

siRNA 介导的 *hPOT1* 基因表达抑制对 HeLa 细胞凋亡的影响

黄迪南*, 姜英华, 梁爱玲

(广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 广东 湛江 524023)

摘要: 目的 应用 siRNA 表达载体介导的 RNAi 技术, 特异地抑制端粒保护蛋白 *hPOT1* 基因在 HeLa 细胞中的表达, 并观察其对细胞凋亡的影响。方法 利用先前构建的含 *hPOT1* 基因特异性序列 (hsRNA) 的 3 种重组 siRNA 表达质粒, 由脂质体介导转染 HeLa 细胞, 以 RT-PCR 和电泳迁移率变化分析法检测转染细胞中的 *hPOT1* 基因的表达抑制效果, 并通过流式细胞术、Hoechst 荧光染色和 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡。结果 不同 *hPOT1* 特异性序列的 3 种重组质粒转染 HeLa 细胞 48 h 后, 细胞中 *hPOT1* 基因 mRNA 和蛋白质表达水平降低, 细胞凋亡水平明显增加。结论 siRNA 表达载体介导的 RNAi 能有效地抑制 HeLa 细胞中 *hPOT1* 基因表达, *hPOT1* 基因表达下调导致 HeLa 细胞凋亡。

关键词: RNA 干扰; 基因, *hPOT1*; 凋亡

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2005)02-0103-05

POT1(protect of telomere 1)蛋白于 2001 年被确定为一种单链端粒 DNA 结合蛋白。普遍存在于真核细胞中。在 T-loop 的基础上与端粒 3' 端富 G 单链结合, 对端粒的维持具有重要的作用, 故命名为端粒保护蛋白^[1,2]。人 POT1(*hPOT1*)蛋白的生物学功能和对端粒的调节机制迄今仍不是十分清楚。作者应用小分子干扰 RNA (small interfering RNAs, siRNA) 表达载体介导的 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术, 特异性地抑制 *POT1* 基因在 HeLa 细胞中的表达, 并观察其对 HeLa 细胞凋亡的影响。为进一

步研究其生物功能和端粒调节作用机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒及主要试剂

大肠杆菌 TOP10 和 siRNA 表达载体 pmU6 为本教研室何承伟副教授赠送, 内切酶 Bbs I 购自英国 NEB 公司, T₄ DNA ligase 购自宝生物工程有限公司, 转染试剂 DOTAP liposomal transfection reagent 购自 Roche 公司, T₄ polynucleotide kinase 购自 Promega 公司, γ -³²P-ATP 购自北京福瑞生物工程公司。

1.2 重组 siRNA 表达质粒

3 种含 *hPOT1* 特异性序列的 siRNA 表达质粒 (pmU6-shDNA1、pmU6-shDNA2 和 pmU6-shDNA3) 为作者课题组先前构建 (另有报道)。

shDNA1 position in cDNA sequence: 619 - 639 bp

Top strand oligonucleotide template:

5'-TTTGACCTTGTCTTGAAGGTGTTCAAGAGACACCTTCA-AGAACAAGGTCCTTTT-3' (55 mer)

Bottom strand oligonucleotide template:

5'-GCTAAAAAAGACCTTGTCTTGAAGGTGCTCTTTGAACA-CCTTCAAGAACAAGGT-3' (55 mer)

shDNA2 position in cDNA sequence: 134 - 154 bp

Top strand oligonucleotide template:

5'-TTTGCAAAGGAACTGATTATTGTTCAAGAGACAATAAT-CAGTTCCTTTGCTTTT-3' (55 mer)

Bottom strand oligonucleotide template:

5'-GCTAAAAAAGCAAAGGAACTGATTATTGCTCTTTGAACAATAATCAGTTCCTTTG-3' (55 mer)

shDNA3 position in cDNA sequence: 171 - 190 bp

Top strand oligonucleotide template:

5'-TTTGTGGACCAGACAAATGTAAATTCAGAGATTACATTTGTCTGGTCCACTTTT-3' (57 mer)

Bottom strand oligonucleotide template:

5'-GCTAAAAAAGTGGACCAGACAAATGTAAATCTCTTTGAA-TTTACATTTGTCTGGTCCA-3' (57 mer)

