



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.05.020  
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.05.020  
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(5):717-722.

· 基础研究 ·

## 热诱导对 8HSE 修饰的 hTERT 启动子转录活性的增强作用

王孝珑, 贺赛, 孙学军, 周培华, 郑见宝, 魏光兵, 崔飞博, 肖宁, 张立, 禄韶英

(西安交通大学医学院第一附属医院 普通外科, 陕西 西安 710061)

### 摘要

**目的:** 探讨热诱导对 8 倍重复串联热休克元件 (8HSE) 修饰的人端粒酶逆转录酶启动子 (hTERT<sub>p</sub>) 转录活性及靶向性的影响。

**方法:** 用 PCR 法从人结肠癌基因组中克隆 hTERT<sub>p</sub>; 将单纯的 hTERT<sub>p</sub> 或 8HSE 修饰的 hTERT<sub>p</sub> 重组于双荧光素酶报告载体 pGL4.2 后, 分别与内参质粒 pGL4.74 (含 TK 启动子) 共转染 hTERT 高表达的 SW480 细胞株和 hTERT 低表达的 MKN28 细胞株, 双荧光素酶法检测 hTERT<sub>p</sub> 在 37 °C 及 43 °C 下的转录活性。

**结果:** PCR、酶切和 DNA 测序表明 hTERT<sub>p</sub> 克隆、8HSE 合成及载体构建成功。37 °C 下, 单纯 hTERT<sub>p</sub> 在 SW480 细胞中的转录活性明显高于 MKN28 细胞 ( $P < 0.05$ ), 8HSE 对 hTERT<sub>p</sub> 转录活性无增强作用, 且在 SW480 细胞中 8HSE 对 hTERT 转录活性具有抑制作用; 43 °C 下, 单纯 hTERT<sub>p</sub> 的转录活性在两种细胞中无明显改变 ( $P > 0.05$ ), 但与单纯 hTERT<sub>p</sub> 比较, 8HSE 修饰的 hTERT<sub>p</sub> 转录活性在 SW480 细胞中明显增强 ( $P < 0.05$ ), 而在 MKN28 细胞中无明显改变 ( $P > 0.05$ )。

**结论:** 热诱导对 hTERT<sub>p</sub> 转录活性无明显影响, 但对 8HSE 修饰的 hTERT<sub>p</sub> 转录活性有明显的增强作用, 且该调控元件靶向于 hTERT 高表达的肿瘤细胞。

### 关键词

肿瘤; 转录因子; HSP70 热休克蛋白质类; 转录启动子  
中图分类号: R730.2

## Enhancing effect of thermal induction on transcriptional activity of 8HSE modified hTERT promoter

WANG Xiaolong, HE Sai, SUN Xuejun, ZHOU Peihua, ZHEN Jianbao, WEI Guangbing, CUI Feibo, XIAO Ning, ZHANG Li, LU Shaoying

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

### Abstract

**Objective:** To investigate the effects of thermal induction on transcriptional activity and targeting specificity of human telomerase reverse transcriptase promoter (hTERT<sub>p</sub>) modified with eight tandem repeats of consensus heat shock element (8HSE).

**Methods:** The hTERT<sub>p</sub> was cloned from the genome of colon cancer cells by PCR amplification, and the hTERT<sub>p</sub> or hTERT<sub>p</sub> modified with 8HSE fragments were recombined into the dual luciferase reporter vector pGL4.2,

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (81101874; 81172362; 81172359); 陕西省科技统筹创新工程计划资助项目 (2013KTCQ03-08)。

**收稿日期:** 2014-09-19; **修订日期:** 2015-04-27。

**作者简介:** 王孝珑, 西安交通大学医学院第一附属医院博士研究生, 主要从事消化系统肿瘤基础与临床方面的研究。

**通信作者:** 孙学军, Email: sunxy@mail.xjtu.edu.cn

which were then co-transfected with the internal control plasmid pGL4.74 (containing TK promoter) into the high hTERT expressing SW480 cells and low hTERT expressing MKN28 cells, respectively. The transcriptional activity of hTERTp in the two types of cells at the temperature of 37 °C and 43 °C were analyzed by dual-luciferase reporter assay system.

