文章编号:1000-5404(2014)08-0789-04

论著

人端粒酶逆转录酶上调 Cdx2 表达促进胃黏膜肠化生

陈柏君*,周 源*,肖煜峰,胡长江,谢 睿,何 兵,汪苏敏,吴玉云,凌贤龙,杨仕明 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院消化内科)

[摘要] **目的** 探讨人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase,hTERT)在胃黏膜肠化生的作用及其可能存在的分子机制。**方法** hTERT 真核表达质粒构建成功后,用脂质体转染法转染人胃癌 MKN45 细胞。应用 qPCR 技术从 RNA 水平检测转染前后相关肠化生基因(Cdx1、Cdx2 和 Cdx4)的改变;进一步采用 Western blot 技术从蛋白水平证实其表达变化;继而构建 Cdx2 基因启动子,采用双荧光素酶实验分析 hTERT 与 Cdx2 的作用机制;采用 Co-IP 证实 hTERT 与 p65 结合情况;加入 NF-κB 抑制剂后,双荧光素酶实验和 Western blot 检测 Cdx2 表达变化情况。**结果** 转染 MKN45 细胞 hTERT 基因后,qPCR 证实肠化生相关基因 Cdx1、Cdx2 mRNA 表达明显上调,而 Cdx4 mRNA 则无明显变化;Western blot 证实过表达 hTERT 后只有 Cdx2 的蛋白表达上调;双萤光素酶报告实验证实与对照组相比,hTERT 组 Cdx2 的启动子活性明显增加($P<0.05$);免疫共沉淀(CO-IP)实验证实 hTERT 与 NF-κB 亚基 p65 存在蛋白-蛋白相互作用;另外双荧光素酶实验和 Western blot 表明 NF-κB 抑制剂(Bay78-1102)能有效抑制 hTERT 对 Cdx2 的启动子的活性,并下调 Cdx2 蛋白的表达。**结论** hTERT 可以通过活化 NF-κB 信号通路促进 Cdx2 的表达,从而促进胃黏膜的肠化生的发生。

[关键词] 人端粒酶逆转录酶;肠上皮化生;胃黏膜;胃黏膜癌前病变
[中图法分类号] R394.3;R730.23;R735.2 [文献标志码] A

Human telomerase reverse transcriptase up-regulates Cdx2 and promotes intestinal metaplasia of gastric mucosa

Chen Baijun*, Zhou Yuan*, Xiao Yufeng, Hu Changjiang, Xie Rui, He Bing, Wang Sumin, Wu Yuyun, Ling Xianlong, Yang Shiming (Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in intestinal metaplasia of gastric mucosa and the relevant molecular mechanism. **Methods** After the hTERT eukaryotic expression plasmids were successfully constructed, hTERT was transferred into human gastric cancer cell line MKN45 by lipofectamine 2000. Quantitative PCR and Western blotting were applied to examine the expression of the intestinal metaplasia genes, Cdx1, Cdx2 and Cdx4. Dual luciferase reporter assay was used to test the activity of the Cdx2 promoter. Furthermore, co-immunoprecipitation was employed to demonstrate the interaction between hTERT and p65. At last, NF-κB inhibitor was used to test the alleviation of the hTERT-induced Cdx2 promoter and protein expression. **Results** Quantitative PCR results showed that the expression of intestinal metaplasia genes Cdx1 and Cdx2 was up-regulated by hTERT, while Cdx4 gene had no obvious change. Western blot results verified that only Cdx2 protein level was increased. Dual luciferase reporter assay results demonstrated that hTERT promoted the activity of Cdx2 promoter. Moreover, co-immunoprecipitation results confirmed that hTERT protein could interact with p65 protein. Additionally, dual luciferase reporter assay and Western blot results revealed that NF-κB pathway inhibitor Bay78-1102 attenuated the activity of

* 同等贡献者

[基金项目] 重庆市自然科学基金重点项目(2013C290);第三军医大学基础医学前沿领域(2012D287)
[通信作者] 凌贤龙,E-mail: lingxlong@yahoo.com.cn
杨仕明,E-mail: shimingyang@yahoo.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140327.1737.008.html(2014-03-27)

hTERT on Cdx2 promoter and down-regulated Cdx2 expression separately. **Conclusion** hTERT promotes the intestinal metaplasia of gastric mucosa *via* Cdx2 expression upregulation mediated by NF-κB pathway.

