

hTERT 短发夹状 RNA 抑制前列腺癌细胞生长的研究

平浩¹, 张军晖¹, 陈晓春², 鲁功成²

Study on Inhibition of Growth and Proliferation in Prostate Cancer Cell by the shRNA of hTERT

PING Hao¹, ZHANG Jun-hui¹, CHEN Xiao-chun², LU Gong-cheng²

1. Department of Urology, Beijing Chaoyang Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100020, China; 2. Department of Urology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology

Abstract: Objective To investigate the effect of the short hairpin RNA (shRNA) against human telomerase reverse transcriptase (hTERT) on the proliferation and apoptosis of prostate cancer cells PC-3m in vitro. **Methods** The recombinant plasmid psilencer-TRT was transfected into prostate cancer cell line PC-3m via liposome reagent. The level of hTERT mRNA was examined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The expressions of hTERT and c-myc protein were detected by western blot analysis. The effect of hTERT shRNA on the cellular proliferation capacity of PC-3m cells was assayed by the growth curve. The cell apoptosis was detected by Hoechst33258 staining, electron microscope, and flow cytometry analysis. **Results** The vector-mediated shRNA significantly reduced the level of hTERT mRNA by 89.02% after psilencer-TRT transduction in PC-3m cells. Meanwhile, the levels of hTERT and c-myc protein were also decreased in transfected cells. The cell proliferation was markedly inhibited compared with the control cells. Partial cancer cells presented morphological changes of apoptosis, and the apoptosis rate was (19.69 ± 4.75)%. **Conclusion** hTERT shRNA can suppress hTERT expression and cell proliferation, in addition to acceleration of apoptosis. This implied the possibility of RNA interfering to hTERT as the potential method for gene therapy of prostate cancer.

Key words: Human telomerase reverse transcriptase; Short hairpin RNA; Prostate cancer; Apoptosis

摘要:目的 研究靶向端粒酶逆转录酶(hTERT)的短发夹状 RNA(shRNA)基因转染对前列腺癌细胞体外生长的抑制效应及其促细胞凋亡作用。方法 在脂质体介导下将针对 hTERT 基因的 shRNA 表达载体 psilencer-TRT 转染前列腺癌细胞 PC-3m, 得到稳定细胞株 PC-3m/shRNA-TRT。采用 RT-PCR 检测 hTERT 基因表达情况, western blot 分析各组细胞 hTERT 及 c-myc 蛋白表达变化, 细胞计数并绘制细胞生长曲线, Hoechst33258 染色、透射电镜、流式细胞仪检测细胞凋亡情况。结果 重组质粒 psilencer-TRT 转录生成的 shRNA 使实验组细胞的 hTERT 基因表达显著下调, 抑制率约为 89.02%; 同时实验组细胞 hTERT 及 c-myc 蛋白水平较对照组有明显下降, 细胞的生长增殖能力也显著降低 ($P < 0.05$), 生长速率明显变慢, 部分细胞呈现凋亡形态学改变, 凋亡率为 (19.69 ± 4.75)%。结论 hTERT 短发夹状 RNA 能有效抑制前列腺癌细胞中 hTERT 表达及癌细胞生长, 诱导 PC-3m 细胞凋亡, 可望为前列腺癌的基因治疗提供新方法。

关键词: 端粒酶逆转录酶; 短发夹状 RNA; 前列腺癌; 凋亡

中图分类号: R737.25 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2007)02-0128-04

0 引言

RNA 干扰是近几年发现和发展起来的一项新的基因阻断技术, 由于其具有高效的抑制作用, 已广

泛应用于医学的多个领域^[1]。人端粒酶逆转录酶基因编码的端粒酶催化亚单位在大多数肿瘤中表达上调并对肿瘤细胞的端粒酶活性起重要调控作用, 是目前肿瘤基因治疗中一个极具前景的靶点^[2]。因此, 本研究拟通过转染针对端粒酶 hTERT 的 siRNA 表达载体, 使其在前列腺癌细胞 PC-3m 内稳定产生特异性的短发夹状 RNA (short hairpin RNA, shRNA), 诱导 RNA 干扰, 并探讨 shRNA 对

收稿日期: 2006-02-07; 修回日期: 2006-05-29

作者单位: 1. 100020 北京, 首都医科大学附属北京朝阳医院泌尿外科; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院泌尿外科

