

端粒酶 RNA 反义基因对肝癌细胞的影响

金礼吉 戴峰 黄雯 安利佳
(大连理工大学生物工程系 大连 116012)

端粒(telomere)是位于真核细胞线性染色体末端的一种特殊结构,由端粒 DNA 和端粒蛋白质组成。它在染色体的定位、复制、保护和控制细胞生长寿命等方面起重要作用^[1,2]。端粒酶(telomerase)是一种以自身 RNA 为模板合成端粒 DNA 的核糖核蛋白复合物。端粒酶 RNA 成分决定着端粒重复序列的合成并参与端粒酶的活化^[3,4]。端粒酶之所以能成为肿瘤治疗的新靶点,在于大多数正常组织中没有活性或活性极低,而在恶性肿瘤的发生、发展中起着关键的作用^[5,6]。利用反义核酸技术,抑制端粒酶活性以促进肿瘤细胞凋亡已屡见报道。本研究将人端粒酶 RNA(hTR)组分的 cDNA 反向插入逆转录病毒载体 pLNCX,经脂质体介导转染人肝癌 SMMC-7721 细胞,以观察反义 hTR 基因的表达对人肝癌 SMMC-7721 细胞的端粒酶活性和细胞生长等方面的影响。

材料和方法

一、材料

人宫颈癌细胞系(HeLa 细胞),人肝癌细胞系(SMMC-7721)。购自中国科学院细胞库。DH5 α ,逆转录病毒载体为本室保存。PCR 试剂盒、反转录 PCR 扩增试剂盒、DNA 连接试剂盒和限制性内切酶购自宝生物大连有限公司。TRIzolTMReagent、lipofectamine、geneticin 购自 GIBCO BRL 公司。

二、方法

1. 端粒酶 RNA 组分的克隆与反义表达质粒的构建
收集 1×10^7 HeLa 细胞,按 TRIzolTMReagent 试剂说明提取总 RNA,经逆转录合成 cDNA,以引物 P1(5'-CCATC-GATGGGTTGCGGAGGGTGGGCGCTG-3')和 P2(5'-CCAA-GCTTGTGTGAGCCGAGTCTGGGTG-3')进行 PCR 扩增,其扩增长度为 450bp。循环参数是:预变性 96℃ 2 分钟,变性 94℃ 30 秒;退火 55℃ 1 分钟;延伸 72℃ 1 分钟,循环 30 次,后延伸 72℃ 2 分钟。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,回收。回收的 PCR 产物和逆转录病毒载体用 Cla I 和 Hind III 双酶切, T₄DNA 连接酶连接,组成 hTR 基因的反义表达质粒,命名为 pLNCX-hTR。质粒 pLNCX-hTR 转化到 DH5 α 感受态菌,通过 PCR、酶切和测序鉴定重组。

2. pLNCX-hTR 质粒转入肝癌细胞
pLNCX-hTR 质粒经 lipofectamine 介导转染肝癌细胞。转染后 36 小时,加入 geneticin 至终浓度 600 μ g/ml 筛选细胞。筛选 14 天,挑出耐受新霉素而能生长的阳性克隆命名为 pLNCX-hTR⁺,此时空白对照细胞全部死亡。geneticin 终浓度改用 300 μ g/ml 扩增培养阳性克隆 5 周后,用于以下实验。空质粒载体 pLNCX 转化肝癌细胞的阳性克隆命名为 pLNCX-hTR,以此作为对照。

3. Southern blot 分析
反义 hTR 基因克隆在逆转录病毒载体的多克隆位点上。因逆转录病毒载体的选择基因 Neo 两侧没有合适的酶切位点,所以提取的细胞基因组 DNA 未经酶切,直接转移至尼龙膜上,以大小为 744bp 的 Neo 基因片段作为探针进行杂交。

4. TRAP-PCR 检测端粒酶活性
用 TRAP-PCR 法检测细胞的端粒酶活性。反应产物经 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染观察。

5. 细胞生长倍增时间的测定
接种细胞 (1×10^4 / 孔)于 24 孔板中,每隔 24 小时对每种细胞的 3 个孔进行消化计数,求平均值。细胞倍增时间计算方法:培养 96 小时后计数的细胞数 = 接种的细胞数 $\times 2^n$ (n = 细胞 96 小时的增殖倍数),细胞倍增时间(小时) = 96/n

