

shRNA 介导 *chTERT* 基因沉默抑制 MDCC-MSB1 细胞增殖

邹亚学^{1,2}, 杜利强¹, 孙莹², 潘风光², 郑梅竹², 艾永兴², 张玉静^{2*}, 刘朋朋^{1,3*}, 赵丽⁴, 安翠萍⁴, 卢鹤真⁵, 姚传玉⁶ (1.河北科技师范学院 生命科学学院, 河北 秦皇岛 066000; 2.吉林大学 动物科学学院, 吉林 长春 100101; 3.中国科学院动物研究所 国家野生动物疫病研究中心, 北京 100101; 4.石家庄市第一医院 检验科, 河北 石家庄 050017; 5.河北省人民医院 生殖遗传科, 河北 石家庄 050017; 6.青县人民医院 疼痛科, 河北 青县 062650)

摘要:几乎所有类型的人类肿瘤都可以检测到端粒酶的活性,通过抑制端粒酶逆转录酶基因(*TERT*)表达降低端粒酶活性可能是进行抗肿瘤治疗的一个新靶点。本试验通过构建靶向端粒酶 *TERT* 基因的 shRNA(Sh1, Sh2 和 Sh3)表达质粒载体转染 MDCC-MSB1 细胞抑制 *chTERT* 基因表达,从而降低端粒酶活性及细胞增殖。Real-time PCR 结果显示,Sh1 和 Sh3 在质粒载体转染细胞后 48, 72, 96 h 显著抑制 *chTERT* 基因表达($P < 0.05$),且呈持续效果;TRAP 法端粒酶活性分析显示,Sh1 和 Sh3 在质粒转染细胞 72 h 显著降低端粒酶活性;流式细胞分析显示,Sh3 在转染后 72 h 显著降低了 S 期细胞的比例($P < 0.01$),G2/M 期细胞比例显著上升($P < 0.01$),G0/G1 期细胞比例没有明显变化($P > 0.05$),抑制了 MDCC-MSB1 细胞的增殖。结果提示,shRNA 通过抑制 *TERT* 基因表达可有效降低端粒酶活性,阻滞肿瘤细胞的增殖,为抗癌治疗提供了新的备选方案及具有参考价值的基础科学数据。

关键词:癌症;端粒酶;端粒酶逆转录酶;shRNA;端粒酶活性;细胞增殖

中图分类号: S852.23; S853.53

文献标志码: A

文章编号: 1005-4545(2017)12-2350-08

DOI: 10.16303/j.cnki.1005-4545.2017.12.19

chTERT silencing mediated by shRNA inhibits MDCC-MSB1 cell proliferation

ZOU Ya-xue^{1,2}, DU Li-qiang¹, SUN Ying², PAN Feng-guang², ZHENG Meng-zhu², AI Yong-xing², ZHANG Yu-jing^{2*}, LIU Peng-peng^{1,3*}, ZHAO Li⁴, AN Cui-ping⁴, LU He-zhen⁵, YAO Chuan-yu⁶ (1.College of Life Science, Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao, Hebei 066600, China; 2.College of Animal Science, Jilin University, Changchun 130062, China; 3.National Research Center for Wildlife Borne Diseases, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 4.Department of Laboratory Medicine, Shijiazhuang First Hospital, Shijiazhuang 050017, China; 5.Department of Reproductive Medicine, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050017, China; 6.Department of Pain Medicine, People's Hospital of Qingxian, Qingxian, Hebei 062650, China)

Abstract: Telomerase activity has been showed in almost human tumors, inhibition of telomerase activation by *TERT* silencing may be a new target in anticancer therapeutics. Here, shRNAs (Sh1, Sh2 and Sh3) expression plasmids targeting *chTERT* were constructed, and then transfected into MDCC-MSB1 cells. The expression level of *chTERT* was monitored by real-time PCR, telomerase activity were examined by TRAP assay, and cells proliferation were measured by flow cytometry. Our findings showed that the expression of *chTERT* was significantly inhibited by Sh1 and Sh3 at 48 h, 72 h and 96 h post-transfection ($P < 0.05$), Sh1 and Sh3 suppressed telomerase activation at 72 h post-transfection, and Sh3 inhibited MDCC-MSB1 cells proliferation by significantly decreasing numbers of cells in S phase ($P < 0.01$), increasing numbers of cells in G₂/M phase ($P < 0.01$)

收稿日期: 2016-10-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30471284)

作者简介: 邹亚学(1972—),男,副教授,博士。

* 通讯作者, E-mail: liupeng.peng@hotmail.com; zhangyujing@jlu.edu.cn

at 72 h post-transfection, moreover, numbers of cells in G_0/G_1 phase had no change. These results indicated that *chTERT* silencing mediated by shRNA decreased telomerase activation, and inhibited MDCC-MSB1 cell proliferation, which provided a new alternative for anticancer therapeutics.

