

小鼠 EL-4 淋巴瘤细胞中靶向 *TERT* 的 RNA 干涉

张敏 郭欣欣 奚耕思*

(陕西师范大学生命科学院, 西安 710062)

摘要 为了初步研究小鼠肿瘤细胞端粒酶催化亚基 *mTERT* 的表达抑制及其对细胞增殖的影响, 本研究应用 RNA 干涉方法, 将体外转录合成的靶向 *mTERT* 的短发夹 RNA (shRNA) 转染至表达 *mTERT* 的小鼠 EL-4 淋巴瘤细胞。RT-PCR 和 Western blot 检测结果显示, 靶向 *mTERT* 的 shRNA 转染到小鼠 EL-4 细胞后, 有效抑制了细胞中内源性 *mTERT* mRNA 和蛋白的表达。MTT 实验显示, 转染后细胞数量未见明显差异, 可能缘于 *TERT* 抑制导致的表型滞后现象。

关键词 端粒酶催化亚基; RNA 干涉; 短发夹 RNA

端粒酶是一种核糖核蛋白复合体, 其可利用自身的 RNA 模板合成末端 DNA, 并添加到染色体末端以补偿细胞分裂时染色体末端的缩短, 从而使细胞获得无限增殖能力。大多数正常细胞不含有端粒酶活性, 而少数正常细胞(如生殖细胞系和造血细胞系)及绝大多数恶性肿瘤细胞(约 90%)可逃逸端粒缩短的临界点, 因其含有活化的端粒酶系统, 通过对端粒的维持和保护赋予细胞无限增殖的能力^[1,2]。端粒酶催化亚基(telomerase reverse transcriptase, *TERT*)是端粒酶的组分之一, 与端粒酶的表达高度正相关, 是端粒酶活性的主要决定因素, 同样与肿瘤的发生发展有着密切关系^[3-6]。因此, 在肿瘤细胞中通过抑制 *TERT* 的表达降低端粒酶活性, 进而抑制肿瘤细胞增殖或诱导其凋亡, 成为肿瘤基因治疗的重要策略之一, 目前许多学者正在致力于这方面的研究^[7-9], 同时, RNA 干涉作为一项已经在多个领域展现了巨大应用前景的新兴技术, 也越来越多地被应用到以端粒酶及其 *TERT* 为靶点的肿瘤基因治疗研究中, 目前推测细胞增殖与端粒酶激活享有同一信号激活通道, 但并不清楚端粒酶在细胞增殖中的具体调控机制^[10-15], 同时有关小鼠 EL-4 淋巴瘤细胞端粒酶及其 *mTERT* 的 RNA 干涉研究也尚未见报道。本研究以表达 *mTERT* 的小鼠 EL-4 淋巴瘤细胞为材料, 应用 RNA 干涉方法, 以阳离子脂质体为转染试剂, 将体外转录合成的特异的 shRNA 转染至小鼠 EL-4 细胞, 并于 48 h 和 96 h 分别收获细胞, 以 RT-PCR 和 Western blot 方法分别从 mRNA 和蛋白水平检测细胞内源性 *mTERT* 转录和蛋白表达的受抑制情况。同时进行 MTT 实验初步探讨了靶向 *mTERT* 的 RNA 干涉能否有效地导致细胞死亡(或凋亡)。这些将为进一步研究肿瘤细胞内 *TERT*

基因的调控机制和以端粒酶及其催化亚基为靶点的肿瘤基因治疗奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

小鼠 EL-4 淋巴瘤细胞, 购于上海生化细胞所细胞库。

1.2 实验方法

1.2.1 shRNA 的体外转录合成

1.2.1.1 靶向 *mTERT* 的 DNA 模板设计 设计的 DNA 模板包含的序列应为: 19~29 个碱基长度的目的 mRNA 靶序列; 形成发夹的 Loop 序列; 19~29 个碱基长度的目的 mRNA 靶序列的反向互补序列; T7 Promoter Oligo 3' 端部分互补序列; 5' 端加上 AA。并将选中的 shRNA 序列打乱作为负对照。依照以上原则设计的 DNA 模板(E)以及阴性对照(N)序列为: E: 5'-AAG GTA CAA AGA GGC ATC TGA GTC TTG CTT CAC TCA GAT GCC TCT TTG TAC CTA TAG TGA-3', N: 5'-AAG GAC TAC CGT TGT TAT AGG TGC TTG CTT CCA CCT ATA ACA ACG GTA GTC CTA TAG TGA-3'。

