

· 基础研究 ·

## CHD4 基因表达对急性 T 淋巴细胞白血病细胞增殖和凋亡的影响及其启动子鉴定

杨彩霞, 陆超\*

南京医科大学第一附属医院儿科, 江苏 南京 210029

**[摘要]** 目的:探讨人染色质解旋酶 DNA 结合蛋白 4(recombinant chromodomain helicase DNA binding protein 4, CHD4) 基因表达对急性 T 淋巴细胞白血病细胞增殖和凋亡的影响及其启动子鉴定。方法:使用 siRNA-CHD4 瞬时转染 T 淋巴细胞白血病细胞(Jurkat)敲低 CHD4 基因表达,实时荧光定量 qRT-PCR 和 Western blot 检测细胞转染后 CHD4 表达量,流式细胞术测定细胞凋亡率及细胞周期变化;CCK-8 分析测定 CHD4 基因对 Jurkat 细胞增殖的影响。根据生物信息学分析,以 Jurkat 细胞提取的全基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 CHD4 基因候选启动子区 2 091 bp 片段,以 pGL3-Basic 为载体,克隆含有 CHD4 基因候选启动子区的序列,制备重组质粒,并且构建一系列含 CHD4 基因候选启动子 5' 侧翼区截短序列质粒。将含 CHD4 启动子序列的质粒及截短序列质粒转染至 Jurkat 细胞和人胚胎肾 T 细胞(HEK293T),双荧光素酶报告基因检测各片段的启动子活性,确定 CHD4 基因启动子最小活性区域,并通过生物信息学方法分析该区域转录因子结合位点,构建结合位点突变的质粒,通过双荧光素酶报告基因检测,分析结合位点对 CHD4 转录的影响。结果:流式细胞检测结果发现,与对照组比较,CHD4 抑制 Jurkat 细胞凋亡,转染 siRNA-CHD4 的 Jurkat 细胞 G0/G1 期比例显著升高,而 S 期比例下降( $P < 0.01$ );CCK-8 检测 CHD4 基因对 Jurkat 细胞的增殖有促进作用( $P < 0.05$ );成功构建含有 CHD4 基因候选启动子序列的质粒及其截短序列质粒,与 pGL3-Basic 空载体相比,含有 CHD4 基因候选启动子序列的质粒活性明显增加( $P < 0.05$ )。CHD4 基因最小活性区域位于转录起始位点-233~-13 bp,其中包含 NF- $\kappa$ B、MZF1 等转录因子结合位点;NF- $\kappa$ B 对 CHD4 启动子活性具有正向调控作用。结论:CHD4 基因对 Jurkat 细胞凋亡有抑制作用,并且促进其增殖。CHD4 最小活性区域位于转录起始位点-233~-13 bp,转录因子 NF- $\kappa$ B 对 CHD4 基因启动子活性具有正向调控作用。

**[关键词]** 急性 T 淋巴细胞白血病;凋亡;染色质解旋酶 DNA 结合蛋白 4(CHD4);启动子;转录因子

**[中图分类号]** R733.71

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2021)03-331-08

**doi:**10.7655/NYDXBNS20210304

## Effect of CHD4 gene expression on proliferation and apoptosis of acute T lymphocytic leukemia cells and its promoter identification

YANG Caixia, LU Chao\*

Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

**[Abstract]** **Objective:** This study aims to explore influences of recombinant chromodomain helicase DNA binding protein 4(CHD4) gene expression on proliferation and apoptosis of acute T lymphoblastic leukemia cells and to identify its promoter. **Methods:** siRNA-CHD4 was used to transiently transfect Jurkat cells to knock down the expression of CHD4. The qRT-PCR and Western blot were used to detect the expression of CHD4. The apoptosis rate and cell cycle were measured by flow cytometry. The effect of CHD4 gene on the proliferation of Jurkat cells was analyzed by CCK-8. According to bioinformatics analysis, a 2 091 bp fragment of CHD4 gene candidate promoter region was amplified by PCR using the whole genome DNA extracted from Jurkat cells as template. The sequence containing candidate promoter region of CHD4 gene was cloned with pGL3 basic as vector, and a series of plasmids containing truncated 5' flanking region of CHD4 gene candidate promoter were constructed. The plasmids containing CHD4 promoter and truncated sequence were transfected into Jurkat and HEK293T cells. The promoter activity of each fragment was detected by double luciferase reporter

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81770162)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: luchadoctor@163.com

gene, and the minimal active region of CHD4 gene promoter was determined. The effect of binding site on the transcription of CHD4 was analyzed by double luciferase reporter gene detection. **Results:** Flow cytometry showed that, compared with the control group, CHD4 inhibited the apoptosis of Jurkat cells, the Jurkat cells transfected siRNA-CHD4 were significantly increased in the G0/G1 phase and decreased in the S phase ( $P < 0.01$ ). CCK-8 assay identified that CHD4 gene promoted the proliferation of Jurkat cells ( $P < 0.05$ ). Plasmids containing CHD4 gene candidate promoter and truncated sequence plasmids were successfully constructed. Compared with empty vector, plasmids containing CHD4 gene candidate promoter sequences were significantly more active ( $P < 0.05$ ). The core promoter of CHD4 gene located in 233 bp to 13 bp relative to transcription start site, which contained transcription factor binding sites NF- $\kappa$ B and MZF1. NF- $\kappa$ B had a positive function to the CHD4 promoter activity. **Conclusion:** Our results suggested that CHD4 inhibited apoptosis and induced proliferation in Jurkat cells. The core promoter of CHD4 located in -233/-13 bp relative to TSS. NF- $\kappa$ B bound to the core promoter of CHD4 *in vivo* and it had positive function to the promoter activity of CHD4.

