论著

文章编号:1000-5404(2006)24-2422-04

靶向端粒酶逆转录酶基因反义寡核苷酸对人舌鳞癌细胞增殖和凋亡的影响

姚 晨[1],姚 华[2],吴求亮[2],谭龙益[1],范 骏[3],石展鹰[4] ([1]第二军医大学长征医院实验诊断科,上海 200003;浙江大学医学院附属第一医院:[2]口腔中心,[3]传染病研究所,杭州 310003;[4]解放军第113医院检验科,宁波 315040)

提 要:目的 观察并探讨靶向端粒酶逆转录酶基因(human telomerase reverse transcriptase,hTERT)反义寡核苷酸对人舌鳞癌细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 根据细胞形态学、DNA ladder琼脂糖凝胶电泳分析、MTT法流式细胞仪检测细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡。**结果** 反义寡核苷酸组Tca8113细胞增殖受抑、细胞周期阻滞,对照组Tca8113细胞未受抑。流式细胞仪和DNA ladder检测结果显示:反义寡核苷酸转染Tca8113细胞早期凋亡率增加,并随寡核苷酸浓度和培养时间的增加而增高,与对照组比较有显著性差异($P<0.05$)。对照组间比较无统计学差异($P>0.05$)。**结论** 靶向端粒酶逆转录酶基因反义寡核苷酸能抑制人舌鳞癌细胞增殖和促进细胞凋亡。

关键词:端粒酶逆转录酶;反义寡核苷酸;流式细胞仪;鳞癌细胞,舌;细胞增殖;细胞凋亡

中图法分类号:R329.28;R73-362;R739.86 **文献标识码**:A

Effect of antisense oligodeoxynucleotides against hTERT on proliferation and apoptosis of human Tca8113 cancer cell

YAO Chen[1], YAO Hua[2], WU Qiu-liang[2], TAN Long-yi[1], FAN Jun[3], SHI Zhan-ying[4] ([1]Department of Experimental Diagnosis, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003; [2]Department of Stomatology, The First Affiliated Hospital, [3]Research Institute of Infectious Disease, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, [4]Department of Laboratory Medicine, No. 113 Hospital of PLA, Ningbo 315040, China)

Abstract: Objective To study the effect of antisense oligodeoxynualeotides against hTERT on proliferation and apoptosis of human tongue Tca8113 cancer cell. **Methods** Morphology of Tca8113 cells was observed under microscope. The proliferation of Tca8113 cells was detected by MTT assay. Cell cycles and apoptosis were examined by flow cytometry (FCM). DNA of Tca8113 cells was extracted and identified by gel electrophoresis for evidence "DNA ladder". The data were analyzed by one-way ANOVA of SPSS 11.0 for windows. **Results** ASODN inhibited the proliferation of Tca8113 cells significantly, as compared with controls ($P<0.05$), in both time-dependent and dose-dependent manner. The cells of control groups kept exponential reproduce ability. FCM analysis and the DNA ladder also showed that cells treated with ASODN arrested in G_1/G_0, the ratio of cells in S period was reduced and apoptosis rate of Tca8113 cells treated with ASODN for 72 h was significantly increased in comparison with control groups ($P<0.05$). No significant difference was found among the control groups. **Conclusion** Antisense oligodeoxynucleotides against hTERT could inhibit the proliferation of human Tca8113 cancer cell and promote cell apoptosis.

