

· 基础研究 ·

负载 miR-138 复制缺陷型腺病毒对 hTERT 表达的影响^{*}

刘志鹏¹, 王宗华², 梁光萍³, 熊晓峰¹, 范亚川¹, 邹利全¹, 王洪斌¹, 陈陵¹, 李学成^{1△}

(1. 中国人民解放军第三二四医院消化内科, 重庆 400020; 2. 第三军医大学护理学院, 重庆 400038; 3. 第三军医大学西南医院烧伤研究所, 重庆 400038)

摘要:目的 探讨以复制缺陷型腺病毒为载体, 上调人端粒酶逆转录酶(hTERT)调控相关 miR-138 表达丰度后, 能否有效抑制靶基因 hTERT 的表达。方法 将负载 hTERT 调控相关 miR-138 的复制缺陷型腺病毒以 200:1 的感染复数(MOI), 感染人胃癌 BGC-823 细胞; 采用实时荧光定量 PCR(real-time PCR)检测 BGC-823 细胞内 miR-138 和 hTERT mRNA 的表达丰度; Western Blot 检测 hTERT 蛋白表达。结果 与阴性对照腺病毒相比, 负载 miR-138 的腺病毒感染 BGC-823 细胞后, 可显著提高 miR-138 表达丰度($P<0.05$); 而未感染腺病毒的空白对照组与阴性对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。与感染阴性对照腺病毒的 BGC-823 细胞相比, 感染负载人 miR-138 腺病毒(Ad-miR138)的 BGC-823 细胞内 hTERT 蛋白表达有所下调。结论 以复制缺陷型腺病毒为载体, 可有效上调 hTERT 调控相关 miR-138 的表达丰度, 进而可有效抑制 miR-138 靶基因 hTERT 的表达水平。

关键词: RNA 指导的 DNA 聚合酶; 胃肿瘤; 复制缺陷型腺病毒载体

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.29.013

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)29-2947-02

Effects of replication-deficient adenovirus carrying miR-138 on the hTERT expression^{*}

Liu Zhipeng¹, Wang Zonghua², Liang Guangping³, Xiong Xiaofeng¹,
Fan Yachuan¹, Zou Liquan¹, Wang Hongbin¹, Chen Ling¹, Li Xuecheng^{1△}

(1. Gastrointestinal Department, 324 Hospital of PLA, Chongqing 400020, China; 2. Nursing School, Third Military Medical University; 3. Burning Institution, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To identify effects of the replication-deficient recombinant adenovirus carrying miR-138 on the expression level miR-138 and the target gene hTERT. **Methods** The human gastric cancer cell line BGC-823 were infected with the replication-deficient recombinant adenovirus carrying miR-138 by the MOI of 200:1. The expression levels of miR-138 and hTERT mRNA were investigated by real-time PCR. The expression of hTERT protein was detected by western blot. **Results** Compared to the negative control, after infecting the replication-deficient recombinant adenovirus carrying miR-138, BGC-823 cells expressed higher level of miR-138 (9.152 ± 2.641 vs. 0.928 ± 0.199 , $P<0.05$). No significant difference was observed between the ZERO group (BGC-823 infecting no adenovirus) and negative control (1.085 ± 0.478 vs. 0.928 ± 0.199 , $P>0.05$). The expression of hTERT protein was down-regulated in the BGC-823 cells after infected adenovirus carrying miR-138. **Conclusion** The replication-deficient recombinant adenovirus carrying miR-138 can up-regulate the expression of miR-138 effectively and suppress the expression of hTERT protein.

Key words: RNA-directed DNA polymerase; stomach neoplasms; replication-deficient adenoviral vector

