

肝癌细胞端粒酶逆转录酶 (htert) 活性与 c-myc 表达的关系及调控研究

林 勇¹, 曾 欣¹, 谢渭芬¹, 陈伟忠¹, 张忠兵¹, 张 新², 陈岳祥¹

摘要:目的 研究肝癌细胞端粒酶逆转录酶 (htert) 活性与 c-myc 的表达及其在肝癌发生中的调控机制。方法 TRAP-ELISA 法和 RT-PCR 分别测定肝癌细胞株端粒酶活性、htert 和 c-myc 表达;将 c-myc 表达质粒与含有 htert 启动子序列的报告基因质粒共转染 COS-7 细胞后测定启动子活性。结果 肝癌细胞株均有端粒酶活性表达;htert 和 c-mycmRNA 表达明显增高;外源性 c-myc 可上调 htert 启动子活性。结论 在肝癌细胞株中,c-myc 和 htert 的表达均增强且有着重要的相关性;c-myc 对 htert 基因调控可能是激活端粒酶诱发肝癌发生的重要途径。

关键词:肝癌;端粒酶逆转录酶;c-myc;基因调控

中图分类号:R735.7 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2002)05-0359-03

Humantelomerasereversetranscriptase(htert)activity correlateswithc-mycexpressionandregulationinhepatomacelllines

LINYong,ZENGXin,XIEWeifen,etal

Department of Gastroenterology, Changzhen Hospital,

Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

Abstract:Objective Toinvestigate theactivity ofhumantelomerasereversetranscriptase (htert) andthe expressionof c-mycinhepatomacelllines,whichmayregulatethe pathwayinhepatocarcinoma genesis. **Methods** TRAP-ELISAmethodwasusedtodeterminethetelomeraseactivity inhepatomacelllines,andtheexpression ofhtertandc-mycintranscriptionallevelwasmeasuredbyusingRT-PCRtechnique.Thenthec-mycexpression plasmidandthevectorwhichharborshtert promoterwerecotransfectedintoCOS-7cells,andtheactivity of promoterwasdeterminedaftertransfection. **Results** Thetelomeraseactivitiesofhepatomacelllineswere positiveandtheRNAexpressionofhtertandc-mycinthe celllinesincreasedtoo.Inaddition,exogenousc-myc couldtransactivatehtert promoteractivity. **Conclusion** Thereistheimportantcorrelationbetweenc-myc andhtert,andtheup-regulationof telomeraseactivitywhichcontributes tothehepatocarcinoma genesismay be conferredthroughtransactivationofhtertbyc-myc.

Keywords: Hepatoma;Humantelomerasereversetranscriptase;C-myc;Gene regulation

人类细胞端粒酶含有多个蛋白质亚单位,其中人端粒酶逆转录酶(humantelomerasereversetranscriptase,htert)在肿瘤细胞中表达明显增强,在正常细胞中受到抑制,其表达水平与端粒酶活性显著相关,对端粒酶活性表达起限速作用。c-myc 则由 myc 原癌基因编码,参与细胞的分化与增殖,其调控、表达异常

与肿瘤发生密切相关。最近的研究发现 htert 被激活可能和 c-myc 的高表达有关^[1]。

本实验检测了不同肝癌细胞株的端粒酶活性、htert 和 c-mycmRNA 的表达,同时利用体外瞬时转染技术,测定了外源性 c-myc 对 htert 启动子的调控作用,以期进一步了解 htert 和 c-myc 在肝癌发生机制中的相互作用。

1 材料与方法

1.1 细胞 肝癌细胞株 HepG2、HepG1-6、SMMC-7721 和正常肝细胞株 L02 以及猴肾细胞 COS-7 由上海市国家人类基因组南方研究中心提供。

