

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.12.003

# 腺病毒介导的 shRNA 沉默 hTERT 基因表达对鼻咽癌细胞增殖和凋亡的影响

宋玉姣, 韩继波, 陈始明, 肖伯奎, 陈晨, 陶泽璋

## Effect of Adv Vector-mediated shRNA Targeting hTERT on Proliferation and Apoptosis of Nasopharyngeal Carcinoma Cells

SONG Yu-jiao, HAN Ji-bo, CHEN Shi-ming, XIAO Bo-kui, CHEN chen, TAO Ze-zhang

*Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China**Corresponding Author: TAO Ze-zhang, E-mail: taozezhang@hotmail.com*

**Abstract: Objective** To evaluate the effect of targeting hTERT gene on the proliferation and apoptosis of CNE-2 cells by applying RNA interference to restrain the expression of hTERT in nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cells. **Methods** Recombinant adenovirus vectors expressing EGFP and human TERT shRNA were constructed and transfected in human nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cells. The expression levels of hTERT mRNA and protein were detected respectively by RT-PCR and Western blot method. Cell proliferation was determined by CCK-8 assay and cell apoptosis was observed by FCM(Flow cytometric). **Results** The transfection rate of Adv-EGFP-shTERT recombinant adenovirus plasmid in CNE-2 cell line was more than 90%. The expression levels of the hTERT mRNA and protein were dramatic declining respectively at 24h and 48h after transfection. Cell proliferation activity was significantly inhibited and the cell apoptosis reached 23.0%. **Conclusion** Adv vector-mediated RNAi targeting hTERT can inhibit the activity of telomerase reverse transcriptase by down-regulating the expression of the hTERT mRNA and its protein significantly, therefore can inhibit the growth of the cells and induce their apoptosis. Future application of RNAi to the gene therapy of nasopharyngeal carcinoma might be expected.

**Key words:** RNA interference; Viral vectors; hTERT genes; NPC cells

**摘要:目的** 探讨靶向人端粒酶反转录酶(hTERT)的短发夹 RNA(shRNA)对人鼻咽癌细胞株 CNE-2 hTERT 表达的影响,及其对鼻咽癌细胞增殖和凋亡的效应。**方法** 构建表达绿色荧光蛋白(EGFP)基因和靶向 hTERT 基因短发夹 RNA 的重组腺病毒质粒,观察其对鼻咽癌细胞株(CNE-2)的转染效果,RT-PCR 检测 hTERT mRNA 表达水平,Western blot 检测 hTERT 蛋白表达水平,CCK-8 法检测细胞增殖活性,流式细胞仪检测细胞凋亡状况。**结果** Adv-EGFP-shTERT 重组腺病毒质粒转染率可达 90%以上,成功转染 CNE-2 细胞 24 h 后,hTERT mRNA 的表达水平显著下降,转染 48 h 后,hTERT 蛋白表达明显下调,细胞增殖活性受到显著抑制,细胞凋亡率可达 23.0%。**结论** 腺病毒载体介导靶向 hTERT 基因的 RNA 干扰,能显著抑制端粒酶反转录酶表达,进而抑制端粒酶活性,抑制 CNE-2 细胞增殖并诱导其凋亡,为鼻咽癌的基因治疗研究提供了理论基础。

**关键词:** RNA 干扰;腺病毒载体;hTERT 基因;NPC 细胞

**中图分类号:**R739.63 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8578(2011)12-1351-05

## 0 引言

人端粒酶反转录酶(human telomerase reverse

transcriptase, hTERT)是端粒酶的蛋白催化亚基,能够以端粒酶 RNA 为模板反转录合成端粒 DNA,其表达是端粒酶活性的限速步骤<sup>[1]</sup>。hTERT 在大多数正常组织中不表达,而在 90%以上的恶性肿瘤细胞中都有高表达。肿瘤细胞中 hTERT 的表达水平可反映端粒酶活性状态,与肿瘤发生、发展密切相关,成为近几年的研究热点。

RNA 干扰是内源性或外源性双链 RNA

**收稿日期:**2011-03-24;**修回日期:**2011-06-16

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30872851)

