基础研究 文章编号:0253-3626(2010)10-1482-04

使用 hTERT 启动子联合 RNAi 靶向逆转乳腺癌的耐药性

黄金向,王继见,莫琳君
(重庆医科大学附属第二医院普外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:克隆人端粒酶逆转录酶启动子(Human telomerase reverse transcriptase,hTERT),探讨对乳腺癌细胞的特异性[1],利用 RNAi 技术靶向沉默耐药乳腺癌细胞 MCF-7/ADR 乳腺癌耐药蛋白(Breast cancer resistance protein,BCRP)基因[2]的表达,观察 BCRP 的 mRNA 变化,BCRP 蛋白的表达以及对阿霉素耐药性的变化[3]。方法:构建重组质粒(pGenesil-CMV-shRNA、pGenesil-hTERT-shRNA),分别转染端粒酶阴性及阳性细胞,检测 hTERT 启动子的靶向性,应用 RT-PCR 及 Western-blot 技术检测不同组的细胞的 RNA、蛋白差异,MTT 法分析药敏性变化[4]。结果:端粒酶阳性的细胞可见很强的荧光,明显强于端粒酶阴性的细胞[5];细胞实验 RT-PCR 及 Western blot 检测结果显示:BCRP 的 mRNA 和蛋白的表达受抑制与对照组其差异有显著性($P<0.05$);MTT 比色法结果显示:对阿霉素的药物敏感性明显提高。结论:使用 hTERT 启动子联合 RNAi 成功靶向沉默 BCRP 基因,乳腺癌 MCF-7/ADR 对阿霉素的敏感性明显增加,为进一步开发肿瘤的特异性基因沉默治疗奠定实验基础。

【关键词】重组质粒;启动子 hTERT;RNAi ;乳腺癌;MCF-7/ADR; 端粒酶阳性细胞
【中国图书分类法分类号】R737.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-06-01

hTERT promoter targeting reverse drug resistance in breast cancer combined with RNAi

HUANG Jin-xiang, et al
(*Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical Universiey*)

【Abstract】*Objective*: To clone the promoter of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) and investigate its selective effect on breast cancer cell, and to observe changes of breast cancer resistance protein (BCRP) mRNA, its protein expression and changes of drug resistance to doxorubicin with RNAi technology used in cell (MCF-7/ADR). *Methods*: Plasmids (pGenesil-CMV-shRNA, pGenesil-hTERT-shRNA) were recombined and transfected into telomerase-negative and-positive cells, hTERT promoter targeting was detected. RT-PCR, and Western-blot were applied to detect RNA and protein of different groups of cells. MTT was applied to analyze drug sensitivity. *Results*: Highly visible fluorescent was seen in telomerase-positive cells, which was stronger than that of telom-

作者介绍:黄金向(1980-),男,住院医师,硕士,研究方向:乳腺肿瘤。
通讯作者:王继见,男,教授,E-mail:wangjj163@163.com。
基金项目:重庆市教委科学技术(编号:KJ080305)