Key words: human telomerase reverse transcriptase; antisense oligodeoxynualeotides; flow cytometry; Tca8113 cancer cell lines, tongue; proliferation; apoptosis

近年来关于端粒酶与人体肿瘤的相关研究结果表明端粒酶是肿瘤发生、发展的关键步骤。其中端粒酶逆转录酶基因(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)作为端粒酶三大组分之一,是决定端粒酶活性的关键性分子,它在端粒酶活性失控、肿瘤形成中起重要作用。国内外采用反义hTERT或(和)反义端粒酶RNA(telomerase RNA,hTR)技术逆转了淋

基金项目:浙江省中医药科技计划基金资助项目(2004c098)
Supported by the Foundation of Sci & Tech Plan for Traditional Chinese Medicine in Zhejiang Province, China(2004c098)

作者简介:姚 晨(1971-),女,浙江省永康市人,硕士研究生,主管技师,主要从事实验诊断学方面的研究,现在解放军第113医院检验科。电话:(0574)27754042,E-mail: chenyaonb@163.com

通讯作者:石展鹰,电话:(0574)27754042, E-mail:Shizhangying@gmail.com

收稿日期:2005-12-28;**修回日期**:2006-02-22

巴癌细胞、卵巢癌细胞、腺样囊性癌细胞恶性表型[1-3]。但目前关于反义 hTERT 抑制舌癌细胞增殖、诱导凋亡报道较少。本研究采用脂质体作介导,用端粒酶逆转录酶基因作为分子靶点,将反义 hTERT 基因导入口腔鳞癌 Tca8113 细胞,观察其对细胞生物学行为的影响,探讨 hTERT 作为靶点治疗舌癌的可行性。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　实验对象　　人舌鳞状细胞癌细胞系 Tca8113 细胞,由上海第二医科大学附属第九人民医院口腔生物研究室建系并提供。

1.1.2　实验主要试剂及药品　　RPMI1640 培养基(美国 GibcoBRL 公司),特级小牛血清(杭州四季青生物工程公司)、小量凋亡 DNA 抽提纯化试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)、脂质体[OligofectAMINE(TM) Reagent, Invitrogen 公司,美国]、Annexin V FITC 检测试剂盒(Coulter 公司,美国)、碘化丙锭(Sigma 公司产品)、细胞总 RNA 抽提试剂 Trizol(Invitrogen 公司,美国)。

1.2　实验方法

1.2.1　细胞培养　　Tca8113 细胞在含 10% 小牛血清 RPMI 1640 培养液中,于 37 ℃、体积分数为 5% CO_2 的饱和湿度孵箱中培养。3 d 换液传代 1 次,取对数生长期细胞做后续实验。

1.2.2　细胞增殖检测　　取对数生长期的 Tca8113 细胞,分为 ASODN 组、SODN 组、空载体组分别按寡核苷酸浓度 0.25、0.5、1.0、2.0 μmol/L 加入每孔,均设 3 个复孔。另设 1 个调零孔(只含培养液,不含细胞和药物)为空白培养基组。置培养箱 37 ℃培养后于第 24、48、72 h,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml) 20 μl,再 37 ℃培养 4 h 后,离心倾去上清,每孔加入 DMSO 200 μl。30 min 内在酶标仪上读取吸光度值[D(570)],每孔测 3 次,计算细胞增殖抑制率。

1.2.3　细胞 DNA ladder(凋亡梯子)检测　　细胞小量凋亡 DNA 的抽提纯化,严格按照试剂盒说明进行。DNA 产物琼脂糖凝胶电泳分析:取 10 μl DNA,50 mV,在 2.0% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/ml 溴化乙锭)上电泳 1 h,凝胶成像分析仪摄影,KODAK 图像分析系统摄片。

1.2.4　反义寡核苷酸的设计与转染　　hTERT 反义寡核苷酸序列(ASODN):5′-ACTCACTCAGGCCTCAGACT-3′;正义寡核苷酸序列(SODN):5′-AGTCTGAGGCCTGAGTGAGT-3′。经计算机检索证实与其他已知的人类基因无同源性,两者均由上海生物工程公司合成,寡核苷酸的碱基均进行全硫代修饰。

寡核苷酸的转染:参照说明书进行。每组分别按寡核苷酸浓度 0.5、1.0、2.0 μmol/L 加入每孔,每个浓度设 3 个复孔,并设空白培养基组和空载体 0.5、1.0、2.0 μmol/L 组。

