

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2009.07.005

c-myc 靶向 siRNA 抑制人结直肠癌 Colo320 细胞的增殖及下调 hTERT 基因表达的研究

黄浩¹,李秀²,肖宏¹,傅雷¹,余兰才¹,林世和¹,易艳东¹

siRNA Downregulates Human Telomerase Reverse Transcriptase Gene and Telomere Length and Telomerase Activity in Human Colon Cancer Colo320 Cells

HUANG Hao¹, LI Xiu², XIAO Hong¹, FU Lei¹, YU Lan-cai¹, LIN Shi-he¹, YI Yan-dong¹

1. Center of Experimental Medicine, Wuhan First Hospital, Wuhan 430022, China; 2. Department of health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology

Abstract: Objective To study transfected shRNA of c-myc as therapeutic agent in target cell Colo320 which expressed more telomerase activity and to investigate the effect of inhibition on telomerase activity and telomere lengths and tumor cell growth. **Methods** A plasmid-based polymerase III promoter system was used to deliver and express short interfering RNA (siRNA) targeting c-myc in Colo320 cells. The c-myc and hTERT mRNA levels were monitored by fluorescence real time reverse transcription-polymerase chain reaction, the protein levels of c-myc and hTERT were examined by Western blot analysis. Meanwhile, telomere lengths and telomerase activity were measured by Southern analysis of telomere restriction fragment (TRF) length and PCR-ELISA. We also assessed the effects of c-myc silencing on tumor growth by DNA synthesis (³H-thymidine). **Results** Our data showed that expressions of c-myc and hTERT were decreased in shRNA-transfected cells, and down-regulations of c-myc and hTERT inhibited cell growth, reduced cell telomere lengths, telomerase activity. **Conclusion** shRNA of c-myc has the ability to inhibit telomerase activity, telomere lengths and cell growth with a dose dependent pattern.

Key words: c-myc; Small hairpin RNA; Proliferation; hTERT

摘要:目的 探讨发夹状 shRNA 封阻 c-myc 基因,抑制人结直肠癌 Colo320 细胞增殖、生长的状况。**方法** 针对原癌基因 c-myc 构建发夹状 shRNA 的真核表达质粒,并转染人结直肠癌 Colo320 细胞。荧光定量 RT-PCR 检测 c-myc 及细胞端粒酶逆转录酶的 mRNA 表达,Western-blot 检测 c-myc、hTERT 蛋白表达水平。Southern blot 检测端粒的长度,PCR-ELISA 法检测端粒酶活性。³H-thymidine 实验分析 DNA 合成和细胞增殖。**结果** 转染细胞增殖、生长皆受到抑制。同时,c-myc 和 hTERT 的 mRNA 和蛋白表达显著下降,端粒的长度明显缩短,端粒酶活性降低。**结论** c-myc 的 shRNA 对人结直肠癌 Colo320 细胞的增殖、端粒长度、端粒酶活性有特异性抑制作用,并呈剂量依赖关系。

关键词: c-myc; 小发夹结构 RNA; 增殖; 细胞端粒酶逆转录酶

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2009)07-0556-04

0 引言

c-myc 基因是人们发现较早的一种原癌基因,大量研究表明,c-myc 过度表达与多种肿瘤的发生密切相关^[1]。端粒酶在生物代谢、衰老、应激和肿瘤发生中起重要作用,是肿瘤细胞生长的重要指征^[2-4]。我们利用小链 RNA 干扰技术,构建 c-myc 特异性小干扰 RNA (siRNA) 表达载

体,研究其在结直肠癌 Colo320 细胞对过度表达 c-myc 基因的抑制作用。探讨 c-myc 靶向 shRNA 调控 Colo320 细胞端粒酶逆转录酶及端粒长度的分子机制。为探索肿瘤基因治疗的新途径提供依据。

1 材料与方法

1.1 siRNA 合成和真核表达载体的构建

根据 c-myc 基因序列 (GenBank NO. K002467) siRNA 设计规则设计 4 对 siRNA,设计基因靶点分别于 c-myc 基因的第 600、720、1734、1762 位点,靶序列分别为: MYC1 AACTATGACCTCGACTA-CGAC; MYC2 AA-

收稿日期:2008-06-16;修回日期:2008-07-02

基金项目:湖北省科技攻关资助项目(2006AA301B66-3)

