

反义 hTERT 体外抑制白血病细胞增殖的研究

孙来保¹, 李成荣¹, 文剑明², 王国兵¹, 张萌², 杨军¹, 李若馨¹ (1 深圳市儿童医院, 广东 深圳 518026; 2 中山大学中山医学院病理学教研室, 广东 广州 510089)

摘要:目的 研究反义 hTERT 基因对白血病细胞体外增殖的抑制作用。方法 体外通过 SuperFect 将已构建好的正、反义 hTERT 真核表达载体转染 HL₆₀ 白血病细胞, 再经过 G418 及 PCR 筛选鉴定分别转入了正、反义 hTERT 载体的抗性克隆细胞 HL₆₀-s 和 HL₆₀-as。随后运用实时荧光定量 RT-PCR 技术及 TRAP- 银染法对各组细胞内源性 hTERT mRNA 的表达情况及端粒酶的活性进行检测。同时还采用 MTT 法、双层软琼脂克隆形成试验、流式细胞术观察和分析反义 hTERT 对白血病细胞体外生长增殖活力的影响及是否能诱导瘤细胞的凋亡。结果 与空白对照、正义 hTERT 组相比, 反义 hTERT 能显著地降低 HL₆₀ 细胞内源性 hTERT mRNA 的表达 ($P < 0.01$) 和下调端粒酶活性。当各组细胞传至第 25 代后, 与 HL₆₀、HL₆₀-s 比较, HL₆₀-as 细胞的生长速度和集落形成能力明显地减慢和降低, 同时伴有凋亡率的显著增加。结论 反义 hTERT 在体外能抑制白血病细胞的生长增殖能力, 其潜在、广谱的抗肿瘤作用的分子生物学机制可能是首先通过抑制和下调 hTERT 表达 (端粒酶活性) 而最终引发瘤细胞衰亡的途径来实现的。

关键词:反义 hTERT; 白血病; 实时荧光定量 RT-PCR; 细胞增殖; 分子生物学治疗

中图分类号: Q782 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2004)05-0521-04

Antisense human telomerase reverse transcriptase inhibits leukemia cell proliferation *in vitro*

SUN Lai-bao¹, LI Cheng-rong¹, WEN Jian-ming², WANG Guo-bing¹, ZHANG Meng², YANG Jun¹, LI Ruo-xin¹

¹Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518026, China; ²Department of Pathology, Medical College of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China

Abstract: Objective To study the inhibitory effect of antisense human telomerase reverse transcriptase (hTERT) on leukemia cell proliferation *in vitro*. **Methods** Sense and antisense hTERT eukaryotic expression vectors previously constructed were transfected into leukemia cell line HL₆₀ using SuperFect transfection reagent (Qiagen) to obtain HL₆₀-s and HL₆₀-as, and the G418-resistant colonies were identified for the presence of hTERT insert by PCR with T7 and pcDNA3.1/BGH reverse primers. Endogenous hTERT mRNA expression and telomerase activity were then detected by quantitative real-time RT-PCR and telomerase associated protein -silver staining in each cell line. MTT cellular proliferation assay, soft agar colony formation assay and flow cytometry were also employed to analyze the changes in proliferation capacity of leukemia cell *in vitro* and apoptosis of the tumor cells induced by antisense hTERT. **Results** Antisense hTERT remarkably reduced endogenous hTERT mRNA expression ($P < 0.01$) and down-regulated telomerase activity in HL₆₀, as compared with the blank control and sense hTERT. After 25 passages of the 3 cell lines, a 7-day cell growth curve and the numbers (size) of soft agar colony formation showed that the proliferation rates and the anchorage-independent growth ability of HL₆₀-as cells were significantly decreased in comparison with HL₆₀ and HL₆₀-s cells, but a significant increase in apoptosis of HL₆₀-as cells occurred as determined by flow cytometry. **Conclusions** Antisense hTERT can obviously inhibit leukemia cell growth and proliferation *in vitro*, and this telomerase-targeted molecular biotherapy may be achieved by apoptosis pathway through down-regulation of hTERT mRNA and telomerase activity.

