

RNAi干扰WDR79基因对肺腺癌A549细胞增殖的抑制效应

袁平 王志田 吕望 泮辉 杨运海 胡坚*

(浙江大学医学院附属第一医院, 杭州 310003)

摘要 通过RNA干扰技术沉默端粒酶关键组分WDR79的表达, 采用PCR法、Western blot、免疫荧光共聚焦、Southern blot、MTT、流式细胞术(FCM)分别检测WDR79 siRNA瞬时转染A549细胞后WDR79基因和蛋白的表达水平、端粒酶和端粒的结合情况和端粒长度变化、细胞生长增殖变化、细胞周期的变化及细胞凋亡率, 探讨该基因的沉默表达对A549细胞的抑制作用。结果表明, WDR79 siRNA瞬时转染A549细胞显著降低WDR79 mRNA及蛋白水平($P<0.05$), 端粒和端粒酶的结合水平明显减少($P<0.05$), 细胞增殖的活力被抑制($P<0.05$), 干扰后停留在S期的细胞减少($P<0.05$), 停留在G₁期的细胞增多($P<0.05$)。提示WDR79 siRNA的瞬时转染可显著降低WDR79基因及蛋白的表达, 并有抑制肺腺癌A549细胞的生物学效应, 进一步探索了WDR79基因在肿瘤发生发展中的重要作用, 并在为肺癌的治疗中寻找更有效的靶点提供了实验证据。

关键词 肺腺癌; WDR79; 端粒酶; A549细胞

The Inhibitory Effect of WDR79 RNAi on the Proliferation of Human Lung Cancer A549 Cells

Yuan Ping, Wang Zhitian, Lü Wang, Pan Hui, Yang Yunhai, Hu Jian*

(First Affiliated Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

Abstract WDR79 is a telomerase holoenzyme which is notably enriched in Cajal bodies (CBs), it facilitates the recruitment of telomerase to CBs in HeLa cells. We achieved down-regulation of WDR79 expression in A549 cells by conducting transient WDR79 siRNA transfection. Real-time PCR and Western blot assays were used to evaluate the mRNA and protein level of *WDR79* gene. The telomerase/telomere colocalization was detected by immunofluorescence double labeling confocal laser scanning microscopy. The telomere length was detected by Southern blot. The proliferation of cells was analyzed by MTT assay. The cell cycle analysis and apoptosis were detected by flow cytometry (FCM). The results demonstrated that compared with the control siRNA and untreated groups, the mRNA and protein level of WDR79 were significantly decreased ($P<0.05$); The telomerase/telomere colocalization was abolished ($P<0.05$); The proliferation ability was inhibited significantly ($P<0.05$); WDR79 depletion caused decreased S phase cell and led to G₁ phase cell cycle arrest ($P<0.05$). The biological effect of A549 cells may significantly inhibited by down-regulation of WDR79, indicating that WDR79 may serve as a potential candidate for the development of therapeutic target for lung adenocarcinoma.

Key words lung adenocarcinoma; WDR79; telomerase; A549 cells

收稿日期: 2014-01-25 接受日期: 2014-05-24

国家自然科学基金(批准号: 31170720/c050103)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-87236770, E-mail: hujian_med2@163.com

Received: January 25, 2014 Accepted: May 24, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31170720/c050103)

*Corresponding author. Tel: +86-571-87236770, E-mail: hujian_med2@163.com

网络出版时间: 2014-09-03 13:12 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.10.0438.html>

目前,肺癌已是我国发病率最高的恶性肿瘤,并居恶性肿瘤死亡率第一位^[1]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占肺癌总数的85%,其中肺腺癌占NSCLC的大多数。端粒酶活性表达程度增高被认为是肺癌发病的机制之一^[2-3],其中端粒酶关键组分WDR79(WD repeat domain 79 protein, 也被称作卡扎尔体蛋白1或WRAP53)是2009年发现的核心蛋白^[4],它能把端粒酶从卡扎尔体运输到端粒末端从而发挥其维持端粒长度的功能。持续沉默WDR79的表达虽然不会影响端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)对自身携带的RNA组分(hTERC)的逆转录催化作用,但会引起端粒缩短,细胞也会因此加快死亡^[4]。近年研究发现,WDR79基因在肺腺癌细胞和其他肿瘤细胞中过表达,并且可作为治疗癌症的潜在靶基因^[5]。因此,本实验通过瞬时转染WDR79 siRNA至A549细胞,沉默WDR79在A549细胞中的表达,以此探讨WDR79基因的沉默效应对肿瘤增殖等生物学行为的影响,为寻找治疗肺腺癌的有效靶点提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂及仪器