1.2.5　细胞凋亡检测　　调整待测细胞的浓度为 5×10^5 ~ 1×10^6/ml,700 r/min,4 ℃离心 5 min,按 AnnexinV-FITC 检测试剂盒说明分别加入 Binding Buffer、AnnexinV 和 5 μl PI,避光室温反应 15 min,在 1 h 内上机检测。

1.2.6　细胞周期检测　　待测样本制成单细胞悬液,用预冷的 70% 冷乙醇固定,过夜,加入 RNase A(终浓度为 20 μg/ml),37 ℃孵育 30 min,重悬于 1 ml PI 染液(终浓度为 50 μg/ml),4 ℃避光 1 h,上机检测,资料用 Cell Quest 细胞周期分析软件处理。

1.3　统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　反义寡核苷酸对 Tca8113 细胞增殖的影响

ASODN 组 Tca8113 细胞增殖减慢,0.25 μmol/L 组细胞尚能缓慢增殖,2.0 μmol/L 组细胞基本无明显增殖,细胞数量培养 72 h 后低于 24 h 时数量($P<0.05$)。SODN 组、空载体各浓度组和空白培养基组 Tca8113 细胞随培养时间延长呈指数增长,不受影响。见表 1,图 1。

表 1　MTT 法检测反义寡核苷酸对 Tca8113 细胞增殖的影响[D(270),$\bar{x}\pm s$]

组别	寡核苷酸浓度(μmol/L)			
	0.25	0.5	1.0	2.0
ASODN 组	0.664 ±0.035[a]	0.582 ±0.061[a]	0.504 ±0.018[a]	0.372 ±0.027[a]
SODN 组	0.914 ±0.074	0.896 ±0.050	0.917 ±0.073	0.943 ±0.044
空载体组	0.834 ±0.027	0.915 ±0.019	0.852 ±0.024	0.952 ±0.071
空白培养基组	0.882 ±0.065			

a: $P<0.05$,与空白培养基组比较

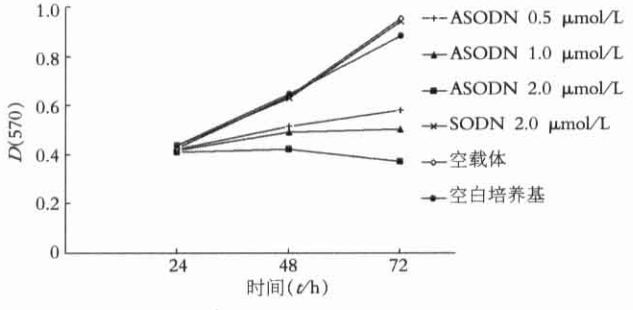
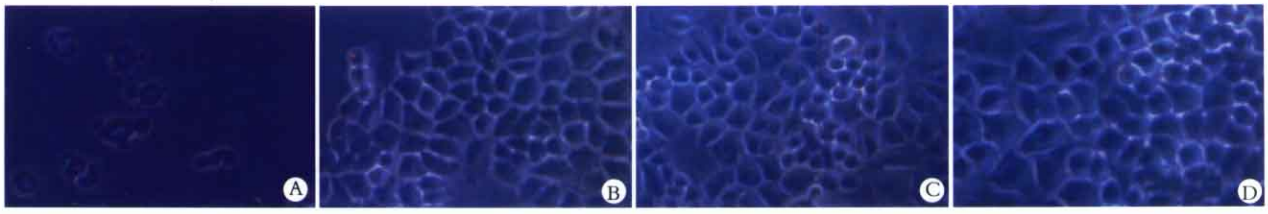


