

· 实验研究 ·

RNAi 抑制 hTERT 基因治疗乳腺癌的实验研究

曾晓华 刘长安 邓建川

【摘要】 目的 利用 siRNA 在乳腺癌细胞内诱导 RNAi, 抑制 hTERT 基因表达, 在体外细胞水平探讨 RNAi 对乳腺癌治疗的可行性。方法 构建靶向 hTERT 基因的 siRNA (hTERT-siRNA), 转导入乳腺癌 MCF-7 细胞, 在瘤细胞内诱导 RNAi, 采用细胞增殖抑制实验、RT-PCR 法、Western blot 等技术检测 siRNA 处理前后瘤细胞增殖及 hTERT 基因表达变化。结果 hTERT-siRNA 对乳腺癌细胞生长抑制率达 43%; hTERT 基因的 mRNA 表达明显降低, 蛋白表达平均下调了 39.8%。结论 siRNA 在体外明显抑制了乳腺癌细胞中 hTERT 基因的表达和瘤细胞增殖。

【关键词】 RNAi; 乳腺癌; hTERT

【中图法分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Experimental research of targeting hTERT gene inhibited in breast cancer therapy by RNA interference Zeng Xiaohua, Liu Chang'an, Deng Jianchuan. General Department, the Second Hospital, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400010, China

【Abstract】 Objective To investigate the feasibility and specificity of breast cancer gene therapy, we utilized RNAi to inhibit hTERT gene expression in MCF-7 cells of breast cancer. **Methods** Small interference RNA (siRNA) homologous to hTERT gene (hTERT-siRNA) was recombined with pGenesil-1 vector, then transfected it into MCF-7 cells of breast cancer to induce RNAi, and then detected hTERT gene expression alterations and tumor cell proliferation in both hTERT-siRNA treatment groups and control groups by MTT assay, RT-PCR and Western blot. **Results** The expression of hTERT had been obviously inhibited by siRNA. The inhibition rate of cell proliferation was 43%. The mRNA level of hTERT was obviously decreased, and its protein expression reduced by 39.8%.

Conclusions siRNA-hTERT effectively inhibited hTERT gene expression and breast cancer cell proliferation in vitro.

【Key words】 RNAi; Breast cancer; hTERT

乳腺癌的发生、发展及预后与端粒酶的异常表达密切相关,其在乳腺癌中的表达阳性率高达93%,癌旁组织和正常乳腺组织中几乎不表达^[1]。而端粒酶催化亚基(hTERT),与乳腺癌关系更为密切,在乳腺癌发生的早期就有表达,随着肿瘤的进展,hTERT在单个肿瘤细胞中的表达量不断增加,且表达hTERT的肿瘤细胞数也相应增多,表明端粒酶在乳腺癌发生早期就有激活,并随肿瘤的发展而增加^[2]。

本实验依据RNA干扰(RNA interference, RNAi)原理,使用短发夹样RNA(small hairpin RNA, shRNA)设计的RNAi-DNA载体方法^[3],以hTERT基因为靶点,从体外细胞水平研究siRNA特异诱导hTERT基因转录后沉默,逆转乳腺癌细胞恶性表型的能力,探讨RNAi治疗乳腺癌细胞的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 乳腺癌MCF-7细胞株购自上海细胞生物研究所。在含10%胎牛血清的DMEM培养液,37℃ 5% CO₂ 孵箱中培养。

1.1.2 质粒 质粒pGenesil-1购自武汉晶赛生物工程技术有限公司。

1.1.3 试剂 限制性内切酶BamH I、Hind III和EcoR I购自Takara公司,总RNA提取试剂、转染试剂Lipofectamine™ 2000购自Invitrogen公司;PCR试剂购自Takara公司;TERT抗体购自博士德公司;siRNA-hTERT转录模板由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 pGenesil-hTERT-siRNA质粒构建

shRNA发夹结构序列长度为65 bp,两端分别为BamH I、Hind III酶切位点,中间为9 bp茎环序列分隔的反向重复靶序列,并以6个T作为RNA聚合酶III的转录终止子。质粒构建采用BamH I、Hind III双酶切空质粒pGenesil-1,将shRNA-hTERT转录模板5'-AAGTGTACAGCCTGTTTCTG-3'(AF015950 nucleotides 2 995 ~ 3 016)和阴性对照转录模板5'-AAGCTTCATAAGGCGCAT-AGC-3'(与人基因无同源性)分别设计成发夹结构,定向克隆至该载体上,经筛选、酶切鉴定后,进行测序确定,命名为pGenesil-hTERT-siRNA,阴性对照命名为pGenesil-PK-siRNA。

