

*hTERT*与*SV40 LT*协同表达对牛乳腺上皮细胞体外增殖的影响

贺小英* 马利兵 程 腾

(内蒙古科技大学数理与生物工程学院, 包头 014010)

摘要 人端粒酶催化亚基(human telomerase reverse transcriptase, *hTERT*)和SV40大T抗原(simian virus 40 large antigen, *SV40 LT*)均能刺激细胞增殖并延长细胞体外寿命,但相对效率较低,二者协同能否增强功效有待于进一步研究。该文首先构建了*hTERT*和*SV40 LT*双基因共表达载体,转染牛乳腺上皮细胞(bovine mammary gland epithelial cells, bMGEs),获得阳性克隆。持续扩大培养时,细胞活力旺盛,且细胞能体外维持寿命超过30代。RT-PCR和Western blot检测结果表明,*hTERT*和*SV40 LT*能同时表达。流式细胞仪检测发现,阳性细胞具有较强的增殖能力。研究结果证实,*hTERT*和*SV40 LT*协同表达能刺激bMGEs体外增殖及延长细胞寿命。

关键词 端粒酶; SV40; 乳腺细胞; 增殖; 协同表达

Cell Proliferation Effect Co-expression of *hTERT* and *SV40 LT* Gene on Bovine Mammary Gland Epithelial Cells *In Vitro*

He Xiaoying*, Ma Libing, Cheng Teng

(School of Mathematics, Physics and Biological Engineering, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 104010, China)

Abstract Human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*) and simian virus 40 large antigen (*SV40 LT*) can stimulate cell proliferation and extend cell life-span, however, they are low efficient. Therefore, it remains for further research to verify whether the two genes have co-expression patterns. In this study, the co-expression plasmid carrying *hTERT* and *SV40 LT* gene was constructed and transfected bovine mammary epithelial cells (bMGEs). The obtained positive cells could maintain growth through passage 30. Using RT-PCR and Western blot, the expressions of *hTERT* and *SV40 LT* were detected in positive cells. Furthermore, there were higher proliferation rates in the positive cells than those of control group by flow cytometer. The results showed that the co-expression of *hTERT* and *SV40 LT* might stimulate cell proliferation and extend cell life-span.

Keywords *hTERT*; SV40; mammary cells; cell proliferation; co-exproliferation

哺乳动物的乳腺细胞不仅能够泌乳,而且能够周期性进行生长、发育、分化和凋亡等一系列生命活动。因此,它已成为乳腺生物反应器和乳腺癌

等重大疾病研究的靶细胞。但由于乳腺细胞体外培养相对生命周期较短,并且随着体外培养时间延长细胞增殖能力越来越低,极大地制约了体外研究。

收稿日期: 2014-05-22 接受日期: 2014-12-04

国家自然科学基金(批准号: 31160245)、内蒙古自然科学基金(批准号: 2012MS0503)和内蒙古自治区高等学校青年科技英才支持计划资助的课题

*通讯作者。Tel: 0472-5954358, E-mail: hxy1124@163.com

Received: May 22, 2014 Accepted: December 4, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31160245), the Natural Science Foundation of Inner Mongolia (Grant No.2012MS0503) and the Program for Young Talents of Science and Technology in Universities of Inner Mongolia Autonomous Region

*Corresponding author. Tel: +86-472-5954358, E-mail: hxy1124@163.com

网络出版时间: 2015-01-30 14:54 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150130.1454.002.html>

目前,已证实人端粒酶催化亚基(human telomerase reverse transcriptase, *hTERT*)和SV40大T抗原(simian virus 40 large antigen, *SV40 LT*)均能刺激细胞增殖并延长细胞体外寿命,但相对效率较低^[1-2],有关二者协同表达是否发挥同样的作用有待于进一步的研究。

内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)是一段核酸序列,它能同时翻译一条mRNA的两个开放读码框^[3]。用IRES将多个目的基因串联在一起,可同时转录成一条单链mRNA,但又能各自独立地翻译成不同的目的蛋白,这样就可利用IRES序列连接多个功能相同的目的基因各自独立地表达,从而发挥协同作用。

