论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201510051

hTERT 调控 Gli1 的表达及其对胃癌细胞侵袭迁移的影响

李 阳,张 丹,胡长江,唐 波,覃 勇,汪苏敏,吴玉云,董 辉,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 enzyme, hTERT)调控 Gli1 的表达及其对胃癌细胞侵袭迁移的影响。**方法** 采用 pIRES2 载体构建 hTERT 过表达质粒,qRT-PCR 和 Western blot 检测 hTERT 对 Gli1 表达的影响;构建 Gli1 启动子荧光素酶质粒,检测 hTERT 对 Gli1 启动子荧光素酶活性的影响;构建 Gli1 干扰质粒,并与 hTERT 过表达质粒共转染 SGC-7901 细胞;Transwell 实验和划痕实验检测胃癌细胞的侵袭、迁移能力的变化;**结果** 过表达 hTERT 显著上调 Gli1 mRNA 和蛋白的表达($P<0.01$),并显著增加 Gli1 启动子荧光素酶的活性($P<0.01$);而 si-Gli1 显著抑制 Gli1 的表达;干扰 Gli1 的表达,减弱 hTERT 对胃癌细胞侵袭、迁移能力的影响。**结论** hTERT 通过促进 Gli1 的转录,增加 Gli1 的表达,进而增强胃癌细胞的侵袭迁移。

[关键词] 人端粒酶逆转录酶;Gli1;胃癌;转录调控
[中图法分类号] R394.3; R730.23; R735.2 [文献标志码] A

hTERT promotes migration and invasion of gastric cancer cells through transcriptional regulation of Gli1 expression

Li Yang, Zhang Dan, Hu Changjiang, Tang Bo, Qin Yong, Wang Sumin, Wu Yuyun, Dong Hui, Yang Shiming (Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the mechanism by which human telomerase reverse enzyme (hTERT) regulates Gli1 expression to promote metastasis of gastric cancer cells. **Methods** After down-regulation of Gli1 expression with a specific siRNA against Gli1, the migration and invasion of gastric cancer cells were detected by wound healing and Transwell assays. The protein expression of hTERT and Gli1 was detected by Western blotting. Ectopic expression of hTERT was performed using pIRES2 vector. After the dual luciferase vector that contains the Gli1 promoter was co-transfected into SGC-7901 cells, and the luciferase activity in the cells was measured. **Results** Si-Gli1 markedly inhibited the Gli1 expression, and the down-regulation of Gli1 significantly suppressed the migration and invasion of gastric cancer cells. Ectopic expression of hTERT significantly enhanced the expression of Gli1 at both mRNA and protein levels ($P<0.01$). Over-expression of hTERT also significantly enhanced the luciferase activity of Gli1 promoter ($P<0.01$). **Conclusion** hTERT may promote the migration and invasion of gastric cancer cells through enhancing Gli1 expression at transcriptional level.

[**Key words**] human telomerase reverse enzyme; Gli1; gastric cancer; transcriptional regulation

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81502554). Corresponding author: Yang Shiming, E-mail: shimingyang@yahoo.com

人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse enzyme, hTERT)是端粒酶的一个亚单位,作为端粒酶的限速成分在端粒酶的活化中发挥主要作用。hTERT 的表达可以代表端粒酶的活化[1-2]。既往研究表明,端粒酶的活化以及 hTERT 表达参与了肿瘤侵袭转移过程[3-6]。经典的 Hedgehog 信号通路主要由配体 Hedgehog、跨膜蛋白受体 patched (Ptch)和 smoothened (Smo),以及转录因子 Gli 家族构成,其中 Gli 家族是

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81502554)
[通信作者] 杨仕明,E-mail: shimingyang@yahoo.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151118.1450.007.html(2015-11-18)

Hedgehog 信号通路中的核心成员[7]。Gli 的激活将导致其下游一系列分子的转录,包括上皮间叶转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关因子,如 SIP1, ZFHX1B, ZEB2 等[8-10]。研究表明,胃癌组织中 hTERT 与 Gli1 的表达呈显著正相关[10],提示 hTERT 与 Gli1 之前可能存在调控与被调控的关系。

