

特异性人端粒酶催化亚单位基因小干扰 RNA 对 HeLa 细胞生长的抑制作用

李欣 沈志伟 薛晓荣 刘民 汤华*

(天津医科大学天津市生命科学中心实验室, 天津 300070)

摘要 通过设计并化学合成人端粒酶催化亚单位(hTERT)特异性 siRNA, 观察其对 hTERT 表达水平及肿瘤细胞生长的影响。将 hTERT-siRNA 以脂质体法转染入 HeLa 细胞, 应用 RT-PCR、实时定量 TRAP、Western 印迹、软琼脂克隆形成实验、荷瘤裸鼠肿瘤内注射等方法检测细胞内 hTERT mRNA、蛋白质表达水平及对肿瘤细胞生长的影响。RT-PCR、实时定量 TRAP 和 Western 印迹的结果显示 hTERT-siRNA 明显降低了 HeLa 细胞内 hTERT 的 mRNA 及蛋白质表达水平并伴随有端粒酶活性的下降。克隆形成实验表明 hTERT-siRNA 组的体外肿瘤形成能力受到抑制。荷瘤裸鼠肿瘤内注射 hTERT-siRNA 使肿瘤平均体积显著小于对照组。TUNEL 凋亡检测表明 hTERT-siRNA 转染组的凋亡率明显高于对照组。研究表明 hTERT 特异性 siRNA 可以明显抑制 HeLa 细胞内 hTERT 的表达水平, 对其生长有明显抑制作用, 是一种有前途的肿瘤治疗新方法。

关键词 端粒酶; RNA 干扰; 人端粒酶催化亚单位; HeLa 细胞

端粒是一种特异的维持染色体结构和功能方面起重要作用的染色体末端结构。端粒 DNA 及其相关蛋白保护染色体末端不被降解和异常重组发生^[1]。其端粒相关蛋白中重要的称之为端粒酶的分子则是维持端粒长度的重要因素。在胚胎发育过程中, 各组织细胞高水平表达此酶活性, 而在健康个体的大多数体细胞中几乎不能检测出端粒酶的活性, 仅在生殖细胞、造血干细胞、激活的淋巴细胞等少数细胞中有低水平的活性^[2-4], 但大多数的恶性肿瘤细胞中端粒酶都显示出较高水平的活性。这为人们寻找有效地特异性抑制恶性肿瘤细胞生长提供了一个重要靶位。人类的端粒酶全酶由 3 部分组成: 端粒酶 RNA (hTR)、端粒酶相关蛋白(TP1)、端粒酶催化亚单位(hTERT), 其中 hTERT 是合成端粒酶全酶的限制性因素, 其表达水平与端粒酶的活性密切相关^[5-7]。研究表明, hTERT 的高表达能通过分化刺激来抑制细胞的凋亡, 导致细胞的永生^[8]。端粒酶表达的激活对于恶性肿瘤细胞的无限增殖性来说几乎是必不可少的条件, 也是肿瘤细胞恶性转化的共同通路。这种特性使其日益成为恶性肿瘤诊断和判断预后的一个重要标志物。更有意义的是人们可以将其作为肿瘤治疗的一个特异性高、治疗谱广的靶位点。目前已经有人应用反义核酸技术、核酶、

分化诱导剂等方法抑制端粒酶的活性, 从而抑制了肿瘤细胞的生长^[9-10]。RNA 干扰(RNAi)技术是近些年来发展起来的可以特异性降低细胞内特定 mRNA 表达水平的转录后基因沉默技术^[11]。现已证明将 19~23 nts 的双链小干扰 RNA (siRNA) 导入哺乳动物细胞中可以诱导 RNAi 效应。RNAi 技术特异性高, 还具有比反义核酸技术更强的抑制作用, 操作也更加简单, 是一种很有前途的基因治疗方法。

本研究的目的是想探讨通过应用 hTERT 特异性 siRNA 来降低 HeLa 细胞内 hTERT 的表达水平, 从而产生对肿瘤生长抑制作用的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人宫颈癌细胞系 HeLa 来自本实验室的保存株, 细胞用含 10% 胎牛血清(天津血研所), 100 μ g/ml 链霉素, 100 U/ml 青霉素的 RPMI1640 (Gibco) 培养液培养于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中。