**作者单位:**430060 武汉,武汉大学人民医院耳鼻咽喉-头颈外科学

**通信作者:**陶泽璋, E-mail: taozezhang@hotmail.com

**作者简介:**宋玉姣(1986-),女,硕士在读,主要从事鼻科学、头颈肿瘤基础研究

(double stranded RNA, dsRNA) 靶向诱发的 mRNA 水平上的基因沉默, 具有高度特异性。由于 RNAi 具有高度特异性并能高效地调节其靶基因的表达, 近年用 RNAi 技术在多种不同肿瘤细胞中成功干扰了多种靶基因的表达, 抑制了肿瘤的生长, 已成为目前肿瘤基因治疗的研究热点<sup>[2]</sup>。哺乳动物及人类细胞中转染 21~23 个核苷酸的小干扰性 RNA, 可特异性降解靶 mRNA, 下调蛋白表达水平<sup>[3]</sup>。本研究应用腺病毒载体介导的 RNA 干扰特异性抑制 hTERT 基因在鼻咽癌细胞株 CNE-2 中的表达, 体外观察沉默 hTERT 基因后对鼻咽癌细胞株 CNE-2 增殖及凋亡的影响, 探讨腺病毒载体介导的 hTERT 基因的 RNA 干扰治疗鼻咽癌的可能, 为鼻咽癌基因治疗提供理论依据和实验基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞株与主要试剂

人鼻咽癌细胞系 CNE-2 细胞株购自武汉大学细胞中心, 含 EGFP-shTERT 的重组腺病毒质粒由本实验室在前期的实验中构建<sup>[4]</sup>, Cell Counting Kit-8(CCK-8 试剂盒)购自日本 Dojindo 公司, 兔抗人 TERT、 $\beta$ -actin 单克隆抗体购自美国 Cellsignaling 公司, 蛋白印迹二抗及增强化学发光(ECL)显色剂购自碧云天生物工程有限公司, Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒购自碧云天公司, RT-PCR 试剂盒购自 Fermentas 公司。

### 1.2 质粒的设计与合成

根据 GenBank 中 hTERT 基因已知序列, 按 siRNA 序列设计原则, 应用 Ambion 公司网上在线设计工具设计, 并将选出的 siRNA 序列进行 BLAST 搜索, 作同源性分析以保证序列的特异性, 最后确定 2 个区段。根据 hTERT cDNA 序列构建表达 hTERT mRNA 特异的、含绿色荧光蛋白基因(EGFP)的 shRNA 真核表达质粒 Adv-pEGFP-shTERT。随机选取一段与人类基因无同源性的碱基序列构建表达 shRNA 的对照质粒 Adv-pEGFP-shHK。其中 Adv-pEGFP-shTERT 作用的两个靶序列分别为 5'-GGAGCAGCTGCGGCCCTCC-3' 及 5'-GTTCTGCACTGGCTGATG-3'; 阴性对照 Adv-pEGFP-shHK 作用的靶序列为: 5'-GACTTCATAAGGCGCATGC-3'。实验分为三组: A 组为 Adv-pEGFP-shTERT 组, B 组为 Adv-pEGFP-shHK 组, C 组为空白对照组。

### 1.3 细胞培养和转染

用基因工程技术将 EGFP 和 TERT 基因短发夹 RNA(shRNA)的 cDNA 从质粒载体 pGenesil-1.1 上亚克隆至穿梭质粒 pEGFP-TERT 上, 再通过体外同源重组的方法将 EGFP-TERTshRNA 表达框转移至 pGSadeno 腺病毒表达载体上, 得到腺病毒载体 pGSadeno-EGFP-TERT, 将 Pac I 线性化的腺病毒 DNA 转染 HEK293, 并在其中包装扩增纯化腺病毒。利用穿梭质粒中所携带 EGFP 报告基因, 进行 CNE-2 细胞感染效率的检测。成功转染 CNE-2 细胞后, RT-PCR 检测 hTERT mRNA 表达水平, Western blot 检测 hTERT 蛋白表达水平, CCK-8 法检测细胞增殖活性, 流式细胞仪检测细胞凋亡状况。

鼻咽癌细胞株 CNE-2 接种于含 10% 胎牛血清、100 u/ml 青霉素和 100  $\mu$ g/ml 链霉素的 RPMI1640 培养液中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下常规培养。细胞转染时, 取对数生长期的 CNE-2 细胞, 按  $2 \times 10^5$ /孔接种于 6 孔培养板, 用含 10% 血清不含抗生素的 RPMI1640 培养液、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 温育过夜, 次日转染。待细胞长至 80% 融合度时, 用不含血清的 RPMI1640 培养液洗涤细胞一次后, 加入不含血清培养液, 用感染复数病毒/细胞(MOI)为 30 的腺病毒感染 CNE-2 细胞, 静置 3 h, 吸出病毒液, 加入完全培养液, 置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下常规培养。24 h 后在荧光显微镜下观察转染效率, 计数 GFP 阳性细胞数。

