文章编号:1000-5404(2005)11-1127-03

论著

反义 T-STAR 基因转染降低肺腺癌 A549 细胞端粒酶活性

张 玲[1],郭 莲[2],彭 勇[2],陈 兵[2] (第三军医大学西南医院:[1] 军人门诊部,[2] 内分泌科,重庆 400038)

提 要:目的 通过反义技术抑制肺腺癌 A549 细胞 T-STAR (testes-signal transduction and activator of RNA)基因内源性表达,观察对细胞端粒酶活性的影响。**方法** 用阳性脂质体法将 T-STAR 反义基因转染入 A549 细胞,用 RT-PCR 及 Western blot 方法检测转染细胞内源性 T-STAR 基因 mRNA 和蛋白表达水平,并用 PCR-ELISA 法检测细胞端粒酶活性改变。**结果** 反义基因可在 mRNA 及蛋白水平有效抑制肺腺癌 A549 T-STAR 基因的表达,同时明显降低细胞端粒酶活性。**结论** 肺腺癌 A549 细胞 T-STAR 基因表达的抑制可能下调端粒酶活性。

关键词: T-STAR;肺腺癌细胞;端粒酶;细胞转染
中图法分类号: R345.9; R446.9; R734.2 **文献标识码**: A

Transfection of T-STAR antisense gene can depress the telomerase activity in lung adenocarcinoma cell line A549

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

Abstract: Objective To investigate the changes of telomerase activity after knocking down endogenous expression of T-STAR (testes-signal transduction and activator of RNA) gene in human lung adenocarcinoma cell line A549 by antisense strategy. **Methods** The mRNA and protein expression of T-STAR gene were determined by RT-PCR and Western blotting, and the telomerase activity was measured by PCR-ELISA, after transfection of T-STAR antisense gene into A549 cells with lipofectamine. Sense pcDNA-STAR and blank pcDNA3.1 transfection served as control. **Results** The expression of T-STAR gene was significantly inhibited at mRNA and protein level, and the telomerase activity was significantly decreased. **Conclusion** The down-regulation of telomerase activity may result from inhibition of T-STAR gene expression in lung adenocarcinoma A549 cells.

Key words: T-STAR; human lung adenocarcinoma cells; telomerase; cell transfection

T-STAR 蛋白(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,与酪氨酸激酶信号系统相关[1],通过影响靶基因 pre-mRNA 的选择性剪接、加工[2]等环节而参与细胞永生化、精子发生[3]、抑制细胞生长等。但 T-STAR 这些作用的机制途径却并不清楚。我们通过酵母双杂交研究表明 T-STAR 还能与端粒酶催化活性亚单位 hTERT(human telomerase reverse transcriptase)发生相互作用,从而有可能通过端粒酶参与细胞的生长、增殖调控等过程。本实验将反义 T-STAR 基因转染入人肺腺癌细胞系 A549 细胞中,检测在 T-STAR 基因内源性表达抑制后细胞的端粒酶活性改变,以研究 T-STAR 基因是否可能参与细胞端粒酶活性的调节。

1 材料与方法

1.1 质粒与细胞

真核表达载体 pcDNA3.1 购于 Invitrogen 生物公司;将 T-STAR 基因 cDNA 68 - 335nt 的 *Apa* Ⅰ 酶切片段分别正、反向装载入 pcDNA3.1 真核表达质粒,构建得到正、反义基因质粒 pcDNA-STAR 和 pcDNA-asSTAR。人肺腺癌细胞株 A549 引自新桥医院全军呼吸内科研究所。

1.2 主要试剂

转染试剂 Lipofectamine2000 Reagent(Invitrogen)、RPMI1640 培养基、小牛血清(Hyclone)、T-STAR 单克隆抗体(Santa Cruz)、兔抗羊 IgG-HRP(北京中山生物技术公司)、RT-PCR KIT(大连宝生物公司)、端粒酶 PCR ELISA 试剂盒购(Roche)。