A549细胞由中国科学院上海生命科学研究院细胞库提供;胎牛血清、F-12K细胞培养基购自GIBCO公司;胰酶(含EDTA)购自杭州科易生物技术有限公司;WDR79 siRNA与control siRNA均购自Santa Cruz公司;脂质体2000、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、Trizol液均购自Invitrogen公司;DMSO购自Amresco公司;RIPA裂解液购自碧云天生物技术有限公司;DNA抽取试剂盒购自QIAGEN公司;引物由大连宝生物工程有限公司(TaKaRa)合成;Mispript逆转录试剂盒、PCR反应试剂盒、DNA Maker与蛋白Maker均购自TaKaRa公司;端粒酶检测试剂盒购自Milipore公司;端粒试剂盒购自Roche公司;细胞凋亡试剂盒与周期染色试剂盒均购自中国联科生物技术有限公司;牛血清白蛋白(BSA)购于上海生工生物工程有限公司。

抗 β -actin抗体购自Sigma公司;抗WDR79抗体、抗hTERT抗体和抗TRF-2抗体均购自Abcam公司;HRP标记的抗兔和抗鼠抗体均购自Cell Signaling Technology公司;FITC标记的羊抗兔第二抗体和cy3标记的羊抗鼠第二抗体均购自Abcam公司。

实验所用仪器有:6孔、96孔细胞培养板(Nunc-clon公司)、CO₂细胞培养箱(Thermo公司)、冷冻高速离心机(Eppendorf公司)、连续光谱荧光酶标仪(BIO-RAD公司)、PCR循环仪(BIO-RAD公司)、倒置显微镜(Olympus公司)、荧光共聚焦显微镜(Carl ZEISS公司)以及流式细胞仪(BD公司)。

1.2 细胞培养及转染

A549细胞培养于F-12K培养基中,内含10%胎牛血清,置于37 °C、5.0% CO₂及饱和湿度的培养箱中培养。

转染分3组,具体如下。A组:无处理组(wild type, WT),加入无血清F-12K; B组: control siRNA转染组,加入脂质体2000/control siRNA复合物; C组: WDR79 siRNA转染组,加入脂质体2000/WDR79 siRNA复合物。细胞转染前1 d接种细胞(6孔板: 1×10^5 /孔, 96孔板: 6 000/孔)使得次日转染时细胞贴壁面积达40%~50%。转染前用无血清F-12K稀释脂质体2000和siRNA并混合,室温孵育30 min后再加入培养皿中。细胞转染后培养箱孵育48 h后进行后续试验。

1.3 Real-time PCR检测各转染组A549细胞WDR79 mRNA的表达

Trizol法分别提取3组处理的细胞株总RNA并测定浓度(以control siRNA细胞组和空白细胞组作为对照),按照Mispript逆转录试剂盒说明书提取总RNA。取1 μ g RNA样本进行合成反应,之后用2 μ L反应产物在20 μ L反应体系中进行半定量PCR检测。WDR79上游引物: 5'-AAC CGT CAG GAG CCC ACT TA-3'; 下游引物: 5'-GGA GAC ACC GCT TGG AAC TA-3'。内参(β -actin)上游引物: 5'-CTC CAT CCT GGC CTC GCT GT-3'; 下游引物: 5'-GCT GTC ACC TTC ACC GTT CC-3'。扩增参数为: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35个循环; 72 °C 5 min; 4 °C短暂保存。用Image J软件分析条带灰度值,用WDR79/ β -actin代表WDR79的mRNA含量,实验独立重复3次。

1.4 Western blot检测各转染组A549细胞WDR79蛋白的表达

用预冷的PBS溶液冲洗细胞2遍,用预冷的刮刀将细胞刮下,然后加入RIPA裂解液,冰上裂解10~15 min,震荡后于4 °C、12 000 r/min离心5 min,取上清液。BCA法测定蛋白浓度后与上样缓冲液以1:1混合,煮沸变性,用8%的分离胶

和5%的浓缩胶进行SDS-PAGE电泳,之后电转移至PVDF膜。用5%脱脂奶粉封闭转膜后的PVDF膜,2 h后分别加入抗WDR79多克隆抗体(1:1 000稀释)和抗 β -actin抗体(1:2 000稀释),4 °C过夜。TBST溶液洗膜3次后加入HRP标记的抗兔抗体(1:1 000稀释),室温孵育3 h,孵育后用TBST溶液洗膜,至暗室显影之前用ECL发光显色系统显色。扫描胶片至计算机中,用Image J软件分析条带灰度值,用WDR79/ β -actin代表WDR79蛋白的相对表达量,实验独立重复3次。

1.5 MTT法和细胞拍照检测和观察转染细胞增殖能力

WDR79 siRNA组、control siRNA组和空白A549组细胞均以6 000/孔接种于96孔板中,设置3个时间点(24, 48, 72 h),每组细胞设5个复孔,同时设置只加培养液的空白孔作为对照。各组细胞置于37 °C、5% CO₂培养箱内分别培养至各时间点后,每孔加入15 μ L MTT(5 mg/mL)后继续培养3 h,平板离心机离心,弃上清后加入DMSO溶液150 μ L终止培养,微震荡后用酶标仪检测各孔490 nm处的吸光度 D 值并计算各组平均值。试验重复3次,以3次实验的平均值为准,绘制曲线。细胞增殖率=(siRNA组 D_{490} 值/空白组 D_{490} 值) \times 100%。