端粒酶通过延长染色体末端端粒, 维持细胞永生能力。而人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)是端粒酶的限速成分, 直接决定了端粒酶活性^[1]。目前有关 hTERT 的调控机制尚未完全明确。有关 hTERT 表达调控的研究大多为转录水平的调节, 未涉及转录后的调节。但是转录水平的调节因子众多, 关系复杂, 很难通过控制转录水平的调节有效控制 hTERT 的表达。转录后的调节主要涉及微 RNAs(miRNA)。miRNA 是最大的一类基因表达转录后调控因子, 极微量的 miRNA 即可对靶蛋白的表达产生有效的调控作用。研究 hTERT 在转录后水平的调控, 对理解肿瘤发生发展机制, 以及基于 miRNA 的肿瘤诊断与治疗具有重要意义^[2]。在前期工作中成功包装了负载 miR-138 的腺病毒^[3], 在本研究中, 进一步研究基于腺病毒载体的 miRNA 表达调控效果, 为基于 miRNA 的 hTERT 转录后调控机制的研究, 以及基于 hTERT 调控相关 miRNA 的肿瘤诊断与治疗研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 标准胎牛血清, 高糖 DMEM 培养液、RPMI 1640 培养液以及胰酶消化液(美国 HyClone 公司); Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司), 焦碳酸二乙酯水(北京天根公司), 逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒(日本 TAKARA 公司); M-PERTM 蛋白提取试剂(美国 Pierce 公司); 蛋白酶抑制剂(美国 Sigma 公司); BCA 蛋白定量试剂盒(上海申能博彩公司); 转化有腺病毒 E1 区基因的包装细胞 HEK293, 本室保存。负载有 miR-138 表达序列的复制缺陷型腺病毒(Ad-miR138), 由本室构建并保存^[3]; 负载有 β -半乳糖苷酶(β -gal)基因 LacZ 的复制缺陷型腺病毒, 由西南医院内科唐兵博士惠赠。U6 及 miR-138 特异 RT 及 real-time PCR 引物(广州锐博公司); hTERT mRNA 的 real-time PCR 引物由上海生工合成纯化, 其上游序列 P1: 5'-CGG AAG AGT GTC TGG AGC AA-3'; 下游序列 P2: 5'-GGA TGA AGC GGA GTC TGG A-3', 扩增片段长度 144 bp^[4]; ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(美国 AB

^{*} 基金项目: 重庆市自然科学基金资助(CSTC2008BB5274, CSTC2009BB5314, CSTC2010BB5158)。 [△] 通讯作者, E-mail: lingcong_008@126.com。

公司)。

1.2 方法

1.2.1 腺病毒感染 BGC-823 细胞 负载 miR-138 的复制缺陷型腺病毒(Ad-miR138)在前期工作中已纯化、浓缩并已测定滴度^[3]。将浓缩的腺病毒液取出后,按 200∶1 的感染复数(MOI)感染 BGC-823 细胞,继续培养 72 h 后,分别检测 miR-138、hTERT mRNA 以及 hTERT 蛋白表达水平。以感染负载有 β -半乳糖苷酶(β -gal)基因 LacZ 的复制缺陷型腺病毒的 BGC-823 细胞作为阴性对照,未感染腺病毒的 BGC-823 细胞作为空白对照。

1.2.2 总 RNA 抽提 消化细胞后计数,取 10^7 个细胞以 200 g 离心 5 min,弃去上清后加 Trizol 试剂 1 mL,反复吹打。按照 Trizol 试剂说明书步骤提取总 RNA,再将总 RNA 溶于 DEPC 水中,用紫外分光光度仪测定 RNA 浓度和纯度。

1.2.3 逆转录反应及实时荧光定量 PCR 反应(real-time PCR) 以 U6 管家基因作为内参,校正器参考文献[5]方法,选用未感染病毒的空白对照组 BGC-823 细胞(ZERO)作为校正器,每个标本设 3 个复孔。取总 RNA 100 ng 为模板,按照逆转录试剂盒说明书配 20 μ L 反应体系,反应条件为 42 $^{\circ}$ C 15 min,85 $^{\circ}$ C 5 s;然后按照 real-time PCR 试剂盒说明书,取合成的 cDNA 4 μ L 为模板,配 25 μ L 反应体系,预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s,反应 40 个循环,条件为 95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 34 s。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行结果分析,将不同标本的 RQ 值($RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$)进行比较。 ΔCt =目的基因 Ct 值-内参照基因 Ct 值, $\Delta\Delta Ct$ =待测标本的 ΔCt -校正器 ΔCt 。