1.3 细胞培养和转染

人肺腺癌细胞株 A549 培养参照文献[4]的条件进行。按

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 12 篇。电话:(023)68754639,E-mail: zhanglingswh@yahoo.com.cn
通讯作者:陈 兵,电话:(023)68754138,E-mail:zp@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2005-02-24;修回日期:2005-04-15

试剂盒说明进行 Lipofectamine 转染细胞。转染前 1 d 将细胞以 1×10^5/ml 培养液的量转入 6 孔板中，细胞融合生长至 50% ~ 60%时，分别将反义 pcDNA-asSTAR（实验组）及正义 pcDNA-STAR、空载体 pcDNA3.1（对照组）转染细胞，8 h 后换液继续培养 24 h，改用含 G418 500 mg/L 的培养基进行阳性克隆筛选，筛选到的阳性克隆分别命名为 A549-asSTAR、A549-STAR 和 A549-pcDNA。阴性对照为无质粒 DNA 的转染细胞 A549。

1.4 T-STAR mRNA 的表达检测

各转染细胞培养 48 h 后，收集 1×10^5 细胞，提取总 RNA，逆转录为 cDNA，进行 RT-PCR 检测。T-STAR 特异性引物序列为：P_1 5′-CAGGATGGGACATGCTTTG-3′，P_2 5′-TCTGTAGACGCCCTTTGCT-3′；内参照 β-actin 引物序列为：P_1 5′-GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA-3′，P_2 5′-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC-3′。PCR 的扩增条件为：95 ℃ 5 min→95 ℃ 45 s、48 ℃ 30 s、72 ℃ 1 min(35 个循环)→72 ℃ 10 min→4 ℃ 20 min 或更长。

将 PCR 产物进行 1.0%琼脂糖凝胶电泳，观察 T-STAR mRNA 的表达，并用 Quantity one 分析软件对电泳结果进行分析，计算每组内目的片段与内参照条带的光密度值之比，作为每组 T-STAR mRNA 的相对定量值（$\bar{x}\pm s$）。实验重复 3 次。

1.5 T-STAR 蛋白的表达检测

1.5.1 细胞总蛋白提取[4] 在细胞融合生长约 90%时，用 PBS 将细胞轻洗 2 次，加入 1 × SDS 上样缓冲液使细胞充分裂解，刮于一干净的 Ep 管中；100 ℃加热 10 min；超声破碎细胞，常温离心 10 min；将上清移至 Ep 管中，以 10 μl/1ml 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。

1.5.2 Western blot 检测 T-STAR 蛋白的表达[4] 分别取各组细胞总蛋白各 40 μg 与等体积上样缓冲液混匀，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。实验重复 3 次，蛋白表达定量水平用目的条带的负相光密度值表示（$\bar{x}\pm s$）。

1.6 PCR ELISA 法检测端粒酶活性

按 Roche 公司 Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA 试剂盒操作说明进行。

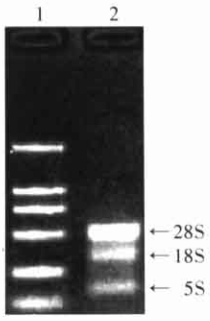
1.7 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPSS 10.0 统计学软件行 t 检验。

2 结果

2.1 细胞 T-STAR mRNA 的表达水平

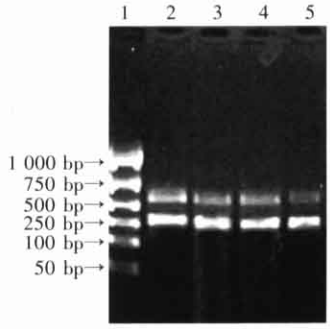
抽提各组细胞总 RNA 的电泳结果如图 1 所示，在 5S、18S 和 28S 处出现 3 条清晰条带，其中 28S 的亮度约为 18S 的 2 倍，说明所抽提总 RNA 无明显降解、较完整。各组 A549 细胞的 T-STAR mRNA 经逆转录成 cDNA 后，与 β-actin 同时行琼脂糖凝胶电泳，结果见图 2；对图 2 中的各 T-STAR cDNA 目的条带进行半定量分析。独立样本 t 检验分析表明，分别与 A549 细胞组平均水平相比，T-STAR mRNA 表达水平在 A549-asSTAR 中明显下降（$P<0.01$），减少了 59%，在 A549-pcDNA 和 A549-STAR 中均无明显变化（$P>0.05$）。