### 1.4 hTERT mRNA 表达的 RT-PCR 检测

目的基因 TERT 的 PCR 引物序列为: 5'-CTGTACTTTGTCAAGGTGGATGTGA-3'; 反义链: 5'-GTACGGCTGGAGGTCTGTCAAG-3', 产物长度 198 bp。分别收集各组转染 48h 后的细胞, 提取总 RNA, 测定浓度, 并反转录成 cDNA。取 RT 产物作为模板, 进行 RT-PCR 检测。RT-PCR 反应体系为: 2 $\times$  PCR Mix 12.5  $\mu$ l, 10  $\mu$ mol/L 上下游引物各 1  $\mu$ l, cDNA 2  $\mu$ l, 加双蒸水至 25  $\mu$ l。反应条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C 5 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 60 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 36 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 10 min。每个样本设三个平行反应; 同时扩增  $\beta$ -actin 为内参对照。对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯下观察各组电泳条带及其位置。用凝胶成像系统进行半定量分析, hTERT mRNA 的相对表达水平 = hTERT 基因的 RT-PCR 产物电泳条带的密度/ $\beta$ -

actin 的 RT-PCR 产物电泳条带的密度。

### 1.5 hTERT 蛋白表达的 Western blot 检测

分别收集转染 72 h 后的各组细胞,用预冷的 PBS 洗涤,加入蛋白裂解液,提取总蛋白。分别取 30  $\mu\text{g}$  蛋白,变性后经 12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,将凝胶置于转移缓冲液中平衡 15 min,再用 250 mA 电流 210 min 转印蛋白到 PVDF 膜上,封闭液 4 $^{\circ}\text{C}$  封闭过夜,加一抗,37 $^{\circ}\text{C}$  振荡温育 1 h, TBST 漂洗 3 次,每次 15 min,加辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗,37 $^{\circ}\text{C}$  振荡温育 40 min, TBST 漂洗 3 次,每次 15 min。取等量的 ECL 发光试剂 A、B 液混匀后孵育 PVDF 膜,压片曝光,以  $\beta$ -actin 为内参。

### 1.6 CCK-8 法检测细胞增殖活性

取对数生长期的 CNE-2 细胞,经 0.25% 的胰蛋白酶消化,用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液配成单个细胞悬液,取  $1 \times 10^7/\text{L}$  浓度的细胞,接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 100  $\mu\text{l}$ 。每组设 3 个复孔。按上述方法进行质粒转染后继续培养,每 24 h 换液 1 次。分别于转染后第 24、48、72 h 加入 10  $\mu\text{l}$  CCK-8,继续培养 2 h,到达检测点时弃去培养液,再加入二甲基亚砜(DMSO)200  $\mu\text{l}$ ,振荡 10 min,置自动酶标仪 450 nm 波长测定各孔吸光度(A)值,绘制不同因素处理下 CNE-2 细胞增殖曲线。

### 1.7 流式细胞仪检测细胞凋亡

分别收集转染 72 h 后的各组细胞,每孔收集  $5 \times 10^6/\text{ml}$ ,加入预冷 PBS 洗涤两次。将 EP 管置于冰上,加入 195  $\mu\text{l}$  Annexin V-FITC 结合液,加入 5  $\mu\text{l}$  Annexin V-FITC,轻轻混匀,室温避光孵育 10 min,加入 10  $\mu\text{l}$  碘化丙啶(PI)染色液,轻轻混匀,冰浴避光放置,孵育 30 min。300 目尼龙网过滤,转入 FCM 测量管上机检测细胞凋亡情况。

### 1.8 统计学方法

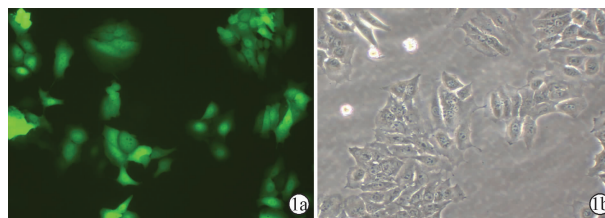
统计数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 13.0 软件对实验数据进行统计学处理,多组间比较采用单因素方差分析,两组间的比较为  $t$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 重组腺病毒质粒转染效率的检测