图 1　各组 Tca8113 细胞增殖曲线

2.2　反义寡核苷酸对 Tca8113 细胞周期和凋亡的影响

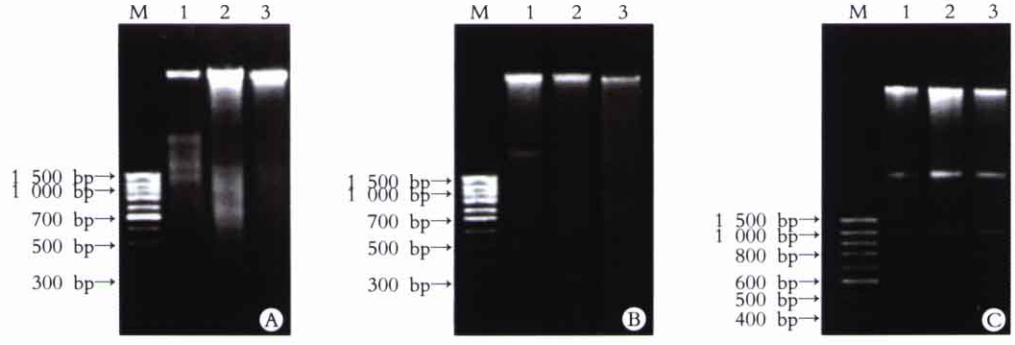
2.2.1　细胞形态学变化　　在倒置显微镜下观察,ASODN 组细胞随作用时间和作用浓度的增加,贴壁细胞出现皱缩、变圆、脱落;细胞间隙增大,部分细胞核深染,细胞膜皱缩,细胞形态呈圆形或椭圆形,作用 72 h 后效应较明显。2.0 μmol/L ASODN 组可见细胞凋亡特征性的细胞膜完整但周围出现颗粒的发泡现象,细胞凋亡晚期可见凋亡小体。SODN 组、空载体各浓度组和空白培养基组间培养 72 h 后连接紧密,分裂活跃,细胞为多边形,触角外展,细胞巢团状分布,无细胞发泡现象,未见凋亡小体。见图 2。



A：ASODN 组2.0 μmol/L；B：SODN 组2.0 μmol/L；C：空载体组2.0 μmol/L；D：空白培养基组

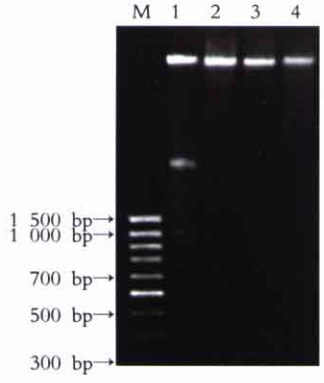
图2 倒置显微镜下观察 Tca8113 细胞 72 h 形态变化 （×400）

2.2.2 DNA ladder 琼脂糖凝胶电泳分析 从图3、4可见，24 h 时，ASODN 各浓度组细胞 DNA ladder 不明显。ASODN 2.0 μmol/L 组在48 h 出现 DNA ladder，72 h 时0.5、1.0 μmol/L 和2.0 μmol/L ASODN 均可检测到 DNA ladder。SODN 组、空载体各浓度组和空白培养基组间在3个时间点均未检测到 DNA ladder，只在加样孔附近出现大分子单一条带。



A：24 h；B：48 h；C：72 h M：DNA 标准；1：ASODN 组2.0 μmol/L；2：ASODN 组1.0 μmol/L；3：ASODN 组0.5 μmol/L

图3 不同浓度 ASODN 组 Tca8113 细胞 DNA ladder 琼脂糖凝胶电泳图



M：DNA 标准；1：ASODN 组2.0 μmol/L；2：SODN 组2.0 μmol/L；3：空载体组2.0 μmol/L；4：空白培养基组

图4 2.0 μmol/L ASOD 组及各对照组 Tca8113 细胞 DNA ladder 琼脂糖凝胶电泳图

2.2.3 细胞凋亡率变化的检测 0.5～2.0 μmol/L ASODN 组转染 Tca8113 细胞培养72 h 后，与空白培养组比较，细胞早期凋亡率增加，而且随 ASODN 浓度和培养时间的增加而增高（$F=75.386$，$P<0.05$）。SODN 组、空载体各浓度组虽随时间增加出现凋亡率略增高，但与空白培养基组无显著差异（$P>0.05$）。见表2。

