

• 论 著 •

人骨碱性磷酸酶基因启动子的克隆及高水平尿酸对其活性影响的实验研究^{*}

田民杰^{1,2}, 徐华国^{1△}

(1. 南京医科大学第一附属医院检验学部, 江苏南京 210029; 2. 南京市江宁医院检验科, 江苏南京 211100)

摘要:目的 克隆人骨碱性磷酸酶(BALP)基因的启动子序列并构建荧光素酶报告基因重组质粒,初步探索高水平尿酸(UA)对 BALP 基因启动子活性是否产生影响。方法 首先用聚合酶链反应扩增目的基因 5' 端侧翼上游 627 bp(距转录起始位点-473 bp 至 154 bp)的片段,纯化扩增产物后行双酶切,后亚克隆至 pGL3-basic 质粒,构建 BALP 基因启动子荧光素酶报告基因重组质粒。通过质粒转染到 HEK293 细胞内,最后借助双荧光素酶报告基因活性检测的方法,比较 3 种 UA 水平条件下(0.0、0.2 和 0.4 mmol/L)对基因启动子活性的影响。结果 通过双酶切电泳、基因组测序比对分析,成功构建了 BALP 启动子荧光素酶报告基因重组质粒。随着 UA 水平的升高,HEK293 细胞中启动子重组质粒的相对荧光素酶活性明显降低,差异有统计学差异($P<0.05$)。结论 高水平 UA 能够抑制 BALP 基因启动子的活性。

关键词: 高水平尿酸; 骨碱性磷酸酶; 骨转移

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.13.012

中图法分类号:R73-37

文章编号:1673-4130(2020)13-1585-04

文献标识码:A

Cloning of BALP gene promoter and effect of high uric acid on its activity^{*}

TIAN Minjie^{1,2}, XU Huaguo^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Jiangning Hospital of Nanjing, Nanjing, Jiangsu 211100, China)

Abstract: Objective To clone the promoter sequence of human bone alkaline phosphatase (BALP) gene and to explore whether high level of uric acid (UA) has an effect on BALP promoter activity. **Methods** Firstly, a fragment of 627 bp (from -473 bp to 154 bp) upstream of the 5' end of the target gene was amplified by polymerase chain, and the amplified product was purified and double-digested, and then subcloned into pGL3-basic plasmid to construct BALP promoter. The luciferase reporter gene recombinant plasmid was transfected into HEK293 cells by plasmid, and finally by means of dual luciferase reporter gene activity assay, three different UA levels were compared (0.0, 0.2 or 0.4 mmol/L) pairs. The effect of gene promoter activity. **Results** The double-enzyme digestion electrophoresis and genome sequencing analysis confirmed that the BALP promoter luciferase reporter gene recombinant plasmid was successfully constructed. With the increase of UA level, the relative expression of the promoter recombinant plasmid luciferase activity was significantly decreased, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** High level of UA can inhibit the activity of the BALP gene promoter.

Key words: high uric acid; bone alkaline phosphatase; bone metastasis

骨转移是癌症中晚期外源性恶性肿瘤转移至骨组织引起的疾病,常伴随骨痛和骨质损害^[1-2]。随着癌症诊疗技术的发展,肿瘤患者生存周期明显延长,骨转移出现的概率也明显增加,疾病的早期发现具有

重要价值,可防范或减少错误治疗,提高患者生存质量。目前,骨转移辅助诊断主要依赖影像学技术(如放射核素骨扫描、X 线和 CT),但缺点在于其特异度不能满足临床需求。而骨代谢相关的血清学标志物

^{*} 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81302531);江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20131018)。

作者简介:田民杰,男,主管技师,主要从事分子实验诊断研究。△ 通信作者, E-mail: snxcu2012@yeah.net。

本文引用格式:田民杰,徐华国. 人骨碱性磷酸酶基因启动子的克隆及高水平尿酸对其活性影响的实验研究[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(13):1585-1588.