[**Key words**] human telomerase reverse transcriptase; intestinal metaplasia; gastric mucosa; precancerous lesion of gastric mucosa; molecular mechanism

Supported by the Key Program of Natural Science Foundation of Chongqing(2013C290) and the Frontier Research Project of Basic Medicine of Third Military Medical University(2012D287). Chen Baijun and Zhou Yuan are the first authors who contributed equally to the article. Co-corresponding authors: Ling Xianlong, E-mail: lingxlong@yahoo.com.cn; Yang Shiming E-mail:shimingyang@yahoo.com

胃黏膜癌变是一个渐进的过程,往往要经历从肠上皮化生→异型增生→早期胃癌→进展期胃癌。如果能在癌前阶段进行早期有效干预,或可阻断胃黏膜癌变的发生。胃黏膜肠上皮化生(intestinal metaplasia, IM)作为胃黏膜癌前期病变的一种,越来越受到重视[1]。

端粒酶(telomerase)是一种核糖核酸酶,具有逆转录酶活性,是细胞永生化和无限增殖的重要条件。人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase,hTERT)作为端粒酶的主要限速成分,其表达的强度与端粒酶活性一致。因此,hTERT 的表达可以作为衡量端粒酶活性的指标[2]。研究表明,在胃黏膜癌变过程中,随着胃黏膜癌变程度的加重,端粒酶及其 hTERT 单位的表达明显增强[3-4];在肠化上皮中,亦发现随着肠化程度的增加,端粒酶及其 hTERT 的表达亦逐渐增强[5],提示 hTERT 的表达可能参与了肠上皮化生的过程,但其确切机制不明。基于以上分析,本研究构建 hTERT 真核过表达质粒到 MKN45 细胞,检测相应肠化生基因的表达变化,系统地研究了 hTERT 在肠化生中可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人胃腺癌细胞 MKN45 均为本实验室保存。Trizol、逆转录试剂盒及实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)试剂盒(TaKaRa 公司,日本),Cdx2 引物(上海生工),双荧光素酶试剂盒(Promega 公司,美国),DMEM 高糖培养基与胎牛血清(HyClone 公司,美国),免疫共沉淀 Co-IP 试剂盒(Active motif 公司,美国),核蛋白提取试剂盒(碧云天,中国江苏)

1.2 细胞培养

人胃腺癌 MKN45 细胞,10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液,于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养,2~3 d 传代。NF-κB 抑制剂 Bay11-7082(Sigma, 美国)使用浓度为 3 μmol/mL。

1.3 qRT-PCR 检测

用 Trizol 提取细胞总 RNA,以其为模板,逆转录 cDNA,条件是 37 ℃ 15 min, 85 ℃ 5 s, 按照 qRT-PCR 试剂盒(DRR037A) SYBR Green 法步骤进行 PCR 扩增,qRT-PCR 扩增程序:95 ℃ 预变性 3 min,95 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 退火 45 s,以 GAPDH 作为内参,扩增 40 个循环周期,每个标本 3 个复孔。

1.4 Western blot 检测

用蛋白裂解液提取细胞总蛋白,RCDC 法检测蛋白浓度,经 5% 的浓缩胶和 10% 的分离胶 SDS-PAGE 电泳,每孔上样量为 40 g 总蛋白。浓缩胶 60 V 电泳 1 h,分离胶 100 V 电泳 2 h,常规湿法转膜 120 min,5% 的 BCA 封闭 1 h,免疫抗体反应(稀释比例,一抗 hTERT 1∶1 000,Cdx2 1∶1 000,GAPDH 1∶500;二抗:山羊抗鼠 1∶5 000,山羊抗兔 1∶10 000)。ECL 化学发光,凝胶成像系统显影。

1.5 双荧光素酶实验

委托泉涌公司构建 pGl3-cdx2 启动子,双酶切电泳鉴定。MKN45 细胞消化传代后,按照 8×10^4 个/孔密度铺于 24 孔板中,24 h 培养后,将萤火虫荧光素告质粒 pGl3-cdx2 Report 及海肾荧光素报告质粒 pRL-TK 转染 MKN45 细胞,同时转染对照 pIERS2-EGFP 以及 pIERS2-hTERT 质粒,每孔转染 Lip2000 1.2 μL:总质粒 0.8 μg,24 h 后检测双荧光素酶活性。