本研究通过IRES连接*hTERT*和*SV40 LT*,构建双基因共表达载体,转染牛乳腺上皮细胞(bovine mammary gland epithelial cells, bMGEs),进一步验证*hTERT*和*SV40 LT*对bMGEs体外增殖及细胞寿命延长是否有协同作用。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

怀孕约17周健康牛乳腺组织来自内蒙古永圣域奶牛场,取材符合伦理委员会标准操作规程。

1.2 主要试剂

质粒纯化试剂盒(Endofree Plasmid Extraction Kit)购自Promega公司; Lipofectamine 2000、Trizol总RNA提取试剂盒、Taq DNA聚合酶、反转录试剂盒(Super-Script™ Reverse Transcriptase)购自Invitrogen公司; T4连接酶、限制性内切酶和Marker购自加拿大MBI公司。小鼠抗人*hTERT*单克隆抗体、小鼠抗人SV40大T单克隆抗体、小鼠抗牛 β -actin和HRP-羊抗小鼠IgG购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 质粒和菌株

真核表达载体pIRES-neo3.0、pSV3-neo和pCI-neo-hTERT为本实验室保存,宿主菌DH5 α 为本实验室保存,质粒psp73和pGEM-T Easy vector购自Promega公司。

1.4 主要溶液配制

完全培养基: 1:1 DMEM/F12基础培养液,含10%胎牛血清(FBS, Invitrogen公司)、100 U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素、2 mmol/L谷氨酰胺(Sigma公司)、10 ng/mL表皮生长因子、10 μ L/mL胰岛素-转铁蛋白-硒钠(ITS, 100 \times , Invitrogen公司)、5 μ g/mL

胰岛素(insulin, Invitrogen公司)。

1.5 phTERT-IRES-SV40融合表达载体构建

以pIRES-neo3.0为模板,采用引物序列为:上游引物I1: 5'-CCC GGG CTT AAG TGT GCT GGA ATT AAT TCG CTG TCT G-3',下游引物I2: 5'-TCT AGA GTT GTG GCA AGC TTA TCA TCG TGT TT-3',扩增IRES序列区。获得的IRES片段定向连接到克隆载体pSP73,新的载体命名为pSP73-IRES,通过*Sma* I和*Bam* H I双酶切载体pSP73-IRES和pSV3-neo,回收pSP73-IRES大片段以及pSV3-neo的*SV40 LT*片段,重组后的载体命名为pSP73-IRES-LT。新载体pSP73-IRES-LT与pCI-neo-hTERT载体通过*Acc* II和*Sal* I双酶切定向连接,最终表达载体命名为phTERT-IRES-SV40。phTERT-IRES-SV40融合表达载体构建如图1所示。

1.6 牛乳腺细胞体外分离培养

无菌状态下取大约怀孕17周左右牛乳腺组织,剪成1 mm³小块,用眼科镊将其贴于培养皿中,每小块间距0.5 cm左右。放置好后,轻轻倒置培养皿,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂及饱和湿度的培养箱内2~3 h。待组织块与培养皿黏合牢固时,轻轻补足培养液,继续在CO₂培养箱中培养。每隔3 d换一次液。3~5 d成纤维样细胞迁出,10~14 d上皮样细胞迁出。利用差酶消化法,即在混杂的成纤维和上皮细胞的中加入0.25%胰酶,消化3 min,成纤维细胞被去除,剩下的大部分为上皮细胞。培养过程中重复消化数次,直至获得纯化的上皮细胞。当培养皿铺满单层上皮细胞时,加消化液消化细胞并进行冻存或传代培养。

1.7 转染乳腺上皮细胞

pCI-neo-hTERT是携带*hTERT*基因的真核表达载体,pSV3-neo是携带*SV40 LT*基因的真核表达载体,phTERT-IERS-SV40是*hTERT*和*SV40 LT*双基因共表达载体。严格按照质粒纯化试剂盒说明书操作,纯化载体pCI-neo-hTERT、pSV3-neo和phTERT-IERS-SV40,利用紫外分光光度计检测浓度分别为620 ng/ μ L、576 ng/ μ L、569 ng/ μ L。根据Lipofectamine 2000说明书操作指南,转染前48 h,将bMGEs接种到6孔板内,转染当天细胞汇合达85%~90%。转染前2 h,更换新鲜的无血清无双抗DMEM/F12培养液。分别取pCI-neo-hTERT、pSV3-neo及phTERT-IERS-SV40各4 μ g,用基础DMEM/F12培养液(无血清、无双抗)分别稀释三种质粒至终体积为250 μ L,室温静置5 min。