点为进一步深入研究与 nbM 相关的中枢神经系统疾病奠定了基础。

参 考 文 献

[1] 舒斯云,包新民. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京:人民卫生出版社.1991.
[2] 朱淑娟,钱亦华,韩学哲. 急性分离 Meynert 核团神经元方法及其应用[J].中国老年学杂志,2006,26(6):811-813.
[3] 赵海花,赖 红,曾 亮,等.人参皂甙对老龄大鼠 Meynert 核及大脑皮质脑源性神经营养因子含量的影响[J].解剖学报,2006,37(2):223-225.
[4] 刘永红,柏 林. 学习记忆相关脑区[J].第一军医大学分校学报,2003,26(2):153-154.
[5] 张 蕲,田 青,胡茂琼,等. Meynert 基底核注射冈田酸致大白鼠空间记忆障碍[J].医药导报,2004,23(12):891-893.
[6] Bengtson C P, Osborne P B. Electrophysiological properties of cholinergic and noncholinergic neurons in the ventral pallidal region of the nucleus basalis in rat brain slices [J].J Neurophysiol,2000,83(5):2649-2660.
[7] 刘 照,张 进,陈怀红,等.皮质发育障碍大鼠海马神经元钠通道功能的变化[J].中国病理生理杂志,2008,24(12):2465-2469.
[8] 桑 楠,孟紫强.硫酸镁对大鼠海马 CA1 区神经元钠电流的抑制作用[J].生理学报,2002,54(6):539-543.
[9] 王 斌,仲崇波.大鼠海马锥体神经元延迟整流性钾电流的发育变化[J].徐州医学院学报,2008,28(8):513-517.
[10] Spigelman I, Zhang L, Carlen P L. Patch-clamp study of postnatal development of CA1 neurons in rat hippocampal slices: membrane excitability and K^+ currents [J]. J Neurophysiol,1992,68(1):55-69.
[11] Zhang Y L, Wang X L .Study on the mRNA exp ression of potassium channel gene Kv1.5 in the developing rat brain[J].Chin Pharmcol Bull,1999,15(6):505-508.

(责任编辑:冉明会)

erase-negative cells.The results of RT-PCR, and Western-blot showed that the mRNA and protein expression of BCRP were inhibited; MTT results showed that the drug sensitivity to doxorubicin was significantly increased, which was of significant difference as compared with the control group ($P<0.05$). *Conclusion*: hTERT promoter can targeting silence BCRP gene combined with RNAi technology and drug resistance to doxorubicin is reversed, which lays a solid experimental basis for the further development of tumor specific therapy in gene silencing.

【Key words】Plasmid; hTERT promoter; RNAi; Breast cancer; MCF-7/ADR; Telomerace-positive cells

乳腺癌是妇女第二大常见肿瘤,是导致癌症妇女死亡的第二大主要原因,化学治疗在乳腺癌治疗中起着不可替代的作用,化学治疗的成败直接关系患者生存率,但内在型或获得性的多重耐药(Multidrug resistance, MDR)常导致化学治疗失败。药物转运蛋白(ATP binding cassette G2, ABCG2)膜转运蛋白的过度表达与肿瘤 MDR 关系密切,一种新的乳腺癌耐药蛋白 P(Breast cancer resistance protein, BCRP),属于 ABC超家族的一种。因此我们设想能否在基因水平靶向沉默乳腺癌细胞 BCRP,逆转肿瘤细胞的耐药性,以提高化学治疗疗效。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 人正常成纤维细胞株(BJ)、子宫成纤维细胞(UFC)、MCF-7/ADR 均购于中国科学院上海细胞所; RPMI1640、小牛血清购自 Gibco 公司;PCR 反应试剂盒(购自 Tiange 公司); TaqDNA 聚合酶、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒,DNA 纯化试剂盒(购于 Takara 公司);RNA 提取试剂盒(购于 Takara 公司);LipofectamineTM2000(购于 In vitrogen 公司);G 418、MTT (Gibco BRL USA),BCRP 一抗(购于武汉博士德生物科技有限公司),Western 及 IP 细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、BeyoECL Plus(超敏 ECL 化学发光试剂盒),均购于碧云天。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建 ShRNA 表达载体选用 pGenesil-1,含有绿色荧光蛋白(EGFP)。BCRP 基因序列引自 GenBank,采用 ambion 公司的 siRNA 在线设计工具 siRNA Target Finder,选出 1 条 21 nt 的序列 5'-AAGAGTGGCTTTCTACCTTG T- 3';全基因合成 hTERT 启动子(共 260 bp),与 GenBank 中的 hTERT 调控区序列相对照。构建重组质粒 pGenesil-CMV-shRNA, 重组质粒 pGenesil- hTERT-shRNA 均由武汉晶赛生物工程公司构建、合成,质粒含量及测序由该公司测定。