6. 分析细胞凋亡
A. 流式细胞技术检测:收集 1×10^6 pLNCX-hTR⁺ 细胞,70% 乙醇固定,PI 染色,流式细胞仪检测细胞凋亡指数。B. 染色体 DNA 片段分析:收集 1×10^7 细胞,提取 DNA,经琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察,照相。

结 果

1. 重组质粒 pLNCX-hTR 的鉴定

质粒 pLNCX-hTR 用 Cla I 和 Hind III 双酶切(见图 1)及测序(见图 2)。结果表明反义 hTR 基因正确插入逆转录病毒载体,没有发生碱基突变。

2. 转染肝癌细胞的 Southern 杂交鉴定

质粒 pLNCX-hTR 作为阳性对照,未转染的肝癌细胞基因组 DNA 作为阴性对照进行杂交。结果显示转染的肝癌细胞有杂交带,而未转染的肝癌细

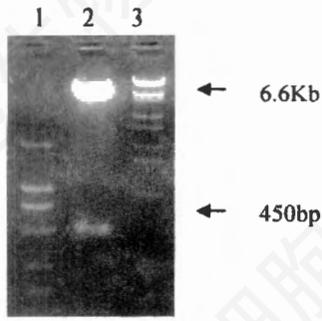


图1 重组质粒的酶切图

1. pLNCX-hTR⁻/Cla I + Hind III; 2. λ-DNA EcoT14I digest.

Hind III

GACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGGCCCCAAGCTTGCATG
 TGTGAGCCGAGTCCCTGGGTGCACGTCCCACAGCTCAGGGAATC
 GCGCCGCGCGGGGACTCGCTCCGTTTCTCTTCTGCGGCT
 GAAAGCCTGAACCTCGCCTCGCCCCGAGAGACCGCGGCT
 GACAGAGCCAACTCTTCGCGGTGGCAGTAGGTGCCTCCGGAGA
 AGCCCCGGGCCGACCGCGGCTCCAGGCGGGTTCGGGGCTG
 GGCAGGCGACCCGCGCAGGTCCCGGGAGGGGCGAACGGCC
 AGCAGCTGACATTTTTTGTGTTGCTCTAGAATGAACGGTGAAG
 GCGGCAGGCCGAGGCTTTTCCGCCGCTGAAAGTCAGCGAGAA
 AAACAGCGCGGGGAGCAAAAGCACGGCGCTACGCCCTTCT
 CAGTTAGGGTTAGACAAAAATGGCCACCACCCCTCCAGGCC
 CACCCTCGCAACCCATCGATAAAATAAAAGATTTTATTAGT
 CTCAGAAAAGGG Cla I

图2 pLNCX-hTR 重组质粒的核苷酸序列

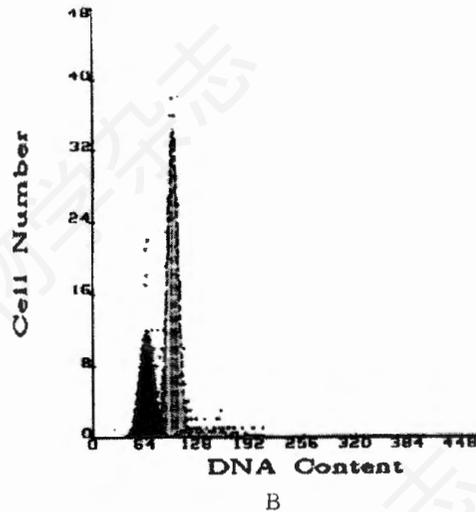
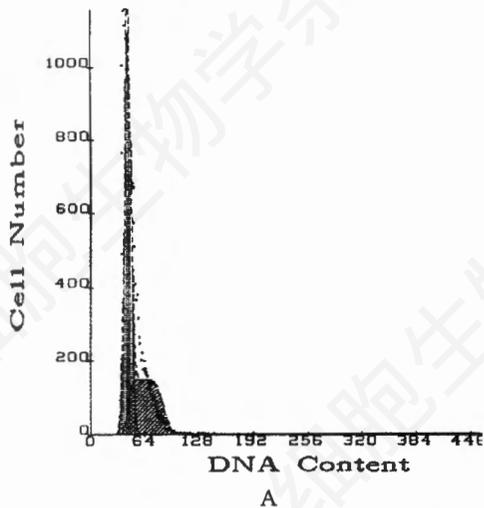


