

解。DC-chol/DOPE 脂质体能有效地转染许多难被转染的细胞株。与 Lipofectin 试剂相比较,对于人的表皮样癌细胞——A431, DC-chol/DOPE 脂质体的转染活力高 2 到 3 倍,而细胞毒性要低得多。由于转染效率、稳定性和潜在的安全性等特点,DC-chol/DOPE 脂质体已被批准为第一个可应用于人类基因治疗临床试验的阳离子脂质体试剂^[14]。

今天,阳离子脂质体介导核酸转染真核细胞已是最具创新性的、高效率的转染技术,并且逐渐成为基因治疗领域的一种标准方法。

摘 要

阳离子脂质体介导转染是一种具创新性的、高效的转染技术,并且逐渐成为介导核酸进入真核细胞的标准方法。因此,如果在使用其他的转染手段并不理想时,宜试用阳离子脂质体介导的转染技术。

参 考 文 献

- [1] Felgner, P. L. et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**:7413-7417.
[2] Whitt, M. A. et al. 1991, *Focus*, **13**:8-12.

- [3] Yang, J. P. et al. 1995, *Chinese J. Biochem. Biophys.*, **26**:245-253.
[4] Hawley-Nelson, P. et al., 1993, *Focus*, **15**:73-79.
[5] Nabel, G. L. et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:11307-11311.
[6] Caplen, N. J. et al., 1995, *Nature Medicine*, **1**:39-46.
[7] Plank, C. et al., 1994, *J. Biol. Chem.*, **269**:12918-12924.
[8] Gershon, H. et al., 1993, *Biochemistry*, **32**:7143-7151.
[9] Felgner, P. L. et al., 1989, *Nature*, **337**:387-388.
[10] Gao, X. and Huang, L. 1993, *Nucleic Acids Res.*, **21**:2867-2872.
[11] Ciccarone, V. et al., 1994, *Focus*, **16**:94-98.
[12] Wang, D. et al., 1996, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **226**:450-455.
[13] Lin, Q. S. et al., 1995, *Biopolymer and Bioproducts (Structure, Function and Applications)* Published for the Organising Committee, 11th FAOBMB Symposium by Samakkhisin (dokya) Public Company Limited, ed. by Jisnuson, S. et al., pp46-53, Kra Buri River, Ranong, Thailand.
[14] Gao, X. and Huang, L. 1995, *Gene therapy*, **2**:710-722.

研究工作

端粒酶 RNA 和端粒酶活性在人生殖道癌细胞株中的表达*

郑伟 石一复 谢幸 程琪 沈敏

(浙江医科大学附属妇产科医院 杭州 310006)

王升启

(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100039)

近年来的研究发现,端粒酶的激活与恶性肿瘤细胞的形成和发展密切相关^[1,2]。端粒(Telomere)是位于染色体末端的 DNA 与特殊蛋白质结合的复合体,对于维持染色体的完整性至关重要。端粒酶(Telomerase)是一种 RNA 依赖性核酸蛋白复合体,参与合成端粒 DNA 的重复序列(TTAGGG)^[3]。端粒酶的激活是细

胞阻止端粒重复序列的缩短并获得永生化的必要途径。在许多恶性肿瘤中显示有端粒酶活动。现已知人端粒酶 RNA 成分(human Telomerase RNA, hTR)决定着端粒酶重复序列的合成,并参与端粒酶的活化^[4]。反义端粒酶

*国家自然科学基金资助项目

RNA 可以抑制肿瘤细胞端粒酶活性,从而使肿瘤细胞生长受到抑制^[5]。本文采用反转录套式聚合酶链反应(RT-nested PCR)和 PCR 端粒重复扩增(TRAP)方法分别检测了人宫颈癌 HeLa 和 SiHa,绒癌 JAR 和 BeWo 以及卵巢癌 OCCI 5 种细胞株中端粒酶 RNA 与端粒酶活性的表达。探讨人端粒酶 RNA 与肿瘤细胞及其端粒酶活化的关系。