图1 phTERT-IRES-SV40结构图

Fig.1 The map of phTERT-IRES-SV40

取8 μL Lipofectamine 2000, 用基础DMEM/F12培养液(无血清、无双抗)稀释至终体积为250 μL , 室温静置5 min。将脂质体和DNA二者混合, 总体积为500 μL , 室温静置20 min。将混合液逐滴加入待转染的bMGEs, 混匀, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度的培养箱中孵育4~6 h, 吸弃培养液, 加入完全DMEM/F12培养液。同时, 设立未转染组做空白对照。

1.8 阳性克隆率检测

当外源基因转染真核细胞时, 经过一段时间药物加压筛选后, 外源基因会稳定整合到宿主染色体基因, 此时获得的细胞为阳性细胞, 且阳性细胞大多以集落的形式进行生长, 每一个集落即为一个阳性克隆。阳性克隆率统计方法是: 阳性克隆率(P%)=每次转染后G418加压选择后存活的阳性克隆数/转染重复次数 \times 100%。采用1.7的转染方法, 在每个6孔板中分别用pCI-neo-hTERT、pSV3-neo及phTERT-IRES-SV40转染bMGEs(1个6孔板转染1种DNA质粒, 6个孔相当于6次重复), 48 h后加550 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418筛选, 当未转染空白对照全部死亡后, G418浓度减为250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 继续筛选。3周后, 统计阳性克隆率。

1.9 RT-PCR鉴定phTERT-IRES-SV40阳性克隆

根据Trizol法裂解阳性细胞提取mRNA。具体是: 取(3~5) \times 10⁵阳性细胞, 加500 μL Trizol, 静置5 min。12 000 r/min离心1 min, 取上清, 加100 μL 氯仿, 室温放置15 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min离心15 min, 取上层水相, 加0.25 mL异丙醇, 室温放置5~10 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min离心10 min, 去上清, 加75%的酒精洗涤晾干。最后用50 μL 的TE buffer溶解。*hTERT*和*SV40 LT*的cDNA合成按照反转录试剂盒说明书操作。RT-PCR扩增*hTERT*基因的引物是: 5'-gta tgc cgt ggt cca gaa gg-3'和5'-cgt ggg tga ggt gag gtg tc-3'; 扩增*SV40 LT*基因引物是: 5'-taa gta tga ctc tgt ccc taa-3'和5'-tca aag att cct ggt tt-3'。

1.10 Western blot鉴定phTERT-IRES-SV40阳性克隆

取2 \times 10⁷阳性细胞, PBS洗涤3次, 严格按照蛋白提取试剂盒说明书提取细胞总蛋白, 分别加300 μL (1 \times 10⁶)

RIPA裂解缓冲液裂解细胞, 冰浴30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下1 000 \times g离心15 min。收集上清, 用BCA试剂盒测定蛋白质浓度。分别配制6%、12%的变性聚丙烯酰胺凝胶分离胶和5%积层胶, 取15 μg 细胞总蛋白进行SDS-PAGE电泳分离。电转移至PVDF上, PBST(含0.01% Tween20的PBS)洗涤后, 用封闭液(含5%脱脂奶粉的PBST)封闭1 h, 加入小鼠抗人*hTERT*单克隆抗体、小鼠抗人*SV40*大T单克隆抗体和小鼠抗牛 β -actin, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, PBST洗涤, 加入HRP-羊抗小鼠IgG, 室温孵育2 h, PBST洗涤, 然后ECL反应成像, 暗室曝光。

1.11 流式细胞术鉴定phTERT-IRES-LT增殖能力

随机选取第10代阳性细胞, 以未处理的第10代bMGEs作为对照组, 采用冰预冷的95%酒精固定1 \times 10⁶待测细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。1 000 r/min离心1 min, 去上清, 加入250 μL 的500 U/mL核糖核酸酶(Rnase)和含有1.12%柠檬酸钠的PBS液重悬细胞, 然后添加250 μL 浓度为50 mg/mL的碘化丙啶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min。室温避光1 h, 流式细胞仪检测。

