

· 论 著 ·

hTERT 启动子特异性调控炭疽毒素致死因子表达 以杀伤人肺腺癌 A549 细胞的研究^{*}

卓文磊¹, 陈芳琳¹, 陶光利²

(第三军医大学新桥医院:1. 全军肿瘤研究所;2. 全军肾脏病中心, 重庆 400037)

摘 要:目的 观察人端粒酶逆转录酶启动子(hTERTp)靶向调控炭疽毒素致死因子(LF)表达对人肺腺癌 A549 细胞活力及凋亡/坏死的影响。方法 构建含 hTERTp 或 CMV 启动子(CMVp)且表达 LF 的真核质粒表达载体(phTERTp-LF 或 pCMV-LF),分别转染人肺腺癌 A549 细胞株和正常人胚肺成纤维 MRC-5 细胞株。针对 A549、A549_{hTERTp-LF}、A549_{CMVp-LF}、MRC-5、MRC-5_{hTERTp-LF}、MRC-5_{CMVp-LF} 六组细胞,分别采用 RT-PCR 和 Western blot 检测 LF mRNA 和蛋白表达,用 MTT 分析检测细胞活力,用流式细胞仪检测细胞凋亡/坏死。结果 与 A549 组比较,A549_{hTERTp-LF} 组、A549_{CMVp-LF} 组均出现明显的 LF mRNA 和蛋白表达,以及细胞活力降低和凋亡/坏死率上升;与 A549_{hTERTp-LF} 组相比,A549_{CMVp-LF} 组 LF mRNA 和蛋白表达更高,细胞活力降低和凋亡/坏死率上升更明显。与 MRC-5 组比较,MRC-5_{hTERTp-LF} 组也不能测出 LF mRNA 和蛋白表达,细胞活力和凋亡/坏死率亦无明显变化,但 MRC-5_{CMVp-LF} 组的 LF mRNA 和蛋白表达上升,细胞活力降低和凋亡/坏死率增加。结论 hTERTp 能特异性地驱动 LF 表达并杀伤人肺腺癌 A549 细胞,但避免了对 MRC-5 细胞的毒性,可望提供一种针对肺腺癌细胞且不良反应小的靶向治疗策略。

关键词:人端粒酶逆转录酶;启动区;致死因子;细胞凋亡;A549 细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.11.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)11-1051-04

Specific regulation of anthrax toxin lethal factor expression by hTERT promoter in human lung carcinoma A549 cells^{*}

Zhuo Wenlei¹, Chen Fangling¹, Tao Guangli²

(1. Cancer Research Institute; 2. Renal Diseases Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of anthrax toxin lethal factor (LF) expression regulated by human telomerase reverse transcriptase gene promoter (hTERTp) on A549 cells viability and apoptosis/necrosis. **Methods** LF eukaryotic expression vectors for LF, phTERTp-LF containing hTERTp or pCMV-LF containing CMV promoter(CMVp), was designed, constructed, and lipotransfected into human lung adenocarcinoma cells line (A549 cells) or human lung embryonated fibroblast cells line (MRC-5 cells) respectively. For the six groups of cells, including A549, A549_{hTERTp-LF}, A549_{CMVp-LF}, and MRC-5, MRC-5_{hTERTp-LF}, MRC-5_{CMVp-LF}. LF mRNA and protein expression were examined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, cell viability was measured by MTT analysis, apoptosis/necrosis was detected using Annexin V-FITC labeling method. **Results** Compared with that in A549 group, LF mRNA and protein expression upregulated, cell viability decreased, and apoptosis/necrosis rates increased significantly in A549_{hTERTp-LF} and A549_{CMVp-LF} groups. Compared with that in A549_{hTERTp-LF} group, there are stronger LF mRNA and protein expression, lower cell viability, and higher apoptosis/necrosis rate in A549_{CMVp-LF} group. Compared with that in MRC-5 group, LF mRNA and protein expression were not detectable also, cell viability and apoptosis/necrosis rates are similar in MRC-5_{hTERTp-LF} group, however, LF mRNA and protein expression upregulated, cell viability decreased, and apoptosis/necrosis rates increased significantly in MRC-5_{CMVp-LF} group. **Conclusion** Although activity is weaker than CMVp, hTERTp can specifically drive LF expression, injure human lung adenocarcinoma A549 cells, and avoid the toxicity to MRC-5 cells. This study may provide a targeted strategy for lung adenocarcinoma therapy with low side effect.

