文章编号:1000-5404(2005)06-0511-03

论著

T-STAR基因对人结肠癌细胞系HCT-116生长增殖的影响

张 玲[1],郭 莲[2],彭 勇[2],陈 兵[2] (第三军医大学西南医院:[1]预防保健科,[2]内分泌科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨正、反义T-STAR(testes-signal transduction and activator of RNA, T-STAR)基因对结肠癌细胞HCT-116生长增殖的影响。**方法** 用脂质体介导法分别将正、反义T-STAR基因转入HCT-116细胞中,用Western blot检测T-STAR蛋白表达水平,用细胞动力学检测HCT-116细胞的生长、增殖变化。**结果** 转染正义T-STAR基因后,HCT-116细胞的T-STAR蛋白表达水平增加,但细胞生长速度变慢、增殖能力下降;转染反义T-STAR基因后,HCT-116细胞的T-STAR蛋白表达水平下降,但细胞生长速度变快、增殖能力增强。**结论** T-STAR基因可抑制结肠癌细胞HCT-116的生长、增殖。

关键词: T-STAR;反义核酸;正义核酸;细胞转染
中图法分类号: R329.28; R394.3; R735.35 **文献标识码:** A

Effects of sense and antisense T-STAR gene on colon cancer cell line HCT-116

ZHANG Ling[1], GUO Lian[2], PENG Yong[2], CHEN Bing[2] ([1]Department of Health Care, [2]Department of Endocrinology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of the sense and antisense testes-signal transduction and activator of RNA (T-STAR) gene on the colon cancer cell line HCT-116. **Methods** The sense and antisense T-STAR gene was stably transfected into HCT-116 cells with lipofectamine. The expression level of T-STAR in those cells was detected by Western blotting and the growth velocity and proliferation of those cells by cytokinetics. **Results** The growth velocity and proliferation decreased after transfection of the sense T-STAR gene, but increased after transfection of the antisense T-STAR gene. **Conclusion** T-STAR gene can inhibit the growth velocity and proliferation of HCT-116 cells.

Key words: testes-signal transduction and activator of RNA; antisense nucleic acid; sense nucleic acid; cell transfection

T-STAR (testes-signal transduction and activator of RNA, T-STAR)是一种新发现的STAR (signal transduction and activator of RNA)蛋白家族成员,是哺乳动物细胞的一种酪氨酸蛋白和RNA结合蛋白。它通过酪氨酸激酶信号转导系统[1]和靶pre-mRNA的选择性剪接、加工[2]等环节而参与了一系列重要的生理、病理过程,如细胞永生化[3]、精子发生[4]、抑制细胞生长[5,6]及参与某些疾病的起病[7]等。但T-STAR这些作用的机制途径却并不十分清楚。我们通过酵母双杂交研究表明(待发表)T-STAR还能与端粒酶催化活性亚单位(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)发生相互作用,从而有可能有通过端粒酶参与细胞的生长、增殖调控等过程。但我们的前期工作证实T-STAR的表达与肿瘤组织的端粒酶活性和hTERT表达呈正相关,这与T-STAR抑制细胞生长的作用似乎相矛盾,因为端粒酶活性增高的细胞往往生长速度较快,增殖能力较强,抑或这是T-STAR功能作用的不同方面,其中机制不甚清楚。本研究拟将正、反义T-STAR基因体外转染人结肠癌细胞系HCT-116,观察转染后HCT-116细胞中T-STAR表达水平与细胞生长、增殖的关系,以验证T-STAR是否对细胞生长、增殖起抑制作用,并就相关机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与细胞株 正义T-STAR基因真核表达载体pEGFP-C1/T-STAR由英国Leicester大学生物化学教研室Chew教授惠赠;反义T-STAR基因真核表达载体pneo-STAR为自行构建;真核表达载体pEGFP-C1和pcl-neo分别由本校新桥医院杜剑平博士和本校基础医学部免疫学教研室万瑛博士惠赠;人结肠癌细胞株HCT-116由本院普通外科实验室提供。

1.1.2 主要试剂 转染试剂DOTAP Liposomal Transfection Reagent购自Roche公司;DMEM(高糖)培养基、小牛血清购自Hyclone公司、T-STAR单克隆抗体购自Santa Crus Biotechnology公司;兔抗羊IgG-HRP购自北京中山生物技术公司;G418购自Roche公司;MTT、HEPES购自Sigma公司。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271442,39980010)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30271442, 39980010)
作者简介: 张 玲(1962-),女,山西省太原市人,硕士,主治医师,主要从事保健康复医学专业方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68754465
通讯作者: 陈 兵,电话:(023)68754138, E-mail: zp@mail.tmmu.com.cn
收稿日期: 2004-11-25;**修回日期:** 2005-01-11

