

RNA 干扰对肾癌细胞端粒酶活性及增殖、凋亡的影响

郝林, 郑骏年, 李望, 杨文发, 刘俊杰, 温儒民, 陈家存, 孙晓青

Inhibition of Telomerase Activity in Human Renal Carcinoma Cells by RNA Interference Leads to Inhibition of Proliferation and Induction of Apoptosis

HAO Lin, ZHENG Jun-nian, LI Wang, YANG Wen-fa, LIU Jun-jie, WEN Ru-min, CHEN Jia-Cun, SUN Xiao-qing

Department of Urology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China

Corresponding Author: ZHENG Jun-nian, E-mail: zhengjunnian@sina.com

Abstract :Objective To evaluate the effects of small interfering RNA (siRNA) against either the template RNA (hTR) or its catalytic subunit (hTERT) of telomerase gene on the proliferation and apoptosis of human renal carcinoma cell line 786-0 cells. **Methods** 786-0 cells were transfected with hTR-siRNA or hTERT-siRNA (100nmol/L). The mRNA expression of hTR and hTERT was detected by RT-PCR. The telomerase activity was detected by telomeric repeat amplification protocol (TRAP). The proliferation of 786-0 cells was detected by MTT assay. The apoptosis of 786-0 cells was detected by TUNEL assay. **Results** The hTR and hTERT expression levels of 786-0 cells were reduced significantly by hTR-siRNA and hTERT-siRNA respectively. Both types of siRNA reduced telomerase activity, inhibited proliferation and increased apoptosis of 786-0 cells. When cells were treated with both hTR-siRNA and hTERT-siRNA simultaneously, the effects did not exceed that seen with each separately. **Conclusion** siRNA against hTR or hTERT gene can inhibit the proliferation and induce apoptosis by blocking telomerase activity of human renal carcinoma 786-0 cells. The inhibition of telomerase by siRNA may be a rational approach in gene therapy for renal cancer.

Key words: Renal neoplasm; Small interfering RNA; Human telomerase RNA; Human telomerase reverse transcriptase

摘要:目的 探讨针对人端粒酶 RNA (hTR) 及其催化亚基 (hTERT) 的小干扰 RNA (siRNA) 对肾癌细胞端粒酶活性及其增殖、凋亡的影响。方法 将 hTR-siRNA、hTERT-siRNA (100nmol/L) 单独或联合转染人肾癌 786-0 细胞, 采用 RT-PCR 法检测 hTR、hTERT mRNA 表达, TRAP-ELISA 法检测端粒酶活性, MTT 法检测细胞增殖, 免疫组化 TUNEL 法检测细胞凋亡。结果 (1) hTR-siRNA 可显著降低 786-0 细胞 hTR mRNA 表达 ($P < 0.01$), hTERT-siRNA 可显著降低 hTERT mRNA 表达 ($P < 0.01$), 但彼此互不影响。(2) 二者均能显著抑制端粒酶活性 ($P < 0.01$, $P < 0.01$), 并增加 786-0 细胞增殖抑制率及凋亡细胞阳性率 ($P < 0.01$, $P < 0.01$)。二者联合应用与单独应用差异亦无显著性 ($P > 0.05$)。结论 hTR、hTERT siRNA 通过抑制各自基因表达, 抑制人肾癌细胞端粒酶活性, 进而抑制增殖、促进凋亡。

关键词: 肾癌; 小干扰 RNA; 端粒酶 RNA; 端粒酶逆转录酶

中图分类号: R73-36⁺2; R737.11 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2007)01-0001-03

0 引言

端粒酶被激活导致肿瘤细胞无限增殖, 抑制端粒

酶活性能使肿瘤细胞无法合成端粒而凋亡, 因此是肿瘤治疗的理想靶点^[1]。端粒酶主要由端粒酶 RNA (hTR) 及端粒酶逆转录酶 (hTERT) 组成。端粒酶以 hTR 为模板合成端粒 DNA, hTERT 则是催化这一反应的唯一限速酶。RNA 干扰能特异、高效阻抑靶基因表达, 有望成为肿瘤基因治疗的有力工具。我们应用 RNA 干扰技术阻抑 hTR、hTERT 表达, 观察其对肾癌细胞端粒酶活性及增殖、凋亡的影响。

收稿日期: 2006-01-16; 修回日期: 2006-03-01
基金项目: 国家自然科学基金 (30370331); 江苏省卫生厅医学科技发展基金 (H200328)
作者单位: 221002 江苏徐州医学院附属医院泌尿外科
通讯作者: 郑骏年, E-mail: zhengjunnian@sina.com
作者简介: 郝林 (1981-), 男, 硕士, 主要从事泌尿系肿瘤基因治疗的研究

1 材料与方法

1.1 材料

人肾癌透明细胞株 786-0 由本室保存。hTR-siRNA、hTERT-siRNA、阴性对照 siRNA、siRNA 转染试剂盒为美国 Ambion 公司产品。总 RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒为美国 Promega 公司产品。TRAP-ELISA 端粒酶活性检测试剂盒购自 Roche 公司。原位末端凋亡检测试剂盒购自 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 siRNA 的设计、合成

