论著

文章编号:1000-5404(2010)01-0074-03

胃癌细胞 POT1 mRNA 表达、端粒酶活性与胃癌发生的关系

王 雷,房殿春 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军消化病研究所)

[摘 要] 目的 研究人胃癌细胞 POT1 mRNA 表达、端粒酶活性与胃癌发生的关系。**方法** 采用实时定量荧光 PCR 分析不同胃黏膜细胞 POT1 mRNA 的表达,采用 TRAP-ELISA 半定量分析不同细胞端粒酶活性。**结果** 与癌旁正常黏膜相比,晚期胃癌癌组织 POT1 mRNA 增高,中重度不典型增生胃黏膜与其正常胃黏膜比较其 POT1 mRNA 表达也明显增高,肠上皮化生胃黏膜及其正常胃黏膜 POT1 mRNA 表达无明显差异。晚期胃癌及中重度不典型增生胃黏膜上皮中端粒酶活性明显高于肠上皮化生组织和正常胃黏膜上皮,但是胃癌和中重度不典型增生及肠上皮化生组织和正常胃黏膜间端粒酶活性无明显变化。**结论** 尽管胃癌细胞和中重度不典型增生端粒酶活性高于正常和肠上皮化生胃黏膜细胞,但是 POT1 mRNA 的表达与之无关。

[关键词] POT1 mRNA;端粒酶活性;胃癌

[中图法分类号] R735.2; R345.5; R394.2 **[文献标志码]** A

Relationship of POT1 mRNA expression and telomerase activity with incidence of gastric carcinoma

Wang Lei, Fang Dianchun (Gastroenterology Research Institute, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[Abstract] Objective To study of relationship of the mRNA expression of protection of telomeres 1 (POT1) and the activity of telomerase with the incidence of gastric carcinoma. Methods Lesioned gastric mucosal tissues and the corresponding normal tissues from 30 cases of gastric cancer, 30 cases of moderate or severe atypical hyperplasia, and 30 cases of intestinal metaplasia were collected in this study. The expression of POT1 mRNA was detected with real time-PCR and the activity of telomerase was examed with TRAP-ELISA. Results Real time-PCR analysis showed that POT1 expression was increased in the gastric carcinoma tissues compared with the paracancerous normal mucosal tissues, increased in the severe atypical hyperplasia than in the corresponding normal tissues, but there was no difference between intestinal metaplasia tissues and normal tissues. The activity of telomerase in the advanced gastric tumors and severe atypical hyperplasia was significantly higher than that in intestinal metaplasia tissues and normal gastric mucosal tissues. However no obvious difference was found in the activity in gastric tumors and severe atypical hyperplasia with intestinal metaplasia tissues and normal gastric mucosal tissues. Conclusion Although the activity of telomerase in gastric cancer and severe atypical hyperplasia is significantly higher than that in normal and intestinal metaplasia tissues, POT1 mRNA has no relationship with this change.

[Key words] protection of telomeres 1; telomerase, activity; gastric carcinoma

Corresponding author: Fang Dianchun, Tel: 86-23-68754664, E-mail: fangdianchun@hotmail.com.cn

POT1(protection of telomeres 1)是目前所知端粒末端结合蛋白(telomeric end-binding protein,TEBP)的同源类似物[1]。在不同真核细胞染色体末端 POT1 蛋白与 D 环单链 DNA 突出部分结合。POT1 对于染色体的末端保护是必不可少的,对真核细胞端粒长度的调节也有着重要作用[1-3]。本研究旨在探讨不同胃癌细胞 POT1 mRNA 表达、端粒酶活性与胃癌发生的关系。

1 材料与方法

1.1 标本收集及准备

收集本校西南医院消化病研究所内镜中心(2005 年 8 月至 2006 年 5 月)及新桥医院消化科内镜中心(2006 年 6 - 10 月)

[通信作者] 房殿春,电话:(023)68754664,E-mail: fangdianchun@hotmail.com.cn

30例胃癌患者癌组织及其正常胃黏膜样本,30例中重度不典型增生胃黏膜及其正常胃黏膜样本,30例肠上皮化生胃黏膜及其正常胃黏膜样本。

将胃癌组织及相应非瘤生长的胃黏膜进行内镜下活检或切除,样本立即冷冻在液氮或-80 ℃直到应用。同时留取部分进行HE染色,显微镜下确认样本主要的癌组织部分,并且非癌黏膜无癌细胞浸润或显著炎性反应。按照Lauren分级系统进行组织分级和肿瘤分期[3]。