**Results:** As identified by PCR, enzyme digestion and sequencing, the hTERTp cloning, 8HSE synthesis and plasmid vector constructions were all successful. Under the condition of 37 °C, the transcriptional activity of the unmodified hTERTp in SW480 cells was significantly higher than that in MKN28 cells ( $P < 0.05$ ), while 8HSE modification exerted no enhancing effect on transcriptional activity of hTERTp, and it even inhibited the transcriptional activity of hTERTp in SW480 cells; under the condition of 43 °C, the transcriptional activity of unmodified hTERTp in either type of cells showed no significant change ( $P > 0.05$ ), while compared with unmodified hTERTp, the transcriptional activity of 8HSE modified hTERTp in SW480 cells was significantly increased ( $P < 0.05$ ), but showed no significant change in MKN28 cells ( $P > 0.05$ ).

**Conclusion:** Thermal induction has no obvious effect on transcriptional activity of hTERTp, but can significantly enhance the transcriptional activity of 8HSE modified hTERTp, which also specifically targets tumor cells with high hTERT expression.

**Key words** Neoplasms; Transcription Factors; HSP70 Heat-Shock Proteins; promoter; Transcription Initiation Site

**CLC number:** R730.2

基因疗法是重要的恶性肿瘤辅助治疗手段之一，已成为传统治疗手段的重要补充，甚至在传统治疗手段无效的情况下成为替代前者的治疗措施<sup>[1]</sup>。采用人端粒酶逆转录酶（hTERT）启动子（hTERTp）作为肿瘤特异性启动子，能在转录水平上驱动下游基因的表达，及靶向性地在肿瘤组织中激活目的基因的转录，从而实现目的基因在肿瘤中的选择性表达，避免损伤周围正常组织，这使得hTERTp成为肿瘤靶向治疗最为常用的调控序列<sup>[2]</sup>，但是hTERTp本身转录活性较弱，所以对hTERTp进行不同修饰以提高其转录活性是基因靶向治疗的一种方式<sup>[3]</sup>。热疗是恶性肿瘤的重要辅助治疗手段之一<sup>[4]</sup>，其作用机理是通过激活热休克元件（heat shock element, HSE），促进热休克蛋白表达<sup>[5]</sup>；HSE是热休克蛋白HSP70启动子区调控基因表达的主要区域，多个重复一致序列5'-nGAAn-3'是热调控基因的启动子组件的主要组成部分<sup>[6-7]</sup>。

本课题组前期已经证实了hTERTp具有良好的靶向性<sup>[8]</sup>，为了进一步明确由8倍5'-nGAAn-3'重复串联组成的HSE（8HSE）能否特异性地提高hTERTp的转录效率，以及验证hTERTp的靶向性，从而确定其是否适用于结直肠癌靶向性基因治疗。本研究克隆了人端粒酶逆转录酶启动子hTERTp和8HSE以组成较高效率的热诱导特异性

重组调控元件，利用目前应用于启动子转录活性研究的双荧光素酶报告系统，对该调控元件在不同的hTERT表达水平的肿瘤细胞株转录效率进行了定量分析，并进一步分析热诱导调控对转录水平的影响，为该重组调控元件能否应用于结直肠癌靶向性基因治疗提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 菌株、质粒及细胞系 大肠杆菌菌株DH5 $\alpha$ 由本课题组保存。含8HSE序列的质粒载体pUC57-8HSE购自上海生工生物工程有限公司，双荧光素酶报告基因载体pGL4.20[luc2]、pGL4.74[hRluc/TK]及双荧光素酶活性检测试剂盒Dual-Glo Luciferase Assay System购自Promega公司。人结直肠癌细胞株SW480和胃癌细胞株MKN28均为本课题组保存。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清为法国Biowest公司生产，RPMI1640培养基为美国Gibco公司产品，TaqDNA聚合酶、限制性内切酶（快切酶）、T<sub>4</sub>DNA连接酶为日本TaKaRa公司产品，质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒为美国OMEGA公司产品，转染试剂为TurboFect™ Transfection Reagent公司产品，RNA提取试剂盒Fast200购自先锋生