本研究拟观察 hTERT 对 Gli1 表达调控的影响,并进一步探讨 hTERT 促进胃癌细胞侵袭转移的分子机制,为基于 hTERT 的胃癌治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂及仪器 DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司),胎牛血清(美国 Gibco 公司);Lipofectamine® 2000(美国 Invitrogen 公司);一抗兔 Gli1 抗体(美国 ORIGENE 公司,编号 TA803969);双荧光素酶报告基因检测系统(美国 Promega 公司);人胃腺癌细胞株 SGC-7901 由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人胃腺癌细胞 SGC-7901 用含 10% 胎牛血清的 DMEM/H 培养基培养,条件为 37 ℃, 5% CO_2。

1.2.2 RNA 提取 以 10^6 细胞/1 mL TRizol Reagent 的比例加入 TRizol Reagent,按照操作说明提取细胞 RNA,溶于 40 μL DEPC 水。

1.2.3 qRT-PCR 检测 按照 Premix ExTaq 试剂盒说明加入逆转录反应试剂,逆转录反应条件:37 ℃, 15 min;85 ℃,5 s。合成的 cDNA 作为模板进行 qPCR 扩增,根据 Premix *ExTaq*™ 试剂盒说明加入 Premix、ROX Dye Ⅱ、Primer R、Primer F、cDNA 及 H_2O。qPCR 条件:95 ℃,2 min;40 次循环于 95 ℃,15 s;60 ℃,30 s,采集荧光。25 μL 反应体系,GAPDH 作为内参。引物序列为:Gli1-Primer F (5′-GCGTGAGCCTGAATCTGTGTAT-3′)、Gli1-Primer R (5′-TGGATGTGCTCGCTGTTGATG-3′); GAPDH-Primer F (5′-GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA-3′)、GAPDH-Primer R (5′- TCTCTTCCTCTTGTGCTCTTGCT-3′)。

1.2.4 Western blot 检测 采用 RIPA 法提取 SGC-7901 细胞总蛋白、BCA 法测定蛋白浓度(根据说明书)。取 20 μg 蛋白经 10% SDS-PAGE 胶分离后,湿转(条件:恒流 200 A,90 min)至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,分别用抗 Gli1 的一抗(1∶500 稀释),抗 hTERT 的一抗(1∶1 000 稀释),抗 GAPDH 的一抗(1∶5 000 稀释)孵育过夜,再与辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 孵育 1 h,与辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 孵育 1 h,用 TBST 液洗膜后曝光显色。

1.2.5 荧光素酶活性检测 将 SGC-7901 细胞接种于 96 孔板,24 h 后细胞贴壁汇合率达 50% 时共转染荧光素酶质粒 Gli1-Promoter Luciferase reporter 及对照质粒 pRL-TK、hTERT 过表达质粒 pIRES2-hTERT 及对照质粒 pIRES2-NC。转染 24 h 以后,采用双荧光素酶报告基因检测系统处理细胞,用 GloMax20/20 Luminometer 检测荧光强度。

1.2.6 转染 将 SGC-7901 细胞接种于 6 孔板,24 h 后细胞贴壁汇合率达 50% 进行转染,转染试剂采用 Lipofectamine® 2000,转染步骤按试剂说明书推荐步骤进行。si-NC 的终浓度为 100 nmol/L , si-Gli1 的终浓度为 100 nmol/L; pIRES2-NC 的终浓度度为 60 nmol/L; pIRES2-hTERT 的终浓度为 80 nmol/L。

1.2.7 质粒构建 委托重庆吉玛基因公司构建 Gli1 干扰质粒 si-Gli1; 本实验室已成功构建 hTERT 过表达质粒(pIRES2-hTERT)及对照质粒(pIRES2-NC)[11]。经 http://genome.ucsc.edu/ 获得人 Gli1 的启动子序列,委托上海生工公司将 Gli1 的启动子序列克隆至 pGL3-basic 位点,构建重组萤火虫荧光素酶报告质粒 pGL3-basic-Gli1,经双酶切电泳及测序鉴定质粒构建成功。

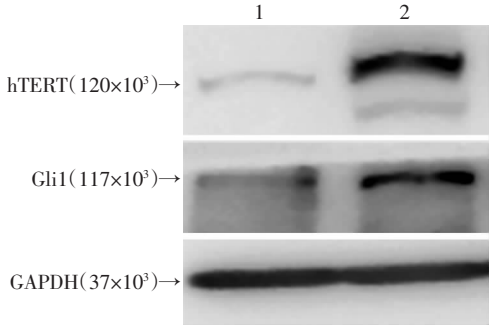
1.3 统计学方法

胃癌细胞的侵袭、迁移计数以及 Gli1 启动子荧光素酶活性的检测均采用配对 t 检验,采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 过表达 hTERT 上调 Gli1 的表达