1.2.4 Western Blot 实验 消化细胞后计数,取 10^7 个细胞以 200 g 离心 5 min,弃去上清后以 M-PERTM 蛋白提取液处理细胞,收集细胞总蛋白,BCA 法定量后经 SDS-PAGE,电转膜,免疫抗体反应,最后化学增强发光法(ECL)显带,具体步骤按文献[6]操作,以 GAPDH 为内参照。

1.3 统计学处理 结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 *t* 检测,利用 SPSS13.0 软件统计分析结果, $P<0.05$ 时为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 real-time PCR 检测 miR-138 的表达丰度 溶解曲线显示,U6 与 miR-138 呈单峰,扩增曲线呈 S 形,表明引物特异性好,real-time PCR 结果可靠。

表 1 miR-138、hTERT mRNA 在各组细胞中的相对表达定量($\bar{x}\pm s$)		
BGC-823	miR-138	hTERT mRNA
细胞分组	相对表达定量	相对表达定量
ZERO	1.085 $\pm$ 0.478	1.02 $\pm$ 0.34
Ad-NC	0.928 $\pm$ 0.199	1.32 $\pm$ 0.67
Ad-miR138	9.152 $\pm$ 2.641*	0.91 $\pm$ 0.35

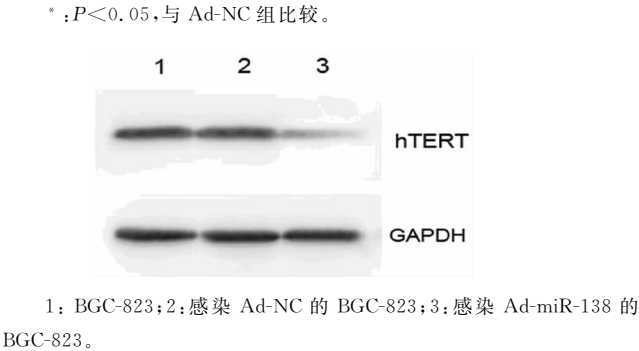


图 1 Western Blot 检测 BGC-823 细胞内 hTERT 蛋白的表达

2.2 real-time PCR 检测 Ad-miR138 感染后 BGC-823 细胞内 miR-138、hTERT mRNA 表达丰度的改变 分析结果显示,与感染阴性对照腺病毒的 BGC-823 细胞组(Ad-NC)相比,未感染腺病毒的空白对照组(ZERO)的 BGC-823 细胞内 miR-138 的表达差异无统计学意义($P>0.05$);而感染 Ad-miR138 腺病毒的 BGC-823 细胞(Ad-miR138)内 miR-138 的表达丰度则显著增加($P<0.05$)。3 组 BGC-823 细胞 hTERT mRNA 的表达水平各组间差异无统计学意义。见表 1。