WDR79 siRNA组细胞和两个对照组细胞均以 2.0×10^4 /孔的数量接种于24孔板,每组细胞设置2个复孔,设置3个时间点(24, 48, 72 h),培养至各时间点后置于倒置显微镜下观察并拍照。

1.6 免疫共聚焦检测端粒酶与端粒的结合情况, Roche试剂盒检测端粒长度变化

WDR79 siRNA组、control siRNA组和空白A549组细胞均以 1×10^5 /孔接种于荧光皿中,转染48 h,染色步骤为:(1)PBS洗3 min;(2)4%多聚甲醛避光固定20 min;(3)PBS洗3 min;(4)PBS溶液稀释的1% Triton通透10 min;(5)PBS洗3 min;(6)用3% BSA溶液封闭半小时;(7)一抗(兔抗hTERT抗体1:1 000和鼠抗TRF-2抗体1:2 000)孵育,4 °C过夜;(8)PBS洗3 min;(9)二抗(FITC羊抗兔1:1 000和cy3羊抗鼠1:1 000)避光室温孵育1 h;(10)PBS洗3 min后滴加抗荧光淬灭封片剂,放置荧光显微镜下观察。统计方法:使用ZEISS激光扫描共聚焦显微镜,观察阳性信号免疫荧光并采集图像(阳性信号为黄色)。每组细胞取3个视野,查数每个视野的100个细胞,记录有阳性信号的细胞数量

后取平均值为即为阳性信号出现的百分比。

用QIAGEN DNA提取试剂盒提取处理后的细胞并检测样本DNA的浓度,按照Roche端粒长度检测试剂盒的说明书进行试验。用Hinf I/Rsa I 1 μ L与37 °C水浴催化2 μ g的基因组DNA 12 h后,行Southern blot印记杂交;凝胶中的DNA经过变性,中和后室温转膜过夜,将凝胶中的DNA转至尼龙膜上;120 °C烘烤尼龙膜20 min,在杂交液中经过预杂交、杂交后将尼龙膜置于Anti-DIG-AP工作液中室温孵育30 min,用检测缓冲液孵育尼龙膜5 min后放入杂交袋,在酶解液中室温孵育5 min后于暗室显影。X胶片预设曝光10 min。扫描至电脑后的图片用Image J软件进行分析并计算端粒长度:端粒长度= $\sum(D_i)/\sum(D_i/L_i)$, D_i 代表i点的吸光度值, L_i 代表i点的Marker长度。实验独立重复3次。

1.7 流式细胞术(FCM)检测转染细胞周期的变化

WDR79 siRNA组、control siRNA组和空白A549组细胞均以 1×10^5 /孔接种于6孔板中。用不含EDTA的胰蛋白酶收集转染48 h的各组细胞,800 r/min离心5 min,用300 μ L PBS溶液洗涤细胞,之后加入700 μ L预冷的无水乙醇中,此时乙醇的最终浓度为70%,4 °C避光固定过夜。800 r/min离心5 min。去上清后用PBS溶液洗2次。重悬细胞于500 μ L含100 U/mL的RNase A的PBS溶液中,避光。37 °C孵育30 min。加2 mg/mL PI至终浓度50 μ g/mL,避光孵育30 min。在1 h内送至流式细胞仪进行检测,实验独立重复3次。

1.8 流式细胞术(FCM)检测转染细胞凋亡

WDR79 siRNA组、control siRNA组和空白A549组细胞均以 1×10^5 /孔接种于6孔板中。用不含EDTA的胰蛋白酶收集转染48 h的各组细胞,800 r/min离心5 min,用300 μ L PBS溶液洗涤细胞后转移至流式管中。采用Annexin V-PI细胞凋亡检测试剂盒、通过流式细胞术检测细胞凋亡水平,实验独立重复3次。

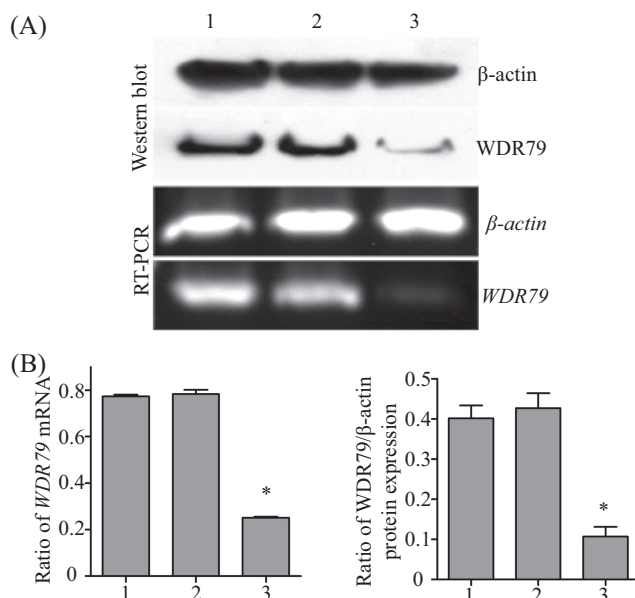
1.9 数据统计

实验数据以 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 形式表示,不同实验组之间的比较采用单向方差检验,运用SPSS 16.0软件进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 WDR79 siRNA的干扰效果检测