材料与 方法

1. 细胞培养

人宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞株及人胎盘绒毛膜癌 JAR 和 BeWo 细胞株分别由中国科学院上海细胞库和台湾长庚医学院提供,人卵巢癌 OCCI 细胞株由香港中文大学威尔斯亲王医院提供。上述细胞株均由我院细胞室传代培养。HeLa、SiHa 和 JAR 细胞株采用 RPMI 1640 培养液(GIBCO 产品)进行培养。BeWo 细胞株采用 F 12 K 培养液(GIBCO 产品)进行培养。OCCI 细胞株采用 DMEM 培养液(GIBCO 产品)进行培养。上述培养液均含 10% 灭活胎牛血清。细胞培养均在 37℃, 5% CO₂ 条件下的孵育箱中进行。

2. 组织标本

收集正常宫颈、卵巢及早期妊娠胎盘绒毛组织,置于 -80℃ 冰箱中保存。

3. 引物设计与合成

根据 Feng 等^[4]报道的 hTR 序列,设计外引物 1 为 5'-GGGTTGCGGAGGGTGGCCT-3',外引物 2 为 5'-ACAGGAAAGCGAACAGCATG-3',扩增度为 460bp,内引物 1 为 5'-GGGAGGGGTGGTGGC-CATTT-3',内引物 2 为 5'-GTTTGCTCTAGA-GAATGAACGG-3'。扩增长度为 150 bp。上述引物均在美国 PE 公司 391A 型 DNA 合成仪上合成。

4. 细胞和组织 RNA 提取

采用胍-酚一步法^[6]提取细胞和组织中 RNA,裂解液成分为 4 mol/L 异硫氰酸胍,0.5% 十二烷基肌酸钠,300 mmol/L NaAC (pH 4.0),10 mmol/L EDTA (pH 8.0),与等体积水饱和酚混合。取 10⁵ 培养细胞或 10-50 mg 组织,加入上述裂解液 100 μl,充分混匀,加入 50 μl 氯仿,充分混匀,室温 5 分钟,15000 rpm 离心 15 分钟,取上层液 50 μl,加入 150 μl 冷无水乙醇,-20℃ 置 30 分钟,15000 rpm 离心 10 分钟,弃上清,沉淀用 150 μl 75% 冷乙醇,混合,15000 rpm 离心 10 分

钟,弃上清,65℃ 水浴干燥 10 分钟后,即进行反转录。

5. cDNA 合成

反应体积为 20 μl,RT-PCR 混合物成分为 AMV 反转录酶(Promega 公司产品)10 u,RNasin(Promega 公司产品)20 u,Tag 聚合酶(Promega 公司产品)1 u,5 mmol/L MgCl₂,200 μmol/L dNTPs,50 mmol KCl,10 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0),0.1% TritonX-100 0.77 μmol/L,引物各 10 pmol/L。取 1-2 μg RNA 加入上述 RT-PCR 混合物 20 μl,在 42℃ 保温 30 分钟合成 cDNA。

6. PCR 扩增

按下列条件在 PE 480 型 DNA 扩增仪上进行套式 PCR 扩增,变性 94℃ 30 秒,退火 58℃ 30 秒,延伸 72℃ 30 秒,循环 30 次。第一次 PCR 完成后,取 1 μl 第一次扩增产物加入 19 μl PCR 混合物。其成分:1.5 mmol/L MgCl₂,200 μmol/L dNTPs,50 mmol/L KCl,10 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0),0.1% Triton X-100 0.77 μmol/L,引物各 10 pmol/L,Tag 聚合酶 1u (Promega 公司产品),按第一次 PCR 扩增条件扩增后,取 PCR 扩增产物 10 μl 直接上样于 2% 琼脂糖凝胶进行电泳,1 ng/ml 溴乙锭染色,在紫外灯下观察并照像。

7. 端粒酶活性检测

根据 Kim 等^[7]报道的 TRAP 方法,即端粒重复扩增法,检测癌细胞株及正常组织中的端粒酶活性。端粒酶引物 TS 和 CX 及检测试剂均由台湾长庚医学院包家驹教授惠赠。简要步骤如下:取 5-10 × 10⁵ 细胞或 50-100 mg 组织经裂解液裂解。离心 15000 rpm 20 分钟,分别加入 TRAP 缓冲液 4 μl T4-gene 32 蛋白 0.2 μl,端粒酶引物 TS,再加入引物端粒酶 CX,90℃ 90 秒,延伸成为双链端粒酶产物,按以下条件进行 PCR 扩增,94℃ 30 秒,50℃ 30 秒,72℃ 30 秒,循环 35 次,PCR 扩增产物在 10% 聚丙烯酰胺凝胶中进行垂直电泳分析,硝酸银染色。

