维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)02－0162－04

反义寡核苷酸抑制端粒酶活性对鼻咽癌细胞癌基因表达的影响

曹 前,吴家廉,骆文龙

(重庆医科大学第二临床学院耳鼻喉科,重庆 400010)

【摘 要】目的:检测针对端粒酶的反义寡核苷酸(AS－ODN)对鼻咽癌 HNE－1 细胞株 bcl－2 及 c－myc 基因表达的影响。方法:用 PCR－ELISA 法检测细胞内端粒酶活性。用免疫细胞化学法检测 bcl－2 和 c－myc 基因的表达。结果:鼻咽癌细胞株 HNE－1 与 20μ mol/L 反义寡核苷酸共同孵育 1 天,对其端粒酶活性抑制率为 61.6%。而同浓度正义寡核苷酸(S－ODN)对细胞端粒酶活性无抑制作用。20μmol/L 反义寡核苷酸作用 2 天后鼻咽癌细胞 c－myc 基因表达 HSCORE 评分由 3.65 下降为 1.98,而 bcl－2 基因表达 HSCORE 评分无明显变化。结论:该反义寡核苷酸可抑制鼻咽癌细胞端粒酶活性,此作用有序列特异性。该反义寡核苷酸抑制了鼻咽癌细胞 c－myc 基因的表达,而对 bcl－2 基因表达无明显影响。

【关键词】反义寡核苷酸;端粒酶;癌基因

【中国图书分类法分类号】R739.63 【文献标识码】A 【收稿日期】2002－06－24

The influence of antisense oligodeoxynucleotide targeting against telomerase in the expression of cellular oncogene to nasopharyngeal carcinoma cells

CAO Qian, et al

(*Department of Otorhinolaryngology, the Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To investigate the influence of AS－ODN targeting against telomerase in the expression of bcl－2 gene and c－myc gene to nasopharyngeal carcinoma cells. *Methods*: Telomerase activity of HNE－1 cell strain was analysed by PCR－ELISA technique. The expressions of bcl－2 gene and c－myc gene were detected by immunocytochemical method. *Results*: HNE－1 cells were incubated with 20μ mol/L AS－ODN for 1 day, the inhibition rate of telomerase activity was 61.6% . The S－ODN did not inhibit telomerase activity of HNE－1 cell strain at the same concentration . The score of HSCORE to c－myc gene was turned down from 3.65 to 1.98 when HNE－1 cells were incubated with 20μmol/L AS－ODN for 2 days, while it did not change significantly to bcl－2 gene at the same time. *Conclusion*: The AS－ODN inhibits telomerase activity of HNE－1 cell strain. This procedure is sequential specific. The AS－ODN inhibits the expression of c－myc gene, but has no significant influence in the expression of bcl－2 gene.

【Key words】 Antisense oligodeoxynucleotide; Telomerase; Oncogene

端粒是真核细胞染色体末端的重复结构,端粒酶是合成端粒重复序列的反转录酶。端粒酶的激活可维持端粒长度使细胞永生化。据报道在恶性肿瘤中,端粒酶阳性率高达 80%～95%,而在良性肿瘤和正常组织中,端粒酶阳性率不高于 4%[1,2]。因此端粒酶与恶性肿瘤的关系受到广泛的关注。研究反义寡核苷酸抑制端粒酶活性对癌基因的影响,有利于探讨体内端粒酶活性的内在调节机制,为研究的进一步深化打下基础。

1 材料和方法

作者介绍:曹 前(1971－),男,主治医师,硕士,主要研究方向:头颈肿瘤。

1.1 细胞

鼻咽癌 HNE－1 细胞株购自湖南医科大学湘雅医院。

1.2 主要试剂

端粒酶检测试剂盒(Roche 公司)bcl－2 检测试剂盒及 c－myc 单克隆抗体(北京中山公司) 寡核苷酸(上海生工根据要求在 DNA 合成仪上合成,为全硫代型。反义寡核苷酸序列为 5′－$(TTAGGG)_3$－3′,正义寡核苷酸序列为 5′－$(CCCTAA)_3$－3′。)

1.3 方法

1.3.1 端粒酶活性检测 采用 PCR－ELISA 测定原理。端粒酶自带模板将端粒重复片段(TTAGGG)加到生物素标记人工合成的 P1－TS 引物的 3′端,经 PCR 反复扩增 P1－TS 和 P2 引物间的特异产物,产生含有端粒特异的六核苷酸重复序列的 PCR 产物。将 PCR 产物变性后与地高辛标记