[Key words] T-cell acute lymphoblastic leukemia; apoptosis; chromatin helicase DNA binding protein 4 (CHD4); promote; transcription factor

[J Nanjing Med Univ, 2021, 41(03):331-338]

急性T细胞淋巴瘤(T-cell acute lymphoblastic leukemia, T-ALL),是恶性程度较高的血液病<sup>[1]</sup>,由于逐渐累积的基因突变破坏了正常的胸腺细胞发育过程,包括细胞生长、增殖、存活和分化的正常控制,导致T细胞祖细胞发生转化<sup>[2]</sup>。染色质解旋酶DNA结合蛋白4(recombinant chromodomain helicase DNA binding protein 4, CHD4),属于核小体重构和组蛋白乙酰酶复合体的重要成员之一<sup>[3]</sup>,涉及许多致癌过程,与表观遗传密切相关,包括控制细胞周期进展,加速实体肿瘤转移,发动和维持多种肿瘤抑制基因沉默等<sup>[4-6]</sup>。CHD4在T细胞发育过程中积极参与转录激活和抑制<sup>[7]</sup>,CHD4可能对于T-ALL的发生发展很重要,但是具体的影响以及作用机制目前还不清楚。因此,本研究通过流式细胞技术检测和CCK-8检测探讨干扰CHD4基因表达对T-ALL细胞增殖和凋亡的影响,通过构建人CHD4基因启动子重组质粒,进一步探讨CHD4基因的转录调控,为了解T-ALL的发病机制提供新视角。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

T-ALL细胞(Jurkat)和人胚胎肾T细胞(HEK 293T)均购于中国科学院上海细胞库。pGL3-Basic、内参报告基因质粒pRL-TK由本实验室保存。基因组DNA提取试剂盒、感受态大肠埃希菌(北京天根公司)。DMEM培养基、RPMI-1640培养基、青霉素和链霉素(Multicell公司,美国),进口胎牛血清(Scien Cell公司,美国);细胞凋亡检测试剂盒(杭州联科生物公司),细胞周期检测试剂盒、CCK-8检测试剂盒(南京福麦斯公司);流式细胞仪(BD Biosciences

公司,美国);限制性内切酶 *Kpn* I、*Bgl* II、T4 DNA连接酶(Thermo Fisher公司,德国);rTaq DNA聚合酶、DNA聚合酶TaKaRa LA Taq and GC buffer、双荧光素酶报告检测试剂盒、实时定量PCR试剂盒(TaKaRa公司,日本);5000 DNA标准参照物、2000 DNA标准参照物、核心启动子区NF- $\kappa$ B转录因子结合位点突变质粒pGL-mNF- $\kappa$ B(北京擎科公司),NF- $\kappa$ B表达质粒pcDNA3-NF- $\kappa$ B(吉凯基因);质粒提取试剂盒、切胶回收试剂盒(Omega公司,美国),TRIzol、Lipofectamine™ 3000(Invitrogen公司,美国);双荧光素酶报告分析系统(Promega公司,美国);CHD4、GAPDH和NF- $\kappa$ B兔单克隆抗体(Abcam公司,美国);ECL化学发光试剂盒(Biosharp公司,美国),PVDF(聚偏氟乙烯)膜(GE Healthcare公司,美国);EZ-Magna CHIP™ A试剂盒(Millipore公司,美国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细胞培养

Jurkat细胞用RPMI 1640培养基,HEK293T细胞用DMEM培养基培养,两种培养基均含有10%的胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)以及1%青霉素(100 U/mL)-链霉素(100 mg/mL)溶液。两种细胞均置于具有一定湿度、37℃、5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中。所有实验均在细胞生长对数期进行。

### 1.2.2 流式细胞技术

流式细胞术检测Jurkat细胞凋亡百分率。经qRT-PCR分析确定siRNA-CHD4转染Jurkat细胞24 h后敲低效率最高,所以转染24 h后收集细胞,PBS洗涤3次,加入V-APC和7-AAD各5  $\mu$ L,室温避光15 min,使用流式细胞仪检测。细胞周期检测:采用细胞周期检测试剂盒,细胞转染siRNA-CHD4 24 h

后收集,95%乙醇4℃固定过夜,PBS洗涤3次,PI染色,37℃水浴30 min,流式细胞仪检测。

### 1.2.3 CCK-8增殖分析

将Jurkat细胞以 $4 \times 10^3$ 个/孔铺于96孔板,每组5个复孔,加10  $\mu$ L CCK-8试剂,在5% CO<sub>2</sub>、37℃条件下孵育2 h后用酶标仪测量每个孔在450 nm波长下的吸光度值,相同条件下连续测量4 d。