Key words: human telomerase reverse transcriptase; promoter regions; apoptosis; lethal factor; A549 cells line

利用生物毒素杀伤肿瘤细胞是当前肿瘤治疗的方向之一,但目前常用的生物毒素或毒性不够,或缺乏对肿瘤细胞的特异性,从而限制了其应用。近年,作为炭疽毒素的组分之一,炭疽毒素致死因子(LF)以其独特性受到关注^[1]。因为 LF 具有强烈的细胞内毒性,但在细胞外并无毒性,LF 需要在保护性抗原(PA)结合于胞膜受体的介导下,才能进入胞浆发挥细胞毒作用。所以,通过基因转染,让 LF 表达于肺腺癌细胞,既可利用其强烈细胞内毒性杀伤肿瘤细胞,而且毒素逸出或分泌到细胞外后,因缺失 PA 的介导而不能进入并杀伤正常细胞,从而限

制其不良反应。另一方面,人端粒酶逆转录酶基因的启动子(hTERTp)在肺腺癌等肿瘤中活性明显上调,利用它可驱动下游基因选择性地肺腺癌细胞中转录^[2]。本研究拟构建 hTERTp 调控 LF 表达的质粒载体,用以转染人肺腺癌 A549 细胞,观察 LF 在 A549 细胞内的表达,以及对 A549 细胞活力和凋亡/坏死的影响,为今后针对肺腺癌的特异性生物毒素治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 hTERTp 序列及 LF 序列均由上海青禾公司行全

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30800506);重庆自然科学基金资助项目(CSTC,2008BB5124);第三军医大学科研创新基金资助项目(2008D204)。

基因合成。PCR 引物序列用 DNASTar 软件设计,订购于上海生工公司,带有 CMV 启动子(CMVp)的 pAAV-MCS 真核表达质粒载体购于 Stratagene 公司。脂质体(Lipofectamine TM2000)购于 Invitrogen 公司,质粒提取试剂盒购于 Omega 公司,TRI reagent 购于 MRC 公司,RT 试剂盒购于 MBI 公司,PCR 试剂盒购于 TOYABO 公司。羊抗 LF 抗体购于 Santa cruz 公司,羊抗人 GAPDH 抗体和 HRP 标记的兔抗羊 IgG 二抗购于中山公司。凋亡检测试剂盒购于碧云天公司。肺腺癌 A549 细胞株和健康人胚肺成纤维细胞 MRC-5 皆由本研究所保存,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基常规传代培养于 37℃,5%CO₂ 条件下。

1.2 含 hTERTp 或 CMVp 且表达 LF 的质粒载体构建及细胞转染 hTERTp 核心序列参考 Horikawa 等^[3] 的文献,两侧加上 MluI 酶切位点(CGCGT)和 BsaBI 酶切位点(GAT TG),其正链为 69 bp,正链:5'-CGC GTG ACG CCC AGG ACC GCG CTT CCC ACG TGG CGG AGG GAC TGG GGA CCC GGG CAC CCG TCC TGA TTG-3',负链:3'-ACT GCG GGT CCT GGC GCG AAG GGT GCA CCG CCT CCC TGA CCC CTG GGC CCG TGG GCA GGA CTA AC-5'。全基因合成并测序正确。LF 序列参考 pubmed 基因库数据(M30210),选择其 CDS 区除信号肽序列部分(784-3114,2 331 bp),两侧加 XbaI 酶切位点(CTAGA)和 SacI 酶切位点(GAGCT),共 2 431 bp,亦行全基因合成并测序正确。