1.3 质粒转染

采用 Lipofectamine™ 2000 脂质体转染法。转染前1 d, 换取无抗生素培养液后调整细胞浓度为 2×10^5 个/ml, 以 2 ml/孔接种于 6 孔培养板中培养。待细胞增至 90% ~ 95% 时, 将质粒-脂质体复合物转染至细胞中(质粒: 脂质体 = 1: 4), 37 °C, 5% CO₂ 在无血清、无抗生素的培养液培养 16 ~ 18 h 后换 G418 选择培养液, 继续培养 72 ~ 96 h 后检测各指标。

1.4 MTT 实验

收集对数生长期的乳腺癌 MCF-7 细胞, 接种 96 孔板, 细胞终密度为 2×10^4 /孔, 每个样本设 3 个平行孔, 每孔总体系 200 μl, 试剂空白以无血清 DMEM 培养液补足。37 °C, 5% CO₂ 孵箱中培养 24 h, 在每孔中加入四甲基偶氮唑蓝(MTT, 浓度为 0.5 mg/ml), 继续培养 4 h, 弃上清, 加入二甲基亚砷 200 μl, 振荡 5 min, 酶标仪(570 nm)读取 A 值。细胞增殖抑制率 = (1 - 实验组平均 A 值/对照组平均 A 值) × 100%。

1.5 RT-PCR

RT 采用说明书 M-MLV 逆转录酶标准体系, 37 °C 反应 60 min。PCR 扩增采用 50 μl 反应体系, 内含 cDNA 4 μl, 相关引物 20 pmol, 5 μl 10 × buffer, 4 μl 25 mmol/L MgCl₂, 1 μl 10 μmol/L dNTP, Taq 酶 2.5 U。按下述条件进行循环: hTERT 94 °C 60 s, 60 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35 cycles; 同时做 GAPDH 内对照。hTERT 引物, 正义: 5'-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3'; 反义: 5'-GGATGAAGCGGAGTCTGGA-3' (扩增产物 145 bp)。GAPDH 引物, 正义: 5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3'; 反义: 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3' (扩增产物 208 bp)^[4]。以水作为阴性对照。扩增产物 2% 琼脂糖凝胶电泳 30 min (80 V), EB (0.5 μg/ml) 染色, 用 BIO-RAD 图象分析仪上观察并扫描制片, 记录结果。

1.6 Western blot 检测 hTERT 蛋白表达变化

收集常规培养的乳腺癌细胞 MCF-7 2×10^6 个, 提取核蛋白, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样本和分子量标准, 将蛋白样本转移至 PVDF 膜上, 蛋白封闭液 37 °C 封闭 PVDF 膜 1 小时, PBST 洗涤, 加一抗(1: 300) 37 °C 孵育 4 h, PBST 振荡洗涤 2 次, 加二抗(1: 200) 37 °C 孵育 20 min, PBST 洗涤 4 次, 5 min/次, DAB 室温显色, 显影, 记录结果。

1.7 统计学方法

采用 SPSS10.0 软件进行统计学分析, 组间差异比较采用 *t* 检验。P <

0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定

质粒 pGenesil-hTERT-siRNA 和 pGenesil-PK-siRNA 经 Hind III 和 EcoR I 双酶切,同时做 pGenesil-1 空载体双酶切对照。20 g/L 琼脂糖电泳, pGenesil-1 空载经双酶切后呈 2 条带,分别为 4.54 kb 的载体片段和 364 bp 的小片段;而重组质粒则为 4.54 kb 的载体片段和 425 bp 的目的片段。测序结果均正确。