Key words: antisense human telomerase reverse transcriptase; leukemia; quantitative real-time RT-PCR; cell proliferation; molecular biotherapy

人类恶性肿瘤细胞区别于正常组织细胞的最明显生物学特性就是其与整个机体不相协调地无限增殖分裂。近十多年来的大量研究表明恶性肿瘤的这种永生化能力与一种核糖核蛋白复合体的逆转录

酶——端粒酶的活化密切相关^[1,2]。同样白血病及其细胞株也不例外地存在着端粒酶活性的高表达情况^[3]。目前已证实端粒酶至少由 2 种主要成分构成, 一种为人端粒酶 RNA (hTR) 组分, 另一为人端粒酶逆转录酶蛋白催化亚单位 (hTERT), 后者才是其活性表达的关键组分和限速因子^[4]。基于端粒酶在恶性肿瘤中的这种特殊地位, 本研究旨在将靶向端粒酶蛋白亚基的反义 hTERT 基因真核表达载体转染白血病细胞 HL₆₀, 观察其对白血病细胞端粒酶基因表达、活性的影响及体外增殖生长的抑制作用, 为进一步探索恶性

收稿日期: 2003-12-28

基金项目: 深圳市卫生科技计划基金资助项目 (199805021)

Supported by Shenzhen Foundation for Medical Science and Technology Research (199805021)

作者简介: 孙来保 (1969-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤分子病理及基因治疗研究, 电话: 0755-83936178, E-mail: sunlb163@hotmail.com

肿瘤的分子生物治疗途径奠定实验基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 JM109 及 HeLa 宫颈癌细胞株、HL₆₀ 白血病细胞株为本室冻存, pGEM[?]-T 载体为 Promega 公司产品, 高效真核表达质粒 pcDNA3.1(±) 为 Invitrogen 公司产品, 限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I 为 NEB 公司产品。细胞总 RNA 提取试剂 RNeasy 试剂盒、反转录试剂盒、质粒小量提取试剂盒、PCR 产物回收、凝胶回收试剂盒、EndoFree 质粒试剂盒及 SuperFect Transfection Reagent 均为 Qiagen 公司产品。DNA Ligation 试剂盒为 TaKaRa 产品。Advantage-GC 2 PCR 试剂盒为 Clontech 公司产品。G418 购自上海 Sangon, MTT 为美国 Amresco 产品。

1.2 正、反义 hTERT 基因真核表达载体的构建与鉴定 参见文献[5]方法。

1.3 细胞培养

体外常规培养 HL₆₀ 白血病细胞, 培液为 RPMI 1640 (Gibco/BRL) + 10% 胎牛血清 (HyClone) + 双抗 100 U/ml。在含 5% CO₂ 饱和湿度的 37 °C 培养箱中培养。转染后筛选培液为 RPMI 1640 + 10% 胎牛血清 + 300 μg/ml G418。

1.4 转染及筛选

首先将上述含有正确克隆的正、反义 hTERT 重组载体经 EndoFree 试剂盒大量提取并定量, 针头过滤器除菌后备用。待细胞生长至对数增长期时分成 3 组, 即空白对照组、正义 hTERT 组和反义 hTERT 组。将事先准备好的质粒按 SuperFect Transfection Reagent 说明书并参考文献[6]转染 HL₆₀ 白血病细胞。48 h 后按 1:10 稀释传代培养, 培液内加入 800 μg/ml G418, 约 5 d 后对照组细胞大都死亡。调 G418 浓度至 300 μg/ml 以继续维持筛选作用。最后将正、反义 hTERT 组获得的 G418 抗性克隆扩大培养, 同时采用位于 pcDNA3.1 载体多克隆位点两侧的 T7 及 pcDNA3.1/BGH 反向引物进行 PCR 鉴定, 并分别命名为 HL₆₀-s、HL₆₀-as。

1.5 实时荧光定量 RT-PCR 对 hTERT 表达水平的检测

分别收集 HL₆₀、HL₆₀-s、HL₆₀-as 各组细胞, 采用 RNeasy 试剂盒立即提取细胞总 RNA 并定量, -80 °C 冻存。实时在线荧光定量 RT-PCR 是在罗氏 LightCycler 荧光定量 PCR 仪上进行, 所采用的试剂为罗氏 LightCycler TeloTAGGG hTERT Quantification Kit, 具体的逆转录及 PCR 循环参数见操作手册。20 μl 的 PCR 反应混合物准备如下: 2 μl hTERT 反应混合物, 0.1 μl 逆转录酶, 2 μl hTERT 或 PBGD 检测混合物,

13.9 μl 无核酸酶水, 最后 2 μl 为相应的阳标 1-5、纯化自表达 hTERT 永生化细胞株的阳性对照 RNA、阴性对照无核酸酶水、待测样本 RNA (100~200 ng)。最后结果数据采用 LightCycler3.5 版本分析软件在 F2/F1 模式下进行定量分析。hTERT mRNA 含量 NhTERT (标化) 以 hTERT/(PBGD·1000) 的相对比值来表示, 其中 hTERT 为端粒酶蛋白催化亚单位基因的拷贝数, PBGD 为细胞管家基因拷贝数^[7]。