1.2 试剂和设备

Oligo(dt)15 primer, M-MLV Reverse Transcriptase Rnase(Promega公司),Tripure(Roche公司),PBS-T连接试剂盒(TIANGEN公司,VT201-01,20 μl),TaKaRa *Ex* 酶(TaKaRa公司);SYBR Green Ⅰ(Roche公司)质粒提取试剂盒,荧光定量PCR试剂盒(TaKaRa公司)。

RNAsafe(RNase Inhibitor, TIANGEN, DP409, 1 ml);DEPC处理过的水;新的氯仿、异丙醇;75%乙醇;DEPC处理过的大、中、小Tip及1.5 ml EP管;200 μl进口PCR管。

1.3 POT1 mRNA表达检测

采用实时定量荧光PCR法。模板及引物设计:总RNA用RNeasy Mini Kit抽提(按说明书),以RNA为模板用第1条链合成试剂盒转录合成cDNA(amershan pharmacia biotech, Uppsala, Sweden)(按说明书)。反应体系:RNA 5 μl、RT反应液18 μl、M-MLV逆转录酶1 μl、Rnasin 1 μl,总体系45 μl,反应条件:RNA 70 ℃预变性5 min,迅速置于冰浴以防RNA复性。37 ℃水浴反应30 min。PCR用SYBR绿色PCR核心试剂盒(applied biosystems, foster city, CA)完成。POT1上游:5′-TCAGTCTGTTAAACTTCATTGCCC-3′,下游:5′-TGCACCATCCTGAAAAATTATATCC-3′,产物长度1 960 bp;β-actin上游:5′-TCACCGAGCGCGGCT-3′,下游:5′-TAATGTCACGCACGATTTCCC-3′,产物长度312 bp。反应体系:PCR反应液21.5 μl、*Taq*酶1 μl、RT反应产物2.5 μl,总体系50 μl;反应条件:预变性95 ℃ 5 min,进行循环95 ℃ 30 s;62 ℃ 20 s;72 ℃ 20 s,共40个循环,延伸72 ℃ 10 min,4 ℃保存。其中荧光定量PCR每次实验设立4个标准品,拷贝数为4×10^5、4×10^7、4×10^6、4×10^5(由标准品10^9 copy/ml梯度稀释而成),并设立阴性、阳性对照。结合与双链DNA的SYBR的发射强度用ABI PRISM7500序列监测系统进行实时监测。POT1 cDNA和内部对照cDNA(β-actin基因)用PCR单独扩增。每个样本引物进行定量PCR 3次,3次实验的均值用作相对定量值。

1.4 端粒酶活性表达测定

每个标本测定时取相当于0.5 μg蛋白质的提取液,加入到含有反应混合液的PCR管中,加入灭菌水至总体积为50 μl,25 ℃孵育10 min。然后按94 ℃ 5 min(94 ℃ 30 s,50 ℃ 30 s,72 ℃ 90 s)×30个循环,72 ℃延伸10 min进行PCR反应。取5 μl PCR产物加入到20 μl变性液中,室温下反应10 min后,再向其中加入225 μl的杂交缓冲液,将100 μl杂交反应液转移到MTP反应板中,于37 ℃ 300 r/min振荡孵育2 h后弃去反应液,用250 μl缓冲液冲洗MTP反应板孔3次;再将100 μl Anti2DIG2 POD工作液加入到MTP反应板中,于室温下300 r/min振荡孵育30 min后弃去反应液,然后用250 μl的冲洗缓冲液冲洗MTP反应板孔5次;向MTP反应板中再加入100 μl TMB反应底物,于室温下300 r/min 20 min后,直接加入100 μl反应终止液振荡孵育10 min;使用双波长酶标测定仪测出每个板孔的光密度值$D(450)$和$D(690)$。