维普资讯 http://www.cqvip.com

并对端粒重复片段特异的探针杂交,杂交产物通过生物素标记的引物固定在抗生素蛋白包被的微孔板上,之后用与过氧化物酶结合的抗地高辛抗体检测固定的 PCR 产物。最后加入过氧化物酶的反应底物 TMB 便可产生着色反应产物。通过测定着色反应产物的光密度值(OD 值)反映端粒酶活性。具体步骤见 sigma 公司试剂盒说明书。

1.3.2 免疫细胞化学法测 bcl-2、c-myc 蛋白的表达 取对数生长期细胞,常规制成单细胞悬液,接种于预置有小玻片的 24 孔板,5.0×10^4/孔,加培养液量 2ml。分 3 组:对照组、20μ mol/L 反义寡核苷酸组、20μmol/L 正义寡核苷酸组。每 24h 重复加药 1 次,共培养 2 天。按免疫细胞化学 SABC 法操作检测 Bcl-2 和 C-myc 蛋白的表达。

结果判定根据着色程度和分布,用 HSCORE 评分作半定量分析[3]。HSCORE = $\sum$Pi(i+1),以 Pi 代表同一染色强度范围内阳性细胞所占百分比,变化范围为 0～100%,i 代表染色强度,以 1、2、3 分别代表弱、中、强 3 个染色强度(无着色时 i=0);HSCORE 最大值为 4。

1.4 *统计方法*

连续性变量用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组间比较用 t 检验。HSCORE 半定量评分用非参数 Wilcoxon 检验。

2 结 果

2.1 1 HNE-1 细胞端粒酶活性测定

表 1 显示:反义寡核苷酸可明显抑制 HNE-1 细胞的端粒酶活性,此作用随浓度升高而加强。

表 1 HNE-1 细胞端粒酶活性测定结果

组别	1d	3d
对照组	2.745±0.115	2.272±0.212
5μmol/L 正义寡核苷酸组	2.570±0.095	2.351±0.218
5μmol/L 反义寡核苷酸组	1.842±0.131*△	1.712±0.278*△
20μmol/L 正义寡核苷酸组	2.627±0.138	2.289±0.185
20μmol/L 反义寡核苷酸组	1.055±0.096*△	0.954±0.125*△
阳性对照	2.840±0.193	
阴性对照	0.444±0.089	

△与对照组比 $P<0.01$ *与同浓度同一时间正义寡核苷酸比 $P<0.01$

表 2 免疫细胞化学结果(HSCORE 评分)

组别	bcl-2	c-myc
对照组	3.36±0.78	3.65±0.83
正义寡核苷酸组	2.95±0.86	3.05±0.66
反义寡核苷酸组	3.32±0.73	1.98±0.27*

*与对照组比 $P<0.05$。



图 1 对照组 C-myc 胞浆、胞核阳性染色 SABC 400



图 2 S-ODN 组 C-myc 胞浆、胞核阳性染色 SABC 400



图 3 AS-ODN 组 C-myc 阴性,SABC 400



图 4 对照组 Bcl-2 胞浆、胞核阳性染色 SABC 400

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 5 S－ODN 组 Bcl－2 胞浆、胞核阳性染色 SABC 400

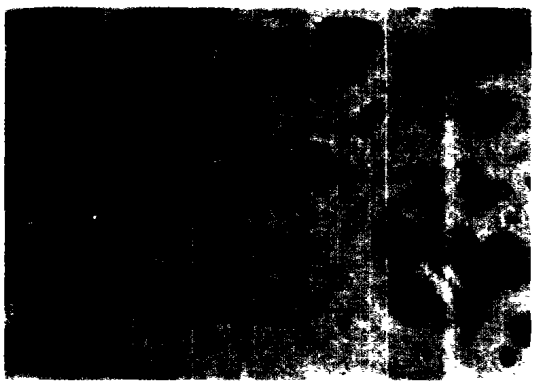


图 6 AS－ODN 组 Bcl－2 胞浆、胞核阳性染色 SABC 400

2.2 免疫细胞化学结果

图 1～3 为 C－myc 基因免疫细胞化学结果：对照组、S－ODN 组有较多细胞染成红色，胞浆和胞核均有着色，为阳性结果。AS－ODN 组细胞多不着色为阴性结果。图 4～6 为 Bcl－2 基因免疫细胞化学结果：3 组细胞均有不同程度着色，均为阳性结果。