具有操作便捷、灵敏度高、动态监测的优点,受到临床医生及科研工作者的广泛关注^[3-5],常见标志物如骨碱性磷酸酶(BALP)和抗酒石酸磷酸酶 5b(TRACP 5b)。BALP 是反映成骨细胞活性及功能的血清标志物,《肺癌骨转移专家共识(2014 版)》专门提到 BALP 在诊断和检测骨转移进展中的应用价值^[6]。同时,应用中需要重视 BALP 检测水平被低估,出现和临床症状不相符的情况,进一步研究发现血清中均含有高水平尿酸(UA)。类似现象还见于笔者前期研究的血清标志物 TRACP 5b,TRACP 5b 是反映骨吸收代谢的重要血清标志物,在高水平 UA 条件下 TRACP 5b 水平受到抑制,出现假性降低的现象^[7]。因此,本研究试图通过构建 BALP 重组质粒,探究高水平 UA 是否干扰细胞系中 BALP 的产生及该影响因素产生的分子机制。

1 材料与方法

1.1 标本来源 人骨肉瘤细胞(Saos-2 细胞)、Hek293 细胞、pGL3-basic 质粒(对照质粒)、pRL-TK(海肾荧光素酶报告质粒)均源于南京医科大学第一附属医院检验学部实验室保存标本。DMEM 培养基和限制性内切酶 Kpn I、Bgl II 来自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,胎牛血清和 Opti-MEM 培养基来自美国 Gibco 公司。大肠埃希菌 DH5α、DL5000 Maker、TaKaRa Ex Taq 保真酶和 TDNA 连接酶均购自大连 TaKaRa 宝生物公司。基因组 DNA 提取试剂盒、小量质粒抽提试剂盒、小量切胶回收试剂盒均购自美国 Omega 公司,琼脂糖购自西班牙 GENE 公司。质粒转染试剂 Lipofectamine™ 2000 脂质体购自美国 Invitrogen 公司,双荧光素酶检测试剂盒购自美国 Promega 公司,UA 标准品购自日本奥林巴斯公司。

1.2 方法

1.2.1 人骨肉瘤细胞 Saos-2 细胞培养和细胞基因组 DNA 提取 液氮罐中取出 Saos-2 细胞冻存管,立即置于水浴箱中解冻复苏。细胞培养液含 10% 的胎牛血清、100 μg/mL 链霉素、DMEM 培养基,置于 37 ℃ 5%CO₂ 细胞培养箱中培养。每天观察细胞生长及融合情况,每周传代培养两次,保证实验采用对数期生长细胞。通过胰蛋白酶消化处理收集细胞。用细胞基因组 DNA 提取试剂盒提取 Saos-2 细胞的 DNA,所有步骤严格按照操作手册进行,用分光光度计检测评判 DNA 的水平和纯度,−20 ℃ 保存备用。

1.2.2 基因启动子的预测和 PCR 引物设计 使用生物信息学方法借助 NCBI 基因数据库和 UCSC 网站,获取人 BALP 的全基因组序列;ALPL 基因(编码:NM_000478.4),进一步预测启动子序列位于 AL-PL 基因的 5'端上游区域,设计并合成一对引物用来

扩增位于上游−473 bp 至 154 bp 序列的片段(基因转录起始位点为+1 位)。引物设计选择 Oligo7 软件,目的片段所含的 Bgl II 和 Kpn I 两个酶切位点分析借助 DNAMAN 5.2.9 软件,根据设计引物原则选择评分最高的。上下游引物序列如下,F:5'-GGG GTA CCG TGC AGA GTC AGA GGT GCA CGT-3' (斜体下划线是 Kpn I 酶切位点);R:5'-GAA GAT CTG AGC ACT GGC GAG GGT CCG TCC-3' (斜体下划线是 Bgl II 酶切位点)。

