论著

文章编号:1000-5404(2006)12-1292-03

# hTERT转染神经干细胞端粒酶活性及hTERT mRNA检测

刘学强,杨 辉,何家全,宋业纯,邱克军,王 彬,吕胜青 (第三军医大学新桥医院神经外科,重庆 400037)

**提 要:目的** 以逆转录病毒PLXSN为载体,将hTERT基因转染入体外培养的人神经干细胞,检测神经干细胞端粒酶活性及hTERT mRNA表达情况,为建立永生化神经干细胞系提供一种新的思路。**方法** 体外扩增人神经干细胞及基因转染后,应用PCR-ELISA法检测神经干细胞端粒酶活性,荧光定量PCR法检测hTERT mRNA表达情况。**结果** 通过逆转录病毒介导的hTERT基因转染人神经干细胞后,端粒酶活性明显升高,持续表达,hTERT mRNA也早期呈高水平表达,但继之下降,维持在一个较低水平。**结论** 转染hTERT基因后的神经干细胞具有表达高水平端粒酶活性,并稳定表达,这为建立基因工程的永生化神经干细胞系奠定了基础。而hTERT mRNA则逐渐下降,并维持在一个较低水平,不能作为检测神经干细胞增殖和分化能力的指标。

**关键词:** 神经干细胞;端粒酶;hTERT;转染

**中图法分类号:** R322.8;R345;R394.3 **文献标识码:** A

# Detection of telomerase activity and hTERT mRNA in hTERT transfected human neural stem cells

LIU Xue-qiang, YANG Hui, HE Jia-quan, SONG Ye-chun, QIU Ke-jun, WANG Bin, LU Sheng-qing (Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**Abstract: Objective** To detect the telomerase activity and the expression of hTERT mRNA in hTERT transfected human neural stem cells (NSCs) and explore to establish immortalized NSCs line. **Methods** Human NSCs cultured *in vitro* were transfected by retroviral vector carrying hTERT gene. Telomerase activity (TA) was detected by a quantitative telomerase PCR-ELISA, and hTERT mRNA expression was quantified by online RT-PCR. **Results** High levels of telomerase activity and hTERT expression were detected in transfected NSCs in early stage. The high level of telomerase activity lasted, but the expression of hTERT mRNA decreased gradually, then lasted in a low level. **Conclusion** hTERT transfected human NSCs held a high-level, stable telomerase activity, paving the way to establish immortalized NSCs line. hTERT mRNA could not be used as a molecular target of NSCs for describing their proliferation potential and differentiation status.

**Key words:** neural stem cells; telomerase; hTERT; transfection

端粒酶(telomerase)是一种由多个结构单位组成的具有逆转录合成端粒重复片段至染色体3′末端来补充端粒丢失的核蛋白复合体[1]。目前已经鉴定出来的成分有:端粒酶RNA组分(hTR),端粒酶相关蛋白(TP1)和端粒酶逆转录酶(hTERT,又名端粒酶催化亚单位)。然而,hTR及TP1的表达不具特异性,而hTERT则是调节端粒酶活性的限速因素[2]。我们及其他[3]研究发现,正常人神经干细胞(neural stem cells, NSCs)表达低水平的端粒酶活性(telomerase activity, TA),在体外以有限次分裂后,便进入复制衰老而逐渐死亡。为了获得足够量的神经干细胞,以利于基础及临床研究,我们通过基因转染技术,将hTERT基因导入体外培养的人神经干细胞中,结果显示细胞增殖旺盛,能连续传代30代以上,且稳定表达高水平的端粒酶活性,这就为建立永生化神经干细胞系提供了另外一条途径,而hTERT mRNA检测发现其表达在转染后先升高,之后逐渐下降并维持在相对较低的水平,并持续表达。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人神经干细胞取自2003年10月至2004年5月中梁山医院妇产科,经患者同意的10~14周药物流产人胎脑组织大脑

**基金项目:** 国家自然科学基金资助重点项目(30130110)
Supported by the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (30130110)

**作者简介:** 刘学强(1974-),男,四川省广安市人,硕士研究生,主治医师,主要从事神经干细胞方面的研究,现在解放军42医院神经外科。电话:(0833)5830032,E-mail:stronging@sohu.com

**通讯作者:** 杨 辉,电话:(023)68755610;E-mail:huiyang64@yahoo.com

**收稿日期:** 2004-12-31;**修回日期:** 2005-06-01

皮层。DMEM/F12 细胞培养基购自 Hyclone 公司，B27 添加剂购自 Gibco 公司、EGF、FGF-2、LIF、G418 购自 Sigma 公司，Tripure RNA 裂解液、端粒酶活性 PCR-ELISA 检测试剂盒及 hTERT mRNA 荧光定量检测试剂盒购自罗氏公司，PLXSN-hTERT 真核表达载体由第三军医大学西南医院梁光萍博士赠送。