其中: TTCAAGAGA 为 loop sequence; 下划线处为

收稿日期: 2004-09-06 接受日期: 2004-11-20

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (0401397)

作者简介: 黄迪南 (1962 -), 男, 湖南省双峰县人, 副教授, 主要从事分子生物学研究。

* 联系作者 E-mail: dinanh@gdmc.edu.cn Tel: (0759) 2388895 Fax: (0759) 2284104

Bbs I 酶切位点。

1.3 HeLa 细胞的瞬时转染

重组质粒采用碱裂解法大量提取,并用 PEG 法进行纯化。纯化质粒按 DOTAP 脂质体试剂的说明转染 HeLa 细胞,48 h 后收获细胞。简要过程:将溶液 A(溶解质粒 2 μg 于 HBS 溶液中,终体积 25 μL)和溶液 B(溶解 DOTAP 15 μL 于 35 μL HBS 中)温和混匀,室温放置 10 ~ 15 min,即为 DOTAP/核酸混合物。温和的将 DOTAP/核酸混合物与 1 mL 无抗生素培养基混匀,即为转染混合液。HeLa 细胞按 1×10^5 细胞/培养皿接种于 35 mm 的培养皿中,每孔加 2 mL 培养基,待细胞生长至 60% ~ 80% 汇合。吸弃旧培养基,将转染混合液加入培养皿中,培养 6 h,吸弃培养基,直接加入无抗生素的新鲜培养基,继续培养 48 h 后收获细胞,即可进行检测。鉴于在低于 150 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时, DOTAP 脂质体在体外对 HeLa 细胞未显示细胞毒性(Roche 公司产品说明书),而转染所用脂质体浓度仅 5 ~ 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,故未设 DOTAP 脂质体对照组。

1.4 RNA 干扰效果的检测

1.4.1 RT-PCR 检测 *hPOT1* mRNA 表达水平

hPOT1 扩增引物(扩增产物 302 bp):

Sense primer:5'-CATACCTCGCACTCAAGCA-3'(20 mer)

Antisense primer:5'-TTTGTAGCCGATGGATGTA-3'(20 mer)

内参照 GAPDH 扩增引物(扩增产物 452 bp):

Sense primer:5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'(20 mer)

Antisense primer:5'-TCCACCACCCTGTGCTGTGA-3'(20 mer)

引物由上海生工生物工程有限公司合成。

TRIZOL 法提取细胞总 RNA,采用 M-MLV Reverse Transcriptase 试剂盒进行反转录。PCR 反应体系为 25 μL ,PCR 条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min 变性后,按下列热循环参数 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 进行 30 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖(含 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 溴化乙啶)电泳,紫外透射仪观察拍照。

1.4.2 电泳迁移率变化分析(electrophoresis mobility assay, EMSA 法)检测 *hPOT1* 蛋白表达水平

参照 Baumann 等^[1]和 Marsich 等^[3]报道的方法进行。整个实验过程包括核蛋白的提取,探针的标记和纯化,探针与蛋白的结合反应,非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(4%凝胶)、磷屏显影等步骤。探针由上海生工生物工程有限公司合成。

端粒序列特异性探针:5'-GGTTAGGGTTAGGG-

TTAGGG-3';非特异性探针(特异性探针的随机打散序列):5'-GGATGTGGAGTGGGTTGATG-3'。

1.5 流式细胞术分析

0.25%胰酶消化细胞,PBS 洗涤 2 次并制成单细胞悬液,加预冷的 70%乙醇固定过夜。固定好的细胞再用 PBS 洗涤 2 次,加碘化丙啶至终浓度 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (含 RNase A 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),闭光室温放置 30 min,流式细胞仪检测。

1.6 Hoechst 33 258 荧光染色

0.25%胰酶消化细胞,PBS 洗涤 2 次并制成单细胞悬液,3%甲醛室温下固定,Hoechst 33 258 染液(终浓度为 16 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)重悬细胞染色,荧光显微镜下观察。每次计数 300 个细胞,计算凋亡百分率,共 3 次。