Keywords: cancer; telomerase; *TERT*; shRNA; telomerase activation; cell proliferation

* Corresponding authors, E-mail: liupeng.peng@hotmail.com; zhangyujing@jlu.edu.cn

端粒(telomere)是存在于真核细胞染色体末端的一段特殊的 DNA-蛋白质复合体“帽子”结构,对于染色体的稳定性及复制有着极其重要的意义^[1-3]。正常的体细胞在进行了一定次数的分裂之后,随着端粒的缩短将步入程序化的衰老与凋亡,但是癌细胞却获得了端粒酶的重新激活使其可以保持“永生代”,因此端粒酶的重新激活成为细胞癌化的标志,为癌症的临床诊断提供了潜在的标志物^[1,4-6]。

端粒酶由端粒酶 RNA (telomerase RNA, TER)、端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)和端粒酶相关蛋白(telomerase-associated protein, TAP) 3 个主要亚单位构成。TER 以自身的 RNA 为模板在染色体的末端添加新的端粒重复序列,维持端粒的稳定,如果缺失或突变 TER 基因会导致端粒的缩短和细胞的死亡; TERT 与 TER 一样,体内 TERT 的破坏消除了端粒酶活性并致端粒缩短;而关于端粒酶相关蛋白的研究证实端粒酶相关蛋白并不局限于有端粒酶活性的组织和细胞系,各组织的水平差异与端粒酶的活性无关,因此端粒酶的活性并不由端粒酶相关蛋白决定^[7-10]。CHANG 等^[11]发现人端粒酶逆转录酶基因(*hTERT*)表达水平随着端粒酶活性的增加而成比例地增加,并在正常和癌组织中存在差异性表达,而其他组份(TEP1, hTER, hSP90, P23 和 dyskerin)在整个酶调节过程中均维持高水平但不发生变化,且在正常和癌组织中都有表达。此外, *hTERT* 的启动子在正常人体细胞总是处于失活状态,而在永生代及恶性转化细胞中被激活,这表明 *TERT* 基因的异常表达是端粒酶活性异常的重要前提,端粒酶活性的调控主要是通过 *hTERT* 基因的转录调控来实现的,因此认为 *hTERT* 对端粒酶激活有限速效应, *hTERT* 一旦被表达,就和其他几种亚单位一起组装成具有高活性的端粒酶全酶^[12-13]。

本研究以马立克病肿瘤淋巴母细胞系(MDCC-MSB1 细胞)为肿瘤细胞模型,假设可以采用 siRNA 干扰技术沉默端粒酶活化的限速因素——端粒酶逆转录酶基因(*TERT*)进行干扰抑制端粒酶活性,从而阻滞肿瘤细胞的增殖,期望为靶向端粒酶的抗肿瘤

治疗提供新的思路及备选方法。

1 材料与方法

1.1 材料 MDCC-MSB1 细胞购自中国兽药检查所; pSilencer 1.0-U6 购自美国 Applied Biosystems 公司; DH5 α 感受态细胞由本实验室保存; 转染试剂 LipofectamineTM2000 购自美国 Invitrogen 公司; 限制性核酸内切酶 Hind I、Apa I、Xho I、EcoR I, RNA 酶抑制剂 RNasin (40 U/ μ L)、T₄ DNA 连接酶, pfu DNA 聚合酶(5 U/ μ L)及 dNTP 均购宝生物工程(大连)公司; RNA 抽提试剂盒 Easy PureTM RNA Kit, cDNA 反转录试剂盒 Trans Script First-Strand cDNA Synthesis Super Mix 和 TransStart Probe qPCR Super Mix 均购自北京全式金生物技术有限公司; TRAP-银染法端粒酶活性检测试剂盒购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司。

1.2 shRNA (small hairpin RNA) 设计与合成 根据已发表鸡端粒酶逆转录酶(*chTERT*)基因序列(GenBank 登陆号: AH013710.2), 采用 siRNA 在线设计分析软件 siDESIGNTM (<http://dharmacon.gelifsciences.com/design-center/?redirect=true>) 进行 *chTERT* 基因 siRNA 的设计与分析^[14-15]。经过综合分析 siRNA 序列的(G+C)%、T_m 值、内部发夹结构等理化参数以及其反向序列与靶序列的同源性, 选择 siDESIGNTM 设计分析得分最高、且 GC 含量在 30%~50% 的 3 个序列作为 *chTERT* 基因的 siRNA 候选序列; 同时通过打乱 siRNA 候选序列方式设定阴性对照, 且其与细胞内基因没有同源性^[16]。

根据 pSilencer 1.0-U6 质粒 U6 启动子启动表达小干扰 RNA 的特性, 设计合成 shRNA 的 DNA 序列(Shs; Sh1, Sh2 和 Sh3)及阴性对照 shRNA 的 DNA 序列(ShCtrl)(C. shRNA 编码链; U. shRNA 互补链)(表 1)。分别设计包含 *chTERT* 基因 3 个候选 siRNA 序列正义链和反义链的 shRNA DNA 序列, 并在 siRNA 序列正义链和反义链之间加入间隔序列 TTCAAGAGA, 使 siRNA 序列的正义链和

反义链核苷酸序列可以形成“发夹结构”，构成 shRNA，并在反义链的 3' 端加入 RNA polymerase III 的终止序列 TTTTTT。最后根据 pSilencer 1.0-U6