hTERTp 核心序列正负链在退火缓冲液(10 mmol Tris pH8.0,50 mmol NaCl,1 mmol EDTA)中,等摩尔退火结合(95℃ 5 min,室温),形成双链结构。参考文献^[4]操作,以 MluI 和 BsaBI 进行双酶切,去除其 pAAV-MCS 真核表达质粒载体的 CMVp,再和 hTERTp 核心序列在 T4 连接酶作用下重组,转化 DH5 大肠杆菌,Amp 抗性筛选扩增,试剂盒提取质粒,得到由 hTERTp 驱动的真核表达质粒载体 pHTERTp-MCS。然后以 XbaI 和 SacI 酶切 pHTERTp-MCS 的多克隆位点使之线性化,插入 LF 序列,重组过程同前,得到构建含 hTERTp 驱动的表达 LF 的质粒载体 pHTERTp-LF。另取 pAAV-MCS 载体,直接 XbaI 和 SacI 酶切后和 LF 序列重组,得到 CMVp 驱动的表达 LF 的载体 pCMV-LF。上述载体分别与 LipofectamineTM 2000 按 1 μg : 3 μL 结合成转染液复合物。加入 6 孔板中的 A549 细胞或 MRC-5 细胞,转染 24 h 后收获细胞,行以下实验。每组 5 个样本。

1.3 转染前后 A549 细胞的 LF 表达

1.3.1 RT-PCR 合成 LF、GAPDH 二对 PCR 引物:LF(197 bp):5'-GAA ACA TCG GTC TGG AAA TA-3',5'-ATG CAC GTT GAA TGT AAT AAG-3'。GAPDH(452 bp):5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3',5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'。用 TRI reagent 以一步法提取细胞(10⁷)总 RNA,取 RNA 2 μg 进行 cDNA 合成:70℃ 5 min,37℃ 5 min,42℃ 60 min,70℃ 10 min,冰上;PCR 扩增:94℃ 预变性 1.5 min,(94℃ 0.5 min,50℃ 0.5 min,72℃ 1 min)(反复循环),72℃ 延伸 5 min;PCR 产物以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 1 h 后,图像扫描,用 GAPDH 为内参照进行半定量分析,用相对光密度值(relative optical density,ROD)表示 LF mRNA 相对含量。

1.3.2 Western blot 用 TRI reagent 提取细胞(10⁷)蛋白质。取蛋白质 40 μg 以 10%SDS-PAGE 电泳分离;干于电转移蛋白到 PVDF 膜,分别加一抗(羊抗 LF,或羊抗人 GAPDH)杂交 1

h,二抗(HRP 标记的兔抗羊 IgG)杂交 1 h;DAB 染色。图像扫描分析,以 GAPDH 为内参照进行半定量分析,用 ROD 表示 LF 蛋白相对含量。

1.4 MTT 分析 各组细胞分别以 2.0×10⁴/mL 接种于 96 孔细胞培养板,每孔 100 μL。常规培养。70%融合时行转染质粒处理 24 h,再据以下过程进行 MTT 比色实验。(1)结晶:每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL),继续培养 4 h 后终止培养,在光镜下观察,可见细胞内形成蓝紫色结晶物;(2)溶解:弃孔内上清液,加 150 μL 二甲基亚砜(DMSO),振荡 10 min,使蓝紫色结晶物溶解;(3)比色:选择 490 nm 波长,在酶标仪上测定各孔的光密度值(D value)。

1.5 流式细胞仪检测凋亡 根据试剂盒说明书操作:各组细胞以胰酶消化,计数后取 10⁵ 以 1 000 g 离心 5 min,弃上清,加入 200 μL Annexin V-FITC 结合液 2 次重悬细胞。室温(20~25℃)避光孵育 10 min。再加入 10 μL 碘化丙啶染色液,混匀,冰浴避光放置 10 min。随即进行流式细胞仪检测其凋亡/坏死率(所有被 Annexin V-FITC 染色的细胞)。Annexin V-FITC 为绿色荧光,碘化丙啶为红色荧光。正常的活细胞不被 Annexin V-FITC 和碘化丙啶染色。凋亡早期的细胞仅被 Annexin V-FITC 染色,坏死细胞和凋亡晚期的细胞可以同时被 Annexin V-FITC 和碘化丙啶染色。