图5 细胞凋亡指数

A. pLNCX-hTR⁻细胞 B. pLNCX-hTR⁺细胞。

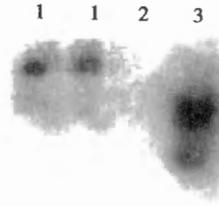


图3 Southern 杂交

1. 转染细胞基因组 DNA; 2. 未转染细胞基因组 DNA; 3. pLNCX-hTR⁻质粒 DNA。

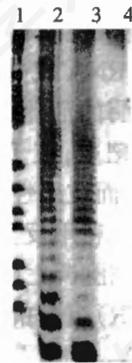


图4 检测端粒酶活性结果

1. pBR322 Hea III Marker; 2. 阳性对照 (HeLa 细胞); 3. pLNCX-hTR⁻细胞; 4. pLNCX-hTR⁺细胞。

胞没有杂交带(见图3),说明反义 hTR 基因已整合到肝癌细胞基因组当中。

3. 转染前后肝癌细胞端粒酶活性变化

检测端粒酶活性结果表明 pLNCX-hTR⁻为阳性,而 pLNCX-hTR⁺为阴性(见图4)。说明 hTR 反

义基因能够有效地抑制端粒酶活性。

4. 细胞生长与凋亡分析

pLNCX-hTR⁺细胞较 pLNCX-hTR⁻细胞生长明显缓慢,pLNCX-hTR⁻细胞的倍增时间为 30-33 小时,而 pLNCX-hTR⁺细胞倍增时间延长至 68-

1 2 3



图6 基因组DNA电泳图

1. DL 2000 DNA Marker; 2. pLNCX-hTR⁺细胞;
3. pLNCX-hTR⁻细胞。

72小时。说明对肝癌细胞的生长有明显的抑制作用。流式细胞术分析 pLNCX-hTR⁺细胞,发现一个亚二倍体的凋亡峰,凋亡细胞占细胞总数的30.2%。G₁期细胞比例明显增加,S期细胞比例明显减少(见图5)。琼脂糖凝胶电泳肝癌-hTR⁺细胞的基因组DNA可见到典型的梯状条带(见图6)。

讨 论

现已知人端粒酶有三个主要组成成分:端粒酶RNA(human telomerase RNA component, hTR)、端粒酶催化亚基(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)和端粒酶相关蛋白 TP1/TLP1。hTR和hTERT基因的克隆^[3,7,8],为利用反义技术抑制端粒酶活性,探索肿瘤治疗提供了新的途径。端粒酶RNA作为合成端粒DNA的模板是组成端粒酶的必要成分^[3],尽管已经证明hTR表达与端粒酶活性表达不一致^[9,10],但针对hTR基因设计的反义核酸、肽核酸等都能显著抑制端粒酶活性^[11,12]。因此hTR是抑制端粒酶活性非常好的靶基因之一。

为探索抗端粒酶对肝癌治疗的意义,我们将端粒酶RNA反义基因导入人肝癌SMMC-7721细胞中。结果表明反义hTR基因的表达显著抑制细胞的增殖,延长细胞倍增时间,能够有效地封闭或抑制

端粒酶活性。流式细胞术进一步分析细胞周期显示,细胞出现明显的亚二倍体凋亡峰,琼脂糖凝胶电泳可见典型的DNA Ladder;而对照组细胞未见上述现象。表明反义hTR不仅能够抑制端粒酶活性,还能抑制肿瘤细胞的增殖,诱导肝癌细胞的程序性死亡。