1.7 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析

染色体组 DNA 提取:采用 Cross-Belard 等的酚抽提法从培养细胞中提取染色体组 DNA。在 1.5% 的琼脂糖凝胶(含 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 溴化乙啶)上电泳 60 min,结果用紫外透射仪观察。

2 结果

2.1 RT-PCR 和电泳迁移率变化分析结果

RT-PCR 结果显示,3 种 siRNA 表达载体转染 HeLa 细胞 48 h 后,细胞内 *hPOT1* 基因 mRNA 水平明显降低,其中以 pmU6-shDNA3 效果最明显(图 1)。

EMSA 检测结果可见,在 3 种 siRNA 表达载体

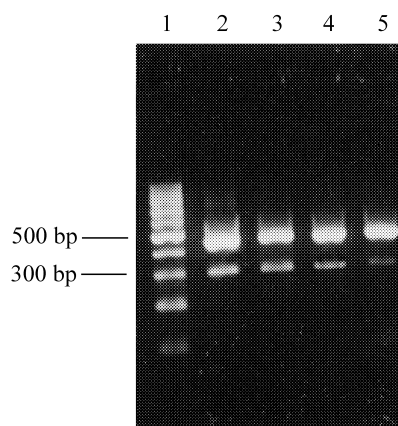


Fig 1. Identification of the *hPOT1* transcription by reverse transcription polymerase chain reaction. Lane 1: 100 bp ladder; lane 2: controlled cells with no transfection; lanes 3, 4, 5: transfected cells with pmU6-shDNA1-3.

转染后, hPOT1 蛋白水平有不同程度的降低。实验中为了验证结合反应的特异性, 做了竞争性实验(加100倍未标记的特异性探针)和非竞争性实验(加100倍未标记非特异性探针, 图2)。

2.2 流式细胞术检测细胞凋亡

与未转染细胞比较, 3种 siRNA 表达质粒转染后, DNA 直方图均可见到明显的亚二倍体峰(sub-G₁ 峰), 细胞凋亡率分别为: 对照细胞(4.5%), pmU6-shDNA1(12.1%), pmU6-shDNA2(17.7%)和 pmU6-shDNA3(18.8%), 以 pmU6-shDNA3 的效果最强(图3)。

2.3 Hoechst 33 258 荧光染色

经 Hoechst 33 258 荧光染色, 正常细胞的 DNA 疏松均匀、荧光表现为弥散均匀; 凋亡细胞固缩、DNA 浓缩并向核膜靠近, 荧光表现为高亮度的块状或点状。结果显示, 与未转染细胞比较, siRNA 表达质粒(pmU6-shDNA3)转染后, 能明显诱导的 HeLa 细胞凋亡(图4)。凋亡百分率(%)分别为: 对照细胞(9.1 ± 3.5), pmU6-shDNA1(22.4 ± 5.8), pmU6-shDNA2(18.6 ± 6.1)和 pmU6-shDNA3(29.5 ± 6.6)。

2.4 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析

经 DNA 琼脂糖凝胶电泳, 未转染细胞和 3 种 siRNA 表达质粒转染细胞 48 h, 均未见明显的 DNA

梯形(电泳结果未显示)。

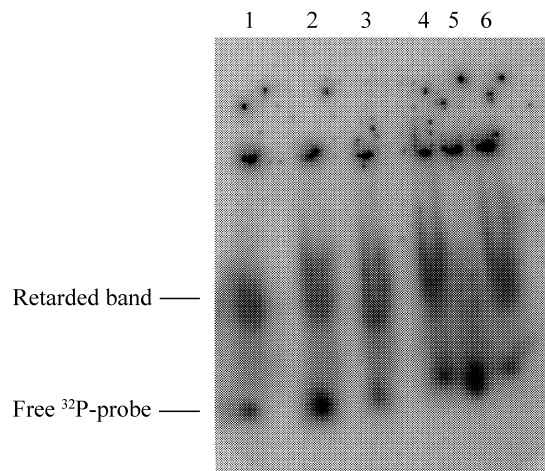


Fig 2. Identification of hPOT1 protein by electrophoresis mobility assay. Lanes 1,2,3: incubation of ³²P-labeled probe oligonucleotide with 5 μg nuclear extract isolated from pmU6-shDNA 1-3, respectively, transfected HeLa cells; lane 4: incubation of ³²P-labeled probe oligonucleotide with 5 μg HeLa nuclear extract and with 100-fold excess of cold nonspecific oligonucleotide; lane 5: incubation of ³²P-labeled probe oligonucleotide with 5 μg HeLa nuclear extract and with 100-fold excess of cold probe oligonucleotide; lane 6: incubation of ³²P-labeled probe oligonucleotide with 5 μg HeLa nuclear extract.