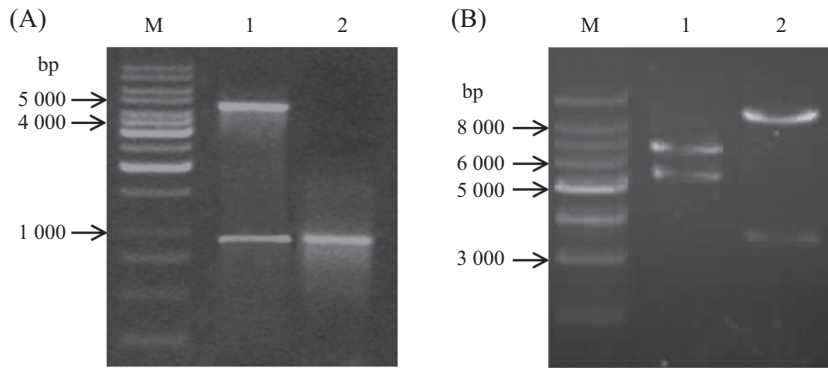
2 结果

2.1 phTERT-IRES-SV40载体鉴定

通过内部核糖体进入位点(IRES)序列连接*SV40 LT*和*hTERT*基因为非融合型共表达载体phTERT-IRES-SV40。克隆载体pSP73-IRES-SV40经*Sal I*/*Sma I*双酶切, DNA片段为4.7 Kb和0.89 Kb, PCR扩增IRES, 获得0.89 Kb, 与预期结果一致(图2A)。最终, 表达载体phTERT-IRES-SV40经*Acc I*/*EcoR I*双酶切获得的片段大小分别为6.5 Kb和5.4 Kb。经*Sal I*/*EcoR I*双酶切, DNA片段为8.5 Kb和3.4 Kb, 与预期的结果一致(图2B)。

2.2 阳性克隆率比较

分别将三个真核表达载体pCI-neo-hTERT、pSV3-neo和phTERT-IRES-SV40转染bMGEs, 药物加压筛选后, 统计获得的阳性克隆数。由表1可知, 只有phTERT-IRES-SV40能够获得阳性克隆, pCI-neo-hTERT和pSV3-neo及对照组在G418的选



A: 1: 重组质粒pSP73-IRES-LT经*Sal I/Sma I*双酶切鉴定结果; 2: IRES的PCR鉴定结果; M: DNA marker; B: 1: pHtert-IRES-SV40经*Acc I/EcoR I*双酶切鉴定结果; 2: pHtert-IRES-SV40经*Sal I/EcoR I*双酶切鉴定结果; M: DNA marker。

A: 1: identification result of pSP73-IRES-LT by *Sal I/Sma I*; 2: PCR product based on primer of IRES; M: DNA marker; B: 1: identification result of pHtert-IRES-SV40 by *Acc I/EcoR I*; 2: identification result of pHtert-IRES-SV40 by *Sal I/EcoR I*; M: DNA marker.

图2 重组质粒pHtert-IRES-SV40载体的鉴定

Fig.2 Identification of recombinant vector pHtert-IRES-SV40

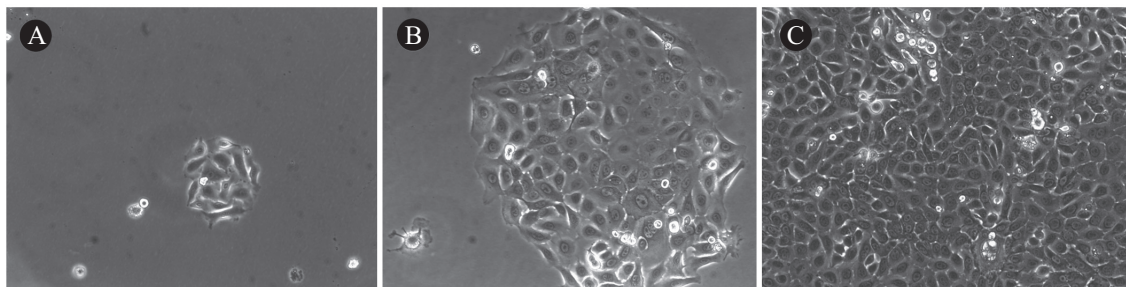
表1 质粒介导的SV40 LT和hTERT转染bMGEs阳性克隆率的比较

Table 1 Feasibility comparison for SV40 LT and plasmids-mediated hTERT gene transferring into bMGEs