RT-PCR结果分析可知,WDR79 siRNA组和control siRNA组WDR79 mRNA相对于WT组抑制率



A: Western blot和Real-time PCR检测WDR79 siRNA转染A549细胞后各组WDR79蛋白和mRNA的表达水平; B: Western blot和Real-time PCR检测各组WDR79的蛋白和mRNA表达水平。1: WT组; 2: control siRNA组; 3: WDR79 siRNA组。* $P < 0.05$, 与control siRNA和WT组比较。

A: expression of WDR79 protein and mRNA detected by Western blot and RT-PCR; B: expression of WDR79 mRNA and protein in A549 cells after transfecting with siRNA. 1: WT group; 2: control siRNA group; 3: WDR79 siRNA group. * $P < 0.05$ vs control siRNA and WT groups.

图1 各组细胞中WDR79蛋白和mRNA表达水平的检测

Fig.1 Expression of WDR79 and protein levels in each group

分别为(67.5±0.9)%和(6.3±1.3)%。WDR79 siRNA干扰组的mRNA抑制明显(图1A),并且WDR79 siRNA组中WDR79 mRNA的表达量与两组对照组之间的差异有统计学意义($P < 0.05$, 图1B)。Western blot结果与RT-PCR结果相似, WDR79 siRNA转染细胞的WDR79的蛋白表达水平明显降低(图1A), WDR79 siRNA转染组和control siRNA转染组中WDR79的蛋白表达水平相对于WT组抑制率分别为(73.6±3.9)%和(7.2±0.8)%, 且WDR79 siRNA干扰组中WDR79蛋白的表达量与两组对照组之间的差异具有统计学意义(图1B)。

2.2 WDR79沉默后对端粒酶与端粒的结合检测和端粒长度的检测

激光共聚焦显微镜技术观察结果显示, 在control siRNA和WT组A549细胞中, 端粒酶标记物hTERT(绿色)在细胞中与分布在核内的端粒标记物TRF-2(红色)结合成黄色。而经WDR79 siRNA转染后的细胞中端粒酶的分布状态明显改变, 大部分聚集在核膜周围, 与核内的端粒结合减少(图2A)。经过查数每组细胞随机3个视野有端粒酶和端粒结

合信号(黄色)的细胞, 结果显示, WDR79 siRNA、control siRNA转染组和WT组中有结合信号细胞的比率分别为(22.7±4.7)%、(82.7±2.5)%和(76.7±7.1)%, 两个对照组相比之间无明显差异, 而WDR79 siRNA组与两个对照组相比, 端粒酶和端粒的结合明显降低, 并且差异有统计学意义($P < 0.05$, 图2C)。

Southern blot检测结果显示, WDR79 siRNA转染组的端粒长度为(3.1±0.3) Kb, control siRNA干扰对照组的端粒DNA长度为(3.0±0.9) Kb(图2B)。经统计分析端粒长度无统计学差异(图2C)。