作者单位:1. 430022 武汉市第一医院实验中心;2. 华中科技大学同济医学院保健科

作者简介:黄浩(1972-),男,博士,主治医师,主要从事病原生物学及肿瘤分子生物学研究

GAAATTCGAGCTGCTGCCC; MYC3 AAGGCCCAAGGTAGTTATC; MYC4 AAGCCACAGCATACTCCTGT。另设计一对对照 siRNA,由武汉市晶赛生物技术有限公司合成。将 siRNA 经 *Bam*H I, *Hind* III 双酶切插入真核表达载体, pGenesil 构建的质粒分别命名为: pGenesil-c-myc-1、2、3、4 和 pGenesil-c-myc-HK(对照质粒)。

1.2 细胞转染

人结肠癌细胞株 Colo320 购置于武汉大学生命科学院,培养于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中,37 °C、5% CO₂ 培养,0.3% 胰酶消化和传代。细胞培养至 40%~60% 融合,配制不同浓度的 pGenesil-c-myc-1、2、3、4 (终浓度分别为 5、7.5、10、12.5 ng/ml) 梭华-SofastTM /DNA 复合物,进行转染,具体操作步骤见试剂盒说明书。

1.3 细胞计数

0.25% 的胰蛋白酶液消化待计数细胞,PBS 液洗涤后,加入培养液,吹打制成待测细胞悬液。加入 0.4% 台盼蓝染液。计算细胞存活率。

1.4 ³H-胸腺嘧啶(³H-thymidine)掺入法测细胞增殖

1 mCi/ml ³H-胸腺嘧啶处理转染后 Colo320 细胞,分别用 PBS,5% 预冷的三氯乙酸及 80% 乙醇冲洗 2 次后,液闪计数器检测 ³H-TdR 掺入率。

1.5 端粒长度的测定

提取各组转染细胞 DNA,溶于 TE 溶液中。样品在 260 nm 和 280 nm 处吸光度比值为 1.8,经电泳检测染色体 DNA 完整性,取 20 μl 基因组 DNA 用适量 *Hin*F I,于 37 °C 酶切过夜,电泳检测酶切消化程度。将已酶切的 DNA 于 7 g/L 琼脂糖凝胶上进行电泳(40 V,过夜),然后用 Southern blot 印迹法转移至尼龙膜上,用试剂盒进行杂交和显色,计算平均端粒长度。

1.6 端粒酶活性测定

采用聚合酶链反应法检测端粒酶活性,操作按使用说明进行。PCR 扩增,引物设计: T1 5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3', T2 5'-CCCT-TACCCTTACCCTTACCCTAA-3'。循环反应条件:25 °C 孵育 30 min,94 °C 灭活 5 min;94 °C 30 s,50 °C 30 s,72 °C 90 s,循环 30 次;最后 72 °C 延伸 10 min 终止反应。酶标仪上读取 A450 和 A650,以其差值 ΔA(ΔA = A450-A650) > 0.2 为阳性。

1.7 逆转录反应

5 000 r/min 离心 10 min,收集各组转染细胞,预冷 PBS 洗涤 1 次后,用 Trizol 一步法提取细胞总 RNA,取 1 μg 细胞总 RNA,加入 Oligo primer

(0.5 μg/μl) 1 μl,去离子水 12 μl 混匀,70 °C 预热 5 min。0 °C 冰水浴立刻终止,5 000 r/min 离心 4 s。加入 5 × reaction buffer 4 μl,Ribonuclease 酶抑制剂(20 u/μl) 1 μl,dNTPs (10 μmol /L) 2 μl 混匀,37 °C 5 min,再加 Reverse Transcriptase (200 u/μl) 1 μl,42 °C 60 min,再 70 °C 10 min。0 °C 终止后,cDNA -20 °C 冻存。

1.8 荧光定量检测 c-myc、hTERT mRNA 的表达

采用 SYBR Green 荧光染料法针对 c-myc 的 mRNA 进行实时 RT-PCR 检测,吸取逆转录反应产物 10 μl 引物上下游各 2 μl,缓冲液 10 μl,ddH₂O 4 μl,ROX 荧光染料 1 μl,预变性 95 °C 10 min,94 °C 10 s,56 °C 30 s 延伸 72 °C 30 s,35 次循环,72 °C 5 min。设置阴性对照和 β-actin 内参照,引物序列: F: 5'-AGCTGCTTAGACGCTGGATTT-3', R: 5'-CGAGGTCAAGTTCCTGTTGGT-3', hTERT 引物序列为 F: 5'-ACGGCGACATGGAGAACAA-3', R: 5'-CACTGTCTTCCGCAAGTTCAC-3'。