1.1.2 siRNA 的设计及合成 使用 Ambion 公司的 siRNA 设计软件, 根据 hTERT 基因的 cDNA 序列

收稿日期: 2006-03-27 接受日期: 2006-08-14

天津市科委重点攻关项目(No.0231115118)

*通讯作者: Tel: 022-23542603-0, E-mail: htang2002@yahoo.com

(nm_003219)进行设计。设计出的hTERT-siRNA相应于其序列的1 799~1 821核苷酸处,共23个碱基长,siRNA每条链的3'端外加2个TT的突出端。其序列为:有义链5'-AGC AAG UUG CAA AGC AUUGGA AUTT-3'反义链5'-AUUCC AAUGCUUUG CAA CUU GCU TT-3'。作为对照的大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因siRNA定位于其CDS的689~709核苷酸,共21个碱基长,在siRNA每链的3'端外加2个TT的突出端,其序列为:有义链5'-GAC UAC ACA AAU CAG CGA UUU TT-3';反义链5'-AAA UCG CUG TUU UGU GUT GUC TT-3'。它们分别由美国Gibco和中国奥科公司化学合成,经PAGE纯化并退火形成双链。

1.1.3 实验动物 6周龄的BALB/C雌性裸鼠,购于中国医学科学院实验动物研究所。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染 采用脂质体转染法。用于RT-PCR、实时定量TRAP和软琼脂克隆形成实验的HeLa细胞转染方法为:(1)A组转染针对端粒酶的hTERT-siRNA+脂质体,(2)B组转染作为无效对照的针对 β -半乳糖苷酶的 β -gal-siRNA+脂质体,(3)C组转染作为对照的空脂质体。转染前一天,以 1×10^6 个/ml将HeLa传代于100 ml培养瓶中,待细胞生长至60%时吸去培养液,用PBS浸洗2次,然后每个瓶中加入6 ml含110 μ g siRNA+60 μ g LipofectamineTM 2 000 (Invitrogen)的无血清培养基。转染4 h后添加6 ml新鲜含10%胎牛血清的全培养基,转染12 h后全部更换为新鲜的含10%胎牛血清的全培养基。用于Western印迹的HeLa细胞的共转染方法为:(1)A'组共转染pcDNA3/hTERT·myc和hTERT-siRNA、脂质体,(2)B'组共转染pcDNA3/hTERT·myc和 β -gal-siRNA、脂质体,(3)C'组转染pcDNA3/hTERT·myc和脂质体。转染前一天,以 1×10^6 个/ml将HeLa传代于60 mm平皿中,待细胞生长至60%时吸去培养液,用PBS浸洗2次,然后每个平皿中加入1.4 ml含2.5 μ g pcDNA3/hTERT·myc真核表达质粒+26 μ g siRNA+22.5 μ g LipofectamineTM 2000 (Invitrogen)的无血清培养基,转染4 h后添加3 ml新鲜含10%胎牛血清的全培养基,转染12 h后全部更换为新鲜的含10%胎牛血清的全培养基。转染之后48 h收集细胞,做软琼脂克隆形成实验或提取RNA做RT-PCR、实时定量TRAP,或裂解细胞做Western印迹。

1.2.2 RT-PCR 采用TRIzol方法分别提取转染

后HeLa细胞的总RNA。逆转录在42 $^{\circ}$ C,进行60 min,逆转录酶为Superscript II。PCR扩增hTERT mRNA片段的引物为:上游:5'-GGC AGG TGT ACG GCT TCG TGC-3',下游:5'-CGC TCG TAG TTG AGC ACG CTG-3';循环条件为:94 $^{\circ}$ C 1 min,66 $^{\circ}$ C 2 min,31个循环。扩增 β 肌动蛋白的引物为:上游5'-CGT GAC ATT AAG GAG AAG CTG-3',下游5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC-3';循环条件为:94 $^{\circ}$ C 1 min,52 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 2 min,31个循环。PCR产物进行含EB的1%琼脂糖电泳,紫外光下观察结果。