1.6 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 SPSS13.0 软件进行单因素方差分析。

2 结 果

2.1 各组细胞 LF mRNA 表达 各组在 452 bp 处皆显现明亮的 GAPDH 内参照条带且无明显差别,部分可于 197 bp 处见特异性 LF 基因条带。和 A549 组比较,A549_{hTERTp-LF} 组、A549_{CMVp-LF} 组均出现明显的 LF mRNA 条带表达,见图 1。和 A549_{hTERTp-LF} 组比较,A549_{CMVp-LF} 组的 ROD mRNA 值显著升高($P<0.01$),提示 hTERTp 和 CMVp 都能驱动 LF mRNA 表达于 A549 细胞中,但 CMVp 效率更高,见表 1。MRC-5 和 MRC-5_{hTERTp-LF} 组皆未测出 LF mRNA 表达,但 MRC-5_{CMVp-LF} 组中有一定 LF mRNA 表达,见图 2。和 MRC-5 组比较,MRC-5_{CMVp-LF} 组的 ROD mRNA 显著升高($P<0.01$),但 MRC-5_{hTERTp-LF} 组的 ROD mRNA 值差异无统计学意义,提示 CMVp 在 MRC-5 细胞亦有活性,反之,hTERTp 并不能驱动 LF mRNA 在 MRC-5 细胞中表达,见表 2。

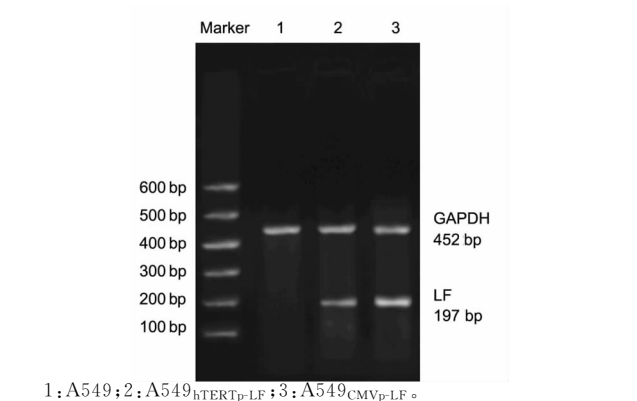
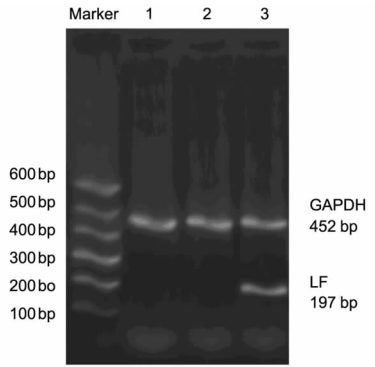


图 1 pHTERTp-LF 或 pCMVp-LF 载体转染对 A549 细胞表达 LF mRNA 的影响(RT-PCR)

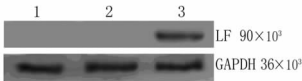
2.2 各组细胞 LF 蛋白表达 各组在相对分子质量 36×10³ 处皆显现明亮的 GAPDH 内参照印迹且无明显差别,部分可于相对分子质量 90×10³ 处见特异性 LF 蛋白印迹。和 A549

组比较,A549_{hTERTp-LF}组、A549_{CMVp-LF}组均出现明显的 LF 蛋白表达,见图 3。和 A549_{hTERTp-LF}组相比,A549_{CMVp-LF}组 ROD 蛋白值显著增高($P<0.01$),提示 hTERTp 能驱动 LF 蛋白表达于 A549 细胞中,但其效率低于 CMVp,见表 1。MRC-5 和 MRC-5_{hTERTp-LF}组皆未测出 LF 蛋白表达,但 MRC-5_{CMVp-LF}组中有一定 LF 蛋白表达,见图 4。和 MRC-5 组比较,MRC-5_{CMVp-LF}组的 ROD 蛋白值显著升高($P<0.01$),但 MRC-5_{hTERTp-LF}组的 ROD 蛋白值无显著差异,提示 CMVp 在 MRC-5 细胞亦有活性,反之,hTERTp 并不能驱动 LF 蛋白在 MRC-5 细胞中表达,见表 2。