### 1.2　方法

#### 1.2.1　人神经干细胞的培养及逆转录病毒介导的基因转染

神经干细胞培养按本室建立的方法进行[4]，将 PLXSN-hTERT 扩增，并按其构建时方法进行了酶切鉴定[5]，采用脂质体法转染包装细胞 PA317，获得病毒上清后，转染体外培养的增殖旺盛的神经干细胞，按文献[6]进行。G418 筛选后约 3～4 周，形成抗性克隆，持续给予 G418 150 μg/ml 培养，每 3～5 天传代 1 次，收集不同代数的细胞，用于端粒酶活性及 hTERT mRNA 检测。

1.2.2　端粒酶活性检测　　TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA PLUS (Roche Molecular Bio- chemicals, Mannheim, Germany)，用于端粒酶活性的半定量检测。

其检测原理可分为两步：第 1 步，在端粒酶的作用下，将端粒重复序列 TTAGGG 添加至生物素标记的引物 P1-TS 的 3′末端，在引物 P1-TS 和引物 P2 的作用下，进行 PCR 扩增，产生的 PCR 产物则包含端粒酶特异性的 6 个核苷酸片段重复序列。第 2 步，PCR 产物分为两份，分别进行变性并杂交至地高辛(DIG)标记的端粒重复序列特异性检测探针(P3-T)及内标(P3-Std)上，产物通过生物素标记至链霉亲和素包被的 ELISA 板内固定，通过与辣根过氧化物酶共轭的抗地高辛抗体(Anti-DIG-HRP)和其特异性底物 TMB 反应显色来检测其光吸收值。

所有操作均按试剂盒的操作流程进行，分别取转染后传代 2、4、6、10、15、20、30 代(passage, P)细胞，每代细胞取 3 组样品进行检测，阳性对照为永生化人胚肾细胞系 293 细胞，是一种已知的端粒酶活性高表达的细胞，空白对照为未经转染的第 5 代神经干细胞，最后用酶标仪测量在 690 nm 参考波长下的 450 nm 波长吸光度值[$\delta D = D(450) - D(690)$]。

1.2.3　细胞总 RNA 提取　　按文献[7]方法进行。抽提的总 RNA 进行 0.8% 琼脂糖电泳，选取 18S 及 28S 保存完好的进行进一步实验，总 RNA 浓度根据紫外分光光度计测量结果计算。

1.2.4　荧光定量检测 hTERT mRNA 水平　　使用 LightCycler Telo TAGGG hTERT Quantification Kit®(Rouche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)，进行实时定量(Real-time PCR)检测，仪器使用 LightCycler® 仪(Roche Molecular Systems, Alameda, CA)，所有的操作步骤皆按试剂盒说明书进行。取与检测端粒酶活性同代细胞，每代 3 个样品，结果取均值，进行 40 个循环，根据生成的曲线，即可获得样品中 RNA 的初始浓度。

该试剂盒引入了二个特异的探针，一个探针在其 5′标记荧光染料 LightCycler Red 640，为了避免其延长，在其 3′末端磷酸化。另一个探针在其 3′标记了荧光素，只有这两个探针杂交到 DNA 模板，并靠近时，发生荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)，供体荧光基团被激发，将能量部分转移至受体荧光基团 LightCycler Red 640，便可通过联机显示器获得荧光信号。荧光淬灭的程度与起始模板的量成反比，以此可以进行 PCR 定量分析。

为建立标准曲线，所有的测量包括了 5 个体外转录的 hTERT mRNA 标准对照品，初始浓度分别为 $1\times10^6$，$1\times10^5$，$1\times10^4$，$1\times10^3$ 和 $1\times10^2$ 拷贝数/2 μl。

为使结果归一化，引入了看家基因 PBGD(胆色素脱氨酶)，用于反应的控制和作为相对定量 hTERT mRNA 的参考。

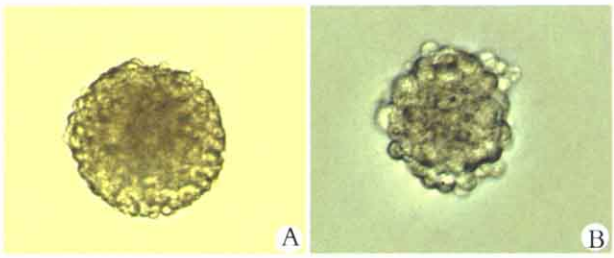
### 1.3　统计学分析

数据均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPSS 10.0 软件行多组间比较，单因素方差分析，端粒酶活性与 hTERT mRNA 的相关性采用 Spearman 相关分析。