结 果

1. 套式 RT-PCR 敏感性检测

取 1-5 × 10⁵ 细胞进行 10 倍连续稀释并抽提 RNA。并进行 RT-PCR 和套式 RT-PCR 扩增敏感性的比较。结果显示:JAR 细胞经 10⁻⁴ 倍稀释及套式 RT-PCR 扩增,hTR 仍为阳性,hTR 套式 RT-PCR 扩增灵敏度高于非套式 RT-PCR 10-100 倍(图 1)。

2. 细胞株 hTR 基因表达

hTR 检测结果显示,宫颈癌 HeLa 和 SiHa,卵巢癌 OCCI 以及绒毛膜癌 JAR 和 BeWo 细胞株均呈强阳性,即出现 150 bp 的特异性扩增片段,正常胎盘绒毛、宫颈上皮组织及卵巢组织 hTR 呈弱阳性(图 2)。

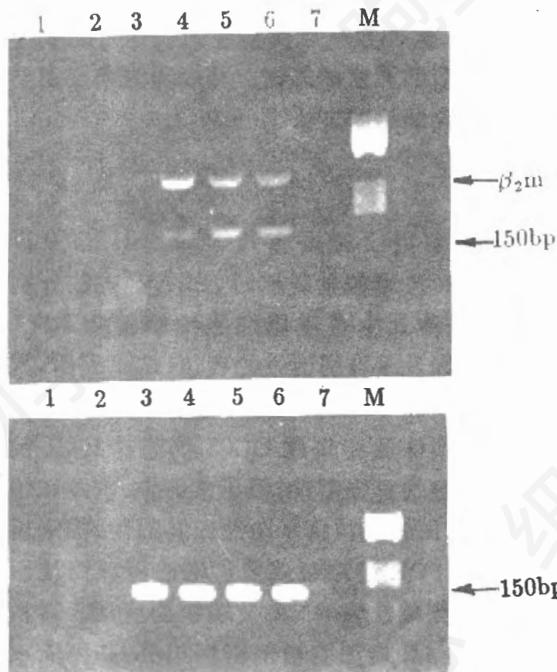


图 1 hTR 套式 RT-PCR 敏感性的比较

(上图:RT-PCR;下图:套式 RT-PCR)1-5, JAR 细胞稀释倍数分别 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 稀释;6, 阳性对照 (3×10^5 HeLa 细胞);7, 阴性对照;M, pBR 322/Hae III DNA 标准分子量。

3. 细胞株端粒酶活性检测

端粒酶活性检测结果显示,五种细胞株端粒酶活性均呈阳性,即出现典型的间隔六个核苷酸的端粒酶条带。正常胎盘绒毛和卵巢组织端粒酶呈弱阳性,正常宫颈组织呈阴性(图 3)。

讨 论

端粒酶的发现和它的 RNA 依赖性肿瘤生物学上的一个重要突破。最近的研究表明,大多数(84.8%)恶性肿瘤显示有端粒酶活动。而在良性肿瘤和正常体细胞中未发现端粒酶活性。

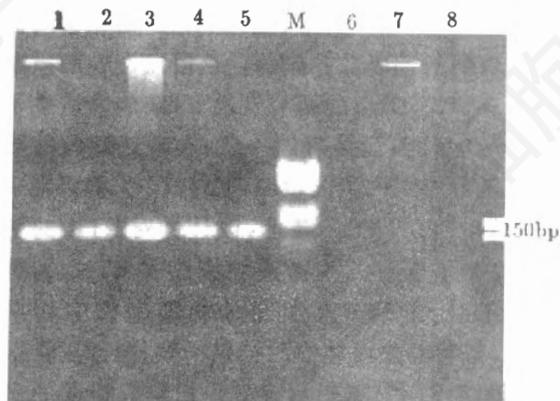


图 2 人生殖道癌细胞株及正常组织中 hTR 的表达

1. HeLa 细胞株 2. SiHa 细胞株 3. JAR 细胞株 4. BeWo 细胞株 5. OCCI 细胞株 M: pBR 322/Hae III DNA 标准分子量 6. 正常胎盘绒毛组织; 7. 正常宫颈组织 8. 正常卵巢组织

这种显著的相关性提示着端粒酶在肿瘤细胞恶性状态的形成和发展中,可能起关键性作用。但在正常卵巢和睾丸组织及造血细胞中也有端粒酶活动^[2,7]。我们已证实早孕绒毛滋养细胞具有端粒酶的活动,但足月胎盘滋养细胞中,其端粒酶活性明显减弱(另文发表)。我们认为卵巢组织及早孕绒毛端粒酶活化可能与卵巢生殖细胞及胎盘滋养细胞增殖有关。宫颈癌、卵巢癌及胎盘绒毛膜癌等 5 种永生性癌细胞株中均存在端粒酶活动。表明端粒酶的激活对于癌细胞获得永生性是必需的。