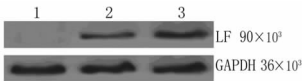
1:MRC-5;2:MRC-5_{hTERTp-LF};3:MRC-5_{CMVp-LF}。

图 2 phTERTp-LF 或 pCMVp-LF 载体转染对 MRC-5 细胞表达 LF mRNA 的影响(RT-PCR)



1:A549;2:A549_{hTERTp-LF};3:A549_{CMVp-LF}。

图 3 phTERTp-LF 或 pCMVp-LF 载体转染对 A549 细胞表达 LF 蛋白的影响(Western blot)



1:MRC-5;2:MRC-5_{hTERTp-LF};3:MRC-5_{CMVp-LF}。

图 4 phTERTp-LF 或 pCMVp-LF 载体转染对 MRC-5 细胞表达 LF 蛋白的影响(Western blot)

表 1 phTERTp-LF 或 pCMVp-LF 载体转染对 A549 细胞表达正常 LF mRNA 和蛋白的影响($\bar{x}\pm s,n=5$)

指标	A549	A549 _{hTERTp-LF}	A549 _{CMVp-LF}
ROD mRNA	0.038±0.013	0.744±0.141▲	1.284±0.077▲▲
ROD 蛋白	0.034±0.017	0.284±0.063▲	0.636±0.102▲▲

▲: $P<0.01$,与 A549 比较;▲▲: $P<0.01$,与 A549_{hTERTp-LF}比较。

表 2 phTERTp-LF 或 pCMVp-LF 载体转染对 MRC-5 细胞表达 LF mRNA 和蛋白的影响($\bar{x}\pm s,n=5$)

组别	MRC-5	MRC-5 _{hTERTp-LF}	MRC-5 _{CMVp-LF}
ROD mRNA	0.040±0.019	0.044±0.028	0.722±0.160▲
ROD 蛋白	0.028±0.013	0.050±0.027	0.668±0.109▲

▲: $P<0.01$,与 MRC-5 比较。

2.3 各组细胞活力比较 和 A549 组比较,A549_{hTERTp-LF}组、A549_{CMVp-LF}组均出现明显的 D 值显著下降($P<0.01$),

A549_{CMVp-LF}的 D 值又较 A549_{hTERTp-LF}更低($P<0.01$),提示,hTERTp 和 CMVp 能驱动 LF 表达于 A549 细胞后,皆能有效降低细胞活力,而 hTERTp 的效能弱于 CMVp,见表 3。和 MRC-5 组比较,MRC-5_{hTERTp-LF}组 D 值无显著差异,而 MRC-5_{CMVp-LF}组 D 值显著降低($P<0.01$),提示 phTERTp-LF 载体转染对 MRC-5 细胞无显著影响,但 pCMVp-LF 载体转染能在一定程度上抑制 MRC-5 细胞活力,见表 4。

2.4 各组细胞凋亡/坏死率比较 和 A549 细胞组比较,A549_{hTERTp-LF}组、A549_{CMVp-LF}组凋亡/坏死率显著增加($P<0.01$),A549_{CMVp-LF}的凋亡/坏死率又较 A549_{hTERTp-LF}更高($P<0.01$),提示,hTERTp 和 CMVp 能驱动 LF 表达于 A549 细胞后,皆能有效导致细胞凋亡/坏死,但 hTERTp 的此方面效能弱于 CMVp,见表 3。和 MRC-5 组比较,MRC-5_{hTERTp-LF}组凋亡/坏死率无显著差异,而 MRC-5_{CMVp-LF}组凋亡/坏死率显著增加($P<0.01$),提示 phTERTp-LF 载体转染对 MRC-5 细胞凋亡/坏死率无显著影响,但 pCMVp-LF 载体转染能在一定程度上导致 MRC-5 细胞发生凋亡/坏死,见表 4。

表 3 phTERTp-LF 或 pCMVp-LF 载体转染对 A549 细胞活力或凋亡/坏死影响($\bar{x}\pm s,n=5$)

