

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X·2009·01·014

· 基础研究 ·

反义端粒酶 RNA 基因对裸鼠肝癌移植瘤的抑制作用

裴庆山, 刘吉勇*, 孙欣欣(山东大学附属省立医院 消化内科, 济南 250021)

[摘要] 目的: 研究反义人端粒酶 RNA 基因(human telomerase RNA, hTR)在裸鼠体内对肝癌移植瘤的抑制作用。方法: BALB/c 裸鼠前肢腋窝皮下注射 HepG2 肝癌细胞构建移植瘤模型, 以携反义 hTR 逆转录病毒质粒 PLXSN-hTR-BamH I 瘤体内注射治疗(每次 0.2 ml, 共 5 次), 以注射正义 hTR 逆转录病毒质粒 PLXSN-hTR-EcoR I 和生理盐水为对照, 测量肿瘤体积, 计算抑瘤率; H-E 染色观察瘤组织病理变化; TUNEL 法检测肿瘤组织细胞的凋亡。结果: 反义 hTR 治疗组肿瘤生长较正义 hTR 治疗组及生理盐水组明显减慢, 反义 hTR 组抑瘤率为 26.78%, 明显高于正义 hTR 组的 1.93% ($P < 0.01$)。反义 hTR 治疗组较正义 hTR 治疗组及生理盐水组瘤组织坏死面积、肿瘤细胞凋亡率均明显增加(均 $P < 0.01$)。结论: 反义 hTR 在裸鼠体内能够显著抑制肝癌移植瘤的生长, 促进肿瘤细胞的凋亡。

[关键词] 反义端粒酶 RNA; 肝癌移植瘤; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R735.7; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)01-063-04

Inhibitory effect of antisense human telomerase RNA on implanted hepatocellular carcinoma in nude mice

PEI Qing-shan, LIU Ji-yong*, SUN Xin-xin (Department of Gastroenterology, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Ji'nan 250021, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of antisense human telomerase RNA (hTR) gene on implanted hepatocellular carcinoma in nude mice. **Methods:** HepG2 cells were subcutaneously inoculated into BALB/c nude mice at the axilla to establish implanted hepatocellular carcinoma model. The retrovirus plasmid containing antisense telomerase RNA (PLXSN-hTR-BamH I) was injected into the tumor (0.2 ml every time, 5 times). Retrovirus plasmid containing sense telomerase RNA (PLXSN-hTR-EcoR I) and normal saline were inoculated as control groups. Tumor volume was determined and the inhibitory rate was calculated. Tumor necrosis was observed by histological analysis and cell apoptosis was analyzed by terminal transferase dUTP nick end labeling (TUNEL). **Results:** Tumor growth in antisense hTR group was significantly inhibited compared with the two control groups. The tumor inhibitory rate (26.78%) of antisense hTR group was significantly higher than that of sense hTR group (1.93% , $P < 0.01$). The tumor necrosis area and apoptotic rate in the antisense hTR group were significantly higher than those of the other two groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** Antisense hTR can inhibit the growth of implanted hepatocellular carcinoma and promote cell apoptosis.

[Key words] antisense telomerase RNA; implanted hepatocellular neoplasms; proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(1): 63-66]

原发性肝癌为常见的恶性肿瘤之一,因早期症状不特异,80%左右的患者在明确诊断时已处于晚期,错过了外科手术的机会。近年来,随着分子生物学和细胞生物学的飞速发展,基因治疗成为肿瘤治疗研究最活跃的领域之一。反义基因技术是基因治疗的重要手段,它通过反义 RNA 与靶 mRNA 互补结合,抑制特定基因的表达,并且可以选择不同的靶点来达到对肿瘤的抑制^[1-2]。

端粒酶是恶性肿瘤细胞无限增殖的重要分子基础,它已成为新的肿瘤标志物及肿瘤治疗的新靶点。

设计以端粒酶为靶点来抑制肿瘤细胞端粒酶活性,阻止端粒继续延长,可使肿瘤细胞重获致死性^[3]。本研究前期实验^[4]已证明了逆转录病毒介导反义人端粒酶 RNA 基因(human telomerase RNA, hTR)