1.2.2 细胞的培养及传代 人正常成纤维细胞株(BJ)、子宫成纤维细胞(UFC)、MCF-7/ADR 细胞在 37℃,50 ml/L CO_2 条件下,用 RPMI1640 加入 10%小牛血清培养液及双抗(100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素)中常规培养,隔天传代 1 次,处于对数生长期以备实验所用。

1.2.3 脂质体介导的质粒的转染 参考脂质体(Lipofectin)2000 转染试剂盒说明书:转染前 1 d,将 3 种对数生长期细胞接种于 3 个 6 孔培养板中,并以 2 ml 无双抗的培养液培养,当细胞达到 80% ~ 90%时开始转染,先以无血清及无双抗的培养液 250 ml 分别加入脂质体及质粒,静置 5 min 后,将两管混合,制备脂质体 - 质粒复合物,再静置 15 min 后,加入到细胞培养板中,每个培养板分为重组质粒 pGenesil-CMV-shRNA 组、重组质粒 pGenesil-shRNA-hTERT 组、脂质体对照组(只含脂质体的无血清、无抗生素培养液)和空白组(无血清、无抗生素培养液)。转染每隔 24 h 就用质粒包裹体重复转染 1 次,第 1 次转染的当天定为 0 d,连续转染 4 d,第 1、2、3、4 d 各收获细胞 1 批,进行倒置荧光镜检查。

1.2.4 MTT 法测定不同浓度阿霉素对各组细胞存活率的影响 将转染后细胞经 G418 筛选,浓度 100 μg/ml,将筛选后细胞培养生长至指数增长期,以 2×10^4 个/ml 浓度接种 96孔培养板中。分别以 6.26、12.5、25、50、100、200、400、800 ng/ml 的阿霉素进行药物作用浓度分析,各组分别设 8 个复孔,空白、对照组加入 10%血清的 RPMI1640 培养液。终止前 4 h,每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 液 20 μl,继续放于 CO_2 培养箱中 37℃,5%CO_2,饱和湿度条件下培养 4 h,取出培养板。小心吸去孔内液体,每空加入 150 μl 的 DMSO,振荡溶解后,用全自动酶标仪测定各孔光密度(OD_{460} 值)各平行孔取均值后以下式计算细胞 IC_{50}(死细胞与全部细胞数之比等于 50%时所对应的阿霉素的浓度),各平行孔取均值后以下式计算细胞相对存活率。细胞相对存活率% =($OD_{实验组}/OD_{对照组}$)×100% (以空白组 OD 值调零)。结果进行统计学分析。各组实验均重复 3 次。

1.2.5 RT-PCR 检测 BCRP 的 mRNA 表达 将未干预的及 2 种重组质粒转染后的 MCF-7/ADR 细胞提取 RNA,内参为 NADPH,其上游引物为 5'-ACTGTGCCCATCTACGAGG-3', 下游引物为 5'-GAAAGGGTGTAACGC AACTA-3',扩增产物 678 bp;BCRP 上游引物 5-ATGAAACCTGGTCTCAACGC-3, 下游引物为 5-TGGAGTCTGCCACTTTATCC-3,扩增片段为 319 bp,按照 RT-PCR 说明书检测 RNA 的表达。

1.2.6 Western blot 检测 BCRP 的蛋白的表达 将未干预的及 2 种重组质粒转染后的 MCF-7/ADR 细胞提取总蛋白,按说明书提取蛋白及检测蛋白的浓度,按照碧云天提供的说明书的步骤进行 Western blot,在蛋白凝胶成像仪上显影。

1.2.7 统计学处理 文章中均为计量资料,以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。均采用单因素的方差分析,以 $P<0.05$ 为有统计学意义。所有统计分析均采用 SPSS17.0 统计软件完成。