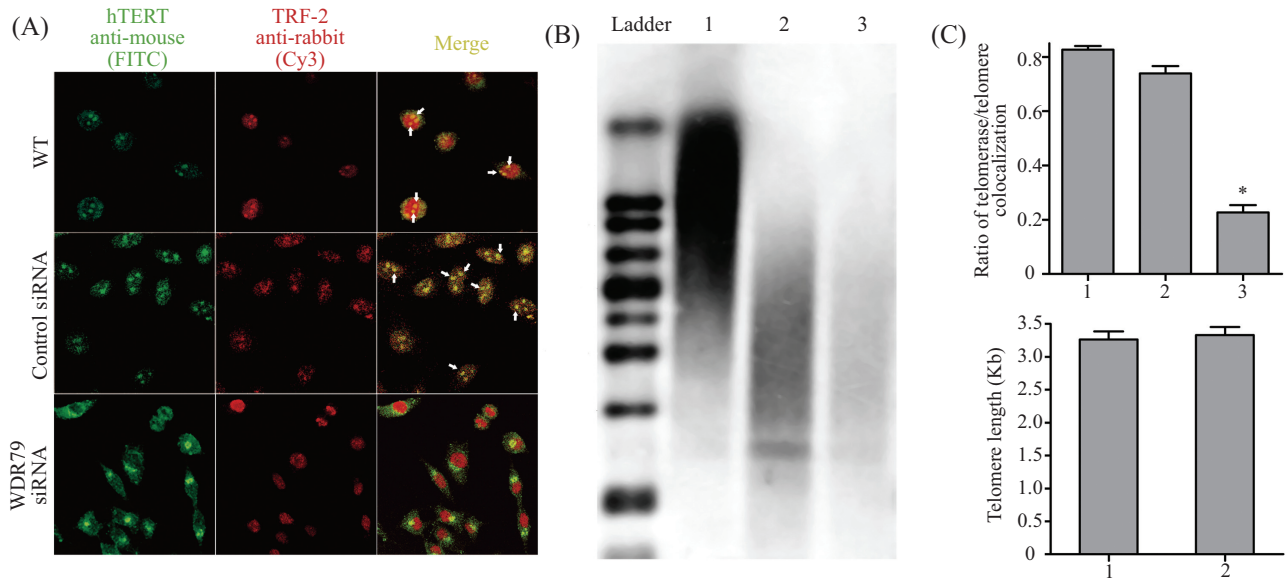
2.3 MTT和细胞生长密度对比检测转染细胞的增殖率

MTT检测结果显示, 各个时间点(24, 48, 72 h) WDR79 siRNA转染组细胞的增殖率分别为81%、82%和68%, D_{490} 吸光值明显低于其他两组细胞($P < 0.05$); 而control siRNA和WT组的细胞的增殖效率均值基本接近, 无统计学差异($P > 0.05$, 图3C)。使用倒置显微镜采集各个组细胞图像显示: WDR79 siRNA转染组的细胞密度明显减少(图3A)。每组实验细胞取3个随机视野查数细胞数量进行统计(WT组, 24 h: 106±7; 48 h: 117±3; 72 h: 256±8。Control siRNA组, 24 h: 111±8; 48 h: 121±4; 72 h: 278±7。WDR79 siRNA组, 24 h: 70±3; 48 h: 84±5; 72 h: 84±8)。WDR79 siRNA转染组细胞在相同面积下细胞的数量明显低于两组对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图3B)。

MTT试验和细胞密度对比结果均显示, WDR79 siRNA转染组的细胞在72 h的存活率明显比24 h和48 h低, 可能由于WDR79 siRNA转染入细胞后沉默WDR79基因, 其效应持续扩增, 在48~72 h之间逐渐达到最大, 并且在72 h维持较高水平, 说明WDR79 siRNA转染对于A549的抑制作用在时间上出现依赖性联系。

2.4 流式细胞术检测转染后细胞周期的变化和凋亡率

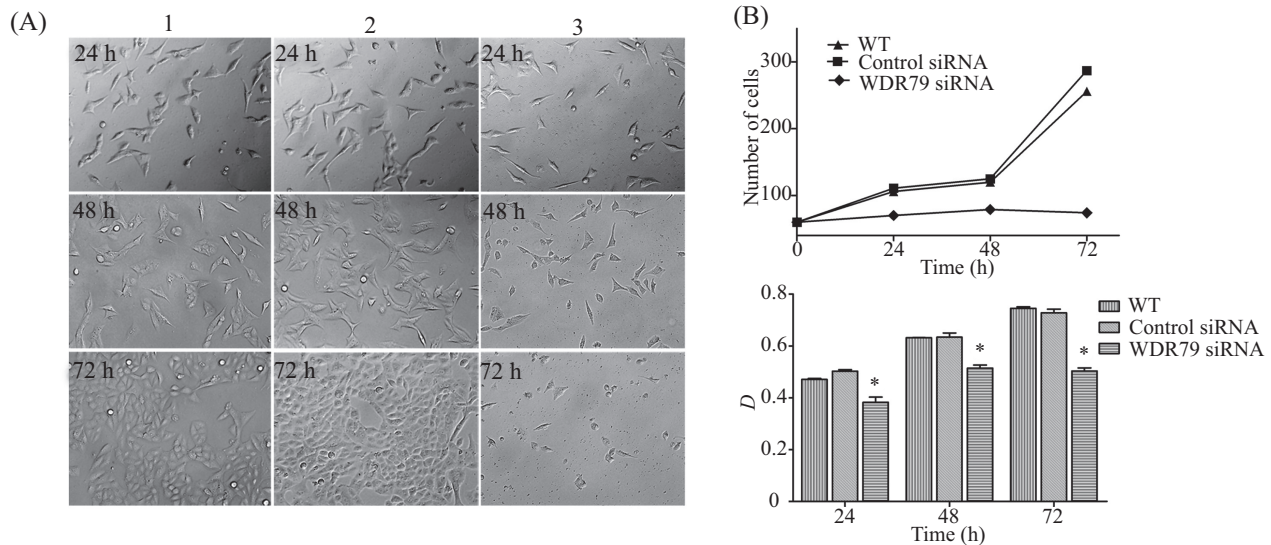
采用流式细胞术检测3组细胞的周期变化, 结果显示, WDR79 siRNA组、control siRNA组和未处理细胞组在G₁期的细胞比率分别为(84.5±1.5)%、(71.5±1.2)%和(72.5±1.5)%; S期细胞的比率分别为(9.5±0.6)%、(22.3±0.7)%和(23.6±1.1)% (图4A)。WDR79 siRNA转染组细胞在G₁期增多, S期减少。并且差异有统计学意义($P < 0.05$, 图4B)。凋亡检