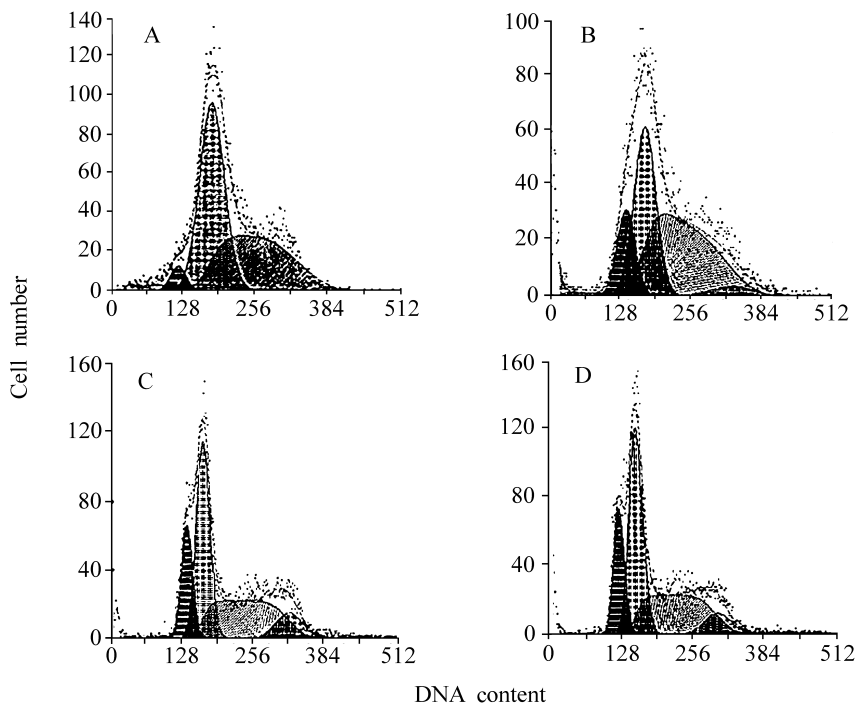


Fig 3. Apoptosis detected by flow cytometry. A: controlled cells; B, C, D: cells transfected with pmU6-shDNA1-3, respectively, 48 h after transfection.

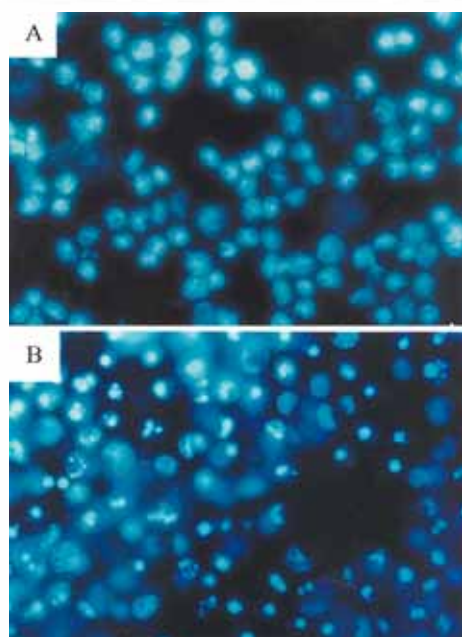


Fig 4. Fluorescence staining with Hoechst 33 258. A: control cells; B: cells transfected with pmU6-shDNA3 for 48 h.

