

# RNAi 下调 hTERT 基因对 MCF-7 乳腺癌细胞生长的影响

曾晓华, 刘长安, 王继见, 印国兵, 郭丹

## Effect of Targeting hTERT Gene Inhibited in MCF-7 Breast Cancer Cell Growth by RNA Interference

ZENG Xiao-hua, LIU Chang-an, WANG Ji-jian, YIN Guo-bing, GUO Dan

Department of General Surgery, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

Corresponding Author: LIU Chang-an, E-mail: qq-zxh@126.com

**Abstract: Objective** To investigate the effect of breast cancer cell growth, we utilized RNAi strategy to inhibit hTERT gene in MCF-7 cells of breast cancer. **Methods** Small interference RNA (siRNA) homologous to hTERT gene (hTERT-siRNA) was recombined with pGenesil-1 vector, then transfected into MCF-7 cells of breast cancer to induce RNAi, and then hTERT gene expression alterations and tumor cell proliferation in both hTERT-siRNA treatment groups and control groups were detected by MTT assay, RT-PCR and Western blot. **Results** The expression of hTERT had been obviously inhibited by siRNA. The inhibition rate of cell proliferation was 61.94%. The mRNA level of hTERT was obviously decreased by 61.7%, and its protein expression reduced by 52.8%. **Conclusion** siRNA-hTERT effectively inhibited hTERT gene expression and breast cancer cell proliferation *in vitro*.

**Key words:** RNAi; Breast cancer; hTERT

**摘要:目的** 利用 siRNA 在乳腺癌细胞内诱导 RNAi, 抑制人端粒酶催化亚基 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 基因表达, 在体外细胞水平探讨 RNAi 对 MCF-7 乳腺癌细胞生长的影响。**方法** 构建靶向 hTERT 基因的 siRNA (hTERT-siRNA), 转导入 MCF-7 乳腺癌细胞, 在癌细胞内诱导 RNAi, 采用细胞增殖抑制实验、RT-PCR 法、Western blot 等技术检测 siRNA 处理前后癌细胞增殖及 hTERT 基因表达变化。**结果** hTERT-siRNA 对乳腺癌细胞生长抑制率达 61.94%; hTERT 的 mRNA 表达降低了 61.7%, 蛋白表达平均降低了 52.8%。**结论** siRNA 在体外明显抑制了乳腺癌细胞中 hTERT 基因的表达和癌细胞增殖。

**关键词:** RNAi; 乳腺癌; 人端粒酶催化亚基

**中图分类号:** R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2010)07-0763-03

## 0 引言

人端粒酶逆转录酶 (Human telomerase reverse transcriptase, hTERT), 即端粒酶催化亚单位是端粒酶的重要组分, 被认为是端粒酶的催化亚基, 是端粒酶活化和细胞癌变的限速步骤<sup>[1]</sup>, 在乳腺癌组织中, 端粒酶活性表达显著升高, 并且与乳腺癌病理类型和分化程度密切相关, 而在正常乳腺组织中不表达, 与乳腺癌的发生、发展有着密切的关系<sup>[2-3]</sup>, hTERT 在乳腺癌中高表达也提示预后较差<sup>[3-4]</sup>。

本实验依据 RNA 干扰原理, 使用短发夹样 RNA (small hairpin RNA, shRNA) 设计的 RNAi-DNA 载体方法<sup>[5]</sup>, 以 hTERT 基因为靶点, 构建针对该基因的 siRNA 表达载体, 从细胞水平 siRNA 特异诱导 hTERT 基因转录后沉默, 逆转乳腺癌细胞恶性表型的能力, 探讨该表达载体对 MCF-7 乳腺癌细胞生长的影响及其 hTERT 表达的抑制作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

MCF-7 乳腺癌细胞株购自上海细胞生物研究所。在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。质粒 pGenesil-1 购自武汉晶赛生物工程有限公司。限制性内切酶 BamH1、

