文章编号:1000-5404(2008)18-1739-04

论著

抑制 TPP1 表达对端粒保护蛋白 1 在染色体端粒定位及其功能的影响

郭晓兰[1,2],谢传美[2],吴凤霞[2],青玉凤[2],杨明辉[2],唐 中[2],周京国[2],袁国华[2],朱道银[1] ([1]重庆医科大学基础医学院免疫学教研室,重庆 400016;[2]川北医学院附属医院风湿免疫研究所,四川 南充 637000)

摘 要:目的 观察 TPP1 受到抑制后,对端粒保护蛋白 1a(Pot1a)和端粒保护蛋白 1b(Pot1b)在端粒上的定位及其对端粒保护功能产生的影响。**方法** 利用逆转录病毒介导的 RNA 干扰技术抑制小鼠胚胎成纤维样细胞内源性 TPP1 的表达后,采用免疫荧光/端粒肽核酸荧光原位杂交法检测外源性 Pot1a 和 Pot1b 在端粒上的定位,通过端粒末端脱氧尿嘧啶转移酶法检测 TPP1 降低后对染色体末端保护功能的影响,SA-βgal 染色检测细胞衰老,Western blot 检测磷酸化的 P53 水平和 P21 含量。**结果** TPP1 受到抑制后大约 65% 的 MEF 细胞中 Pot1a 和 Pot1b 不能定位在端粒上,显著高于空载体对照组的 5%($t=10.96$, $P<0.01$);TdT-FITC 检测结果显示,大约 50% 的细胞在 TPP1 受到抑制后出现 TdT-FITC 阳性,其中 90% 的 TdT-FITC 阳性信号出现在端粒上,而在空载体对照组 TdT-FITC 阳性细胞为 4.7%($t=14.37$, $P<0.01$),位于端粒上的 TdT-FITC 阳性信号 <3%($t=17.59$, $P<0.01$);β-gal 染色(细胞衰老的特征性标志)结果显示,在 TPP1 受到抑制后 β-gal 阳性细胞率分别达 25.7% 和 22.0%,显著高于对照组细胞的 1.7%($t=18.23$, $P<0.01$;$t=16.9$, $P<0.01$);进一步研究表明,TPP1 受到抑制的细胞导致 $P53^{ser18}$ 磷酸化,P21 表达明显增强。**结论** TPP1 是 Pot1a 和 Pot1b 定位在端粒上必需的,抑制 TPP1 导致染色体末端失去保护功能并诱导 P53 依赖的细胞衰老。

关键词: 端粒;TPP1;Pot1;细胞衰老
中图法分类号: R394.1;R394.3 **文献标识码:** A

TPP1 confers telomere end protection by recruiting Pot1a and Pot1b to telomeres

GUO Xiao-lan[1,2], XIE Chuan-mei[2], WU Feng-xia[2], QING Yu-feng[2], YANG Ming-hui[2], TANG Zhong[2], ZHOU Jing-guo[2], YUAN Guo-hua[2], ZHU Dao-yin[1] ([1]Department of Immunology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, [2]Institute of Rheumatology and Immunology, The Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

Abstract: Objective To characterize the effects of TPP1 knockdown on Pot1a and Pot1b localization at telomeres and on the telomere end protection. **Methods** Knockdown of endogenous TPP1 in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) with the retrovirus vector encoding shRNA targeting TPP1, IF/PNA-FISH was performed to determine the localization of Pot1a and Pot1b at telomeres, and TdT-FITC was applied to characterize the effects on the function of telomere end protection, cellular senescence was analyzed by SA-beta gal staining, and phosphorylated $p53^{ser18}$ and p21 were examined by Western blotting. **Results** Pot1a and Pot1b were unable to localize at telomeres in about 65% of MEFs with TPP1 knockdown, while that was found in less than 5% of MEFs without TPP1 knockdown ($t=10.96$, $P<0.01$). TdT-FITC positive cells were detected in 50% of TPP1 knockdown MEFs, as compared with that of 4.7% in the control MEFs ($t=14.37$, $P<0.01$). Furthermore, 90% of TdT signals appeared to co-localize with telomeres in TPP1 knockdown cells, which was significantly higher than that of 3% in the control MEFs ($t=17.59$, $P<0.01$). The SA-beta gal positive cells, a hallmark of cellular senescence, were found in 25.7% and 22.0% of TPP1 knockdown cells by shTPP1-1 or shTPP1-2, paralleled with marked induction of $p53^{ser18}$ phosphorylation and p21 expression in those cells.