[基金项目] 山东省医药卫生科研项目(No. CAIDBA3)。Supported by the Medical Science Research Project of Shandong Province (No. CAID-BA3)

[作者简介] 裴庆山(1982-),男,山东省济南市人,医学硕士,主要从事消化道肿瘤治疗的研究。E-mail: peiqingshan@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author)。E-mail: liujiyong@medmail.com.cn

在体外对肝癌细胞的抑制作用。本实验将逆转录病毒介导反义端粒酶 RNA 基因注入裸鼠肝癌移植瘤体内, 观察其在动物体内对肝癌移植瘤的抑制作用。

1 材料与方 法

1.1 主要材料与试剂

人肝癌细胞 HepG2、包装细胞 PT67、鼠成纤维细胞 NIH3T3 均由山东省立医院中心实验室保存。携带正、反义端粒酶 RNA 基因逆转录病毒真核表达质粒(PLXSN-hTR-EcoR I 和 PLXSN-hTR-BamH I) 由本实验室构建^[5]。TUNEL 反应试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。4 周龄的 BALB/c 雄性无胸腺裸鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司提供[合格证号为 SCXK(沪)2003-0003]。HG-DMEM、G418、胎牛血清购自 Gibco 公司, 胰蛋白酶购自 Sigma 公司, 4% 锥虫蓝母液购自日本大木工业株式会社。

1.2 细胞培养

HepG2、PT67、NIH3T3 细胞采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 置于 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度的孵箱培养, 每 2 d 换液 1 次。

1.3 逆转录病毒的转染包装及滴度检测

电穿孔法将构建的 PLXSN-hTR-EcoR I 和 PLXSN-hTR-BamH I 转染到 PT67 包装细胞上。G418 筛选培养基培养 4 周, 获得稳定的转染细胞系, 分别命名为 PT67-hTR-EcoR I 和 PT67-hTR-BamH I。收集细胞培养液上清, 针头滤器过滤, 30 000 × g 离心 2 h, 弃上清, 加培养液吹打, -80 ℃ 冰箱保存备用。病毒滴度检测方法参考文献^[6]。

1.4 动物荷瘤模型的制备

HepG2 肝癌细胞生长至 80% 丰度时传代, 取对数生长期的细胞以 0.25% 胰蛋白酶消化, 锥虫蓝染色以确定活细胞数量大于 95%。调整细胞密度为 5.0 × 10⁶/ml, 每只裸鼠于前肢腋窝皮下注射 0.2 ml 细胞悬液, 共 30 只。

1.5 荷瘤动物的分组处理

裸鼠皮下肿瘤直径达到 5 mm 左右时, 随机将 30 只裸鼠分 3 组(每组 10 只), 即 PLXSN-hTR-BamH I 组、PLXSN-hTR-EcoR I 组、生理盐水组。瘤内注射相应制剂 0.2 ml, 共注射 5 次, 隔日注射。根据肿瘤最大直径及最小直径来计算体积。

肿瘤体积 = (最小直径)² × (最大直径) × 0.5。计算肿瘤生长抑制率: 抑制率(%) = (1 - 治疗组体积变化 / 对照组体积) × 100%

1.6 反义 hTR 治疗后肝癌移植瘤组织病理观察

治疗 10 d 后, 处死小鼠, 肿瘤组织用 10% 甲醛固定, 脱水、包埋、切片、H-E 染色。光学显微镜观察, 评价移植瘤坏死部分的范围。按肿瘤组织坏死面积占总面积的百分比分成 4 个等级: < 25% 为(+), 25% ~ 50% 为(++), 51% ~ 75% 为(+++), > 75% 为(Ⅲ)。

1.7 TUNEL 法检测反义 hTR 对裸鼠肝癌移植瘤细胞凋亡的影响

TUNEL 法操作步骤按试剂盒说明进行。凋亡的细胞核呈暗褐色。每张玻片随机观察 10 个视野。计算凋亡指数(AI): AI(%) = 凋亡细胞数 / 总细胞数 × 100%。

1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较采用 *t* 检验; 等级资料行秩和检验。用 SPSS13.0 统计学软件进行数据处理。