A: 荧光共聚焦显微镜观察各组细胞中端粒酶和端粒的结合, 绿光信号代表端粒酶(hTERT), 红光信号代表端粒(TRF-2), 箭头代表结合信号; B: Southern blot检测WDR79 siRNA和control siRNA转染组细胞的端粒长度变化。1: 试剂盒内提供的DNA样本; 2: control siRNA组; 3: WDR79 siRNA组; C: 端粒酶与端粒结合率与端粒长度的柱状图。上: 纵轴代表3个视野中出现阳性信号的比率平均值。1: WT组; 2: control siRNA组; 3: WDR79 siRNA组; * $P < 0.05$, 与control siRNA和WT组比较; 下: 纵轴代表利用公式 $TRF = \frac{\sum(D_i)}{\sum(D_i/L_i)}$ 计算出的3次实验端粒长度的平均值。1: control siRNA组; 2: WDR79 siRNA组。

A: representative hTERT (green) and TRF-2 (red) IF data for telomerase and telomeres in A549 cells transfected with WDR79 siRNA. Arrowhead indicates telomerase/telomere colocalization in A549 cells; B: telomere length detected by Southern blot. 1: DNA sample provided in the kit; 2: control siRNA; 3: WDR79 siRNA. C: above panel: telomerase/telomere colocalization proportion among cells from each experiment. 1: WT group; 2: control siRNA group; 3: WDR79 siRNA group. * $P < 0.05$ vs control siRNA group and WT group ($n=3$). Below panel: telomere length was calculated by the formula: $TRF = \frac{\sum(D_i)}{\sum(D_i/L_i)}$. 1: control siRNA group; 2: WDR79 siRNA group.

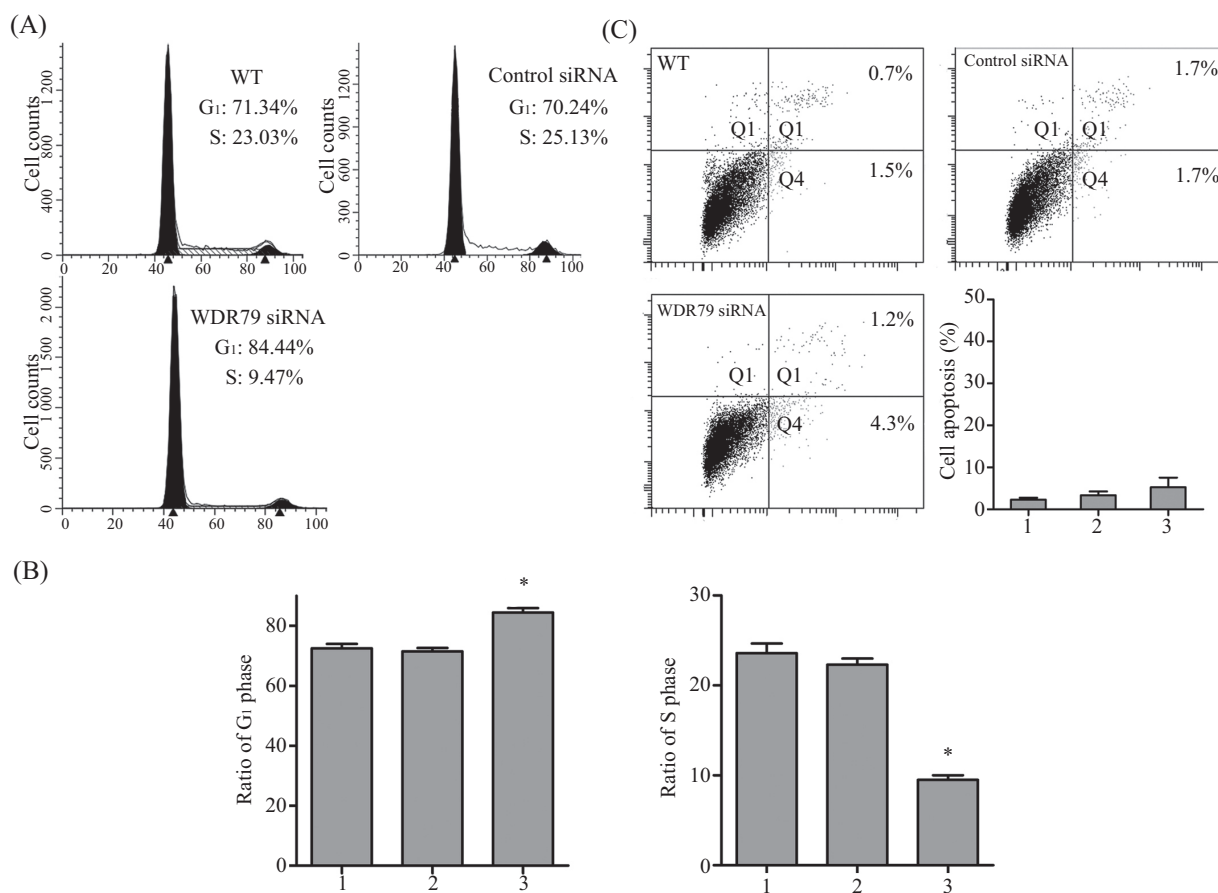
图2 各组细胞中端粒与端粒酶的结合情况和端粒长度的检测
Fig.2 Colocalization of telomerase/telomere and telomere length assay