2.3 Ad-miR138 感染 BGC-823 细胞后 hTERT 蛋白表达的变化 结果显示,BGC-823 细胞感染负载 miR-138 的腺病毒 Ad-miR138 后,hTERT 蛋白的表达下调,见图 1。

3 讨 论

hTERT 仅在肿瘤组织及极少部分正常组织中表达,而绝大多数正常组织中无表达^[7]。以 hTERT 为靶标的抗肿瘤治疗研究是当前的一个重要策略^[8]。本文前期工作发现,将 hTERT 全长 cDNA 导入树突状细胞(dendritic cells,DC),在体外^[9]及裸鼠体内^[10]均可有效激发针对端粒酶的特异细胞毒性 T 淋巴细胞反应,对多种端粒酶阳性的肿瘤细胞具有明显的杀伤效果;进一步研究发现,将 hTERT 全长 cDNA 转染至端粒酶阴性的骨肉瘤细胞系 U-2 OS 后,其增殖能力及侵袭能力增强,提示 hTERT 不仅参与肿瘤的发生,而且还参与肿瘤的转移过程^[11]。因此在转录后水平抑制 hTERT 蛋白表达的相关 miRNA 可作为潜在的肿瘤治疗靶位。目前已发现 miR-138 可在转录后水平抑制 hTERT 表达。因此,通过上调 miR-138 表达丰度而抑制 hTERT 蛋白表达水平,有可能抑制肿瘤细胞端粒酶活性,进而抑制肿瘤增生与转移。人类基因组中至少存在数千条 miRNA,是最大的一类转录后调控因子^[12]。由于 miRNA 对包括肿瘤相关蛋白在内的多种蛋白起着关键的调节作用,其表达谱的改变,在多种肿瘤的发生发展过程中有重要作用,有可能作为肿瘤早期诊断的治疗靶标^[13-15]。目前存在 3 种方式对 miRNA 进行安全而高效的调控。(1)人工合 pre-miRNA 的短核苷酸片段,采用转染试剂将片段转入细胞,在细胞内 Dicer 酶作用下,形成成熟的 miRNA 片段而发挥功能。优点是简单易行,效果确实,但不足之处是一次转入短核苷酸片段后,不能持续高水平表达目的 miRNA。并且由于要用到转染试剂,无法在体内进行。(2)将 pre-miRNA 片段克隆至质粒表达系统,再转染质粒至细胞。这一方法优点是细胞内可持续较高水平表达目的 miRNA,但还是只适合于体外。(3)采用病毒载体方法,如逆转录病毒、腺病毒、慢病毒等。本文在研究中采用腺病毒载体系统。腺病毒载体系统可广泛用于人类及非人类基因的表达,在大多哺乳动物细胞和组织中均可表达重组基因,并且腺病毒具有嗜上皮细胞性,而人类的大多数的肿瘤就是上皮细胞来源的,非常适于靶向肿瘤的基因治疗载体^[16]。另外,腺病毒的复制基因和致病基因均已相当清楚,在人群中早已流行。人感染野生型腺病毒后仅产生轻微的自限性症状,且腺病毒则除了卵细胞以外几乎在所有已知细胞中都不整合到染色体中,不会干扰其他的宿主基因。作者在前期研究中成功包装负载 miR-138 前体(pre-miR-138)cDNA 的腺病毒表达载体^[3]。在本研究中进一步发现,利用腺病毒载体技术可有效上调肿瘤细胞内 miRNA 的表达丰度,进而有效抑制靶基因的表达。这一发现为基于 hTERT 调控相关 miR-138 的肿瘤免疫基因治疗奠定了基础。需进一步深入研究的问题是,上调肿瘤组织内 hTERT 调控相关 miR-138 表达丰度后,虽然可以抑制 hTERT 蛋白的表达,但由于 miRNA 对靶基因是微调作用,无法完全封闭 hTERT 表达,那么未被抑制的 hTERT 活性在多大程度与范围内是否可以(下转第 2951 页)

- 析[J]. 重庆医学,2010,39(6):651-655.
- [2] 包新民,舒斯云. 大鼠脑立体定向图谱[M]. 北京:人民卫生出版社,1991:48.
 - [3] Fornaguera J, Schwarting RK. Early behavioral changes after striatal system damage can serve as predictors of striatal dopamine depletion[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry,1999,23(8):1353-1368.
 - [4] Reglodi D, Lubics A, Tamas A, et al. Pituitary adenylate cyclase activating poly-peptide protects dopaminergic neurons and improves behavioral deficits in a rat model of Parkinson's disease[J]. Behav Brain Res,2004,151(1/2):303-312.
 - [5] Mcnaught KS, Olanow CW. Protein aggregation in the pathogenesis of familial and sporadic Parkinson's disease [J]. Neurobiol Aging,2006,27(4):530-545.
 - [6] Jung TW, Lee JY, Shim WS, et al. Rosiglitazone protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against MPP+ induced cytotoxicity via inhibition of mitochondrial dysfunction and ROS production[J]. J Neurol Sci,2007,253(1/2):53-60.
 - [7] Rao RV, Bredesen DE. Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration [J]. Curr Opin Cell Biol,2004,16(6):653-662.
 - [8] 史树贵,李露斯. 细胞凋亡与神经系统变性疾病[J]. 重庆医学,2003,33(7):928-930.
 - [9] Ferro MM, Bellissimo MI, Anselmo-Franci JA, et al. Comparison of bilaterally 6-OHDA-and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease; histological, neurochemical, motor and memory alterations[J]. J Neurosci Methods,2005,148(1):78-87.
 - [10] Hsieh PF, Chia LG, Ni DR, et al. Behavior, neurochemistry and histology after intranigral lipopolysaccharide injection[J]. Neuroreport,2002,13(3):277-280.
 - [11] Lee JH, Zhu WM, Stanic D, et al. Sprouting of dopamine terminals and altered dopamine release and uptake in Parkinsonian dyskinesia[J]. Brain,2008,131(6):1574-1587.
 - [12] Ahmad M, Saleem S, Ahmad AS, et al. Neuroprotective effects of Withania somnifera on 6-hydroxydopamine induced Parkinsonism in rats[J]. Hum Exp Toxicol,2005,24(3):137-147.
 - [13] Gold SJ, Hoang CV, Potts BW, et al. RGS9-2 Negatively Modulates L-3, 4-Dihydroxyphenylalanine-Induced Dyskinesia in Experimental Parkinson's Disease[J]. Neuroscience,2007,27(52):14338-14348.
 - [14] Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models[J]. Neuro Rx,2003,39(6):889-909.
 - [15] Iancu R, Mohapel P, Brundin P, et al. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice[J]. Behav Brain Res,2005,162(1):1-10.