1.6 端粒酶活性测定

采用非放射性 TRAP- 银染法, 按参考文献[8]进行。

1.7 细胞增殖生长能力的测定

HL₆₀、HL₆₀-s 及 HL₆₀-as3 组细胞 7 d 生长曲线的绘制系采用 MTT 法并参考文献[9]进行, 酶标仪为 Bio-Rad Model 550。双层软琼脂克隆形成试验参考文献[9]方法。

1.8 细胞凋亡的检测

采用 Annexin V-FITC/PI (Pharmingen) 双染色法, 分别收集各组细胞, 用冷 PBS 洗 2 次, 重悬于 1× 结合缓冲液并调细胞浓度至 (2~5) × 10⁵/ml, 取 195 μl 细胞悬液加 5 μl Annexin V-FITC, 混合室温避光孵育 10 min。洗涤 1 次重悬于 190 μl 1× 结合缓冲液, 加 10 μl PI (20 μg/ml) 混合室温避光孵育 15 min。其中有 3 管, 1 管不加任何染色剂用作调电压, 另 2 管只加 Annexin V 或 PI, 用作调补偿, 所有检测数据结果经 Expo2 软件获取分析。检测用仪器为美国 COULTER EPICS ALTRA 流式细胞仪。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 软件 10.0 版分析。

2 结果

2.1 正、反义 hTERT 基因真核表达载体的构建与鉴定 参见文献[5]。

2.2 转入重组体的正、反义 hTERT 组 G418 抗性克隆转入重组体的筛选鉴定

常规提取细胞 DNA 后, 采用位于 pcDNA3.1 质粒载体多克隆位点两侧的 T7 及 pcDNA3.1/BGH 反向引物进行 PCR 扩增外源性基因片段 (图 1)。HL₆₀-as、HL₆₀-s G418 抗性克隆均可见 1 条大小约 340 bp 的特异性条带, 而空白对照组则未见, 说明 HL₆₀ 白血病细胞已被成功地转入了正、反义 hTERT 外源重组体。

2.3 反义 hTERT 对端粒酶蛋白亚单位基因表达的影响

为了更精确地反映我们自行构建的反义 hTERT 真核表达载体对白血病细胞端粒酶蛋白亚单位基因表达的靶向封闭及抑制效果, 采用了 LightCycler 实

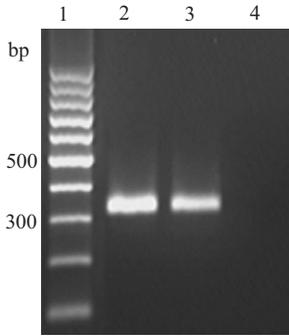


图 1 G418 抗性克隆外源基因片段的 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR amplification of the exogenous gene fragment in G418-resistant colonies

Lane 1: 100 bp ladder marker; Lane 2: HL₆₀-as; Lane 3: HL₆₀-s; Lane 4: HL₆₀

时荧光定量 RT-PCR 技术对各组细胞经转染后内源性 hTERT mRNA 表达量的实际变化情况进行了检测(表 1)。正义 hTERT 组与空白对照组间无显著差别,反义组 hTERT mRNA 表达量则见明显下降,与空白对照组间有极显著差异($P<0.01$)。

表 1 各组 hTERT mRNA 表达的实时荧光定量 PCR 检测结果 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Quantitative real-time RT-PCR results of hTERT mRNA expression in each group (Mean±SD)

Group	Mean NhTERT HL ₆₀
Control	38.3±2.32
Sense hTERT	36.4±2.78*
Antisense hTERT	6.33±0.96**

* $P>0.05$, ** $P<0.01$ vs control

2.4 反义 hTERT 对白血病细胞端粒酶活性的影响

分别收集 HL₆₀、HL₆₀-s、HL₆₀-as 各组细胞,并采用非放射性 TRAP- 银染法对其端粒酶的活性进行检测(图 2)。结果显示反义 hTERT 组的端粒酶活性(PCR 产物梯度条带)较空白对照组、正义 hTERT 组明显降低(减少),这与上述反义 hTERT 组能显著下调内源性 hTERT mRNA 表达量的结果相一致。