1.2.3 Western印迹 与pcDNA3/hTERT·myc真核表达质粒分别共转染hTERT-siRNA/ β -gal-siRNA/脂质体的3组HeLa细胞,转染之后48 h分别收集。用PBS浸洗一遍之后用RIPA裂解液裂解。总蛋白经10% SDS-PAGE分离之后电转移(400 mA,120 min)到硝酸纤维素膜上(Millipore),5%脱脂奶粉封闭液封闭1 h,4 $^{\circ}$ C与一抗温育过夜(对于hTERT·myc融合蛋白的检测用Upstate公司的兔抗-MYC抗体;对于内参 α 微管蛋白的检测用Sigma公司的鼠抗 α 微管蛋白),然后室温与辣根过氧化物酶标记的二抗温育2 h(对于hTERT·myc融合蛋白检测二抗用Sigma公司的抗兔IgG;对于内参 α 微管蛋白的检测二抗用KPL公司的抗鼠IgG),最后用化学发光检测试剂盒(Perkin Elmer)检测,用X射线胶片(柯达)显影。

1.2.4 实时定量TRAP(RQ TRAP) ①细胞提取液的准备:细胞沉淀重悬于3-[3-cholamidopropyl-dimethylammonio]-1-propane-sulfonate裂解液中(1 000个/ μ l)。冰上温育30 min。4 $^{\circ}$ C,16 000 g离心20 min,将上清液立即-80 $^{\circ}$ C保存。检测蛋白质浓度。端粒酶用1 mg/ml DNase-free的核糖核酸酶A (Sigma-Aldrich),37 $^{\circ}$ C,20 min灭活。②RQ-TRAP:SYBR Green RQ-TRAP实验:在25 ml SYBR Green PCR Master Mix (Biosystems)中加入细胞提取液(1 000个细胞),0.1 mg端粒酶引物TS和0.05 mg锚定反向引物ACX,引物序列描述见文献^[12]。使用ABI Prism Thermal Cycler (Biosystems),25 $^{\circ}$ C温育20 min,扩增35个PCR循环(95 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 90 s,两步PCR)。以高过背景10个标准差的荧光值作为默认的阈荧光强度值,在扩增曲线上作图确定阈循环值(threshold cycle, Ct)。Ct值与标准曲线比较计算每组细胞的相对端粒酶活性(RTA)[标准曲线由系列稀释(1 000,100,10,1个细胞)的未经处理HeLa细胞的提取液绘制得到]。各组端粒酶的

相对活性(RTA)用相对于未处理 HeLa 细胞端粒酶活性的百分数表示。

1.2.5 软琼脂克隆形成实验 分别转染 hTERT-siRNA、 β -gal-siRNA 和空脂质体的 3 组细胞,转染之后 48 h 分别收集,并用 $2\times$ RPMI1640 全培养基重悬为单细胞悬液。下层胶准备:在 6 孔板中铺 0.5% 的下层琼脂糖胶 1.6 ml/孔,并静置待其凝固。0.3% 上层胶准备:将前述 1.2 ml 包含 2.4×10^3 个 HeLa 细胞的 $2\times$ RPMI1640 全培养基与 1.2 ml、0.6% 融化并冷却至 $37\sim 38^\circ\text{C}$ 的琼脂糖凝胶混合,然后把混合后含细胞的 0.3% 凝胶立即铺于凝固的下层琼脂糖胶上。待上层胶凝固后,每孔添加 2 ml RPMI1640 全培养基,并且每 3 天更换此培养基。每组细胞设 3 个平行复孔。在 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 15 天后在倒置显微镜(10×10)下计数每孔 20 个视野的总细胞克隆数(以 >50 个细胞的细胞集落为克隆形成标准)。