表2 72 h Annexin-V/PI-双染色法检测细胞凋亡率变化（%，$\bar{x}\pm s$）

组别	寡核苷酸浓度（μmol/L）		
	0.5	1.0	2.0
ASODN 组	11.79±1.42[a]	16.41±2.16[a]	27.53±2.65[a]
SODN 组	5.75±0.38	7.15±1.18	8.19±1.62
空载体组	5.84±0.42	7.33±0.77	8.04±1.77
空白培养基组	6.75±0.91		

a：$P<0.05$，与空白培养基组比较

2.2.4 Tca8113 细胞周期变化的检测 ASODN 组细胞 G_0/G_1 期细胞比率上升，S 期细胞比例下降，说明细胞在反义寡核苷酸作用下，细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期，与 SODN 组、空载体组和空白培养基组比较有差异（$F=3.357$，$P<0.05$）。ASODN 对 Tca8113 细胞的细胞阻滞作用与作用浓度和时间呈正相关，而其余组和空白培养基组比较无显著差异（$P>0.05$），而且不随作用时间和浓度发生明显变化。见表3。

表3 72 h 流式细胞仪法检测细胞周期 S 期比例（%，$\bar{x}\pm s$）

组别	寡核苷酸浓度（μmol/L）		
	0.5	1.0	2.0
ASODN 组	21.330±2.182[a]	19.433±2.251[a]	16.767±1.267[a]
SODN 组	27.167±4.285	28.167±4.285	26.867±1.551
空载体组	29.568±2.514	26.438±3.853	28.600±2.768
空白培养基组	30.970±3.634		

a：$P<0.05$，与空白培养基组比较

3　讨论

近年来,端粒酶与恶性肿瘤的高度相关性引起人们的极大兴趣,成为肿瘤领域的研究热点之一。新近较多研究表明抗 hTERT 能够抑制肝癌、肺癌、白血病和前列腺癌等恶性肿瘤的生长[4-6]。然而,有关抗端粒酶途径治疗口腔鳞癌目前鲜有报道。为进一步探讨抗端粒酶逆转录酶途径治疗舌癌的可行性,并了解其作用的可能机制,我们在本研究中观察了靶向 hTERT 的反义寡核苷酸对 Tca8113 细胞增殖和凋亡的影响,对这一作用相关的分子事件作了一些探索。

反义技术作为基因"封条",能够特异性封闭或抑制其靶基因的表达。但是,不同的研究针对的靶点不同,有以模板区为靶点,有以启动子区为靶点,其效用也存在分歧。本研究针对 hTERT 基因设计合成含 20 个碱基的硫代寡核苷酸,证实反义寡核苷酸在体外对 Tca8113 细胞的增殖有明显的抑制作用,此抑制作用呈现一定的浓度和作用时间相关性。本研究中反义寡核苷酸 0.25 μmol/L 时 Tca8113 增殖出现一定的抑制,但并没有出现细胞大量凋亡的现象,而2.0 μmol/L 反义寡核苷酸作用 48 h 开始,细胞出现负增长。本研究中,观察到细胞若继续培养到 96 h 再经过换液培养后,细胞并没有出现全面死亡,存留的少量细胞会出现重新分裂、繁殖。这可能是因为:①反义寡核苷酸对 Tca8113 细胞作用有一个有效作用浓度和时间[7]。反义寡核苷酸有瞬间释放的效应,96 h 后有少量逃脱凋亡的细胞重新分裂繁殖,引发残余肿瘤复发的危机,这现象提示反义 hTERT 应该重复或多次给药。另外,采取构建质粒的方法,也能持续产生反义序列,但这种方法用于体内可能会造成生物污染,如病毒的转入等[8]。②端粒酶抑制剂作为一种快速有效的抗肿瘤方法并不能单独使用。多数研究认为端粒酶 hTERT 是肿瘤发生发展的必需前提,但不是唯一条件。与顺铂或反义 c-Myc 基因等联合治疗肿瘤将更彻底杀灭肿瘤细胞。在肿瘤研究领域,可以将反义技术和常规治疗方法相结合,提升治疗肿瘤细胞的综合能力[9]。

