分化，观察随着分化时相的推移(0 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h)GFP 荧光强度的变化，荧光显微镜下可见含 CMV 启动子载体的慢病毒感染 NB4 细胞后绿色荧光随着细胞分化成熟而逐渐增强(图 3A)，而 EF1α、PGK 和 Ubiquitin 基本保持不变，流式检测其 GFP 荧光强度也得到同样的结果(图 3B)。尽管 CMV 启动子在 NB4 细胞中驱动 GFP 强度最弱，但是随着细胞分化的程度的升高其荧光强度逐渐增强，这与小鼠胚胎干细胞的结果相似，提示其在分化较为成熟的细胞中驱动基因表达能力较强。

2.3　不同启动子驱动的 GFP 报告基因在其他白血病细胞株中的表达

本研究已证实了不同启动子驱动的 GFP 表达在 NB4 细胞中存在显著差异，为了解在其他白血病细胞株中是否也存在这一现象，又将这 4 种慢病毒分别感染其他几株白血病细胞株——THP1、HL60 和 Kasumi 细胞。感染 72 h 后通过流式细胞仪分析其 GFP 阳性细胞群的荧光信号几何均数，并用 GraphPad Prism 5 进行统计作图。结果与 NB4 细胞相似, EF1α 最强，CMV 最弱，PGK 和 Ubiquitin 介于两者之间(图 4)。