分别转染 piRES2-NC 及 piRES2-hTERT 于 SGC-7901 细胞 48 h 之后,采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 hTERT 的蛋白水平以及 Gli1 mRNA、蛋白的表达水平。过表达 hTERT 可明显增加 Gli1 mRNA 的表达,pIRES2-NC 为(1.11 ± 0.10),pIRES2-hTERT 为(4.60 ± 0.81)(P = 0.003 8)和蛋白的表达(图 1)。



1:pIRES2-NC 空载质粒转染;2:pIRES2-hTERT 过表达质粒转染

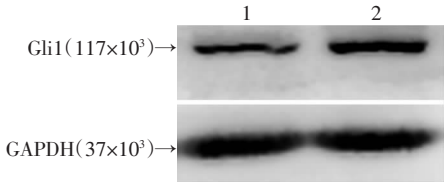
图 1 过表达 hTERT 对 SGC-7901 胃癌细胞 Gli1 mRNA 和蛋白表达的影响

2.2 过表达 hTERT 增强 Gli1 启动子荧光素酶活性

图1结果表明 hTERT 可以增加 Gli1 mRNA 的表达，提示 hTERT 可能在转录水平调控 Gli 1 的表达。我们进一步采用双荧光素酶实验，检测 hTERT 对 Gli1 启动子的影响。我们构建了含 Gli1 启动子的荧光素酶报告载体，将 hTERT 过表达载体或对照载体，与 Gli1 启动子荧光素酶载体分别共转染 SGC-7901 细胞，48 h 后检测荧光素酶报告基因的活性，pIRES2-NC 为（0.096 ± 0.033），pIRES2-hTERT 为（0.188 ± 0.026），hTERT 可明显增强 Gli1 启动子的活性（P = 0.003 874），提示 hTERT 可通过促进 Gli1 的转录进而增强其表达。

2.3 si-Gli1 干扰 Gli1 的表达

采用 Gli1 的干扰 RNA si-Gli1 干扰 Gli1 的表达，如图2所示，SGC-7901 胃癌细胞中 si-Gli1 显著降低了 Gli1 的表达。

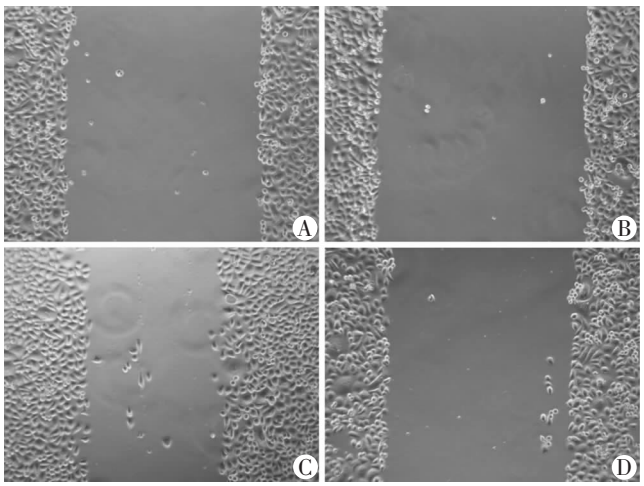


1：si-Gli1；2：si-NC

图2 Western blot 检测 Si-Gli1 干扰 Gli1 的表达

2.4 干扰 Gli1 的表达可显著抑制 hTERT 促胃癌细胞的迁移

在 hTERT 过表达的 SGC-7901 胃癌细胞中同时转染 si-Gli1 质粒，采用划痕实验观察干扰 Gli1 对胃癌细胞迁移能力的影响。如图3所示，与 si-NC 组相比，si-Gli1 组的胃癌细胞的迁移能力明显减弱，提示干扰 Gli1 可显著抑制 hTERT 对胃癌细胞的迁移，hTERT 有可能通过促进 Gli1 的表达并进而促进胃癌细胞的迁移。

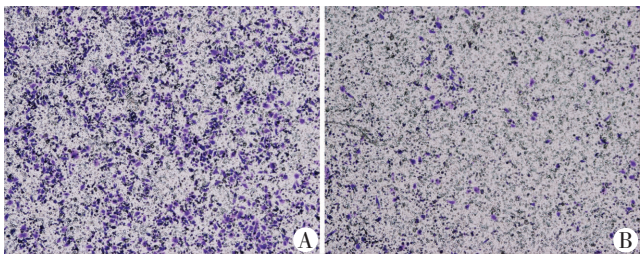


A：hTERT + si-NC 0 h；B：hTERT + si-Gli1 0 h；C：hTERT + si-NC 48 h；D：hTERT + si-Gli1 48 h