2 结 果

2.1 特异性启动子 hTERT 及重组质粒 pGenesil-hTERT-shRNA 的合成

PCR 扩增结果表明:出现特异性条带约为 260 bp,与预期片段一致;成功将 hTERT 启动子克隆于载体 pGenesil 上,构建重组质粒 pGenesil- hTERT-shRNA,经酶切后结果证实(图 1)。

2.2 hTERT 启动子调控 EGFP 转录活性检测

用重组质粒 pGenesil- hTERT-shRNA 分别转染端粒酶阳性细胞 MCF-7/ADR 及端粒酶阴性细胞人正常成纤维细胞株(BJ)、子宫成纤维细胞(UFC),48 h 后在倒置荧光镜检测,端粒酶阳性细胞可见较多绿色荧光,阴性细胞几乎看不见荧光(见图 2),表明 hTERT 启动子在端粒酶阳性细胞 MCF-7/ADR 中具有较强的肿瘤特异性转录活性。

2.3 半定量 RT-PCR 检测 BCRP mRNA 的表达

在细胞对照组(C1)、重组质粒 pGenesil-CMV-shRNA 组(A1),重组质粒 pGenesil-hTERT-shRNA(B1)中的表达,结果显示,3 条泳道中 β-actin 扩增条带(678 bp)的亮度相似;而 2 个 RNAi 组扩增条带(319 bp)的亮度无明显差异,2 组 RNAi 组明显弱于对照组。用 BandScan 软件分析各扩增条带产物的 BCRP/NAPDH 比值(见图 3 表 1)。

2.4 BCRP 蛋白在裸鼠乳腺癌组织中的表达

Western blot 检测 BCRP 蛋白在不同组细胞(重组质粒 pGenesil-CMV-shRNA 组、重组质粒 pGenesil-hTERT-shRNA 组、对照组)中的表达,结果显示,3 条泳道中 β-actin 条带(50 kD)的亮度相似;而 2 个干预条带(75 kD)的亮度无明显差异,均明显弱于对照组。用 BandScan 软件分析各扩增条带产物的 BCRP/β-actin 比值(见图 4,表 2)。

2.5 阿霉素对各组细胞存活率的作用

浓度效应 MTT 比色法检测结果显示,对照组(1)、重组质粒 pGenesil-CMV-shRNA 组;(2)重组质粒 pGenesil- hTERT-shRNA 组;(3)的 IC_{50} 值见表 3 干预组对阿霉素的药物敏感性明显提高,统计分析结果见表 3。



1. pGenesil-10-mir30-shRNA- hTERT *BamH* Ⅰ和 *Kpn* Ⅰ;
2. pGenesil-10-mir30-shRNA- hTERT *BamH* Ⅰ和 *Kpn* Ⅰ;
3. pGenesil-10-mir30-shRNA- hTERT *BamH* Ⅰ和 *Kpn* Ⅰ;
4. DL2000 Marker:2 000、1 000、750、500、250、100 bp

图 1 hTERT 启动子的 PCR 扩增和 pGenesil-shRNA-hTERT 双酶切鉴定

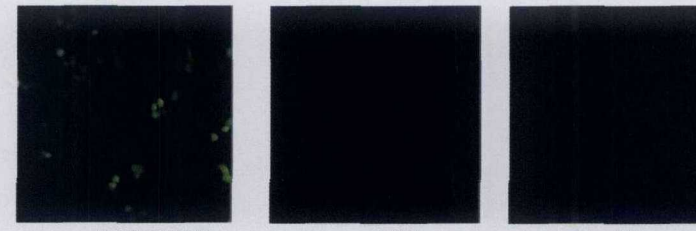
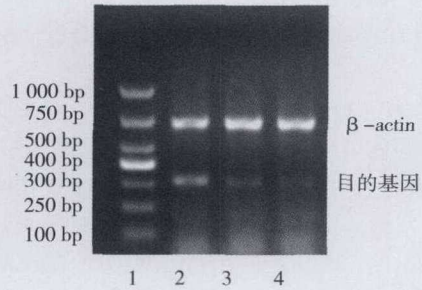
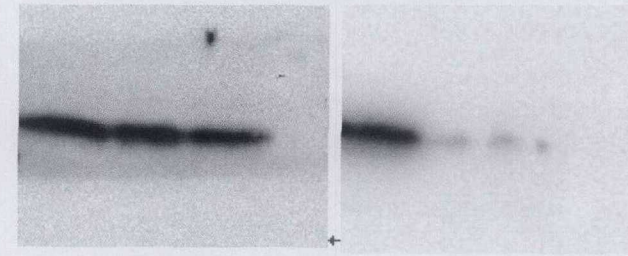