1.2 质粒 DNA c-myc 表达质粒(pMT2Twtmyc)含有 3.8Kb 的 c-mycDNA 片段,对照质粒(pMT2T)不含

收稿日期:2001-12-24;修回日期:2002-02-19

基金项目:本课题受全军医药卫生科研基金课题面上项目(01MA153)及上海市青年科技启明星计划资助项目(00QB14054)资助

作者单位:1.200003 上海第二军医大学长征医院消化内科;2.上海市国家人类基因组南方研究中心

插入片段;htert 启动子报告基因质粒 TERTLuc(800) 含有 800b phtert 启动子序列,连接萤火虫酶报告基因(Fireflyluciferase)。以上质粒由哥伦比亚大学 Kour JueyWu 教授惠赠^[2];pRLSV40 质粒(连接报告基因 Renillaluciferase),购自 Promega 公司。

1.3 端粒酶活性测定 TRAP-ELISA 定性检测肝癌细胞株 HepG2、HepG1-6、SMMC-7721 以及肝细胞株 L02 端粒酶活性,方法见引文^[3]。

1.4 设计 RT-PCR 引物 httert 引物:sense5'-CGG AAGAGTGTCTGGAGCAA -3',antisense5'-GGA TGAAGCGGAGTCTGGA -3';PCR 反应条件 94 45 秒,57 60 秒,72 60 秒,31 个循环^[4]。c-myc 引物:sense5'-TACCC7CTCAACGACAGC AG\3',antisense5'-TCITGACATTCTCCT CGGTG -3';PCR 反应条件 94 30 秒,60 60 秒,68 120 秒,30 个循环^[5]。以上引物由上海申友公司合成。

1.5 RT-PCR 测定肝细胞株 L02 和各肝癌细胞株 httert 及 c-mycmRNA 表达 分别将 HepG2、HepG1-6、SMMC-7721 和 L02 以 5×10^5 /皿接种于 60mm 培养皿(Nunc),加入含 10% 胎牛血清(HighClone)的新鲜 DMEM 培养液培养 3d 后,用 Trizol 试剂(Gibco)抽提总 RNA 并作逆转录反应 1h,取 0.8 μ l 逆转录产物为模板分别进行 PCR 扩增,以 2.0% 琼脂糖凝胶电泳观察 httert 和 c-mycmRNA 的表达。

1.6 外源性 c-myc 对 httert 启动子的调控 将构建好并经测序的 pMT2Twtm yc、pMT2T、TERTLuc(800)质粒转化为感受态大肠杆菌,大量扩增阳性克隆,用 QIAGEN-tip100 试剂盒(Qiagen)抽提、纯化质粒,配成工作浓度(0.5 μ g/ μ l)。猴肾细胞 COS-7 以 5×10^5 /孔接种于六孔培养板(Nunc),24h 后细胞至对数生长期(约 60% ~ 80% 融合),将 1.0 μ g TERTLuc(800)分别与 1.0 μ g pMT2Twtm yc 和 1.0 μ g pMT2T 混合,并以脂质体-DNA 复合物的形式(比例为 1:5)加入上述细胞培养孔中,同时转染内对照 pRLSV40 质粒,24h 后更换含 10% 胎牛血清的新鲜培养液。37 细胞培养箱继续培养 24h 后,用预冷的 PBS 洗 3 遍,以 1 \times PLB 裂解液消化、裂解细胞后,再用 Luciferase 试剂盒(Promega)及萤火虫酶测定仪(Berthold)测定萤火虫酶活性。萤火虫酶活性值以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并以两组萤火虫酶活性比值计算报告基因相对活性。各组复设 2 盘,重复 3 次。

2 结果

2.1 不同细胞株端粒酶活性的测定 TRAP-ELISA 法测定各肝癌细胞株端粒酶活性。从表 1 可见,三株

肝癌细胞株均表现较高的端粒酶活性,L02 未见明显的端粒酶活性表达。

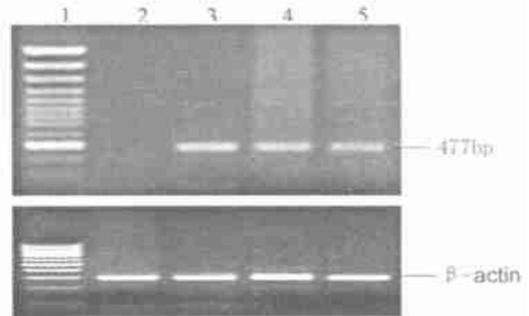
表 1 不同细胞株端粒酶活性测定

细胞株	OD 值($\bar{x} \pm s$)
L02	0.522 \pm 0.016
HepG2	2.683 \pm 0.145 *
HepG1-6	2.437 \pm 0.091 *
SMMC-7721	2.088 \pm 0.237 *