抑制端粒酶活性进行抗肿瘤治疗具有广谱法,但也存在有待解决的问题。除肿瘤细胞中端粒酶活性高表达外,在正常人类生殖细胞以及造血干细胞、外周血白细胞与淋巴细胞、肠黏膜基底干细胞、胚胎体细胞、毛发、皮肤、子宫内膜等具有再生能力的细胞中,均可检测到不同水平的端粒酶活性^[13]。因此端粒酶抑制剂对这些具有再生能力的细胞可能产生的毒副作用有待于今后进一步的研究。

摘 要

用RT-PCR的方法钓取端粒酶RNA基因的cDNA,并将其反向插入到逆转录病毒载体pLNCX上,构建hTR基因的反义表达质粒。将质粒经脂质体介导转染人肝癌SMMC-7721细胞中表达。结果表明hTR反义基因的表达有效地封闭或抑制肝癌细胞的端粒酶活性,抑制细胞的生长和增殖,延长细胞的倍增时间并促进细胞凋亡。

关键词:端粒酶 细胞凋亡 hTR

参 考 文 献

- [1] Chong, L. et al., 1995, *Science*, **270**:1663-1667.
- [2] Harley, C. B. et al., 1990, *Nature*, **345**:458-460.
- [3] Feng, J. et al., 1995, *Science*, **269**(5228):1236-1241.
- [4] Rhyu, M. S., 1995, *Natl Cancer Inst. J*, **87**:884-894.
- [5] Blasco, M. A. et al., 1997, *Cell*, **91**:25-34.
- [6] Lundblad, V. et al., 1996, *Cell*, **87**(1):369-375.
- [7] Sambrook, J. et al., 1989, *Molecular Cloning*. New York.
- [8] Meyerson, M. et al., 1997, *Cell*, **90**:785-795.
- [9] Nakamura, T. M. et al., 1997, *Science*, **277**:955-959.
- [10] Avilion, A. A. et al., 1996, *Cancer Res*, **56**(3):645-650.
- [11] Blasco, M. A. et al., 1996, *Nat Genet*, **12**(2):200-204.
- [12] Kondl, S. et al., 1998, *Oncogene*, **16**(4):3323-3330.
- [13] Norton, J. C. et al., 1996, *Nature Biotech*, **14**(5):615-619.

THE EFFECT OF HUMAN TELOMERASE ANTISENSE RNA ON LIVER CANCER CELLS

JIN Li Ji DAI Feng HUANG Wen AN Li Jia

(Department of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116012)

ABSTRACT

The cDNA of hTR(human telomerase RNA)gene was cloned by the means of RT-PCR and inserted into the reverse transcription virus vector(PLNCX)to construct the antisense expression plasmid of hTR gene. By using lipofectin-mediated DNA transfection, the ob-

tained plasmid was successfully expressed in human liver cancer cells(SMMC-7721). All data suggest that telomerase antisense RNA could significantly inhibit the telomerase activity and proliferation of cells, prolong cell's doubling time and induce the apoptosis of cells.

Key words: Telomerase Apoptosis hTR

P 物质在再生视网膜节细胞中的表达及 IBMX 和 CPT-cAMP 对其表达的影响 *

朱永红 李海标

(中山医科大学组胚教研室 广州 510089)

大量的研究表明脊髓、脑干、大脑皮层和视网膜的某些神经元损伤后可以再生其轴突进入缝合的外周神经的节段内^[1-4]。也有报道,同一脑区神经元的再生能力有明显的不同,有些神经元的再生能力比其他类型的神经元强^[5]。然而,中枢神经元再生能力的不同是由于它们所含递质不同,还是轴突再生的分子机制及再生基因表达的不同所引起,至今尚未知。由于视网膜节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)的胞体和髓鞘包裹的轴突易分离和观察,所以视网膜做为轴突再生模型已沿用多年。研究表明外周神经(PN)移植能促进受损的 RGCs 的再生。由于神经营养因子对中枢神经元再生有一定的促进作用,近年来在这方面做了大量的工作,结果显示,神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、胶质源性神经营养因子(GDNF)和睫状源性神经营养因子(CNTF)对中枢某些神经元的存活和再生有促进作用,但是否能促进中枢 P 物质神经元再生则未见报道。我们在研究 P 物质在 RGCs 定位、外周神经缝接及 IBMX(3-异丁基-1-甲基黄嘌呤)和/或 CPT-cAMP(CPT-环磷酸腺苷)能促进 RGCs 再生的基础上^[6,7],探讨 P 物质阳性的 RGCs 能否再生以及 IBMX 和(或)CPT-cAMP 对其再生的影响。