收稿日期: 2009-02-13; 修回日期: 2009-05-21

作者单位: 400010 重庆医科大学附属第二医院普外科

通信作者: 刘长安, E-mail: qq-zxh@126.com

作者简介: 曾晓华 (1970-), 男, 博士, 副教授, 主要从事乳腺癌的基础与临床研究

*Hind*Ⅲ和 *Eco*RI 购自 Takara 公司,总 RNA 提取试剂、转染试剂 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司;PCR 试剂购自 Takara 公司;TERT 抗体购自博士德公司;siRNA-hTERT 转录模板由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.2 pGenesil-hTERT-siRNA 质粒构建

shRNA 发夹结构序列长度为 65bp,两端分别为 *Bam*H1、*Hind*Ⅲ 酶切位点,中间为 9bp 茎环序列分隔的反向重复靶序列,并以 6 个 T 作为 RNA 聚合酶Ⅲ的转录终止子。质粒构建采用 *Bam*H1、*Hind*Ⅲ 双酶切空质粒 pGenesil-1,将 shRNA-hTERT 转录模板 5'-AAGTGTCACAGCCT-GTTTCTG-3' (AF015950 nucleotides 2995-3016) 和阴性对照转录模板 5'-AAGCTTCATAAGGCG-CATAGC-3' (与人基因无同源性) 分别设计成发夹结构,定向克隆至该载体上,经筛选、酶切鉴定后,进行测序确定,命名为 pGenesil-hTERT-siRNA,阴性对照命名为 pGenesil-PK-siRNA。

### 1.3 质粒转染

采用 Lipofectamine™ 2000 脂质体转染法。转染前一天,换取无抗生素培养液后调整细胞浓度为  $2 \times 10^5$  /ml,以每孔 2ml 接种于 6 孔培养板中培养。待细胞增至 90%~95% 时,将质粒-脂质体复合物转染至细胞中(质粒:脂质体=1:4),37℃、5% CO<sub>2</sub> 在无血清、无抗生素的培养液培养 16~18 h 后换 G418 选择培养液,继续培养 72~96 h 后检测各指标。

### 1.4 细胞增殖抑制实验(MTT 法)

收集对数生长期的 MCF-7 乳腺癌细胞,接种 96 孔板,细胞终密度为每孔  $2 \times 10^4$ ,每个样本设 3 个平行孔,每孔总体积 200 μl,试剂空白以无血清 DMEM 培养液补足。37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 24 h,在每孔中加入四甲基偶氮唑蓝(MTT,浓度为 0.5 mg/ml),继续培养 4h,弃上清,加入二甲基亚砷 200 μl,振荡 5 min,酶标仪(570 nm)读取 A 值。细胞增殖抑制率 = (1 - 实验组平均 A 值/对照组平均 A 值) × 100%。

### 1.5 RT-PCR 检测 hTERT 的 mRNA 表达

RT 采用说明书 M-MLV 逆转录酶标准体系,37℃ 反应 60 min。PCR 扩增采用 50 μl 反应体系,内含 cDNA 4 μl,相关引物 20 pmol,5 μl 10 × buffer,4 μl 25mmol/L MgCl<sub>2</sub>,1 μl 10 μmol/L dNTP, Taq 酶 2.5 u。按下述条件进行循环:hTERT 94℃ 60s,60℃ 30s,72℃ 45s,35 次循环;同时做 GAPDH 内对照。hTERT 引物序列为:正义:5'-CG-GAAGAGTGTCTGGAGCAA-3';反义:5'-GGAT-GAAGCGGAGTCTGGA-3' (扩增产物 145bp)。

GAPDH 引物正义:5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3';反义:5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3' (扩增产物 208bp)。以水作为阴性对照。扩增产物 2% 琼脂糖凝胶电泳 30 min(80v),EB(0.5 μg/ml) 染色,用 BIO-RAD 图像分析仪上观察并扫描制片,记录结果。

### 1.6 Western blot 检测 hTERT 的蛋白表达

收集常规培养的乳腺癌细胞 MCF-7  $2 \times 10^6$  个,提取核蛋白,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样本和分子量标准,将蛋白样本转移至 PVDF 膜上,蛋白封闭液 37℃ 封闭 PVDF 膜 1h,PBST 洗涤,加一抗(1:300)37℃ 孵育 4h,PBST 振荡洗涤 2 次,加二抗(1:200)37℃ 孵育 20 min,PBST 洗涤 4 次,5 min/次,DAB 室温显色,显影,记录结果。

### 1.7 统计学方法

采用 SPSS10.0 软件进行统计学分析,组间差异比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒的鉴定

质粒 pGenesil-hTERT-siRNA 和 pGenesil-PK-siRNA 经 *Hind*Ⅲ和 *Eco*RI 双酶切,同时做 pGenesil-1 空载体双酶切对照。20 g/L 琼脂糖电泳,pGenesil-1 空载体经双酶切后呈 2 条带,分别为 4.54 kb 的载体片段和 364 bp 的小片段;而重组质粒则为 4.54 kb 的载体片段和 425 bp 的目的片段。测序结果证实:pGenesil-1 的 *Bam*H1/*Hind*Ⅲ间有一 65 bp 的插入片段,其序列和方向与我们设计的一致。因此,我们认为已成功构建了 hTERT-pGenesil-siRNA 重组质粒。