作者简介: 郭晓兰,女,四川省南充市人,博士研究生,副教授,主要从事肿瘤 DNA 损伤修复、风湿免疫等方面的研究,发表论文 20 余篇。电话:(0817)2262325,E-mail:alan5200@hotmail.com
通信作者: 袁国华,电话:(0817)2262323,E-mail: ghuayuan1996@yahoo.com
朱道银,电话:(023)68485813,E-mail:immzhudy@tom.com
收稿日期: 2007-10-31;**修回日期:** 2008-02-22

Whereas, cellular senescence occurred only in 1.7% of the control MEFs ($t=18.23$, $P<0.01$; $t=16.9$, $P<0.01$), and increased $p53^{ser18}$ phosphorylation and p21 expression were not detected. **Conclusion** TPP1 is required for Pot1a and Pot1b localization at telomeres, and knockdown of TPP1 results in telomere end accessible and elicits p53-dependent cellular senescence.

Key words: telomere dysfunction; TPP1; Pot1; cellular senescence

端粒位于真核细胞染色体的末端,由串联重复的DNA和端粒结合蛋白组成,具有独特的帽状结构,以保护染色体末端不被降解或与其他染色体发生融合。端粒功能异常将导致细胞衰老、基因组不稳定、甚至诱发肿瘤[1]。因此,维持完整的端粒结构和长度在细胞的增殖、衰老和肿瘤形成过程中起着关键作用[2]。

哺乳动物细胞通过端粒上特有的蛋白区分正常染色体末端而避免被识别为损伤的DNA而诱发DNA损伤反应(DNA damage response, DDR),染色体融合和基因组不稳定[3]。端粒保护蛋白1(protection of telomere 1, Pot1)就是这种特有的蛋白主分之一,结合在端粒末端悬突(overhang)单链DNA上。Pot1不仅只与端粒单链DNA相连,也通过TPP1等保护蛋白复合物与端粒双链DNA相互作用,共同维护着端粒稳定的结构并调节着端粒的长度[4]。

研究表明,小鼠的Pot1蛋白(包括Pot1a和Pot1b)定位于染色体端粒,并且与TPP1相互作用[5]。但是TPP1是否影响Pot1a和Pot1b的端粒定位及其端粒保护作用却不甚了解。为此,本研究利用逆转录病毒介导的RNA干扰技术,有效地抑制小鼠胚胎成纤维样细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)的内源性TPP1,然后观察TPP1表达受到抑制后,对Pot1a和Pot1b在端粒上的定位及其对保护端粒所产生的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料

转染试剂lipofectamine等购于Invitrogen公司;tubulin、Flag和c-Myc抗体由美国Sigma公司提供;P53和P21购于Santa Cruz;端粒PNA探针购于Molecular probes。

1.2 方法

1.2.1 TPP1 shRNA表达载体的构建 小鼠TPP1的mRNA序列来自GenBank(GI:22823923),参照siRNA靶点设计原则,设计如下shRNA, shTPP1-01(位于TPP1 mRNA序列的487~507)和shTPP1-02(位于TPP1 mRNA序列的731~751)。shTPP1-01序列:正义链 5′-*GATCC*CCAATCAGGATTCAGATGTGCAGTTCAAGAGACTGCACATCTGAATCCTGATTTTTTTA-3′; 反义链 5′-*AGCTT*AAAAAAATCAGGATTCAGATGTGCAGTCTCTTGAACTGCACATCTGAATCCTGATTGGG-3′。shTPP1-02序列:正义链 5′-*GATCC*CCAAGCTGTGTTCACTGTGTCTGTTCAAGAGACAGACACAGTGAACACAGCTTTTTTTA-3′;反义链 5′-*AGCTT*AAAAAAGCTGTGTTCACTGTGTCTGTCTCTTGAACTGCACATCTGAATCCTGATTGGG-3′。其中划线部分为TPP1的mRNA特异核苷酸序列,斜体部分为限制性内切酶位点,GATCC为*Bam*HⅠ黏性末端序列,AGCTT为*Hind*Ⅲ黏性末端序列。将合成的正义链和反义链片断溶解于灭菌水中混合,经95 ℃变性后逐渐冷却至室温(退火反应)。退火后形成的双链DNA经限制性内切酶*Bgl*Ⅱ和*Hind* Ⅲ多克隆位点将其定向克隆至逆转录病毒载体Retro-pSuper(含有嘌呤霉素抗性筛选标记),经*Eco*RⅠ和*Hind*Ⅲ酶切鉴定得到的阳性克隆Retro-pSuper-shTPP1,简称shTPP1。