### 1.2.4 CHD4基因候选启动子区生物信息学分析及克隆

CHD4基因候选启动子区生物信息学分析:从NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genef/>) GenBank中获取人CHD4基因序列(编号:NC\_000012.12)。利用UCSC网站(<http://genome.ucsc.edu/>)进行对比,取转录起始位点上游2 000 bp,下游100 bp通过Neural Network Promoter Prediction([http://fruitfly.org/cgi-bin/seq\\_tools/promoter.pl](http://fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/promoter.pl))进行预测;再使用JASPAR([jaspar.genereg.net/](http://jaspar.genereg.net/))数据库5.0版对CHD4基因核心启动子的转录因子结合位点进行预测。

引物设计:以预测的CHD4基因候选启动子序列为模板,用Prime5.0设计引物,再对该区域5'侧翼区截短序列设计引物。上下游引物5'端分别加入限制性内切酶*Kpn*I和*Bgl*II的酶切位点及保护碱基。共用下游引物:5'-GGAGATCTGAGGGC-GTCTCTTTG-3'。上游引物分别是P1(pGL-1974/+117):5'-CGGGTACCAGTATCATCTTCCAGCCTC-TAGA-3';P2(pGL-918/+117):5'-CGGGTACCTGT-GGGCGACAGTAGGG-3';P3(pGL-428/+117):5'-CGGGTACCAGGGTTAGTTGCAAAGGTCTG-3';P4(pGL-233/+117):5'-CGGGTACCTGCCAGGT-GACGCGCGCGC-3';P5(pGL-13/+117):5'-CGGGTACCAGGGAGCCATTTTCCCC-3'(下划线部分为限制性酶切位点,斜体部分为保护碱基)。引物合成由上海英骏公司完成。

Jurkat细胞全基因组DNA提取:Jurkat细胞全基因组DNA提取按照基因组DNA提取试剂盒的说明书操作。

质粒构建:以Jurkat细胞全基因组DNA为模板,根据TaKaRa LA TaqandGC buffer催化酶说明书条件进行催化扩增,条件如下:94℃ 1 min;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 2 min,30个循环。用1%的琼脂糖凝胶对扩增产物进行电泳检测。切胶回收试剂盒回收琼脂糖电泳产物。回收产物与pGL3-Basic载体均用限制性内切酶*Kpn*I、*Bgl*II在37℃水浴条件

下进行双酶切1 h,酶切产物用切胶回收纯化试剂盒纯化,纯化产物用T4 DNA连接酶在37℃水浴中连接30 min。将连接产物转化至大肠杆菌DH5 $\alpha$ 中,转化条件为4℃ 3 min,42℃水浴1 min 20 s,4℃ 30 min。取转化好的菌液加入1 mL不含氨苄青霉素的LB培养液,置于37℃摇床倒置扩增1 h,将扩增好的菌液涂于含有氨苄青霉素的固体LB培养板,于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中倒置培养过夜。在长出菌落的LB板上挑取单克隆菌落,加入含有氨苄青霉素的LB培养液中,37℃摇床倒置扩增3 h,以扩增后的菌液为模板进行PCR扩增,PCR反应条件同前。用1%琼脂糖凝胶对PCR产物电泳30 min,选取阳性菌液进行测序,将经测序鉴定正确的菌液加入含氨苄青霉素的LB培养液中于37℃摇床扩增过夜,扩增后的菌液用质粒提取试剂盒提取含有目的片段的质粒标记为P1(pGL-1974/+117)。以构建成功的质粒序列为模板,共用同一下游引物,上游引物分别为P2~P5进行PCR,构建CHD4基因候选启动子区5'侧翼区截短序列质粒,方法同上。

### 1.2.5 基因敲低分析

双链siRNA的设计与合成由广州锐博生物科技有限公司完成,siRNA序列和阴性对照序列如下:siRNA-CHD4:5'-GCATGTCCTTACTAGAATT-3'(正义链),5'-TAATTCTAGTAAGGACATGC-3'(反义链);siRNA-NF- $\kappa$ B:5'-GCACCTAGCTGCCAAAGAA-3'(正义链),5'-TTCTTTGGCAGCTAGGTGC-3'(反义链);阴性对照:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'(正义链),5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'(反义链)。

### 1.2.6 瞬时转染

Jurkat细胞以 $2 \times 10^5$ 个/孔铺12孔板,12 h后以500 ng/mL siRNA或表达质粒转染细胞,转染24 h后收取RNA,48 h后收取蛋白质。启动子双荧光素酶检测,转染前18 h将生长状态良好的细胞置于96孔板( $1 \times 10^4$ 个/孔),使用Lipofectamine™ 3000将100 ng CHD4启动子荧光素酶报告质粒和4 ng pRL-TK质粒共同转染细胞。18 h后采用双荧光素酶报告基因检测系统检测启动子活性。

### 1.2.7 免疫印迹法(Western blot)

用8%~12%的SDS-PAGE电泳分离总蛋白,在转移缓冲液中将样品电转移到PVDF(聚偏氟乙烯)膜上。用5%脱脂牛奶在室温下封闭PVDF膜2 h,CHD4、GAPDH、NF- $\kappa$ B抗体在摇床上孵育目的条带4℃过夜。TBST缓冲液充分洗涤条带3次,将这些条