1.2 方法

1.2.1 正、反义 T-STAR 基因转染 HCT-116 细胞[8] 人结肠癌细胞株 HCT-116 细胞用含 10% 小牛血清、青霉素 100 mg/L 及链霉素 100 mg/L 的 DMEM（高糖）培养基，置 37 ℃、饱和湿度，5% CO_2 环境中培养。用阳离子脂质体试剂 DOTAP Liposomal Transfection Reagent 介导转染，按试剂说明进行操作。转染前 1 d 将细胞以 1×10^5/ml 培养液的量转入 6 孔板中，细胞生长密度达 50%～60% 时，用 DOTAP 分别将正、反义 T-STAR 基因真核表达载体 pEGFP-C1/T-STAR 和 pneo-STAR 导入细胞内，同时将空载体 pEGFP-C1 和 pcl-neo 在相同条件下进行转染作为对照，转染后 8 h 换入新鲜不含 DOTAP 的培养液，继续培养 24 h，改用含 G418 700 mg/L 的培养基进行阳性克隆筛选，10 d 时选取单克隆细胞扩大培养，改用含 G418 500 mg/L 的培养基维持培养 2 周。筛选到的阳性克隆分别命名为 HCT-STAR、HCT-asSTAR、HCT-EGFP 和 HCT-neo。阴性对照为未加转染液的 HCT-116 细胞。

1.2.2 HCT-116 细胞中 T-STAR 蛋白表达水平的检测

1.2.2.1 细胞总蛋白提取[9] 选生长密度达 90% 的细胞，用 10 mmol/L PBS 洗 2 次，弃净 PBS；加入 200 μl 1×SDS 上样缓冲液使细胞充分裂解，用细胞擦子将裂解液刮于一干净的 1.5 ml Ep 管中；加热：100 ℃，10 min；最大功率超声打碎 DNA；常温离心，1 000 r/min，10 min；将上清移至新的 1.5 ml Ep 管中，以 10 μl/ml 提取液的量加入蛋白酶抑制剂 PMSF。用 BioRad 核酸蛋白仪测定提取液的蛋白浓度，用细胞裂解液将各组总蛋白液稀释成相同浓度，－20 ℃保存备用。

1.2.2.2 Western blot 检测 T-STAR 蛋白的表达 分别取 HCT-116 细胞组、HCT-STAR 细胞组、HCT-asSTAR 细胞组，HCT-EGFP 组和 HCT-neo 细胞组总蛋白各 40 μg 样品和等体积 1×上样缓冲液（100 mmol/L Tris-HCl pH 6.8、200 mmol/L DTT、4% SDS、2% 溴酚蓝、20% 甘油）混匀，100 ℃，5 min 变性，冷却后上样于 10% SDS-PAGE 电泳胶进行电泳分离，然后电转移至硝酸纤维素膜，含 1% 脱脂奶粉的 PBST 室温封闭 2 h，加一抗（1∶100）室温孵育过夜，用 PBST 洗去一抗后加入相应二抗（1∶2 000），室温孵育 2 h，DAB 显色后于凝胶成像系统上成像记录，然后用 Quntity one 图像分析软件测定所采集图像目的条带的负相光密度。每组测 3 次，蛋白表达定量水平用目的条带的负相光密度值表示。

1.2.3 HCT-116 细胞的生长动力学检测 取对数生长期的各组细胞分别接种于 96 孔培养板，每孔 5×10^3 个细胞，每组取 18 个孔。每天取每组细胞各 3 个孔作 MTT 实验：每孔细胞加 MTT 溶液 20 μl（5 mg/ml），在 5% CO_2，37 ℃细胞培养箱中继续培养 4 h。小心弃去培养液，加 DMSO 150 μl/孔，振荡 15 min 使结晶充分溶解。在 492 nm 波长的酶联仪上检测各组细胞的吸光度（D 值），取 3 孔平均值，连续测 7 d，以时间为横坐标，$D(492)$ 值为纵坐标，绘制细胞生长曲线。

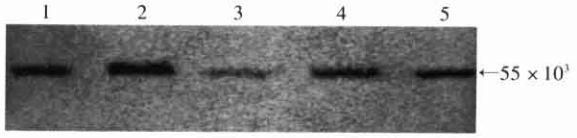
1.3 统计学分析

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 Westen blot 检测 T-STAR 蛋白的表达

