

· 研究原著 ·

文章编号: 1000-2790(2000)03-0366-03

hTERT 基因反义核酸对 8910 卵巢癌细胞端粒酶活性的影响

杜 辉, 辛晓燕, 王 健 (第四军医大学西京医院妇产科, 陕西 西安 710033)

关键词: 端粒酶; 端粒酶催化亚单位; 卵巢癌; 细胞; 反义治疗
中图分类号: R730.53 文献标识码: A

摘要: 目的 研究人类端粒酶催化亚单位(hTERT)基因的反义寡核苷酸对卵巢癌细胞的影响 方法 采用 TRAP-ELISA 检测 8910 卵巢癌细胞在反义核酸处理前后端粒酶活性的变化 结果 hTERT 基反义核酸能有效抑制 8910 细胞端粒酶活性 结论 hTERT 基因反义核酸能显著抑制肿瘤细胞的端粒酶活性, 为恶性肿瘤治疗提供了一条新的有效的途径

Attenuation of telomerase activity by an antisense oligonucleotide against hTERT mRNA in ovarian cancer cells

DU Hui, XIN Xiaoyan, WANG Jian

Department of Obstetrics and Gynecology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

Keywords: telomerase; telomerase catalytic subunit; ovarian carcinoma; cell; antisense treatment

Abstract **AM** To study the inhibitory effect of human telomerase activity by an antisense oligonucleotide against human telomerase catalytic subunit mRNA (hTERT mRNA) in ovarian cancer cells *in vitro* **METHODS** Telomerase activity of cultured ovarian cancer cells (8910 cells) with antisense treatment was measured by using the TRAP-ELISA assay. **RESULTS** The antisense treatment could effectively inhibit the telomerase activity of 8910 cells. **CONCLUSION** Antisense oligonucleotide against hTERT mRNA can effectively inhibit the telomerase activity of tumor cells and is an effective and novel approach for the treatment of malignant cancers

收稿日期: 1999-11-01; 修回日期: 2000-01-31

作者简介: 杜 辉(1968-), 女(汉族), 新疆奇台县人, 硕士生(导师辛晓燕), Tel (029)3375392

0 引言

人类端粒是位于染色体末端的重复 DNA 序列 (TTAGGG)^[1], 有防止染色体降解、重排、缺失、断端彼此发生融合等作用, 正常体细胞中的端粒随细胞分裂, DNA 末端复制依赖序列丢失而进行性缩短, 端粒的缩短将导致染色体不稳定, 细胞衰老死亡。端粒酶是一种特殊的核糖核蛋白聚合酶, 它能以自身的 RNA 作为模板合成端粒, 弥补端粒丢失, 对维持端粒长度, 使细胞获得永生起重要作用^[2]。近年来大量研究^[3]表明, 端粒酶活性主要在恶性肿瘤组织细胞中表达, 而在正常体细胞及良性肿瘤中, 除了一些具有高度再生潜力和生殖细胞的组织外几乎不表达, 这表明端粒酶的激活可能是肿瘤发生过程中的关键因素。端粒酶催化亚单位(hTERT)是一个最近才被克隆出来的单拷贝基因^[4,5], 其基因组含有逆转录酶催化区域高度保守的特异序列。现已证明 hTERT mRNA 只在恶性肿瘤组织或肿瘤细胞株以及某些有高度再生潜力的自我更新组织(如子宫内层)中表达, 与端粒酶活性表达一致, 对癌病变特异, 其上游调节对端粒酶活性表达起重要作用, 被认为是端粒酶活性的限速决定因素^[6-8]。反义寡核苷酸是指能够特异性抑制一个基因转录或翻译的短小 RNA 片段。反义核酸治疗则是利用反义技术设计与异常激活或有害基因及其 mRNA 互补的反义寡核苷酸, 特异性地封闭这些基因使其不表达或低表达, 达到减少基因产物, 抑制细胞恶变的作用。我们设计了一段互补于 hTERT 基因的反义寡核苷酸, 作用于体外培养的 8910 卵巢癌细胞, 研究其对端粒酶活性的影响, 为卵巢癌及其它肿瘤治疗尝试一条新的治疗途径。

1 材料和方法

1.1 反义寡核苷酸合成 根据人类端粒酶 hTERT 基因 cDNA 的序列分析, 选择起始密码子上游的 6 个碱基及后续的 11 个碱基, 共 20 个碱基作为作用的靶序列。反义寡核苷酸的序列为 5'-GGA GCG-CGCGGCA TCGCGGG-3', 经计算机网上检索证实

