

hTERT 反义基因转染对人结肠癌细胞生长的抑制作用

傅桂莲, 董俊红, 杜培革*

(北华大学医学院检验系, 吉林 132001)

摘要: 利用基因重组技术, hTERT 基因反向插入真核表达载体 pcDNA3.0, 获得重组体 pcDRTRT, 通过脂质体法导入人结肠癌细胞株 SW-111C, 获得稳定转染细胞系, 即反义细胞, 该细胞易脱落, 出现明显生长抑制现象; 失去叠落生长能力; 流式细胞仪 (FCM) 证实导入反义 hTERT 后, $G_{0/1}$ 期细胞增加, G_2M 和 S 期细胞减少, 增殖指数 (PI) 降低; 且不能在软琼脂中形成集落; 并发现反义细胞中 hTERT 表达水平明显下降。说明反义 hTERT 基因体外导入结肠癌细胞株 SW-111C 可以明显降低端粒酶活性, 抑制结肠癌细胞的生长、增殖且能使其恶性表型发生逆转。

关键词: 人端粒酶催化亚单位; 人结肠癌细胞; 反义基因治疗

中图分类号: R394.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)01-85-04

端粒酶是细胞内维持 DNA 端粒长度的逆转录酶, 其激活对细胞癌变起重要作用。端粒酶由端粒酶 RNA 成分、端粒酶催化亚单位 (TRT) 和端粒酶相关蛋白三部分组成, 其中 hTERT 是端粒酶激活的限制因素, hTERT 的表达水平与细胞端粒酶的活性是一致的^[1,2]。为探讨 hTERT 反义基因转染对结肠癌细胞生长的抑制作用, 构建了 hTERT 反义真核表达载体, 并通过脂质体法导入人结肠癌细胞株 SW-111C 中, 以观察人结肠癌细胞的生物学行为变化, 为 hTERT 反义基因治疗结肠癌提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

含 620 bp 端粒酶 hTERT 基因的 pBSTRT 质粒由北京大学病理教研室张波教授惠赠; pcDNA 3.0 真核表达载体购自 Promega 公司; *Sal*I、*Bam*HI、*Xho*II 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶为 TakaRa 产品; 脂质体、MTT、G418 为 Sigma 公司产品; PCR 试剂盒为北京鼎国公司产品; 免疫组化试剂盒为北京中山生物公司产品。

1.2 方法

1.2.1 hTERT 反义真核表达载体的构建 含 620 bp 端粒酶 hTERT 基因的 pBSTRT 质粒用 *Sal*I、*Bam*HI 双酶切后, 回收 620 bp 的 hTERT 片段。在 T4 DNA 连接酶作用下, 反向插入真核表达载体 pcDNA 3.0 的 *Bam*HI、*Xho*II 双酶切位点, 构建含反义 hTERT 基因的真核表达重组体 pcDRTRT。

1.2.2 重组基因的鉴定 采用 PCR 技术扩增外源性 hTERT 基因, 按惠赠 pBSTRT 质粒基因图谱设计引物。

1.2.3 细胞培养 SW-111C 细胞培养于含 10% 灭活胎牛血清 RPMI1640 培养液中, 于 37 °C, 5%CO₂ 饱和温度下培养。

1.2.4 脂质体介导重组体质粒的转染 转染前 24h, 消化对数生长期细胞以 1.6×10^5 /孔的密度接种于六孔培养皿中, 加入含 10%FBS 的 DMEM 2 ml, 18~24 h 后细胞密度融合度在 40%~60%; 取重组体质粒 pcDRTRT 及载体质粒 pcDNA3.0 各 2 μ g 溶解到 100 μ l 无血清、无双抗体的 DMEM 培养基中, 放置于室温 45 min, 然后加入到 100 μ l 无血清、无双抗体的 DMEM (含有 10 μ l lipofectin) 各转染用; 对培养的结肠癌细胞按照脂质体转染要求进行处理; 加入上述混合液进行培养; 待细胞融合度达 60% 时更换 G418(400 μ g/ml) 培养基筛选, 每 3 d 换一次液, 2~3w 后抗药克隆形成。

1.2.5 细胞生长曲线测定 MTT 法按文献^[3]方法进行。

1.2.6 hTERT 表达水平的检测(免疫组化法) 按说明书进行。

1.2.7 FCM 检测细胞周期 取对数期生长的细胞用 0.25% 胰酶消化, 800r/min 离心 7 min, 用无胎牛血清的 RPMI1640 洗 2 遍, 70% 乙醇固定, 置于 4 °C 过夜, 送检。FCM 检测前, 加入 RNA 酶及碘