由 Ambion 公司设计、合成针对人端粒酶 hTR 序列及 hTERT 基因显性失活突变体区(NM003219, 碱基序列位置 2182~2200)的 siRNA。hTR 序列如下:正义链: 5'-UUGUCUAACCCU AACU GA Gt -3', 反义链 3'-ttAACAGAUU GGGAUU GACUG-5'。hTERT 序列如下:正义链 5'-CAAGGU GGAU GU GACGGG Ctt-3'。反义链 3'-ttGUUCCACCUACACU GCCCG-5'。经基因库检索确认与 hTR、hTERT 以外的基因序列无同源性。

1.2.2 细胞培养及转染

786-0 细胞于含 10% FCS 的 RPMI1640 中常规培养 48h, 按转染试剂盒说明将 hTR-siRNA、hTERT-siRNA 调整到终浓度为 100 nmol/L, 单独或联合加入培养细胞内, 另以生理盐水(空白对照)、脂质体、阴性对照 siRNA 作对照。培养 24h 后检测 hTR/hTERT mRNA 表达及端粒酶活性, 72h 后检测细胞增殖及凋亡。

1.2.3 RT-PCR

提取总 RNA, RT-PCR 试剂盒一步法行 RT-PCR 反应。hTR 上、下游引物序列如下: 5'-CTGGGAGGGGTGGTGGCCATTT-3', 5'-CGAACGGCCAGCAGCTGACAT-3'。hTERT 引物: 5'-GCCAGAACGTTCCGCA GAGAAA-3', 5'-AATCATC-CACCAAACGCA GGA GC-3'。以 GADPH 基因作为内参照。取 PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外照相并扫描分析, 以 hTR、hTERT/GADPH 表达水平行半定量分析。

1.2.4 端粒酶活性的测定

采用端粒重复序列扩增-酶联免疫吸附 (TRAP-ELISA) 法进行检测, 根据 $A = A_{450} - A_{690}$ 计算端粒酶活性, 并计算与空白对照组比值。具体步骤按说明书进行。

1.2.5 MTT 法检测细胞增殖

处理后 786-0 细胞加入 MTT10 μ l/孔 (5mg/ml), 继续培养 4h 后吸弃上清。加入二甲亚砜 100 μ l/孔, 溶解甲瓚紫结晶, 酶标仪 570nm 波长处

测定吸光度 A 值, 计算抑制率。

1.2.6 TUNEL 法检测细胞凋亡

786-0 细胞于玻片上固定, 洗片后与 Triton-100 共同孵育 2min, 滴加 TUNEL 反应混合液, 在湿盒中 37 $^{\circ}$ C 孵化 1h, PBS 洗 3 次, 二氨基联苯染色, 洗片后封片。高倍镜下随机计数 5 个视野, 细胞核呈黄褐色即为阳性, 计算阳性细胞百分比。

2 结果

2.1 siRNA 对 786-0 细胞 hTR、hTERT mRNA 表达的影响

与阴性 siRNA 对照组比较, hTR-siRNA 组 hTR mRNA 水平明显下调 ($P < 0.01$), hTERT mRNA 水平无明显变化 ($P > 0.05$)。hTERT-siRNA 组 hTERT mRNA 水平明显下调 ($P < 0.01$), hTR mRNA 水平无明显变化 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 hTR-siRNA、hTERT-siRNA 对肾癌 786-0 细胞 hTR、hTERT mRNA 表达的影响

组别	hTR mRNA 表达 (%)	hTERT mRNA 表达 (%)
阴性 siRNA	98.5 \pm 3.4	96.1 \pm 0.9
hTR siRNA	40.7 \pm 1.5 [*]	92.7 \pm 4.5 [#]
hTERT siRNA	94.5 \pm 3.5 [#]	40.1 \pm 1.9 [*]

注:与阴性 siRNA 组比较, [#] $P > 0.05$, ^{*} $P < 0.01$

2.2 siRNA 对 786-0 细胞端粒酶活性的影响

hTR-siRNA 和 hTERT-siRNA 均能明显抑制端粒酶活性 ($P < 0.01$), 但二者比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。联用组与单用组比较差异无显著性 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 hTR-siRNA、hTERT-siRNA 对肾癌 786-0 细胞端粒酶活性及增殖、凋亡的影响

组别	端粒酶活性 (%)	增殖抑制率 (%)	凋亡率 (%)
阴性 siRNA	96.5 \pm 1.4	2.6 \pm 0.2	9.3 \pm 1.4
hTR siRNA	32.7 \pm 2.3 ^{**}	63.6 \pm 1.6 ^{**}	39.4 \pm 0.6 ^{**}
hTERT siRNA	35.8 \pm 1.7 ^{**}	60.7 \pm 1.6 ^{**}	43.2 \pm 0.9 ^{**}
hTR+hTERT siRNA	33.9 \pm 4.3 ^{**}	65.9 \pm 5.3 ^{**}	45.2 \pm 4.3 ^{**}