载体组 Group	转染后G418加压选择后细胞存活天数(d) Survivor days after transfection under G418 selection (d)	阳性克隆率产生(次) Production of positive cloning (T)	转染重复次数(n) Transfection times (n)	阳性克隆率(%) Positive cloning rate (%)
pCI-neo-hTERT	35±2	-	6	0
pSV3-neo	42±1	-	6	0
pHtert-IRES-SV40	150±2*	+*(2)	6	33.3*
Untreated group	15±1	-	6	0

三组质粒介导的hTERT和SV40大T基因转染bMGEs, 仅pHtert-IRES-SV40组能够产生阳性克隆(+), 并且克隆率为33.3%, *表示差异显著。pCI-neo-hTERT: 携带hTERT基因的真核表达载体; pSV3-neo: SV40大T基因的真核表达载体; pHtert-IRES-SV40: 双基因共表达载体; Untreated group: 未处理的对照组。

Comparison of SV40 LT and plasmids-mediated hTERT gene transferring bMGEs, only pHtert-IRES-SV40 group could product positive cloning (+), and the cloning rate was 33.3%. * indicated significant difference. pCI-neo-hTERT: a eukaryotic expression vector carrying the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT); pSV3-neo: a eukaryotic expression vector carrying SV40 LT. pHtert-IRES-SV40: a co-expression vectors carrying hTERT and SV40 LT; Untreated group: untreated control group.



A: G418加压选择后获得的阳性单克隆; B: 阳性克隆持续培养; C: 阳性克隆扩大培养30代。

A: under G418 the obtained monoclonal cells; B: the continuing growth of positive clone; C: the HL-bMGEs at passage 30.

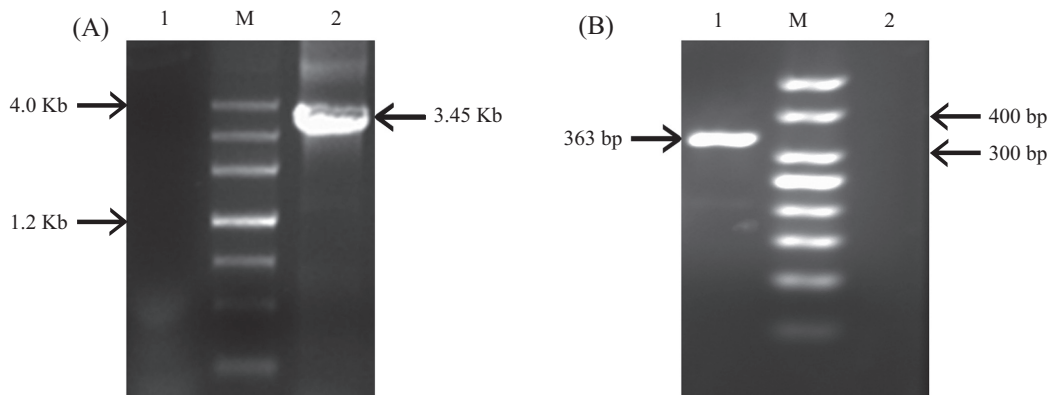
图3 转染细胞的单克隆增殖结果(100×)

Fig.3 The monoclonal cell population after transfection (100×)

择压力均未获得阳性克隆, 且载体 pHtert-IRES-SV40组在重复6次转染后有2次获得阳性克隆, 阳性克隆率为33.3%, 比其他载体组具有更高的克隆效率。

2.3 转染后阳性克隆的鉴定

真核双基因共表达载体 pHtert-IRES-SV40转染bMGEs, 48 h后用G418抗性药物加压筛选。约3周后, 获得阳性克隆, 命名为HL-bMGEs, 挑取单克隆