端粒酶是一个核酸蛋白复合体,它以酶的 RNA 成分上的一个片段为模板合成端粒的重复序列,已有研究发现具有端粒酶活性的肿瘤永生细胞中具有端粒酶 RNA 成分, Feng 等^[4]首次克隆了人端粒酶 RNA 成分(Human Telomerase RNA, hTR),并认为在生殖细胞和肿瘤细胞株中 hTR 基因表达强于无端粒酶活动的正常体细胞和组织。反义 hTR 可抑制端粒酶活动。并使端粒 DNA 缩短,从而引起细胞死亡。此外,端粒酶 RNA 成分的表达随着肿瘤细胞

的诱导分化以及端粒酶活性的降低而减弱^[1]。使得人们对研究通过抑制端粒酶活性来进行抗癌治疗发生了浓厚的兴趣。但 hTR 是否参与调控端粒酶活性以及肿瘤的什么阶段端粒酶被激活尚有争论,最近的研究发现 hTR 的表达并不总是与端粒酶活性表达一致,在缺乏端粒酶活性的正常组织中也能检测到 hTR^[2]。本研究采用反转录套式 PCR 技术,设计针对 hTR 的引物,检测了 5 种人生殖道癌细胞株 hTR,结果证实上述 5 种永生性肿瘤细胞株中存在 hTR,与端粒酶活性检测结果一致,但在正常组织中胎盘绒毛、宫颈及卵巢组织均有微弱的表达。

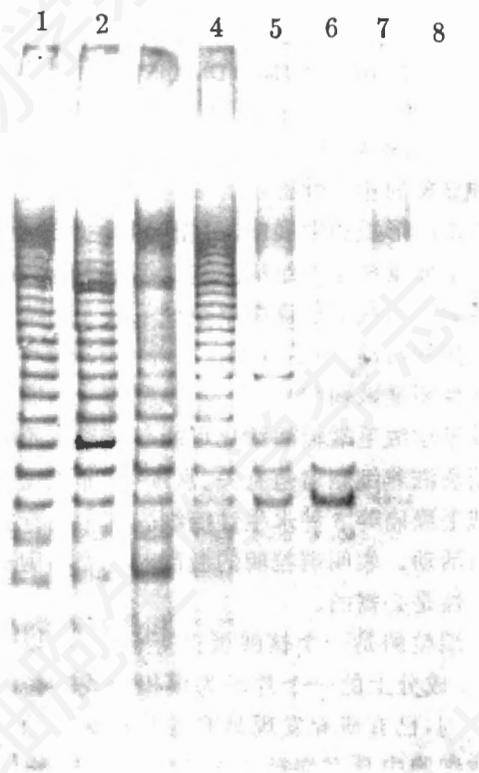


图 3 人生殖道癌细胞株及正常组织中端粒酶活性的检测

1. HeLa 细胞株 2. SiHa 细胞株 3. JAR 细胞株 4. BeWo 细胞株 5. OCCI 细胞株 6. 正常胎盘绒毛组织 7. 正常宫颈组织 8. 正常卵巢组织

研究结果表明,端粒酶 RNA 及端粒酶激活可能在生殖道恶性肿瘤的发生发展中起重要作用,但 hTR 基因表达与端粒酶激活关系以及与肿瘤发生的确切机制尚有待进一步研究。本研究还表明,hTR 和端粒酶活性的检测方法具有较高的灵敏度。对少量临床标本即可作出诊断的优点,有望使其应用范围的进一步扩大。端粒酶 RNA 检测及端粒酶活性的表达可能成为一项有价值的肿瘤标志物。并成为临床鉴别早期可疑肿瘤的诊断方法之一。