化丙啶(PI)复染液 30 min, 检测细胞周期。

1.2.8 软琼脂克隆实验 按文献^[3]的方法进行。

1.2.9 统计学处理 对所得资料进行 χ^2 检验及 t 检验以 $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 hTRT 反义基因真核表达重组体的构建及鉴定

hTRT 反向插入 pcDNA3.0 载体中的多克隆酶切位点 *Bam*HI、*Xho*II, Neo 为该基因在结肠癌细胞内的选择标记。hTRT 反向插入后因属定向克隆, PCR 扩增出 620 bp 杂交带, 阳性者即为 pcDRTRT。如图(1)及图(2)。

2.2 克隆的筛选

经 G418(400 μ g/ml)筛选 3 周后, 可见克隆形成。

2.3 生长曲线的测定(MTT 法)

反义细胞较对照细胞及载体细胞生长速度减慢, 且有显著性差异($P<0.05$), 载体细胞与对照细胞相比亦略有下降, 但无统计学意义, 这可能是由于载体对细胞的非特异性细胞毒作用。该结果提示降低其细胞毒副作用仍是应用反义治疗中需解决的问题。见图(3)。

2.4 软琼脂克隆形成实验

在双层软琼脂中接种 1000 个细胞, 3 周后可见对照细胞及载体细胞生长良好, 均能形成明显的细胞集落, 而且数目多, 平均克隆数为 51.3 ± 18.1 (对照组), 49.8 ± 16.7 (载体组), 二者之间无显著性差异($P>0.05$), 克隆形成率分别是 5.13% 和 4.98%。反义细胞初可见极少数几个克隆, 但直径小于 50 mm, 20 天后不能形成直径大于 50 mm 的集落, 说明 hTRT 反义基因转染后, 细胞不依赖于锚着生长能力丧失, 细胞的恶性程度降低。

2.5 FCM 检测各组细胞周期

反义细胞的 $G_{0/1}$ 期细胞增加, 而 S 和 G_2 期细胞减少, 增殖指数降低, 见表(1)。

经 χ^2 检验, 对照细胞与载体细胞的细胞周期时相没有显著性差异($P>0.05$); 反义细胞与对照细胞的细胞周期时相差异显著($P<0.05$)。

2.6 hTRT 反义基因转染对 SW-111C 细胞中 hTRT 表达水平的影响

采用免疫组化法检测各组细胞 hTRT 表达水平, 反义 hTRT 基因转染的细胞, hTRT 表达水平明显降低, 其中褐色为阳性信号。见图 4。

3 讨论

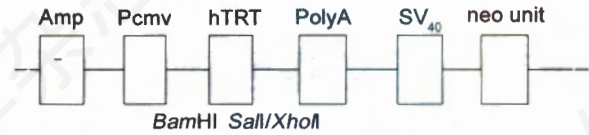


图1 pcDRTRT 结构示意图

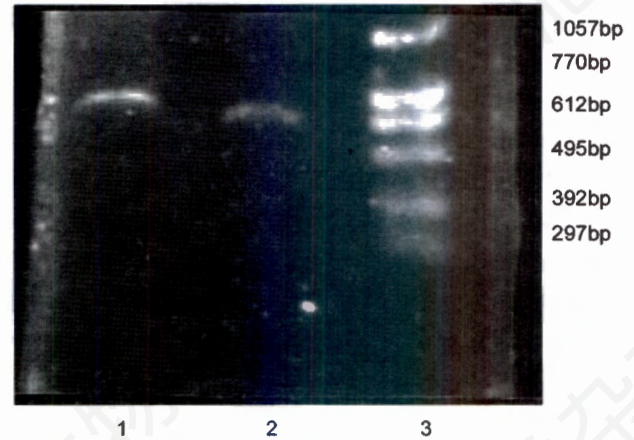


图2 hTRT 基因 PCR 扩增结果

1、2: PCR 扩增产物; 3: Marker ϕ X174Hinc II digest.

