

c-myc 反义核酸对乳腺癌 MCF-7 细胞生长及 hTERT 基因表达的影响

马莉, 税青林, 张莉娟, 彭春, 赵小平

Effect of c-myc Antisense Oligodeoxynucleotides on Cytology and Human Telomerase Reverse Transcriptase Gene in MCF-7 Cells

MA Li, SHUI Qing-lin, ZHANG Li-juan, PENG Chun, ZHAO Xiao-ping

Department of Biology and Genetics, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China

Corresponding Author: SHUI Qing-lin

Abstract: **Objective** To investigate the effects of c-myc ASODN on MCF-7 cells growth and the expression of hTERT gene in MCF-7 cells. **Methods** After transfecting c-myc SODN and ASODN to MCF-7 cells, we measured the proliferation, apoptosis rates and the expression of hTERT mRNA respectively by MTT method, flow cytometry analysis and RT-PCR. **Results** When c-myc ASODN affected MCF-7 cells at 24h, cells growth was inhibited significantly ($P < 0.05$) with hTERT gene expression of MCF-7 cells descending significantly ($P < 0.01$). The apoptosis rates of the ASODN-treated cells rised significantly at 48h. The described effects of suppression on cells rised with time increasing. **Conclusion** c-myc ASODN can effectively inhibit the MCF-7 cells growth, induce apoptosis, and down-regulate hTERT gene expression in MCF-7 cell. The effects correlated with time to a degree.

Key words: Breast neoplasms; c-myc; Human telomerase reverse transcriptase; Antisense Oligonucleotide; MCF-7 cell

摘要: **目的** 探讨脂质体介导 c-myc 基因反义寡核苷酸(Antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide, ASODN)对 MCF-7 细胞生长及其人体端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)基因表达的影响。 **方法** 将 c-myc 正、反义寡核苷酸(ODN)分别导入各组 MCF-7 细胞中, MTT 法、逆转录-聚合酶链法及流式细胞术分别检测各组细胞生长情况、hTERT mRNA 的表达水平以及细胞凋亡率。 **结果** c-myc ASODN 转染 MCF-7 细胞 24h 后,细胞生长受到抑制($P < 0.05$),并且 hTERT mRNA 表达明显降低;随着反义核酸作用时间的延长,凋亡细胞数目逐渐增多,细胞生长及 hTERT 表达的下降随时间延长逐渐明显。对照组、LR-SODN 组、LR-ASODN 24h 组与 LR-ASODN 48h、72h 组相比有显著统计学差异($P < 0.05$)。 **结论** c-myc 反义寡核苷酸能显著下调细胞中 hTERT 基因的表达活性,诱导 MCF-7 细胞凋亡,并抑制 MCF-7 细胞生长;在一定程度上,其效果与时间呈正相关。

关键词: 乳腺癌; c-myc; 人端粒酶逆转录酶; 反义核酸; MCF-7 细胞

中图分类号: R73-36⁺2; R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2007)01-0014-04

0 引言

端粒酶是维持染色体结构和功能稳定的一种核糖核蛋白复合体,在几乎所有的人类恶性肿瘤细胞中均高表达^[1]。其最重要的成分是人端粒酶催化亚单位,又称人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT),被认为是端粒酶激

活的限速因素。随着 hTERT 基因克隆^[2]成功,对其的调控研究成为端粒酶研究的重点。

c-myc 是一类参与细胞增殖与分化的原癌基因,通过基因扩增、逆转录酶插入和染色体易位等方式表达失调,在大多数的肿瘤中都有高水平的表达^[3,4],并且 c-myc 是第一个被发现的调节 hTERT 基因表达的重要转录因子^[5]。许多研究报道,在恶性肿瘤细胞中 c-myc 与 hTERT 的表达密切相关。Oh 等^[5]报道,与正常细胞相比,myc 蛋白在肿瘤细胞中表达显著增高;激活或抑制 myc 蛋白表达可以改变 hTERT 启动子活性,认为 myc 蛋白对 hTERT 启动子的调节作用可能与其促进肿瘤形成有关。而目前也有研究显示^[6],c-myc 与 hTERT 的表达调控无明显相关性。

收稿日期:2006-01-27;修回日期:2006-09-15

基金项目:四川省教育厅自然科学基金重点资助项目(2002A068)