1.2.2 细胞培养和转染 将质粒shTPP1-01和shTPP1-02分别转染病毒包装细胞293T,转染操作按lipofectamine Plus操作说明进行,主要步骤如下:①接种1×10^5个293T细胞于10 cm细胞培养盘中,37 ℃孵箱5% CO_2培养过夜;② 于一小试管中混合750 μl无血清的DMEM培养基和约4 μg shTPP1质粒DNA,然后加入20 μl转染试剂Plus,轻轻混匀;于另一小试管中混合750 μl无血清的DMEM培养基和30 μl转染试剂Lipofectamine,15 min后将含有质粒DNA的混合物加入到有Lipofectamine的培养基中,轻轻混匀,室温放置15 min;③更换293T细胞的培养基为无血清的DMEM,然后逐滴加入上述含质粒DNA的混合物,37 ℃孵箱5% CO_2培养4~6 h后,更换为完全DMEM培养基,继续培养;④ 24 h后收集293T细胞培养上清感染MEF细胞,48 h后再次收集293T细胞培养上清感染MEF细胞,72 h后加入2 μg/ml的嘌呤霉素进行筛选。以RT-PCR检测shTPP1抑制MEF内源性TPP1 mRNA的表达,TPP1上游引物序列:5′-ATGTCCGATTCAGGGTTGCTGG-3′,下游引物序列:5′-TCATACCTGGGTTAACTCAGACTCTGACTC-3′。PCR反应条件:94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共25个循环。

1.2.3 免疫荧光/端粒肽核酸荧光原位杂交(immunofluorescence plus peptide nucleic acids-flu orescence *In Situ* hybridization, IF/PNA-FISH)检测TPP1对Pot1a/Pot1b端粒定位的影响

首先用含有shTPP1逆转录病毒的293细胞培养上清感染MEF细胞,2 μg/ml嘌呤霉素筛选2周获得稳定表达shTPP1的MEF;然后再用含有Pot1a-Myc或Pot1b-Flag(由于没有抗Pot1a的抗体,以Myc或Flag为尾标与Pot1a-进行融合表达,通过检测Myc或Flag的表达来表明Pot1a或Pot1b的水平)逆转录病毒的细胞培养上清感染72 h,消化细胞后按1×10^4/孔接种于8孔的chamberslide中,参照文献[6]作IF/PNA-FISH。

1.2.4 端粒末端脱氧尿嘧啶转移酶法(telomere terminal deoxy-Uridine tranferase assay, TdT)检测失去保护的端粒 表达shTPP1的MEF按1×10^4/孔接种于8孔的chamberslide中过夜

培养,按下列步骤作 TdT 实验:①固定细胞(含有 2% 多聚甲醛的 PBS)室温 10 min,PBS 洗涤 5 min×3 次;②透膜:含 0.1% Triton X-100 的 PBS 室温条件下作用 10 min,重复 1 次,然后 PBS 洗涤 5 min×3 次;③加入 50 μl/孔 FITC 标记的脱氧尿嘧啶转移酶,载以盖玻片,37 ℃避光孵育 30 min,PBS 洗涤5 min×3 次;④封闭后加入兔抗 FITC 的抗体(1∶500 封闭液稀释),避光室温孵育 1 h,PBS 洗涤 10 min×3 次;⑤加入 FITC 标记的羊抗兔抗体(1∶2 000 封闭液稀释),避光室温孵育 1 h,PBS 洗涤 10 min×3 次;⑥再次固定:含有 4% 多聚甲醛的 PBS 室温作用 10 min;⑦加入杂交探针混合物作 PNA-FISH;⑧DAPI 复染后镜检。