(收稿日期:2011-04-09 修回日期:2011-05-04)

(上接第 2948 页)

继续维持肿瘤细胞的生长与增殖,采用腺病毒负载的 hTERT 调控相关 miR-138 是否能有效抑制 hTERT 阳性的肿瘤细胞增殖与转移,这些问题有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 陈陵,杨仕明,蔡永国,等. 针对端粒酶蛋白催化亚单位的肿瘤免疫治疗研究[J]. 世界华人消化杂志,2005,13(4):528-533.
- [2] 孔燕,梁志清. miRNA 与肿瘤及子宫颈癌的研究进展[J]. 重庆医学,2008,37(16):1838-1839.
- [3] 熊晓峰,陈陵,范亚川,等. 负载 hTERT 调控相关 miR-138 复制缺陷型腺病毒的包装及鉴定[J]. 重庆医学,2011,40(9):177-180.
- [4] 陈陵,向国春,李向红,等. 负载 hTERT 复制缺陷型腺病毒的包装及鉴定[J]. 第四军医大学学报,2006,27(1):53-56.
- [5] Stamatopoulos B, Meuleman N, Haibe-Kains B, et al. microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification [J]. Blood,2009,113(21):5237-5245.
- [6] 陈陵,陈婷,蔡永国,等. 胃黏膜癌变过程中 hTERT 和相关基因表达的变化及其临床意义[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2006,15(5):443-447.
- [7] Philippi C, Loretz B, Schaefer UF, et al. Telomerase as an emerging target to fight cancer-opportunities and challenges for nanomedicine[J]. J Control Release,2010,146(2):228-240.
- [8] Chen L, Liang GP, Tang XD, et al. In vitro anti-tumor immune response induced by dendritic cells transfected with hTERT recombinant adenovirus[J]. Biochem Biophys Res Commun,2006,351(4):927-934.
- [9] Chen L, Tang XD, Yu ST, et al. Induction of anti-tumour immunity by dendritic cells transduced with hTERT recombinant adenovirus in mice[J]. J Pathol,2009,217(5):685-692.
- [10] 陈陵,余松涛,梁光萍,等. 端粒酶 hTERT 促进肿瘤细胞侵袭与转移及其机制研究[J]. 实用临床医药杂志,2010,14(5):13-20.
- [11] Wicha MS. Stemming a tumor with a little miR[J]. Nat Med,2011,17(2):162-164.
- [12] 陈陵,陈先华,李学成,等. miR-29 在胃癌患者血清中的表达及对预后的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志,2011,3(2):17-20.
- [13] Hatley ME, Patrick DM, Garcia MR, et al. Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21 [J]. Cancer Cell,2010,18(3):282-293.
- [14] Swarbrick A, Woods SL, Shaw A, et al. miR-380-5p represses p53 to control cellular survival and is associated with poor outcome in MYCN-amplified neuroblastoma [J]. Nat Med,2010,16(10):1134-1140.
- [15] Li G, Kawashima H, Ogose A, et al. Efficient virotherapy for osteosarcoma by telomerase-specific oncolytic adenovirus[J]. J Cancer Res Clin Oncol,2011,137(6):1037-1051.

(收稿日期:2011-04-09 修回日期:2011-05-16)