1.6 免疫共沉淀(Co-IP)实验

在 MKN45 细胞中,提取核蛋白后,用 hTERT 或者 p65 抗体特异性结合,洗涤未结合蛋白后继续实验。抗体使用浓度:hTERT 1∶50,p65 1∶100,其余步骤同 Western blot 实验。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件分析数据,计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验或非参数秩和检验,两配对样本之间采用配对 t 检验。

2 结果

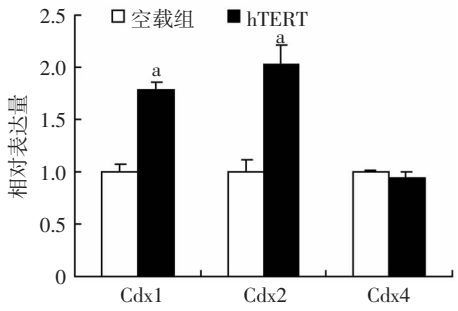
2.1 过表达 hTERT 后肠化相关基因 RNA 表达水平变化

MKN45 细胞转染 hTERT 质粒后,在 RNA 水平,与对照组相比,Cdx 家族中 Cdx1 以及 Cdx2 表达明显上调($P<0.001$),Cdx4 变化不明显($P>0.005$)(图 1)。为了进一步验证蛋白水平变化,接下来进行 Western blot 实验。

2.2 过表达 hTERT 后 Cdx1 和 Cdx2 蛋白表达水平变化

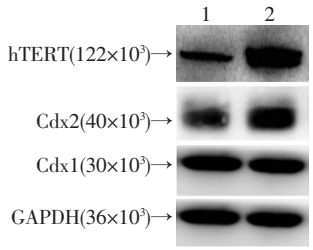
MKN45 细胞转染 hTERT 质粒后,蛋白水平仅有 Cdx2 表达上调,Cdx1 未出现明显变化。证实 hTERT 确实促进 Cdx2 蛋白水平的表达,参与了肠化生的发生、发展(图 2)。那么 hTERT

是通过什么调控了 Cdx2 呢？为此我们进一步构建了 Cdx2 基因启动子，进行进一步实验。



a：$P<0.05$，与空载组比较

图 1 qRT-PCR 检测 MKN45 细胞转染 hTERT 前后 Cdx1、Cdx2 和 Cdx4 的表达变化

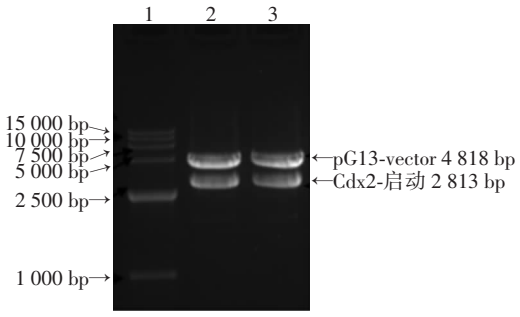


1：对照组；2：hTERT 转染后

图 2 Western blot 检测 MKN45 细胞转染 hTERT 后 Cdx1 和 Cdx2 的表达

2.3 过表达 hTERT 后 Cdx2 启动子活性明显加强

双酶切鉴定 pGl3-Cdx2 Report 质粒，酶切正确，进一步测序鉴定，证实 Cdx2 启动子构建成功（图 3）。在 MKN45 细胞，转染 hTERT 后，Cdx2 启动子双荧光素酶活性（1.70 ± 0.13）明显比对照组（1.00 ± 0.02）上调（$P<0.05$）。提示 hTERT 可增强 Cdx2 启动子活性。

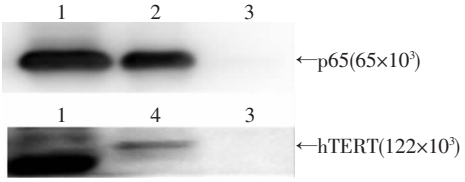


1：标准；2、3：pGL3- Cdx2 载体经 *Kpn* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切

图 3 人端粒酶逆转录酶对 Cdx2 基因启动子活性的影响

2.4 Co-IP 检测 hTERT 与 P65 相互作用

Co-IP 实验证实 hTERT 与 NF-κB 亚基 p65 结合，并加强其对下游基因的转录调控作用（图 4），该结果说明 hTERT 可能是通过 NF-κB 参与肠化生过程。