作者单位:646000 泸州,四川省泸州医学院医学生物学与遗传学教研室

通讯作者:税青林

作者简介:马莉(1979-),女,硕士,主要从事基因治疗研究

由此可见,研究者们对于 c-myc 与 hTERT 的表达调控关系仍持不同意见。

本研究选用 c-myc 和 hTERT 均高表达的乳腺癌 MCF-7 细胞,采用 Lipfect AMINE™ 介导的反义核酸技术将 c-myc 反义核酸转染入 MCF-7 细胞,观察细胞生长抑制、细胞凋亡以及 hTERT 基因表达的变化,为针对端粒酶抑制的乳腺癌肿瘤基因治疗提供理论依据,并从逆向角度进一步探讨 c-myc 对 hTERT 基因表达的调控作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

采用含 5% FBS (60 灭活 30min)、100U/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基,在 37、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养人乳腺癌 MCF-7 细胞系。实验选用指数生长期细胞。

1.2 c-myc 正、反义寡核苷酸转染

c-myc 正、反义寡核苷酸由上海 Sangon 公司合成并行全硫代磷酸化修饰,经 NCBI blast 证实与人类其他已知基因无同源性。序列分别为:反义序列 (ASODN):5'-AAC GTT GAG GGG CAT-3';正义序列 (SODN):5'-ATG CCC CTC AAC GTT-3'。将细胞分为对照组、LR-SODN 组与 LR-ASODN 组。转染按照文献报道^[7]中所述,并有些改动:ASODN 和 SODN 的终浓度均为 2.5μmol/L,脂质体相对浓度为 10%;对照组细胞只加同量培养基。

1.3 MTT 法检测细胞生长的情况

取出 c-myc SODN 及 ASODN 分别作用 24h、48h、72h 后的各组细胞,每孔加入终浓度为 5mg/ml 的 MTT 溶液 200μl,5h 后加入 DMSO 溶解振荡 10min,酶标仪测 570nm 波长的 OD 值。绘制各组细胞存活率曲线。细胞抑制率 (%) = (1 - 处理组 OD 值/ 对照组 OD 值) × 100%。实验重复 5 次。

1.4 RT-PCR 方法检测 hTERT 基因 mRNA 的表达水平

hTERT 基因 PCR 扩增引物参照 Takakura 等的方法设计,并经 GenBank 检索证实,hTERT 上游引物序列:5'-CGG AAG AGT GTC TGG AGC AA-3';hTERT 下游引物序列:5'-GGA TGA AGC GGA GTC TGG A-3',扩增片段长度为 145bp。内对照 -肌动蛋白 (-actin) 基因扩增片段长度为 540bp。上述引物均由上海 Sangon 公司合成。

分别收集上述各组 MCF-7 细胞,提取总 RNA 后,采用紫外分光光度计检测 RNA 浓度及纯度,1.2% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 提取样品完整性。按照 MMLV 一步法 RT-PCR 进行扩增

反应,以 -肌动蛋白 (-actin) 作为内对照,设置 50μl 反应体系:模板 RNA 1μl、2 × 反应混合液 25μl、MMLV/ Taq Mix 1μl、hTERT 上下游引物均 1μl、内对照 -actin 基因上下游引物均 0.3μl,加无菌双蒸水至 50μl。37 30min,94 2min;94 15sec,57 30sec,68 90sec,35 个循环,最后 68 5min。扩增产物在 1.7% 琼脂糖凝胶上电泳,用凝胶图象分析仪分析 RT-PCR 产物的电泳结果,用 hTERT 与 -actin 的灰度扫描比值表示 hTERT mRNA 相对表达量,实验重复 5 次。

1.5 Annexin -FITC/ PI 双染色法流式细胞计数仪检测分析转染细胞凋亡情况

Annexin -FITC/ PI 细胞凋亡检测试剂盒购自 Biovision 公司。用 0.25% 的胰酶消化收集各组细胞,冷 PBS 洗涤 2 次,1 × Annexin 缓冲液悬浮细胞,调整细胞浓度为 1 × 10⁶/ml,取 100 细胞悬液 (1 × 10⁵ 细胞) 加入 5μl Annexin -FITC 和 5μl PI,混匀,于暗处室温孵育 15min。每管加入 400μl 1 × Annexin 缓冲液,过滤后在 1h 内进行流式细胞仪检测。Annexin 阳性/ PI 阴性判断为早期凋亡。实验重复 5 次。

1.6 统计学分析

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单因素方差分析,均由 SPSS11.0 软件统计包完成。检验水准: = 0.05。