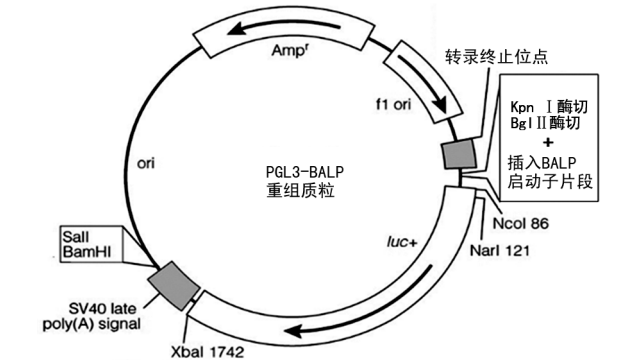
1.2.3 BALP 基因 5'侧翼启动子序列的 PCR 扩增 将提取的 Saos-2 细胞基因组作为 DNA 模板,根据 5'端上游区域设计的引物进行 PCR 扩增,PCR 反应条件设置为:94 ℃ 预变性 5 min,1 个循环;94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 2 min,共 30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 反应体系:双蒸水 37.75 μL,10×PCR 缓冲液 5.00 μL,dNTP 混合液 4.00 μL,上下游引物各 1.00 μL,模板 1.00 μL,TaKaRa Taq 0.25 μL。PCR 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。切下和目的基因大小相同的凝胶条带,用 DNA 小量胶回收试剂盒对 PCR 扩增产物进行纯化、回收。

1.2.4 BALP 基因启动子荧光素酶报告基因重组质粒的克隆 用限制性内切酶 Kpn I 酶和 Bgl II 酶,将已纯化的 PCR 产物和报告基因质粒 PGL3-Basic 分别进行双酶切消化,反应条件为 37 ℃,水浴酶切 2 h。双酶切后的目的基因扩增产物及载体质粒分别在 1%琼脂糖凝胶上电泳,用 DNA 小量胶回收试剂盒纯化,再用 T4 DNA 连接酶把酶切纯化后的 PCR 产物和载体质粒黏性末端进行连接,16 ℃ 水浴连接过夜。取 10 μL 连接产物加入至 100 μL DH5α 大肠埃希菌感受态细胞进行转化,将上述悬液 100 μL 均匀地涂抹于含 50 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂培养板平板上,平板倒置于 37 ℃ 恒温培养箱过夜培养。次日挑取生长出来的菌落进行 PCR 验证,PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析,菌落的阳性克隆可见约 620 bp 大小的条带,放大培养,阳性克隆并提取质粒,将 BALP 基因启动子荧光素酶报告基因重组质粒命名为 PGL3-BALP,构建重组质粒模式简图见图 1。

1.2.5 不同水平 UA 溶液的配制 将 40 mg UA 干粉置室温平衡,溶解在 1 mol/L 的 NaOH 溶液中,保证 UA 结晶颗粒充分溶解防止再次析出,若再次出现结晶时加热溶解。取细胞培养液作为稀释时的溶剂及空白对照品,留意调整 pH 值不宜偏酸。将 UA 溶液稀释配置成 0.2 和 0.4 mmol/L 两种水平备用。

1.2.6 BALP 基因 5'侧翼序列的启动子活性初步鉴定 借助 HEK293 细胞进行质粒转染,鉴定构建的重组质粒的启动子活性。以每孔 2×10^5 个 HEK293 细胞铺板于 48 孔板培养,次日细胞生长密度至 80%~

90%时进行转染,每个质粒设置 3 个复孔。依据 Lipofectamine™ 2000 转染试剂的使用说明书,对照质粒、待测重组质粒和内参照质粒 pRL-TK 进行瞬时共转染。转染 24 h 后去除每孔中的培养基,1×PBS 轻轻洗涤细胞两次,加入新鲜配制的 1×被动裂解缓冲液裂解细胞。采用双荧光素酶检测试剂盒,分别进行待测重组质粒、对照质粒、内参质粒的荧光素酶活性检测,计算荧光素酶活性的比值,即相对荧光素酶强度。