带与相应的二抗在室温下孵育2 h, TBST缓冲液充分洗涤条带3次后用电化学发光检测系统观察条带。

### 1.2.8 实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)

用 TRIzol 法提取总 RNA, 用 Prime Script RT Master Mix Perfect Real Time Kit 系列逆转录试剂将 RNA 逆转录为 cDNA, 以该 cDNA 为扩增模板, 用实时定量 PCR 试剂盒进行 qRT-PCR 扩增。引物序列: GAPDH 5'-GATCATCAGCAATGCCTCCT-3'(正义链), 5'-TGAGTCCTTCCACGATACCA-3'(反义链); CHD4 5'-CAAAATGGCGGGAGTTCAGTA-3'(正义链), 5'-CTCTCCACCACAGCTACCG-3'(反义链); NF- $\kappa$ B 5'-AACAGAGAGGATTTTCGTTTCCG-3'(正义链), 5'-TTTGACCTGAGGGTAAGACTTCT-3'(反义链)。qRT-PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min; 90 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环 40 次; 72 °C 延伸 5 min。反应仪器为 Step One Plus Quantitative Realtime PCR System。记录各反应孔对应  $C_t$  值以计算 mRNA 相对表达量。内参基因为 GAPDH, 目的基因为人 CHD4, CHD4 mRNA 的相对表达量 ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) = CHD4 mRNA 拷贝数/GAPDH mRNA 拷贝数;  $\Delta\Delta C_t = (C_t_{\text{刺激组 CHD4}} - C_t_{\text{刺激组 GAPDH}}) - (C_t_{\text{对照组 CHD4}} - C_t_{\text{对照组 GAPDH}})$ 。设对照组 mRNA 相对表达量为 1。

### 1.2.9 双荧光素酶活性测定

收集 96 孔培养板中的细胞, 弃去原培养基, 用 1×PBS 洗涤 3 次, 弃去 PBS 加入 1×裂解缓冲液, 室温振荡 30 min 充分裂解细胞。按照双荧光素酶活性检测试剂盒说明书, 每孔取 20  $\mu$ L 裂解液, 分别加入 20  $\mu$ L 底物缓冲液和 20  $\mu$ L 终止缓冲液, 混合后分别测定萤火虫荧光值和海肾荧光值。

### 1.2.10 CHIP 实验检测

使用 EZ-Magna CHIP tm A 试剂盒, 根据其说明书进行分析。将  $1 \times 10^7$  个 Jurkat 细胞在 1% 甲醛中室温固定 10 min, 超声检测细胞裂解产物, 产生 200~1 000 bp 的 DNA 片段。然后用 anti-IgG 抗体、anti-NF- $\kappa$ B 抗体 (Abcam ab194729) 和 anti-acetyl 组蛋白 H3 抗体进行免疫沉淀反应。经反向交联和 DNA 纯化后, 使用 SYBR Green 进行 qRT-PCR 分析。引物如下: 上游引物 5'-GGGTTGGAGTTGTTGAGGT-3', 下游引物 5'-GGGTTGGAGTTGTTGAGGT-3'。qRT-PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min; 90 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环 40 次; 72 °C 延伸 5 min。反应仪器为 Step One Plus Quantitative Realtime PCR System。记录各反应孔对应  $C_t$  值以计算 mRNA 相对表达量。用 rTaq DNA 聚合酶进行 PCR

反应。反应条件: 94 °C 变性 3 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s, 热循环 35 次; 最后 72 °C 延伸 5 min。取 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。

### 1.3 统计学方法

对实验数据应用 Graphpad Prism7.0 和 SPSS 软件进行统计学分析, 实验结果以均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK 法。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CHD4 基因促进 Jurkat 细胞增殖、抑制其凋亡

通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测 siRNA-CHD4 的敲低效率。CCK-8 实验发现 CHD4 对 Jurkat 细胞的增殖有促进作用。流式细胞术检测, 与对照组相比, 转染 siRNA-CHD4 的 Jurkat 细胞凋亡率 (55%~60%) 明显上升。说明 CHD4 对 Jurkat 细胞的凋亡具有抑制作用。与对照组比较, 转染 siRNA-CHD4 的 Jurkat 细胞 G0/G1 期比例显著升高, 而 S 期比例下降 7%~10% (图 1)。

### 2.2 生物信息学分析人 CHD4 基因候选启动子区域

首先在 NCBI 网站及 UCSC 网站比对确认 CHD 基因的启动子区域。运用 Promoter 2.0 Prediction Serve (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>) 预测转录起始位点上游约 2 000 bp、下游 100 bp 区域, 结果表明该区域具有启动子活性, 再通过 Neural Network Promoter Prediction ([http://fruitfly.org/cgibin/seq\\_tools/promoter.pl](http://fruitfly.org/cgibin/seq_tools/promoter.pl)) 对该区域进行预测 (图 2)。