## 2　结果

### 2.1　体外培养的神经干细胞及转染 hTERT 后神经干细胞生长情况

转染 hTERT 后，细胞形态无明显变化，保持了未分化属性及自我更新、自我维持的能力(图 1)，但生长增殖能力增强，群体倍增时间由 7 d 缩短为 3.5 d。




A：转染前神经干细胞；B：转染 hTERT 基因后的神经干细胞

**图 1　转染前后神经干细胞生长情况**　(LM×400)

### 2.2　端粒酶活性

根据试剂盒说明，样品吸光度值以[$(D(450) - D(690)$]值 <0.1 为阴性，样品检测值(AS-AS, 0) >0.2 则端粒酶阳性，阴性对照组吸光度值应小于 0.1。

分别取转染后 2、4、6、10、15、20、30 代及未经转染的体外培养 5 代神经干细胞进行端粒酶活性检测，以 293 细胞为阳性对照，其结果设定为 100% [(AS－AS, O)/AS,IS]，将待测标本与其作为参照进行比较，可以计算出样品的相对端粒酶活性(relative telomerase activities, RTA)，以百分比来表示(表 1)。

**表 1　PCR-ELISA 法检测 hTERT 基因转染后神经干细胞端粒酶活性 *D* 值及其相对活性**

| 样品 | AS,0 | AS | AS,IS | (AS-AS,O)/AS,IS | RTA(%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 293 细胞 | 0.030 | 3.379 | 1.116 | 3.000 | 100 |
| P2 | 0.035 | 2.723±0.598[a] | 1.565 | 2.101 | 70.03 |
| P4 | 0.048 | 2.480±0.231[a] | 1.081 | 2.250 | 75.00 |
| P6 | 0.028 | 2.292±0.493[a] | 1.128 | 2.007 | 66.90 |
| P10 | 0.044 | 2.317±0.488[a] | 1.152 | 1.973 | 65.77 |
| P15 | 0.079 | 2.655±0.871[a] | 1.115 | 2.310 | 77.00 |
| P20 | 0.033 | 2.401±0.300[a] | 1.120 | 2.114 | 70.47 |
| P30 | 0.047 | 2.433±0.603[a] | 1.238 | 1.927 | 64.13 |
| 对照组 | 0.005 | 0.335±0.009 | 0.733 | 0.450 | 15.00 |

a：$P<0.01$，与对照组比较

### 2.3　hTERT mRNA 检测

取与端粒酶活性检测同代细胞 $10^6$ 个，提取总 RNA，分光光

度计测定光密度值,计算出 RNA 浓度,每个样品取 20 ng,一步法进行实时定量 PCR,测定 hTERT mRNA 初始浓度(表 2):从表中可以看出,hTERT mRNA 在转染后表达量较高,之后逐渐下降,维持在较低水平上。

**表 2 不同代细胞初始 hTERT mRNA 拷贝数(2 μl 含量)**

| 样品 | Ct 值 | 浓度 ( $\times 10^4$) |
|---|---|---|
| P2 | 18.82 | 153.20 ± 44.5 |
| P4 | 21.86 | 11.21 ± 6.04[a] |
| P6 | 22.75 | 9.93 ± 4.64[a] |
| P10 | 24.72 | 8.54 ± 1.47[a] |
| P15 | 31.13 | 0.25 ± 0.06[a] |
| P20 | 31.42 | 0.24 ± 0.08[a] |
| P30 | 32.14 | 0.20 ± 0.05[a] |

a: $P<0.01$, 与 P2 比较

### 2.4 端粒酶活性与 hTERT mRNA 的关系

转染 hTERT 基因后,不同代细胞端粒酶活性检测与 hTERT mRNA 的相关系数 $r=0.170$ ($P=0.461$),二者间无明显的相关性。

## 3 讨论

神经干细胞是指具有分化为神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞的能力,能自我更新并足以提供大量脑组织细胞的细胞[8],神经干细胞的发现为神经发育和中枢神经系统基础和临床研究提供了一条新的思路。