2.5 反义 hTERT 对白血病细胞体外增殖的抑制作用

分别取 HL₆₀、HL₆₀-s 及 HL₆₀-as 3 组传至第 25 代的细胞来绘制 7 d 生长曲线(图 3)。从图观察 HL₆₀-as 细胞增殖速度较 HL₆₀、HL₆₀-s 细胞明显减低,以后 3 d 尤为显著($P<0.05$)。另外双层软琼脂克隆形成试验亦是用 3 组传至第 25 代的细胞来进行的,结果显示 HL₆₀-as 细胞无论在集落形成的数量或是大小上均较 HL₆₀、HL₆₀-s 2 组细胞明显减少、变小,差异有显著性($P<0.01$)。分别是:HL₆₀-as 为 38.3 ± 3.5 ,HL₆₀-s 为 125.67 ± 7.02 ,HL₆₀ 为 133.33 ± 9.07 。

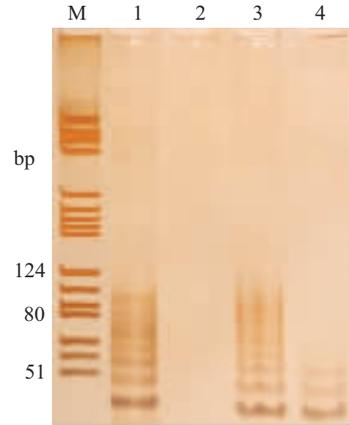


图 2 HL₆₀ 端粒酶活性的 TRAP 银染结果

Fig.2 TRAP-silver staining results of HL₆₀ telomerase activity

M: PBR322 DNA/Hae III marker; Lane 1: HL₆₀-s group; Lane 2: Negative control; Lane 3: Blank control; Lane 4: HL₆₀-as group

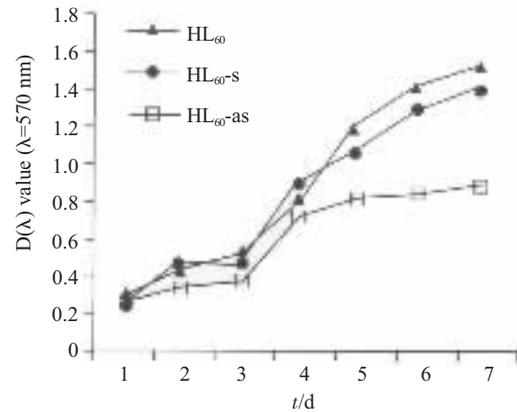


图 3 3 组细胞第 25 代之 7 d 生长曲线

Fig.3 Growth curves of the 25 th generation of the 3 cell lines in a 7-day incubation

2.6 反义 hTERT 诱导白血病细胞凋亡

为了进一步阐明反义 hTERT 是否通过诱导肿瘤细胞的凋亡途径来抑制肿瘤增殖,我们分别取 HL₆₀、HL₆₀-s 及 HL₆₀-as 三组传至第 5、25 代的细胞来检测(图 4)。在第 5 代时检测结果显示各组间无显著性差异(资料未显示)。

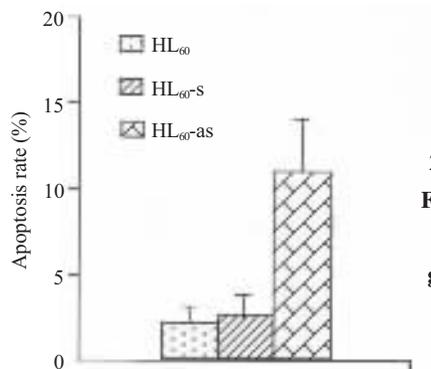


图 4 三组细胞第 25 代之凋亡百分率
Fig.4 Apoptotic rate of the 25 th generation of the 3 cell lines

3 讨论

恶性肿瘤乃当今危害人类生命健康及导致死亡的主要原因之一, 尽管传统的手术及放化疗方法不断发展, 但对患者的治愈率仍不理想。近年来大量的研究发现了一种于癌细胞和正常细胞间高度差异表达的物质——端粒酶, 为肿瘤的分子生物学治疗带来了新的思路和高度特异的靶点。端粒酶是一种核糖核蛋白复合体的逆转录酶, 其主要功能是维持染色体末端端粒(telomere, 作为细胞的有丝“分裂钟”决定着细胞的剩余复制能力)的长度。目前已证实端粒酶在约98%永生细胞株和90%以上的恶性肿瘤组织中表达, 正常周边组织细胞却少有表达^[1,2], 而且 hTERT 蛋白亚基组分才是其活性表达的决定因素^[4]。因此本研究首先采用分子克隆技术, 成功地构建了能特异靶向封闭对启动内源性 hTERT 基因表达起关键作用的起始密码子前后一段序列的反义 hTERT 真核表达载体^[5], 为进一步研究其对白血病细胞内源性 hTERT mRNA 表达、端粒酶活性的影响及体外增殖生长的抑制作用打下了坚实的实验基础。