1：Marker；2：T-STAR mRNA

图 1 A549 细胞总 RNA 电泳图

Fig 1 Electrophoresis of total RNA of each A549 cell group



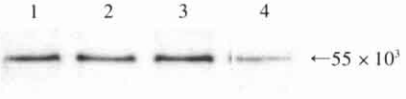
1：Marker；2：A549；3：A549-pcDNA；4：A549-STAR；5：A549-asSTAR

图 2 逆转录 PCR 琼脂糖凝胶电泳显示各组细胞 T-STAR mRNA 的表达量

Fig 2 T-STAR mRNA expression in each group of cells amplified by RT-PCR on agarose gel

2.2 T-STAR 蛋白的表达水平

T-STAR 蛋白在转染了不同载体的肺腺癌 A549 系列细胞株中均有表达，结果见图 3，从图中可见到，不同细胞总蛋白经电泳、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：A549、A549-pcDNA 和 A549-STAR 无明显变化，A549-asSTAR 明显减弱。T-STAR 蛋白的定量分析结果显示，T-STAR 蛋白在 A549-asSTAR 中表达量下降了 83.80%，有显著性差异（$P<0.01$）。对照组 A549、A549-pcDNA 和 A549-STAR 间无显著性差异（$P>0.05$）。



1：A549；2：A549-pcDNA；3：A549-STAR；4：A549-asSTAR

图 3 Western blot 检测各 A549 细胞组的 T-STAR 蛋白表达量

Fig 3 Western blot analysis of the T-STAR protein expression in each group of A549 cell

2.3　转染前后各细胞的端粒酶活性

各 A549 细胞组的端粒酶活性均呈阳性，PCR-ELISA 定量检测结果显示，端粒酶活性在各对照组及 A549-STAR 组间无明显差异；但在细胞内源性 T-STAR 表达受抑制的 A549-asSTAR 组细胞中，端粒酶活性却明显降低（$P < 0.01$），仅约为对照组的 59.7%。

3　讨论

T-STAR 广泛表达于视网膜、胎肝、睾丸、前列腺、心脏、肺、胰腺、胎盘、脑和骨骼肌等组织中[1]，参与了一系列重要的生理、病理过程。我们先前的研究发现 T-STAR 还能与 hTERT 发生相互作用，从而有可能通过端粒酶参与细胞的生长、增殖调控等过程，同时也证实 T-STAR 的表达与肿瘤组织的端粒酶活性和 hTERT 表达呈正相关。

本研究结果显示，T-STAR 反义基因可在 mRNA 及蛋白水平明显抑制该基因在肺腺癌细胞株 A549 内源性表达，这说明我们已经成功获得了 T-STAR 特异性下调细胞株；更重要的是，在 A549 细胞 T-STAR 基因内源性表达减少的同时，细胞端粒酶活性也随之明显降低，二者呈平行的下降变化趋势。这一结果与文献[5]在不同肿瘤细胞中的研究结果基本一致，也进一步证实 T-STAR 与 hTERT 以及端粒酶活性之间存在一定的相关关系，即 T-STAR 的表达抑制可能导致肿瘤细胞内 hTERT 和端粒酶活性的降低。