质粒载体的多克隆酶切位点设置添加酶切位点 Apa I 和 EcoR I (图 1a)^[14,17-19]。上述 shRNA 序列由宝生物工程(大连)公司合成。

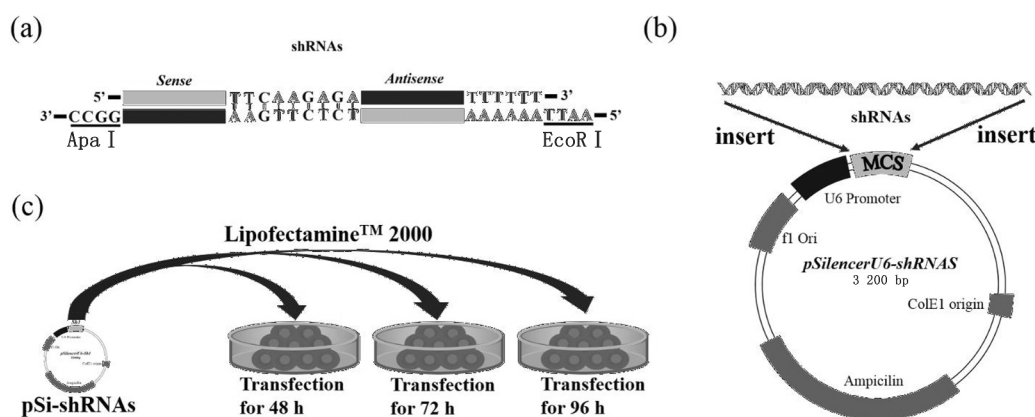


图 1 shRNA 设计、pSi-shRNAs 构建以及干扰质粒转染 MDCC-MSB1 细胞 a.靶向 *chTERT* 基因 shRNA 设计策略；b.pSi-shRNAs (Sh1, Sh2 and Sh3) 干扰质粒载体；c.pSi-shRNAs (pSi-sh1, pSi-sh2, pSi-sh3 和 pSi-shCtrl) 质粒转染细胞

表 1 靶向 *chTERT* 基因 shRNAs 序列

shRNAs	shRNAs 序列 (5'→3')
Sh1	C: <u>AATT</u> AAAAAAGGTCTGGTTATCAGCCTTCTCTCTGAAGAAGGCTGATAACCAGACCGGCC U:GGTCTGGTTATCAGCCTTCTTCAAGAGAGAAGGCTGATAACCAGACCTTTTTT
Sh2	C: <u>AATT</u> AAAAAAGCCATAACAAATGCCGTTCTCTCTTGAAGAACCGGCATTGTGTTATGGCGGCC U:GCCATAACAAATGCCGTTCTTCAAGAGAGAACCGGCATTGTGTTATGGCTTTTTT
Sh3	C: <u>AATT</u> AAAAAAGATCCCAAGGGATACTATGTCTCTTGAACATAGTATCCCTTGGGATCGGCC U:GATCCCAAGGGATACTATGTTCAAGAGACATAGTATCCCTTGGGATCTTTTTT
ShCtrl	C: <u>AATT</u> AAAAAACTTCCGACTATTGGTCTGGTCTCTTGAACCAGACCAATAGTCGGAAGGGGCC U:CTTCCGACTATTGGTCTGGTTCAGAGACCAGACCAATAGTCGGAAGTTTTT

注：C.编码链；U.互补链。斜体下划线.EcoR I 和 Apa I 酶切位点

1.3 pSilencer 1.0-U6-shRNAs 重组质粒构建与 MDCC-MSB1 细胞转染 pSilencer1.0-U6 质粒载体经 DH5 α 感受态细胞克隆扩增后进行质粒抽提，-20℃ 保存备用。分别取合成的 shRNA DNA 序列 (1.0 g/L) 的互补链和编码链 2 μ L，加入 46 μ L 退火缓冲液中 (100 mmol/L 乙酸钾，30 mmol/L HEPES-KOH, pH 7.4, 2 mmol/L 乙酸镁) 中，90℃ 3 min, 37℃ 1 h，使 shRNA 的编码链和互补链退火形成双链 DNA。pSilencer1.0-U6 质粒载体与 shRNA 双链 DNA 经 Apa I 和 EcoR I 双酶切位点连接，连接产物经 DH5 α 感受态细胞克隆后抽提 pSilencer 1.0-U6-shRNAs 重组质粒进行测序鉴定 (图 1b)。

MDCC-MSB1 细胞经复苏后采用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素的 MEM 培养液于 5% CO₂、37℃ 培养箱中进行悬浮培养。于转染前 24 h

对 MDCC-MSB1 细胞进行无血清、无双抗的分瓶过夜培养，细胞密度为 1.0×10^7 个/mL。成功构建的 pSilencer 1.0-U6-shRNAs 重组质粒 pSi-sh1、pSi-sh2、pSi-sh3 及 pSi-shCtrl 经大量制备后，采用 LipofectamineTM 2000 介导法进行 pSilencer 1.0-U6-shRNAs 重组质粒的细胞转染，于转染后 6 h 更换含血清和抗生素的 MEM 培养基 (图 1c)。

1.4 MDCC-MSB1 细胞 *chTERT* 基因相对表达量分析 根据已发表 *chTERT* 基因序列 (GenBank 登陆号: AH013710.2)，采用 Primer express 2.0 软件设计用于 Real-time PCR 的引物及探针；同时以鸡三磷酸甘油醛脱氢酶基因 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*, CB018343) 作为内参基因，设计引物及探针，上述 Real-time PCR 的引物及探针由宝生物工程(大连)公司合成 (表 2)。

分别于 pSilencer 1.0-U6-shRNAs (pSi-sh1、

pSi-sh2、pSi-sh3 及 pSi-shCtrl) 重组质粒转染 MDCC-MSB1 细胞后 48, 72, 96 h 收集转染细胞, 应用 RNA 抽提试剂盒 Easy Pure™ RNA Kit 抽提 MDCC-MSB1 细胞总 RNA, 并以此为模板, 采用 TransScript First-Strand cDNA Synthesis Super Mix 试剂盒反转录成 cDNA, Real-time PCR 检测 pSilencer 1.0-U6-shRNAs 转染 MDCC-MSB1 细胞的 *chTERT* 基因相对表达量。采用 ABI PRISM 7000