1.9 Western blot 定量检测 c-myc、hTERT 蛋白

转染细胞如 1.2,收集转染及正常的细胞,细胞裂解液裂解,取 20 μl 裂解样品液,进行 SDS-PAGE 电泳,表达产物电转移至硝酸纤维素膜上,进行 Western blot 反应,通过 BandScan 5.0 软件对杂交图像进行分析,以 β-actin 作为定量标记。

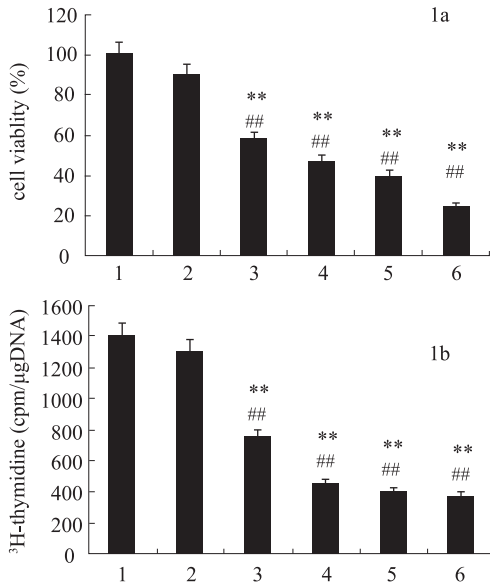
2 结果

2.1 活细胞计数与 ³H-thymidine 结果分析

转染不同浓度的 pGenesil-c-myc-1~4 组(由于 pGenesil-c-myc-1~4 各组有相似的结果,我们如下结果都以转染 pGenesil-c-myc-1 浓度 5、7.5、10、12.5 ng/ml 为代表)与对照组和空载体组比较,都具有显著性差异,活细胞数与 ³H-thymidine 的百分率显著减少,见图 1a、1b。

2.2 c-myc 的 shRNA 对 c-myc 和 hTERT 基因表达的影响

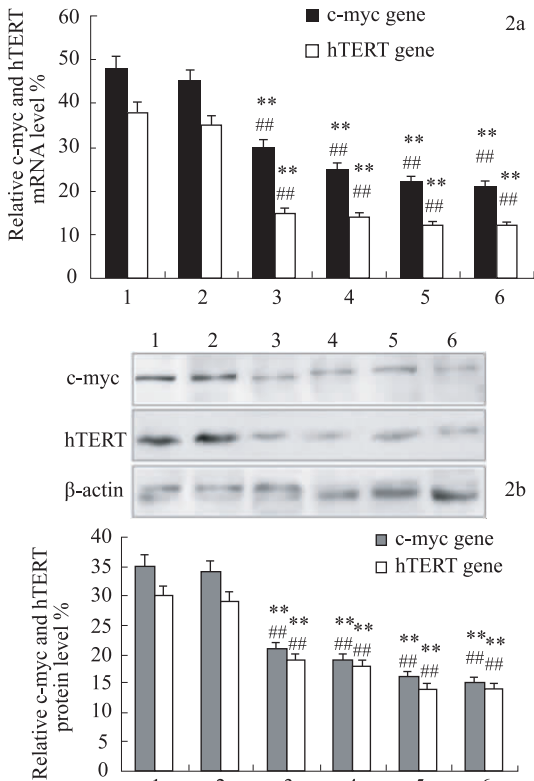
通过 Real-time PCR、Western-blot 实验,证实构建的 pGenesil-c-myc-1 对人 Colo320 细胞 c-myc 和 hTERT 基因表达具有抑制作用,见图 2。转染 pGenesil-c-myc-1 组与对照组及空载体组比较,c-myc 和 hTERT 的 mRNA 有显著性差异,mRNA 含量显著减少,见图 2a,同时,转染 pGenesil-c-myc-1 组与对照组及空载体组比较,c-myc 和 hTERT 蛋白表达有显著性差异,c-myc 和 hTERT 蛋白含量显著减少,见图 2b。



1: Untreated control cells; 2: pGensil-c-myc-HK treated; 3: 5 ng/ml shRNA treated; 4: 7.5 ng/ml shRNA treated; 5: 10 ng/ml shRNA treated; 6: 12.5 ng/ml shRNA treated; (** $P < 0.01$, vs. control, # $P < 0.01$, vs. pGensil-c-myc-HK)