3　讨 论

我们在进行基因功能研究时，常常需要在细胞中稳定表达目的基因，并且多数时候期待目的基因在目的细胞中处于高表达状态。为了获得稳定转染

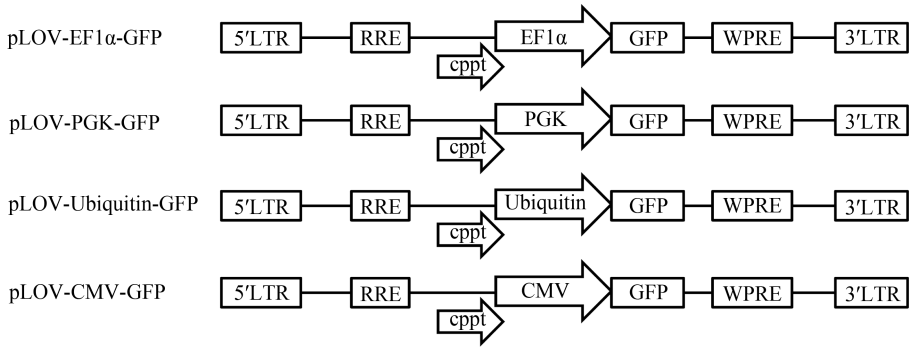


图 1　慢病毒载体结构示意图

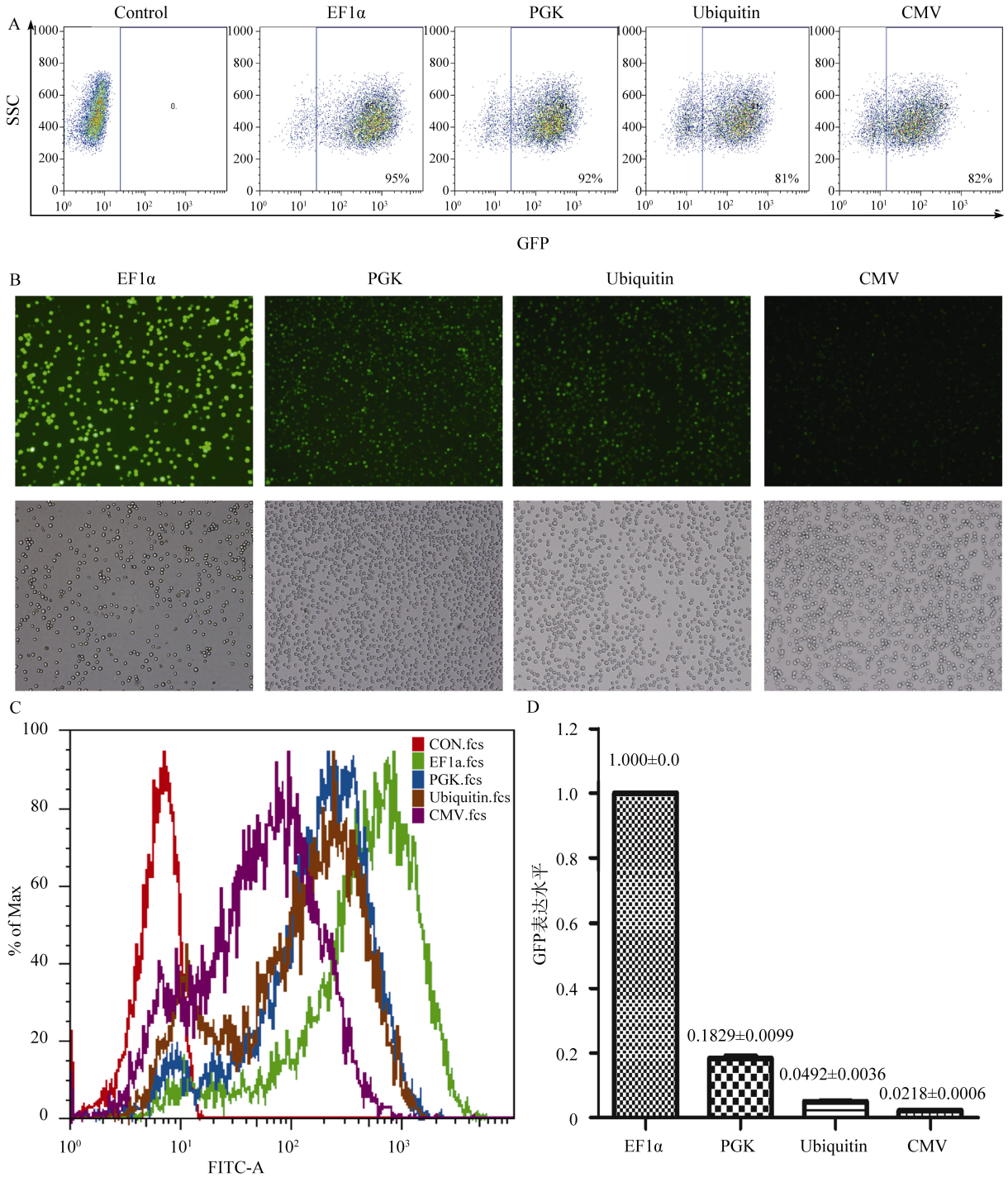


图 2　不同启动子在 NB4 细胞中驱动基因表达能力的检测

A: 流式检测含不同启动子慢病毒感染 NB4 细胞的效率。散点图右象限 GFP 阳性比例表示感染效率; B: 荧光显微镜下观察慢病毒载体介导的不同启动子驱动 GFP 表达的效率(×100); C: 流式检测慢病毒载体介导的不同启动子驱动 GFP 表达的效率。直方图横坐标表示 GFP 荧光信号强度; D: 荧光定量 PCR 检测慢病毒载体介导的不同启动子驱动 GFP 表达的效率。柱状图以 EF1α 驱动的 GFP mRNA 表达水平为参照, 各数值表示其 3 次重复实验的表达均值和标准差。

的细胞株, 特别是针对一些难转染的细胞株如原代细胞、干细胞、造血细胞等, 我们通常会选择病毒感染系统, 并且利用一些组成型启动子来驱动外源基因的表达, 其中 CMV 是最常用的组成型启动子[7,8]。