1：input；2：hTERT；3：IgG；4：p65

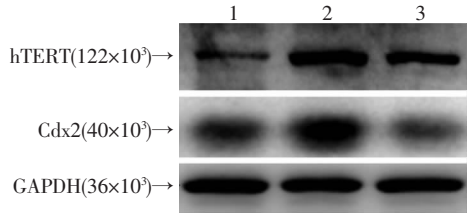
图 4 Co-IP 实验检测 hTERT 与 p65 相互作用

2.5 NF-κB 抑制剂可以明显抑制 hTERT 对 Cdx2 启动子活性的增强作用

在 MKN45 细胞中，过表达 hTERT 后，与对照组（1.00 ± 0.14）比较，Cdx2 启动子活性（1.88 ± 0.14）增加（$P<0.05$），但过表达 hTERT 同时加入 NF-κB 抑制剂 Bay11-7082 后（0.69 ± 0.07），有效抑制 hTERT 对 Cdx2 启动子上调作用（$P<0.05$）。

2.6 NF-κB 抑制剂可明显抑制 hTERT 对 Cdx2 蛋白的上调作用

在 MKN45 细胞中，过表达 hTERT 后，Cdx2 蛋白表达水平增加（图 5），但加入 NF-κB 抑制剂 Bay11-7082 后，能有效抑制 hTERT 对 Cdx2 蛋白的上调作用（图 5）。



1：转染空载组；2：转染 hTERT 组；3：转染 hTERT 同时加 NF-κB 抑制剂（Bay11-7082）组

图 5 阻断 NF-κB 在 hTERT 对 Cdx2 蛋白上调作用的影响

3 讨论

正常胃黏膜以柱状上皮为主，一旦出现杯状细胞，即发生了肠上皮化生[6]。既往的研究发现，肠化生的细胞来自胃黏膜基底层的干细胞[7]。而胃黏膜干细胞位于胃腺体峡部，通过向祖细胞分化，进一步分化形成胃的各种腺体细胞，在维持胃黏膜更新及保持组织内环境稳定方面起着重要作用。那么随着肠化生程度加重，hTERT 表达上调，提示 hTERT 有可能促进肠上皮化生，但其确切机制不清楚。

在本研究中，我们发现 MKN45 细胞转染 hTERT 后，Cdx2 明显增强。在干细胞分化的决定因素中，肠上皮特异性转录因子 Cdx2 在干细胞向肠上皮分化过程中起关键的调控作用[8]。在一般情况下 Cdx2 基因在人的胃黏膜上皮细胞中不表达；一旦胃黏膜受到外界的刺激作用后，为适应环境的变化，Cdx2 表达上调，使本应该向正常柱状上皮分化的干细胞向杯状细胞分

化。研究发现,当诱导 Cdx2 基因表达后,发现 Cdx2 对刺激隐窝细胞增殖的作用明显[9-10]。MOK 基因是分裂素活化蛋白激酶(mitogen-activated protein,MAP)超家族中的一员,在肠道上皮细胞分化方面起一定作用。研究证明,Cdx2 可以结合在 MOK 启动子区域调控其基因的表达,从而实现对肠道上皮细胞分化的调控[11]。也就是说,hTERT 可以通过调控 Cdx2 的表达,从而使胃黏膜干细胞向肠上皮细胞分化,促进胃黏膜肠化生的发生。

为了研究 hTERT 对 Cdx2 表达的调控机制,我们构建了 Cdx2 的启动子。转染 hTERT 后,Cdx2 启动子活性明显上调;但 hTERT 并非核转录因子,不可能直接作用于 Cdx2 的启动子。文献[12-13]报道 hTERT 可以作为一种辅因子与核转录因子结核,促进靶基因的转录,据此我们推测,hTERT 是否亦可能与某个核转录因子结核后共同促进 Cdx2 的表达呢?