1.2.1.2 靶向 *mTERT* 的 shRNA 合成 合成 DNA 模板: 以上模板序列及其阴性对照序列均经过 BLAST 搜索, 在 EST 数据库查询, 证实与其它基因序列无同源性, 并委托上海生工生物工程公司合成。

退火反应: 合成的模板 DNA 溶解为 50 pmol/ μ l,

收稿日期: 2010-03-05 接受日期: 2010-05-21

陕西省自然科学基金(No.2004C107)和陕西师范大学重点科研项目资助

* 通讯作者。Tel: 029-85310266, E-mail: xigengsi@snnu.edu.cn

并建立 10 μl 退火反应体系: T7 Promoter Oligo 1.5 μl ; 模板 DNA 1 μl ; 5 \times annealing buffer 2 μl ; RNase-free water 5.5 μl , 混合液 75 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 min;

补平反应: 退火反应液 10 μl ; 10 \times Klenow fragment exo-fill-in buffer 2 μl ; dNTP mix(2.5 mmol/L each dNTP) 2 μl ; Klenow fragment exo-DNA polymerase(20 U/ μl) 1 μl ; RNase-free water 5 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min; 70 $^{\circ}\text{C}$ 灭活酶 10 min;

体外转录反应: RNase-free water 2.8 μl ; 补平反应液 4 μl ; AmpliScribe T7-flash 10 \times reaction buffer 2 μl ; NTP mix (25 mmol/L each dNTP) 7.2 μl ; 0.1 mol/L DTT 2 μl ; AmpliScribe T7-flash enzyme solution 2 μl , 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3~90 min;

shRNA 纯化: RNase-free DNaseI 1 μl 消化体外转录反应液 20 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min; 70 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min 灭活酶; 酚: 氯仿抽提; shRNA 沉淀; 20 μl 5 \times annealing buffer 和 80 μl RNase-free 水溶解 shRNA; 进一步用 MicroSpin™ G-25 柱子(Amersham)脱盐纯化, 离心; 紫外分光光度计进行 shRNA 定量。

1.2.2 靶向 *mTERT* 的 shRNA 对 EL-4 细胞的转染实验组(E)、阴性对照组(N)及空白对照组(未转染组, C), 共 3 组样本。

转染前一天进行细胞传代, 将与无血清培养液混合的 25 μl shRNA 溶液加入 siIMPORTER 稀释液中, 室温孵育 5 min, 以形成 shRNA/lipid 复合物; 离心细胞, 弃去培养液, 再加适合的培养液使细胞终浓度达到 10^6 cells/ml; 6 孔板中, 各加 930 μl 以上细胞和 shRNA/lipid 复合物至每孔, 轻轻混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养直至收获细胞。

空白对照组(C)不加 shRNA/lipid 复合物, 其它步骤相同; 每组样本设两孔重复。

1.2.3 RT-PCR 检测 转染 48 h 后收获细胞, 离心, 弃去培养液。Trizol 法抽提总 RNA, 紫外分光光度计测 RNA 纯度及浓度。逆转录, PCR 反应: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 25 个循环(94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 59 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s); 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。同时逆转录扩增 β -actin 为内参照。 *mTERT* 引物1: 5'-TCA AGA GCA GTA GTC GCC AG-3', 引物2: 5'-TCT CGG GAC AGG ATA GCA TCT-3', *mTERT* RT-PCR 产物长度为 131bp; β -actin 引物1: 5'-CCT GTA CGC CAA CAC AGT GC-3', 引物2: 5'-ATA CTC CTG CTT GCT GAT CC-3'。引物委托上海生工生物工程公司合成。