2 结果

2.1 不同处理组对 MCF-7 细胞生长的影响

经 LR 介导反义 c-myc 作用 24h 后,细胞生长出现抑制;作用 48h 后,细胞生长抑制率明显升高。将各组 OD 值进行比较显示:LR-ASODN 24h、48h、72h 组与空白对照组、LR-SODN 组比较,差异有统计学意义 (P < 0.05)。空白对照组与 LR-SODN 组比较,无统计学差异 (P > 0.05),见表 1。

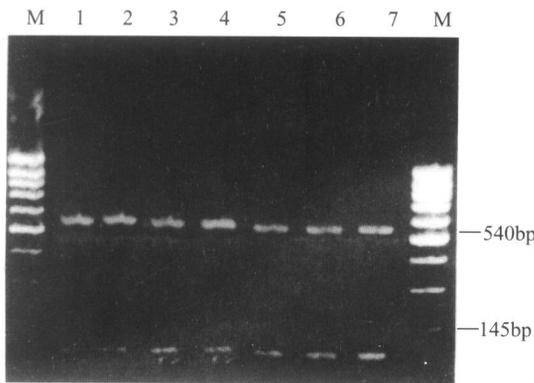
表 1 LR 介导 c-myc 正反义寡核苷酸对 MCF-7 细胞生长的影响

组别	次数	OD 值 ($\bar{x} \pm s$)	MCF-7 细胞生长抑制率 (%)
对照组	5	0.581 ± 0.019	—
LR-SODN 24h 组	5	0.575 ± 0.028	1.03
LR-SODN 48h 组	5	0.570 ± 0.014	1.90
LR-SODN 72h 组	5	0.567 ± 0.020	2.41
LR-ASODN 24h 组	5	0.547 ± 0.013 [#]	5.85
LR-ASODN 48h 组	5	0.394 ± 0.036 [*]	32.18
LR-ASODN 72h 组	5	0.218 ± 0.015 [*]	62.47

[#] 与对照组、LR-SODN 各组相比, P < 0.05; ^{*} 与对照组、LR-SODN 各组及 LR-ASODN 24h 组相比, P < 0.01

2.2 c-myc ASODN 对 MCF-7 细胞 hTERT mRNA 表达水平的影响

MMLV 一步法 RT-PCR 反应扩增后,凝胶电泳紫外灯下直接观察,各组在 100bp DNA ladder Marker 145bp 处见明暗不一的 hTERT 扩增产物,于 540bp 处可见明暗一致的内对照 β -actin 扩增产物,见图 1。紫外凝胶成像灰度扫描后,进行单因素方差分析,结果显示:ASODN 作用于 MCF-7 细胞 24、48、72h 时 hTERT mRNA 相对表达量分别与对照组、LR-SODN 组相比,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);而 SODN 作用于 MCF-7 细胞 24、48、72h hTERT mRNA 相对表达量分别与对照组相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。并且在一定范围内,LR-ASODN 各组 hTERT mRNA 相对表达量随时间的递增而明显降低,见表 2。



M:100bp DNA ladder Marker; 1:LR-ASODN 处理 72h 组; 2:LR-ASODN 处理 48h 组; 3:LR-ASODN 处理 24h 组; 4:LR-SODN 处理 72h 组; 5:LR-SODN 处理 48h; 6:LR-SODN 处理 24h; 7:对照组

图 1 RT-PCR 检测反义 c-myc 对 MCF-7 细胞 hTERT 基因表达的影响

表 2 LR 介导 c-myc 正反义寡核苷酸对 MCF-7 细胞凋亡及 hTERT 基因表达的影响

组别	次数	细胞凋亡率 (%)	hTERT mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)
对照组	5	4.30 \pm 0.32	0.726 \pm 0.019
LR-SODN 24h 组	5	4.35 \pm 0.29	0.715 \pm 0.017
LR-SODN 48h 组	5	4.39 \pm 0.40	0.680 \pm 0.016
LR-SODN 72h 组	5	4.42 \pm 0.26	0.623 \pm 0.015
LR-ASODN 24h 组	5	4.64 \pm 0.39	0.544 \pm 0.021 [#]
LR-ASODN 48h 组	5	13.50 \pm 0.48	0.240 \pm 0.069 [*]
LR-ASODN 72h 组	5	28.76 \pm 1.09	0.143 \pm 0.011 [*]

[#] 与对照组及 LR-SODN 各组相比, $P < 0.05$; ^{*} 与对照组及 LR-SODN 各组相比, $P < 0.01$; 与对照组、LR-SODN 各组及 LR-ASODN 24h 组相比, $P < 0.01$; 与对照组、LR-SODN 各组及 LR-ASODN 其他组相比, $P < 0.01$