实时荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems 公司, 美国) 和 TransStart Probe qPCR SuperMix 试剂盒, 按试剂盒实验说明书推荐反应体系 (20 μ L) 进行试验。反应条件: 94℃ 预变性 30 s, 然后以 94℃ 5 s, 60℃ 30 s 反应 40 个循环。每个样品做 3 个重复, 测定 C_t 值, 以内参基因 *GAPDH* 为对照计算 ΔC_t 值, 以阴性对照组 pSi-shCtrl 为对照计算 $\Delta\Delta C_t$ 值, 然后计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值。

表 2 *chTERT* 和 *GAPDH* 基因实时荧光 PCR 引物和探针

基因名称	引物和探针序列 (5'→3')
<i>chTERT</i>	Forward-5'-GTCAGAGCGAAGTCATCACAAGAAT-3'
	Reverse-5'-TGGCAAAACTCTGAAGTGACAAC-3'
	Probe-FAM-ATGGATACTCCTTGCTGGATGAGAA-ECLIPSE
<i>GAPDH</i>	Forward-5'-TTGTTTCCTGGTATGACAATGAGTTT-3'
	Reverse-5'-CTCACTCCTGGATGCCATGT-3'
	Probe-FAM-ATACAGCAACCGTGTGTGGACTTGATGGT-ECLIPSE

1.5 pSilencer 1.0-U6-shRNAs 转染 MDCC-MSB1 细胞端粒酶活性分析 分别于 pSilencer 1.0-U6-shRNAs (pSi-sh1、pSi-sh2、pSi-sh3 及 pSi-shCtrl) 重组质粒转染 MDCC-MSB1 细胞 48 h 和 72 h 后收集转染细胞, 采用 TRAP (telomerase repeat amplification protocol, TRAP)-银染法端粒酶活性检测试剂盒进行端粒酶活性检测, 所有操作参照试剂盒说明书进行。MDCC-MSB1 细胞端粒酶活性测定引物 T1: 5'-TCACCTTGTAATCCGTCGAGCAGAGTT-3'; T2: 5'-CAACATCTCCACTACCTTCTAACCGTAACC-3'。端粒酶活性测定产物经 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后进行凝胶银染结果分析^[20-21]。

1.6 pSilencer 1.0-U6-shRNAs 转染 MDCC-MSB1 细胞周期分析 pSi-sh3 及 pSi-shCtrl 重组质粒转染 MDCC-MSB1 细胞 72 h 后收集转染细胞, PBS 洗涤 MDCC-MSB1 细胞 3 次, 重悬于流式细胞染色液, 调整细胞数量为 10^7 个/mL。取 2×10^6 个细胞加入流式管, 经离心沉淀后, 缓慢加入 1 mL 预冷的 70% 乙醇固定 MDCC-MSB1 细胞, 充分混匀后, 4℃ 静置固定 30 min。离心沉淀, 弃上清, 加入 200 μ L PI 染色液重悬细胞, 同时加入 RNA 酶, 充分混匀后 4℃ 静置染色 30 min, 经再次离心沉淀后重悬于 200 μ L 流式细胞染色液中流式上样分析。

1.7 统计分析 所有数据均采用 Graphpad Prism 6 和 SPSS 16.0 软件进行数据的统计学分析, 所有结果用 ($\bar{x} \pm s$) 表示; * * $P < 0.01$ 表示差异极显著, $0.01 < * P < 0.05$ 表示差异显著, # $P > 0.05$ 表示没

有显著性差异。

2 结果

2.1 pSilencer 1.0-U6-shRNAs 重组质粒鉴定 鉴于 shRNAs 长度仅为 53 nt 的短链 DNA, 常规的双酶切结合琼脂糖凝胶电泳鉴定不能准确确认 shRNAs 的插入, 为保证重组质粒 pSilencer 1.0-U6-shRNAs 构建的正确性, 对构建的 pSi-sh1、pSi-sh2、pSi-sh3 及 pSi-shCtrl 重组质粒进行了测序鉴定, 测序鉴定结果显示 Sh1、Sh2、Sh3 及 shCtrl 均已正确插入 pSilencer 1.0-U6 质粒, 成功构建了 pSi-sh1、pSi-sh2、pSi-sh3 及 pSi-shCtrl 质粒。

2.2 shRNA Sh1 及 Sh3 成功抑制 MDCC-MSB1 细胞 *chTERT* 基因表达 采用成功构建的 pSi-sh1、pSi-sh2、pSi-sh3 及 pSi-shCtrl 质粒转染 MDCC-MSB1 细胞检测 shRNAs 是否可以抑制 MDCC-MSB1 细胞端粒酶 *chTERT* 基因的表达。Real-time PCR 结果显示, 在 pSi-sh1、pSi-sh2、pSi-sh3 及 pSi-shCtrl 质粒转染 MDCC-MSB1 细胞 48, 72, 96 h 后, Sh1 抑制 *chTERT* 基因表达量相对阴性对照组 pSi-shCtrl 分别下降了 45%, 66%, 44%; Sh2 抑制 *chTERT* 基因表达量相对阴性对照组 ShCtrl 分别下降了 14%, 6%, 4%; Sh3 抑制 *chTERT* 基因表达量相对阴性对照组 pSi-shCtrl 分别下降了 59%, 89%, 71%。经统计学分析, Sh1 和 Sh3 均显著抑制了端粒酶 *chTERT* 基因的表达 ($P < 0.05$), 且在转染后 72 h 表现出最强的抑制效率, 而在转染后 96 h