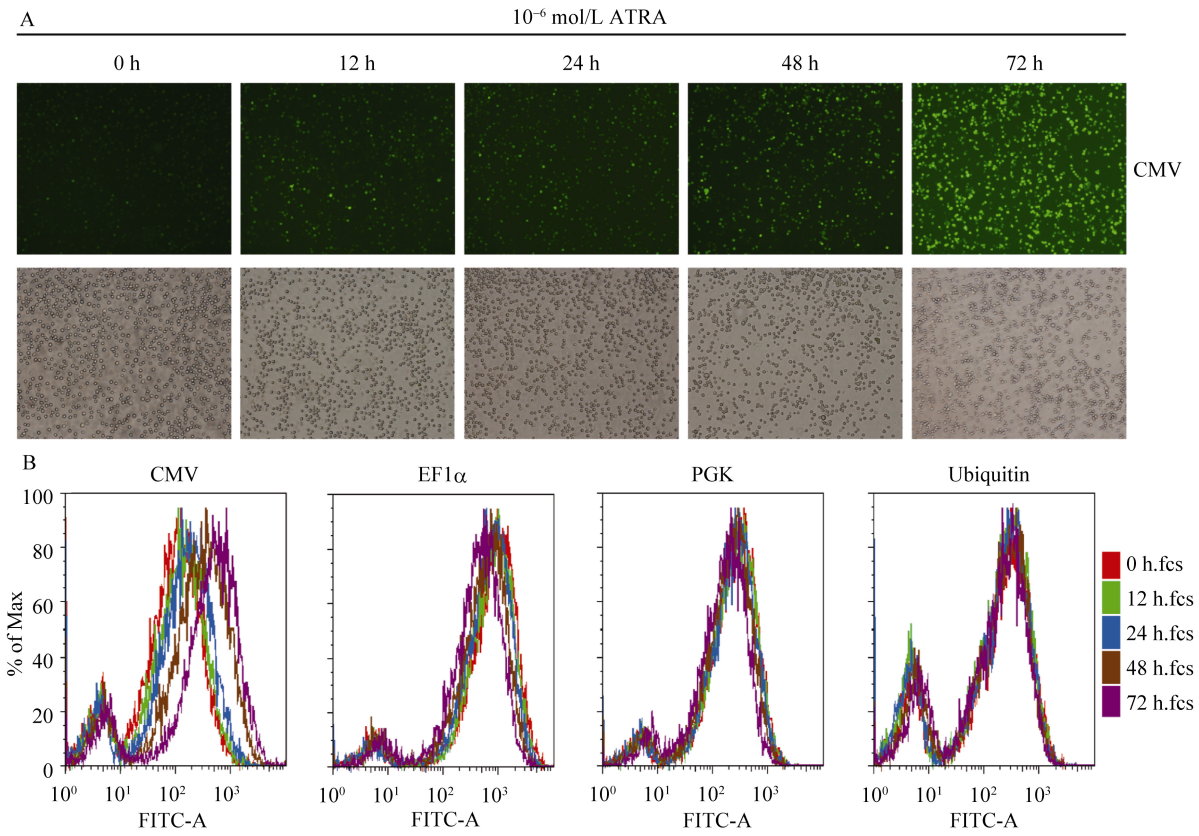


图 3　不同启动子在不同分化阶段的 **NB4** 细胞中驱动基因表达能力的检测

A: 荧光显微镜下观察慢病毒载体介导的 CMV 启动子在 10^{-6} mol/L ATRA 诱导后的不同分化阶段 NB4 细胞中驱动 GFP 表达的能力差异(×100);
B: 流式检测慢病毒载体介导的不同启动子在 10^{-6} mol/L ATRA 诱导后的不同分化阶段 NB4 细胞中驱动 GFP 表达的能力差异。