化科技有限公司,逆转录试剂盒 primescript RT Master Mix 购自日本 TaKaRa 生物有限公司,引物由上海生工生物工程有限公司合成。

## 1.2 方法

**1.2.1 hTERT 基因启动子的克隆及 pGL4.2-hTERTp 报告基因载体的构建** 用基因组 DNA 提取试剂盒提取临床来源结肠癌肿瘤的人基因组 DNA<sup>[9]</sup>, 根据基因数据库 (GenBank, AN097365) 中 hTERT 启动子序列设计 1 对引物: 上游引物为 5'-CTA GCT AGC CAC AGA CGC CCA GGA CCG CGC TTC-3', 下游引物为 5'-CCC AAG CTT CCA CGT GCG CCC ACG TGC GCC CAC-3'; 5' 端分别引入 *Nhe*I 和 *Hind* III 酶切位点 (酶切位点下划线所示) 所用 DNA 聚合酶为 TaKaRa Ex Taq 聚合酶, 25  $\mu$ L 的反应体系, 98  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 98  $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 扩增 hTERTp 片段与载体 pGL4.2 通过 *Hind* III 和 *Nhe* I 双酶切、连接构建 pGL4.2-hTERTp, 转化感受态菌 DH5 $\alpha$ , 接种含氨苄青霉素 (100 mg/ $\mu$ L) 的 LB 平板, 37  $^{\circ}$ C 培养 15 h, 挑取单克隆菌落摇菌提质粒, *Hind* III 和 *Nhe* I 双酶切鉴定得到长为 301 bp 片段, 对符合预期的克隆送测序, 保存测序正确菌落, 去内毒素质粒提取试剂盒提取质粒并分光光度计测定质粒浓度。

**1.2.2 8HSE 基因片段的合成及 pGL4.2-8HSE-hTERTp 报告基因载体的构建** 8HSE 由 8 个重复的理想化的 HSE 片段 (AGA ACG TTC TAG AAC) 构成<sup>[10-11]</sup>, 中间用 3~6 个任意碱基分开。按上下游酶切位点, 分别用 *kpn* I 和 *Nhe* I 内切酶切开 pUC57-8HSE 与载体 pGL4.2-hTERTp, 切胶回收 8HSE 片段及载体 pGL4.2-hTERTp, 连接构建 pGL4.2-8HSE-hTERTp, 转化感受态菌 DH5 $\alpha$ , 接种含氨苄青霉素 (100 mg/ $\mu$ L) 的 LB 平板, 37  $^{\circ}$ C 培养 15 h, 挑取单克隆菌落摇菌提质粒, *kpn* I 和 *Nhe* I 双酶切鉴定, 对符合预期的克隆送测序, 保存测序正确菌落, 去内毒素质粒提取试剂盒提取质粒并分光光度计测定质粒浓度。

**1.2.3 人结直肠癌细胞株 SW480 和胃癌细胞株 MKN28 的培养及报告基因载体的瞬时转染** 将 SW480 和 MKN28 细胞从液氮中取出, 复苏后在 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养于 RPMI1640 完全培养基中, 细胞长满至单层后 (约 2~3 d), 用胰酶消化传代, 使细胞保持在对数生长期。细胞传至第 2 代后, 将细胞接种在 96 孔板中 (约 5 000 个细胞/孔),

24 h 后细胞生长至 70% 融合可用于转染。将报告基因载体 pGL4.2-hTERTp 及内参照质粒 pGL4.74 分别按 1:1、5:1、10:1、20:1、40:1 的比例转染 SW480 细胞 (pGL4.2-hTERTp/pGL4.74 组); 以 pGL4.2 及内参照质粒 pGL4.74 共转染组为空白对照组 (pGL4.2/pGL4.74 组)。按照 TurboFect<sup>TM</sup> Transfection Reagent 转染试剂说明书进行转染, 根据荧光素酶检测结果, 后续实验采用 5:1 (报告基因载体: pGL4.74) 比例转染细胞。复苏 SW480 和 MKN28 细胞, 按上述方法接种细胞于 96 孔板中 (约 5 000 个细胞/孔), 将报告基因载体 pGL4.2-hTERTp/pGL4.74、pGL4.2-8HSE-hTERTp/pGL4.74 按照 5:1 共转染上述两种细胞, pGL4.2/pGL4.74 为空白对照, 并设置 37  $^{\circ}$ C 及 43  $^{\circ}$ C 处理组对照, 转染后 24~72 h, 分别 37  $^{\circ}$ C (常温) 及 43  $^{\circ}$ C 温度处理 1 h, 处理后 6 h 进行荧光素酶检测。每种转染设置 3 复孔。

