DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.24.013
第25卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 24
2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

文章编号:1000-5404(2003)24-2193-03

论著

hTRT反义基因转染对肝癌细胞端粒酶亚单位及细胞周期的影响

杨仕明,房殿春,杨金亮,罗元辉,鲁 荣,刘为纹 (第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心,重庆 400038)

提 要:目的 探讨人端粒酶蛋白催化活性亚单位(Human telomerase reverse transcriptase, hTRT)反义基因转染对$HepG_2$肝癌细胞株端粒酶亚单位及细胞周期的影响。方法 采用流式细胞仪检测hTRT正义基因转染的$HepG_2$细胞($HepG_2$-S)以及hTRT反义基因转染的$HepG_2$细胞($HepG_2$-AS)的细胞周期,采用RT-PCR法检测上述细胞hTRT、端粒酶RNA(hTR)、端粒酶相关蛋白1(TP1)以及c-myc和bcl-2基因的变化,同时采用Western blot检测hTRT蛋白质的变化。结果 $HepG_2$-AS出现G_0/G_1期阻滞,增殖指数增加,凋亡率亦明显增加,进一步研究发现,$HepG_2$-AS端粒酶亚单位hTRT在蛋白质和mRNA水平均表达减少,而TP1、hTR无明显变化,bcl-2和c-myc mRNA的表达亦明显下调。结论 hTRT反义基因不仅可以下调$HepG_2$细胞hTRT mRNA和蛋白质的表达,而且可以下调c-myc、bcl-2 mRNA的表达,从而一方面降低端粒酶活性,另一方面一定程度增加凋亡细胞的比率,抑制肝癌细胞的生长。

关键词:人端粒酶蛋白催化活性亚单位;反义基因治疗;肝癌
中图法分类号:R394.3;R730.23;R735.7 文献标识码:A

Effect of antisense gene transfection to human telomerase reverse transcriptase on telomerase subunits and cell cycle of $HepG_2$

YANG Shi-ming, FANG Dian-chun, YANG Jin-liang, LUO Yuan-hui, LU Rong, LIU Wei-wen (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of antisense gene to human telomerase reverse transcriptase(hTRT) on telomerase subunits and cell cycle of $HepG_2$. **Methods** Cell cycles in $HepG_2$, $HepG_2$-S and $HepG_2$-AS were examined by flow cytometry. Telomerase subunits(hTR, hTRT, TP1), c-myc and bcl-2 mRNA were detected by RT-PCR. Meanwhile, protein in transfected and untransfected cells was determined by Western blotting. **Results** Flow cytometric analysis displayed an accumulation of cells in the G_0/G_1 phase of cell cycle and a decreased percentage of proliferative index after transfection with antisense gene of hTRT. Further studies showed expression levels of hTRT, bcl-2 and c-myc were down-regulated in $HepG_2$-AS, but hTR and TP1 remained unchanged in all kinds of cells. **Conclusion** hTRT antisense gene can down-regulate the expression levels of hTRT mRNA and protein as well as the expression levels of c-myc and bcl-2 mRNA in $HepG_2$ cell, suggesting that hTRT antisense gene can not only decrease the telomerase activity but also partially induce apoptosis in cancer cells.

Key words: human telomerase reverse transcriptase (hTRT); antisense gene therapy; hepatocellular carcinoma cell line

我们以前的研究表明,肝癌组织中端粒酶阳性率可高达80%,不仅在肝癌组织中,而且在部分癌前肝组织中亦存在端粒酶的表达,提示端粒酶在肝癌的发生发展中可能具有重要作用[1]。进一步研究显示,采用反义技术,将端粒酶蛋白催化亚单位(Human telomerase reverse transcriptase, hTRT)反义基因导入$HepG_2$肝癌细胞中,可以明显抑制肝癌细胞的生长,部分逆转其恶性表型[2],但其机制尚不清楚。本研究拟从细胞周期及端粒酶相关基因和凋亡相关基因的角度,来研究反义hTRT基因逆转肝癌细胞株的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

$HepG_2$肝癌细胞株由本室保存;RT-PCR试剂盒购自Promega公司;1640培养基、琼脂糖购自GIBCO公司;hTRT多克隆抗体购自Santa Cruz公司;端粒酶RNA(Human telomerase RNA, hTR)、端粒酶蛋白催化亚单位(Human telomerase reverse transcriptase, hTRT)、端粒酶相关蛋白1(Telomerase associated protein