1.2.6 荷瘤裸鼠的 siRNA 治疗性实验 收集对数生长期的 HeLa 细胞,用 RPMI1640 全培养基重悬为 0.8×10^7 个/ml,于裸鼠背部皮下接种 0.1 ml。6 天之后将裸鼠随机分为 2 组,4 只/组,并接受第一次 siRNA-脂质体(60 μl /只)肿瘤内注射:A 组注射 hTERT-siRNA+LipofectamineTM 2000, B 组注射 β -gal-siRNA+LipofectamineTM 2000,注射时分 3~4 点进行。60 μl siRNA-脂质体的制作方法:按每 ml 混合物含 18.5 μg siRNA+10 μg LipofectamineTM 2000 将 siRNA 和脂质体溶于 5% 葡萄糖溶液中。以后每 3 天肿瘤内注射一次,共 4 次。第一次注射后 19 天处死裸鼠,实验中止。用游标卡尺测量肿瘤的长径和短径,比较各组裸鼠肿瘤体积大小(体积= $0.5\times$ 长径 \times 短径 2)并称量肿瘤湿重。

1.2.7 TUNEL 法检测细胞凋亡 TUNEL 原位凋亡检测试剂盒购自罗氏公司。HeLa 细胞分别经转染 hTERT-siRNA+脂质体、 β -gal-siRNA+脂质体或空脂质体(如前所述)后两天,按 TUNEL 试剂盒的操作说明操作。照像系统为 Nikon ECLIPSE 80i 荧光显微镜,高倍镜下观察($400\times$),随机选取 3 个视野,记下凋亡细胞数和未凋亡细胞数。细胞凋亡率(apoptosis rate)=凋亡细胞数/(凋亡细胞数+未凋亡细胞数) $\times 100\%$ 。

1.2.8 统计学处理 数据表示为均数 \pm 标准差的形式,应用 SPSS 11.5 统计软件,采用方差分析(one-way ANOVA)进行统计学分析。

2 结果

2.1 hTERT-siRNA 转染 HeLa 细胞后特异性地抑制 hTERT mRNA 和蛋白质的表达,端粒酶的活性也受到抑制

HeLa 细胞经脂质体法分别转染 hTERT-siRNA、作为对照的 β -gal-siRNA、空脂质体。转染之后 48 h,用 RT-PCR 方法来比较各组转染细胞内 hTERT mRNA 的含量,并用实时定量 TRAP 方法比较各组的端粒酶活性。结果表明 hTERT-siRNA 组的 HeLa 细胞较 β -gal-siRNA 及空脂质体组的 HeLa 细胞 hTERT mRNA 的水平明显下降(图 1a),且 hTERT-siRNA 组端粒酶的活性仅为对照组的约 1/3(A 组的相对活性为 24.3%, B、C 组的相对活性均为 64.2%,图 1c),而 B、C 两组 hTERT mRNA 的水平及端粒酶活性相比没有明显差别。转染 pcDNA3/hTERT-myc 真核表达质粒的 HeLa 细胞内可以表达 hTERT-myc 融合蛋白,通过 MYC 抗体的 Western 印迹检测表明共转染 hTERT-siRNA 的 HeLa 细胞与共转染 β -gal-siRNA 及仅共转染脂质体的 HeLa 细胞相比 hTERT-myc 融合蛋白的表达水平明显降低(图 1b)。实验结果表明转染 hTERT-siRNA 后可以特异性地降低 HeLa 细胞内 hTERT mRNA 及蛋白质的表达水平,并且降低端粒酶的活力。

2.2 hTERT-siRNA 转染 HeLa 细胞后明显抑制了其体外生长能力

通过软琼脂克隆形成实验来检验转染 hTERT-siRNA 后对细胞体外生长能力是否有影响。将转染了 hTERT-siRNA、 β -gal-siRNA、空脂质体的 HeLa 细胞接种在 0.3% 的软琼脂凝胶中。培养 15 天后,通过显微镜(10×10)计数每孔 20 个视野的克隆形成总数(图 2 示 3 个复孔的平均值及标准差)。各组克隆数量如下(均数 \pm 标准差),A 组(hTERT-siRNA) (1.00 ± 1.00)个, B 组(β -gal-siRNA) (4.33 ± 0.577)个, C 组(空脂质体) (4.00 ± 1.00)个, A 组与 B、C 两组相比克隆形成的数量明显减少($n=3, P<0.05$, one-way ANOVA),而 B、C 两组之间没有明显差别($n=3, P>0.05$, one-way ANOVA)。实验结果表明,转染 hTERT-siRNA 后,HeLa 细胞的体外肿瘤形成能力受到明显抑制。