指标	A549	A549 _{hTERTp-LF}	A549 _{CMVp-LF}
MTT D 值	0.168±0.016	0.106±0.011▲	0.062±0.015▲▲
凋亡/坏死	0.048±0.024	0.574±0.116▲	0.810±0.063▲▲

▲: $P<0.01$,与 A549 组比较;▲▲: $P<0.01$,与 A549_{hTERTp-LF}组比较。

表 4 phTERTp-LF 或 pCMVp-LF 载体转染对 MRC-5 细胞活力或凋亡/坏死影响($\bar{x}\pm s,n=5$)

指标	MRC-5	MRC-5 _{hTERTp-LF}	MRC-5 _{CMVp-LF}
MTT D 值	0.122±0.015	0.114±0.018	0.080±0.019▲
凋亡/坏死	0.058±0.022	0.086±0.011	0.528±0.142▲

▲: $P<0.01$,与 MRC-5 比较。

3 讨 论

目前临床常用的大多数化疗药属无机化合物,其靶向性和杀伤性不足,限制了其临床效果,相比而言,生物毒素是自然进化的产物,结构和种类多样,其毒性远较非生物毒素强,有望成为抗肿瘤重要新药来源。炭疽毒素由炭疽杆菌产生,具有强大的细胞内毒性,它包括 PA、水肿因子(EF)和 LF 3 个组分,在 PA 结于敏感细胞膜受体的介导下,EF 和 LF 进入细胞发挥杀伤作用。LF 杀伤细胞的机制可能和灭活细胞内丝裂原激活的蛋白激酶激酶(MAPKK)有关^[5-6]。缺乏 PA 介导时,单独的 LF 和 EF 都不能进入并杀伤细胞。鉴于此,通过基因转染技术,让 LF 特异性地表达于肿瘤细胞,有望实现针对肿瘤细胞的靶向性杀伤,并减少对正常细胞的不良反应。

人端粒酶逆转录酶是细胞端粒酶活性的主要决定因素,在包括肺腺癌在内的绝大部分肿瘤细胞中活化,而在大多数正常体细胞中表达阴性,故 hTERTp 可作为一种肿瘤特异性启动子,实现在转录水平控制目的基因表达,以获得肿瘤治疗的特异靶向性。但是,hTERTp 是否能驱动 LF 表达于肺腺癌 A549 细胞,其杀伤效能如何,对正常细胞是否存在较大的不良反应,尚未见相关报道。

CMVp 活性强且适用细胞广泛,是目前基因真核表达研究中最常用的启动子。在本研究中,本研究分别构建了

hTERTp 或 CMVp 驱动的 LF 真核表达载体,转染 A549 细胞和 MRC-5-2 细胞株,观察 LF 的表达和对细胞的杀伤。结果发现,hTERTp 和 CMVp 都能驱动 LF 表达于并杀伤 A549 细胞,杀伤效能包括细胞活力下降,凋亡/坏死率上升。所采用的 Annexin V-FITC 标记法,可以同时检测凋亡和坏死比例,其结果和 MTT 分析法检测的细胞活力下降相一致。但 hTERTp 的效能较 CMVp 弱,这可能和 hTERTp 的活性可能比 CMVp 的活性低有关。另一方面,和 CMVp 能驱动 LF 表达于 MRC-5 细胞并杀伤后者相反,hTERTp 并不能驱动 LF 表达于并杀伤 MRC-5 细胞。提示可能和 MRC-5 细胞中端粒酶活性为阴性有关。这提示,hTERTp 驱动 LF 表达是肿瘤特异性的,避免了对正常细胞的毒性。

本研究设想以下几种进一步增进 hTERTp 的活性,以得到更强的抑瘤效应的策略:(1)包括肺癌在内的实体肿瘤细胞往往处于缺氧环境^[7],且往往需要放射治疗,故可在 hTERTp 上游增加缺氧或放射反应元件,构建成缺氧或放射诱导型增强子,以增强 hTERTp 的效能。(2)hTERTp 内部存在 E-box 结合元件,它是 c-Myc 等癌基因激活 hTERTp 的重要结构^[8-9],故可通过人工基因合成,增加 E-box 结合元件的拷贝数,亦有望增加 hTERTp 在肿瘤细胞内的活性。这方面,值得进一步研究。此外,近来还发现,肿瘤血管表达炭疽毒素的另一组份 EF 的受体 TEM-8 和 CMG-2^[10-11],设想如果用 hTERTp 驱动分泌型 EF 表达于肿瘤细胞,则有可能实现对肿瘤血管的靶向性破坏。这方面,亦值得进一步地探索。