注:与阴性 siRNA 组比较, ^{*} $P < 0.01$; 三组之间两两比较, [#] $P > 0.05$

2.3 siRNA 对 786-0 细胞增殖的影响

hTR-siRNA 和 hTERT-siRNA 均能明显抑制 786-0 细胞增殖, 二者比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。联用组与单用组比较差异无显著性 ($P > 0.05$), 见表 2。

2.4 siRNA 对 786-0 细胞凋亡的影响

hTR-siRNA 和 hTERT-siRNA 均能明显促进 786-0 细胞凋亡, 二者比较差异无显著性 ($P >$

0.05)。联用组与单用组比较差异无显著性 ($P > 0.05$),见表 2。

3 讨论

端粒位于线性染色体末端,细胞每分裂一次端粒序列缩短 50 ~ 200bp,当缩短至临界长度时细胞凋亡^[2]。端粒酶是催化合成并维持端粒长度的一种核糖核蛋白,由端粒酶 RNA (hTR)、端粒酶催化亚基(hTERT)组成,它能以 hTR 为模板,在 hTERT 催化下合成端粒,以弥补缩短的端粒^[3]。癌细胞由于端粒酶的激活使染色体端粒维持在一定长度,一方面使细胞获得永生,另一方面使细胞周期缩短、生长变快^[3]。研究证实针对 hTR、hTERT 的反义核酸能够通过抑制端粒酶活性,抑制多种肿瘤细胞增殖并诱导凋亡^[1,4]。Kanaya 等^[5]报道 hTR、hTERT 在肾癌组织的检出率分别为 80%、86%,且其表达与端粒酶活性呈正相关,而正常肾组织无 hTERT 表达,因此 hTR、hTERT 是肾癌基因治疗的有效靶点。

RNA 干扰是由小片断双链 RNA (siRNA) 介导的转录后基因沉默技术。siRNA 进入细胞后与 RNA 诱导的沉默复合体(RISC)结合,并在 RISC 作用下特异性降解靶基因 mRNA,其效率比单链反义 RNA 强 100 倍^[6],因此 siRNA 可在体内外抑制癌基因表达,并抑制肿瘤生长^[7]。本研究发现 siRNA 可抑制肾癌细胞 hTR、hTERT 基因表达,且具有高度特异性。hTR、hTERT 表达抑制后,肾癌细胞端粒酶活性降低。二者抑制端粒酶活性作用相仿,联用亦不能增强抑制作用。我们的研究结果与 Kosciolk 在结肠癌、宫颈癌细胞中获得的结果一致^[8]。

本研究还发现 hTR-siRNA 与 hTERT-siRNA 具有相似的抑制肾癌细胞增殖、促进凋亡作用,联合应用也不能增加其作用。肿瘤细胞端粒酶活性下降后,通常需要数周时间,肿瘤细胞经过数代分裂使端

粒缩短至临界值后才能凋亡^[9]。但如果肿瘤细胞的端粒加帽延长功能具有缺陷,肿瘤细胞也能立即出现增殖抑制、凋亡增加^[10]。本研究 siRNA 处理后 72h 细胞即出现增殖抑制、凋亡增加,可能与 786-0 细胞端粒加帽延长功能缺陷有关。

参考文献:

- [1] 许宁,赵忠文,石爱平等.端粒酶反义寡核苷酸对肾癌细胞端粒酶活性及其体外增殖的影响[J].中华泌尿外科杂志,2000,21(6):331-333.
- [2] Richard CA, Homagoun V, Christopher P. Telomeres length predicts replicative capacity of human fibroblasts[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(21):10114-10118.
- [3] Holt SE, Ginsky VV, Ivanova AB, et al. Resistance to apoptosis is in human cell conferred by telomerase function and telomere stability[J]. Mol Carcinog, 1999, 25(4):241-248.
- [4] Zhang Y, He DM. Effect of antisense hTERT mRNA oligodeoxynucleotide on telomerase activity of leukemic cells [J]. Cell Biol Int, 2002, 26(5):427-431.
- [5] Kanaya T, Kyo S, Takakura M, et al. hTERT is a critical determinant of telomerase activity in renal-cell carcinoma [J]. Int J Cancer, 1998, 78(5):539-543.
- [6] Lipardi C, Wei Q, Paterson BM. RNAi as random degradative PCR: siRNA primer convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs[J]. Cell, 2002, 107(4):297-307.
- [7] Martinez LA, Naguibneva I, Lehmann H, et al. Synthetic small inhibiting RNAs: Efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways [J]. PNAS, 2002, 99(23):14849-14854.
- [8] Kosciolk BA, Kalantidis K, Tabler M, et al. Inhibition of telomerase activity in human cancer cells by RNA interference [J]. Mol Cancer Ther, 2003, 2(3):217-218.
- [9] Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, et al. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells [J]. Nat Med, 1999, 5(10):1164-1170.
- [10] 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.

[编辑:贺文]