### 2.2 细胞增殖抑制实验(MTT 法)

pGenesil-hTERT-siRNA 处理组中,MCF-7 乳腺癌细胞平均增殖抑制率(Proliferation Inhibition rate,PIR)达 61.94%,明显高于阴性对照 pGenesil-PK-siRNA 处理组(9.48%),两组相比差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ),见图 1。

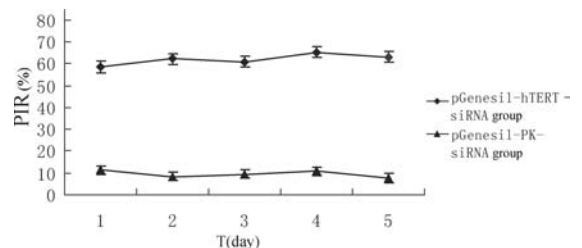


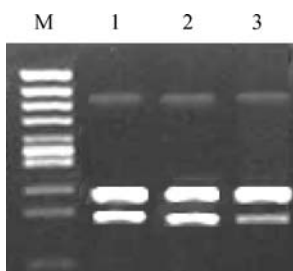
图 1 MCF-7 乳腺癌细胞增殖抑制试验

Figure 1 The proliferation inhibition result of MCF-7 breast cancer cells

### 2.3 RT-PCR 检测 hTERT 的 mRNA 表达

半定量 RT-PCR 检测结果以琼脂糖电泳条带

的亮度来判断 hTERT 的 mRNA 表达高低。实验结果显示见图 2, 阴性对照 pGenesil-PK-siRNA 组与未处理 MCF-7 乳腺癌细胞组间无差别; pGenesil-hTERT-siRNA 处理组中, hTERT mRNA 表达均明显降低, 与阴性对照 pGenesil-PK-siRNA 处理组相比, hTERT 的 mRNA 表达下降了 61.7%, 其差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。



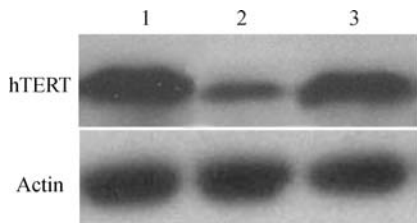
M: Maker; 1: untreated group; 2: negative control group (pGenesil-PK-siRNA); 3: pGenesil-hTERT-siRNA group

图 2 MCF-7 乳腺癌细胞 hTERT 的 mRNA 表达

Figure 2 The mRNA expression of hTERT of MCF-7 breast cancer cells

### 2.4 Western blot 检测 hTERT 的蛋白表达

阴性对照 pGenesil-PK-siRNA 组与未处理 MCF-7 乳腺癌细胞组间无显著性差别; 与阴性对照 pGenesil-PK-siRNA 处理组相比, pGenesil-hTERT-siRNA 处理组中 hTERT 蛋白表达明显降低, 见图 3。通过内参  $\beta$ -actin 进行定量分析, 与阴性对照组比较, pGenesil-hTERT-siRNA 处理组中 hTERT 蛋白表达平均降低了 52.8%, 其差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。



1: Control group; 2: hTERT-siRNA group; 3: PK-siRNA group

图 3 MCF-7 乳腺癌细胞 hTERT 的蛋白表达

Figure 3 The hTERT protein expression of MCF-7 breast cancer group

## 3 讨论

hTERT 基因仅在精原细胞、卵母细胞和造血祖细胞等低分化细胞中呈现表达, 而在正常成熟细胞和组织中无表达<sup>[6]</sup>。在恶性肿瘤中 hTERT 基因在 90% 以上的不同肿瘤细胞上均出现不同程度的高表达<sup>[7]</sup>, 在乳腺癌中的表达高达 88%<sup>[8]</sup>, 说明肿瘤细胞主要通过激活 hTERT 而激活端粒酶,