各组细胞总蛋白经电泳、电转移、免疫检测后，均在 55×10^3 处出现一条清晰的特异性条带，条带深浅顺序为：HCT-STAR 最强，HCT-neo、HCT-EGFP 和 HCT-116 居中，HCT-asSTAR 最弱，结果见图 1。



1：HCT-116；2：HCT-STAR；3：HCT-asSTAR；4：HCT-EGFP；5：HCT-neo

图 1 Westen blot 检测 T-STAR 蛋白在各 HCT-116 细胞组中的表达

Fig 1 Western blot analysis of the protein expression of T-STAR in HCT-116 cells

T-STAR 蛋白的定量分析结果见表 1。从表 1 中数据可计算出，与 HCT-116 细胞的平均表达量相比，T-STAR 蛋白在 HCT-STAR 中表达增加了 60.3%，在 HCT-asSTAR 中表达量下降了 71.90%。独立样本 t 检验分析表明，分别与 HCT-116 细胞平均水平相比，T-STAR 蛋白在 HCT-STAR 中表达增加有显著性意义（$P<0.05$），在 HCT-asSTAR 中表达下降有显著性差异（$P<0.05$），在 HCT-STAR 和 HCT-asSTAR 组间比较有显著性差异（$P<0.01$），在 HCT-116、HCT-EGFP 和 HCT-neo 组间比较无显著性差异（$P>0.05$）。

表 1 HCT-116 系列细胞中 T-STAR 蛋白的定量值（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Expression level of T-STAR protein in HCT-116 cells（$\bar{x}\pm s$）

Cell lines	T-STAR（INT×mm²）
HCT-116	3 985 ± 112
HCT-STAR	6 388 ± 78*
HCT-asSTAR	1 120 ± 217*
HCT-EGFP	4 060 ± 57
HCT-neo	3 671 ± 81

*：$P<0.05$，*vs* HCT-116

2.2 HCT-116 细胞生长曲线变化

细胞生长曲线见图 2。从图 2 中可看出，与转染前的 HCT-116 细胞相比，HCT-asSTAR 组细胞从第 4 天开始，细胞生长明显变快，HCT-STAR 组细胞的生长速度则逐渐变慢，而 HCT-EGFP 组和 HCT-neo 组细胞的生长速度与 HCT-116 细胞组无显著性差异。

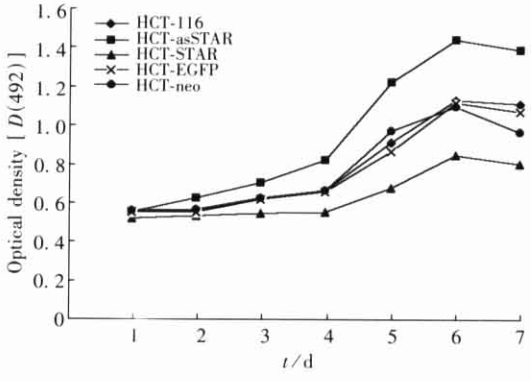


图 2 转染后各 HCT-116 细胞株生长曲线图

Fig 2 Growth curves of HCT-116 cells transfected with T-STAR gene and the control

3　讨论

T-STAR 是 STAR 蛋白家族新成员，是一种酪氨酸蛋白和 RNA 结合蛋白。编码基因位于染色体 8q24.3，长度范围为 1.2～1.9 kb，其蛋白分子量为 55×10^3，广泛表达于视网膜、胎肝、睾丸、前列腺、心脏、肺、胰腺、胎盘等组织中[1]。目前关于 T-STAR 的功能研究不多，已知的作用如参与细胞永生化、参与精子发生、抑制细胞生长等的作用途径均不十分清楚。由于 T-STAR 可能通过与 hTERT 相互作用而参与端粒酶活性调控，因此 T-STAR 有可能通过此途径发挥上述作用。

正、反义 RNA 技术是两种研究蛋白功能的重要方法。正义 RNA 为可翻译链，外源转入后可使目的蛋白的翻译链 mRNA 增加，相对应的蛋白翻译产物明显增多，因此可特异性增加目的蛋白的表达。反义 RNA 是指能与特异翻译链 mRNA 互补的 RNA，外源转入后可与目的基因的 mRNA 互补配对，使单链 mRNA 数量下降，蛋白翻译产物下降，因此反义 RNA 技术可从翻译水平、转录水平和核酸复制水平上高度特异地抑制靶基因表达。因此我们选择了正、反义 RNA 技术作为 T-STAR蛋白功能研究的方法。结果表明，转染正义 T-STAR 基因的 HCT-STAR 细胞中，T-STAR 蛋白表达量增加了 60.3%，转染反义 T-STAR 基因的 HCT-asSTAR 细胞中，T-STAR 表达量下降了 71.90%，而 2 种对照细胞（HCT-EGFP 细胞和 HCT-neo 细胞）与 HCT-116 细胞相比，蛋白表达量未出现增加或减少，说明达到了特异性增加或减少 T-STAR 蛋白表达的目的。