端粒酶与细胞永生化和肿瘤的关系密切，而我们对不同组织的较大样本研究进一步证实 T-STAR 主要表达于腺瘤组织中[5]，参与了瘤细胞的永生化过程，T-STAR 的丢失是细胞逃逸危机，达到永生化的先决条件之一，且很可能是细胞增殖危机通路或永生化通路的重要成分之一[3,6]。然而对于已经完成转化过程的、有较高端粒酶活性的永生化细胞中，T-STAR 表达变化的实验数据却相对较少。有研究表明，精子细胞作为一种永生化细胞，在精子成熟后不仅一直保持较高端粒酶活性，而且持续高表达 T-STAR 蛋白[3,7]。这与我们的研究结果相符。即在永生化细胞中，T-STAR 与端粒酶活性呈正相关，且很可能是端粒酶活性调控网络成员之一。其中的具体作用机制目前还不分清楚，但我们从 T-STAR 的已有功能进行分析，推测 T-STAR 可能主要从对 hTERT 蛋白的磷酸化调控和对 hTERT 的 pre-mRNA 选择性剪接两方面起作用。

hTERT 是端粒酶活性的核心，其可逆性磷酸化过程可调节端粒酶活性[8]。研究表明，酪氨酸激酶 c-Abl 能通过自身 SH3 结构域与 hTERT 结合，并使后者磷酸化抑制端粒酶活性。T-STAR 作为酪氨酸激酶信号传导通路重要成分，可通过与其同族物 Sam68 蛋白结合成异源多聚体[1]而抑制 Sam68 蛋白与靶蛋白的作用。而 Sam68 蛋白作为多种 RNA 结合蛋白的适配器蛋白，对 c-Abl SH3 起促进作用。因此 T-STAR 可能通过可逆性磷酸化抑制 Sam68 蛋白与 c-Abl SH3 结合，增加端粒酶活性。T-STAR 对端粒酶活性产生影响的另一重要机制可能在于参与了 hTERT 基因的选择性剪接。体内存在不同的 hTERT 剪接产物[7,9]，其中全长转录产物与端粒酶的活性相关[8]。T-STAR 与选择性剪接有关的蛋白发生相互作用[2]，接参与靶 pre-mRNA 特异性剪接位点的选择性调节和加工[2]。T-STAR 是否可通过调控 hTERT 的 per-mRNA 进行剪接方式，增加 hTERT 的全长剪接产物，上调了端粒酶活性，尚待进一步研究。

参考文献：

[1] Haegebarth A, Heap D, Bie W, *et al*. The nuclear tyrosine kinase BRK/Sik phosphorylates and inhibits the RNA-binding activities of the Sam68-like mammalian proteins SLM-1 and SLM-2[J]. J Biol Chem, 2004, 279(52): 54398 - 54404.

[2] Venables J P, Dalgliesh C, Paronetto M P, *et al*. SIAH1 targets the alternative splicing factor T-STAR for degradation by the proteasome[J]. Hum Mol Genet, 2004, 13(14): 1525 - 1534.

[3] Elliott D J. The role of potential splicing factors including RBMY, RBMX, hnRNPG-T and STAR proteins in spermatogenesis[J]. Int J Androl, 2004, 27(6): 328 - 334.

[4] Liu W J, Zhang Y W, Shen Y, *et al*. Telomerase inhibition is a specific early event in salvicine-treated human lung adenocarcinoma A549 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 323(2): 660 - 667.

[5] Saygan-Karamursel B, Dikmen G, Dogan P, *et al*. Quantitative telomerase activity in malignant, benign and normal gynecological tissues[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2005, 26(1): 83 - 86.

[6] Najib S, Martin-Romero C, Gonzalez-Yanes C, *et al*. Role of Sam68 as an adaptor protein in signal transduction[J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62(1): 36 - 43.

[7] Feng L X, Chen Y, Dettin L, *et al*. Generation and *in vitro* differentiation of a spermatogonial cell line[J]. Science, 2002, 297(5580): 392 - 395.

[8] Goueli B S, Janknecht R. Upregulation of the Catalytic Telomerase Subunit by the Transcription Factor ER81 and Oncogenic HER2/Neu, Ras, or Raf [J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(1): 25 - 35.

[9] Fujiwara-Akita H, Maesawa C, Honda T, *et al*. Expression of human telomerase reverse transcriptase splice variants is well correlated with low telomerase activity in osteosarcoma cell lines[J]. Int J Oncol, 2005, 26(4): 1009 - 1016.

（编辑　栾　嘉）