2.3 hTERT-siRNA 肿瘤内注射可以抑制裸鼠 HeLa 细胞移植瘤的生长

检验 hTERT-siRNA 的肿瘤内注射能否对裸鼠的 HeLa 细胞移植瘤生长起抑制作用。建立 HeLa 荷瘤鼠模型后用 siRNA-脂质体进行了 4 次肿瘤内注射治疗。实验结束时, hTERT-siRNA 组的肿瘤体积 ($5\ 523.058\pm 42.523$) mm^3 要小于 β -gal-siRNA 组

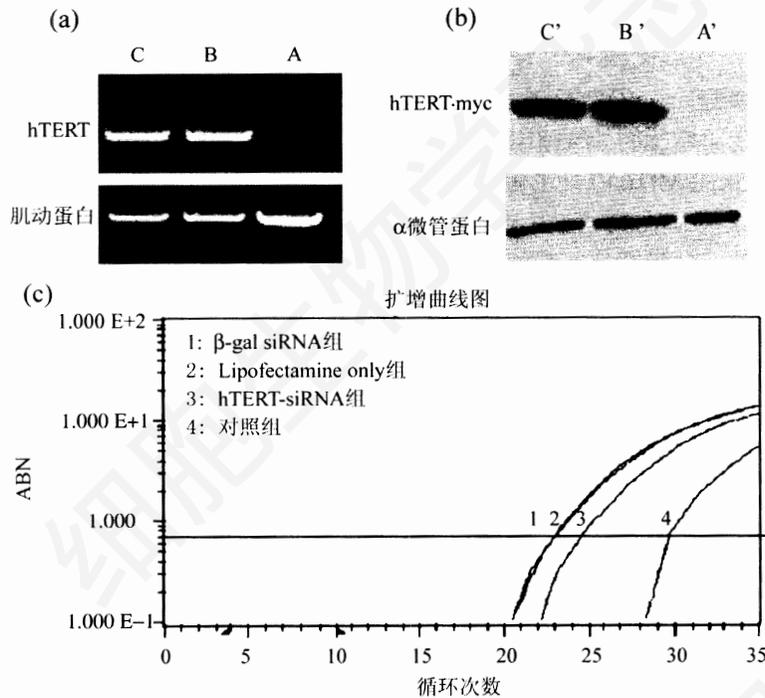


图1 HeLa细胞转染hTERT-siRNA后hTERT的mRNA水平、蛋白质水平及端粒酶活性的改变

(a)RT-PCR: HeLa细胞转染hTERT-siRNA后hTERT mRNA的表达水平明显降低。(b)Western印迹:共转染pcDNA3/hTERT-myc真核表达质粒和hTERT-siRNA/ β -gal-siRNA/脂质体的HeLa细胞,以抗myc抗体检测hTERT-myc融合蛋白的表达情况,显示其表达被明显抑制。(c)实时定量TRAP的扩增曲线图。A:转染hTERT-siRNA的HeLa细胞;B:转染 β -gal-siRNA的HeLa细胞;C:转染空脂质体的HeLa细胞。A':共转染pcDNA3/hTERT-myc和hTERT-siRNA的HeLa细胞;B':共转染pcDNA3/hTERT-myc和 β -gal-siRNA的HeLa细胞;C':共转染pcDNA3/hTERT-myc和脂质体的HeLa细胞。

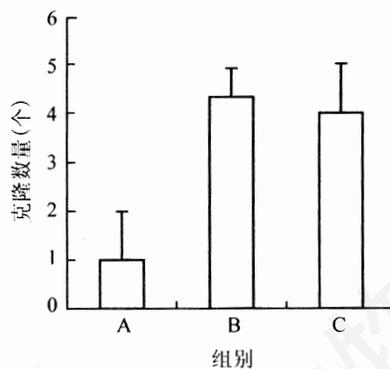


图2 不同处理组在软琼脂中的克隆形成数量(3个复孔平均值)