**1.2.4 双荧光素酶检测** 按 Dual-Glo Luciferase Assay System 双荧光素酶检测试剂盒 (promega) 说明书进行检测, 43  $^{\circ}$ C 处理 6 h<sup>[12]</sup> 后, 分别于每孔加入 100  $\mu$ L Luciferase Buffer 和 Luciferase Substrate 混合液, 室温孵育 10 min, 酶标仪上检测荧光强度 (萤火虫) 并记录, 检测后分别于每孔加入 100  $\mu$ L Stop&Glo Buffer 和 Stop&Glo Substrate 混合液, 室温孵育 10 min, 再次酶标仪检测荧光强度 (海肾)。以萤火虫荧光素活性/海肾荧光素活性作为相对荧光素酶活性单位 (relative luciferase unit, RLU), 以 pGL4.2 转染细胞的相对荧光素酶活性为参考, 计算 pGL4.2-hTERTp 和 pGL4.2-8HSE-hTERTp 相对荧光素酶活性, 分析 8HSE 对 hTERT 启动子在温度应激下的转录效率及特异性的影响。

**1.2.5 PCR 检测 2 种细胞内源性 hTERT mRNA 相对水平** 在 6 cm 培养皿中培养 2 种细胞, 至 70%~80% 融合时, 弃培养液, 冷 PBS 冲洗, 按 RNA 提取试剂盒 Fast200 说明书提取总 RNA。取 10  $\mu$ L 总 RNA、10  $\mu$ L primescript RT Master Mix 和 30  $\mu$ L 无 RNA 酶水, 在 50  $\mu$ L 体系中进行 cDNA 合成反应。hTERT 上游引物: 5'-ATC AGA CAG CAC TTG AAG AG-3', 下游引物: 5'-GTA GTC CAT GTT CAC AAT CG-3'。内参照  $\beta$ -actin 上游引物: 5'-CTT AGC ACC CCT GGC CAA G-3', 下游引物: 5'-GAT GTT CTG GAG AGC CCC G-3'。PCR 条件均为: 94  $^{\circ}$ C 变性 3 min, 然后进行 30 个循环的扩增: 94  $^{\circ}$ C, 30 s; 55  $^{\circ}$ C, 30 s; 72  $^{\circ}$ C,

1 min。β-actin PCR 循环数为 25。以 β-actin 为内参照分析 hTERT mRNA 相对灰度水平。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件分析数据，组间比较采用两独立样本均数 *t* 检验，各组数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 hTERT 启动子和 pGL4.2-hTERTp 载体的鉴定

以 pGL4.2-hTERTp 为模板 PCR 扩增 hTERT 启动子片段，PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳，获得清晰的 313 bp 大小的 DNA 片段（图 1A），与预期结果相符。构建好的 pGL4.2-hTERTp 经 Nhe I 和 Hind III 双酶切后可获得 301 bp 的片段，与预期相符（图 1B）。hTERT 启动子基因序列与 GenBank（AN097365）中 hTERT 启动子 DNA 序列完全一致，经华大基因有限公司测序确认。

### 2.2 pGL4.2-8HSE-hTERTp 载体的鉴定

构建好的 pGL4.2-8HSE-hTERTp 经 Nhe I 和 kpn I 双酶切后可获得 184 bp 的片段（图 2A），与预期相符；经 Nhe I 和 Hind III 双酶切后可获得 301 bp 的片段（图 2B），与预期相符。hTERT 启动子基因序列与 GenBank（AN097365）中 hTERT 启动子 DNA 序列完全一致，酶切 8HSE 序列与所构建序列完全一致，两者均经华大基因有限公司测序确认。