2.3 流式细胞计数仪检测分析不同作用时间段转染细胞凋亡情况

MCF-7 细胞经 LR 介导反义 c-myc 处理后,流

式细胞仪检测显示在一定范围内,随着时间的延长,细胞凋亡率明显增高,见表 2。统计学分析显示:对照组、LR-ASODN 24h 组及 LR-SODN 各组之间无统计学差异 ($P > 0.05$);LR-ASODN 48h、72h 组与对照、LR-ASODN 24h 及 LR-SODN 各组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

hTERT 基因表达的上调是端粒酶激活的主要途径,而 c-myc 是参与 hTERT 调控的重要因子,它能够通过激活 hTERT 的表达而导致肿瘤发生。分析 hTERT 序列发现^[8,9],hTERT 基因结构的内含子和启动子序列中有多个转录因子的潜在结合位点,其中 c-myc 可与 hTERT 基因启动子 E 盒结合,激活靶基因的转录,从而影响端粒酶活性的表达及细胞的增殖和分化。林勇等^[10]利用瞬时转染实验,采用在脂质体 LipfectAMINETM (LR) 介导下,将含有 c-mycDNA 质粒分别转染入肝癌细胞 Hep G2、猴肾 COS-7 细胞和 NIH3T3 细胞,结果发现 c-myc 可以直接激活 hTERT 启动子的表达,且 c-myc 的激活作用与其剂量呈正相关。Oh 等^[5]还应用 c-myc 反义核酸作用 HeLa 细胞,发现 c-myc 和 hTERT 基因表达均下降且两者呈平行关系。

本研究用相对定量 RT-PCR 检测反义 c-myc 作用 MCF-7 细胞后 hTERT mRNA 表达水平,发现:c-myc SODN 作用于 MCF-7 细胞 24h、48h、72h 后,hTERT mRNA 表达均无明显变化 ($P > 0.05$);而 c-myc ASODN 作用于 MCF-7 细胞 24h 后,hTERT mRNA 相对表达量即出现明显下降,抑制率达 25%,作用 48h、72h 后抑制率进一步升高,分别为 62%和 80%,与对照组相比均存在统计学差异 ($P < 0.01$)。可见抑制效果随时间的延长逐渐增强。这一结果进一步证明,c-myc 是 hTERT 基因表达的重要调控因子。c-myc 高表达上调 hTERT 基因表达水平,进而上调端粒酶活性,这是端粒酶活性调节的重要机制。

另外,在本实验中发现,c-myc 反义寡核苷酸作用于 MCF-7 细胞 72h 后,hTERT mRNA 表达量仍可达到 0.143 \pm 0.011,抑制率为 80%,即 hTERT 基因表达未被完全抑制,与林勇等^[10]得出的结论相符。表明 c-myc 反义核酸只能下调 hTERT 基因表达,并不能完全封闭该基因。这一结果进一步证明 c-myc 对 hTERT 的调控不是唯一的影响因素。

虽然 hTERT 启动子区有 E 盒与 c-myc 相互作用,且目前许多研究结果也都有证实,但有研究在应用 RT-PCR 方法检测乳腺癌组织中端粒酶与 c-myc

mRNA^[11]及 hTERT mRNA 与 c-myc mRNA 表达水平时^[6],发现 c-myc mRNA 与端粒酶表达之间无明显关系,而且 hTERT mRNA 与 c-myc mRNA 表达之间亦无明显关系。而且在乳腺癌组织中 hTERT 蛋白与 c-myc 蛋白表达之间也不存在明显关系^[12]。因此,作者认为 hTERT 的调控无疑是非常复杂的,要结合其他的细胞调控途径综合评价。例如有研究者就指出^[13],Mad1 可作为 myc 调控途径的一个因子,抑制 hTERT 的转录水平。因此要了解 hTERT 与 c-myc 的调控关系究竟是怎样的,还应结合细胞和组织两个水平进一步证实。