参考文献:

- [1] Su Y, Ortiz J, Liu S, et al. Systematic urokinase-activated anthrax toxin therapy produces regressions of subcutaneous human non-small cell lung tumor in athymic nude mice[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(7): 3329-3336.
- [2] Deng WG, Jayachandran G, Wu G, et al. Tumor-specific activation of human telomerase reverses transcriptase promoter activity by activating enhancer-binding protein-2beta in human lung cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(36): 26460-26470.
- (上接第 1050 页)
- al. Ref-1/Ape is critical for formation of the hypoxia-inducible transcriptional complex on the hypoxic response element of the rat pulmonary artery endothelial cell VEGF gene[J]. *FASEB J*, 2004, 18(9): 986-988.
- [20] Gray, MJ, Zhang J, Ellis LM, et al. HIF-1a, STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas[J]. *Oncogene*, 2005, 24(19): 3110-3120.
- [21] Liu LX, Lu H, Luo Y, et al. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia-inducible factor 1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291(4): 908-914.
- [22] Larcher F, Robles AI, Duran H, et al. Up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability

- [3] 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.
- [4] 张明满,李德华,苟兴华,等. 靶向肝癌细胞的重组腺相关病毒载体的构建[J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2005, 12(2): 142-146.
- [5] Bromberg-White JB. Biochemical Characterization of Anthrax Lethal Factor. A proteolytic inhibitor of MEK signaling pathways[J]. *Methods Enzymol*, 2008, 438(8): 355-365.
- [6] Wei W, Lu Q, Chaudry GJ, et al. The LDL receptor-related protein LRP6 mediates internalization and lethality of anthrax toxin[J]. *Cell*, 2006, 124(6): 1141-1154.
- [7] Wang T, Niki T, Goto A, et al. Hypoxia increases the motility of lung adenocarcinoma cell line A549 via activation of the epidermal growth factor receptor pathway[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(4): 506-511.
- [8] Purification JH. Identification of a transcription factor. USF-2, binding to E-box element in the promoter of human telomerase reverse transcriptase(hTERT)[J]. *Proteomics*, 2010, 10(2): 203-211.
- [9] Xu DK, Dwyer J, Li H, et al. Ets2 maintains hTERT gene expression and breast Cancer cell proliferation by interacting with c-Myc[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(35): 23567-23580.
- [10] Cryan LM, Rogers MS. Targeting the anthrax receptors, TEM-8 and CMG-2, for anti-angiogenic therapy[J]. *Front Biosci*, 2011, 16(2): 1574-1588.
- [11] Reeves CV, Dufraine J, Young JA, et al. Anthrax toxin receptor 2 is expressed in murine and tumor vasculature and functions in endothelial proliferation and morphogenesis[J]. *Oncogene*, 2010, 29(6): 789-801.

(收稿日期:2011-11-21 修回日期:2011-12-22)

factor in mouse skin carcinogenesis correlates with malignant progression state and activated H-ras expression levels[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(23): 5391-5396.

- [23] Jeon BH, Gupta G, Park YC, et al. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 regulates endothelial NO production and vascular tone[J]. *Circ Res*, 2004, 95(9): 902-910.
- [24] Kakolyris S, Kaklamanis L, Engels K, et al. Human AP endonuclease 1 (HAP1) protein expression in breast cancer correlates with lymph node status and angiogenesis[J]. *Br J Cancer*, 1998, 77(7): 1169-1173.
- [25] 沈春燕,穆海玉,王忱,等. APE1、VEGF 在非小细胞肺癌组织中的表达及其与预后的关系[J]. *天津医科大学学报*, 2011, 17(2): 166-169, 193.

(收稿日期:2011-11-18 修回日期:2011-12-17)