摘 要

本文采用反转录套式 PCR (nested RT-PCR) 和 PCR 端粒重复扩增 (TRAP) 方法分别检测了 5 种人生殖道癌细胞株端粒酶 RNA (hTR) 基因及端粒酶活性的表达。结果表明,宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞株,绒毛膜癌 JAR 和 BeWo 细胞株及卵巢癌 OCCI 细胞株 hTR 及端粒酶活性均呈强阳性。但正常卵巢、宫颈和胎盘组织 hTR 和端粒酶呈阴性或弱阳性。提示反转录套式 PCR 和端粒重复扩增法可以简便而有效地检测端粒酶 RNA 及端粒酶活性。端粒酶的激活与肿瘤细胞增殖密切相关,并可能成为一项具有临床价值的肿瘤标志物。

关键词:端粒酶 RNA 聚合酶链反应 生殖道癌 细胞株

参 考 文 献

- [1] Broccoli D., et al., 1995, *Proc. Natl. Aci. USA*, **92**:9082-9086.
- [2] Rhyu M. S., 1995, *J Natl Cancer Inst.*, **87**: 884-889.
- [3] Blackburn E. H., et al., 1995, *Telomeres*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 35-43.
- [4] Feng J., et al., 1995, *Science*, **269**: 1236-1241.
- [5] Norton J. C., et al., 1996, *Nature Biotechnology*, **14**: 615-619.
- [6] Chomczynski P., et al., 1987, *Anal. Biochem.*, **162**: 156-159.
- [7] Kim N. M., et al., 1994, *Science*, **266**: 2011-2015.

[8] Albanell J., et al., 1996, *Cancer Res.*, **56**:1503-1508.

[9] Avilion A. A., et al., 1996, *Cancer Res.*, **56**:645-650.

EXPRESSION OF TELOMERASE RNA AND TELOMERASE ACTIVITY IN CANCER CELL LINES OF HUMAN REPRODUCTIVE TRACT

ZHENG Wei SHI Yi Fu WANG Sheng Qi

(Women's hospital, Zhejiang Medical University, Hang Zhou, 310006)

ABSTRACT

We used RT nested PCR and PCR-based TRAP method to determine the human telomerase RNA (hTR) and telomerase activity of five cancer cell lines of human reproductive tract. The result shown that hTR is strongly expressed in the five cancer cell lines of cervical cancer, choriocarcinoma and ovarian cancer. hTR is weakly expressed in normal ovarian tissue, cervical tissue and term placenta tissue. It has shown that telomerase activity was presented in the five cancer cell lines of human reproductive tract, and was also detected though at low levels, in normal ovarian tissue, whereas it was undetectable normal cervical tissue and term placenta tissue. Our findings suggest that RT nested PCR is a simple and effective method with high sensitivity. The expression of hTR gene and telomerase activity associated with proliferation of cancer cells of human reproductive tract may be useful tumor markers.

Key words: Telomerase RNA Polymerase chain reaction Reproductive tract Cancer Cell line

COUP-TE 和 RAR β 受体的表达影响癌细胞对视黄酸的敏感性*

吴 乔 张晓坤**

(厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室 361005)

视黄酸 (retinoic acid, RA) 能够抑制许多类型癌细胞的恶性生长, 它的作用主要由于其受体 RARs (retinoic acid receptors) 和 RXRs (retinoid X receptors) 介导^[1], 这些受体作为配体激活的转录因子, 通过结合到视黄酸应答元件 (retinoic acid response element, RARE) 上调节基因的转录表达。RARs 和 RXRs 由 3 种不同基因: α 、 β 和 γ 编码, 通过各自的表达而使各自的功能。例如, 在许多类型的癌细胞中, RA 通过诱导其受体 RAR β 的表达而抑制癌细胞的生长^[2], 但在另一些癌细胞中, 这种抑制作用则丧失, 表明 RAR β 的表达是抑制癌细胞生

长的必要因子, 但不是唯一的因子, 提示可能还有其它受体参与调节癌细胞对 RA 的应答过程。本文研究表明, COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor) 可能是这类受体中的一种受体。

COUP-TF 是一种孤生受体 (orphan receptor), 属于核受体超家族成员, 由两种不同的基因编码^[3]。COUP-TF 的特异性配体至今

* 福建省自然科学基金 (C 96002) 部分资助。

** 美国, 加州, La Jolla 癌症研究中心, Burnham 研究所。