图 1 活细胞计数与³H-thymidine 实验

Figure 1 Cell viability and ³H-thymidine incorporation studies



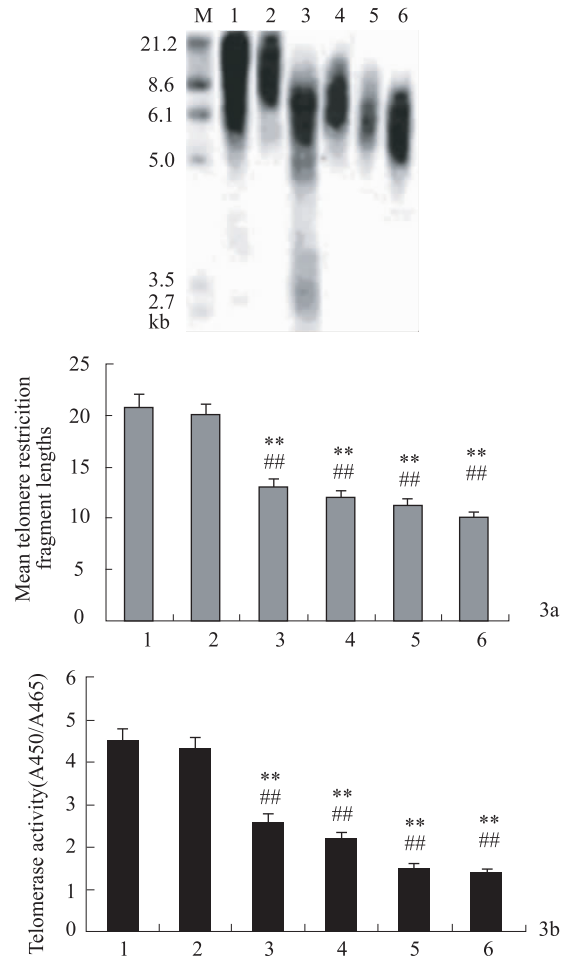
1: Untreated control cells; 2: pGensil-c-myc-HK treated; 3: 5 ng/ml shRNA treated; 4: 7.5 ng/ml shRNA treated; 5: 10 ng/ml shRNA treated; 6: 12.5 ng/ml shRNA treated; (** $P < 0.01$, vs. control, # $P < 0.01$, vs. pGensil-c-myc-HK)

图 2 shRNA 对 c-myc 和 hTERT 基因表达的影响

Figure 2 Effects of shRNA on expressions of c-myc and hTERT gene in Colo320 cells

2.3 c-myc 的 shRNA 对人 Colo320 细胞端粒长度、端粒酶活性的影响

Southern blot 杂交分析见图 3a, 转染 pGensil-c-myc-1 各浓度组, 端粒长度与对照组及空载体组比较, 有显著性差异, 端粒长度显著减少。端粒酶活性的检测, 由图 3b 可知, 转染 pGensil-c-myc-1 各浓度组, 端粒酶活性与对照组及空载体组比较, 有显著性差异, 端粒酶活性显著减少。表明 c-myc 的 shRNA 能明显下调人 Colo320 细胞端粒酶活性。



M: 22kb DNA marker; 1: Untreated control cells; 2: pGensil-c-myc-HK treated; 3: 5 ng/ml shRNA treated; 4: 7.5 ng/ml shRNA treated; 5: 10 ng/ml shRNA treated; 6: 12.5 ng/ml shRNA treated; (** $P < 0.01$, vs. control, # $P < 0.01$, vs. pGensil-c-myc-HK)

图 3 shRNA 对人 Colo320 细胞端粒长度、端粒酶活性的影响

Figure 3 Effects of shRNA on telomere length and telomerase activity in Colo 320 cells

3 讨论

原癌基因 myc 家族位于细胞核内, 是调控细胞周期的主要基因, 具有转录因子活性^[5]。c-myc 过度表达可导致细胞无限增殖并抑制细胞凋亡^[6]。最近的研究表明, hTERT 可以因 c-myc 基因过度表

达而激活^[7-8]。有人检测包括结直肠癌等 17 例肿瘤患者,发现 c-myc 的 mRNA 与 hTERT 的 mRNA 的表达率、表达量有明显的相关性^[9]。Wang 等^[10]将 c-myc 基因转染至端粒酶阴性的乳腺上皮细胞,乳腺上皮细胞表达端粒酶,且 hTERT 的 mRNA 表达水平提高 50 倍。因而,抑制 c-myc 基因的表达能够下调 hTERT 基因表达,降低端粒酶活性,抑制细胞的增殖,达到治疗肿瘤的目的。