抑制效率虽然持续,但是已有所减弱;而 Sh2 对端粒酶 *chTERT* 基因表达的抑制与阴性对照组 ShCtrl 相比没有显著性差异($P>0.05$)(图 2)。上述结果证实,shRNA Sh1 和 Sh3 可以显著降低 MDCC-MSB1 细胞端粒酶 *chTERT* 基因的表达,然而 Sh1 和 Sh3 对 *chTERT* 基因表达的抑制是否会降低端粒酶活性仍需进一步证实。

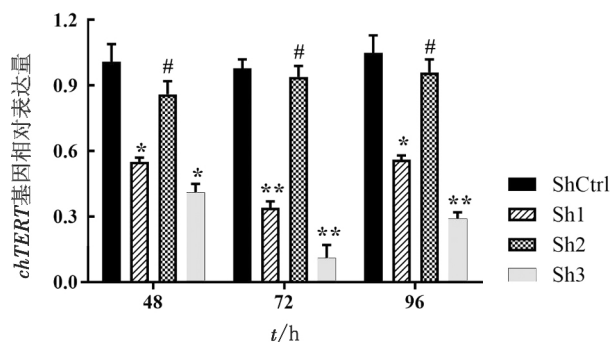


图 2 shRNA 抑制 MDCC-MSB1 细胞 *chTERT* 基因表达

注:与 shCtrl 对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;# $P>0.05$ 。下同

2.3 shRNA Sh1 及 Sh3 有效降低了 MDCC-MSB1 细胞端粒酶活性 TERT 作为端粒酶活化过程的限速因素,抑制 *TERT* 基因的表达会导致端粒酶活性的降低。在此,采用 TRAP-银染法分析了 pSi-sh1、pSi-sh2、pSi-sh3 及 pSi-shCtrl 质粒转染 MDCC-MSB1 细胞 48 h 和 72 h 对细胞端粒酶活性的影响。结果显示,与阴性对照组 ShCtrl 相比,在质粒转染细胞 48 h,Sh1 和 Sh3 对端粒酶活性抑制效果较弱,72 h 时,Sh1 和 Sh3 均可明显抑制端粒酶活性;而 Sh2 始终对端粒酶活性没有明显的抑制效果(图 3)。上述结果与 *chTERT* 基因表达量分析一致的,Sh1

和 Sh3 可以通过抑制 *chTERT* 基因的表达降低 MDCC-MSB1 细胞端粒酶活性。

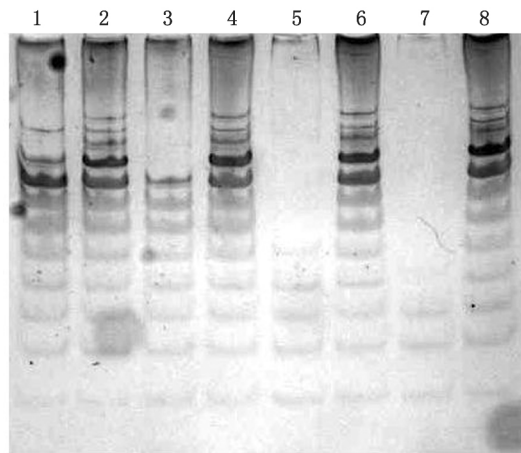


图 3 shRNA 有效降低了 MDCC-MSB1 细胞端粒酶活性
1~4.转染后 48 h 端粒酶活性;5~8.转染后 72 h 端粒酶活性。1,5.Sh1;2,6.Sh2;3,7.Sh3;4,8.ShCtrl

2.4 shRNA Sh1 及 Sh3 抑制 MDCC-MSB1 细胞增殖 端粒酶的重新激活是细胞癌化的标志,端粒酶活性的抑制可以有效降低肿瘤细胞的增殖,基于上述 shRNAs(Sh1、Sh2 和 Sh3)在不同时间点对 MDCC-MSB1 细胞 *chTERT* 基因表达量和端粒酶活性的抑制,选取 pSi-sh3 及 pSi-shCtrl 质粒转染 MDCC-MSB1 细胞,采用流式细胞术分析了质粒转染细胞 72 h 后 Sh3 对 MDCC-MSB1 细胞周期的影响。结果显示,与阴性对照组相比,Sh3 显著降低了 S 期细胞的比例($P<0.01$),G2/M 期细胞比例显著上升($P<0.01$),G0/G1 期细胞比例没有明显变化($P>0.05$)(图 4)。