文献[14-16]报道 NF-κB 可以与 Cdx2 的启动子结合,促进 Cdx2 的转录。而 NF-κB 信号通路是一条在免疫调控、炎症、应激反应、胚胎发育、生长控制及细胞凋亡中起重要作用的信号通路[17]。那么在 hTERT 上调 Cdx2 是否是由 NF-κB 介导的呢? NF-κB 主要由 p65 和 p50 亚基形成的异二聚体,入核后促进其下游靶基因的转录来发挥活性。因此,我们采用 Co-IP 实验证实 hTERT 跟 p65 结合,那么 hTERT 可能通过促进 P65 的转录活性进而进上调 Cdx2 基因的表达,从而参与了肠化生过程。为了进一步验证,本实验在过表达 hTERT 的同时抑制 NF-κB,在启动子水平,我们发现抑制 NF-κB 后,显著下调了 hTERT 对 Cdx2 启动子活性的增强作用,在蛋白水平,抑制 NF-κB 活性后,hTERT 同样不能上调 Cdx2 的蛋白水平。以上提示 hTERT 可以通过与 p65 结合,并进而促进 Cdx2 蛋白的表达,促进胃黏膜肠上皮化生。

本实验研究表明,hTERT 与 NF-κB 结合增强其对 Cdx2 转录,从而使胃黏膜干细胞向肠上皮细胞分化,杯状细胞形成增多,促进了胃黏膜肠上皮化生的形成,为 hTERT 在胃黏膜肠上皮化生及癌变中的作用提供了实验依据。

参考文献:

[1] 马长青, 黄厚章, 胡加海. 老年人早期胃癌48例诊断分析[J]. 中华全科医学, 2010, 8(6): 737-738.

[2] Shay J W, Wright W E. Role of telomeres and telomerase in cancer [J]. Semin Cancer Biol, 2011, 21(6): 349-353.

[3] Duarte M C, Babeto E, Leite K R, *et al*. Expression of TERT in precancerous gastric lesions compared to gastric cancer[J]. Braz J Med Biol Res, 2011, 44(2): 100-104.

[4] Yang S M, Fang D C, Luo Y H, *et al*. Alterations of telomerase activity and terminal restriction fragment in gastric cancer and its premalignant lesions[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2001, 16(8): 876-882.

[5] 陈陵, 陈婷, 蔡永国, 等. 胃黏膜癌变过程中 hTERT 和相关基因表达的变化及其临床意义[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2006, 15(5): 443-447.

[6] Kang J M, Lee B H, Kim N, *et al*. CDX1 and CDX2 expression in intestinal metaplasia, dysplasia and gastric cancer[J]. J Korean Med Sci, 2011, 26(5): 647-653.

[7] Mills J C, Shivdasani R A. Gastric epithelial stem cells[J]. Gastroenterology, 2011, 140(2): 412-424.

[8] Barros R, da-Costa L T, Pinto-de-Sousa J, *et al*. CDX2 autoregulation in human intestinal metaplasia of the stomach: impact on the stability of the phenotype[J]. Gut, 2011, 60(3): 290-298.

[9] Stringer E J, Duluc I, Saandi T, *et al*. Cdx2 determines the fate of postnatal intestinal endoderm[J]. Development, 2012, 139(3): 465-474.

[10] Escaffit F, Pare F, Gauthier R, *et al*. Cdx2 modulates proliferation in normal human intestinal epithelial crypt cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342(1): 66-72.

[11] Uesaka T, Kageyama N. Cdx2 homeodomain protein regulates the expression of MOK, a member of the mitogen-activated protein kinase superfamily, in the intestinal epithelial cells[J]. FEBS Lett, 2004, 573(1/3): 147-154.

[12] Park J I, Venteicher A S, Hong J Y, *et al*. Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin[J]. Nature, 2009, 460(7251): 66-72.

[13] Choi J K, Southworth L Y, Sarin K S, *et al*. TERT promotes epithelial proliferation through transcriptional control of a Myc- and Wnt-related developmental program[J]. PLoS Genet, 2008, 4(1): e10.

[14] Kim S, Domon Dell C, Wang Q, *et al*. PTEN and TNF-alpha regulation of the intestinal-specific Cdx-2 homeobox gene through a PI3K, PKB/Akt, and NF-kappaB-dependent pathway[J]. Gastroenterology, 2002, 123(4): 1163-1178.

[15] Debruyne P R, Witek M, Gong L, *et al*. Bile acids induce ectopic expression of intestinal guanylyl cyclase C Through nuclear factor-kappaB and Cdx2 in human esophageal cells[J]. Gastroenterology, 2006, 130(4): 1191-1206.

[16] Jotwani R, Moonga B S, Gupta S, *et al*. Nuclear factor-kappaB p50 subunits in chronic periodontitis and Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-pulsed dendritic cells[J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1192: 278-285.

[17] Caamano J, Hunter C A. NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions[J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15(3): 414-429.

(**收稿**:2014-01-29;**修回**:2014-03-05)

(编辑 王 红)