A: 倒置显微镜观察WDR79 siRNA对于A549细胞增殖的影响。1: WT组; 2: control siRNA组; 3: WDR79 siRNA组; B: 细胞数量和MTT法检测A549细胞的生长情况。上: A549细胞的生长趋势。* $P < 0.05$, 与control siRNA和WT组比较。下: 每组细胞490 nm处吸光值。* $P < 0.05$, 与control siRNA和WT组比较。

A: effects of WDR79 siRNA on A549 cell density were observed under invert microscope. 1: WT group; 2: control siRNA group; 3: WDR79 siRNA group. B: number of cells and MTT results. Above panel: cells were counted from three different visual fields from one single treatment; * $P < 0.05$ vs control siRNA group and WT group ($n=3$). Below panel: the absorbance at 490 nm of each group. * $P < 0.05$ vs control siRNA group and WT group ($n=3$).

图3 WDR79 siRNA对A549细胞的抑制作用
Fig.3 Effects of WDR79 siRNA on A549 cell proliferation



A: 流式细胞术检测细胞的周期变化; B: 各组细胞在G₁期和S期的百分率。1: WT组; 2: control siRNA组; 3: WDR79 siRNA组。* $P < 0.05$, 与control siRNA和WT组比较; C: 流式细胞术检测A549细胞的凋亡率。1: WT组; 2: control siRNA组; 3: WDR79 siRNA组。

A: the cell cycle was detected by flow cytometry; B: the ratio of cells in G₁ and S phases. 1: WT group; 2: control siRNA group; 3: WDR79 siRNA group. * $P < 0.05$ vs control siRNA group and WT group ($n=3$); C: the apoptosis rate was detected by flow cytometry. 1: WT group; 2: control siRNA group; 3: WDR79 siRNA group.

图4 流式细胞术检测细胞的周期和凋亡情况

Fig.4 The cell cycle and apoptosis detected by flow cytometry

测结果显示, WDR79 siRNA组、control siRNA组和WT组处于凋亡状态的细胞分别为 $(5.3 \pm 2.3)\%$ 、 $(3.3 \pm 1.0)\%$ 和 $(2.3 \pm 0.5)\%$ (图4C)。WDR79 siRNA干扰组处于凋亡状态的细胞虽然在数值上稍高于对照组,但差异没有统计学意义($P > 0.05$, 图4C)。

3 讨论

端粒酶能引起细胞的永生,被认为是细胞发生癌变的原因之一^[6-7]。研究报道表明,有80%的NSCLC中端粒酶活性呈过表达^[8],因此一直是肺癌研究领域的热点。通过运用质谱技术, Venteicher等^[4]在2009年发现了端粒酶的重要核心成分WDR79, WDR79对于端粒酶的组装完成及从卡扎尔体到端粒的运输是不可或缺的, WDR79将端粒酶复合体集合在卡扎尔体中,在卡扎尔体的协助下,使染色体片段与功能

性能蛋白结合,后者在小分子RNA的作用下对染色体片段进行处理,因此WDR79担任着重要的运输员的角色。随后,学者们发现, WDR79对于端粒的形成密切相关,它不仅调控端粒酶的信号转导,而且对于卡扎尔体的形成起到重要作用^[9-10]。研究表明, WDR79除了在多种肿瘤细胞(骨肉瘤细胞、结肠癌细胞和子宫颈癌)中异常表达外,还在某些上皮细胞过度表达,促使细胞发生恶性转化。利用shRNA靶向抑制WDR79在某些肿瘤细胞的表达后能够通过线粒体途径引发这些肿瘤细胞凋亡^[5]。以上研究均提示, WDR79可能成为一种新型的抗肺癌药物的靶分子,具有潜在的治疗学意义。鉴于此,本研究拟通过瞬时转染siRNA沉默WDR79基因,使该基因在A549细胞中呈现低表达状态,从而在细胞水平探讨其抗肿瘤的效应。