与 hTERT 基因以外的已知人类基因无同源性 另外合成一段正义寡核苷酸序列 (5'-CCC GCGA TGC-CGCGCTCC-3') 作为对照, 上述寡核苷酸序列由美国 Gibco 生物公司合成

1.2 试剂 Telomerase-PCR-ELISA 检测试剂盒为 Boehringer Mannheim 公司产品, 小牛血清为浙江四季青公司产品, RPMI-1640 培养基为 Gibco 公司产品

1.3 细胞培养 8910, TC-1 卵巢癌细胞株, HeLa 宫颈癌细胞株由本实验室冻存 所有细胞在含 100 mL · L⁻¹ 小牛血清 (56 °C, 灭活 30 min), 1 × 10⁵ IU · L⁻¹ 青霉素, 100 mg · L⁻¹ 链霉素的 RPMI-1640 培养基, 37 °C 50 mL · L⁻¹ CO₂ 饱和温度下培养 实验选用对数生长期细胞

1.4 细胞的处理及标本制备 实验分为反义核酸作用组 (A 组)、正义核酸作用组 (B 组) 及空白对照组 (C 组). 8910 细胞生长至对数生长期后, 常规消化, 接种于 24 孔培养板, 每孔接种细胞 2 × 10⁵ 个. 在 CO₂ 培养箱中孵育过夜 (37 °C 50 mL · L⁻¹ CO₂) 后, 每天往培养液中加入 5 μmol · L⁻¹ 的寡核苷酸, 空白对照组细胞每日加等量培养液 分别收集寡核苷酸处理 24, 48, 72 h 后的细胞 (调节每组细胞数为 2 × 10⁶ 个), 加 PBS 500 μL 4 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 充分移去上清, 放 -80 °C 冰箱冻存备用或直接制备细胞抽提物 取未经任何处理的对数生长期 8910 细胞 65 °C 热处理 10 min, 作为阴性对照 同法制备不经任何处理、同样条件下培养的 TC-1 卵巢癌细胞, HeLa 宫颈癌细胞标本作为端粒酶活性检测的参考

1.5 细胞抽提物的制备 加裂解液 200 μL (冻存细胞先在冰上解冻再加裂解液), 重新充分悬浮细胞, 冰上孵育 30 min, 4 16 000 g 离心 25 min, 吸取上清备用 取培养 24 h 的正常对照组 8910 细胞抽提物 5 μL, 加入 5 μmol · L⁻¹ 的反义寡核苷酸备用

1.6 RT-PCR 扩增 取上述提取液 2 μL, 加反应混合液 25 μL (包括 dNTP, Taq 酶, 生物素标记的端粒酶引物 I 和引物 II), 补充灭菌 DEPC 水至 50 μL, 充分混匀, 在 PCR 扩增仪上按以下步骤进行 RT-PCR 扩增: 引物延伸: 25 30 min 循环 1 次; 端粒酶灭活: 94 5 min 循环 1 次; PCR 扩增: 置 94 30 s, 50 30 s, 72 90 s, 循环 29 次; 延伸: 72 10 min

1.7 扩增产物中端粒酶活性的检测 ELISA 法: 取 5 μL PCR 扩增产物, 加 20 μL 变性试剂, 室温下孵育 10 min, 加 225 μL 杂交混合液 (含地高辛标记的探针) 100 μL 充分混匀, 取 100 μL 混合液加在抗生

物素蛋白包被的微孔板上, 37 °C 摇床杂交 2 h 弃去 ELISA 微量板上的杂交液, 洗液充分清洗, 加 100 μL 和过氧化物酶偶联的抗地高辛抗体 (anti-DIG-POD), 室温下孵育 30 min 弃去 anti-DIG-POD 液, 洗液充分清洗, 加 100 μL TMB 底物溶液, 室温下孵育 15 min, 加 100 μL 终止液终止反应 在酶标仪上测定 A_{450 nm} 值 丙烯酰胺电泳: 配制 125 g · L⁻¹, 1 mm 厚丙烯酰胺凝胶, 置于 1 × TBE 电泳槽中, 取 10 μL PCR 产物, 加 6 × 上样缓冲液 3 μL 上样于凝胶孔内, 150 V 电压下电泳 3 h 后取出凝胶 EB 染色, 在紫外透射反射分析仪下观察结果并照相

2 结果

阳性对照为 Telomerase-PCR-ELISA kit 中提供的恒表达端粒酶活性的 293 细胞抽提液, 阴性对照为经 65 °C 热处理 10 min 的 8910 卵巢癌细胞