### 2.3 人 CHD4 基因候选启动子区扩增

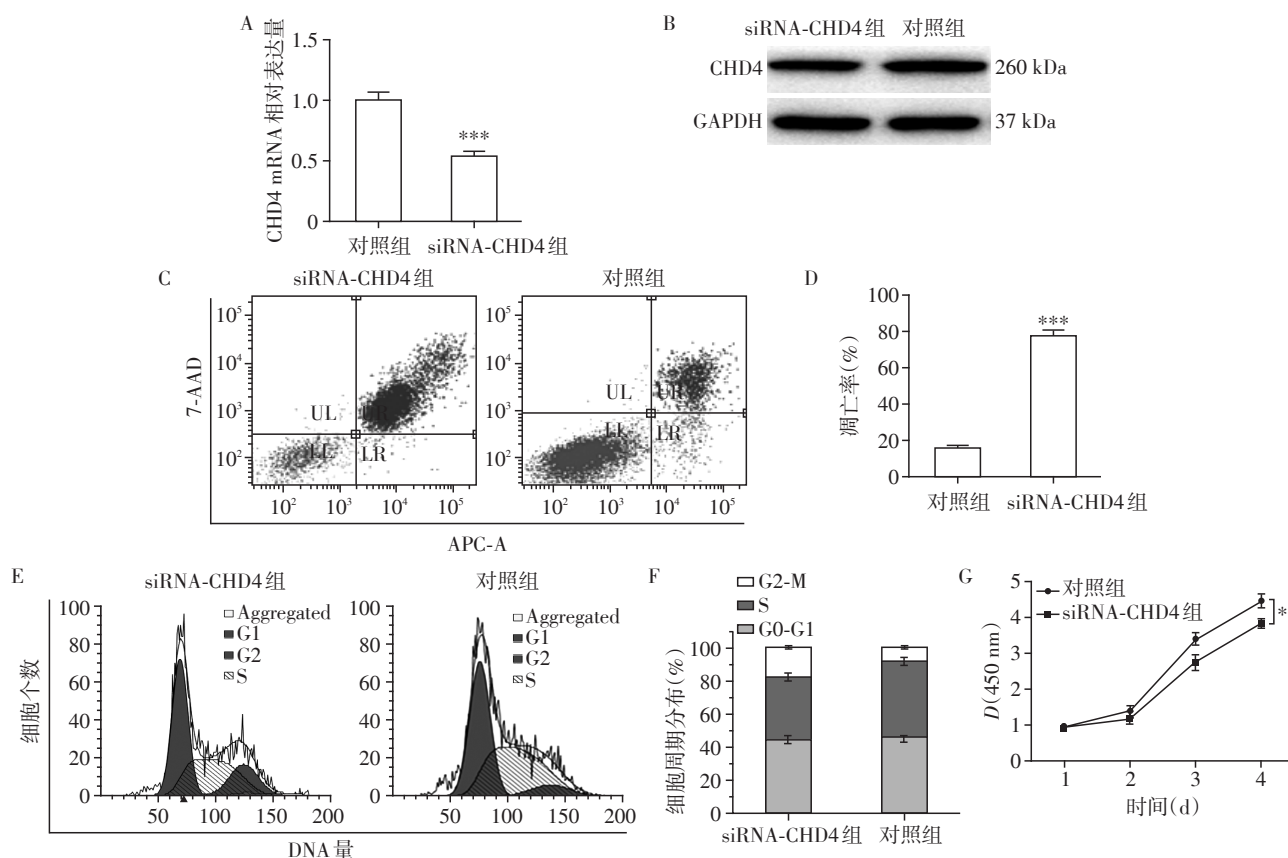
CHD4 基因预测启动子经 PCR 扩增, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳显示有特异性条带出现, 长度为 2 091 bp, 与预测片段大小相符 (图 3)。

### 2.4 人 CHD4 基因候选启动子区 5' 侧翼区截短序列质粒构建

各截短序列质粒经 *Kpn* I、*Bgl* II 酶切, 可见 pGL3-Basic 载体片段 (4 818 bp) 和长度分别为 2 091、1 035、546、350、130 bp 的序列片段 (图 4)。

### 2.5 人 CHD4 基因候选启动子区活性检测

在 HEK293T 细胞和 Jurkat 细胞中进行荧光素酶检测, 发现与阴性对照质粒 pGL-3Basic 相比, 重组质粒 P1 (pGL-1947/+117) 的荧光素酶相对活性明显增高, P1~P4 的活性无明显差异 ( $P > 0.05$ ), P5 (pGL-13/+117) 与其他截短节段质粒相比, 启动子活性明显降低 ( $P < 0.05$ ), 与阴性对照 pGL-3Basic 相近。因此认为, CHD4 基因启动子最小活性区域位于其 5' 侧



A、B:用qRT-PCR(A)和Western blot(B)检测CHD4基因在转染siRNA-CHD4的Jurkat细胞中的表达;C、D:抑制CHD4基因表达对Jurkat细胞凋亡的影响(C:流式检测结果;D:定量分析结果);E、F:抑制CHD4基因表达对Jurkat细胞周期的影响(E:流式检测结果;F:定量分析结果);G:通过CCK-8检测转染siRNA-CHD4的Jurkat细胞增殖受到抑制。与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ( $n=3$ )。