1.2.5　细胞衰老的检测(senescence associated-βgal staining, SA-βgal)　原代培养的 MEF 细胞转染 shTPP1 72 h 后,经嘌呤霉素(2 μg/ml)筛选 2 周,收集 1×10^6 细胞用于裂解细胞蛋白 Western blot 检测磷酸化的 P53 水平和 P21,同时以 5×10^4/孔接种于 6 孔细胞培养板。24 h 后,经含有 2% 甲醛和 0.2% 戊二醛的 PBS 固定 5 min,PBS 洗涤 3 次后加入 SA-βgal 染色液[1 mg/ml X-gal, 40 mmol/L pH 6.0 Citric Acid($C_6H_8O_7$), 5 mmol/L $Fe_2(CN)_6$, 5 mmol/L $Fe_3(CN)_6$, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L $MgCl_2$],37℃孵箱中 8 h 后观察结果。

2　结果

2.1　抑制 TPP1 表达对外源性 Pot1a 和 Pot1b 在 MEF 细胞中表达影响

Western blot 结果显示,外源性 Pot1a 和 Pot1b 在转染shTPP1 的 MEF 细胞中的表达水平与转染空载体质粒的 MEF 中基本一致,均有较高水平的蛋白表达(图 1),说明抑制 TPP1 表达后对外源性 Pot1a 和 Pot1b 在 MEF 细胞中表达的蛋白质没有影响。

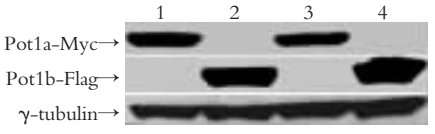


图 1　Pot1a 和 Pot1b 蛋白的表达

2.2　TPP1 对 Pot1a 和 Pot1b 在端粒上定位的影响

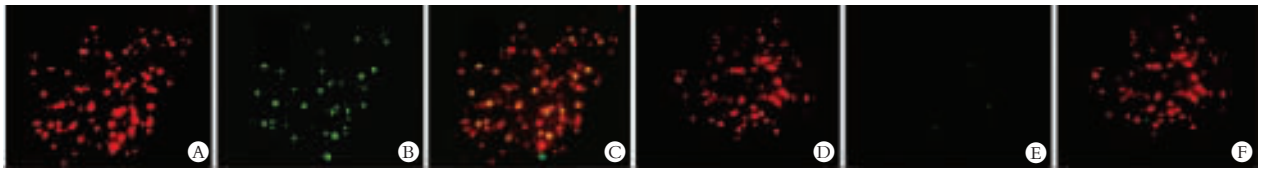
IF/PNA-FISH 结果表明:在空载体转染的 MEF 细胞中,外源性 Pot1a 或 Pot1b 的表达(绿色,见图 2,3)与染色体的端粒肽核酸探针原位杂交信号 TTAGGG-FISH(红色, 见图 2、3 中 A,B)相重合,如图 2、3 中 C 所示的黄色信号;而在 shTPP1 作用后的 MEF 细胞中,极少看到外源性 Pot1a 或 Pot1b 在端粒上的表达,见图 2、3 中 F 所示,染色体上几乎没有端粒红色信号与 Pot1a 或 Pot1b 绿色信号发生重合。定量分析发现,抑制 TPP1 后只有 35% 左右的细胞端粒上可见 Pot1a 和 Pot1b 的表达,其他 65% 的 MEF 细胞中 Pot1a 和 Pot1b 不能定位在端粒上,而在空载体对照组中不到 5% 的细胞不能将 Pot1a 和 Pot1b 定位在端粒上,提示 TPP1 是 Pot1a 和 Pot1b 在端粒上定位所必需。

2.3　TPP1 受到抑制后导致端粒功能异常

TdT-FITC 与 PNA-FISH 相结合的实验结果表明,在 shTPP1 作用后的 MEF 细胞中,TdT-FITC 阳性的信号(绿色,见图 4E)与端粒 PNA-FISH 杂交的信号(红色,见图 4A,D)重合在一起,如图 4F 中的黄色信号,提示端粒末端可能受到酶的降解而失去保护作用;而在空载体转染的对照组细胞中,则几乎没有检测到 TdT-FITC 阳性的信号,见图 4C 中没有黄色信号,表明端粒末端受到保护。定量分析发现,大约 50% 的细胞在 TPP1 受到抑制后出现 TdT-FITC 阳性,而空载体对照组细胞中仅有 5%;而且在 TPP1 受到抑制后的 MEF 中,大约 90% TdT-FITC 阳性信号出现在端粒上,<3% 的对照组细胞端粒上见到 TdT-FITC 阳性。