图 2 hTERT 启动子在不同细胞的荧光差异



1. Marker;2. C1 组;3. A1 组;4. B1 组

图 3 半定量 RT-PCR 图 4 检测 BCRP mRNA 的表达



1. 对照组;2. 重组质粒 pGenesil-CMV-shRNA 组;3. 重组质粒 pGenesil- hTERT-shRNA 组

图 4 BCRP 蛋白在裸鼠乳腺癌组织中的表达(Western blot)

表 1 各组 RT-PCR 结果

组别	$\bar{x} \pm s$
C1	0.293 ± 0.009
A1	0.021 ± 0.001*
B1	0.022 ± 0.001▲

$P<0.05$(分别与 C1 组比较)▲ 间比较 $P>0.05$(两两比较用 LSD-t 检验)

表 2 各组 Western blot 结果

组别	$\bar{x} \pm s$
1	0.386 ± 0.001
2	0.021 ± 0.001*
3	0.021 ± 0.001▲

$P<0.05$(分别与 1 组比较)▲ 间比较 $P>0.05$(两两比较用 LSD-t 检验)

表 3 各组 IC_{50} 值

组别	$\bar{x} \pm s$
1	2 200.000 ± 18.069
2	193.222 ± 23.973*
3	196.444 ± 26.642▲

$P<0.05$(分别与 C1 组比较)▲ 间比较 $P>0.05$(两两比较用 LSD-t 检验)

3 讨 论

目前国内外 RNAi 基因治疗现状，RNAi 在肿瘤基因治疗成为当前研究热点，然而存在的问题是 RNAi 不具有靶向杀灭恶性肿瘤细胞的能力，使正常细胞和肿瘤细胞内的靶基因同时被敲出或抑制，造成 RNAi 干扰的不确定性。

使用肿瘤特异性启动子在转录水平控制目的基因的表达，以获得肿瘤治疗的特异靶向性，是近年肿瘤基因治疗的又一研究热点。研究表明，80%~90%的恶性肿瘤不同程度表达端粒酶[6]，乳腺癌也不例外。而人体大多数体细胞无端粒酶活性，因此，端粒酶可成为肿瘤基因治疗的理想靶点[7]。人类端粒酶逆转录酶(Human telomerase reverse transcriptase，hTERT)是端粒酶催化亚单位，其表达与端粒酶活性相平行，是端粒酶活性的决定因素[8]。利用 hTERT 启动子进行基因调控是目前靶向基因治疗的常用手段之一。研究表明，hTERT 启动子经修饰后可作用于乳腺癌，成骨肉瘤，膀胱癌等恶性肿瘤[9]，与对照组的差异有显著性($P<0.05$)。

本实验将修饰后的 hTERT 启动子[10]，加载于 pGenesil 载体上，成功构建重组质粒 pGenesil- hTERT-shRNA，用带有 hTERT 启动子及绿色荧光蛋白的重组质粒转染端粒酶阴性细胞人正常成纤维细胞株、子宫成纤维细胞及端粒酶阳性的细胞 MCF-7/ADR 后，不同时间用倒置荧光镜检测，只在端粒酶阳性细胞可见很强的荧光，而阴性细胞均不能见到荧光，因此，hTERT 启动子可能成为肿瘤基因治疗的靶向治疗，这与国内外研究完全一致。