图1 人CHD4基因促进Jurkat细胞的增殖及抑制其凋亡

Figure 1 CHD4 induces proliferation and inhibits apoptosis in Jurkat cells

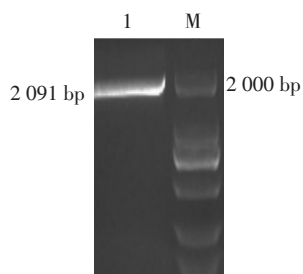
Promoter predictions for 1 eukaryotic sequence with score cutoff 0.88(transcription start shown in larger font):

Promoter predictions

Start	End	Score	Promoter Sequence
1 348	1 398	0.94	TATTATGGGATATCAAACCTGGGGTGGATGAAGGATGGTTATTATGGGAT
1 621	1 671	0.89	GGCATATGTGTATGAAATGTGGGGGGCCAGGGTGTGTGTGTGTGTGTGT
1 955	2 005	0.97	TGTTTCAGGCCCTTTAAGAGGCGACGCTGGAGCCCGAGCCATTTTCCCC

图2 生物信息学分析人CHD4基因候选启动子区域

Figure 2 Analysis of candidate promoter region of human CHD4 gene



1:人CHD4基因候选启动子区扩增产物;M:2000 DNA标准参照物。

图3 人CHD4基因候选启动子区扩增

Figure 3 Amplification of the candidate promoter region of human CHD4 gene

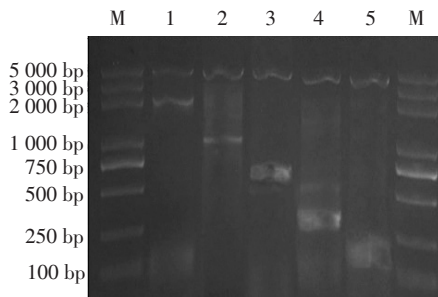
翼区的-233 bp至-13 bp(图5)。

2.6 人CHD4基因启动子核心区域转录因子结合位点预测

使用 JASPAR (jaspar.genereg.net/) 数据库 5.0 版,发现在-233~-13 bp之间存在NF- $\kappa$ B、MZF1等转录因子结合位点(图6)。

2.7 转录因子NF- $\kappa$ B结合到CHD4基因启动子区

为进一步确定转录因子NF- $\kappa$ B与CHD4启动子区是否可以结合,进行了染色质免疫沉淀实验(CHIP),根据启动子区的NF- $\kappa$ B结合位点,设计了相应的引物。PCR证实NF- $\kappa$ B结合的基因组DNA



M: 5000 DNA 标准参照物; 1: P1 (pGL-1974/+117); 2: P2 (pGL-918/+117); 3: P3 (pGL-428/+117); 4: P4 (pGL-233/+117); 5: P5 (pGL-13/+117)。

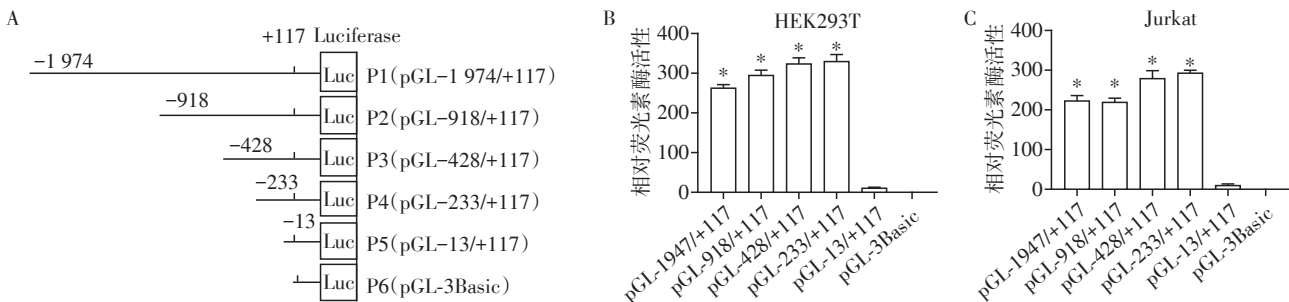
图4 人CHD4基因候选启动子区5'侧翼区截短序列质粒双酶切鉴定

Figure 4 Identification of the 5' flanking region of the candidate promoter region of human CHD4 gene in luciferase report gene recombinant plasmid by double enzyme digestion

包含 CHD4 启动子区的 NF-κB 结合位点区域。因此,在 Jurkat 细胞中,转录因子 NF-κB 能与人 CHD4 基因启动子结合(图7)。

2.8 NF-κB 对人 CHD4 基因的启动子活性具有正向调控作用

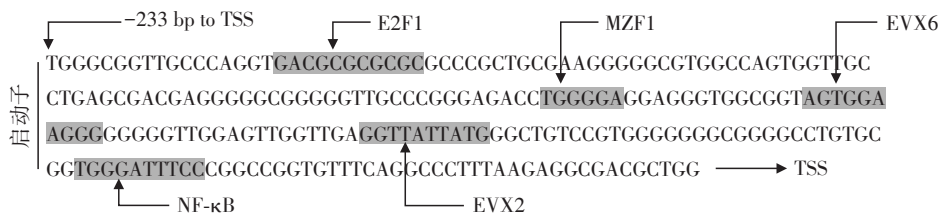
首先用 siRNA-NF-κB 和 pcDNA3-NF-κB 分别转染 Jurkat 细胞,分析其转染效率。用结合位点突变质粒、siRNA-NF-κB 和 pcDNA3-NF-κB 分别瞬时转染 Jurkat 细胞。检测其荧光素酶活性,发现抑制 NF-κB 后,CHD4 基因的启动子活性下降;反之,当过表达 NF-κB 时,CHD4 基因的启动子活性明显增加。同时,与野生型相比,转染含有转录因子结合位点突变序列的质粒后,CHD4 基因启动子活性明显下降,这些结果说明人类 CHD4 基因启动子活性受 NF-κB 的正向调控(图8)。