作者简介: 平浩(1977-), 男, 博士, 主治医师, 主要从事泌尿肿瘤研究

hTERT、c-myc 表达及细胞增殖和凋亡的影响,寻找新的前列腺癌基因治疗方法。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

质粒 psilencer2.1-U6neo 购自美国 Ambion 公司。Annexin -FITC 试剂盒购自晶美生物技术有限公司。

1.2 shRNA 表达载体的构建及鉴定

本实验应用本组已成功构建的重组质粒 psilencer-TRT^[3],其合成步骤大致如下:针对 hTERT 基因靶点 (TTTCA TCA GCAA GTTTGGGA) 合成两条寡核苷酸链,它包括两端的 BamHI 和 HindIII 酶切位点及反向的两个一致的靶序列,被 9bp 的非同源序列的环间隔,3' 末端加有 TTTTTT 终止序列。该正反两条寡核苷酸链退火得到双链 DNA,并将该退火 siRNA 目的片段插入到 psilencer2.1-U6 载体中,连接产物 psilencer-TRT 转化宿主菌 DH5 并行测序鉴定;阴性对照质粒 psilencer-NC 由人和鼠的非同源性靶序列构建合成。

1.3 细胞培养及稳定转染

人前列腺癌细胞株 PC-3m 接种于 6 孔板,在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中生长至 50% ~ 70% 融合。采用脂质体转染法稳定转染抑制质粒 psilencer-TRT 和对照质粒 psilencer-NC,按照转染试剂盒说明书提供的步骤进行,将重组质粒与脂质体 1:3 混合,G418 筛选阳性细胞克隆并进行实验分组,转染 psilencer-TRT 质粒的 PC-3m 细胞命名为 PC-3m/shRNA-TRT (实验组),转染 psilencer-NC 质粒的 PC-3m 细胞命名为 PC-3m/shRNA-NC (阴性对照组)。未转染质粒的亲本细胞 PC-3m 作为空白对照组。

1.4 RT-PCR 检测 hTERT mRNA 的表达水平

收集细胞,提取细胞总 RNA,MMLV 逆转录酶进行反转录,相应 PCR 反应体系中进行扩增,PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,紫外线透射仪下观察拍照并行条带灰度分析,hTERT 与 -actin 灰度的比值即为 hTERT mRNA 相对量 A 值。

抑制率 = A_{实验组} / A_{阴性对照组} × 100 %

1.5 Western blot 检测 hTERT、c-myc 蛋白表达

收集细胞后加入预冷的裂解缓冲液,离心取上清,二喹啉甲酸法测定蛋白含量。以等量蛋白上样,在聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳分离,电转移法将蛋白质从 SDS-PAGE 凝胶转移至聚偏二氟乙烯膜,室温封闭,并分别加入一抗及二抗,碱性磷酸酶系统显色,同时 -actin 蛋白作为内参照。

1.6 细胞生长曲线测定

将 PC-3m 细胞及稳定表达 G418 抗性的转染细胞以 1 × 10⁴ / ml 的浓度接种于 24 孔板中,每隔 24h 对每组细胞的 3 个孔进行消化,显微镜下计数,取平均值,共测 5 个时间点,以培养时间为横轴,细胞数为纵轴,绘制生长曲线。

1.7 荧光染色观察细胞凋亡

采用 Hoechst33258 染色法观察凋亡细胞形态。培养后收集各组细胞,4℃ 固定 5min,加入 Hoechst33258 染色液 (1:20),荧光显微镜下观察拍照。

1.8 透射电镜观察细胞形态

收集细胞后,D-hanks 缓冲液清洗 2 次,以 2.5% 戊二醛、1% 锇酸双固定,常规电镜样品制备程序脱水、渗透、包埋,超薄切片,铀铅染色,透射电镜下观察照相。

1.9 流式细胞仪检测细胞凋亡

采用 Annexin -FITC 和 PI 双染色流式细胞仪法,具体步骤按试剂说明书进行,流式细胞仪检测 488nm 波长处吸光度值。

1.10 统计学方法

应用 SPSS11.5 统计分析软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 质粒 psilencer-TRT 的鉴定结果