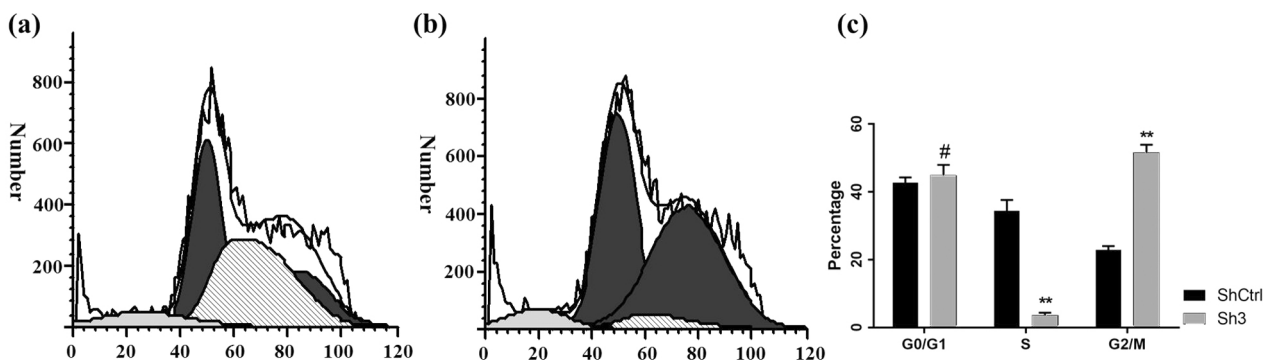


图 4 shRNAs 抑制 MDCC-MSB1 细胞增殖 a.pSi-shCtrl 转染 MDCC-MSB1 细胞 72 h 细胞周期变化;b.pSi-sh3 转染 MDCC-MSB1 细胞 72 h 细胞周期变化;c.Sh3 显著抑制降低了 S 期细胞的比例,抑制 MDCC-MSB1 细胞增殖

3 讨论

近年来关于人和动物的肿瘤研究发现端粒酶的激活是细胞永生化的重要事件之一,是细胞癌化的标志,几乎所有类型的人类肿瘤都可以检测到端粒酶的活性^[5-6,22]。100 余株永生化的端粒酶活性检测也显示 98% 的细胞株存在端粒酶活性,从而提示端粒酶活性的抑制可能是进行抗肿瘤治疗的一个新靶点^[23-26]。在本研究中,采用 shRNA (small hairpin RNA) 成功抑制了 MDCC-MSB1 细胞 *chTERT* 基因的表达,降低了端粒酶活性,阻滞 MDCC-MSB1 细胞的增殖,为靶向端粒酶的抗肿瘤治疗提供新的思路及备选方法。

MDCC-MSB1 细胞是一种细胞结合性疱疹病毒(MDV)感染鸡导致的传染性淋巴组织增生肿瘤,导致鸡马立克氏病(Marek's disease, MD)^[27]。在对 MD 肿瘤端粒和端粒酶的研究中发现肿瘤细胞的端粒长度较正常细胞明显缩短,端粒酶活性显著升高,说明 MD 肿瘤的形成也与端粒、端粒酶存在着密切的相关性。由于该病人工诱发简单,可采用疫苗来预防,而且肿瘤细胞表现出较高的端粒酶活性,因此是较为理想的肿瘤研究模型,为研究端粒酶在肿瘤形成过程中的活性调控及抗肿瘤研究提供了较为理想的细胞株系^[28-30]。因此在本研究中我们采用 MD 肿瘤 MDCC-MSB1 细胞作为实验模型。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种由双链 RNA 诱发的基因沉默,首次报道于 1998 年,它将目的基因所对应的双链 RNA 导入生物体,在细胞内与细胞成份形成 RNA 诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC),在 RISC 的作用下,以双链 RNA 分子中的反义链为指导 RNA,使与其同源的 RNA 降解,从而达到阻抑基因表达的目的^[31]。然而我们以往的研究证实 siRNA 直接转染 MDCC-MSB1 细胞诱导的基因沉默效应具有时效性,在一定时间内,siRNA 对 *chTERT* 基因的表达具有很高的抑制效率,但随着时间的延长,其作用效率降低甚至丧失^[30]。同时,针对不同细胞的转染需要进行费时和费力的转染程序优化过程,且即使同样的细胞在同样的转染条件下也可能因为细胞代次的不同而导致转染效率的改变,这些因素直接影响试验的重复性和研究结果的可靠性^[17-19]。因此,构建表达载体表达 shRNA 成为唯一有可能进行长期基因沉默研究的选择。在本研究中我们针对 *chTERT* 基因设计了针对不同靶位点的 siRNA,

合成其对应的 DNA 序列并克隆到 shRNA 表达载体中,通过将重组质粒导入 MDCC-MSB1 细胞研究 *chTERT* 基因下调对端粒酶活性及细胞增殖的影响。

依据 pSilencer 1.0-U6 质粒 U6 启动子启动表达小干扰 RNA 的特性以及 shRNA 的设计原则,根据已发表 *chTERT* 基因序列采用在线设计软件设计了 shRNA 干扰序列,并选取预测评估干扰效果最优的 3 个 shRNA 进行合成并构建干扰质粒载体,同时设置阴性对照 MDCC-MSB1 细胞。*chTERT* 基因相对表达量 Real-time PCR 分析结果显示,质粒转染 MDCC-MSB1 细胞后 48, 72, 96 h, Sh1 和 Sh3 均显著抑制了端粒酶 *chTERT* 基因的表达,且在转染后 72 h 表现出最强的抑制效率,而在转染 96 h 抑制效率虽然持续,但是已有所减弱;而 Sh2 对于端粒酶 *chTERT* 基因则没有显著抑制性,提示 pSi-sh1 和 pSi-sh3 对 *chTERT* 基因的表达呈现持续性抑制。不同于我们以往研究中 siRNA 对 *chTERT* 基因的瞬时抑制,为研究端粒酶活性对于肿瘤细胞增殖提供了有利的工具^[30]。同时也发现在 3 个 shRNA 中 Sh1 和 Sh3 发挥了对目的基因的抑制效果,而 Sh2 并没有发挥抑制作用,提示 shRNA 对目的基因的干扰效果单靠模型预测是不可靠的,只有通过试验才能确证 shRNA 对目的基因的干扰效果。