hTERT 的异常激活是肿瘤形成的重要原因之一。通过对 hTERT 启动子的改造或敲除, 即提高了该启动子对基因表达调控作用的特异性, 达到了使 hTERT 失活的同时降低了对正常细胞毒性作用, 还能增强对化疗药的敏感性, 提高杀伤肿瘤的靶向性<sup>[9-10]</sup>。我们采用了 pGenesil-1 质粒, 其启动子是 RNA 聚合酶 III 启动子 (pol III), 插入的 hTERT-siRNA 转录模板被克隆到 RNA 聚合酶 III 启动子下游。当这种带有 pol III 启动子和 shRNA 编码序列的质粒转染哺乳动物细胞时, pol III 总是在离启动子一个固定距离的位置开始转录合成 RNA, 当遇到 4~5 个连续的 U 即终止转录。在 hTERT 靶基因的 siRNA 转录模板选择、设计时, 选择了 hTERT 基因外显子的一 siRNA 片段, 为 21bp。于是 shRNA 在细胞内自动被加工成为 siRNA 而诱导 RNAi, 下调靶基因的表达。由于 siRNA 表达质粒的选择标记, siRNA 载体能够稳定、长效地抑制目的基因表达。本研究结果显示, hTERT-pGenesil-siRNA 处理组中, 乳腺癌 MCF-7 细胞平均增殖抑制率达 61.94%, 对照 pGenesil-PK-siRNA 处理组细胞增殖抑制率几乎无变化。Western blot 检测乳腺癌 MCF-7 细胞 hTERT 蛋白表达, 发现乳腺癌 MCF-7 细胞经 hTERT-pGenesil-siRNA 处理后, 与内参 actin 吸光度相比, 对照 pGenesil-PK-siRNA 处理组 hTERT 蛋白几乎无变化, 而 hTERT-pGenesil-siRNA 处理组 hTERT 蛋白表达下降了 52.8%。半定量 RT-PCR 检测乳腺癌 MCF-7 细胞系 hTERT 的 mRNA 的表达, 发现重组质粒 hTERT-pGenesil-siRNA 处理组的乳腺癌 MCF-7 细胞 hTERT 的 mRNA 表达明显下调, 与阴性对照 pGenesil-PK-siRNA 处理组相比, 下降了 61.7%。因此, 本研究表明 hTERT-pGenesil-siRNA 重组质粒在乳腺癌 MCF-7 细胞中能有效地下调了 hTERT mRNA 和蛋白的表达, 细胞增殖抑制实验也证实了下调 hTERT 基因能抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的过度增生。有研究也证实在肾癌、喉癌、前列腺癌等多种肿瘤细胞中抑制 hTERT 的表达, 可以导致肿瘤细胞生物学特性发生改变, 细胞生长速度减慢、出现凋亡<sup>[11-14]</sup>。

因此, siRNA 特异诱导 hTERT 基因转录后沉默, 靶向 hTERT 基因的 siRNA 能在 MCF-7 乳腺癌细胞中特异诱导 RNAi, 抑制了 MCF-7 乳腺癌细胞的增殖, 从 mRNA 和蛋白水平降低了 hTERT 的表达, 逆转了乳腺癌细胞的恶性表型, 为乳腺癌基因治疗的临床应用开辟了新的思路。

erbB-2 的表达呈正相关。由此推测 c-erbB-2 的过度表达作为一种上游的信号分子,通过细胞内一条或多条转导通路刺激 survivin 的表达,而 survivin 的过度表达使异常细胞不能启动凋亡则可能是 c-erbB-2 致癌的又一机制。同时也提示 survivin 与 c-erbB-2 一样可作为乳腺癌预后差的生物学行为标志物。

survivin 在乳腺癌中的作用还有待于进一步深入研究。另外, survivin 蛋白的表达与临床病理特征及预后的关系还有不少方面存在结论不一致,甚至相反的情况,有必要进行多单位协作、大样本分析研究。

**参考文献:**

[1] McCarthy EP, Ngo LH, Roetzheim RG, et al. Disparities in breast cancer treatment and survival for women with disabilities[J]. *Ann Intern Med*, 2006, 145(9): 637-645.  
 [2] Yip KW, Shi W, Pintilie M, et al. Prognostic significance of the Epstein-Barr virus, p53, bcl-2, and survivin in nasopharyngeal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(19): 5726-5732.  
 [3] Bowen AR, Hanks AN, Murphy KJ, et al. Proliferation, apoptosis and survivin expression in keratinocytic neoplasms and hyperplasias[J]. *Am J Dermatopathol*, 2004, 26(3): 177-181.  
 [4] Altieri DC. survivin, versatile modulation of cell division and