琼脂糖凝胶电泳, 天能凝胶成像系统扫描, 图像分析软件检测条带灰度值, 以 *mTERT* 与 β -actin 的

灰度值之比(*mTERT*/ β -actin)表示 *mTERT* mRNA 的相对含量, SPSS11.0 进行方差分析检验。

1.2.4 Western blot 检测 转染 96 h 后收获细胞, 核蛋白抽提, SDS-PAGE 电泳, 蛋白质转移 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 膜封闭和抗体孵育; 结果以 X 光胶片曝光并显影, 图片扫描, 天能图像分析系统测定每个特异条带的光密度值。

1.2.5 MTT 实验 接种细胞, 每孔 100 μl , 培养 48 h; 每组设 4 个复孔, 另外加空白对照; 去培养液, 每孔加 90 μl 无血清培养液及 10 μl MTT (5 mg/ml), 培养 4 h, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育; 每孔加 DMSO 10 μl , 摇床振荡 10 min, 至完全溶解; 酶标仪 570 nm 处读吸光度值 A, 应用 SPSS11.0 的 one-way ANOVA 对重复实验中得到的 A 值进行统计学分析。

2 结果

2.1 RT-PCR 结果

琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。应用天能凝胶成像系统进行电泳条带的灰度值测定, 以 *TERT* 与内参照 β -actin 的灰度值之比表示 *mTERT* 表达的相对含量(表 1)。根据实验组(E)与阴性对照组(N)的 *TERT*/ β -actin 值绘制柱状图(图 2)。根据抑制率 = $1 - (E_{TERT/\beta\text{-actin}} / N_{TERT/\beta\text{-actin}})$ 计算三次重复转染实验的 RT-PCR 结果的抑制率, 得到平均抑制率为 44.07%(表 1)。结果表明, 应用设计合成的 shRNA 转染小鼠 EL-4 淋巴瘤细胞 48 h 后, 有效抑制了细胞内源性 *mTERT* mRNA 的转录表达。

2.2 Western blot 结果

Western blot 结果见图 3, 根据各组条带光密度值绘制柱状图(图 4)。根据抑制率 = $1 - (E/N)$, 计算转染后 *TERT* 蛋白的抑制率为 49%。结果表明, 应用 *mTERT* 特异的 shRNA 转染小鼠 EL-4 淋巴瘤细胞

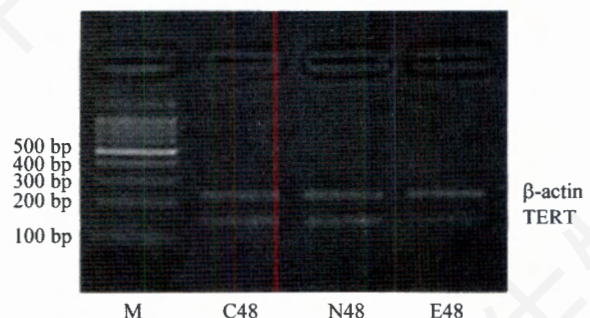


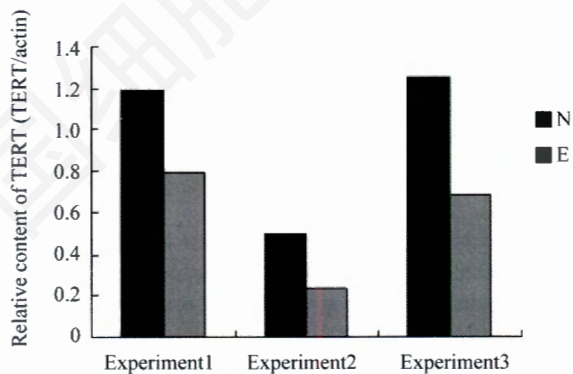
Fig.1 The results of RT-PCR experiments

M:marker; C48,N48,E48: blank control, negative control and experimental group at 48 h after transfection.