是否 Sh2 不能干扰 *chTERT* 基因的表达就不能抑制端粒酶的活性呢?答案似乎是肯定的。在对 MDCC-MSB1 细胞端粒酶活性的分析中,Sh2 依然不能降低端粒酶的活性。而对 *chTERT* 基因具有显著抑制效果的 Sh1 和 Sh3 在质粒载体转染后 24, 48 h 均显著降低了端粒酶的活性,间接提示 *chTERT* 基因的转录对于端粒酶活性的重要性,与 CHANG 等^[11]关于 *chTERT* 基因表达水平与端粒酶活性的研究结果一致,进一步证实 *chTERT* 基因对端粒酶具有限速作用。

靶向抑制 *chTERT* 基因表达的最终目的是降低端粒酶活性,从而阻滞肿瘤细胞的增殖。本研究结果证实 Sh1 和 Sh3 可以显著抑制 *chTERT* 基因的表达并抑制端粒酶活性,为了进一步证实 shRNA 通过抑制端粒酶活性阻滞肿瘤细胞增殖的作用,试验选择 3 个 shRNA 中对 *chTERT* 基因表达及端粒酶活性有最优抑制效果的 Sh3 对其阻滞 MDCC-MSB1 细胞增殖的效果进行探讨。基于上述研究知道在质粒载体转染 MDCC-MSB1 细胞 72 h 时,shRNA 对 *chTERT* 基因的表达和端粒酶活性的抑

制效果最优,因此本试验于 *pSi-sh3* 质粒载体转染 MDCC-MSB1 细胞 72 h 时研究了其对 MDCC-MSB1 细胞增殖的抑制作用。结果显示,Sh3 成功阻断了 MDCC-MSB1 细胞增殖,证实以端粒酶 *TERT* 基因为端粒酶活性抑制靶点阻滞肿瘤细胞增殖的可能性,同时提示 *chTERT* 基因作为靶向端粒酶靶点抗肿瘤的新途径,同时也证实以往研究对端粒酶活性和肿瘤形成的关系,阐明端粒活性对肿瘤增殖的重要性,此外证实了 *chTERT* 基因通过调控端粒酶活性对肿瘤增殖的影响^[32-35]。

在本研究中基于 siRNA 技术构建 siRNA 质粒表达载体 shRNA 成功抑制了 *chTERT* 基因表达、降低端粒酶活性阻滞了肿瘤细胞的增殖,为抗癌治疗提供了新的备选方案及具有参考价值的基础科学数据。

参考文献:

- [1] THIEM S, HEROLD T, KRAFFT U, et al. Telomerase reverse transcriptase (TERT) promoter mutations are rare in urachal cancer[J]. *Pathol Int*, 2017 (1): 1-5.
- [2] GRAHAM M K, MEEKER A. Telomeres and telomerase in prostate cancer development and therapy[J]. *Nat Rev Urol*, 2017, 14(10): 607-619.
- [3] 童夏静, 周金秋. 端粒和端粒酶的发现及其生物学意义[J]. *生命科学*, 2009(6): 760-769.
- [4] FALEIRO I, APOLONIO J D, PRICE A J, et al. The TERT hypermethylated oncologic region predicts recurrence and survival in pancreatic cancer[J]. *Future Oncol*, 2017, 23(13): 167.
- [5] WILLEIT P, WILLEIT J, MAYR A, et al. Telomere length and risk of incident cancer and cancer mortality[J]. *Jama*, 2010, 304(1): 69-75.
- [6] WENTZENSEN I M, MIRABELLO L, PFEIFFER R M, et al. The association of telomere length and cancer: a meta-analysis[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2011, 20(6): 1238-1250.
- [7] 营孙阳, 熊加秀, 麦洪旭, 等. 端粒酶调控研究进展[J]. *遗传*, 2016(4): 289-299.
- [8] LIPINSKA N, ROMANIUK A, PASZEL-JAWORSKA A, et al. Telomerase and drug resistance in cancer[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(22): 4121-4132.
- [9] LATERREUR N, ESCHBACH S H, LAFONTAINE D A, et al. A new telomerase RNA element that is critical for telomere elongation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(16): 7713-7724.
- [10] FENG J, FUNK W D, WANG S S, et al. The RNA component of human telomerase[J]. *Science*, 1995, 269 (5228): 1236-1241.
- [11] CHANG J T, CHEN Y L, YANG H T, et al. Differential regulation of telomerase activity by six telomerase subunits[J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269(14): 3442-50.
- [12] ZAUG A J, CRARY S M, JESSE FIORAVANTI M, et al. Many disease-associated variants of hTERT retain high telomerase enzymatic activity[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(19): 8969-8978.
- [13] HIRAGA S, OHNISHI T, IZUMOTO S, et al. Telomerase activity and alterations in telomere length in human brain tumors[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(10): 2117-2125.
- [14] BAROY T, SORENSEN K, LINDEBERG M M, et al. shRNA expression constructs designed directly from siRNA oligonucleotide sequences[J]. *Mol Biotechnol*, 2010, 45(2): 1161-20.
- [15] MONTGOMERY M K, XU S, FIRE A. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(26): 15502-15507.
- [16] DONZE O, PICARD D. RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(10): e46.
- [17] LAMBETH L S, SMITH C A. Short hairpin RNA-mediated gene silencing[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 942: 205-32.
- [18] JI W, JIANG Z. Effect of shRNA-mediated inhibition of Nanog gene expression on the behavior of human gastric cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(2): 367-374.
- [19] MOORE C B, GUTHRIE E H, HUANG M T, et al. Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown[J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 629: 141-58.
- [20] KIM N W, PIATYSZEK M A, PROWSE K R, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer[J]. *Science*, 1994, 266 (5193): 2011-2015.
- [21] KIM N W, WU F. Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP)[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(13): 2595-2597.
- [22] SHAY J W, GAZDAR A F. Telomerase in the early detection of cancer[J]. *J Clin Pathol*, 1997, 50(2): 106-109.
- [23] RHYU M S. Telomeres, telomerase, and immortality[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87(12): 884-894.
- [24] KHEIROLLAHI M, MEHRAZIN M, KAMALIAN N, et al. Telomerase activity in human brain tumors;