作者简介:杨仕明(1970-),男,湖南省双峰县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事端粒酶在肿瘤诊断及治疗方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68754124

收稿日期:2002-12-13;修回日期:2003-03-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1，TP1）以及 c-my、bcl-2、GAPDH 的引物按文献由上海申工生物技术工程公司合成；其余试剂均为国产优质分析纯。

1.2 方法

① $HepG_2$、$HepG_2$-S、$HepG_2$-AS 细胞在含 10% 小牛血清的 1640 培养基中，于 37℃、5% CO_2、饱合湿度下培养。② 采用流式细胞术检测细胞凋亡及细胞周期[3]。③转染细胞 hTRT 蛋白的检测采用 Westem blot 法[4]。④转染细胞端粒酶亚单位以及 bcl-2 和 c-myc mRNA 的检测采用 RT-PCR 一步法，以 GAPDH 为外参照[3]。

1.3 统计学分析

对相关资料进行 t 检验。

2 结果

2.1 转染细胞细胞凋亡及细胞周期的变化

$HepG_2$-AS 细胞凋亡数明显增加，G_0/G_1 期细胞亦明显增加，而 S 和 G_2/M 期细胞明显减少，增殖指数减少（$P<0.05$，$P<0.01$），而 $HepG_2$-S 细胞凋亡数较 $HepG_2$ 细胞明显减少（$P<0.01$），但其他期细胞无明显变化，见表 1。

表 1 **hTRT** 正、反义基因对 **$HepG_2$** 细胞周期及凋亡的影响（$\bar{x}\pm s$，%）

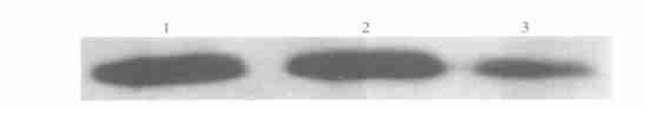
Tab 1 Effect of sense and antisense hTRT on cell cycle and apoptosis of $HepG_2$（$\bar{x}\pm s$，%）

Cell type	Rate of apoptosis	G_0/G_1	G_2/M	S	Proliferation index
$HepG_2$	4.5±0.46	50.9±4.69	4.4±0.95	44.7±4.14	49.1±4.69
$HepG_2$-S	2.6±0.32**	55.7±3.24	3.1±1.51	41.2±3.42	44.3±3.29
$HepG_2$-AS	7.2±0.53**##	62.8±0.57*#	4.1±0.45	33.1±0.79**##	37.2±0.57*#

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* $HepG_2$；#：$P<0.05$，##：$P<0.01$ *vs* $HepG_2$-S

2.2 hTRT 反义基因对 $HepG_2$ 内源性 hTRT 蛋白表达的影响

采用 Westem blot 检测 $HepG_2$、$HepG_2$-S 和 $HepG_2$-AS 蛋白表达的变化，发现 $HepG_2$-S 变化不明显，而 $HepG_2$-AS 的 hTRT 蛋白水平明显下降，见图 1。



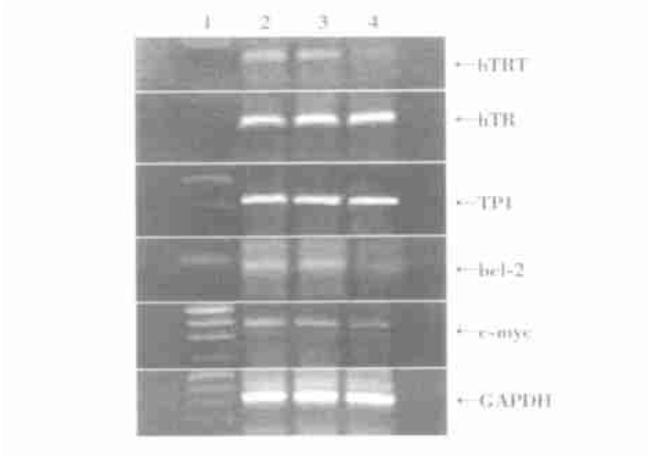
1：$HepG_2$；2：$HepG_2$-S；3：$HepG_2$-AS

图 1 **hTRT** 正、反义基因转染对 **$HepG_2$** 细胞内源性 **hTRT** 翻译的影响

Fig 1 Effect of sense and antisense hTRT transfection on endogenous translation of hTRT in $HepG_2$