用感染复数病毒/细胞(MOI)为 30 的腺病毒感染 CNE-2 细胞,24 h 后  $>90\%$  的细胞出现荧光,见图 1,表明构建的腺病毒质粒对 CNE-2 细胞具有较

高的转染能力。



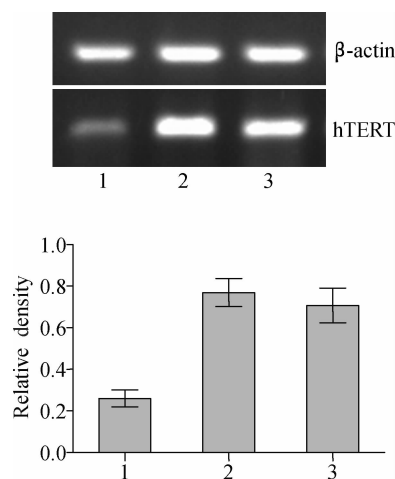
1a: fluorescence field; 1b: bright field

图 1 Adv-pEGFP-shTERT 转染 24 h 后 CNE-2 细胞转染情况( $\times 400$ )

Figure 1 The transfected result of CNE-2 cells at the 24 h after Adv-pEGFP-shTERT transfection( $\times 400$ )

### 2.2 hTERT siRNA 对 CNE-2 细胞 hTERT mRNA 表达的影响

Adv-pEGFP-shTERT 转染 CNE-2 细胞 48 h 后,hTERT mRNA 表达水平为  $(26.0 \pm 4.1)\%$ ,与阴性对照组  $(70.6 \pm 8.4)\%$  比较,实验组可明显下调 hTERT mRNA 的表达( $t = 8.311, P < 0.05$ ),两组间差异有统计学意义。而空白对照组 hTERT mRNA 的表达水平为  $(76.9 \pm 6.8)\%$ ,与 Adv-pEGFP-shHK 阴性对照组 hTERT 比较差异无统计学意义( $t = 1.004, P > 0.05$ ),见图 2。



1: Adv-pEGFP-shTERT group; 2: blank control group; 3: Adv-pEGFP-shHK group

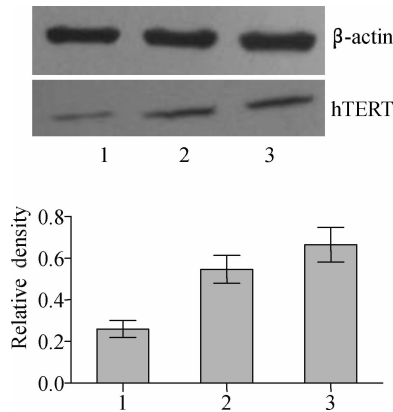
图 2 Adv-pEGFP-shTERT 转染 CNE-2 细胞后对 hTERT mRNA 表达量的影响

Figure 2 Effects of transfection Adv-pEGFP-shTERT on the hTERT mRNA expression in CNE-2 cells

### 2.3 hTERT siRNA 对 CNE-2 细胞 hTERT 蛋白表达的影响

采用 Western blot 法分析 CNE-2 细胞 hTERT

蛋白表达水平,以  $\beta$ -actin 蛋白作为内参。结果显示,Adv-pEGFP-shTERT 转染 CNE-2 细胞 72h 后, hTERT 蛋白表达水平为  $(25.9 \pm 4.1)\%$ ,与阴性对照组  $(58.8 \pm 2.0)\%$  比较, hTERT 蛋白表达量明显降低,两者之间的差异有统计学意义 ( $t = 12.535, P < 0.05$ )。而空白对照组 hTERT 蛋白表达水平为  $(63.5 \pm 4.5)\%$ ,与 Adv-pEGFP-shHK 阴性对照组比较差异无统计学意义 ( $t = 1.682, P > 0.05$ ),见图 3。



1: Adv-pEGFP-shTERT group; 2: Adv-pEGFP-shHK group; 3: blank control group

图 3 Western blot 检测各组细胞中 hTERT 蛋白的表达水平  
Figure 3 Expression level of hTERT protein in different groups detected by Western blot