2 结 果

2.1 逆转录病毒滴度的测定

所收集到携带正义和反义端粒酶 RNA 基因的浓缩逆转录病毒滴度分别为 0.95 × 10⁶ CFU/ml 和 1.1 × 10⁶ CFU/ml。

2.2 反义 hTR 对裸鼠肝癌移植瘤生长的抑制

通过测得肿瘤直径计算肿瘤体积, 绘制的肿瘤生长曲线如图 1 所示, 可见 PLXSN-hTR-BamH I 治疗组的肿瘤体积较 PLXSN-hTR-EcoR I 组及生理盐水组增长明显缓慢(*P* < 0.01)。PLXSN-hTR-BamH I 组肿瘤生长抑制率为 26.78%, 明显高于 PLXSN-hTR-EcoR I 组的 1.93%(*P* < 0.01, 表 1)。

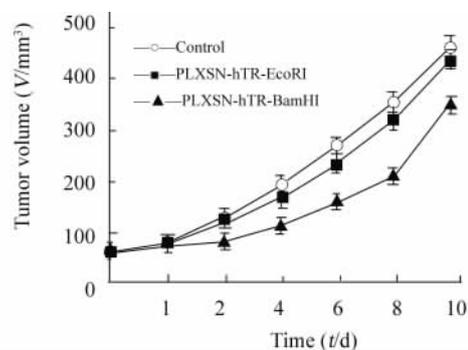


图 1 反义 hTR 对裸鼠肝癌移植瘤生长的抑制

Fig. 1 Antisense hTR inhibited growth of implanted hepatocellular carcinoma in nude mice

2.3 反义 hTR 治疗后肝癌移植瘤组织的病理改变
组织学观察发现各组肿瘤组织均有不同程度坏死, 生理盐水组仅见少量坏死, 注射 PLXSN-hTR-

EcoR I 治疗组坏死有所增加,注射 PLXSN-hTR-BamH I 治疗组坏死最为明显(图 2)。各组肿瘤坏死面积(表 1)通过秩和检验 PLXSN-hTR-BamH I 组与 PLXSN-hTR-EcoR I 组及生理盐水组间差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.4 TUNEL 分析反义 hTR 治疗后裸鼠肝癌移植瘤细胞的凋亡

凋亡细胞细胞核固缩,变圆,TUNEL 染色为细

胞核染为棕黄色。生理盐水组组织中可见少量散在的凋亡细胞,PLXSN-hTR-EcoR I 组有所增多,而 PLXSN-hTR-BamH I 组经处理后可见成片密集的凋亡细胞(图 3)。各组凋亡指数:PLXSN-hTR-BamH I 组为 $(19.18 \pm 8.22)\%$, PLXSN-hTR-EcoR I 组为 $(5.61 \pm 3.25)\%$,生理盐水组 $(5.28 \pm 3.21)\%$ 。PLXSN-hTR-BamH I 组显著高于 PLXSN-hTR-EcoR I 组及生理盐水组($P < 0.01$)。

表 1 反义 hTR 对裸鼠肝癌移植瘤体积及组织坏死的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 Tumor volume and necrotic degree of implanted hepatocellular carcinoma in nude mice after treatment with antisense hTR($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Group	Tumor volume (V/mm^3)			Necrosis degree(n)			
	Initial	Ultimate	Inhibitory rate (%)	+	++	+++	++++
PLXSN-hTR-BamH I	60.34 ± 1.25	$351.06 \pm 9.38^{**}$	26.78	0	4	4	2
PLXSN-hTR-EcoR I	60.80 ± 1.36	450.32 ± 11.78	1.93	5	4	1	0
PBS	60.21 ± 0.64	458.26 ± 19.13		6	3	1	0

** $P < 0.01$ vs PBS or PLXSN-hTR-EcoR I

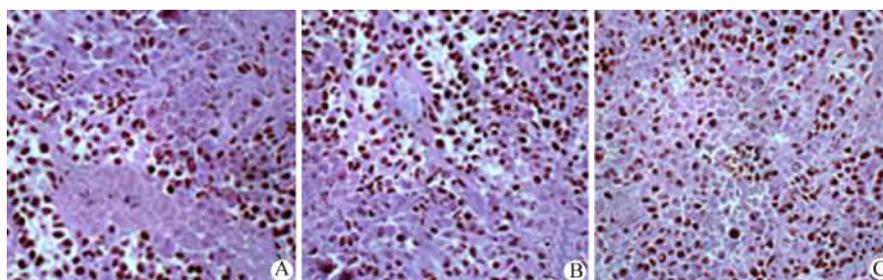


图 2 反义 hTR 治疗后裸鼠肝癌移植瘤组织的病理改变(H-E, $\times 400$)