A: 启动子5'侧翼区不同长度截短序列质粒,数字代表相对转录起始点的位置;B、C: HEK293T(B)和Jurkat 细胞(C)中CHD4 启动子不同长度截短序列质粒的荧光素酶相对活性。与对照组比较,\*P<0.001(n=4)。

图5 人CHD4基因候选启动子区活性检测

Figure 5 Relative luciferase activities of candidate plasmids of CHD4 promote



阴影表示不同转录因子结合位点,TSS表示转录起始位置。

图6 人CHD4基因启动子核心区域转录因子结合位点

Figure 6 Putative consensus binding sites of transcription factors in CHD4 promote

3 讨论

T-ALL 的发生和发展是一个多基因突变的多阶段过程,其中最显著的变化之一是对细胞凋亡的抑制。虽然已经在诱导白血病细胞分化和促进其凋亡方面做了很多努力,但是治愈率并没有显著提高<sup>[8]</sup>。CHD4 是 NuRD 的核心亚基,参与许多疾病的发展和

进展,包括肿瘤发生、病毒感染、神经退行性变等,但其在这些疾病中的作用尚未完全了解<sup>[5,9]</sup>。在某些情况下,它通过对抗染色质重构来对抗转录活性因子<sup>[6,10]</sup>。在某些条件下 CHD4 可以促进转录,与促癌功能相关<sup>[11]</sup>。鉴于这些调节转录活性的特点,我们猜测 CHD4 可能与 T-ALL 细胞凋亡有关。

CCK-8 检测、流式细胞计数检测发现 CHD4 可

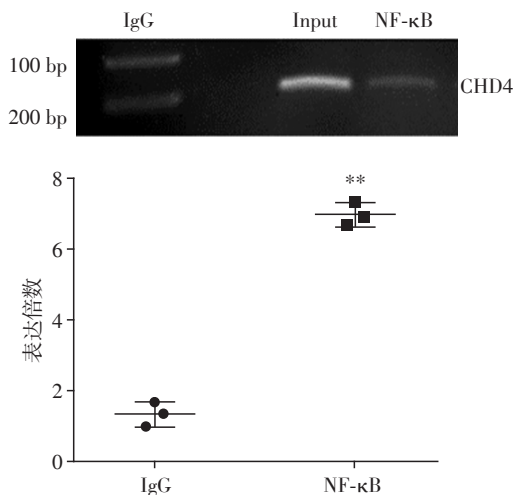


图7 NF-κB与CHD4基因启动子区最小活性区域结合  
Figure 7 NF-κB binds to the minimal promoter of CHD4 *in vivo*

以促进Jurkat细胞的增殖,抑制其凋亡,与之前的一些研究结果一致,异常表达的CHD4在T-ALL中起着原癌基因的作用<sup>[12]</sup>。基因的转录调控是由启动子决定的。启动子通过与一些蛋白质结合来决定基因的活性,这些蛋白质被称为影响基因表达的转录因子。基因启动子部分的改变导致基因表达调控紊乱,常导致恶性肿瘤的发生<sup>[13-14]</sup>。因此,本研究分析了CHD4基因启动子区域,以更好地理解CHD4在T-ALL中的内在机制。本研究克隆了其启动子,分析了Jurkat和HEK293T细胞的启动子区域结构和启动子活性。通过产生一系列5'缺失质粒,确定了核心启动子相对于TSS位于-233/-13 bp区域。为进一步分析CHD4基因启动子最小活性区域内重要的调控元件,本研究通过转录因子结合位点预测,发现NF-κB、MZF1等转录因子结合位点。NF-