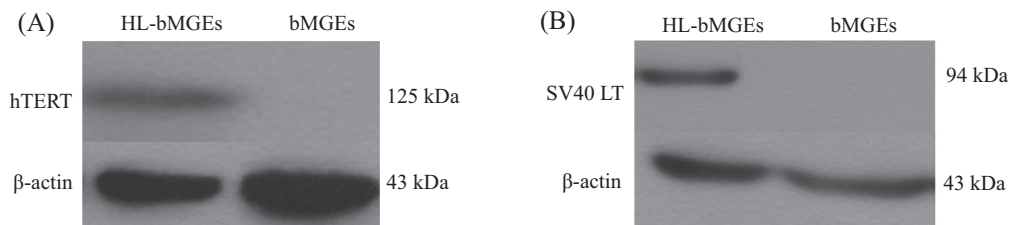


A: RT-PCR检测阳性克隆中*hTERT*表达。1: 阴性对照; 2: 阳性细胞RT-PCR结果; M: DNA marker; B: RT-PCR检测阳性克隆中*SV40 LT*表达。1: 阳性细胞RT-PCR结果; 2: 阴性对照; M: DNA marker。

A: the RT-PCR for detection of the *hTERT* mRNA in positive cells. 1: negative control group; 2: the RT-PCR result of the *hTERT* mRNA in positive cells; M: DNA marker; B: the RT-PCR for detection of the *SV40 LT* mRNA in positive cells. 1: the RT-PCR result of the *SV40 LT* mRNA in positive cells; 2: negative control group; M: DNA marker.

图4 RT-PCR检测阳性克隆中*hTERT*和*SV40LT*的表达

Fig.4 The RT-PCR for detection of the *SV40 LT* and *hTERT* mRNA in positive cells

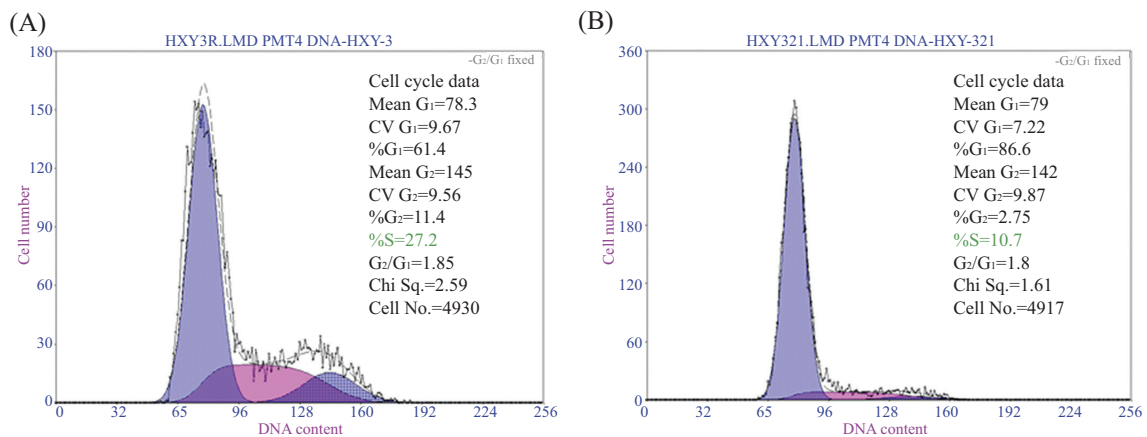


A: *hTERT*在阳性细胞HL-bMGES中表达, 在对照bMGES中不表达; 内参 β -actin在HL-bMGES和bMGES均表达; B: *SV40 LT*在阳性细胞HL-bMGES中表达, 在对照bMGES中不表达; 内参 β -actin在HL-bMGES和bMGES均表达。

A: expressions of *hTERT* were detected in HL-bMGES, but were undetectable in bMGES; Expressions of β -actin were detected in HL-bMGES and bMGES. B: expressions of *SV40 LT* were detected in HL-bMGES, but were undetectable in bMGES; Expressions of β -actin were detected in HL-bMGES and bMGES.

图5 Western blot检测阳性细胞*hTERT*和*SV40*大T蛋白的表达

Fig.5 The proteins expression of *hTERT* and *SV40 LT* in positive cells by Western blot



A: 第10代阳性细胞周期结果(HL-bMGES-10); B: 第10代对照细胞周期结果(bMGES-10); 流式细胞数值代表是分布在G₁期、S期、G₂/M期的细胞占细胞总数的百分比。

A: cell cycle result of HL-bMGES at passage 10; B: cell cycle result of bMGES at passage 10. The date represented the percentage of cells in the G₁, S and G₂/M phases of the cell cycle.