研究表明,人体细胞每分裂 1 次,染色体丢失约 50 ~ 100 bp 长度的端粒 DNA,随着细胞的不断分裂增殖,端粒缩短至一定程度,细胞将出现"复制衰老"现象[9]。端粒酶是一种 RNA 和蛋白质构成的复合体,具有逆转录酶的活性,它能以自身 RNA(hTR)为模板,从头合成端粒 DNA 并加到染色体末端,维持染色体的稳定性,使细胞获得永生化[10]。

Kim 等[11]于 1994 年建立了 TRAP 法检测端粒酶活性,是目前常用的一种方法。但是,在检测时需要通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),然后经放射自显影,分析显示扩增的端粒重复序列的梯度条带。后来有人将 PCR 产物经 PAGE 用银染的方法显色。但上述方法均存在一定的缺点:定量困难,检测时间长,前者还可引起放射性同位素污染。在本实验中,我们应用 Telo TAGGG PCR-ELISA 检测试剂盒检测端粒酶活性,具有操作简便、检查结果稳定、特异性好,能半定量了解端粒酶活性强弱,不存在同位素污染的优点。通过对 hTERT mRNA 的定量检测,能够快速准确的了解样品中初始 mRNA 的含量,通过与看家基因胆色素原脱氨酶(PBGD)比较对样品 mRNA 含量进行评价,可使检测结果稳定、可靠。

我们的研究发现,体外培养的人神经干细胞,早期表达低水平端粒酶活性,但并不持久,培养 10 代以后,端粒酶活性检测即为阴性。转染 hTERT 基因后的神经干细胞,经过 G418 筛选,获得抗性克隆,扩大培养后,神经干细胞生长旺盛,增殖周期缩短,群体倍增时间缩短,端粒酶活性检测明显升高,且能持续表达,不同代细胞之间无显著性差异,而与未转染神经干细胞相比,存在显著性差异($P<0.01$)。通过检测 hTERT mRNA 的含量,可以发现,转染后细胞的 hTERT mRNA 早期为高表达状态,随着传代次数增多,逐渐下降,但维持在一个较低水平,各组间存在显著差异。端粒酶活性与 hTERT mRNA 之间,无明显的相关性。

hTERT 诱导细胞永生化,已在不同的体细胞中得以证实[12],我们选用 hTERT 基因转染神经干细胞,建立了稳定的永生化神经干细胞系,为临床及基础研究提供大量稳定可靠的种子细胞。hTERT mRNA 的表达没有组织特异性[13],与端粒酶活性不成相关关系,不能作为端粒酶活性检测的有效指标,其原因可能与 hTERT mRNA 的转录后修饰有关[14]。

## 参考文献:


[1] SHIPPEN-LENTZ D, BLACKBURN E H. Functional evidence for an RNA template in telomerase[J]. Science, 1990, 247(4942): 546 - 552.

[2] COUNTER C M, MEYERSON M, EATON E N, *et al*. Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase[J]. Oncogene, 1998, 16(9): 1217 - 1222.

[3] OSTENFELD T, CALDWELL M A, PROWSE K R, *et al*. Human neural precursor cells express low levels of telomerase *in vitro* and show diminishing cell proliferation with extensive axonal outgrowth following transplantation[J]. Exp Neurol, 2000, 164(1): 215 - 226.

[4] 刘仕勇, 杨 辉, 邱克军, 等. 人胚与鼠胚神经干细胞体外培养的差异[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2001, 10(4): 393 - 397.

[5] 梁光萍, 罗向东, 陈 渝, 等. 人 hTERT 正反义逆转录病毒表达载体的构建和鉴定[J]. 世界华人消化杂志, 2002, 10(1): 94 - 95.

[6] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993: 645 - 649.

[7] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W 著. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂等译. 北京: 科学出版社, 2002: 518 - 522.

[8] MCKAY R. Stem cells in the central nervous system[J]. Science, 1997, 276(5309): 66 - 71.

[9] WATSON J D. Origin of concatemeric T7 DNA[J]. Nat New Biol, 1972, 239(94): 197 - 201.

[10] SHAY J W, GAZDAR A F. Telomerase in the early detection of cancer[J]. J Clin Pathol, 1997, 50(2): 106 - 109.

[11] KIM N W, PIATYSZEK M A, PROWSE K R, *et al*. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer[J]. Science, 1994, 266(5193): 2011 - 2015.

[12] MONDELLO C, CHIESA M, REBUZZINI P, *et al*. Karyotype instability and anchorage-independent growth in telomerase-immortalized fibroblasts from two centenarian individuals[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 308(4): 914 - 921.


(编辑 陈聪连)