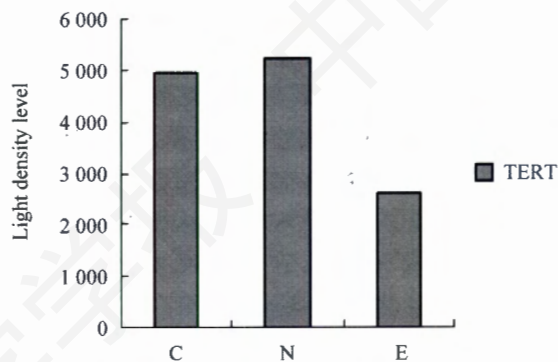
Table 1 Repressive efficiency of RNA interference

	E1	N1	E2	N2	E3	N3
TERT	875	886	130	280	1 066	1 552
Actin	1 103	744	566	565	1 553	1 240
TERT/actin	0.7933	1.1909	0.2297	0.4956	0.6864	1.252
Suppression ratio	33.38%		53.65%		45.17%	
Av.suppression ratio			44.07%			

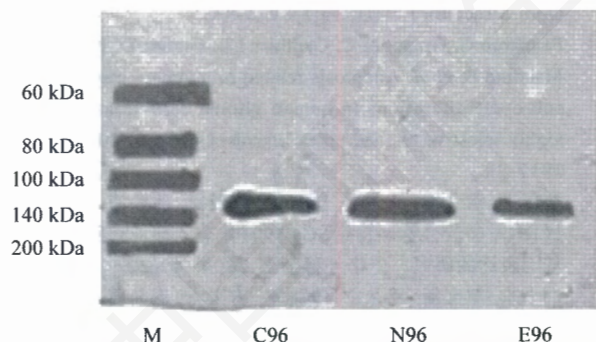
E1,N1: experimental group and negative control after first transfection; E2,N2: experimental group and negative control after second transfection; E3,N3: experimental group and negative control after third transfection.

**Fig.2** The relative content of TERT in reduplicate transfection experiments

N: negative control; E: experimental group.

**Fig.4** Western blot result of light density level at 96 h after transfection

C: blank control; N: negative control; E: experimental group.

**Fig.3** The results of Western blot experiment

M: marker; C96,N96,E96: blank control, negative control and experimental group at 96 h after transfection.

96 h 后, 通过抑制细胞内源性 *mTERT* mRNA 的转录, 进而抑制了细胞内源性 TERT 蛋白的表达, *mRNA* 转录和蛋白质翻译水平的抑制程度接近。

2.3 MTT 结果

MTT 实验中各组 A 值见表 2。统计学分析表明, 实验组与阴性对照组之间未见显著性差异($P=0.085$)。

3 讨论

Kosciolek 等^[16]利用 RNAi 技术, 特异性合成分别靶向端粒酶 TR 和 TERT 组分的 siRNA, 以评估人多种癌细胞中 siRNA 抑制端粒酶活性的能力, 结果显示其在 HCT-15、Hela、NclH23、A431 等癌细胞中

Table 2 The average A levels in MTT experiments

Duplicate sample	E1	N1	E2	N2	E3	N3
1	0.712	0.628	0.724	0.720	0.687	0.777
2	0.638	0.755	0.728	0.676	0.654	0.783
3	0.673	0.684	0.682	0.731	0.723	0.766
4	0.674	0.775	0.660	0.623	0.617	0.697
Average A	0.6743	0.7105	0.6985	0.6875	0.6702	0.7557

E1,N1: experimental group and negative control after first transfection; E2,N2: experimental group and negative control after second transfection; E3,N3: experimental group and negative control after third transfection.

抑制了端粒酶表达,并且这种抑制是剂量依赖性的。在人 HCT-15 细胞中,转染 *hTERT* 特异的 siRNA 44 h 后收集细胞,当浓度为 142 nmol/L 时抑制率最高,为 65%,而对于人纤维肉瘤 HT1080 细胞,当 siRNA 浓度一定时(142 nmol/L),转染 22 h 后的抑制率为 40%,高于 46 h 的抑制率。表明 siRNA 对端粒酶的抑制是剂量依赖性的,并与转染后细胞的收集时间有关。张鹏辉等^[17]应用 RNAi 技术进行了靶向 *hTERT* 基因的治疗肝癌的研究,定性地表明 shRNA 介导的 RNAi 能抑制 *hTERT* 的 mRNA 和蛋白表达。Sciamanna 等^[18]应用 RNAi 技术对黑色素瘤和前列腺癌细胞系进行 *TERT* 的抑制,结果发现其可抑制细胞增殖。我们在小鼠 EL-4 淋巴瘤细胞中的结果同样显示,设计合成的 *mTERT* 特异的 shRNA 转染到小鼠淋巴瘤细胞后,能有效抑制细胞中内源性 *mTERT* mRNA 和蛋白的表达,导致靶基因部分沉默,在 mRNA 和蛋白水平的平均抑制率分别为 44% 和 49%。用 RT-PCR 检测到转染 shRNA 后的 mRNA 的表达量,包括了未被转染细胞中的 RNA 的表达量和被转染细胞中靶基因表达抑制后残余的 RNA 量,显示其被转染细胞和未被转染细胞都可能存在目的基因的转录。