3 讨论

由于 hPOT1 蛋白是 2001 年新发现的端粒单链 DNA 结合蛋白,目前尚无市售的抗体,故不能通过常用的 Western 印迹检测蛋白表达水平。作者参照有关文献^[1,3],采用检测 DNA 结合蛋白的一种非常有效的方法——EMSA 法进行。结果显示,100 倍非特异性探针的加入对蛋白与特异性探针的结合无明显影响,100 倍特异性探针的加入使滞后带基本消失。表明被检测蛋白质与探针的结合具有端粒单链序列特异性。POT1 蛋白是目前唯一被确认的高等真核细胞的端粒单链结合蛋白。因而,采用 EMSA 法检测端粒单链 DNA 结合蛋白,再结合特异的 RT-PCR 法检测 mRNA 表达,可以有效地反映 hPOT1 基因表达水平。

hPOT1 基因位于 7 号染色体,全长 73 983 bp, cDNA 全长 2631 bp,编码区为 24 ~ 1928 bp。共有 22 个外显子,翻译起始于第 5 外显子,大多数外显子在 cDNA 中均能检测出来,但有 4 个外显子于某些转录中出现跳跃现象,产生 5 种异构体,其中 4 种于所有细胞中均表达,第 5 种有白细胞特异性,5 种不同的蛋白与 3' 单链末端结合能力差别极大^[2]。这些特点是构建重组 siRNA 表达质粒时应予以重视的问题。因此,作者在构建 siRNA 表达质粒时,靶序列选择的条件亦考虑到:①位于编码区内;②避开可能发生跳

跃的剪接点位置;③5 种剪接突变体中都出现的区段(靠近 cDNA-5' 端)。实验结果显示,3 种重组 siRNA 表达质粒瞬时转染 HeLa 细胞 48 h 后,RT-PCR 和 EMSA 法检测细胞中 hPOT1 基因 mRNA 和蛋白表达水平均下调。表明先前构建的 3 种重组的 siRNA 表达质粒,均能有效介导特异的 hPOT1 基因表达沉默。其中以 pmU6-shDNA3 效果最好,其靶序列位于 hPOT1 cDNA 的 171 ~ 190 bp 处。

hPOT1 蛋白的生物学功能和作用机制迄今仍不是十分清楚。它可能起中介作用,在端粒酶与端粒结合之前保护端粒 3' DNA,还可能参与端粒酶或其他酶对染色体的调控作用^[4]。在端粒酶阳性的细胞系 HT1080 中过表达 hPOT1 的 3 种异构体均导致端粒长度的增加。而它们在端粒酶阴性的细胞中的过表达则对端粒长度无影响,当诱导端粒酶活性后,又能导致长度增加,故 hPOT1 蛋白对端粒的调控可能是一种端粒酶依赖的端粒延长机制^[5]。Kondo 等^[6]研究表明在胃癌中,随着 hPOT1 表达水平的降低,3' 端粒末端单链和端粒长度均降低,hPOT1 的抑制还增加分裂后期的染色体搭桥的几率。另外,在胃癌中用反义寡核苷酸对 POT1 表达的抑制,导致端粒缩短效应和端粒酶活性被抑制时引发的效应,表明 hPOT1 在端粒长度调控方面起重要作用。本研究显示,3 种重组的 siRNA 表达质粒瞬时转染 HeLa 细胞后,能有效介导特异的 hPOT1 基因表达沉默。由于 HeLa 细胞是端粒酶阳性细胞,根据上述观点,作者推测 hPOT1 在 HeLa 细胞的表达抑制,可能会通过端粒酶依赖的途径起到负调节染色体端粒长度,并导致端粒的完整性和不稳定性增加。但由于是瞬时表达,估计对端粒长度的影响非常有限,故未进行端粒长度检测。

越来越多的证据显示^[7],端粒的完整性和端粒酶能够使细胞免于凋亡,端粒帽的破坏能够在某些肿瘤细胞中触发凋亡,类似于细胞对 DNA 损伤的应答。Mark 等^[8]报道,DNA 寡核苷酸类似物加入到端粒 3' 悬挂序列(telomere 3' overhang sequence),伴随着端粒环的破坏能引起淋巴细胞凋亡。Multani 等^[9]的研究显示,端粒断裂和 TRF2 丢失诱导半胱天冬酶依赖的细胞凋亡。在本研究中,流式细胞术分析表明,3 种 siRNA 表达质粒介导的 hPOT1 表达抑制均导致 HeLa 细胞凋亡增加,其中以 pmU6-shDNA3 效果最好。Hoechst 33 258 荧光染色检测亦表明,3 种 siRNA 表达质粒瞬时转染后 HeLa 细胞凋亡率均增加,其中亦以