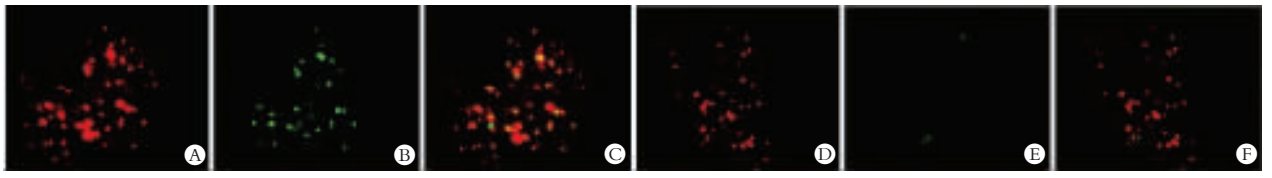
2.4　抑制 TPP1 表达诱导 p53 依赖的细胞衰老

shTPP1 作用于原代培养的 MEFs 后,细胞生长明显减缓,增殖受到抑制的细胞表现为类似细胞衰老的形态学改变,体积变大,形态扁平。β-gal 染色结果见图 5,显示 shTPP1 作用后,大约 30% 的 MEFs 呈现蓝色(β-gal 阳性反应),此即为细胞衰老的特征性标志[7],阳性细胞的数量是对照组细胞的 10 倍左右(图 5)。同时,Western blot 分析发现,TPP1 受到抑制的细胞导致 $P53^{ser18}$ 磷酸化,P21 表达明显增强(图 6)。



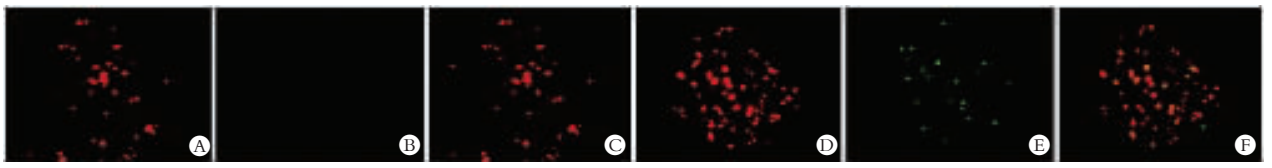
A、B、C: 转染空载体质粒的 MEF 细胞组; D、E、F:转染 shTPP1 的 MEF 细胞组;A、D:以 TTAGGG 探针原位杂交检测的端粒信号;B、E:以免疫荧光法检测 Pot1a 的表达;C、F:端粒杂交信号与 Pot1a 荧光信号的重合

图 2　Pot1a 在 MEF 中的表达及定位　(×200)



A、B、C: 转染空载体质粒的 MEF 细胞组;D、E、F:转染 shTPP1 的 MEF 细胞组;A、D:以 TTAGGG 探针原位杂交检测的端粒信号;B、E:以免疫荧光法检测 Pot1b 的表达;C、F:端粒杂交信号与 Pot1b 荧光信号的重合

图 3　Pot1b 在 MEF 中的表达及定位　(×200)



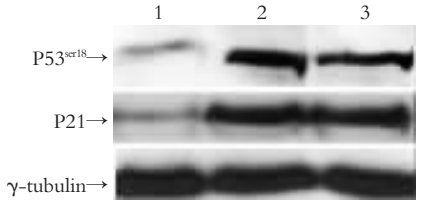
A、B、C：转染空载体质粒的 MEF 细胞组；D、E、F：转染 shTPP1 的 MEF 细胞组；A、D：以 TTAGGG 探针原位杂交检测的端粒信号；B、E：以免疫荧光法检测 TdT 的表达；C、F：端粒杂交信号与 TdT 荧光信号的重合