本研究中,我们选取人结直肠癌 Colo320 细胞作为 siRNA 的靶细胞,该细胞端粒酶活性呈稳定高表达,c-myc 基因呈扩增状态。针对 c-myc 的设计发夹状 shRNA 的真核表达质粒,并转染人结直肠癌 Colo320 细胞。封阻靶基因的功能,观察分析 shRNA 封阻的作用机制。

我们应用 Real-time RT-PCR 和 Western blot 对转染 5 ng/ml、7.5 ng/ml、10 ng/ml、12.5 ng/ml 浓度的 pGenesil-c-myc-1~4 细胞的 c-myc、hTERT mRNA 和蛋白表达水平进行了检测,结果显示转染不同浓度的 pGenesil-c-myc-1~4 细胞的 c-myc、hTERT mRNA 水平较与对照组及空载体组显著减少,其 c-myc、hTERT 蛋白量亦显著下降,且各组 c-myc、hTERT mRNA 及蛋白表达量随着转染质粒浓度的增加而降低,表明我们构建的 4 种 shRNA 真核表达载体对细胞的 c-myc、hTERT 基因表达具有有效干扰作用,并且这种干扰效应具有一定的剂量依赖性。

研究中,我们使用了细胞计数及³H-thymidine 标记对细胞增殖情况进行了检测。结果显示,转染后的活细胞数与反映 DNA 合成³H-thymidine 掺入百分率亦较对照组显著减少,且其抑制作用呈剂量依赖性,当给药浓度达到 12.5 μg/ml 时,pGenesil-c-myc-1~4 对细胞生长的抑制作用最强。说明 pGenesil-c-myc-1~4 具有相似的抑制细胞生长增殖的作用,通过干扰细胞 c-myc、hTERT 基因的表达,影响细胞 DNA 合成发挥作用,并且随着给药浓度的增加,转染的 RNAi 质粒可能越多,其抑制效果也相应地增强。同时,我们还发现,转染不同浓度的 pGenesil-c-myc-1~4 细胞的端粒长度及端粒酶活

性与对照组及空载体组比较,有显著性差异,端粒长度显著减少,端粒酶活性显著降低。表明 c-myc 的 shRNA 能明显下调人 Colo320 细胞端粒长度和端粒酶活性。

我们研究发现 c-myc 特异性的 shRNA 可通过干扰相应 mRNA,导致端粒酶活性下调,端粒长度缩短,抑制结直肠癌的增殖。本研究为端粒酶的基因调控以及结直肠癌的基因治疗提供了一个潜在的新线索。

参考文献:

- [1] Zhang J, Chen S, Zhang W, et al. Human differentiation-related gene NDRG1 is a Myc downstream-regulated gene that is repressed by Myc on the core promoter region [J]. *Gene*, 2008, 417(1-2): 5-12.
- [2] Jaco I, Canela A, Vera E, Blasco MA. Centromere mitotic recombination in mammalian cells [J]. *J Cell Biol*, 2008, 181(6): 885-892.
- [3] Deng Y, Chan SS, Chang S. Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(6): 450-458.
- [4] Kondo Y, Koga S, Komata T, et al. Treatment of prostate cancer in vitro and in vivo with 2-5A-anti-telomerase RNA component [J]. *Oncogene*, 2000, 19(18): 2205-2211.
- [5] Kurland JF, Tansey WP. Myc-mediated transcriptional repression by recruitment of histone deacetylase [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(10): 3624-3629.
- [6] Hemann M T, Bric A, Teruya J, et al. Evasion of the p53 tumour surveillance network by tuour derived MYC mutants [J]. *Nature*, 2005, 436(7052): 787-795.
- [7] Yuen JW, Gohel MD, Au DW. Telomerase-associated apoptotic events by mushroom ganoderma lucidum on premalignant human urothelial cells [J]. *Nutr Cancer*, 2008, 60(1): 109-119.
- [8] Mijatovic T, De N ve N, Gailly P, et al. Nucleolus and c-Myc: potential targets of cardenolide-mediated antitumor activity [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(5): 1285-1296.
- [9] Pallini R, Pierconti F, Falchetti ML, et al. Evidence for telomerase involvement in the angiogenesis of astrocytic tumors: expression of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA by vascular endothelial cells [J]. *J Neurosurg*, 2001, 94(6): 961-971.
- [10] Wang J, Hannon GJ, Beach DH. Risky immortalization by telomerase [J]. *Nature*, 2000, 405(6788): 755-756.

[编辑:刘红武;校对:安 凤]