Fig.2 Histological changes of implanted hepatocellular carcinoma in nude mice after treated with antisense hTR (H-E, $\times 400$)

A: PLXSN-hTR-BamH I (antisense hTR) group; B: PLXSN-hTR-EcoR I (sense hTR) group; C: PBS group

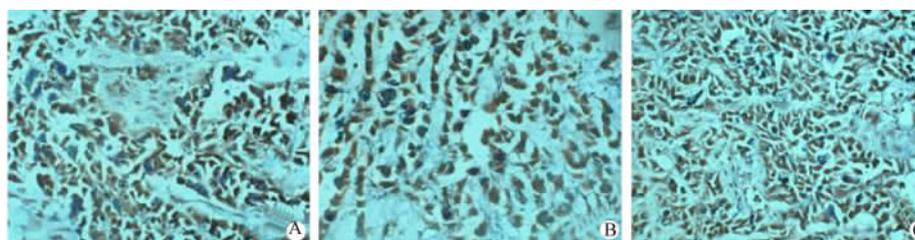


图 3 反义 hTR 促进裸鼠肝癌移植瘤细胞的凋亡(TUNEL, $\times 400$)

Fig.3 Antisense hTR induced apoptosis of implanted hepatocellular carcinoma cells in nude mice(TUNEL, $\times 400$)

A: PLXSN-hTR-BamH I (antisense hTR) group; B: PLXSN-hTR-EcoR I (sense hTR) group; C: PBS group

3 讨论

人端粒酶是一种具有逆转录酶活性的 DNA 聚合酶,有 3 个主要组分:人端粒酶 RNA(hTR)、人端

粒酶催化亚单位(hTERT)、人端粒酶相关蛋白(hTP1)。端粒酶能以自身 RNA 为模板,逆转录合成重复序列,加到染色体的末端,以弥补细胞分裂时端粒 DNA 的丢失,维持端粒的长度^[7]。在大约

90%的恶性肿瘤细胞中,端粒酶都有活性^[8],但是,正常细胞中却无法检测到^[9]。因此,端粒酶成为肿瘤治疗的一个天然靶点,针对端粒酶的特异性靶点治疗将可能不会对正常细胞产生毒性作用。

对于端粒酶活性的抑制主要在于它的3个组分(hTR、hTERT和hTP1),方法主要包括反义技术、RNA干扰及核酶技术等^[10]。反义技术从反向生物学的角度来研究结构基因的功能、基因表达的调控等等,从而为阐明分子细胞生物学的某些根本问题提供了又一重要手段。Natarajan等^[11]分别利用针对hTR和hTERT的反义寡核苷酸和小分子RNA干扰等技术研究对细胞端粒酶活性的影响,结果发现以hTR为基因治疗靶点较以hTERT mRNA为靶点对端粒酶活性的抑制作用更为明显。为此,本研究选用了端粒酶组分hTR,构建反义hTR真核表达载体,并将其导入细胞内,封闭端粒酶RNA,使其失去模板作用,不能向端粒末端添加(TYAGGG)_n重复序列,导致端粒长度的缩短和细胞染色体的不稳定,最终诱导细胞凋亡。