### 2.3 两种细胞株 hTERT mRNA 表达水平

采用逆转录 PCR 检测 SW480 和 MKN28 细胞株本身的 TERT 表达，并采用 β-actin 水平的标化进行了半定量分析（重复检测 3 次），检测结果显示

SW480 细胞株中 hTERT/actin =  $4.13 \pm 0.03$ ，MKN28 细胞株中 hTERT/actin =  $0.057 \pm 0.002$ （图 3）。

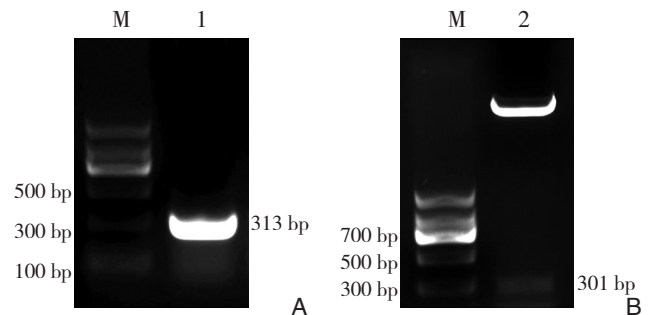


图 1 pGL4.2-hTERTp 载体鉴定 A: PCR 鉴定; B: 双酶切鉴定 M: DNA 分子质量标记; 1: PCR 产物; 2: 双酶切产物

Figure 1 Identification of pGL4.2-hTERTp vectors A: PCR identification; B: Double enzyme digestion identification M: DNA marker; 1: PCR products; 2: Double enzyme digestion products

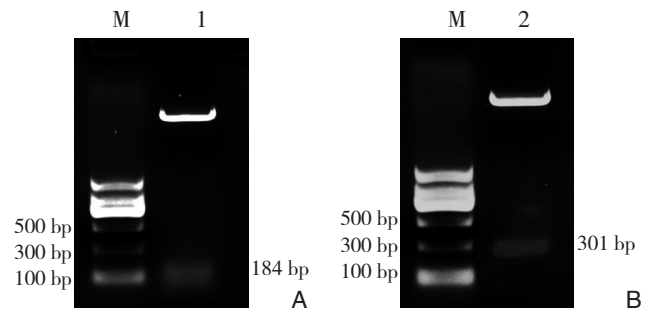


图 2 pGL4.2-8HSE-hTERTp 载体鉴定 A: kpn I 和 Nhe I 双酶切鉴定 (8HSE); B: Nhe I 和 Hind III 双酶切鉴定 (hTERTp) M: DNA 分子质量标记; 1, 2: 酶切产物

Figure 2 Identification of pGL4.2-8HSE-hTERTp vectors A: kpn I/Nhe I double digestion (8HSE); B: Nhe I/Hind III double digestion (hTERTp) M: DNA marker; 1 and 2: Enzyme-digested products

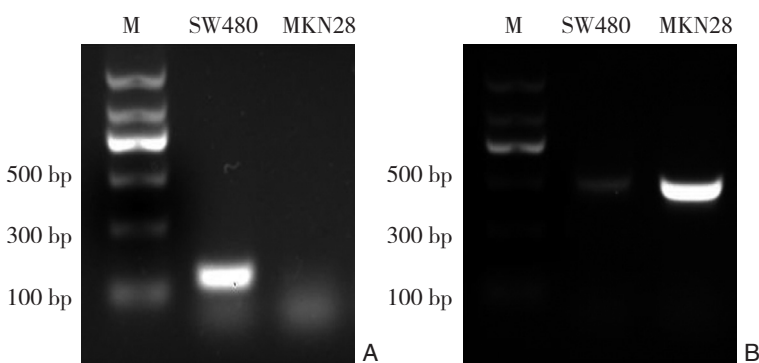
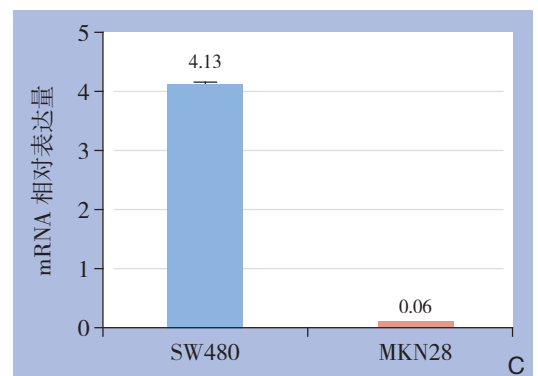