2.3 hTRT 反义基因对 $HepG_2$ 端粒酶亚单位和 c-myc 以及 bcl-2 mRNA 转录的影响

采用 RT-PCR 技术扩增 hTRT、hTR 和 TP1 基因，发现 hTRT 正、反义基因转染后，hTR 和 TP1 的转录无明显变化，而 hTRT 反义基因转染后 $HepG_2$-AS 细胞 hTRT 的表达明显减少，同样观察到 c-myc 和 bcl-2 mRNA 的表达亦明显减少，见图 2。



1：Marker；2：$HepG_2$；3：$HepG_2$-S；4：$HepG_2$-AS

图 2 **hTRT** 正、反义基因转染对 **$HepG_2$** 细胞端粒酶亚单位和 **c-myc**、**bcl-2** 基因转录的影响

Fig 2 Effect of sense and antisense hTRT on transcription of telomerase subunits and c-myc，bcl-2 in $HepG_2$

3 讨论

有研究表明，与 hTR 和 TP1 不同，hTRT 仅在恶性肿瘤组织及部份癌前病变中表达，而正常组织中除胚胎细胞及干细胞外基本不表达[1,5]，将 hTR 和 hTRT 体外进行重组，人工构建的端粒酶亦具有合成端粒重复序列的功能[6]，而将 hTRT 基因导入无端粒酶活性的正常体细胞中，转染细胞端粒酶被激活，体外倍增次数明显增加[7]，提示 hTRT 在端粒酶组份中是端粒酶活性的限速成分。基于以上认识，我们在以往研究的基础上[1,2]，采用流式细胞术检测 hTRT 正反义基因转染的 $HepG_2$ 细胞的细胞周期变化，结果显示 $HepG_2$-AS G_0/G_1 期细胞增加，S 和 G_2/M 期细胞减少，增殖指数减少，提示反义 hTRT 基因确有抑制肝癌细胞增殖的能力。

Kondo 等[8] 将反义 hTR 基因导入恶性胶质瘤细胞，他们发现反义 hTR 对细胞的抑制作用是通过诱导凋亡及分化两条途径实现的。我们曾将 hTR 和 hTRT 反义基因分别导入 SGC-7901 胃癌细胞中，发现细胞凋亡的量虽明显增加，但也只 10% 左右[3,9]。本研究将反义 hTRT 导入 $HepG_2$ 细胞中，发现虽然细胞凋亡率较未转染组明显增加，但最高也不超过 8.0%，而且我们还发现正义 hTRT 基因转染的细胞凋亡明显减少，因此，我们认为反义 hTRT 基因对 $HepG_2$ 细胞的生长抑制作用，诱导凋亡可能只是其中的一种机制。

虽然反义 hTRT 作用后 $HepG_2$ 细胞凋亡比例并不是很高，但进一步研究显示作为细胞凋亡抑制基因 bcl-2 和 c-myc 在转录明显下降。Mandal 等[10] 将 bcl-2

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

基因转染 HeLa 细胞、人结肠癌 DiFi 细胞及鼠 IL-2 依赖的 T 淋巴细胞(CTLL-2), 发现转染细胞端粒酶活性均上调, 进一步研究显示在 CTLL-2 细胞培养基中不加 IL-2, 8 h 后显示细胞 bcl-2 表达减少, 端粒酶活性下调, 但未显示凋亡细胞及 G_0/G_1 期细胞增加, 相反加入 IL-2 后, bcl-2 的表达和端粒酶活性明显上调, 提示 bcl-2 基因具有调控端粒酶活性的作用。Wang 等[11] 将 Myc 基因转染二倍体正常人体细胞, 发现转染后的细胞可以上调端粒酶 hTRT 基因的表达, 从而增加端粒酶活性, 但不增加 hTR 基因的表达, 提示 myc 基因可以通过上调 hTRT 基因的表达来上调端粒酶活性。最近, 有学者在克隆的 hTRT 启动子基因中发现有 c-myc 基因的结合位点, 这是目前发现的 c-myc 基因对 hTRT 表达调控的最直接有力的证据[12,13]。本研究结果表明, 反义 hTRT 基因可下调 $HepG_2$ 肝癌细胞株 hTRT 基因的表达, 从而降低端粒酶活性的同时, 而且亦可以下调 bcl-2 和 c-myc 基因的表达, 从而提示 hTRT 和 bcl-2、c-myc 基因之间可能存在相互调节的作用。