本研究应用 MTT 方法,检测了 RNA 干涉的和未受干涉的小鼠 EL-4 细胞数量之间的差异,结果显示各组 A 值之间未见显著性差异,表明靶向 *mTERT* 特异的 shRNA 转染到细胞后,虽然内源的 *mTERT* mRNA 转录和蛋白表达均受到明显抑制,但这种抑制至少在 MTT 方法检测时没有导致明显的细胞死亡(或凋亡)。Masutomi 等^[19]在利用功能缺失的突变型 *TERT*(DN-*hTERT*)和 *hTERT* 特异的 shRNA,对两种表达 *TERT* 的人纤维原细胞 BJ 和 WI-38 进行 *hTERT* 抑制时,并没有检测到明显的细胞死亡,这与我们的结果相一致,他们同时也发现抑制后的细胞延缓进入 S 期,并且聚积于 G₂/M 期。Zhang 等^[20]证明向 A431 和 293 细胞引入外源的突变 *hTERT* 可以抑制细胞内的端粒酶活性,还发现突变的 *TERT* 在 24 h 开始在细胞中聚集,同样直到 96 h 后还未观察到升高的细胞凋亡率。根据端粒酶及其催化亚基 *TERT* 的普遍性功能,可以添加端粒重复序列到染色体末端以维持细胞的增殖或永生,我们推测 *TERT* 的表达抑制可能会影响细胞生长和增殖的速度,使得细胞停滞于细胞周期的某一时相,但能否导致细胞凋亡却依赖于端粒长度,由于 *TERT* 抑制可能存在表型滞后现象^[20],在检测时多数细胞的端粒还没有缩短到促发凋亡的临界长度,导致随后的细胞凋亡反应还尚未启动。

可见 *TERT* 的表达抑制对于细胞增殖的影响并不是酶促型的,而是依赖于端粒长度^[19]。因此尚需做进一步研究以分析内源性 *TERT* 表达抑制后对端粒长度、肿瘤细胞周期及细胞增殖可能产生的影响。

参考文献(References)