图3 干扰 Gli1 的表达可显著抑制 hTERT 促胃癌细胞的迁移

2.5 干扰 Gli1 的表达可显著抑制 hTERT 促胃癌细胞的侵袭

采用 Transwell 实验验证抑制 Gli1 的表达后，过表达 hTERT 的 SGC-7901 细胞侵袭能力的变化。结果显示，共转染 pIRES2-hTERT、si-Gli1 24 h 之后，相对于 si-NC 组，si-Gli1 组中从膜上侧迁移至膜下侧的 SGC-7901 细胞数量明显减少，表明干扰 Gli1 的表达显著降低了 SGC-7901 细胞的迁移能力（图4）。证明 hTERT 可通过 Gli1 进而促进胃癌细胞侵袭。



A：hTERT + si-NC，共转染 pIRES2-hTERT、si-NC 于 SGC-7901 细胞；B：hTERT + si-Gli1，共转染 pIRES2-hTERT、si-Gli1 于 SGC-7901 细胞

图4 Transwell 检测干扰 Gli1 的表达抑制 hTERT 对胃癌细胞侵袭能力的影响 （结晶紫 ×40）

3 讨论

在胃癌细胞株 SGC-7901 中过表达 hTERT 之后，Gli1 的 mRNA 及蛋白表达水平显著上调，且 Gli1 启动子荧光素酶报告基因活性显著增加，而干扰 Gli1 的表达抑制了胃癌细胞的侵袭和迁移。提示 hTERT 能够调控 Gli1 的表达。

hTERT 在胃癌转移的淋巴结组织中显著升高，与胃癌淋巴结转移情况，TNM 分期，浆膜层浸润等临床病理特征密切相关[12-13]。hTERT 导致胃癌细胞发生上皮-间质 EMT 改变，其在胃癌组织中的表达水平与 Snail1、Vimentin 等呈正相关[14]；干扰 hTERT 的表达能够抑制胃癌细胞的 EMT 样改变和侵袭转移。有意思的是，hTERT 能够以非依赖于端粒酶活性和不改变端粒长度的条件下，促进血管内皮生长因子表达（VEGF）和肿瘤的进程[15]。hTERT 同样与肿瘤的侵袭转移密切相关。因此，阐明 hTERT 导致胃癌侵袭转移的具体分子机制，有益于通过靶向 hTERT 的表达从而抑制肿瘤细胞侵袭转移。hTERT 本质上是一种酶，文献[16]报道 hTERT 能够与 NF-κB 的 p65 亚基结合并促进 p65 的入核，进而影响大部分 NF-κB 的下游基因的表达；此外，研究亦表明 hTERT 能够通过与 β-catenin 蛋白-蛋白相互作用后促进 Wnt 通路下游靶基

因的表达[17]。也就是说 hTERT 可以作为 co-activator，通过影响某些转录因子的表达最终影响靶基因的表达。据此，有理由推测 hTERT 引起的 Gli1 表达变化可能原因是，hTERT 作用于某些转录因子，通过与转录因子结合后，共同作用于 Gli1 的启动子区域，影响其功能或者其表达水平。

Gli1 是 Hedgehog 信号通路中的主要成员之一，其表达的高低显著影响了该信号通路的活性。有研究表明，Gli1 的转录主要受一段长达 1.4 kb 的序列调控，该序列包含 5 侧翼序列、一个非编码外显子以及 425 bp 处的内含子。Gli1 的核心启动子区位于 -357 ~ +130，富含 GC 序列和 CpG 岛，而缺乏 TATA 框、CCAAT 框。c-MYC 和 Twist 能与该序列上的 E-box 结合，促进 Gli1 的转录[18]。Beauchamp 等[19]报道，在 Gli1 启动子区域含有多个 EWS-FLI1 蛋白结合序列 GGAA，EWS-FLI1 能与这些位点结合进而上调 Gli1 的转录水平。这些研究提示 hTERT 可能与 Gli1 的转录因子相互作用，共同启动 Gli1 基因的转录。本研究明确了 Gli1 在胃癌细胞侵袭转移中的作用，证实了 hTERT 通过转录后调控 Gli1 的表达。

参考文献：

[1] Yu L, Liu S, Zhang C, *et al*. Enrichment of human osteosarcoma stem cells based on hTERT transcriptional activity[J]. Oncotarget, 2013, 4(12): 2326 - 2338.