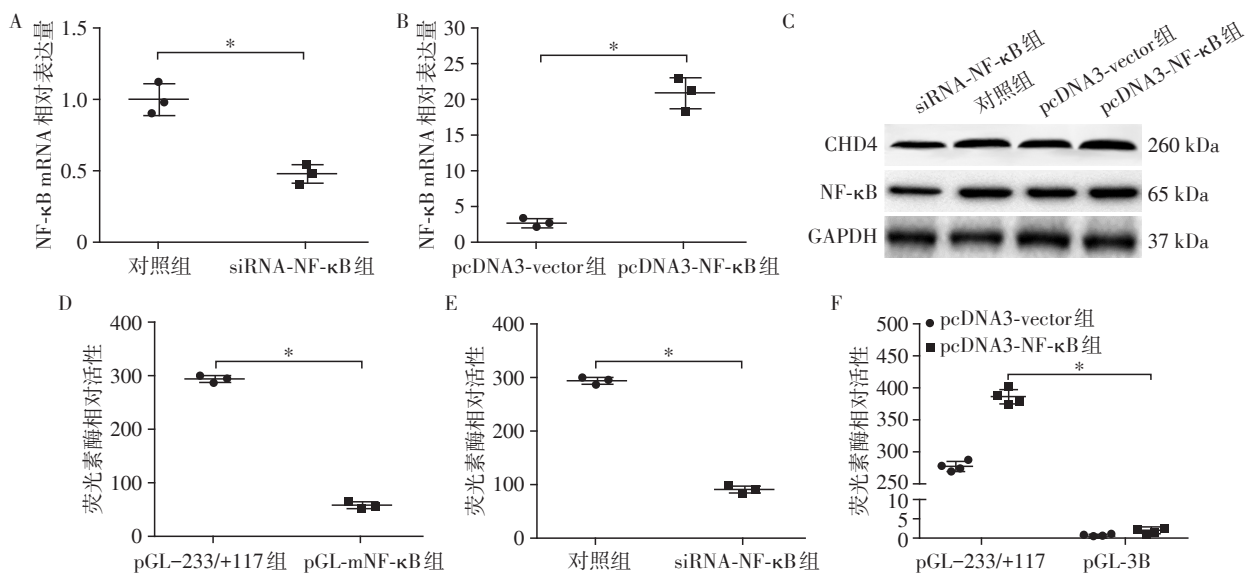


图8 NF-κB对人CHD4基因的启动子活性具有正向调控作用  
Figure 8 NF-κB positively regulates the promoter activity of CHD4

κB在多种信号通路中与肿瘤发生和发展有关,其中细胞增殖和凋亡的信号通路被认为是最重要的通路之一<sup>[15]</sup>。已有研究表明,NF-κB与成人T-ALL细胞的激活有关<sup>[16]</sup>。因此,本研究进一步通过点突变技术分析CHD4启动子区的转录因子结合位点,证实NF-κB对CHD4基因的启动子活性具有正向调控作用;通过荧光素酶测试发现NF-κB表达降低时,人CHD4启动子活性降低,而NF-κB表达增高时,

CHD4启动子活性明显增高。染色质共沉淀试验发现转录因子NF-κB与CHD4基因启动子相结合,进一步分析了CHD4基因转录调控的分子机制,为进一步研究T-ALL提供了新方向。

【参考文献】

[1] KARRMAN K, JOHANSSON B. Pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2017, 56(2): 89-116

- [2] VAN V P, PIETERS R, BEVERLOO H B, et al. Molecular-genetic insights in paediatric T-cell acute lymphoblastic leukaemia[J]. *Br J Haematol*, 2008, 143(2):153-168
- [3] DENSLow S, WADE P A. The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation[J]. *Oncogene*, 2007, 26(37):5433-5438
- [4] SHEN H, LAIRD P W. Interplay between the cancer genome and epigenome[J]. *Cell*, 2013, 153(1):38-55
- [5] XIA L, HUANG W, BELLANI M, et al. CHD4 has oncogenic functions in initiating and maintaining epigenetic suppression of multiple tumor suppressor genes[J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(5):653-668.e7
- [6] O'SHAUGHNESSY A, HENDRICH B. CHD4 in the DNA-damage response and cell cycle progression: not so NuRDy now[J]. *Biochem Soc Trans*, 2013, 41(3):777-782
- [7] TODD M A, PICKETTS D J. PHF6 interacts with the nucleosome remodeling and deacetylation (NuRD) complex[J]. *J Proteome Res*, 2012, 11(8):4326-4337
- [8] DURINCK K, GOOSSENS S, PEIRS S, et al. Novel biological insights in T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Exp Hematol*, 2015, 43(8):625-639
- [9] YAMADA M, SATO N, IKEDA S, et al. Association of the chromodomain helicase DNA-binding protein 4 (CHD4) missense variation p.D140E with cancer: potential interaction with smoking[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2015, 54(2):122-128
- [10] RAMÍREZ J, DEGE C, KUTATELADZE T G, et al. MBD2 and multiple domains of CHD4 are required for transcriptional repression by Mi-2/NuRD complexes[J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(24):5078-5088
- [11] ERKINA T Y, ZOU Y, FREELING S, et al. Functional interplay between chromatin remodeling complexes RSC, SWI/SNF and ISWI in regulation of yeast heat shock genes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(5):1441-1449
- [12] TONG J K, HASSIG C A, SCHNITZLER G R, et al. Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex[J]. *Nature*, 1998, 395(675):917-921
- [13] MA Z D, STARK A. Regulatory enhancer-core-promoter communication via transcription factors and cofactors[J]. *Trends in Genetics*, 2016, 32(12):801-814
- [14] VAN SCHOONHOVEN A, HUYLEBROECK D, HENDRIKS R W, et al. 3D genome organization during lymphocyte development and activation[J]. *Brief Funct Genomics*, 2020, 19(2):71-82
- [15] 程顺舟, 陈欣, 王平, 等. miR-199a对肝癌HepG2细胞增殖的影响及机制[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(8):961-965
- [16] HARHAJ E W, GIAM C Z. NF- $\kappa$ B signaling mechanisms in HTLV-1-induced adult T-cell leukemia/lymphoma[J]. *FEBS J*, 2018, 285(18):3324-3336

[收稿日期] 2020-04-20