图6 细胞周期结果分析

Fig.6 The result analysis of cell cycle

扩大培养(图3)。获得的单克隆以“铺路石”样细胞类型生长。继续扩大培养,细胞仍以紧密单层生长方式增殖,细胞体外持续培养达30代依然生长旺盛。

2.4 转染后阳性克隆的RT-PCR鉴定

分别从筛选出的阳性细胞HL-bMGEs和未转染的bMGEs中提取基因组mRNA, RT-PCR扩增*hTERT*和*SV40 LT*, 阳性细胞基因扩增的产物长度为3.45 Kb和363 bp, 未处理组为阴性结果, 所得结果与预期的一致(图4)。

2.5 Western blot鉴定phTERT-IRES-SV40阳性克隆

Western blot检测结果表明, 第15代阳性细胞HL-bMGEs中的*hTERT*和*SV40 LT*均能正常表达, 蛋白分子量为125 kDa和94 kDa。阴性细胞bMGEs中*hTERT*和*SV40 LT*不表达。内参 β -action在阳性细胞和对照均稳定表达, 蛋白分子量为43 kDa(图5)。

2.6 流式细胞鉴定阳性细胞增殖能力

利用流式细胞技术进行阳性细胞周期分析。随机选取第10代HL-bMGEs, 对照组为未转染phTERT-IRES-SV40、正常培养的bMGEs第10代。通过流式细胞仪数据分析表明, HL-bMGEs的细胞周期活动是从G₀/G₁期向G₂期过渡, 处于S期细胞占细胞总数为27.2%, 阳性细胞中第10代细胞S期相对较高。对照组的细胞大部分处于G₀期, 处于S期细胞则相比较低(对照组为10.7%)。结果表明, 阳性细胞具有较强的增殖能力(图6)。

3 讨论

本研究构建了*hTERT*和*SV40 LT*的双基因共表达载体。结果显示, *hTERT*和*SV40 LT*这两个基因的协同表达能够刺激牛乳腺上皮细胞的增殖并延长细胞的体外寿命。在过去的研究中, 有的学者认为, *hTERT*单独不能诱导乳腺细胞增殖直至永生, 但是当*hTERT*与原癌基因比如乳头瘤病毒E6和E7共同作用时能够刺激细胞增加^[4-5]。这可能是由于细胞在分裂增殖过程中端粒变短, 最终导致细胞衰老; 而*hTERT*能够延长端粒, 原癌基因的活性又能够灭活肿瘤抑制因子p16和p53, 这种双重功效能够加速刺激细胞的增殖^[6]。但是, 近期有学者报道, 单独的*hTERT*也能诱导乳腺细胞增殖。Smith等^[7]通过外源*hTERT*转到人乳腺上皮的研究证实, 端粒酶能够刺激上皮细胞增殖, 进一步验证了端粒酶不仅可以稳

定端粒而且可能通过刺激促生长基因的表达来激活上皮细胞增殖。Blagoev等^[8]的实验表明, 一个细胞的增殖能力与端粒酶的浓度存在指数关系。*SV40 LT*是目前最常用且有效的细胞增殖的分子干预手段之一。利用*SV40 LT*已经成功地介导了多种细胞的增殖及永生, 如内皮细胞、神经细胞等真核细胞。Huynh等^[9]利用SV40病毒温度敏感突变株的T抗原基因转染牛原代乳腺腺泡样细胞, 建立了牛乳腺细胞系MAC-T, 该细胞系亦呈现上皮细胞的典型特征, 而且在催乳素的诱导下可以产生 β -酪蛋白。这个细胞系也是仅有的有后续研究报道的细胞系^[10-12]。尽管*hTERT*和*SV40 LT*都能刺激乳腺细胞体外增殖甚至永生, 但相对效率较低。本实验也证实了这一结论, 通过比较单独转染*hTERT*和*SV40 LT*和自身构建*hTERT*和*SV40 LT*双基因共表达载体, 最终获得阳性细胞克隆的效率。结果显示, 二者单独转染乳腺细胞重复6次均未获得阳性克隆细胞。而本文构建的双基因共表达载体, 在同样实验条件下重复6次, 结果2次获得阳性克隆。进一步的Western blot检测表明, *hTERT*和*SV40 LT*能同时表达。因此, 双基因共表达载体具有较高的阳性克隆率, 极有可能的原因是目的基因表达量的高低在阳性克隆细胞形成效率中起关键作用, 表达载体本身不起决定性作用。通常认为, 载体DNA片段越小细胞转染效率越高, 获得转基因阳性克隆的概率越大。本研究表明, phTERT-IRES-SV40(11.9 Kb)的DNA长度大于单独携带*hTERT*的pCI-neo-hTERT(8.9 Kb)和单独携带*SV40 LT*的pSV3-neo(8.57 Kb), 但是其获得转基因阳性克隆较高。因此, 我们认为, 目的基因的表达高低对基因的转染效率起关键作用。此外, 本研究采用IRES连接*hTERT*和*SV40 LT*, 使目的蛋白*SV40 LT*和*hTERT*同时表达, 避免了多个启动子彼此之间存在竞争抑制, 此法可能对促进双基因共表达更有效。