图 4　TdT-FITC 检测 shTPP1 对 MEF 染色体保护作用的影响



A：空载体；B：sh-TPP1-1；C：sh-TPP1-2

图 5　抑制 TPP1 表达后细胞 β-gal 染色为阳性（蓝色）



1：空载体；2：sh-TPP1-1；3：sh-TPP1-2

图 6　P53^{ser18} 和 P21 的表达水平

3　讨论

在我们以往的研究中，已经成功地利用逆转录病毒介导的 RNA 干扰技术，将 TPP1 的 shRNA 构建于表达逆转录病毒的载体 Retro-pSuper 中，得到靶向 TPP1 的 shRNA（即 shTPP1）能有效抑制 MEF 细胞内源性 TPP1 在转录水平的表达，并诱发 ATM 依赖的 DDR。我们推测其原因可能是，TPP1 受到抑制后影响了 Pot1 的功能，从而导致端粒功能异常诱发 DDR。为了证实这种假设，本实验采用在 shTPP1 作用的 MEF 中表达外源性 Pot1a 和 Pot1b，观察抑制 TPP1 表达后对 Pot1a 和 Pot1b 定位以及功能的影响。PNA-FISH/IF 实验结果发现，由于 TPP1 的降低导致 Pot1a 和 Pot1b 不能定位在端粒上，尽管 Western 证实 Pot1a 和 Pot1b 在 TPP1 降低的细胞中均有较高水平的蛋白表达。因此表明，TPP1 对于 Pot1a 和 Pot1b 的端粒定位是必不可少的。

本研究表明，在小鼠体内缺失 Pot1a/Pot1b 基因引起端粒失去保护而不稳定，导致染色体末端同源或异源环化，细胞发生衰老。我们发现抑制 TPP1 后影响了 Pot1 在端粒上的定位，这是否可以引起端粒失去保护，进而导致染色体被酶降解？研究表明，端粒发生 DDR 后，失去 Pot1 将会导致染色体被酶降解而失去保护。这种失去保护功能的端粒可以通过端粒末端脱氧尿嘧啶转移酶法（TdT-FITC）得以检测[8]。在本实验中，TdT-FITC 与 PNA-FISH 相结合的结果显示，大约 50% 的细胞在 TPP1 受到抑制后出现 TdT-FITC 阳性，而 90% 的 TdT-FITC 阳性信号出现端粒，因此提示 TPP1 表达受到抑制后导致端粒失去保护，引起染色体末端被酶降解。进一步分析显示，TPP1 降低后，激活了细胞 P53^{ser18} 发生磷酸化，同时 CDK 的抑制物 P21 表达水平也明显增强，从而诱导了细胞衰老。由此提示，抑制 TPP1 以后，Pot1a 和 Pot1b 不能与端粒结合，导致端粒失去保护，激活 P53-P21 介导的细胞信号通路，从而致使细胞生长受到限制，出现细胞衰老的形态学改变和标志性特征。端粒功能异常诱导 P53 依赖的细胞衰老可能在抑制肿瘤过程中发挥着重要的作用，但仍需进一步研究证实。

参考文献：

[1] Verdun R E, Karlseder J. Replication and protection of telomeres[J]. Nature, 2007, 447(7147): 924 – 931

[2] Deng Y, Chang S. Role of telomeres and telomerase in genomic instability, senescence and cancer[J]. Lab Invest, 2007, 87(11): 1071 – 1076.

[3] d'Adda-di-Fagagna F, Teo S H, Jackson S P. Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response[J]. Genes Dev, 2004, 18(15): 1781 – 1799.

[4] de-Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres[J]. Genes Dev, 2005, 19(18): 2100 – 2110.

[5] Liu D, Safari A, O'Connor M S, *et al*. PTOP interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres[J]. Nat Cell Biol, 2004, 6(7): 673 – 680.

[6] Takai H, Smogorzewska A, de-Lange T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres[J]. Curr Biol, 2003, 13(17): 1549 – 1556.

[7] Dimri G P, Lee X, Basile G, *et al*. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(20): 9363 – 9367.

[8] Verdun R E, Crabbe L, Haggblom C, *et al*. Functional human telomeres are recognized as DNA damage in G2 of the cell cycle[J]. Mol Cell, 2005, 20(4): 551 – 561.

（编辑　栗　嘉）