本研究的反义寡核苷酸针对 hTERT 基因 3′端非编码区,这一区域为 mRNA 的不稳定部位,对 Tca8113 细胞的 hTERT 和增殖有较强的抑制作用。反义寡核苷酸抑瘤作用存在序列相关性。Kraemer 等[10]设计了针对 5 个不同位点的 23 条反义 hTERT 寡核苷酸作用于膀胱癌 EJ28 细胞,发现 5 条有抑制作用,对 hTERT 的最高抑制率达 88%,细胞增殖抑制率为 67%。本研究结果也显示,该反义片段抑制 Tca8113 细胞增殖作用有序列特异性。正义序列与寡核苷酸的 GC 含量一致,但正义寡核苷酸对 Tca8113 细胞增殖无明显影响。而部分研究认为正义序列能较空白对照促进细胞增殖,引起 hTERT 的过表达,这可能与反义寡核苷酸序列的靶位设计有关。

从形态学观察,贴壁的细胞出现增殖能力减弱的改变,包括变圆、脱落,连接松弛,细胞体积变小和细胞膜完整的发泡现象等。SODN 组、空载体组和空白培养基组却没有类似改变。流式细胞仪结果证实 ASODN 组细胞增殖受抑,发生凋亡的现象。ASODN 组 Tca8113 细胞 S 期细胞比例下降,G_0/G_1 期细胞比例较对照组增加。虽然 ASODN 组没有检测到明显的亚 G_1 峰,但早期凋亡率出现上升。

综上所述,本研究表明,诱导细胞凋亡是靶向 hTERT 反义寡核苷酸引起 Tca8113 细胞增殖抑制的途径之一。随着反义技术的迅速发展,人类基因组计划的完成,将可能出现新的更富杀伤力的基因,这会给反义 RNA 治疗舌癌提供更大的用武之地。

参考文献:

[1] PANG J X, CHENG X Y, XU W, *et al*. Antisense Sp1 oligodeoxynucleotide decreases telomerase activity by inhibiting hTERT mRNA expression in Jurkat T cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24(1): 91-96.

[2] ROBERTSON D M, LI L, FISHER S, *et al*. Characterization of growth and differentiation in a telomerase-immortalized human corneal epithelial cell line[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(2): 470-478.

[3] SHAY J W. Telomerase therapeutics: telomeres recognized as a DNA damage signal. Clin Cancer Res[J], 2003, 9(10 Pt 1): 3521-3525.

[4] WANG E S, WU K, CHIN A C, *et al*. Telomerase inhibition with an oligonucleotide telomerase template antagonist: *in vitro* and *in vivo* studies in multiple myeloma and lymphoma[J]. Blood, 2004, 103(1): 258-266.

[5] LIU L, BERLETCH J B, GREEN J G, *et al*. Telomerase inhibition by retinoids precedes cytodifferentiation of leukemia cells and may contribute to terminal differentiation[J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(8): 1003-1009.

[6] 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.

[7] 田凤军, 王智勇, 马俊义, 等. hTERT 双链 RNA 对肺癌细胞端粒酶的抑制作用[J]. 癌症, 2005, 24(3): 257-261.

[8] PRUZAN R, PONGRACZ K, GIETZEN K, *et al*. Allosteric inhibitors of telomerase: oligonucleotide N3′--> P5′ phosphoramidates[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(2): 559-568.

[9] CHEN Z, KOENEMAN K S, COREY D R. Consequences of telomerase inhibition and combination treatments for the proliferation of cancer cells[J]. Cancer Res, 2003, 63(18): 5917-5925.

[10] 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.

(编辑　薛国文)