2.1 TRAP-ELISA 检测结果 阳性对照细胞株 293 细胞端粒酶 A_{450 nm} 值为 1.43, 阴性对照 A_{450 nm} 值为 0.02 空白对照组的 8910 卵巢癌细胞, 培养 24, 48 和 72 h, A_{450 nm} 值分别为 1.07, 1.09 和 1.04 正义核酸处理组 8910 细胞端粒酶活性无明显变化, 处理 24, 48 和 72 h, A 值分别为 1.08, 1.05 和 1.02 8910 卵巢癌细胞经 5.0 μmol · L⁻¹ 的 hTERT 基因反义核酸处理后端粒酶活性受到抑制, 处理 24 h 后 A_{450 nm} 值为 0.75, 其抑制率为 23.8%. 作用 48 h A_{450 nm} 值为 0.37, 其抑制率为 60%. 作用 72 h 后端粒酶活性下降明显, A_{450 nm} 值为 0.07, 其抑制率为 88.5%. 和 8910 细胞同样条件下培养, 不作任何处理的 TC-1 卵巢癌细胞, HeLa 宫颈癌细胞吸光度 A_{450 nm} 值分别为 1.35 和 1.12 用反义寡核苷酸直接作用于 8910 卵巢癌细胞抽提物, 对端粒酶活性无影响, A_{450 nm} 值为 1.10

2.2 丙烯酰胺电泳结果 阳性对照 293 细胞, TC-1 卵巢癌细胞, 反义寡核苷酸直接作用的 8910 细胞抽提物, 空白对照组及正义核酸处理组的 8910 卵巢癌细胞, 丙烯酰胺电泳均出现间隔 6 bp 的特征性阶梯形条带 阴性对照和 5.0 μmol · L⁻¹ hTERT 基因反义核酸处理 48 h 和 72 h 后的 8910 细胞, 未见明显的阶梯状条带 丙烯酰胺电泳结果与 ELISA 方法检测的结果相符 (Fig 1).

3 讨论

据目前已检测组织标本的统计结果分析, 恶性肿瘤组织端粒酶检出率高达 84% ~ 95%, 而良性肿瘤及正常组织的端粒酶检出率仅 4% 左右, hTERT 表

达与端粒酶活性检测一致 肿瘤治疗的理想靶点是肿瘤生长所必需而不存在于正常细胞的细胞成分, hTERT 的特异性, 自然使其成为肿瘤治疗的一个理想靶点

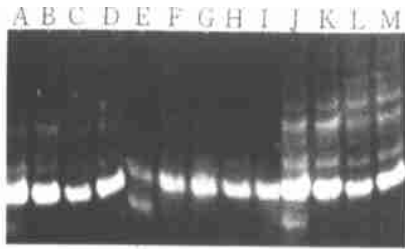


图 1 TRAP-丙酰胺电泳检测不同处理的 8910 卵巢癌细胞的端粒酶活性

Fig 1 Detecting results of telomerase activity by TRAP-PAGE assay in ovarian cancer cells 8910 with different treatment

Lane A ~ C: 8910 cells without any treatment were cultured for 24 h, 48 h, 72 h, respectively; Lane D: Extracts of 8910 cells treated with antisense oligonucleotide; Lane E: TC-1 cells; Lane F ~ H: 8910 cells were treated with antisense oligonucleotide ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ every 24 h) for 24 h, 48 h, 72 h, respectively; Lane I: Negative control; Lane J: Positive control; Lane K ~ M: 8910 cells were treated with sense oligonucleotide ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ every 24 h) for 24 h, 48 h, 72 h, respectively.

众所周知, 恶性肿瘤主要表现为细胞失去控制无限制的增长, 而端粒酶的活化是使细胞获得无限增殖能力成为永生细胞的关键因素 因此, 从理论上讲, 如果使恶性肿瘤细胞端粒酶活性受到抑制, 便能从根本控制或治愈恶性肿瘤 目前研究端粒酶对恶性肿瘤的治疗作用, 都建立在通过各种途径、各种环节抑制端粒酶活性的基础上

反义技术作为基因“封条”能够特异性封闭或抑制其靶基因的表达 目前, 端粒酶的 3 个主要组成成分: 端粒酶 RNA (hTR)、端粒酶相关蛋白 (TP1)、端粒酶催化亚单位 (hTERT) 已被鉴别, 基因序列也已被克隆, 这为利用反义技术抑制端粒酶活性, 探索肿瘤治疗的新途径提供了条件