核酸序列分析结果可证实,shRNA 表达载体 psilencer-TRT 构建成功,测序结果与设计的完全一致,见图 1。

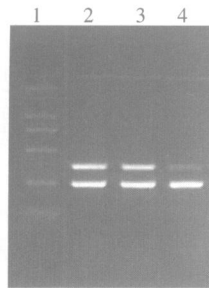
CGACGGCCA GTGCCAAGCTTGTGCACAAAAA TTTCA T
CAGCAA GTTTGGACGTCTTGAATCCAAACTTGCTGATG
AAA CGGA TCCC GCGTCCTTCCACAAGATA TATAAACCC
CAAGAAA TCGAAA TACTTTCAA GTTACGGTAA GCA TAT
GATA GTCCA TTTTAAAACA TAATTTTAAA ACTGCAAAC
TACCCAA GAAATTA TTTACTTTCTACGTCACGTA TTTTGT
ACTAATA TCTTTGTGTTTACAGTCAAA TTAAT TCTAAT
TATCTCTAACA GCCTTGTA TCGTATATGCAAA TATG
AAGGAA TCA TGGGAAA TAGCCCTCTCTCTGCCCGACC
TTGGCGCGCTCGGC GCGGTACGCTCCGTCACGTG
GTGCGTTTGCCTGCGCTCTTCCACTGGGGAA TTC
ATGCTTCTCTCCCTTATGTGAGGGTAA TCTCTCTCTC
TCCCTA TAGTGA GTCGTA TTAATTCCTTCTCTCTA TAG
TGTCACCTAAA TCGTTGCAA TTCGTAA TCATGTCA TAG
CTGTTTCTGTGTGAAATGTTA TCCGCTCACAATCC
ACACAACA TACGA GCCGGAA GCA TAAA GTGTAAGCC
TGGGGTGCCTAATGAGTGA GCTAACTCACATTAATTGC
GTTGCGCTCACTG

图 1 psilencer-TRT 干扰质粒的核酸序列分析

2.2 各组细胞中 hTERT mRNA 表达水平



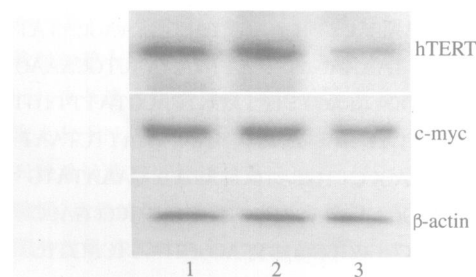
琼脂糖凝胶电泳上,各组均可见明亮的内参照-actin 的扩增条带,空白对照组 PC-3m 细胞和阴性对照组 PC-3m/ shRNA-NC 细胞 hTERT 条带较明亮,两者 hTERT mRNA 的量基本一致,hTERT/ -actin 比值(A)分别为 0.84 ± 0.16 和 0.82 ± 0.13 ,两者比较无显著性差异($P > 0.05$);实验组 PC-3m/ shRNA-TRT 细胞中 hTERT mRNA 表达水平明显降低,A 值为 0.09 ± 0.04 ,抑制率为 89.02% ,与阴性对照组和空白对照组比较差异有显著性($P < 0.01$),见图 2。



1: DNA marker DL2000; 2: PC-3m; 3: PC-3m/ shRNA-NC; 4: PC-3m/ shRNA-TRT
图 2 RT-PCR 检测各组癌细胞 hTERT mRNA 水平

2.3 各组细胞中 hTERT 及 c-myc 蛋白表达变化

Western blot 分析显示,空白对照组 PC-3m 细胞和阴性对照组 PC-3m/ shRNA-NC 细胞均高表达 hTERT 及 c-myc 蛋白,蛋白条带清晰,两组间无明显变化。而实验组 PC-3m/ shRNA-TRT 细胞中 hTERT 和 c-myc 蛋白水平有不同程度的降低,蛋白表达受到抑制,尤其以 hTERT 蛋白降低最为明显,见图 3。



1: PC-3m; 2: PC-3m/ shRNA-NC; 3: PC-3m/ shRNA-TRT
图 3 Western blot 检测各组癌细胞 hTERT 及 c-myc 蛋白表达

2.4 细胞体外生长情况

实验组 PC-3m/ shRNA-TRT 细胞生长速度明显减慢,倍增时间延长,细胞增殖受到抑制($P < 0.05$);而 PC-3m/ shRNA-NC 细胞体外增殖活跃,与未转染 PC-3m 细胞相比增殖活性无明显改变($P > 0.05$),见图 4。