然而很多研究证实在不同细胞中，CMV 启动子驱动外源基因表达并非是最好的选择[3,9,10]。本研究也同样发现在 NB4 细胞中，CMV 启动子驱动 GFP 报告基因表达的强度较 EF1α、PGK 和 Ubiquitin 都弱，这种现象在我们选择的其他几种白血病细胞株中也得到类似的结果。因此在目的细胞中研究基因功能时，选择合适的启动子驱动目的基因的表达显得尤为重要。

真核基因的表达调控是一个复杂动态的过程，在转录起始、转录延伸和转录终止的循环中，每一个细节都受到精细而复杂的调控。基因启动子在转录起始过程中发挥重要的调控作用，它们能够被很多反式作用因子识别，在不同细胞中，同一个启动子因相互作用的反式作用因子不同，基因的表达水平也不同；而在同一细胞中，相同反式作用因子对不同启动子的识别序列不一致，开启转录起始的能力也并不一致。我们在 NB4 细胞中发现 EF1α 启动子驱动 GFP 基因表达能力最强，Ubiquitin 和 PGK 次之，而 CMV 最弱。产生这一现象的原因是：首先可能与 NB4 细胞中能够识别不同启动子序列的一些反式作用因子表达水平不一致相关，CMV 启动子序列中含有 NFκB 结合位点，NF 位点可以明显增强 CMV 启动子的表达水平[11]，而 Ubiquitin 启动子则含有比较多造血细胞特异性的转录因子识别序列[12]，因此在 NB4 细胞中，这些反式作用因子表达水平的差异可能是引起 GFP 表达强度差异的一个原因；其次可能与启动子的种属特异性相关，CMV 启动子来源于病毒，相对与内源性的启动子，在哺乳动物细胞中 CMV 表达可能更易于受到细胞内沉默机制的影响[13]，虽然在很多细胞中 CMV 驱动基因的表达强度最强，然而越来越多的实验结果表明 CMV 启动子并不能驱动外源基因在机体组织中长期持续表达[14~16]；第三，不同启动子在细胞中的表观遗传学修饰状态也可能导致其驱动基因表达能力存在差异[17]，