2.4 hTERT siRNA 对 CNE-2 细胞增殖的影响

CCK-8 结果显示, Adv-pEGFP-shTERT 转染 CNE-2 细胞后第 24、48、72 h,与阴性对照组及空白对照组比较, A450 明显降低,即细胞增殖明显减慢,抑制率明显增加,且细胞转染 72 h 后的抑制作用较 48 h 明显升高,表明随着时间的延长,抑制作用逐渐增高。见图 4。

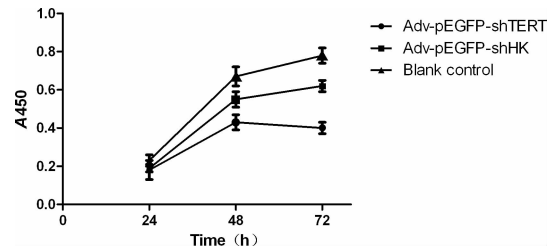


图 4 CCK-8 法检测 CNE-2 细胞增殖曲线  
Figure 4 Reproduction curve of CNE-2 cells analyzed via CCK-8 assay

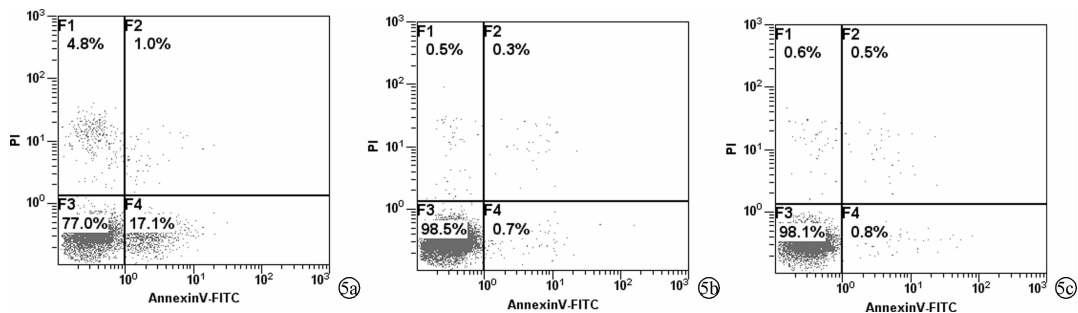
2.5 hTERT siRNA 对 CNE-2 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测可见,转染特异性 hTERT siRNA 后,细胞的凋亡率明显增加  $(23.0\%)$ ,与空白对照组  $(1.9\%)$  相比差异明显,阴性对照组凋亡率为  $1.5\%$ ,与空白对照组相比,凋亡率的差异微小,见图 5。

3 讨论

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 是我国南方及东南亚国家常见的恶性肿瘤,放疗是目前主要的治疗手段。放射治疗虽然可以达到较高的局部控制率,但由于鼻咽癌生长迅速,局部区域复发和远处转移成为其治疗失败的主要原因。分子靶向药物治疗应用于晚期肿瘤的治疗或联合化疗上,其不良反应相对较轻,与放疗结合有更好的耐受性,为今后的综合治疗模式提供了更多选择。因此,深入研究鼻咽癌的发病机制并探讨一些新的治疗方式改善患者的预后、提高患者生存质量仍显得非常紧迫。

端粒酶在健康者组织中的活性被抑制,在肿瘤中被重新激活,端粒酶可能参与恶性转化,故端粒酶在肿瘤的发生、发展中具有重要意义<sup>[5]</sup>。端粒酶以自身 RNA 为模板反转录合成端粒重复单元,加到



5a: Adv-pEGFP-shTERT group; 5b: Adv-pEGFP-shHK group; 5c: blank control group

图 5 流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况

Figure 5 The apoptosis of the CNE-2 cells in different groups detected by FCM

染色体末端以防止端粒缩短<sup>[6]</sup>,从而使肿瘤细胞永生。健康者细胞中,端粒酶活性为阴性或低表达,85%以上的肿瘤细胞和永生细胞具有高度端粒酶活性<sup>[7]</sup>。研究显示,hTERT mRNA 的表达与人端粒酶阳性率呈正相关,至少 80%的 hTERT mRNA 阳性表达的肿瘤患者可以检测到端粒酶活性的增高<sup>[8]</sup>。研究表明,在多种肿瘤细胞中抑制端粒酶反转录酶(TERT)的表达,可以导致肿瘤细胞生物学特性发生变化,细胞增殖速度减慢,出现凋亡。另外,人端粒酶反转录酶基因编码的端粒酶催化亚单位在大多数肿瘤中表达上调并对肿瘤细胞的端粒酶活性起重要调控作用,是目前肿瘤基因治疗中一个极具前景的靶点<sup>[9]</sup>。同时阐明端粒酶与细胞周期及细胞凋亡相关基因的关系,对深入了解鼻咽癌发病机制及诊断和治疗均有重要的意义。