注:右侧方框所示区域为双酶切后插入目的片段区域,构建成新的重组质粒;Amp^r 为氨苄西林耐药基因。

图 1 构建 PGL3-BALP 重组质粒模式简图

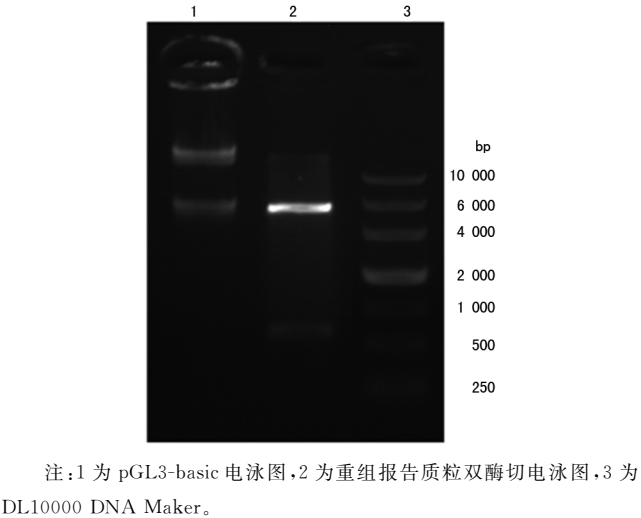
1.3 统计学处理 统计软件选用 SPSS17.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间比较采用双侧 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。分析两个变量之间的相关性采用回归分析的方法。

2 结 果

2.1 BALP 基因启动子荧光素酶报告基因重组质粒的克隆 用 Saos-2 细胞基因组作为 DNA 模板,根据 5'端上游区域设计的引物进行 PCR 扩增,产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果与目的条带大小一致。将获得的重组质粒进行双酶切鉴定,利用 Kpn I 和 Bgl II 限制性内切酶,将双酶切产物进行核酸电泳并观察条带分布。阳性克隆在单个泳道中显示为两个条带:一条大小约 5 000 bp(载体质粒片段),另一条约 620 bp(目的片段),根据条带位置可以判断与目的片段相同,见图 2。将双酶切鉴定为阳性克隆的质粒送外测序分析,将测序公司返回的结果序列输入到在线 BLAST 核酸比对软件,与 ALPL 基因的 5 侧翼区的核酸序列比对结果相同。

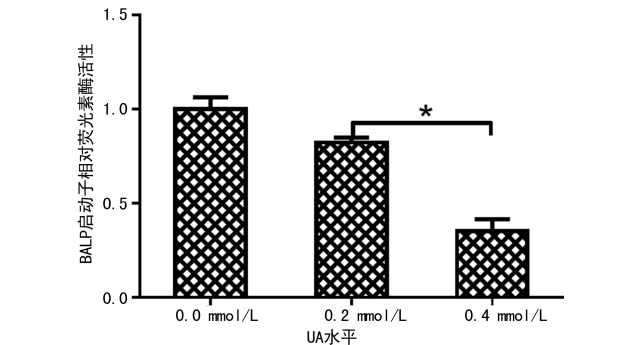
2.2 人 BALP 启动子活性的检测 将构建成功的 BALP 启动子荧光素酶报告基因重组质粒与内参质粒 pRL-TK 共转染至 HEK293 细胞中,转染 6 h 后分别将不同水平 UA(0.0、0.2、0.4 mmol/L)溶液加入到培养液,24 h 后进行双荧光素酶活性检测。数据表达取 3 次试验的平均值显示为 $\bar{x} \pm s$ 。结果显示,细胞培养液中未加入 UA 溶液时荧光素酶活性为 1.00 ± 0.06 ;加入 UA 水平为 0.2、0.4 mmol/L 时,相对荧

光素酶活性分别为 0.82 ± 0.03 、 0.35 ± 0.06 ,两者差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。