为了更精确地反映我们自行构建的反义 hTERT 真核表达载体对白血病细胞内源性 hTERT mRNA 表达的靶向封闭及抑制效果, 采用了 LightCycler 实时荧光定量 RT-PCR 技术对转染 HL₆₀ 白血病细胞前后的内源性 hTERT mRNA 表达量的实际变化情况进行了检测。结果表明正义 hTERT 组与空白对照组间无显著差别, 反义组 hTERT mRNA 表达量则见明显下降, 与空白对照组间有极显著差异($P < 0.01$)。同时还运用我们以前建立的简便快速、敏感而有效的非放射性 TRAP- 银染法^[8]对转染前后各组的端粒酶活性进行了检测, 结果显示反义 hTERT 组的端粒酶活性(PCR 产物梯度条带)较空白对照组、空载体组明显降低(减少)。以上的研究结果强烈提示我们自行构建的反义 hTERT 真核表达载体确实能明显有效地封闭和抑制 hTERT mRNA 的表达和下调端粒酶的活性, 在抗肿瘤靶向分子生物学治疗中有着高度特异性和潜在应用的广泛性; 同时也进一步证实了端粒酶的活性主要由 hTERT 蛋白亚基决定。

另外为了探讨反义 hTERT 对白血病细胞的体外增殖生长特性的改变和影响, 我们还采用了 MTT 法、双层软琼脂克隆形成试验、流式细胞术分别对各组传至第 5、25 代的细胞进行了观察和分析。结果与空白对照、正义 hTERT 组比较, 传至第 25 代的反义

hTERT 组细胞无论在生长速度还是在集落形成的数目、大小上均明显地减慢和降低, 同时凋亡率显著地增加; 但传至第 5 代的细胞进行同样的检测实验结果却未见明显改变(资料未显示)。究其原因这可能与 HL₆₀ 白血病细胞的染色体末端的起始端粒长度有关, 只有当端粒缩短到一定长度才引发细胞衰亡^[10]。因此尽管转入了反义 hTERT 重组体的白血病细胞内在的端粒酶活性能很快地被抑制并且不能再添加端粒重复序列, 但细胞的起始端粒长度在此却起了缓冲作用。因此本研究构建的反义 hTERT 潜在的广谱抗肿瘤分子生物治疗机制可能是首先通过抑制和下调 hTERT 表达(端粒酶活性)而最终引发瘤细胞走向衰亡。

参考文献:

- [1] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer[J]. *Science*, 1994, 266(352): 2011-4.
- [2] Shay JW, Zou Y, Hiyama E, *et al.* Telomerase and cancer[J]. *Hum Mol Genet*, 2001, 10(7): 677-85.
- [3] Shay JW, Werbin H, Wright WE. Telomere and telomerase in human leukemia[J]. *Leukemia*, 1996, 10(23): 1255-61.
- [4] Kirkpatrick KL, Mokbel K. The significance of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in cancer[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2001, 27(8): 754-60.
- [5] 孙来保, 李成荣, 文剑明, 等. 正、反义 hTERT 基因真核表达载体的构建与鉴定[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(9): 899-902.
Sun LB, Li CR, Wen MJ, *et al.* Construction and identification of eukaryotic expression vector for sense and antisense human telomerase reverse transcriptase [J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2003, 23(9): 899-902.
- [6] Teixeira LA, Fricke CH, Bonorino CB, *et al.* An efficient gene transfer system for hematopoietic cell line using transient and stable vectors[J]. *J Biotechnol*, 2001, 88(2): 159-65.
- [7] Emrich T, Karl G, Panzinger B. Detection of telomerase components by quantitative real-time on-line PCR analysis with the LightCycler [J]. *Biochemica*, 2000, 4(1): 16-9.
- [8] 孙来保, 文剑明, 张萌, 等. 侵袭性骨肿瘤端粒酶活性检测及其意义[J]. 中华骨科杂志, 1998, 18(10): 615-8.
Sun LB, Wen JM, Zhang M, *et al.* Telomerase activity in aggressive bone tumors and its significance[J]. *Chin J Orthop*, 1998, 18(10): 615-8.
- [9] 程宝鸾. 动物细胞培养技术[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2001. 124-32.
- [10] White LK, Wright WE, Shay JW. Telomerase inhibitors[J]. *Trends Biotechnol*, 2001, 19(3): 114-20.