- astrocytoma and meningioma[J].Cell Mol Neurobiol, 2013,33(4):569-574.
- [25] FALCHETTI M, LAROCCA L, PALLINI R. Telomerase in brain tumors[J].Child's Nervous System, 2002,18(3/4):112-117.
- [26] GARCIA-ARANDA C, DE JUAN C, DIAZ-LOPEZ A, et al. Correlations of telomere length, telomerase activity, and telomeric-repeat binding factor 1 expression in colorectal carcinoma[J].Cancer, 2006,106(3):541-551.
- [27] BENCHERIT D, REMY S, LE VERN Y, et al. Induction of DNA damages upon Marek's disease virus infection; implication in viral replication and pathogenesis[J].J Virol, 2017(1):78.
- [28] DELANY M E, DANIELS L M. The chicken telomerase reverse transcriptase (chTERT): molecular and cytogenetic characterization with a comparative analysis[J].Gene, 2004,339:61-69.
- [29] VENKATESAN R N, PRICE C. Telomerase expression in chickens: constitutive activity in somatic tissues and down-regulation in culture [J].Proc Natl Acad Sci USA, 1998,95(25):14763-14768.
- [30] 邹亚学, 孙莹, 潘风光, 等. 小干扰 RNA(siRNA)对马立克氏病淋巴瘤细胞 *chTERT* 基因表达的抑制[J].中国兽医学报, 2008,28(2):115-119,124.
- [31] FIRE A, XU S, MONTGOMERY M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J].Nature, 1998,391(6669):806-811.
- [32] FOLINI M, BRAMBILLA C, VILLA R, et al. Antisense oligonucleotide-mediated inhibition of hTERT, but not hTERC, induces rapid cell growth decline and apoptosis in the absence of telomere shortening in human prostate cancer cells[J].Eur J Cancer, 2005,41(4):624-634.
- [33] AUTEXIER C, LUE N F. The structure and function of telomerase reverse transcriptase[J].Ann Rev Biochem, 2006,75:493-517.
- [34] ARMANIOS M Y, CHEN J J, COGAN J D, et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis[J].N Engl J Med, 2007,356(13):1317-1326.
- [35] RAO Y, XIONG W, LIU H, et al. Inhibition of telomerase activity by dominant-negative hTERT retards the growth of breast cancer cells[J].Breast Cancer, 2014,23(2):1-8.

(上接 2349 页)

- [24] 徐鹏, 曹利利, 王泽东, 等. 刚地弓形虫丝裂原活化蛋白激酶 1 基因克隆、表达及抗原性分析[J].中国兽医学报, 2016,36(2):265-270.
- [25] CHING X T, FONG M Y, LAU Y L. Evaluation of immunoprotection conferred by the subunit vaccines of GRA2 and GRA5 against acute Toxoplasmosis in BALB/c mice[J].Frontiers Microbiol, 2016,7(87S):1.
- [26] GAZZINELLI R, XU Y, HIENY S, et al. Simultaneous depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*[J].J Immunol, 1992,149(1):175-180.
- [27] MATOWICKAKARNA J, DYMICKAPIEKARSKA V, KEMONA H. Does *Toxoplasma gondii* infection affect the levels of IgE and cytokines (IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, and TNF-alpha) ? [J].Clin Dev Immunol, 2009,2009(1):142-145.
- [28] STURGE C R, BENSON A, RAETZ M, et al. TLR-independent neutrophil-derived IFN-γ is important for host resistance to intracellular pathogens [J].Proc Natl Acad Sci, 2013,110(26):10711-10716.
- [29] MACMICKING J D. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity[J].Nat Rev Immunol, 2012,12(5):367-382.
- [30] ZHANG N Z, HUANG S Y, ZHOU D H, et al. Protective immunity against *Toxoplasma gondii* induced by DNA immunization with the gene encoding a novel vaccine candidate; calcium-dependent protein kinase 3 [J].BMC Infect Dis, 2013,13:512.
- [31] ZHANG N Z, HUANG S Y, XU Y, et al. Evaluation of immune responses in mice after DNA immunization with putative *Toxoplasma gondii* calcium-dependent protein kinase 5 [J].Clin Vaccine Immunol, 2014,21(7):924-929.