注:1 为 pGL3-basic 电泳图,2 为重组报告质粒双酶切电泳图,3 为 DL10000 DNA Maker。

图 2 BALP 启动子重组质粒酶切后电泳鉴定



注:加入 0.4 mmol/L UA 时的相对荧光素酶活性与加入 0.2 mmol/L UA 时比较,* $P < 0.05$ 。

图 3 人 BALP 启动子荧光素酶报告基因重组质粒在不同水平 UA 溶液中的相对荧光素酶活性比较

3 讨 论

BALP 来源于成骨细胞,排除了肝、肾、肠道等疾病的干扰,能更特异地反映骨代谢情况,当骨形成大于骨吸收时,血清中 BALP 活性明显增高,是反映成骨细胞活性及骨形成的敏感指标之一^[8]。骨是多种实体瘤的常见转移部位,包括肺癌、乳腺癌、卵巢癌^[9-10],骨转换标志物可应用在疾病的诊断、预后和预测过程中^[11]。

随着生活水平不断提高,高尿酸血症(HUA)患病率不断增加,我国沿海经济发达地区 HUA 的患病率超过 10%^[12-13]。2010—2015 年江浙沪皖地区一项基于 24 家医院的横断面研究发现,江苏地区 HUA 检出率达 14.84%^[14]。HUA 还与恶性肿瘤的进展、转移相关^[15],晚期肿瘤患者放、化疗时会破坏细胞核,UA 随之释放增多^[16]。UA 是嘌呤的终末代谢产物,可清除氧自由基,抑制氧化应激反应^[17],使骨细胞内抗氧化能力下降,降低反应骨代谢的相关标志物,抑制破骨细胞的生成^[18]。国外研究尝试在老鼠体内建

立 UA 干扰破骨细胞的实验模型,验证 UA 可以降低破骨细胞内活性氧自由基(ROS)水平,进而影响破骨细胞生成,降低骨转化相关标志物^[19]。基于上述研究推测,在人体内可能也存在类似干扰,临床监测患者的 BALP 需留意 HUA 的干扰。因此,本实验借助细胞模型来验证高水平 UA 影响 BALP 的生成,并探索其影响的机制。

在高水平 UA 对 BALP 启动子的干扰实验中,将 UA 最高水平设置为 0.4 mmol/L,这是因为 UA 水平为 0.8 mmol/L 时,HEK293 细胞的凋亡明显增加,结果重复性差,不稳定。此外,国内学者在体外观察不同水平 UA 对培养肾小管上皮细胞影响时也有类似发现,0.1 mmol/L UA 溶液组(最低水平组)检测肾小管上皮细胞凋亡率已经达到(73.4±11.7)%,且伴随 UA 水平增加细胞凋亡率呈现剂量依赖性^[20]。

本研究借助现有 Saos-2 细胞系成功构建了人 BALP 基因启动子荧光素酶基因报告重组质粒,并验证高水平 UA 对 BALP 基因启动子活性产生抑制作用。下一步工作尝试探索在其他人骨肉瘤细胞系中(如 MG-63、U2SO)同样的实验过程是否具有共性的结论。此外在调控机制中,高水平 UA 是否作用于 BALP 基因启动子中的转录因子结合位点而发挥作用,有待进一步研究。

4 结 论

本研究成功构建 BALP 基因启动子重组质粒,证实高水平 UA 干扰 Saos-2 细胞系中 BALP 的产生。其干扰机制在于高水平 UA 抑制 BALP 基因启动子的活性。BALP 检测在用于骨转移的早期诊断、预后判断等临床应用时,应注意高水平 UA 造成的假阴性结果。