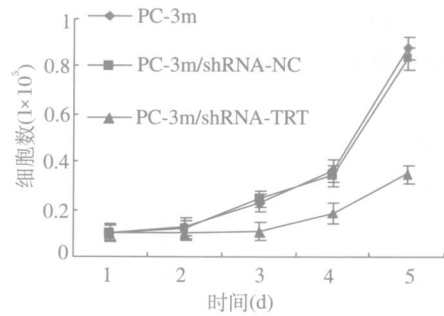


图 4 hTERT 短发夹 RNA 对 PC-3m 细胞增殖的影响

2.5 细胞荧光染色结果

部分 PC-3m/ shRNA-TRT 细胞呈现凋亡特征性的形态学变化,细胞皱缩,染色强度增强,染色质凝集,核固缩并断裂成数个大小不等的圆形颗粒及凋亡小体;而 PC-3m/ shRNA-NC 细胞及正常 PC-3m 细胞染色中细胞核荧光染色均匀,未见或少见凋亡细胞,见图 5。

2.6 凋亡细胞超微结构观察

透射电镜观察结果显示,对照组细胞形态正常,结构完整。实验组可见部分 PC-3m/ shRNA-TRT 细胞呈凋亡形态,细胞体积缩小,胞浆浓缩,染色质固缩、边集或碎裂成不规则块状,出现核质沿核膜内侧排列的现象,见图 6。

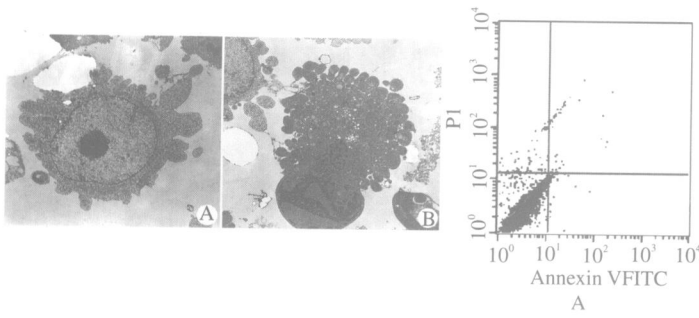
2.7 细胞凋亡率检测

分析流式细胞仪双参数图发现,PC-3m 和 PC-3m/ shRNA-NC 细胞均未见明显凋亡,凋亡率分别为 $(0.94 \pm 0.29)\%$ 、 $(1.37 \pm 0.68)\%$;PC-3m/ shRNA-TRT 细胞凋亡明显增加,凋亡率为 $(19.69 \pm 4.75)\%$,显著高于空白对照组和阴性对照组细胞($P < 0.01$)。

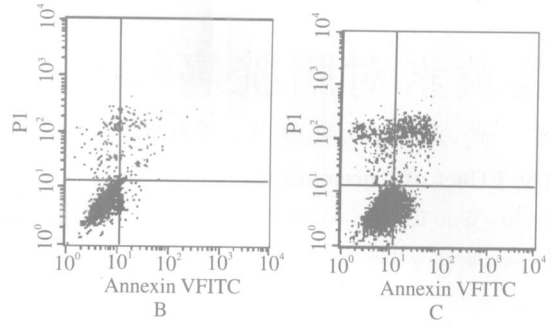
3 讨论

端粒酶是近年来肿瘤研究的热点之一,它由自身 RNA 模板(hTR)、端粒酶相关蛋白(TP-1)和端粒酶催化亚单位(hTERT)等部分组成,其异常激活可使细胞逃避衰老、死亡而发生永生化和癌变。已证实,hTERT 基因在端粒酶阳性的永生化和肿瘤细胞中高表达,但在端粒酶阴性的绝大多数正常体细胞中不表达。研究发现,在前列腺癌中 hTERT 基因的阳性率可高达 90%,hTERT 表达与端粒酶活性密切相关,可能是端粒酶激活的限速步骤,其水平升高可能在前列腺癌的发生发展中起重要作用^[4]。并且,hTERT 的调控是非常复杂的过程,它受到细胞内多种因素的影响,其中 c-myc/ Max/ Mad 网络调节是一个重要环节^[5,6]。

本组已报道应用新兴的 RNA 干扰技术将重组



A: PC-3m cells; B: PC-3m/shRNA-TRT cells
图 6 电镜观察细胞的超微结构(×5000)