转染后15天用倒置显微镜(10 \times 10)计数每孔中20个视野的克隆形成总数(图中显示为每组3个孔的平均值及标准差)。A:转染hTERT-siRNA的HeLa细胞;B:转染 β -gal-siRNA的HeLa细胞;C:转染空脂质体的HeLa细胞。

(11 636.53 \pm 1 741.088)mm³($n=4$, $P<0.05$, one-way ANOVA)(图3)。

2.4 hTERT-siRNA转染HeLa细胞的凋亡率明显高于对照组

转染后2天用TUNEL法检测3组细胞的凋亡情况。如表1所示hTERT-siRNA转染HeLa细胞组的凋

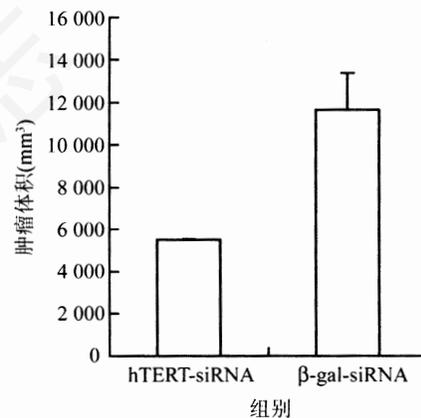


图3 荷瘤裸鼠经siRNA干扰治疗后的肿瘤体积

表1 分别计数每组3个随机视野的凋亡率

分组	凋亡率(%)		
	第一个视野	第二个视野	第三个视野
hTERT-siRNA组	84.2	90.9	85.7
β -gal-siRNA组	3.6	0	4.3
Lipofectamine only组	10	6.3	10.6

亡率明显高于 β -gal-siRNA和Lipofectamine only组。图4示荧光显微镜下每组3个随机视野中的一个。

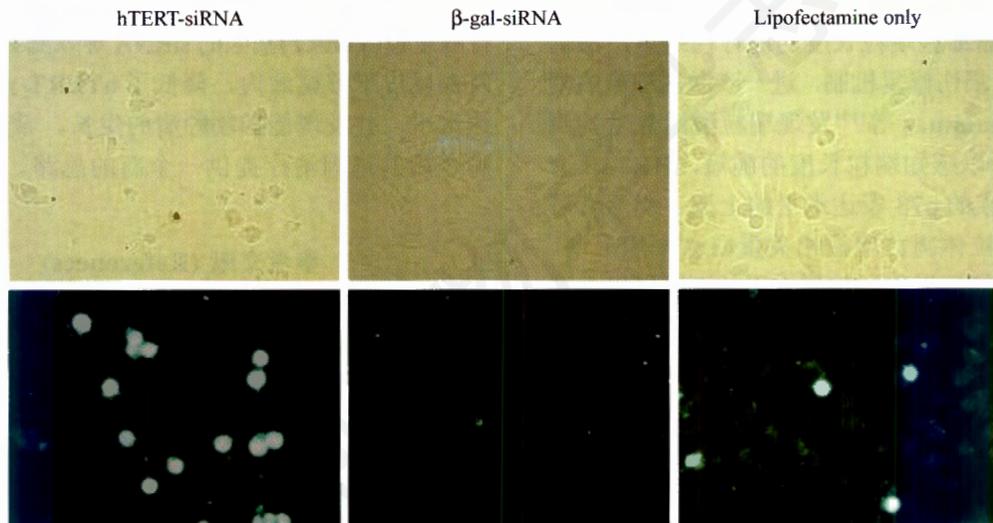


图4 TUNEL法检测的细胞凋亡情况(400×)