[2] Deeb D, Gao X, Liu Y, *et al*. Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by oleanane triterpenoid (CDDO-Me) in pancreatic cancer cells is associated with the suppression of hTERT gene expression and its telomerase activity [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 422(4): 561 - 567.

[3] Hu C, Ni Z, Li B S, *et al*. hTERT promotes the invasion of gastric cancer cells by enhancing FOXO3a ubiquitination and subsequent ITGB1 upregulation[J]. Gut, 2015, pii: gutjnl - 2015 - 309322.

[4] Zhao T, Hu F, Qiao B, *et al*. Telomerase reverse transcriptase potentially promotes the progression of oral squamous cell carcinoma through induction of epithelial-mesenchymal transition[J]. Int J Oncol, 2015, 46(5): 2205 - 2215.

[5] Chen R, Zhu J, Dong Y, *et al*. Suppressor of Ty homolog-5, a novel tumor-specific human telomerase reverse transcriptase promoter-binding protein and activator in colon cancer cells [J]. Oncotarget, 2015, 6(32): 32841 - 32855.

[6] Lu M H, Deng J Q, Cao Y L, *et al*. Prognostic role of telomerase activity in gastric adenocarcinoma: A meta-analysis[J]. Exp Ther Med, 2012, 3(4): 728 - 734.

[7] Briscoe J, Therond P P. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013, 14(7): 416 - 429.

[8] Chen X, Lingala S, Khoobyari S, *et al*. Epithelial mesenchymal transition and hedgehog signaling activation are associated with chemoresistance and invasion of hepatoma subpopulations [J]. J Hepatol, 2011, 55(4): 838 - 845.

[9] Yoo Y A, Kang M H, Lee H J, *et al*. Sonic hedgehog pathway promotes metastasis and lymphangiogenesis via activation of Akt, EMT, and MMP-9 pathway in gastric cancer[J]. Cancer Res, 2011, 71(22): 7061 - 7070.

[10] 魏青林，张丹，杨仕明. 端粒酶逆转录酶和 Gli1、Gli2 在胃癌中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报，2015，37(9)：902 - 906.

[11] Yu S T, Chen L, Wang H J, *et al*. hTERT promotes the invasion of telomerase-negative tumor cells in vitro[J]. Int J Oncol, 2009, 35(2): 329 - 336.

[12] Tahara E. Molecular aspects of invasion and metastasis of stomach cancer[J]. Verh Dtsch Ges Pathol, 2000, 84: 43 - 49.

[13] 张帆，郝迎学，唐波，等. 不同浆膜受侵犯面积胃癌患者行腹腔镜胃癌根治术对腹腔微转移的影响[J]. 中华消化外科杂志，2015，14(5)：400 - 404.

[14] Liu Z, Li Q, Li K, *et al*. Telomerase reverse transcriptase promotes epithelial-mesenchymal transition and stem cell-like traits in cancer cells[J]. Oncogene, 2013, 32(36): 4203 - 4213.

[15] Zhou L, Zheng D, Wang M, *et al*. Telomerase reverse transcriptase activates the expression of vascular endothelial growth factor independent of telomerase activity[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 386(4): 739 - 743.

[16] Ding D, Xi P, Zhou J, *et al*. Human telomerase reverse transcriptase regulates MMP expression independently of telomerase activity via NF-kappaB-dependent transcription [J]. FASEB J, 2013, 27(11): 4375 - 4383.

[17] Listerman I, Gazzaniga F S, Blackburn E H. An investigation of the effects of the core protein telomerase reverse transcriptase on Wnt signaling in breast cancer cells[J]. Mol Cell Biol, 2014, 34(2): 280 - 289.

[18] Yoon J W, Gallant M, Lamm M L, *et al*. Noncanonical regulation of the Hedgehog mediator GLI1 by c-MYC in Burkitt lymphoma[J]. Mol Cancer Res, 2013, 11(6): 604 - 615.

[19] Beauchamp E, Bulut G, Abaan O, *et al*. GLI1 is a direct transcriptional target of EWS-FLI1 oncoprotein[J]. J Biol Chem, 2009, 284(14): 9074 - 9082.

（**收稿**：2015-10-12；**修回**：2015-11-10）

（编辑 王 红）