实验结果表明, WDR79 siRNA瞬时转染可明显抑制A549细胞中WDR79 mRNA及蛋白的表达水平;下调WDR79蛋白表达后能够减少A549细胞中端粒与端粒酶的结合,并且抑制细胞的增殖。同时,我们还发现下调的WDR79可显著降低A549细胞处于S期的数量,增加处于G₁期的细胞数量。探讨其原因,可能与端粒酶与端粒的结合减少阻滞端粒DNA合成有关:细胞在S期内主要的任务是合成DNA,为下一步的M分裂期做准备。任何一期的停止都会导致细胞周期阻滞而对细胞的增殖都有抑制效应。端粒酶虽然作为一种有逆转录活性的复合物,使自身携带的与端粒互补的一段序列与端粒结合,逆转录生成端粒DNA,以弥补有丝分裂中丢失的端粒长度。但我们通过RNAi技术沉默了WDR79的表达水平,失去了搬运工的端粒酶无法与端粒结合,使进行端粒DNA合成的S期受到阻滞,导致细胞停留在S期之前的G₁期,抑制细胞的增殖。

实验结果还表明,经WDR79 siRNA干扰之后的A549细胞在端粒长度和凋亡水平方面与对照组相比无明显变化,此实验结果与之前的报道相矛盾^[4-5],追其原因是实验方法不同。我们采用的瞬时siRNA转染法虽然使得小干扰RNA得以表达,但不会整合到细胞的基因组中,因此瞬时转染的外源基因表达时间有限,不能在细胞传代过程中持续沉默WDR79的表达。端粒长度变化要达到通过实验可检测的程度,需要WDR79在持续沉默的状态下进行一定次数的细胞分裂,因为每次细胞分裂端粒损失的碱基对只有50~200对,只有当端粒长度缩短到一定程度时在*p53*或*Rb*基因的作用下才会引发DNA损伤反应,引起细胞凋亡危象^[11-12],进而使细胞的端粒缩短引发凋亡。

本研究已从细胞水平证实沉默WDR79具有明显抑制肺腺癌A549细胞增殖的作用,后续我们将进一步通过慢病毒稳定转染WDR79 siRNA,检测在

A549细胞内持续沉默表达WDR79的条件下经过一定次数的传代后端粒长度的变化情况和凋亡水平,并对肺腺癌动物模型进行进一步的检测。

参考文献 (References)

- Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *New Engl J Med* 2008; 359(13): 1367-80.
- Zaffaroni N, de Polo D, Villa R, della Porta C, Collini P, Fabbri A, *et al.* Differential expression of telomerase activity in neuroendocrine lung tumours: Correlation with gene product immunophenotyping. *J Pathol* 2003; 201(1): 127-33.
- Nakanishi K, Kawai T, Kumaki F, Hiro T, Mukai M, Ikeda E. Expression of human telomerase RNA component and telomerase reverse transcriptase mRNA in atypical adenomatous hyperplasia of the lung. *Hum Pathol* 2002; 33(7): 697-702.
- Venteicher AS, Abreu EB, Meng Z, McCann KE, Terns RM, Veenstra TD, *et al.* A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science* 2009; 323(5914): 644-8.
- Mahmoudi S, Henriksson S, Farnebo L, Roberg K, Farnebo M. WRAP53 promotes cancer cell survival and is a potential target for cancer therapy. *Cell Death Dis* 2011; 2: e114.
- Bolzan AD. Chromosomal aberrations involving telomeres and interstitial telomeric sequences. *Mutagenesis* 2012; 27(1): 1-15.
- Cui W, Wylie D, Aslam S, Dinnyes A, King T, Wilmut I, *et al.* Telomerase-immortalized sheep fibroblasts can be reprogrammed by nuclear transfer to undergo early development. *Biol Reprod* 2003; 69(1): 15-21.
- Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, Yamakido M, Inai K, Gazdar AF, *et al.* Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer I* 1995; 87(12): 895-902.
- Mahmoudi S, Henriksson S, Weibrecht I, Smith S, Soderberg O, Stromblad S, *et al.* WRAP53 is essential for Cajal body formation and for targeting the survival of motor neuron complex to Cajal bodies. *PLoS Biol* 2010; 8(11): e1000521.
- Stern JL, Zyner KG, Pickett HA, Cohen SB, Bryan TM. Telomerase recruitment requires both TCAB1 and Cajal bodies independently. *Mol Cell Biol* 2012; 32(13): 2384-95.
- Cristofari G, Adolf E, Reichenbach P, Sikora K, Terns RM, Terns MP, *et al.* Human telomerase RNA accumulation in Cajal bodies facilitates telomerase recruitment to telomeres and telomere elongation. *Mol Cell* 2007; 27(6): 882-9.
- Mitchell JR, Wood E, Collins K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 1999; 402(6761): 551-5.