*与对照组相比 $P < 0.05$

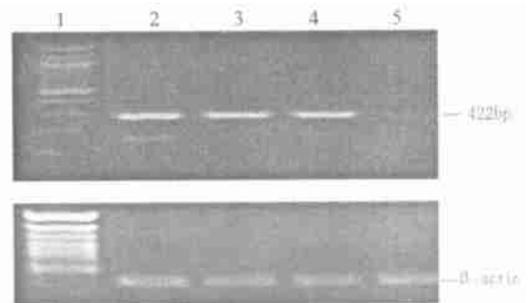
2.2 不同细胞株 httert 和 c-mycmRNA 的表达 RT-PCR 测定各肝癌细胞株 httert 和 c-mycmRNA 的表达,结果见图 1、图 2。HepG2、HepG1-6、SMMC-7721httert 和 c-mycmRNA 表达较强,L02 未见明显表达。

2.3 c-myc 对 httert 启动子的调控作用 将 c-myc 表达质粒 pMT2Twtm yc 或空载质粒 pMT2T 分别与 TERTLuc(800)共转染至 COS-7 细胞,结果显示外源性 c-myc 可显著上调 httert 启动子的活性,是对照组的 4.33 倍(图 3 略)。



1 RT-PCR 测定不同细胞株 c-mycmRNA 的表达

1.100b pmarker;2.L02;3.He pG2;4.He pG1-6;5.SMMC -7721



2 RT-PCR 测定不同细胞株 httert mRNA 的表达

1.100b pmarker;2.He pG2;3.He pG1-6;4.SMMC -7721;5.L02

3 讨论

端粒酶在细胞永生化和恶性肿瘤发生中起重要作用,其催化亚单位—httert 对端粒酶活性表达最为关键,许多研究已证实,httert 活性上调是端粒酶激活的重要途径,也可能成为肿瘤基因治疗的一个理想靶点。对 httert 的研究揭示:在肿瘤细胞中,httert 的高表达往往伴有 c-myc 的活性增强;httert 启动子序列存在多个与

c-myc 蛋白结合的顺式作用元件—E 盒,推测 c-myc 可能参与 htert 和端粒酶的激活过程^[1,6]。

为研究肝癌细胞端粒酶和 htert 活性的表达与 c-myc 调控之间的关系,本实验首先检测了不同肝癌细胞株的端粒酶活性,结果显示三株肝癌细胞株均有较高的端粒酶活性表达,说明端粒酶在肝癌细胞发生发展过程中起着重要的作用。

为明确肝癌细胞株端粒酶活性上调是否伴随 htert 和 c-myc 表达的增强,本实验分别检测了不同肝癌细胞株 htert 和 c-mycmRNA 的表达。结果:在肝癌细胞中 htert 和 c-myc 的表达均明显增强,表明 c-myc 与 htert 的表达与端粒酶的激活和肝癌的发生可能存在密切关系。

目前的一些研究推测,c-myc 的高表达可能导致 htert 的活性增强,这或许是许多肿瘤发生的重要途径之一^[2,6]。我们的相关实验说明,htert 启动子序列尤其以临近转录起始位点 800bp 的序列中,存在着调控 htert 表达的重要顺式作用元件,包括 c-myc、SP1、AP2 等多个反式作用因子的结合位点,特别是 E 盒,可能是 htert 基因调控的主要靶位点^[7]。为进一步明确 c-myc 对 htert 启动子调控作用,本实验利用体外瞬时共转染方法,将 c-myc 表达质粒和连接报告基因的 htert 启动子质粒一起转染至 COS-7 细胞,结果是外源性 c-myc 表达可明显激活 htert 启动子的活性,进一步证实 c-myc 对 htert 的激活有着重要的调控作