- Chan SW, Blackburn EH. New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene* 2002; 21(4): 553-63.
- Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33(5): 787-91.
- Orlando C, Gelmini S, Selli C, Pazzagli M. Telomerase in urological malignancy. *J Urol* 2001; 166(2): 666-73.
- Chen W, Xiong X, Zhou H, Zhou Q. Expression of telomerase activity, telomerase RNA component and telomerase catalytic subunit gene in lung cancer. *Chin Med J* 2002; 115(2): 290-2.
- Takahashi S, Kitamoto M, Takaishi H, Aikata H, Kawakami Y, Nakanishi T, et al. Expression of telomerase component genes in hepatocellular carcinomas. *Eur J Cancer* 2000; 36(4): 496-502.
- Saretzki G, Petersen S, Petersen I, Kolble K, von Zglinicki T. *hTERT* gene dosage correlates with telomerase activity in human lung cancer cell lines. *Cancer Lett* 2002; 176(1): 81-91.
- 杜辉, 辛晓燕, 王健. *hTERT* 基因反义核酸对 8910 卵巢细胞端粒酶活性的影响. *第四军医大学学报* 2000; 21(3): 366.
- Neidle S, Parkinson GN. The structure of telomeric DNA. *Curr Opin Struct Biol* 2003; 13(3): 275-83.
- Pennarun G, Granotier C, Gauthier LR, Gomez D, Hoffschir F, Mandine E, et al. Apoptosis related to telomere instability and cell cycle alterations in human glioma cells treated by new highly selective G-quadruplex ligands. *Oncogene* 2005; 24(18): 2917-28.
- 马晋平, 詹文华, 汪建平, 彭俊生, 高劲松, 殷勤伟. 小分子干扰 RNA 特异性抑制胃癌 SGC7901 细胞人端粒酶催化亚单位基因表达的研究. *中华外科杂志* 2004; 42(22): 1372-6.
- 卢小东, 覃文新, 潘东宁, 李锦军, 万大方, 温传俊, 等. DNA 载体途径的 RNA 干扰技术对肝癌细胞系 HCCLM3 端粒酶活性的抑制作用. *中华医学杂志* 2004; 84(16): 1381-5.
- Wang Y, Duan HG, Chen SM, Xiao BK, Cheng J, Tao ZZ. Effect of RNA interference targeting human telomerase reverse transcriptase on telomerase and its related protein expression in nasopharyngeal carcinoma cells. *J Laryngol Otol* 2007; 121(5): 476-82.
- Chen D, Huang H, Pan C, Wang J, Zhang B, Wang A. Antitumor effects of targeting *hTERT* lentivirus-mediated RNA interference against KB cell lines. *Oncol Res* 2009; 17(11-12): 621-30.
- Shen Y, Zhang YW, Zhang ZX, Miao ZH, Ding J. *hTERT*-targeted RNA interference inhibits tumorigenicity and motility of HCT116 cells. *Cancer Biol Ther* 2008; 7(2): 228-36.
- Luo Y, Yi YF, Yao ZW. Growth arrest in ovarian cancer cells by *hTERT* inhibition short-hairpin RNA targeting human telomerase reverse transcriptase induces immediate growth inhibition but not necessarily induces apoptosis in ovarian cancer cells. *Cancer Invest* 2009; 27(10): 960-70.

- 16 Kosciolk BA, Kalantidis K, Tabler M, Rowley PT. Inhibition of telomerase activity in human cancer cells by RNA interference. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 209-16.
- 17 张鹏辉, 涂植光, 杨明清, 黄文方, 邹琳, 周亚莉. RNA 干扰技术靶向 *hTERT* 基因治疗肝癌的实验研究. *癌症* 2004; 23(6): 619-25.
- 18 Sciamanna I, Landriscina M, Pittoggi C, Quirino M, Mearelli C, Beraldi R, *et al.* Inhibition of endogenous reverse transcriptase antagonizes human tumor growth. *Oncogene* 2005; 24: 3923-31.
- 19 Masutomi K, Yu EY, Khurts S, Ben-Porath I, Currier JL, Metz GB, *et al.* Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* 2003; 114: 241-53.
- 20 Zhang XL, Mar V, Zhou W, Harrington L, Robinson MO. Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. *Genes Dev* 1999; 13: 2388-99.

mTERT-targeted RNA Interference in EL-4 Lymphoma Cells of Mice

Min Zhang, Xin-Xin Guo, Geng-Si Xi*

(College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract In order to investigate the expression inhibition and gene regulation of telomerase reverse transcriptase(TERT) in tumour cells of mice, designed short hairpin RNA targeted *mTERT* was synthesized and transfected into EL-4 lymphoma cells of mice through cationic liposomes. Further analysis of RT-PCR and Western blot indicated that the *mTERT* specialized shRNA effectively repressed the expressions of endogenous *mTERT* mRNA and protein after transfection, which made the targeted genes partially silent. MTT experiments demonstrated that the amount of EL-4 cells did not show significant difference between the sample treated with *TERT* specialized shRNA and the control, which may due to the phenotypic lag phenomenon caused by the inhibition of telomerase.

Key words telomerase reverse transcriptase; RNA interference; short hairpin RNA

Received: March 5, 2010 Accepted: May 21, 2010

This work was supported by Shaanxi Provincial Natural Science Foundation (No.2004C₁07) and Science Research Foundation of Shaanxi Normal University

*Corresponding author. Tel: 86-29-85310266, E-mail: xigengsi@snnu.edu.cn