A: PC-3m; B: PC-3m/shRNA-NC; C: PC-3m/shRNA-TRT
图 7 流式细胞仪检测 hTERT shRNA 介导的细胞凋亡

质粒 psilencer-TRT 瞬时转染前列腺癌细胞,明显降低了 hTERT 表达水平,并显著抑制端粒酶活性,从而证实了 psilencer-TRT 转录产生的 shRNA 对 hTERT 基因的强大沉默效应,为 RNA 干扰治疗前列腺癌提供了基础^[3]。目前,众多研究显示,抑制 hTERT 基因表达可选择性抑制肿瘤细胞中的端粒酶活性而导致抗肿瘤效应^[7]。因此,本实验利用已构建的 psilencer-TRT 重组质粒稳定转染前列腺癌细胞 PC-3m,得到稳定细胞株 PC-3m/shRNA-TRT,检测发现其 hTERT 基因表达显著降低,并且 hTERT 及 c-myc 蛋白水平明显下降,说明短发夹状 RNA 不但抑制了 hTERT 基因,而且对其调控蛋白 c-myc 也有抑制作用,也进一步证实了 RNA 干扰质粒具有稳定性好、抑制作用强、细胞摄取相对容易等多种特点。此外我们还发现,实验组的前列腺癌细胞体外生长缓慢,倍增时间延长,取对数生长期的 PC-3m/shRNA-TRT 细胞继续培养 5 天后,部分细胞发生凋亡,凋亡率可达 19.69%,说明这种作用可能与细胞周期的改变、细胞端粒酶的调节和凋亡信号转导途径的激活有关。同时,结果间接提示了前列腺癌细胞内的 hTERT 基因受 c-myc 调节,c-myc 可能通过激活 hTERT 的表达而导致肿瘤的发生,两者在细胞中过表达对于肿瘤的形成和发展具有重要作用^[8]。

目前, RNA 干扰技术已广泛应用于基因功能、抗肿瘤和抗病毒基因等方面的研究,尤其是短发夹状 RNA 的应用,可以对基因表达产生稳定强大的干扰效应,为肿瘤的治疗提供了良好的前景^[9]。在我们的研究中,我们采用短发夹状 RNA 表达质粒对肿瘤密切相关的靶基因 hTERT 进行干预,发现 hTERT shRNA 可逆转前列腺癌细胞的恶性表型,

这种作用不仅与端粒酶活性的抑制有关,可能还涉及多种基因和信号途径的参与。因此,针对 hTERT 基因的 RNAi 技术有望成为前列腺癌治疗的新方法。

(本文图 5 见第 164 页)

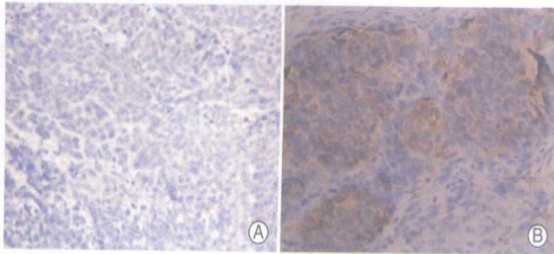
参考文献:

- [1] Milhavet O, Gary DS, Mattson MP. RNA interference in biology and medicine[J]. Pharmacol Rev, 2003, 55(4): 629-648.
- [2] Biroccio A, Leonetti C. Telomerase as a new target for the treatment of hormone-refractory prostate cancer[J]. Endocr Relat Cancer, 2004, 11(3): 407-421.
- [3] 平浩,陈晓春,叶哲伟,等. 短发夹状 RNA 对 PC-3M 细胞端粒酶逆转录酶基因表达和端粒酶活性的影响[J]. 临床泌尿外科杂志, 2004, 19(12): 743-746.
- [4] Bettendorf O, Heine B, Kneif S, et al. Expression-patterns of the RNA component (hTR) and the catalytic subunit (hTERT) of human telomerase in nonneoplastic prostate tissue, prostatic intraepithelial neoplasia, and prostate cancer[J]. Prostate, 2003, 55(2): 99-104.
- [5] Latil A, Vidaud D, Valeri A, et al. hTERT expression correlates with myc over-expression in human prostate cancer[J]. Int J Cancer, 2000, 89(2): 172-176.
- [6] Wu KJ, Grandori C, Amacker M, et al. Direct activation of TERT transcription by c-myc[J]. Nat Genet, 1999, 21(2): 220-224.
- [7] Kraemer K, Fuessel S, Schmidt U, et al. Antisense-mediated hTERT inhibition specifically reduces the growth of human bladder cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(10 Pt 1): 3794-3800.
- [8] Zou L, Zhang PH, Lou CL, et al. Transcript Regulation of Human Telomerase Reverse Transcriptase by c-myc and mad1[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2005, 37(1): 32-38.
- [9] Mukhopadhyay UK, Senderowicz AM, Ferbeyre G. RNA Silencing of Checkpoint Regulators Sensitizes p53-Defective Prostate Cancer Cells to Chemotherapy while Sparing Normal Cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(7): 2872-2881.