pmU6-shDNA3 转染细胞凋亡特征最明显。但 Hoechst 33 258 荧光染色所得各组的凋亡百分率均明显高于流式细胞术分析,这可能与检测方法的灵敏度有关。这些细胞凋亡分析结果与 RT-PCR 和 EMSA 检测的转染细胞 *hPOT1* 表达抑制程度的趋势相一致。虽然染色体组 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析,对照组细胞和转染细胞均未见明显的 DNA 梯形出现。实际上,并非所有的细胞凋亡都能观察到明显的 DNA 梯形。因此,不应影响对 *hPOT1* 表达抑制均导致 HeLa 细胞凋亡这一结论的判断。

根据前述观点,作者推测,由于 *hPOT1* 在 HeLa 细胞(端粒酶阳性)的表达下调,可能通过端酶依赖的途径起到负调节染色体端粒长度作用,并导致端粒的完整性和不稳定性增加,触发类似于细胞对 DNA 损伤的应答,最终导致细胞凋亡。但其确切机制有待进一步探明。

4 参考文献:

- [1] Baumann P, Cech TR. POT1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and human[J]. *Science*, 2001, **292**(5519):1171 - 1175.
- [2] Baumann P, Podell E, Cech TR. Human POT1 protein: cytolocalization, gene structure and alternative splicing[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, **22**(22):8079 - 8087.
- [3] Marsich E, Piccini A, Xodo LE, Manzini G. Evidence for a HeLa nuclear protein that binds specifically to the single-stranded d(CCCTAA)_n telomeric motif[J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, **24**(20):4029 - 4033.
- [4] Neidle S, Parkinson G. Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, **1**:383 - 393.
- [5] Colgin LM, Baran K, Baumann P, Cech TR, Reddel RR. Human POT1 facilitates telomere elongation by telomerase[J]. *Curr Biol*, 2003, **13**(11):942 - 946.
- [6] Kondo T, Oue N, Yoshida K, Mitani Y, Naka K, Nakayama H, et al. Expression of POT1 is associated with tumor stage and telomere length in gastric carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2004, **64**(2):523 - 529.
- [7] Mondello C, Scovassi AI. Telomeres, telomerase, and apoptosis[J]. *Biochem Cell Biol*, 2004, **82**(4):498 - 507.
- [8] Eller MS, Puri N, Hadshiew IM, Venna SS, Gilchrist BA. Induction of apoptosis by telomere 3' overhang-specific DNA[J]. *Exp Cell Res*, 2002, **276**(2):185 - 193.
- [9] Multani AS, Ozen M, Narayan S, Kumar V, Chandra J, McConkey DJ, et al. Caspase-dependent apoptosis induced by telomere cleavage and TRF2 loss[J]. *Neoplasia*, 2000, **2**(4):339 - 345.

Effects of RNAi-mediated gene silencing of *hPOT1* expression on apoptosis of HeLa cell

HUANG Di-Nan*, JIANG Ying-Hua, LIANG Ai-Ling

(Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: **AIM** To silence the expression of human telomere protection gene *hPOT1* in HeLa cells using vector based on RNA interference (RNAi) technique and to investigate its effects on the apoptosis of HeLa cell. **METHODS** Three recombinant plasmids containing different *hPOT1* target sequences were transfected into HeLa cells by liposome. The expression inhibition of *hPOT1* was detected by RT-PCR and EMSA. Cellular apoptosis was inspected by flow cytometry, Hoechst fluorescent staining and DNA agar electrophoresis. **RESULTS** After 48 h of transfecting three recombinant plasmids containing dif-

ferent *hPOT1* target sequences, *hPOT1* mRNA and protein level in HeLa cells reduced and the apoptosis increased evidently. **CONCLUSION** *hPOT1* expression in HeLa cells can be inhibited significantly using plasmid-based RNAi and the down-regulation of *hPOT1* expression can cause apoptosis in HeLa cell.

Key words: RNA interference; gene, *hPOT1*; apoptosis

Foundation item: The project supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province(0401397)

* Corresponding author.

(本文编辑 石 涛)