转染效率一直是基因转染技术的关键。重组腺病毒载体作为近年一种新型的载体,有着一系列的优势,如无需同时使用转染试剂;可以同时感染分裂期和静止期细胞;可以高效介导基因的体内外转移;感染效率较高等等<sup>[10]</sup>。在本实验中应用的重组腺病毒质粒滴度高达  $1.0 \times 10^9$  PFU/ml,并且产生的病毒活性较高,在 MOI 为 30 时,感染 24 h 后高于 90%的细胞表达绿色荧光蛋白。

本研究应用 Adv-pEGFP-shTERT 转染 CNE-2 细胞株后,RT-PCR 和 Western blot 检测结果显示,CNE-2 细胞株 hTERT mRNA 和蛋白的表达均被明显抑制,而阴性对照组和空白对照组则没有抑制现象,表明 CNE-2 细胞株在短期内出现的增殖活力下降与 hTERT 蛋白表达下调有关。CCK-8 结果可见,转染 24 h 后细胞增殖能力开始下降,转染 72 h 后细胞抑制作用较 24 h 和 48 h 明显升高。流式细胞仪检测结果显示,Adv-pEGFP-shTERT 组与阴性对照组及空白对照组比较,细胞的凋亡率明显增高,为 23.0%。然而相对于 90%的高转染率,细胞凋亡率水平不高,可能是因为 hTERT 基因是端粒酶的限速基因,影响端粒的合成,使肿瘤的永生生长受阻,但它并不是直接诱导细胞凋亡的基

因,因此我们推测,人端粒酶反转录酶的活性被抑制后,端粒酶的活性受阻,可能间接影响调节细胞周期及凋亡相关蛋白的表达,从而促使细胞凋亡。本研究表明,应用 shRNA 靶向抑制 hTERT 基因在鼻咽癌 CNE-2 细胞株中的表达,能显著地抑制细胞人端粒酶反转录酶活性,从而抑制细胞增殖,并诱导细胞凋亡。在此基础上我们将在后续实验中探索多个基因同时干扰对 CNE-2 细胞系增殖抑制作用及凋亡诱导作用的影响,以期探索一种更为有效的肿瘤基因治疗的新方法。

#### 参考文献:

- [1] Tollesbol TO, Andrews LG. Mechanisms for telomerase gene control in aging cells and tumorigenesis[J]. Med Hypotheses, 2001, 56(6):630-637.
- [2] 李刚,谭晓虹. RNA 干扰 survivin 对口腔表皮样癌细胞株 KB 生长的抑制作用[J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38(3):257-260.
- [3] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. Science, 2002, 296(5567):550-553.
- [4] 陈晨,陶泽璋,陈始明,等. 人 EGFP-TERT-VEGF-Bcl-xl shRNA 重组腺病毒的构建与鉴定[J]. 中华医学杂志, 2009, 33(3):117-119.
- [5] Stewart SA, Weinberg RA. Telomerase and human tumorigenesis [J]. Semin Cancer Biol, 2000, 10(6):399-406.
- [6] Stewart SA, Hahn WC, O'Connor BF, et al. Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(20):12606-12611.
- [6] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer [J]. Science, 1994, 266(5193):2011-2015.
- [8] Neidle S, Parkinson G. Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery[J]. Nat Rev Drug Discov, 2002, 1(5):383-393.
- [9] Biroccio A, Leonetti C. Telomerase as a new target for the treatment of hormone-refractory prostate cancer[J]. Endocr Relat Cancer, 2004, 11(3):407-421.
- [10] de Fougerolles AR. Delivery vehicles for small interfering RNA in vivo[J]. Hum Gene Ther, 2008, 19(2):125-132.

[编辑:安 凤;校对:刘红武]