1.5 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 不同胃黏膜POT1 mRNA的表达

实时定量荧光PCR衡量POT1 mRNA表达的指标为扩增后其RNA拷贝数。按照标准曲线求得不同组织POT1 mRNA的表达。hPOT1标准曲线斜率=-0.338 1,截距=46.68,标准方程为$y=-0.338\ 1x+46.68$。胃癌癌组织、中重度不典型增生胃黏膜与其正常胃黏膜比较,其POT1 mRNA表达均明显增高($P<0.01$),肠上皮化生胃黏膜与其正常胃黏膜POT1 mRNA表达无明显差异($P>0.05$)。中重度不典型增生、胃癌组织与肠上皮化生组织比较,POT1 mRNA表达明显增加($P<0.01$),但是二者之间无明显差异($P>0.05$)。见表1。

表1 不同黏膜组织POT1 mRNA的表达($\bar{x}\pm s$)

黏膜来源	POT1 mRNA(copy/ml)
胃癌	
正常黏膜	124.73±23.08
癌组织	511.06±84.42[ab]
中重度不典型增生	
正常黏膜	111.81±56.25
病变黏膜	520.82±290.74[ab]
肠上皮化生组织	
正常黏膜	105.13±35.27
病变黏膜	124.77±44.69

a: $P<0.01$,与对应正常黏膜比较; b: $P<0.01$,与肠上皮化生组织病变黏膜比较

2.2 不同组织端粒酶活性的变化

胃癌(0.78±0.19)及中重度不典型增生(0.74±0.21)胃黏膜上皮中端粒酶活性明显高于肠上皮化生组织(0.12±0.07)和正常胃黏膜上皮(0.13±0.08)($P<0.05$),但是胃癌和中重度不典型增生及肠上皮化生组织和正常胃黏膜间端粒酶活性无明显变化。

3 讨论

大量研究表明,POT1是一种端粒酶依赖的端粒长度的阳性调节因子,其功能需要联合TRF1和TRF2[1-4]。因此POT1与端粒复合物中其他组分的作用机制也是近年来研究的热点问题[5]。研究表明POT1丢失可以导致染色体DNA不稳定和细胞凋亡,且大多研究表明POT1必须在端粒酶阳性的细胞内才能发挥作用[6-8]。但在胃癌和癌前病变中POT1的表

达以及与端粒酶的关系研究较少。

本研究中在胃癌细胞中 POT1 mRNA 的表达低于正常上皮细胞,而中重度不典型增生中 POT1 mRNA 表达明显高于正常和肠上皮化生组织,表明 POT1 对于端粒酶阳性细胞癌变发生的不同阶段可能有着不同的作用。在细胞癌变过程中 POT1 可能起到正向调节作用,但是一旦细胞癌变 POT1 的作用会被减弱或者存在其他机制使其降低。因此,尽管 POT1 对于胃癌发生可能有重要作用,但是一旦癌变发生 POT1 对病变进一步加重可能不能起关键作用。此外,本研究中不同组织中 POT1 mRNA 表达与端粒酶的活性无关,这与文献报道 POT1 对端粒的调节作用必须依赖端粒酶不完全一致[9]。由于本研究中所有胃癌标本中端粒酶都为阳性,所以对于端粒酶阴性的胃癌 POT1 的表达及功能有待进一步研究。POT1 在胃癌中表达研究较少,日本学者研究发现在早期胃癌和中晚期胃癌中 POT1 的表达表现为反向趋势,即早期胃癌中 POT1 表达增高,但是到中晚期胃癌 POT1 的表达减少[10]。

本研究中在癌前状态中重度不典型增生时,POT1 的表达明显高于正常和胃癌细胞,而中晚期胃癌 POT1 较正常和肠上皮化生组织减低,此于前述日本学者研究一致[11]。尽管由于我们早期胃癌的诊断率尚不是很高,因此我们未进一步研究 POT1 在早期胃癌中的表现,但是从中重度不典型增生到晚期胃癌 POT1 表达的变化结果,表明 POT1 对于从正常黏膜上皮进展为胃癌,可能起促进作用;但是对于胃癌的进一步进展可能不起作用或者有一定抑制作用。既往的研究表明,和正常胃黏膜上皮相比较,胃癌端粒长度明显缩短[12-14]。本研究中 POT1 在胃癌组织中表达明显低于正常胃黏膜和肠上皮化生组织细胞,如果 POT1 是端粒酶依赖的端粒长度阳性调节因子那么在端粒缩短时 POT1 应该表达增加,这与我们研究的结果不符合。POT1 这种表达现象机制不明,可能于其双向调节的作用有关其具体机制仍然需要进一步研究[15]。也可能在胃癌发生初期 POT1 高表达起到一定的端粒末端保护作用,防止基因重排或者染色体错接;但是一旦细胞癌变,由于端粒缩短结合于端粒的 POT1 及其他复合物成分也随之减少。