材料和方法

1. 实验动物及分组

16 只成年雄性金黄地鼠(*Mesocricetus auratus*),体重 80-100 克,6-8 周。由中山医科大学实验动物中心提供。随机分 4 组,每组 4 只:①AG 组(attached graft),近端切断视神经(ON),ON 近侧残端与一段坐骨神经移植缝合;②AG + IBMX 组,在①组的基础上加玻璃体内注射 IBMX;③AG + CPT-cAMP 组,在①组的基础上加玻璃体内注射 CPT-cAMP;④AG + IBMX + CPT-cAMP 组,在①组的基础上加玻

璃体内联合注射 IBMX 和 CPT-cAMP。AG 组为再生对照组,其余三组为实验组。

2. 实验方法

30g/L 的戊巴比妥钠(50mg/kg)腹腔麻醉动物,取一段长约 2cm 的坐骨神经(AG)备用。实验组动物于眼球背侧角巩缘处扎一小孔,用 2mol/L 的 IBMX 溶液(Sigma 公司产品,溶于生理盐水)3 μ l 和/或 5mol/L 的 CPT-cAMP(Calbiochem 公司产品,溶于生理盐水)3 μ l 从小孔注入玻璃体内。

眼球后约 1mm 处切断 ON,将 2cm 长的坐骨神经与 ON 近侧残端缝接,眼球复位后,将另一端包埋固定于颅顶的肌肉中。ON 切断前及术后 7d,14d 用上述剂量共 3 次注射。

3. 荧光金逆行标记和 P 物质免疫组化

术后 4 周取材。在取材前 3d,于移植的坐骨神经远端约 1.5cm 处将其切断,放置黏有 60mg/ml 荧光金(fluorogold,FG,Merck 公司)的明胶海绵逆行标记再生 RGCs。3d 后摘出眼球,剥离视网膜并置于 40g/L 多聚甲醛(0.1 mol/L 磷酸缓冲液 pH7.3)固定 1h,漂洗后将视网膜裱于载玻片上,用激发光为 400nm 的滤光片,荧光显微镜下观察并计数,颞上、颞下、鼻上、鼻下 4 个区域的再生 RGCs 数之和为每个视网膜再生 RGCs 的总数。

参照李雯等人的方法进行 P 物质免疫组化染色^[8]。计数后的视网膜后固定于上述相同的固定液,4 $^{\circ}$ C 过夜。再经 300 g/L 蔗糖过夜,于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱反复冻融,PBS 漂洗,30 ml/L 正常羊血清 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育。P 物质免疫组化染色一抗选用 1:100 大鼠 P 物质单克隆抗体(Pel-freeze 公司产品),4 $^{\circ}$ C 孵育 3-4d,PBS 洗 3 次,二抗选用 1:100 生物素结合的兔抗大鼠 IgG(Vector 公司),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 洗;再加 1:500 卵白素结合的 FITC,4 $^{\circ}$ C 孵育 3-5h,PBS 清洗后裱片。用激发光 540nm 波长的滤光片观察 P 物质阳性细胞,转换为 400nm 的滤光片可见荧光金(FG)标记的再生 RGCs,双标的细胞即为 P 物质阳性再生 RGCs,每个视网膜双标细胞之和为 P 物质阳性再生 RGCs 的总数。数据采用方差分析和

本文 2001 年 6 月 8 日收到,2002 年 1 月 8 日接受。

* 国家自然科学基金项目(39870266);广东省自然科学基金项目(980096)。