综上所述, 反义 hTRT 基因可以下调 $HepG_2$ 肝癌细胞株 hTRT、bcl-2、c-myc 基因的表达, 一方面降低端粒酶活性, 另一方面可以部分增加细胞凋亡的比率, 从而抑制细胞的生长。端粒酶 hTRT 基因作为端粒酶活性的限速基因, 有可能成为肝癌以及其它肿瘤基因治疗的一个良好靶点。

参考文献:

[1] 罗元辉, 房殿春, 杨仕明, 等. 端粒酶在原发性肝癌中的表达及临床意义[J]. 中华肝脏病杂志, 1998, 6(3): 133－135.

[2] 杨仕明, 房殿春, 刘爱民, 等. 端粒酶蛋白催化亚单位反义基因对 $HepG_2$ 细胞恶性表型的逆转作用[J]. 中华肝脏病杂志, 2002, 10(2): 97－99.

[3] 杨仕明, 房殿春, 杨金亮, 等. 人端粒酶蛋白催化亚单位反义基因转染对胃癌细胞恶性表型的逆转作用[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(8): 934－937.

[4] 李永明, 赵玉琪. 实用分子生物学方法手册[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 366.

[5] 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.

[6] Beattie T L, Zhou W, Robinson M O, *et al*. Reconstitution of human telomerase activity *in vitro*[J]. Curr Biol, 1998, 8(3): 177－180.

[7] Bodnar A G, Ouellette M, Frolkis M, *et al*. Extension of lifespan by introduction of telomerase into normal human cells[J]. Science, 1998, 279(5349): 349－352.

[8] Kondo S, Tanaka Y, Kondo Y, *et al*. Antisense telomerase treatment: induction of two distinct pathways, apoptosis and differentiation[J]. FASEB J, 1998, 12(10): 801－811.

[9] Yang J L, Fang D C, Yang S M, *et al*. Effect of antisense human telomerase RNA on malignant behaviors of gastric carcinoma cell line SGC－7901[J]. J Med Coll PLA, 2001, 16(4): 255－259.

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

[11] Wang J, Xie L Y, Allan S, *et al*. Myc activates telomerase[J]. Genes Dev, 1998, 12(12): 1769－1774.

[12] Takakura M, Kyo S, Kanaya T, *et al*. Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells[J]. Cancer Res, 1999, 59(3): 551－557.

[13] Wu K J, Grandori C, Amacker M, *et al*. Direct activation of TERT transcription by c-myc[J]. Nat Genet, 1999, 21(2): 220－224.

（编辑　陈聪连）

关于医学符号的使用

统计学符号不论用哪种字母, 也不论大写或小写一律都用斜体。要注意区分拉丁字母和希腊字母。例如均数的符号是字母 $\bar{x}$, 卡方的符号是希腊字母 χ^2, 自由度的符号是希腊文“υ”, 不是拉丁文“V”。样本的相关系数是英文“*r*”, 不能误为希腊文“γ”。

化学元素及核素在医学写作时一般多采用符号, 都是拉丁字母正体大写。离子态是在右上角用数字加“－”或“＋”表示。例如 Na^+、Ca^{2+}、P^{3-} 等等, 不采用 Ca^{++}、P^{---}、Al^{+3}、O^{-2} 表示。核素的核子素(质量数)应写在元素符号的左上角, 例如: ^{131}I、^{32}P。表示激发状态的 m 写在右上角, 例如: $^{99}Tc^{m}$、$^{133}In^{m}$。在科技论文和专著中不应写核素的中文名称, 即不能写成^{131}碘、铟^{133m}、P^{32}、Tc^{99m}。

近几年分子生物学发展很快, 并已渗透到许多学科, 大多数分子生物学名词术语的符号已有统一的确定形式, 要对符号的来源及其内涵有深刻的了解, 使用时不致发生错误, 例如: RNA 有 rRNA(ribosomal RNA)、tRNA(transfer RNA)、mRNA(messenger RNA)3 类。r、t、m 是表示类型的符号应小写, RNA 应大写。

本刊编辑部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net