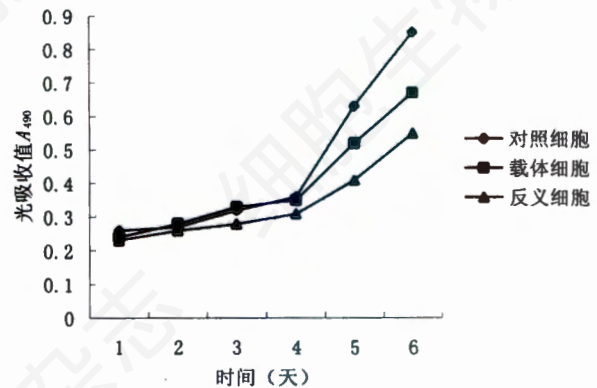


图3 细胞生长曲线

表1 反义 hTRT 基因对 SW-111C 细胞周期的影响

	$G_{0/1}$ (%)	S(%)	G_2 M(%)	PI
对照细胞	52.41	8.6	29.1	47.7
载体细胞	53.6	18.8	27.8	46.6
反义细胞	58.6	13.7	27.7	41.1

hTRT 仅在恶性肿瘤组织及部分癌前病变中表达, 而正常组织少有表达^[4,5]。hTRT 的表达水平与细胞中端粒酶活性一致。hTRT 导入正常人体细胞可出现端粒酶活性, 而突变和反义 hTRT 导入则降低端粒酶的活性^[6], 因此提示 hTRT 具有调控端粒酶活性的作用。

本实验构建了 hTRT 反义真核表达载体, 采用



图4 反义细胞 (400×)

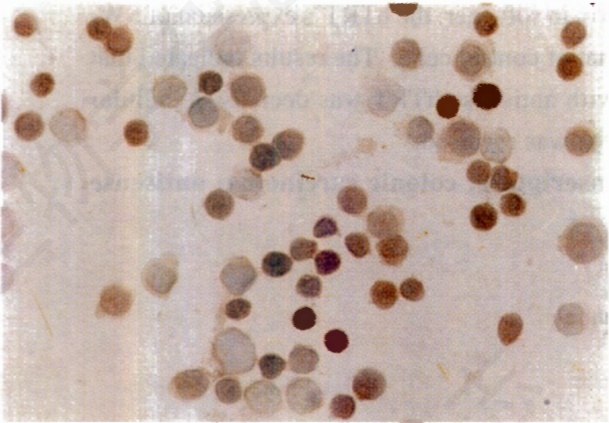


图4 对照细胞 (400×)

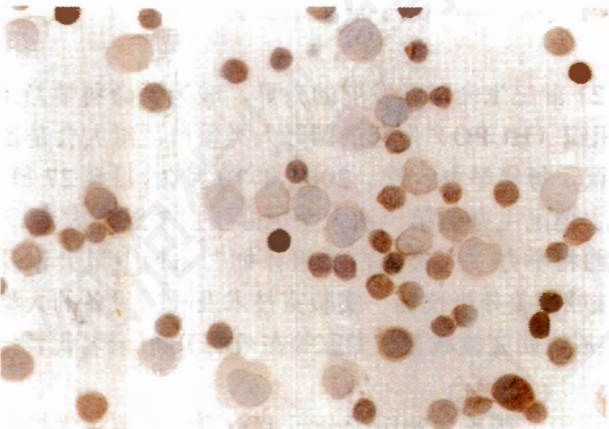


图4 载体细胞 (400×)

脂质法导入结肠癌细胞 SW-111C 中, 发现反义细胞增殖速度明显降低, 并出现接触性生长抑制; 且不能在软琼脂中形成集落; 反义细胞中 hTRT 表达水平明显降低, 其作用机制可能是反义 hTRT 封闭癌细胞中内源性 hTRT mRNA, 从而抑制其翻译

成蛋白质, 使 hTRT mRNA 含量降低。提示反义 hTRT 可以降低端粒酶活性及部分逆转结肠癌细胞的恶性表型。

端粒酶活性的调节机理错综复杂, 研究认为可能与癌基因、抑癌基因、细胞分化和周期有关^[7,8]。Zhu^[9]等应用阻断法发现细胞周期的不同阶段, 端粒酶活性也不同, G_{0/1} 期酶活性完全抑制, S 期酶活性最高, G₂M 期时酶活性最低, 说明端粒酶活性与细胞周期密切相关^[8]。本实验应用 FCM 检测发现反义基因转染的细胞 G_{0/1} 期细胞增加, S 和 G₂M 期细胞减少, 细胞增殖指数降低。说明反义 hTRT 基因表达阻抑细胞分裂, 使其停滞 G₁ 期, 而不能进入 S 期, 使细胞增殖速度减慢, 增殖能力下降。因此现有学者认为端粒酶反义基因治疗, 诱导细胞分化可能是主要的作用机制。