2.2 细胞增殖抑制实验

pGenesil-hTERT-siRNA 处理组中,乳腺癌 MCF-7 细胞平均增殖抑制率达到 43%,明显高于 pGenesil-PK-siRNA 处理组(17%),两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

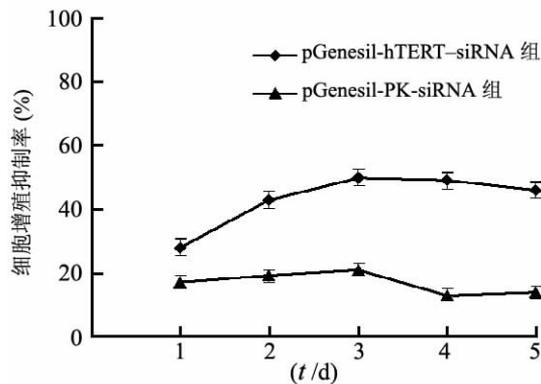


图1 MCF-7 细胞增殖抑制实验

2.3 RT-PCR 检测 hTERT mRNA 表达

阴性对照 pGenesil-PK-siRNA 组与未处理乳腺癌 MCF-7 细胞组间无差别;pGenesil-hTERT-siRNA 处理组中,hTERT mRNA 表达均明显降低,与阴性对照 pGenesil-PK-siRNA 处理组相比,两者比较差异具统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

2.4 Western blot 检测 hTERT 蛋白表达变化

与阴性对照 pGenesil-PK-siRNA 处理组相比,pGenesil-hTERT-siRNA 处理组中 hTERT 蛋白表达明显降低(图 3)。通过内参 β -actin 进行定量分析,与阴性对照组比较,pGenesil-hTERT-siRNA 处理组中 hTERT 蛋白表达平均降低了 39.8%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

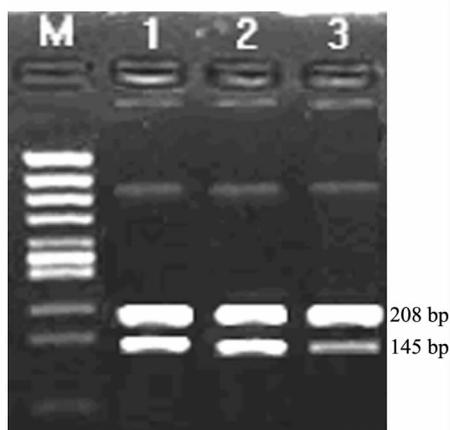


图2 乳腺癌 MCF-7 细胞 hTERT 的 mRNA 表达

M:Maker; 1:未处理组; 2:pGenesil-PK-siRNA 处理组; 3:pGenesil-hTERT-siRNA 处理组

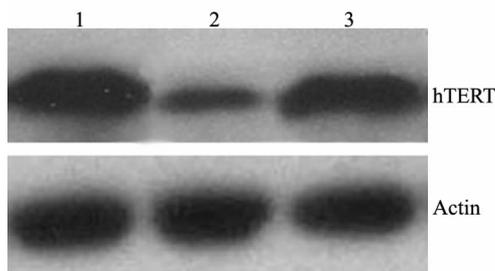


图3 乳腺癌 MCF-7 细胞 hTERT 蛋白表达变化

1:未处理组; 2:pGenesil-hTERT-siRNA 处理组; 3:pGenesil-PK-siRNA 处理组

3 讨论

端粒酶是一种核糖核蛋白酶,由 RNA 和蛋白质组成,具有逆转录酶的功能,能以自身的 RNA 为模板合成端粒 DNA,从而维持端粒的长度。在正常人体细胞,端粒随细胞分裂而进行性缩短,当达到一定程度,细胞就衰老死亡。端粒酶的激活可使端粒长度保持相对稳定,从而使细胞获得永生化,进一步发生癌变,提示端粒酶的激活与恶性肿瘤发生、发展密切相关^[5]。