apoptosis in cancer[J]. *Oncogene*, 2003, 22(53): 8581-8589.  
 [5] Span PN, Tjan-Heijnen VC, Manders P, et al. High survivin predicts a poor response to endocrine therapy, but a good response to chemotherapy in advanced breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2006, 98(2): 223-230.  
 [6] 张晓雨, 周建农, 张彤. survivin、VEGF 及 Ki67 在结直肠癌中的表达及其临床意义[J]. *肿瘤防治研究*, 2007, 34(1): 35-38.  
 [7] Karabatsou K, Pal P, Dodd S, et al. Expression of survivin, platelet-derived growth factor A(PDGF-A) and PDGF receptor alpha in primary central nervous system lymphoma[J]. *Neurooncol*, 2006, 79(2): 171-179.  
 [8] 毛杰, 海健, 舒衡平, 等. 乳腺癌组织中 survivin、p53 蛋白的表达与预后的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14(4): 265-268.  
 [9] Gerdes J, Schwab U, Lemke H, et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation[J]. *Int J Cancer*, 1983, 31(1): 13-20.  
 [10] Bhatavdekar JM, Patel DD, Shah NG, et al. Prognostic significance of immunohistochemically localized biomarkers in stage II and stage III breast cancer; a multivariate analysis[J]. *Ann Surg Oncol*, 2000, 7(4): 305-311.  
 [11] Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, et al. Prognostic value of c-erbB-2 expression in breast cancer[J]. *Surg Oncol*, 2002, 79(4): 216-231.  
 [12] 王涛, 周云峰. c-erbB-2 及 nm23 在乳腺癌中的表达及其临床意义[J]. *肿瘤防治研究*, 2001, 28(6): 454-456.

[编辑: 周永红; 校对: 刘红武]

(上接第 765 页)

**参考文献:**

[1] Kyo S, Inoue M. Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: how can we apply them for cancer therapy? [J]. *Oncogene*, 2002, 21(4): 688-697.  
 [2] Yano Y, Yoshida K, Osaki A, et al. Expression and distribution of human telomerase catalytic component, hTERT, in human breast tissues[J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(6C): 4101-4107.  
 [3] Elkak A, Mokbel R, Wilson C, et al. hTERT mRNA expression is associated with a poor clinical outcome in human breast cancer[J]. *Anticancer Res*, 2006, 26(6C): 4901-4904.  
 [4] Salhab M, Jiang WG, Newbold R F, et al. The expression of gene transcripts of telomere-associated genes in human breast cancer: correlation with clinico-pathological parameters and clinical outcome[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2008, 109(1): 35-46.  
 [5] Sui G, Soohoo C, Affar El B, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(8): 5515-5520.  
 [6] Takakura M, Kyo S, Kanaya T, et al. Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(3): 551-557.  
 [7] Cerni C. Telomeres, telomerase, and myc. An update[J]. *Mutat Res*, 2000, 462(1): 31-47.

[8] Kammori M, Izumiyama N, Hashimoto M, et al. Expression of human telomerase reverse transcriptase gene and protein, and of estrogen and progesterone receptors, in breast tumors: preliminary data from neo-adjuvant chemotherapy[J]. *Int J Oncol*, 2005, 27(5): 1257-1263.  
 [9] Song JS, Kim HP. Adenovirus-mediated HSV-TK gene therapy using the human telomerase promoter induced apoptosis of small cell lung cancer cell line[J]. *Oncol Rep*, 2004, 12(2): 443-447.  
 [10] Takeuchi H, Kanzawa T, Kondo Y, et al. Combination of caspase transfer using the human telomerase reverse transcriptase promoter and conventional therapies for malignant glioma cells[J]. *Int J Oncol*, 2004, 25(1): 57-63.  
 [11] Kurvinen K, Syrjanen S, Johansson B. Long-term suppression of telomerase expression in HeLa cell clones, transfected with an expression vector carrying siRNA targeting hTERT mRNA[J]. *Int J Oncol*, 2006, 29(1): 279-288.  
 [12] 陈始明, 陶泽璋, 池花明, 等. 短发夹 RNA 抑制喉癌细胞 hTERT 基因表达及诱导细胞凋亡[J]. *肿瘤*, 2006, 26(9): 798-804.  
 [13] 平浩, 张军晖, 陈晓春, 等. hTERT 短发夹状 RNA 抑制前列腺癌细胞生长的研究[J]. *肿瘤防治研究*, 2007, 34(2): 128-131, 164.  
 [14] 温儒民, 郑骏年, 李望, 等. hTERT 基因短发夹状 RNA 表达载体对肾癌细胞生长的抑制作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2007, 24(10): 1236-1238.

[编辑: 贺文; 校对: 杨卉]