端粒酶 RNA (hTR) 是端粒酶必要组成成分, 其基因序列含有一段与端粒酶 RNA 重复序列 (TTAGGG) 互补的模板序列^[9], 尽管已经证明 hTR 表达与端粒酶活性表达不一致^[10, 11], 但针对 hTR 或 hTR 模板区设计的反义核酸, 肽核酸却能显著抑制端粒酶活性^[12, 13] 因此, hTR 是反义核酸的非常好的靶基因 TP1 是人端粒酶的结合蛋白^[14, 15], TP1 mRNA 也广泛表达在各组织中, 与端粒酶活性表达不平行^[6-8] 目前未见以 TP1 mRNA 作为反义核酸靶基因的报道 hTERT 的 mRNA 表达已证明与端粒酶活性表达一致^[6-8], 说明 hTERT 可能是端粒酶活性的主要调节因子, 这也意味着这个蛋白的 mRNA 能成为反义核酸的另一个靶基因

我们设计了一段互补于 hTERT mRNA 的起始密码子附近的 20 mer 的反义寡核苷酸, 作用于表达端粒酶活性的 8910 卵巢癌细胞, 发现该反义核酸能抑制端粒酶活性, 特别是在反义核酸作用 2~3 d 后, 端粒酶活性显著下降, 而正义核酸处理组端粒酶活性无明显改变, 同时还发现反义寡核苷酸并不直接抑制细胞抽提物中的端粒酶活性 这说明设计互补与 hTERT 基因的反义寡核苷酸能以序列特异性方式抑 hTERT 的表达, 从而抑制端粒酶的活性, 也证明了 hTERT 与端粒酶活性密切相关, hTERT mRNA 是反义核酸治疗的一个非常好的靶基因 采用端粒酶抑制战略进行抗癌治疗具有广谱性, 尽管本实验选取反义核酸处理的细胞是卵巢癌细胞, 但显然也适用于其他肿瘤细胞, 这一优势是针对其他癌基因的治疗方法所不能具备的, 利用端粒酶抑制剂治疗肿瘤是一条新的有效的途径

参考文献

- [1] Rhyu MS. Telomeres, telomerase and immortality [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1995; 87(12): 884- 894
- [2] Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of human telomerase [J]. *Science*, 1995; 269(5228): 1236- 1241
- [3] Lundblad V, Wright WE. Telomeres and telomerase: A simple picture becomes complex [J]. *Cell*, 1996; 87(1): 369- 375
- [4] Counter CM, Meyerson M, Eaton EN *et al*. The catalytic subunit of yeast telomerase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997; 94(17): 9202- 9207
- [5] Meyerson M, Counter CM, Eaton EN *et al*. HEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene is up-regulated in tumor cells and during immortalization [J]. *Cell*, 1997; 90(4): 785- 795
- [6] Takakura M, Kyo S, Kanaya T *et al*. Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer [J]. *Cancer Res*, 1998; 58(1): 1558- 1561
- [7] Kyo S, Kanaya T, Takakura M *et al*. Expression of human telomerase subunits in ovarian malignant borderline and benign tumors [J]. *Int J Cancer*, 1999; 80(6): 804- 809
- [8] Kyo S, Kovnaya T, Takakura M *et al*. Human telomerase reverse transcriptase as a critical determinant of telomerase activity in normal and malignant endometrial tissues [J]. *Int J Cancer*, 1999; 80(1): 60- 63
- [9] Feng J, Frank WD, Wang SS *et al*. The RNA component of human telomerase [J]. *Science*, 1995; 269(5228): 1236- 1241
- [10] Avilion AA, Piatyszek MA, Gupta J *et al*. Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues [J]. *Cancer Res*, 1996; 56(3): 645- 650
- [11] Blasco MA, Rizen M, Greider CW *et al*. Differential regulation of telomerase activity and telomerase RNA during multi-stage tumorigenesis [J]. *Nat Genet*, 1996; 12(2): 200- 204
- [12] Kondl S, Kondo Y, Li G *et al*. Targeted therapy of human malignant glioma in a mouse model by 2'-5A antisense directed against telomerase RNA [J]. *Oncogene*, 1998; 16(4): 3323- 3330
- [13] Norton JC, Playszek MA, Wright WE *et al*. Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids [J]. *Nature Biotech*, 1996; 14(5): 615- 619
- [14] Harrington L, Mphail T, Mar V *et al*. A mammalian telomerase associated protein [J]. *Science*, 1997; 275(5302): 973- 977
- [15] Nakayama J, Saito M, Nakamura H *et al*. TLP1: A gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family [J]. *Cell*, 1997; 88(6): 875- 884

编辑 王睿