近年来许多研究表明,端粒酶及其催化亚基 - hTERT 活性下调后,端粒序列不完全复制,导致随着细胞分裂端粒重复片段的丢失,进而肿瘤细胞染色体不稳定,诱导 DNA 损伤反应,细胞周期受阻,最终肿瘤细胞发生凋亡或死亡。本实验中,c³myc反义核酸转染乳腺癌 MCF-7 细胞后,24、48、72h 时各组细胞抑制率分别为 5.85%、32.18%、62.47%;流式细胞仪定量检测反义 c-myc 寡核苷酸作用 24、48、72h 时,各组细胞凋亡率为 4.64%、13.50%、28.76%,凋亡指数明显高于正常对照组细胞。结果表明,脂质体介导的反义 c-myc 下调 hTERT 基因表达的同时,能有效抑制 MCF-7 细胞生长,并诱导细胞凋亡,在一定程度上,其效果与时间呈正相关。经流式细胞仪检测发现,早期坏死细胞比例并没有升高,说明 ASODN 对细胞的抑制并不是直接的细胞毒作用,而是反义核酸的反义作用效应。而 Yamaguchi 等^[14]用 hTERT 的反义载体转染到神经胶质瘤细胞后,出现端粒酶活性受到抑制,但转染后 2 个月仍未出现细胞死亡。以上结果表明除了影响端粒的长度外,端粒酶还可能通过其他途径(例如半胱氨酸蛋白酶家族成员瀑布式的信号传导通路)参与细胞凋亡,从而导致细胞凋亡发生的速度各不相同。

端粒酶是目前所发现的恶性肿瘤细胞中最广谱的分子标记,在绝大多数肿瘤细胞中被激活,而在正常体细胞中一般为阴性表达,因此端粒酶是进行肿瘤基因治疗的理想靶点。在肿瘤基因治疗研究中,结合本研究结果,作者认为靶向 c-myc 针对端粒酶抑制的肿瘤基因治疗是一种有效的基因治疗策略。但是在肿瘤细胞中,端粒酶活性的调控是多因子、多水平、多阶段进行的,在不同种类细胞中,端粒酶的

激活机制不尽相同,因此端粒酶的靶向基因治疗尚需针对多靶基因、多途径进一步深入探讨。

参考文献:

- [1] Perry PJ,Amold JR,Jenkins TC,et al. Telomerase inhibitors for the treatment of cancer:the current perspective [J]. Expert Opin investing Drugs,2001,10(12):1241-1256.
- [2] Kirkpatrick KL,Mokbel K. The significance of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in cancer[J]. Eur J Surg Oncol,2001,27(8):754-760.
- [3] Rothermund K,Rogulski K,Fernandes E,et al. C-Myc-independent restoration of multiple phenotypes by two C-Myc target genes with overlapping functions[J]. Cancer Res,2005,65(6):2097-2107.
- [4] O'Connell BC,Cheung AF,Simkevich CP,et al. A large scale genetic analysis of c-myc regulated gene expression patterns [J]. J Biol Chem,2003,278(14):12563-12573.
- [5] Oh S,Song YH,Kim UJ,et al. In vivo and in vitro analyses of Myc for differential promoter activities of the human telomerase (hTERT) gene in normal and tumor cells [J]. Biochem Biophys Res Commun,1999,263(2):361-365.
- [6] Kirkpatrick KL,Ogunkolade W,Elkak AE,et al. hTERT expression in human breast cancer and non-cancerous breast tissue: correlation with tumour stage and c-Myc expression[J]. Breast Cancer Res Treat,2003,77(3):277-284.
- [7] 张莉娟,税青林,何国平,等. 脂质体介导反义核酸对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响[J]. 中国应用生理学杂志,2005,21(3):338-339,355.
- [8] Cerni C. Telomeres,telomerase,and myc. An update[J]. Mutat Res,2000,462(1):31-47.
- [9] Kondo Y,Koga s,Komata T,et al. Treatment of prostate cancer in vitro and in vivo with 2-5'-anti-telomerase RNA component [J]. Oncogene,2000,19(18):2205-2211.
- [10] 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.
- [11] Kirkpatrick KL,Newbold RF,Mokbel K. There is no correlation between c-myc mRNA expression and telomerase activity in human breast cancer[J]. Int Semin Surg Oncol,2004,1(1):2-6.
- [12] Elkak AE,Meligonis G,Salhab M,et al. hTERT protein expression is independent of clinicopathological parameters and c-Myc protein expression in human breast cancer[J]. J Carcinog,2005,4:17-22.
- [13] Gunes C,Lichtsteiner S,Vasserot AP,et al. Expression of the hTERT gene is regulated at the level of transcriptional initiation and repressed by Mad1 [J]. Cancer Res,2000,60(8):2116-2121.
- [14] Yamaguchi F,Morrison RS,Takahashi H,et al. Anti-telomerase therapy suppressed glioma proliferation [J]. Oncol Rep,1999,6(4):773-776.

[编辑:安 凤]