3 讨 论

针对端粒酶 HTR 模板结构的反义寡核苷酸 5′－$(TTAGGG)_3$－3′与 HNE－1 细胞共同孵育。发现 5μmol/L 和 20μmol/L 反义寡核苷酸作用 24h，其端粒酶活性由 2.747 下降为 1.842 和 1.088，均明显抑制了鼻咽癌细胞的端粒酶活性，且此抑制作用随反义寡核苷酸浓度的升高而加强，表现出浓度依赖性。相同浓度的正义寡核苷酸作用相同的时间，其端粒酶活性分别为 2.570 和 2.627，与对照组相比无显著差异（$P>0.05$），说明此抑制作用是特定碱基序列而非硫代核苷酸骨架的作用，有序列特异性。其作用的可能机制为[4]：①反义寡核苷酸与 HTR 模板区碱基互补，阻碍了其作为模板逆转录合成端粒的功能。②硫代型反义寡核苷酸与 RNA 结合后，能激活细胞内的核糖核酸酶 H，使其特异性地降解与之结合的 RNA。本实验反义寡核苷酸抑制端粒酶活性未显示出时间依赖性，而且高浓度 AS－ODN（20μmol/L）作用3天后，其端粒酶活性为 0.954与阴性对照0.444间仍有明显差异（$P<0.01$）。说明在抑制端粒酶活性时，单用硫代型反义寡核苷酸效果还不够满意，可考虑用一些方法加强其作用：如①加用脂质载体以增强反义寡核苷酸进入细胞的能力[5]。②选用肽核酸替代硫代型反义寡核苷酸以增强与 RNA 结合的能力[6]。还可联合应用其它一些方法和策略，以加强对端粒酶活性的抑制作用，这些方法包括：①设计锤头酶切除 HTR 特异序列[7]；②HTR 模板序列突变；③编码端粒蛋白质成分的基因突变和蛋白质组分的抑制[8]；④抑制反转录过程或诱导细胞分化[9,10]。

恶性肿瘤的发生是一个多基因，多阶段的复杂过程，其中涉及多种癌基因和抑癌基因的表达异常。端粒酶是一种恶性肿瘤的标志物，其与多种癌基因、抑癌基因关系密切。研究二者的关系一方面有利于从基因水平探讨细胞内端粒酶的调控机制，另一方面也有助于从更深层次理解癌基因、抑癌基因与恶性肿瘤的关系，从而最终为恶性肿瘤的基因矫正或基因置换治疗打下基础。c－myc 是一个与生长增殖密切相关的癌基因。它与头颈癌及其高度浸润的生物学行为有关。研究发现[11]在端粒酶 HTERT 基因 5′端的部分启动子编码中有多个 c－myc 蛋白结合位点。转染含 c－myc 的质粒后，HTERT 的表达增加，端粒酶活性也增加。说明 HTERT 基因是 c－myc 转录的目标。反义抑制 c－myc 基因，其端粒酶活性随之下降[12]。反之，在正常细胞中导入端粒酶，可使 c－myc 过表达[13]。本研究显示，反义寡核苷酸抑制端粒酶活性后，c－myc 的表达也被抑制，说明二者间的调控是双向的。Bcl－2 是在凋亡研究中最重要的癌基因。由于在大多数恶性肿瘤中，端粒酶活化与 bcl－2 表达异常同时存在，因此研究二者之间的关系的文献较多。Mandal 等[14]用含 bcl－2 的质粒转染 Hela 细胞和人结肠 DiFi 细胞，发现其端粒酶活性升高了 5～12 倍。张传山等[15]设计了 bcl－2 的核酶，发现其对肝癌 SMMC7721 细胞在抑制 bcl－2 表达的同时也抑制了端粒酶活性。从而说明 bcl－2 蛋白的过度表达是端粒酶激活的重要途径之一。但另有一部分文献表明端粒酶与 bcl－2表达无关[16～18]。这可能由于不同肿瘤其端

维普资讯 http://www.cqvip.com

粒酶激活相关基因不同。本研究发现反义寡核苷酸抑制端粒酶活性对 bcl－2 的表达无明显影响。端粒酶与 bcl－2 的关系尚需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Shang JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer [J]. Eur J Cancer, 1997;33:787－791.

[2] Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, et al. Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle [J]. J Clin Invest, 1992;90:188－195.

[3] Kim NW. Clinical implications of telomerase in cancer [J]. Eur J Cancer, 1997;33(5):781－786.

[4] Carter G, Lemoine NR. Antisense technology for cancer therapy: does it make sense [J]? Br J Cancer, 1993;67:869－876.