应用 RNAi 技术干预 BCRP mRNA，通过干预前和干预后对比，有明显的差异($P<0.05$)，干预组间无统计学意义($P<0.05$)，其干预的目的基因达到很好的干预的效果[11]，且带有 hTERT 启动子较之带有 CMV 启动子的干预效果无明显差异($P>0.05$)，证实 hTERT 启动子功能与 CMV 启动子一样强大[12]。选择的小干扰序列在沉默 BCRP 基因上效果是显著的，将转染后的细胞阿霉素进行药敏实验，与对照组比较其差异有统计学意义($P<0.05$)，MCF-7/ADR 的耐药性被逆转。

综上所述，使用 hTERT 启动子联合 RNAi 靶向逆转乳腺癌 MCF-7/ADR 的耐药性，为肿瘤的基因治疗开辟了崭新的前景—既能够沉默掉我们想沉默的目的基因，又能够对目的基因外的基因毫发无损。据报道，乳腺癌耐药基因不是乳腺癌所特有，是很多肿瘤的共同的耐药机制，如大肠癌，胃癌等肿瘤组织，其研究有其广泛性及通用性，为肿瘤的基因治疗开辟了新的途径。将其应用于药物开发，有较强的临床应用价值。

参 考 文 献

[1] Xu F, Wen Z, Qiu Y Z, et al. Tumor-targeted human telomerase reverse transcriptase promoter/tk gene therapy against human nasopharyngeal carcinoma cells in vitro[J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2010, 30(4): 695-699.

[2] Abbott B I.ABCG2 (BCRP3) espression in normal and maligant hematopoietic cells[J].Hematol Oncol, 2003, 21(3): 115-130.

[3] Zang S, Chen F, Dai J, et al. RNAi-mediated knockdown of Notch-1 leads to cell growth inhibition and enhanced chemosensitivity in human breast cancer[J].Oncol Rep, 2010, 23(4): 893-899.

[4] Sevenich L, Schurigt U, Sachse K, et al. Synergistic antitumor effects of combined cathepsin B and cathepsin Z deficiencies on breast cancer progression and metastasis in mice[J].Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(6): 2497-2502.

[5] Lou Z, Wei J, Riethman H, et al. Telomere length regulates ISG15 expression in human cells[J].Aging, 2010, 1(7): 608-321.

[6] Liu D Y, Peng Z H, Qiu G Q, et al.Expression of telomerase activity and oxidative stress in human hepatocellular carcinoma with cirrhosis[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(8): 1859-1862.

[7] Shlomai A, Shaul Y.Inhibition of hepatitis B virus expression replication by RNA interference[J] .Hepatologgy, 2003, 37(4): 764-770.

[8] Wu H, Hait W N, Yang J M.Small interfering RNA-induced suppression of M DR 1(P—glyeoprotein)restores sensitivity to multidrug--resistant cancer cellsl[J].Cancer Res, 2003, 63(7): 1515-1519.

[9] Kim N W, Piatyszek M A, Prowse K R, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cell and cancer[J].Science, 1994, 266(5193): 2011-2015.

[10] Wang Z, Xu J, Geng X, Zhang W. Analysis of DNA methylation status of the promoter of human telomerase reverse transcriptase in gastric carcinogenesis[J]. Arch Med Res, 2010, 41(1): 1-6.

[11] Lee S J, Lee S W, Jeong J S, et al. In vivo reprogramming of human telomerase reverse transcriptase(hTERT) by trans-splicing ribozyme to target tumor cells[J].Methods Mol Biol, 2010, 629: 307-321.

[12] Liu X Y, Fang H, Chen H C, et al.Construction of VEGF gene-targeted small interfering RNA mediated by CMV promoter and its silencing effect[J]. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2010, 39(2): 181-186.

(责任编辑：冉明会)