上面的图片为明场照片，下面为相对应的荧光场照片

3 讨论

端粒是真核细胞线性染色体末端的特殊结构，是由富含G的DNA重复序列和端粒结合蛋白所构成的一种核蛋白复合体。人和其他哺乳动物的端粒DNA序列由5'-TTAGGG-3'重复序列组成，长度大约为5~15 kb不等^[13]。端粒的存在维持了染色体结构的完整性和稳定性，可防止染色体DNA的降解、重组和末端融合。在大多数体细胞周期的S期中，染色体DNA进行半保留复制，由于子代链5'端RNA引物被降解后不能被重新合成，端粒DNA会不断缩短，每个周期约损失50~65 bp。当端粒的长度缩短到一个临界值后，染色体末端的稳定机制将被破坏，导致细胞生理功能紊乱，进入危象期，最终死亡。多数恶性肿瘤中端粒酶被活化，可以依赖自身RNA模板使端粒得以重新填充，端粒长度不随细胞分裂次数的增加而缩短，甚至还会延长，帮助细胞跨越衰老、危象达到永生性。

研究中我们根据以上原理，利用RNA干扰技术可以高效、特异敲低细胞内特定mRNA水平的特性，探索能否通过导入hTERT特异性siRNA来敲低HeLa细胞内hTERT的水平，从而产生对肿瘤生长的抑制作用。

实验中，RT-PCR和Western印迹结果显示转染hTERT-siRNA可以明显抑制细胞中hTERT mRNA和蛋白质的表达水平。实时定量TRAP(RQ TRAP)方法显示转染hTERT-siRNA细胞的端粒酶活性降低到仅为两个对照组细胞端粒酶活性的约1/3。这一

方面证明了转染hTERT-siRNA可以特异、有效地敲低肿瘤细胞内hTERT mRNA和蛋白质水平，下调端粒酶活性，同时也印证了hTERT mRNA水平与端粒酶活性呈密切正相关的观点^[5~7]。在软琼脂克隆形成实验中，转染hTERT-siRNA组的克隆形成数量明显少于两个对照组，提示hTERT表达水平的降低(伴随端粒酶活性的下降)可以抑制HeLa细胞的体外肿瘤形成能力。在荷瘤裸鼠的siRNA治疗性实验中，转染hTERT-siRNA的裸鼠在实验终点时肿瘤体积小于对照组，提示hTERT表达的下调可以抑制HeLa细胞的体内肿瘤形成能力。为了探索实验中观察到的转染hTERT-siRNA后HeLa细胞发生的表型变化，我们又用TUNEL的方法检测了hTERT-siRNA对于细胞凋亡的影响。实验结果明确提示hTERT-siRNA在转染之后48 h就可以特异性诱导HeLa细胞发生凋亡。

根据已经建立的模型，hTERT mRNA表达水平降低伴随着端粒酶活性的下降，导致肿瘤细胞的染色体不能由于端粒酶对端粒长度的维持作用而得以稳定，肿瘤细胞跨越危象获得永生性的物质基础消失，最终引起肿瘤细胞的死亡。实验中观察到HeLa细胞转染hTERT-siRNA后体外的肿瘤生长和体内肿瘤形成能力都受到明显的抑制，这种表型变化的机制可能包括hTERT水平的降低诱导肿瘤细胞的凋亡或者引起细胞周期的停滞^[14~17]。本研究中用TUNEL的方法证明凋亡机制参与了这种表型的变化。近年来已经有一些研究者发现hTERT表达受抑

制后可以引起细胞的凋亡。推测可能是端粒酶活性的下降引起肿瘤细胞端粒长度的进行性缩短, 激活细胞内的DNA损伤修复机制, 进一步激活细胞的凋亡途径。如Shammas等^[17]发现端粒酶活性受抑制后, HR23B可以感知端粒长度的缩短, HR23B介导属于p53家族的p73表达水平的上调, 而后者可以引起许多线粒体凋亡途径相关蛋白水平的上调。同时Shammas等还发现端粒酶水平的下降可以上调Fas、FasL、caspase-8表达水平, 提示死亡受体相关途径的激活也参与此凋亡过程。目前多数的研究者认为端粒酶相关的凋亡需要由端粒长度缩短介导, 并且需要数周的延迟时间。但实验中我们的实验结果显示hTERT-siRNA转染之后48h就可以引起HeLa细胞发生凋亡。这一发现与Zhang等^[18]的研究结果相似, 作者认为对于端粒长度已经很短的肿瘤细胞, 细胞每次分裂后的生存能力都需要端粒酶活性的支持, 一旦端粒酶活性受到抑制将立即引起细胞凋亡机制的激活。同时, 近年来也有多篇报道提示hTERT存在非端粒延长的作用, 如与线粒体凋亡途径密切相关等^[19,20], 也是实验中观察到现象的可能机制。