[5] Chiang MY, Chan H, Zounes MS, et al. Antisense oligonucleotides inhibit intercellular adhesion molecule 1 expression by two distinct mechanisms [J]. J Bio Chem, 1991;266:18162－18171.

[6] Norton JC, Piatyszek MA Wright WE, et al. Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids [J]. Nature Biotech, 1996;14:615－619.

[7] Kanazawa Y, Ohkawa K, Veda K, et al. Hammerhead ribozyme－mediated inhibition of telomerase activity in extracts of human hepatocellular carcinoma cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996;225(2):570－574.

[8] 谭端军，王文雯. 以限制端粒扩充为靶点的肿瘤治疗新思路和新策略[J]. 国外医学肿瘤学分册，1998;6:332－335.

[9] Zhu XL, Kumar R, Mandal M, et al. Cell cycle－dependent modulation of telomerase activity in tumor cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996;93:6091－6095.

[10] Holt SE, Wright WE, Shay JW, et al. Regulation of telomerase activity in immortal cell lines [J]. Mol Cell Biol, 1996;6:2932－2939.

[11] Greenberg RA, O'Hagan RC, Deng H, et al. Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c－myc but is not functionally equivalent in cellular transformation [J]. Oncogene, 1999;18(5):1219－1226.

[12] Fujimoto K, Takahashi M. Telomerase activity in human leukemic cell lines is inhibited by antisense pentadecadeoxynucleotides targeted against c－myc mRNA [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997;243(3):775－781.

[13] 孙 英，童坦君. 正常细胞中导入端粒酶可使 c－myc 过表达，出现癌变危险[J]. 生理科学进展，2000;31(4):360.

[14] Mandal M, Kumar K. Bcl－2 modulates telomerase activity[J]. J Biol Chem, 1997;272(22):14183－14187.

[15] 张传山，王文亮，彭玮丹，等. Bcl－2 核酶对 SMMC7721 细胞的促凋亡机制[J]. 世界华人消化杂志，2000;8(4):417－419.

[16] Kunimura C, Kikuchi K, Ahmed N, et al. Telomerase activity in a specific cell subset co－expressing integrin beta 1 EGFR but not p75 NGFR/bcl－2/integrin beta 4 in normal human epithelial cells [J]. Oncogene, 1998;17(16):187－197.

[17] Okayasu I, Mitomi H, Yamashita K, et al. Telomerase activity significantly correlates with cell differentiation, proliferation and lymph node metastasis in colorectal carcinomas [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1998;124:444－449.

[18] Scheid S, Heinzinger M, Waller CF, et al. Bcl－2 mRNA－targeted ribozymes effects on programmed cell death in chronic myelogenous leukemia cell cubes [J]. Ann Hematol, 1998;76:117－125.

(上接第 139 页)胞因子组合可以从脐血、胚肝、骨髓、外周血培养扩增大量 DC，然而胚肝、骨髓来源困难，不适宜临床应用，脐血来源方便，但其抗原提呈功能弱于外周血来源的 DC[3]，王月丹[4]等比较不同来源的树突状细胞，发现外周血单核细胞诱导分化的树突状细胞，其抗原提呈能力最强。因此，本实验从正常人外周血中分离单核细胞，用 GM－GSF 和 IL－4 组合诱导分化树突状细胞，经形态学、功能学及特异标记鉴定为典型的树突状细胞。用模拟体内实验的方法体外诱导出针对肝癌细胞抗原的特异性 CTL。结果表明，DC 诱导的 CTL 对 $HepG_2$ 有较强的杀伤效应，杀伤率为 71.6%，而对肺癌细胞杀伤率仅为 23.1%，这说明 DC 诱导的 CTL 不仅高效，而且具有较高的特异性。

参 考 文 献

[1] 李用国，罗云萍，梁增伟，等. 人外周血树突状细胞的体外培养扩增[J]. 重庆医科大学学报，2001;26(1):1－3.

[2] 巴德年，何 维. 当代免疫学技术与应用[M]. 第 1 版，北京：北京医科大学中国协和医科大学联合出版社，1998;212－216.

[3] 范国昌. 树突状细胞疫苗的制备及其临床应用研究[J]. 国外医学肿瘤学分册，2000;27(2):97－100.

[4] 王月丹，谢 玮，邱玉华，等. 细胞因子诱导不同来源的贴壁型细胞分化为树突状细胞的研究[J]. 上海免疫学杂志，2000;20(3):140－143.