本研究的前期体外实验^[4]将正反义端粒酶RNA真核生物表达载体通过电转法分别转染进肝癌细胞HepG2中,进行体外培养;通过端粒重复序列扩增法(TRAP)检测端粒酶活性,MTT法绘制细胞生长曲线,免疫荧光检测抗中性粒细胞核增殖抗原(PCNA)、流式细胞术分析细胞周期分布及细胞凋亡,从而证实了反义端粒酶RNA基因在体外可以有效促进肿瘤细胞的凋亡,抑制肿瘤细胞的生长。为明确反义端粒酶RNA基因在体内能否发挥抑制作用,本实验建立了一种接种了人肝癌细胞的裸鼠模型,然后分别将携正反义hTR逆转录病毒质粒(PLXSN-hTR-EcoR I和PLXSN-hTR-BamH I)注入体内,测量移植瘤体大小,绘制生长曲线,并行组织病理学及TUNEL检测。结果证实,PLXSN-hTR-BamH I组移植瘤生长明显减缓,肿瘤组织坏死程度及肿瘤细胞凋亡率明显高于PLXSN-hTR-EcoR I组及生理盐水组($P < 0.01$),由此说明,反义端粒酶RNA基因在动物体内也可以有效抑制肝癌的生长,与You等^[12]的研究相似。但是,实验中虽然观察到肿瘤生长减缓,却未见肿瘤体积的缩小,提示反义hTR作为一种独立的治疗手段可能存在一定的局限性,与其他反义寡核苷酸^[13]或与放、化疗^[14-15]联合可能会产生更好的疗效。本研究结果说明,端粒酶RNA模板的特异性抑制为肝癌的治疗提供了新方法,对临床肝癌的治疗具有潜在的应用价值。

[参考文献]

- [1] Gan L, Yang XL, Liu Q, *et al.* Inhibitory effects of thioredoxin reductase antisense RNA on the growth of human hepatocellular carcinoma cells [J]. *J Cell Biochem*, 2005, 15, 96(3):653-664.
- [2] Hao JH, Yu M, Li HK, *et al.* Inhibitory effect of antisense vascular endothelial growth factor RNA on the profile of hepatocellular carcinoma cell line *in vitro* and *in vivo* [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(7):1140-1143.
- [3] Feng J, Funk WD, Wang SS, *et al.* The RNA component of human telomerase [J]. *Science*, 1995, 269(3): 236-1241.
- [4] 赵淑磊,刘吉勇,马进财,等.反义端粒酶RNA基因对肝癌细胞的抑制作用[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2007,14(2):143-147.
- [5] 王丛笑,刘吉勇,赵跃然,等.正反义人端粒酶RNA组分(hTR)逆转录病毒真核表达载体的构建[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2005,12(1):51-54.
- [6] 曹亚.实用分子生物学操作指南[M].北京:人民卫生出版社,2003:196.
- [7] Sato R, Maesawa C, Fujisawa K, *et al.* Prevention of critical telomere shortening by oestradiol in human normal hepatic cultured cells and carbon tetrachloride induced rat liver fibrosis [J]. *Gut*, 2004, 53(7):1001-1009.
- [8] Kondo Y, Koga S, Komata T, *et al.* Treatment of prostate cancer *in vitro* and *in vivo* with 2-5A-anti-telomerase RNA component [J]. *Oncogene*, 2000, 19(5): 2205-2211.
- [9] Harley CB, Villeponteau B. Telomeres and telomerase in aging and cancer [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1995, 5(1): 249-255.
- [10] Chen H, Li Y, Tollefsbol TO. Strategies targeting telomerase inhibition [J]. *Mol Biotechnol*, 2009, 41(2): 194-199.
- [11] Natarajan S, Chen Z, Wancewicz EV, *et al.* Telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA and telomerase RNA (hTR) as targets for downregulation of telomerase activity [J]. *Oligonucleotides*, 2004, 14(4): 263-273.
- [12] You Y, Pu P, Huang Q, *et al.* Antisense telomerase RNA inhibits the growth of human glioma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Oncol*, 2006, 28(5): 1225-1232.
- [13] Lledó S, Alfonso R, Aliño SF. Antisense gene therapy using anti-k-ras and antitelomerase oligonucleotides in colorectal cancer [J]. *Rev Esp Enferm Dig*, 2005, 97(7): 472-480.
- [14] Ji XM, Xie CH, Fang MH, *et al.* Efficient inhibition of human telomerase activity by antisense oligonucleotides sensitizes cancer cells to radiotherapy [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27(9): 1185-1191.
- [15] Ward RJ, Autexier C. Pharmacological telomerase inhibition can sensitize drug-resistant and drug-sensitive cells to chemotherapeutic treatment [J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 68(3): 779-786.

[收稿日期] 2008-11-24

[修回日期] 2009-01-10

[本文编辑] 韩丹