图 3 SW480 细胞与 MKN28 细胞 hTERT mRNA 和 β-actin mRNA 水平 A: hTERT mRNA 在两细胞株中的表达; B: β-actin mRNA 在两细胞株中的表达; C: SW480 和 MKN28 细胞株 hTERT/β-actin 相对灰度比值比较

Figure 3 Expression levels of hTERT and β-actin mRNA in SW480 and MKN28 cells A: Expressions of hTERT mRNA in the two types of cells; B: Expressions of β-actin mRNA in the two types of cells; C: Gray-scale ratios of hTERT/β-actin in SW480 and MKN28 cells



A: hTERT mRNA 在两细胞株中的表达; B: β-actin mRNA 在两细胞株中的表达; C: SW480 和 MKN28 细胞株 hTERT/β-actin 相对灰度比值比较

## 2.4 8HSE对hTERT启动子转录活性的影响

以单独hTERT<sub>p</sub>重组荧光素酶报告基因载体pGL4.2-hTERT<sub>p</sub>和带有8HSE调控序列的hTERT<sub>p</sub>的荧光素酶报告基因载体pGL4.2-8HSE-hTERT<sub>p</sub>分别与内参质粒pGL4.74瞬时共转染细胞株SW480和MKN28,两细胞株转染后相对荧光素酶活性如图4所示。结果显示,37℃条件下,高表达hTERT的SW480细胞中hTERT<sub>p</sub>转录活性明显高于低表达hTERT细胞株MKN28(28.44 vs. 7.80),差异有统计学意义( $P<0.05$ ),同时常温下8HSE对

hTERT<sub>p</sub>转录活性无增强作用(图4A),甚至在SW480细胞株中8HSE对hTERT转录活性起到抑制作用(hTERT<sub>p</sub>为28.44,8HSE-hTERT<sub>p</sub>为6.44)。温度刺激对单纯hTERT<sub>p</sub>转录活性影响较小;在温度诱导刺激下,8HSE明显增强高表达hTERT细胞株SW480中hTERT<sub>p</sub>转录活性(327.34),与单纯hTERT<sub>p</sub>转录活性比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),而在低表达hTERT细胞株MKN28中,该促进作用较小( $P>0.05$ )(图4B)。

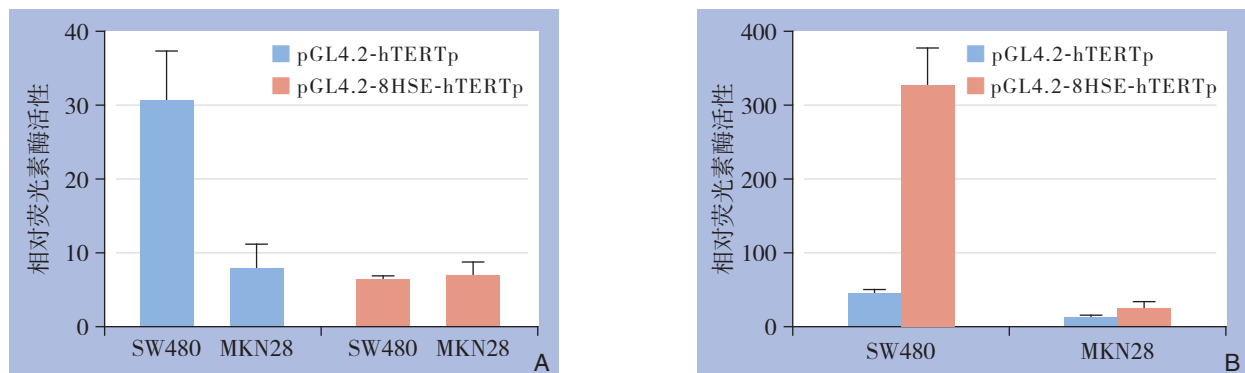


图4 不同温度条件下SW480和MKN28细胞株中hTERT<sub>p</sub>和8HSE-hTERT<sub>p</sub>转录活性 A: 37℃下SW480和MKN28细胞株中hTERT<sub>p</sub>和8HSE-hTERT<sub>p</sub>转录活性; B: 43℃下SW480和MKN28细胞株中hTERT<sub>p</sub>和8HSE-hTERT<sub>p</sub>转录活性