参考文献

- [1] WU Z, WEI D, GAO W, et al. TPO-induced metabolic reprogramming drives liver metastasis of colorectal cancer CD110⁺ tumor-initiating cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(1):47-59.
- [2] FERRER-MILEO L, LUQUE B, GONZÁLEZ-BARBOT EO J. Efficacy of cryoablation to control cancer pain: a systematic review[J]. *Pain Pract*, 2018, 11(8):18.
- [3] DAMIAN A, LAGO G, ROSSI S, et al. Early detection of bone metastasis in small cell neuroendocrine carcinoma of the cervix by 68Ga-DOTATATE PET/CT imaging[J]. *Clin Nucl Med*, 2017, 42(3):216-217.
- [4] WANG Z, LU Y, QIAO D, et al. Diagnostic and prognostic validity of serum bone turnover markers in bone metastatic non-small cell lung cancer patients[J]. *J Bone Oncol*, 2015, 4(3):85-91.
- [5] PANAGIOTIDIS E, LAM K, MISTRY A, et al. Skeletal

- metastases and benign mimics on NaF PET/CT: a pictorial review[J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2018, 28(2):W1-W11.
- [6] 孙燕, 管忠震, 廖美琳, 等. 肺癌骨转移诊疗专家共识(2014 版)[J]. *中国肺癌杂志*, 2014, 17(2):57-72.
- [7] WU Z Q, ZHANG Y, XIE E, et al. High uric acid (UA) negatively affects serum Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) immunoassay[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1):e0147554.
- [8] STANIK J, KRATZSCH J, LANDGRAF K, et al. The bone markers sclerostin, osteoprotegerin, and bone-specific alkaline phosphatase are related to insulin resistance in children and adolescents, independent of their association with growth and obesity[J]. *Horm Res Paediatr*, 2019, 91(1):1-8.
- [9] 庞艳, 阳义. 血清骨转换标志物在卵巢癌骨转移诊断中的应用[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2017, 24(18):1315-1318.
- [10] 刘美, 尤玮, 郑成丽, 等. 肺癌骨转移患者化疗前后血清骨源性碱性磷酸酶、I 型前胶原 N 端前肽、β 胶原特殊序列和肿瘤标志物水平变化及其临床意义[J]. *转化医学杂志*, 2018, 31(5):272-275.
- [11] D'ORONZO S, BROWN J, COLEMAN R. The role of biomarkers in the management of bone-homing malignancies[J]. *J Bone Oncol*, 2017, 9(11):1-9.
- [12] 王丹晨, 尹逸丛, 禹松林, 等. 北京协和医院 2012—2017 年体检人群高尿酸血症患病率变化及与血糖、血脂相关性的调查[J]. *临床检验杂志*, 2018, 36(6):462-466.
- [13] 刘剑, 俞正娟. 上海浦东地区高尿酸血症的流行现状及影响因素分析[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2017, 18(5):401-404.
- [14] 张亮. 高尿酸血症与相关疾病血清学指标关系的探讨[D]. 苏州:苏州大学, 2017.
- [15] 韩睿. 高尿酸血症与恶性肿瘤的关系与治疗概述[J]. *中国医药导报*, 2013, 10(27):31-32.
- [16] 安雅婷, 杨培树, 王雅琦, 等. 高尿酸血症发病机制及药物治疗[J]. *天津药学*, 2015, 27(5):72-75.
- [17] NDREPEPA G. Uric acid and cardiovascular disease[J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 9:484.
- [18] AHN S H, LEE S H, KIM B J, et al. Higher serum uric acid is associated with higher bone mass, lower bone turnover, and lower prevalence of vertebral fracture in healthy postmenopausal women [J]. *Osteoporos Int*, 2013, 24(12):2961-2970.
- [19] XU M, SU J, HAO J, et al. Positive association between serum uric acid and bone mineral density in Chinese type 2 diabetes mellitus stratified by gender and BMI[J]. *J Bone Miner Metab*, 2018, 36(5):609-619.
- [20] 丁红, 杨琦, 李慧敏. 不同浓度尿酸对体外培养肾小管上皮细胞氧化应激及凋亡的影响[J]. *海南医学*, 2017, 28(2):177-179.