我们的细胞动力学研究表明，转染正义 T-STAR 基因后，HCT-STAR 细胞的生长变慢，细胞克隆数减少，与此相对应，转染反义 T-STAR 基因的 HCT-asSTAR 细胞生长变快，细胞克隆数增加。这与 Lee 和 Barlat 等[5,6]所报道的，外源 T-STAR 使鸡胚成纤维细胞的克隆数减少，细胞增殖能力下降的结论相一致。因此，T-STAR确系一种细胞生长抑制蛋白，对细胞生长、增殖有抑制作用，且引起这种作用的功能区位于 STAR 结构域中[5]。

T-STAR 抑制细胞生长、增殖的作用机制还不完全清楚，其可能的途径为：①通过抑制细胞生长调节蛋白 Sam68（Src-associated in mitosis，68×10^3）而抑制细胞生长、增殖[6]。Sam68 为 RNA 结合蛋白，参与了多种基因的表达调控，包括前 mRNA 的剪接。应用酵母双杂交研究发现它的主要的结合蛋白是 Ubiquitin 的连接酶 E3 中的 SIAH1 和 SIAH2，Ubiquitin 是广泛存在于各种组织细胞中的蛋白水解酶。T-STAR 抑制细胞增殖可能与 Ubiquitin 通路相关。②通过下调 cyclin D1 而抑制细胞增殖。T-STAR 参与了 Sam68 的 pre-mRNA 的选择性剪接[2]，产生剪接异构体 Sam68 KH，后者通过可下调 cyclin D1 而抑制细胞增殖[6]。③通过调节前 mRNA 的加工来影响细胞的生长。由于 T-STAR 可调节特异的剪接位点，参与前 mRNA 的加工，T-STAR 的高表达可能造成不同的 mRNA 剪接方式，进而导致了部分基因 mRNA 的增多和另一部分基因 mRNA 的减少，使得这些 mRNA 编码的蛋白增加或减少，从而影响细胞的生长。

我们的前期工作表明 T-STAR 的表达与多种肿瘤组织的端粒酶活性和 hTERT 表达呈正相关，端粒酶活性较高的细胞往往生长增殖较快，而本研究结果表明 T-STAR 对细胞生长、增殖起抑制作用，因此我们推测 T-STAR 这两种作用可能是通过不同的机制途径完成的。

参考文献：

[1] Di Fruscio M, Chen T, Richard S. Characterization of Sam68-like mammalian proteins SLM-1 and SLM-2: SLM-1 is a Src substrate during mitosis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(6): 2710－2715.

[2] Stoss O, Olbrich M, Hartmann A M, *et al*. The STAR/GSG family protein rSLM-2 regulates the selection of alternative splice sites[J]. J Biol Chem, 2001, 276(12): 8665－8673.

[3] Kool J, van Zaane W, van der Eb A J, *et al*. Down-regulation of T-STAR, a growth inhibitory protein, after SV40-mediated immortalization [J]. Cell Growth Differ, 2001, 12(11): 535－541.

[4] Venables J P, Vernet C, Chew S L, *et al*. T-STAR/ETOILE: a novel relative of Sam68 that interacts with an RNA-binding protein implicated in spermatogenesis[J]. Hum Mol Genet, 1999, 8(6): 959－969.

[5] Lee J S, Burr J G. Salpalpha and salpbeta, growth-arresting homologs of Sam68[J]. Gene, 1999, 240(1): 133－147.

[6] Barlat I, Maurier F, Duchesne M, *et al*, A role for Sam68 in cell cycle progression antagonized by a spliced variant within the KH domain[J]. J Biol Chem, 1997, 272(6): 3129－3132.

[7] Sugimoto Y, Morita R, Amano K, *et al*. T-STAR gene: fine mapping in the candidate region for childhood absence epilepsy on 8q24 and mutational analysis in patients[J]. Epilepsy Res, 2001, 46(2): 139－144.

[8] 司徒镇强，吴军正. 细胞培养[M]. 西安：世界图书出版公司，1996. 58－136.

[9] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第2版. 北京：中国协和医科大学出版社，1999. 401.

（编辑　陈聪连）