[编辑:安 凤]

OPCML 对卵巢癌细胞抑制的 体内外实验研究

(正文见 121 页)

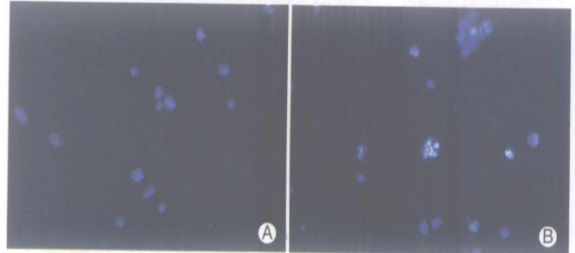


A. A2780-PWPI; B. A2780-OPCML

图4 免疫组织化学染色检测移植瘤组织 OPCML 蛋白的表达 (× 40)

hTERT 短发夹状 RNA 抑制前 列腺癌细胞生长的研究

(正文见 128 页)



A. PC-3m cells; B. PC-3m/shRNA-TRT cells

图5 Hoechst33258 荧光染色检测 hTERT shRNA 介导的细胞凋亡 (× 400)

非小细胞肺癌多药耐药性病理学检测的临床意义

(正文见 106 页)

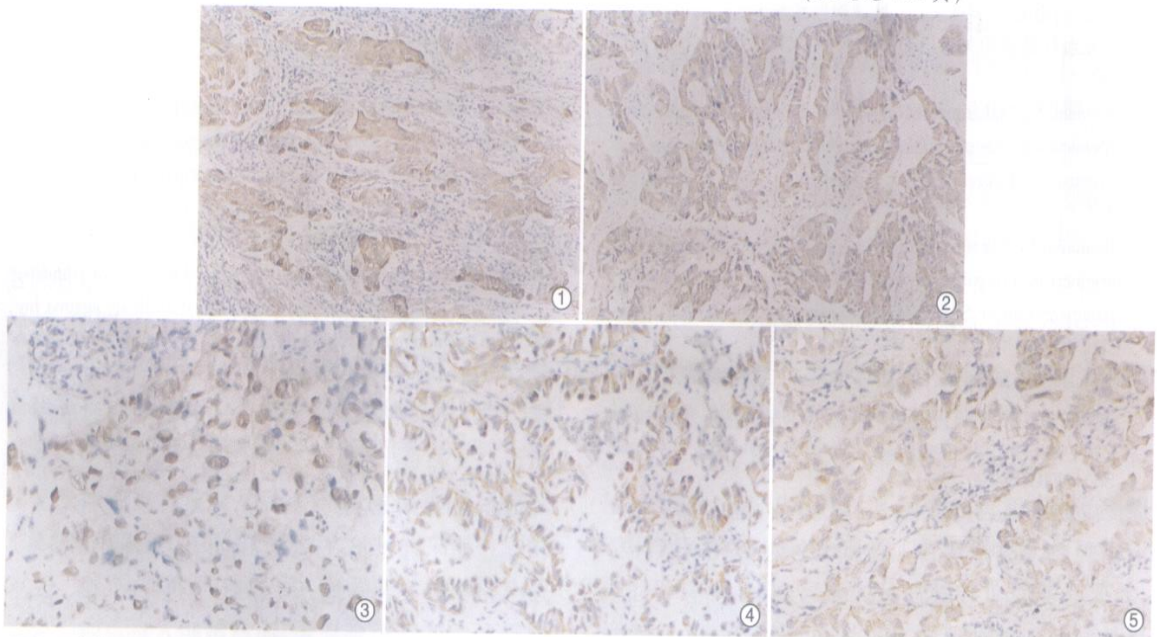


图1 腺鳞癌中 GST-π 蛋白的阳性表达 (SP × 100)

图2 中等分化腺癌中 LRP 蛋白的阳性表达 (SP × 100)

图3 Topo II α 蛋白在中等分化鳞癌中的阳性表达 (SP × 200)

图4 MPP mRNA 在高分化腺癌中的阳性表达 (ISH × 200)

图5 MDR₁ mRNA 在细支气管肺泡癌中的阳性表达 (ISH × 200)