本研究应用脂质体转染法成功将针对端粒酶催化亚单位(hTERT)基因的siRNA导入到HeLa细胞内及裸鼠皮下移植瘤内, 降低了hTERT mRNA的表达水平, 并发现能抑制肿瘤的生长。希望能为宫颈癌今后的基因治疗提供一个新思路。

参考文献 (References)

- [1] Blackburn EH. *Nature*, 1991, **350**: 569
- [2] Broccoli D *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 9082
- [3] Counter CM *et al. Blood*, 1995, **85**: 2315
- [4] Wright WE *et al. Dev Genet*, 1996, **18**: 173
- [5] Kirkpatrick KL *et al. Eur J Surg Oncol*, 2001, **27**: 754
- [6] Mergny JL *et al. Nucleic Acids Res*, 2002, **30**: 839
- [7] 王行炜等. *中华医学杂志*, 2001, **81**: 553
- [8] Akiyama M *et al. Cancer Lett*, 2002, **178**: 187
- [9] Hao ZM *et al. World J Gastroenterol*, 2003, **9**: 104
- [10] Sharma HW *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 12343
- [11] Nguyen JT *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 7533
- [12] Kim NW *et al. Nucleic Acids Res*, 1997, **25**: 2595
- [13] Sharpless NE *et al. J Clin Invest*, 2004, **113**: 160
- [14] 张鹏辉等. *癌症*, 2004, **23**: 619
- [15] Zou L *et al. Cancer Chemother Pharmacol*, 2006, **57**: 328
- [16] 赵英等. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, **21**: 524
- [17] Shammas MA *et al. Mol Cancer*, 2005, **4**: 24
- [18] Zhang X *et al. Genes Dev*, 1999, **13**: 2388
- [19] Zhang P *et al. FASEB J*, 2003, **17**: 767
- [20] Xi L *et al. Apoptosis*, 2006, **11**: 789=

Growth Inhibition of Uterine Cervix Cancer Cells (HeLa) by an siRNA Targeting Human Telomerase Catalytic Subunit Gene

Xin Li, Zhi-Wei Shen, Xiao-Rong Xue, Min Liu, Hua Tang*

(Tianjin Life Science Research Center, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China.)

Abstract In this study, we aimed to observe the effect of chemically synthesized human telomerase catalytic subunit (hTERT)-oriented siRNA in cultured cell line and in a mouse xenograft model. Transfected hTERT-siRNA into HeLa cells, then using the RT-PCR, RQ TRAP, Western blot, soft agar colony forming assay, and intratumoral injection of hTERT-siRNA in a mouse xenograft model to investigate the level of hTERT mRNA and protein, the activity of telomerase, energy for growth of HeLa *in vitro* and *in vivo*. The result of RT-PCR, Western blot and RQ TRAP had showed that after transfected with hTERT-siRNA, the level of hTERT mRNA and protein decreased, and the activity of the telomerase was depressed obviously. The colony forming assay showed that energy for growth of hTERT-siRNA group was lower than that of the two control groups. The animal experiments showed that the cancer growth of hTERT-siRNA group was depressed. TUNEL assay showed an increased apoptosis rate in hTERT-siRNA group. Our study have showed that hTERT-siRNA can inhibit the expression of hTERT and depress the growth of the HeLa cells by inducing apoptosis *in vitro* and *in vivo*.

Key words telomerase; RNAi; human telomerase catalytic subunit; HeLa

Received: March 27, 2006 Accepted: August 14, 2006

This work was supported by the Tianjin Municipal Science & Technology Commission (No.0231115118)

*Corresponding author. Tel: 86-22-23542603-0, E-mail: htang2002@yahoo.com