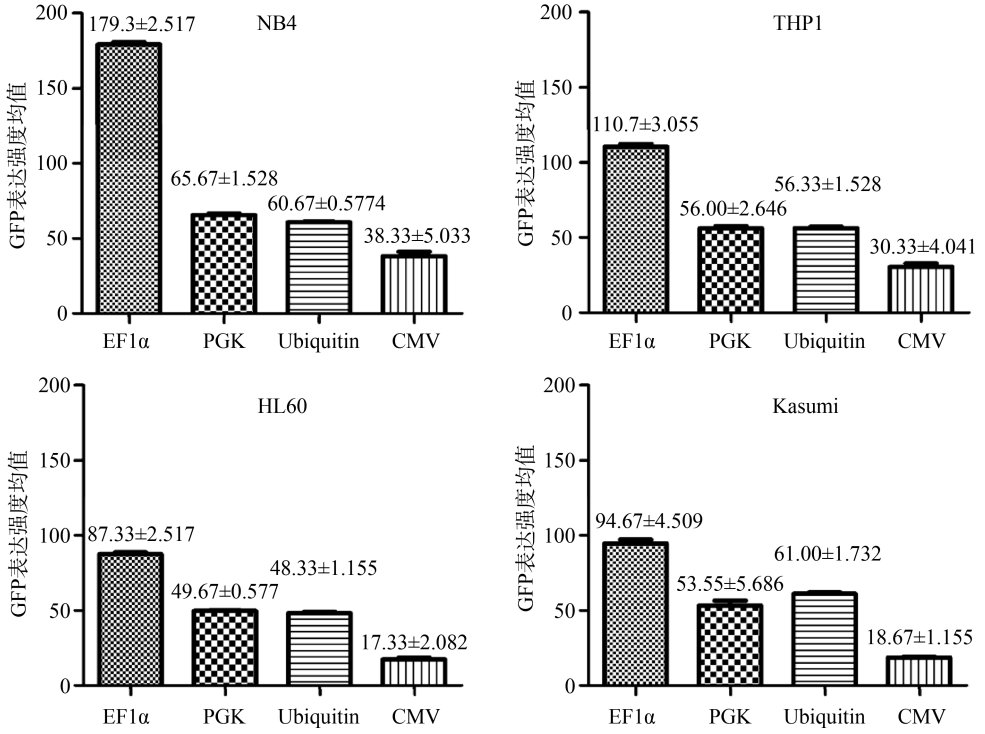


图 4　不同启动子在 NB4、THP1、HL60 和 Kasumi 细胞中驱动基因表达的能力检测
柱状图表示流式检测 GFP 阳性群细胞中的荧光信号几何均数值，各数值表示其 3 次重复实验的表达均值和标准差。

如果将 CMV 启动子中的 CpG motif 去除后，可以明显增强 CMV 驱动基因的表达强度[12]，这说明 DNA 甲基化状态可能也是引起不同启动子在同一细胞中表达差异的重要原因。

有趣的是在 NB4 细胞不同分化阶段，我们观察到 CMV 启动子驱动基因表达的能力逐渐增强，与 Hong 等[3]在小鼠胚胎干细胞中的发现一致。正如前面我们所讨论的，在 ATRA 诱导 NB4 细胞分化过程中，可能活化了诸如 NFκB 分化信号途径的某些基因，最终影响了 CMV 启动子的活性。

综合本文的实验结果，提示我们应根据靶基因的功能研究需要选择最合适的启动子在目的细胞中进行表达。例如当我们在 NB4 细胞中研究一个可能促进细胞分化的基因时，我们可以选择 EF1α 启动子，最大强度地驱动基因表达，观察它对细胞分化的影响；如果我们选择了 CMV 启动子，可能会因为基因表达强度较弱，从而无法观察到细胞表型。总而言之，在细胞中进行基因过表达实验时，如果基因表达效率偏低，应该考虑到选择的启动子恰当与否，同时更需要从基因本身的功能出发，选择最为适合的启动子。

参考文献(References):

[1] Ikawa M, Tanaka N, Kao WWY, Verma IM. Generation of transgenic mice using lentiviral vectors: a novel preclinical assessment of lentiviral vectors for gene therapy. *Mol Ther*, 2003, 8(4): 666–673.

[2] Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, Verma IM. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(4): 2140–2145.

[3] Hong S, Hwang DY, Yoon S, Isacson O, Ramezani A, Hawley RG, Kim KS. Functional analysis of various promoters in lentiviral vectors at different stages of *in vitro* differentiation of mouse embryonic stem cells. *Mol Ther*, 2007, 15(9): 1630–1639.

[4] Ritchie WA, Neil C, King T, Whitelaw CBA. Transgenic embryos and mice produced from low titre lentiviral vectors. *Transgenic Res*, 2007, 16(5): 661–664.

[5] Schorpp M, Jäger R, Schellander K, Schenkel J, Wagner EF, Weiher H, Angel P. The human ubiquitin C promoter directs high ubiquitous expression of transgenes in mice. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(9): 1787–1788.

[6] Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. Germ-

line transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science*, 2002, 295(5556): 868–872.

[7] Keating A, Horsfall W, Hawley RG, Toneguzzo F. Effect of different promoters on expression of genes introduced into hematopoietic and marrow stromal cells by electroporation. *Exp Hematol*, 1990, 18(2): 99–102.

[8] Muller SR, Sullivan PD, Clegg DO, Feinstein SC. Efficient transfection and expression of heterologous genes in PC12 cells. *DNA Cell Biol*, 1990, 9(3): 221–229.

[9] Chung SM, Andersson T, Sonntag KC, Björklund L, Isacson O, Kim KS. Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines. *Stem Cells*, 2002, 20(2): 139–145.