由于 hTERT 在正常乳腺组织细胞中不表达,而特异性地表达在乳腺癌细胞中,且在乳腺癌的发生、发展中起重要作用,因此,hTERT 有望成为新的乳腺癌治疗靶点。

近年来,利用端粒酶抑制剂治疗乳腺癌的研究取得一定进展,研究者发现阳离子卟啉 TMP4 能抑制 MCF-7 细胞的端粒酶活性并具有时间及浓度依赖性,且将细胞生长阻止于 G2/M 期^[6]。逆转录酶抑制剂 AZT 不仅能有效地抑制乳腺癌细胞中端粒酶的活性,并能抑制乳腺癌细胞的生长以及软琼脂集落形成能力^[7]。这些研究结果表明,抗端粒酶治疗可能成为从分子水平上治疗乳腺癌的一种新手段,端粒酶抑制剂可能达到治疗乳腺癌的目的。

RNAi 近年发展迅速,已成为分子生物学研究的主要技术手段之一,在人类基因功能研究、信号转导研究及基因治疗方面已显示出巨大的前景。目前,利用 RNAi 对白血病^[8]、艾滋病^[9]、乙型肝炎^[10]、丙型肝炎^[11]的治疗研究已取得一定进展,成功地抑制了相关基因的表达。然而,利用 RNAi 抑制 hTERT 基因进行乳腺癌的治疗性研究探讨,国内还鲜见报道。

在本研究中,我们利用 RNAi-DNA 载体技术,以 hTERT 基因为靶点,用 hTERT 高表达的乳腺癌细胞为研究对象,设计、构建、筛选靶向 hTERT 基因的小干扰 RNA,从体外细胞水平,研究 siRNA 特异诱导 hTERT 基因转录后沉默,逆转乳腺癌细胞恶性表型的能力。试验结果显示,靶向 hTERT 基因的 siRNA 能在乳腺癌 MCF-7 细胞中特异诱导 RNAi,从 RNA 和蛋白水平降低了 hTERT 基因的表达抑制了 MCF-7 细胞的增殖,逆转了乳腺癌细胞的恶性表型,为乳腺癌基因治疗的临床应用开辟了新的思路。

参考文献

- [1] Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T, *et al*. Telomerase activity in human breast tumors[J]. J Natl Cancer Inst,1996,88: 116 - 122.
- [2] Kolquist K A, Ellisen L W, Counter C M, *et al*. Expression of TERT in early premalignant lesions and a subset of cells in normal tissues[J]. Nat Genet,1998,19:182 - 186.
- [3] Sui G, Soohoo C, Affarel B, *et al*. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells [J]. Proc Natl Acad Sci,2002,99:5515 - 5520.
- [4] Zou L, Luo C L, Tu Z G, *et al*. Expression of hTERT and c-myc mRNA in transitional cell carcinoma of the bladder[J]. Chinese Medical J,2002,16:103 - 106.
- [5] Shay J W, Van Der Haegen B A, Ying Y, *et al*. The frequency of immortalization of human fibroblasts and mammary epithelial cells transfected with SV40 large T-antigen[J]. Exp Cell Res,1993,209:45 - 52.
- [6] Izbicka E, Wheelhouse R T, Raymond E, *et al*. Effects of cationic porphyrins as G-quadruplex interactive agents in human tumor cells[J]. Cancer Res,1999,59:639 - 644.
- [7] Melana S M, Holland J F, Pogo B G. Inhibition of cell growth and telomerase activity of breast cancer cells in vitro by 3'-azido-3'-deoxythymidine[J]. Clin Cancer Res,1998,4:493 - 696.
- [8] Wilda M, Fuchs U, Wossmann W, *et al*. Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi)[J]. Oncogene,2002,21:5716 - 5724.
- [9] Barnor J S, Miyano-Kurosaki N, Yamaguchi K, *et al*. Lentiviral-mediated delivery of combined HIV-1 decoy TAR and Vif siRNA as a single RNA molecule that cleaves to inhibit HIV-1 in transduced cells[J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids,2005,24:431 - 434.
- [10] Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression replication by RNA interference[J]. Hepatology,2003,37: 764 - 770.
- [11] Kapadia S B, Brideau-Andersen A, Chisari F V. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs[J]. Proc Natl Acad Sci,2003,100:2014 - 2018.

(收稿日期:2006-08-15)

(本文编辑:周艳)