用。

端粒酶在肿瘤发生和细胞永生过程中的作用已成为肿瘤研究的热点,且端粒酶基因调控的研究也日益为人们所重视。本课题通过对肝癌细胞 c-myc 与 htert 活性及调控的研究,不仅初步证实了二者在部分肝癌发生机制中的相关性,也为端粒酶基因调控研究提供了新的思路,可望为肿瘤的基因治疗提供更有力的手段。

参考文献:

[1] 林勇,陈伟忠,谢渭芬,等. 端粒酶逆转录酶研究现状[J]. 肿瘤防治研究,2001,28 (3):246-248.
 [2] WuKJ,GrandoriC,AmackerM,etal.DirectactivationofTERT transcriptionbyC-MYC[J].NatGenet,1999,21 (2):220-224.
 [3] 谢渭芬,林勇,张兴荣,等. 重组人肿瘤坏死因子调节端粒酶活性的体外研究[J]. 中华消化杂志,2001,21 (3):156-158.
 [4] NakamuraTM,MorinGB,ChapmanKB,etal.Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human[J]. Science,1997,277 (15):955-959.
 [5] FieldsWR,DesiderioJG,PutnamKP,etal.Quantification of changes in c-myc mRNA levels in human bronchial epithelial (NHBE) and lung adenocarcinoma (A549) cells following in vivo chemical treatment[J]. Toxicol Sci,2001,63 (1):107-114.
 [6] LatilA,VidaudD,ValeriA,etal.Htert expression correlates with MYC over-expression in human prostate cancer[J]. Int J Cancer, 2000,89 (2):172-176.
 [7] 林勇,谢渭芬,陈伟忠,等.c-myc 调节人端粒酶逆转录酶(htert)启动子活性的体外研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2001,8 (1):34-36.

(安 凤校对)

青春前期双侧乳腺多发性 巨纤维腺瘤癌变 1 例

何德云

关键词:青春前期;乳腺肿瘤病;纤维腺瘤
 中图分类号:R737.9 文献标识码:D
 文章编号:1000-8578(2002)05-0361-01

1 病案摘要

女,14岁,学生。因发现双乳肿块半年余,于1995年1月17日就诊。半年前无意中

发现异常。双乳呈球形膨隆,皮肤高度紧张,部分区域静脉怒张,乳头未发育,无溢液,左乳肿块约13.0×12.0 cm²,右乳肿块约16.0×15.0 cm²,均呈多个结节,占据整个乳腺,质地硬、边清,有一定活动度。

腺迅速增大。患者尚未初潮,家中无乳

锁骨上及腋窝未扪及肿大淋巴结。针吸细胞学提示:乳腺纤维腺瘤,部分细胞有异形。于1995年1月24日在

插管全麻下予双侧乳腺切除术。术中见肿块呈结节状,结节大小不等,小如黄豆,最大约8.5×8.5×6.0 cm³。病理报告:双侧乳腺多发性巨纤维腺瘤并局灶性癌变。术后未予放疗、化疗。随访6年余,未见复发。

2 讨论

女性乳腺属内分泌系统的组成部分之一,当女孩发育到一定的年龄阶段,体内的激素水平增高且又不太稳定,而乳腺组织对雌激素、孕激素的敏感性较高,当这种刺激和反映仅限于乳腺组织的一部分时,就会产生局部的纤维腺瘤。巨纤维腺瘤发病极少,一般发生在青年妇女,多见于20岁前后,单侧,病程也较慢。而青春前期女性双侧同时发生巨纤维腺瘤并癌变少见报道,该病愈后良好,但需与乳癌、叶状囊肉瘤和恶性淋巴瘤鉴别,以免误治。

(李奇明校对)

收稿日期:2001-12-30;修回日期:2002-01-24
 作者单位:541002 桂林,广西南溪山医院外六科