正常乳腺细胞随着体外培养时间延长细胞增殖活力显著降低, 最终导致体外寿命缩短, 这极大地制约了体外研究。本研究构建的表达载体phTERT-IRES-SV40转导bMGEs时不仅获得了阳性单克隆, 而且获得的单克隆细胞能够维持扩大培养, 细胞活力旺盛, 且细胞能维持体外寿命超过30代。RT-PCR和Western blot检测结果表明, *hTERT*和*SV40 LT*能同时表达; 流式细胞结果表明, 阳性细胞具有较强的增

殖能力。因此, 本研究结果证实, *hTERT*和*SV40 LT*协同表达不仅刺激bMGEs体外增殖而且延长了其体外寿命, 该实验为进一步深入乳腺细胞的体外研究提供了一种新的方法。

参考文献 (References)

- 1 Daniela M, Peekas GW, Tollefsbol TO. Regulation of the human catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene* 2012; 498(2): 135-46.
- 2 Colvin EK, Weir C, Ikin RJ, Hudson AL. SV40 TAg mouse models of cancer. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 27(3): 61-73.
- 3 Martínez-Salas E, Pacheco A, Serrano P, Fernandez N. New insights into internal ribosome entry site elements relevant for viral gene expression. *J Gen Virol* 2008; 89(Pt 3): 611-26.
- 4 Doorslaera KV, Burk RD. Association between *hTERT* activation by HPV E6 proteins and oncogenic risk. *Virology* 2012; 433(1): 216-9.
- 5 Farwell DG, Shera KA, Koop JI, Bonnet GA, Matthews CP, Rutherford GW, *et al.* Genetic and epigenetic changes in human epithelial cells immortalized by telomerase. *Am J Pathol* 2000; 156(5): 1537-47.
- 6 Toouli CD, Huschtscha LI, Huschtscha AA, Noble JR, Colgin LM, Hukku B, *et al.* Comparison of human mammary epithelial cells immortalized by simian virus 40 T-Antigen or by the telomerase catalytic subunit. *Oncogene* 2002; 21(1): 128-39.
- 7 Smith LL, Colle HA, Roberts JM. Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nat Cell Biol* 2003; 5(5): 474-9.
- 8 Blagoev KB. Cell proliferation in the presence of telomerase. *PLoS One* 2009; 4(2): e4622.
- 9 Huynh TH, Robitaille G, Turner J.D. Established of bovine mammary epithelial cell line (MAC-T): An *in vitro* model for bovine lactation. *Exp Cell Res* 1991; 197(2): 191-9.
- 10 Zhou Y, Akers RM, Jiang H. Growth hormone can induce expression of four major milk protein genes in transfected MAC-T cells. *J Dairy Sci* 2008; 91(1): 100-8.
- 11 Bruzelius K, Purup S, James P, Onning G, Akesson B. Biosynthesis of selenoproteins in cultured bovine mammary cells. *Trace Elem Med Biol* 2008; 22(3): 224-33.
- 12 McFadden JW, Corl BA. Activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) inhibits fatty acid synthesis in bovine mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390(3): 388-93.