Figure 4 Transcriptional activities of hTERT<sub>p</sub> and 8HSE-hTERT<sub>p</sub> in SW480 and MKN28 cells under different temperature conditions

A: Transcriptional activities of hTERT<sub>p</sub> and 8HSE-hTERT<sub>p</sub> in SW480 and MKN28 cells at 37℃; B: Transcriptional activities of hTERT<sub>p</sub> and 8HSE-hTERT<sub>p</sub> in SW480 and MKN28 cells at 43℃

## 3 讨论

基因疗法具有在癌症治疗产生重大影响的能力。其中靶向性是肿瘤基因治疗的最为关键的制约因素之一,当前基因治疗载体转入目标肿瘤细胞的低效率直接限制此方法的广泛应用,因为基因治疗存在对正常组织细胞的毒性<sup>[3]</sup>。解决这一问题的一个办法是利用靶向性较高的启动子或采用低毒性基因,一些组织或肿瘤特定的启动子已经在一些模型中得到验证并产生良好的效果。这些启动子包括恶性肿瘤中的hTERT<sub>p</sub>,黑色素瘤中的酪氨酸酶启动子<sup>[13]</sup>,肺癌、胃癌中的癌胚抗原(CEA)启动子<sup>[14]</sup>,纤维肉瘤中的Grp78/Bip启动子<sup>[1]</sup>,研究证实,hTERT<sub>p</sub>具有较高的靶向性。

研究<sup>[15]</sup>表明,除干细胞、生殖细胞和活化的淋巴细胞外,hTERT在多数永生化细胞和各种人类肿瘤组织中均有表达,而在大多数正常组织中表达阴性,这一特点使得hTERT<sub>p</sub>可以作为绝

大多数肿瘤靶向治疗的可选启动子之一。在肿瘤细胞株中,检测到hTERT表达,说明hTERT<sub>p</sub>在该细胞株中具有活性,将hTERT<sub>p</sub>构建于双荧光素酶报告基因载体上转染该细胞株,这样就可以检测hTERT<sub>p</sub>在该细胞株中的转录活性。但由于hTERT<sub>p</sub>转录活性较低,所以本研究构建热休克元件8HSE靶向增强该启动子的转录活性。

热诱导是通过特异性启动子序列,即热休克元件HSE,来影响热休克蛋白的表达。其中HSE是热休克蛋白HSP70主要的转录反应元件<sup>[16]</sup>,多个重复一致序列5'-nGAAn-3'是热调控基因的启动子组件的主要组成部分。虽然HSE可以被多种因素激活,如缺氧<sup>[17]</sup>、高温、应激、重金属<sup>[18]</sup>、血清及低温等,但是热处理的作用最显著<sup>[18]</sup>。实际上这些启动子的热反应是由热休克因子(HSF1)介导的<sup>[19]</sup>,HSF1结合到这些HSE序列并调节特定基因的表达,而热处理可以增加HSF1蛋白表达<sup>[6,20]</sup>。

本文成功构建含hTERT<sub>p</sub>及8HSE-hTERT<sub>p</sub>的

双荧光素酶报告基因载体，与内参载体pGL4.74瞬时共转染结直肠癌细胞株SW480和胃癌细胞株MKN28，并给予43℃处理1h，结果显示高表达hTERT的SW480细胞株中hTERT<sub>p</sub>转录活性明显高于低表达hTERT的MKN28细胞株；hTERT<sub>p</sub>子本身受温度影响较小，SW480和MKN28细胞株中，温度刺激对8HSE-hTERT<sub>p</sub>序列转录活性有明显激活作用，该结果为以后该启动子及热反应元件靶向调控目的基因表达奠定基础。