[10] Mao G, Marotta F, Yu J, Zhou L, Yu Y, Wang L, Chui D. DNA context and promoter activity affect gene expression in lentiviral vectors. *Acta Biomed*, 2008, 79(3): 192–196.

[11] Laegreid A, Medvedev A, Nonstad U, Bombara MP, Ranges G, Sundan A, Espevik T. Tumor necrosis factor receptor p75 mediates cell-specific activation of nuclear factor kappa B and induction of human cytomegalovirus enhancer. *J Biol Chem*, 1994, 269(10): 7785–7791.

[12] Yew NS, Przybylska M, Ziegler RJ, Liu DP, Cheng SH. High and sustained transgene expression *in vivo* from plasmid vectors containing a hybrid ubiquitin promoter. *Mol Ther*, 2001, 4(1): 75–82.

[13] Gill DR, Smyth SE, Goddard CA, Pringle IA, Higgins CF, Colledge WH, Hyde SC. Increased persistence of lung gene expression using plasmids containing the ubiquitin C or elongation factor 1α promoter. *Gene Ther*, 2001, 8(20): 1539–1546.

[14] Guo ZS, Wang LH, Eisensmith RC, Woo SL. Evaluation of promoter strength for hepatic gene expression *in vivo* following adenovirus-mediated gene transfer. *Gene Ther*, 1996, 3(9): 802–810.

[15] Löser P, Jennings GS, Strauss M, Sandig V. Reactivation of the previously silenced cytomegalovirus major immediate-early promoter in the mouse liver: involvement of NFkappaB. *J Virol*, 1998, 72(1): 180–190.

[16] Yew NS, Wysokenski DM, Wang KX, Ziegler RJ, Marshall J, McNeilly D, Cherry M, Osburn W, Cheng SH. Optimization of plasmid vectors for high-level expression in lung epithelial cells. *Hum Gene Ther*, 1997, 8(5): 575–584.

[17] Kuriyama S, Sakamoto T, Kikukawa M, Nakatani T, Toyokawa Y, Tsujinoue H, Ikenaka K, Fukui H, Tsujii T. Expression of a retrovirally transduced gene under control of an internal housekeeping gene promoter does not persist due to methylation and is restored partially by 5-azacytidine treatment. *Gene Ther*, 1998, 5(10): 1299–1305.

•综合信息•

2011 年第 8 期《遗传》封面说明

科学发现依赖于技术的进步。以第二代测序技术为代表的新一代高通量技术的诞生和迅猛发展为医学遗传学研究开辟了新途径，使得疾病的研究模式发生了重大转变。从过去以假说为导向的研究模式转变为如今以数据为导向、大规模工业化的研究模式，极大地加速了人们对于疾病的认识，为疾病的研究、诊断、预防及治疗提供了更为有效的手段。对于包括癌症、复杂疾病、单基因病在内的疾病的机制研究，尤其是遗传因素在疾病的发生和发展中扮演的角色一直是研究者关注的焦点。基因组信息是医学遗传学研究的基础，而要更加全面深刻的理解疾病背后潜藏的各种网络关系，还需要在更广泛的组学领域展开探索，包括转录组，表观组以及蛋白质组等层次的研究以及它们之间的贯穿研究等。本期杨旭，焦睿，杨琳，吴莉萍，李英睿，王俊等作者的文章“基于新一代高通量技术的人类疾病组学研究策略”(本期第 829–846 页)从 DNA、RNA、表观组、蛋白质组以及宏基因组学层次上，介绍了新一代高通量技术包括第二代测序技术以及蛋白质谱技术如何应用于遗传疾病组学研究，以及最新的研究进展及发展趋势。借助高通量技术和生物信息分析方法，已有研究者从多组学的角度在疾病研究领域展开了系统、深入的疾病遗传机制研究，取得了一系列杰出成果，不仅加深了人们对疾病发生和发展机理的认识，也为转化医学领域的应用奠定了基础。

(杨旭，王俊)