端粒长度的调节是依赖多种分子共同作用的复杂系统完成的[12-17],尽管已经进行了大量研究但是目前为止还有众多问题不能解释,总之 POT1 作为端粒末端一种重要的保护蛋白其对染色体稳定性有着重要作用,但是其参与端粒调节的具体机制仍然有待进一步研究。

参考文献:

[1] Colgin L, Reddel R. Telomere biology: a new player in the end zone [J]. Curr Biol, 2004, 14(20): R901-R902.

[2] Ye J Z, Donigian J R, van-Overbeek M, *et al*. TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres [J]. J Biol Chem, 2004, 279(45): 47264-47271.

[3] Cooley C, Baird K M, Faure V, *et al*. Trf1 is not required for proliferation or functional telomere maintenance in chicken DT40 cells[J]. Mol Biol Cell, 2009, 20(10): 2563-2571.

[4] Salhab M, Jiang W G, Newbold R F, *et al*. The expression of gene transcripts of telomere-associated genes in human breast cancer: correlation with clinico-pathological parameters and clinical outcome[J]. Breast Cancer Res Treat, 2008, 109(1): 35-46.

[5] Tang T, Zhou F X, Lei H, *et al*. Increased expression of telomere-related proteins correlates with resistance to radiation in human laryngeal cancer cell lines[J]. Oncol Rep, 2009, 21(6): 1505-1509.

[6] Zaug A J, Podell E R, Cech T R. Human POT1 disrupts telomeric G-quadruplexes allowing telomerase extension *in vitro*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(31): 10864-10869.

[7] Surovtseva Y V, Shakirov E V, Vespa L, *et al*. Arabidopsis POT1 associates with the telomerase RNP and is required for telomere maintenance[J]. EMBO J, 2007, 26(15): 3653-3661.

[8] Wang F, Podell E R, Zaug A J, *et al*. The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor[J]. Nature, 2007, 445(7127): 506-510.

[9] Yang Q, Zheng Y L, Harris C C. POT1 and TRF2 cooperate to maintain telomeric integrity[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(3): 1070-1080.

[10] Kondo T, Oue N, Yoshida K, *et al*. Expression of POT1 is associated with tumor stage and telomere length in gastric carcinoma[J]. Cancer Res, 2004, 64(2): 523-529.

[11] Smogorzewska A, de Lange T. Regulation of telomerase by telomeric proteins[J]. Annu Rev Biochem, 2004, 73:177-208.

[12] Avilion A A, Piatyszek M A, Gupta J, *et al*. Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues[J]. Cancer Res, 1996, 56(3): 645-650.

[13] Baumann P, Cech T R. Pot1, the Putative Telomere End-Binding Protein in Fission Yeast and Humans[J]. Science, 2001, 292(5519): 1171-1175.

[14] Zaug A J, Podell E R, Cech T R. Human POT1 disrupts telomeric G-quadruplexes allowing telomerase extension *in vitro*[J]. PNAS, 2005, 102(31): 10864-10869.

[15] O'Sullivan J N, Bronner M P, Brentnall T A, *et al*. Chromosomal instability in ulcerative colitis is related to telomere shortening[J]. Nat Genet, 2002, 32(2): 280-284.

[16] Lin X, Gu J, Lu C, *et al*. Expression of telomere-associated genes as prognostic markers for overall survival in patients with non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res. 2006, 12(19): 5720-5725.

[17] 巩艳, 房殿春, 罗元辉. 胃癌细胞中端粒位置效应研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(8): 694-696.

(**收稿**:2009-06-05;**修回**:2009-10-08)

(编辑 汪勤俭)