### 参考文献

- [1] Brade AM, Ngo D, Szmitko P, et al. Heat-directed gene targeting of adenoviral vectors to tumor cells[J]. *Cancer Gene Ther*, 2000, 7(12):1566-1574.
- [2] Agrawal A, Dang S, Gabrani R. Recent patents on anti-telomerase cancer therapy[J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2012, 7(1):102-117.
- [3] Lü MH, Liao ZL, Zhao XY, et al. hTERT-based therapy: a universal anticancer approach (Review)[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(6):1945-1952.
- [4] Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer[J]. *Lancet Oncol*, 2002, 3(8):487-497.
- [5] Gómez Ramos MJ, Miguel González Valverde F, Sánchez Álvarez C, et al. Fatal heat stroke in a schizophrenic patient[J]. *Case Rep Crit Care*, 2012:924328. doi: 10.1155/2012/924328.
- [6] Rome C, Couillaud F, Moonen CT. Spatial and temporal control of expression of therapeutic genes using heat shock protein promoters[J]. *Methods*, 2005, 35(2):188-198.
- [7] Salimgareeva MKh, Sadovnikov SV, Farafontova EI, et al. Cellular test systems for the search for transcription factor activity modulators[J]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 2014, 50(2):219-225.
- [8] 贺赛, 郑见宝, 孙学军, 等. 缺氧诱导的肿瘤特异性基因治疗载体的靶向性鉴定[J]. *西安交通大学学报:医学版*, 2014, 35(4):465-469.
- [9] 贺赛, 孙学军, 郑见宝, 等. hTERT, CEA及CMV启动子在人结肠癌细胞株中的转录活性比较[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(1):74-80.
- [10] Bajoghli B, Aghaallaei N, Heimbucher T, et al. An artificial promoter construct for heat-inducible misexpression during fish embryogenesis[J]. *Dev Biol*, 2004, 271(2):416-430.
- [11] Shen LJ, Chen FY, Zhang Y, et al. MYCN transgenic zebrafish model with the characterization of acute myeloid leukemia and altered hematopoiesis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3):e59070. doi: 10.1371/journal.pone.0059070.
- [12] Ortner V, Kaspar C, Halter C, et al. Magnetic field-controlled gene expression in encapsulated cells[J]. *J Control Release*, 2012, 158(3):424-432.
- [13] Pleshkan VV, Alekseenko IV, Zinovyeva MV, et al. Promoters with cancer cell-specific activity for melanoma gene therapy[J]. *Acta Naturae*, 2011, 3(2):13-21.
- [14] 王伟, 孙学军, 郑见宝, 等. 缺氧促进5HRE和AFP<sub>p</sub>调控的NTR/CB1954自杀基因系统特异杀伤HepG2细胞[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16(2):125-129.
- [15] Gu J, Kagawa S, Takakura M, et al. Tumor-specific transgene expression from the human telomerase reverse transcriptase promoter enables targeting of the therapeutic effects of the Bax gene to cancers[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(19):5359-5364.
- [16] Murphy ME. The HSP70 family and cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(6):1181-1188.
- [17] Ali YO, McCormack R, Darr A, et al. Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase is a stress response protein regulated by the heat shock factor/hypoxia-inducible factor 1 alpha pathway[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(21):19089-19099.
- [18] Koizumi S, Suzuki K, Yamaguchi S. Heavy metal response of the heat shock protein 70 gene is mediated by duplicated heat shock elements and heat shock factor 1[J]. *Gene*, 2013, 522(2):184-191.
- [19] Dai C, Whitesell L, Rogers AB, et al. Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis[J]. *Cell*, 2007, 130(6):1005-1018.
- [20] Walther W, Stein U. Heat-responsive gene expression for gene therapy[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(7/8):641-649.

( 本文编辑 宋涛 )

本文引用格式: 王孝琰, 贺赛, 孙学军, 等. 热诱导对8HSE修饰的hTERT启动子转录活性的增强作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(5):717-722. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.05.020

Cite this article as: WANG XL, HE S, SUN XJ, et al. Enhancing effect of thermal induction on transcriptional activity of 8HSE modified hTERT promoter[J]. *Chin J Gen Surg*, 2015, 24(5):717-722. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.05.020