本实验结果表明反义 hTRT 转导入结肠癌细胞后, 具有抑制癌细胞生长及逆转其恶性表型的作用。提示 hTRT 可以作为肿瘤基因治疗的一个新的靶位。

参 考 文 献

- [1] MEYERSON M, COUNTER C M, EATEN E N, *et al.* hEST₂, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulate tumor cells and during immortalizing[J]. *Cell*, 1997, **90**: 785 - 795.
- [2] NAKAMURA T M, LINGER J, CECH T R, *et al.* Telomerase catalytic subunit homoge from fission yeast and human[J]. *Science*, 1997, **277**: 955 - 957.
- [3] 司徒镇强. 细胞培养. 世界图书出版公司, 2001, 184 - 187.
- [4] SUMIDA, HAWAKAWA H, SOGAWAK, *et al.* Telomerase components as a diagnostic tool in human oral lesions[J]. *Int J cancer*, 1998, **80**(1).
- [5] WEINRICH S L, PRUZAN R MAL, *et al.* Reconstitution of humantelomerase with the template RNA ocomponent hTR and the catalytic protein subunit hTRT Nat[J]. *Genet*, 1997, **17**: 498 - 512.
- [6] BODNARr A G, OULLETTEM, FROLIKIS M, *et al.* *Science*, 1998, 279 - 349.
- [7] WRIGHT W E, SHAY J W. Telomere positional effects and the regulation of cellular sencence[J]. *Trends Genet*, 1992, **8**: 193 - 197.
- [8] HARRINGTON L, MCPHSIL T, MAR V, *et al.* A mammalian telomerase associated protein[J]. *Science*, 1997, **275**: 973 - 977.
- [9] ZHU X L, KUMAR R, MANDAL M, *et al.* Cell cycle-dependent modulation of telomerase activity in tumor cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 6091 - 6095.

Inhibitive Effects of Antisense hTERT on Human Colonic Carcinoma Cells

FU Gui Lian, DONG Jun Hong*, DU Pei Ge

(The Medical College of Beihua University, Jilin 132001, China)

Abstract: hTERT was reversely inserted into pcDNA 3.0 and recombinant pcDRTRT was obtained. Recombinant pcDRTRT were transfected into colonic carcinoma cell line SW-111C were transfected into colonic carcinoma cell line SW-111C with lipofectin and a stable transfected cell line, ie. SW-111C-pcDRTRT was obtained. The transfected cells were charatered with easily dropping, slow growth, and loss of overlap growth ability; Flow cytometry(FCM) detection showed that the cell in $G_{0/1}$ phases of SW-111C-pcDRTRT increased, but the cells in S and G_2M phases decreased; The SW-111C-pcDRTRT cells couldn't form in soft agar; the hTERT's expression of SW-111C-pcDRTRT cells was significantly lower than that of control cells. The results indicated that telomerase activity of SW-111C cells transfected with antisense hTERT was decreased, cellular growth was inhibited and cellular malignant phenotype was reversed.

Key words: human telomerase reverse transcriptase; colonic carcinoma; antisense gene therapy

*Corresponding author, E-mail: dupeige2001@yahoo.com.cn

第三届国际人类蛋白质组大会即将于 2004 年 10 月在北京召开

随着人类基因组计划的完成,蛋白质组研究已成为 21 世纪生命科学发展的先导,成为生命科学乃至自然科学最活跃的学科领域之一。由国际人类蛋白质组组织(HUPO)发起的国际人类蛋白质组大会是蛋白质组领域规模最大、影响最广、水平最高的国际性会议,每年举办一次。2004 年 10 月 25 日至 27 日,第三届国际人类蛋白质组大会将在北京召开。这将是亚太地区主办的第一次大型国际蛋白质组学大会。

本届大会主题是“蛋白质组—基因组的诠释”。会前将举办“人类蛋白质组计划”系列卫星会议及蛋白质组研究技术培训班。会议同期还将举办生命科学领域相关分析仪器、实验室技术及相关设备的大型国际展览。预计将有包括若干诺贝尔奖获得者及国际蛋白质组研究领域著名专家等在内的 3000 余名代表出席。

大会由国际人类蛋白质组组织、中国人类蛋白质组组织、国家生物医学分析中心、北京市科学技术委员会共同主办。

有关大会的详细信息请查阅会议网站: www.hupo2004.cn

电话: 86-10-82327644 传真: 86-10-82802515 E-mail: Beijing2004@newlife.org.cn

通信地址: 北京市海淀区学院路 38 号北京大学医学部会议中心一层 100083

联系人: 陈宁

(第三届国际人类蛋白质组大会筹备组)