

端粒酶 RNA 模板定点突变对肿瘤细胞 Bcap-37 的作用研究

韦敬航, 杨力媛, 郑洁, 吕齐, 何丹枫, 刘小川

(浙江理工大学生物工程研究所, 杭州 310018)

摘 要: 端粒酶在正常体细胞中极少表达,而在大多数人类恶性肿瘤和细胞系中高度表达,这暗示着端粒酶活性可能与肿瘤密切相关。本研究以人乳腺癌细胞株 Bcap-37 接种裸鼠形成的肿瘤组织块为实验材料,通过检测端粒酶活性、端粒长度及细胞凋亡的情况,观察端粒酶 RNA 模板定点突变的作用。结果显示:MT-hTER 组样本的端粒酶活性低于对照组,端粒长度短于对照组,细胞核形态不够稳定,有较多细胞凋亡的现象,而对照组细胞核形态稳定,较少发生细胞凋亡。以上结果提示着端粒酶 RNA 模板定点突变在一定程度上改变了人乳腺癌细胞株 Bcap-37 的端粒酶活性、端粒长度及细胞凋亡发生率。

关键词: 人乳腺癌细胞株 Bcap-37; 端粒酶活性; 端粒长度; 细胞凋亡

中图分类号: Q243

文献标志码: A

0 引 言

端粒是真核细胞线性染色体末端的特殊结构,由非编码 DNA 重复序列和端粒结合蛋白构成^[1]。端粒在细胞持续分裂中逐渐缩短,达到极限长度时会引发细胞衰老及死亡^[2-3]。若端粒的长度得到稳定维持,细胞就可能推迟衰老和死亡。端粒的延伸需要端粒酶的作用。端粒酶的结构主要由三部分组成:端粒酶逆转录酶(TERT)、端粒酶 RNA(TER)及端粒酶相关蛋白^[4]。端粒酶以自身 RNA 为模板,在 TERT 的催化下逆转录合成端粒 DNA 并添加至端粒的末端,使端粒得到延伸,但端粒酶在正常体细胞中不表达,而在大多数人类恶性肿瘤和细胞系中高度表达。这提示着端粒酶活性与肿瘤密切相关,因此以端粒酶为靶标的肿瘤治疗研究受到广泛的关注。

TERT 和 TER 均对端粒酶活性具有重要作用。研究表明,人端粒酶逆转录酶(hTERT)的表达水平与端粒酶活性呈正向相关^[5-7],以及显性失活 hTERT(Dominant-negative hTERT, DN-hTERT)

的表达会抑制人肝癌细胞的端粒酶活性并下调端粒平均长度^[8]。TER 分为模板区和非模板区,模板区序列决定端粒酶所合成端粒 DNA 的序列特异性,非模板区则提供底物的结合位点^[9]。hTER 含有 445 个核苷酸,模板区为 5'-CUAACCCUAAG-3'^[10],位于 46~56 区段。研究表明,在人肿瘤细胞中表达模板突变的 hTER(MT-hTER)可导致端粒酶活性的改变以及突变端粒 DNA 的合成,但对肿瘤细胞生长的抑制作用不明显^[11]。Kim 等^[12]发现在前列腺(LNCaP)和乳腺(MCF-7)肿瘤细胞系中低水平表达 MT-hTER 可抑制肿瘤细胞生长并诱导细胞凋亡。Li 等^[13]发现在肿瘤细胞中过表达 MT-hTER,可抑制肿瘤细胞生长。Stohr 和 Blackburn 发现在肿瘤细胞中过表达 MT-hTER-47A 可抑制肿瘤细胞生长并诱导细胞凋亡^[14]。这表明,端粒酶 RNA 模板的突变可在一定程度上改变某些类型肿瘤细胞的端粒酶活性,抑制其生长以及诱导细胞凋亡。人端粒酶 RNA 模板序列含有 11 个核苷酸,定点突变对不同类型肿瘤细胞的作用程度仍需

收稿日期: 2012-12-10

基金项目: 浙江省大学生科技创新活动计划(新苗人才计划)

作者简介: 韦敬航(1987-),男,广西宜州市人,硕士研究生,主要从事染色体端粒、端粒酶与细胞的癌变机制研究。

通信作者: 刘小川,电子邮箱: xcliu@zstu.edu.cn

要深入研究。

因此本研究通过检测人乳腺癌细胞株 Bcap-37 肿瘤组织块的端粒酶活性、端粒平均长度及细胞凋亡率,并对比 MT-hTER 组与对照组的实验结果,可获知 hTER 模板定点突变的作用及程度,为端粒酶与肿瘤关系的深入研究、肿瘤治疗药物的研发和改进提供参考。

1 实验材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞株 Bcap-37 的肿瘤组织块为本实验室所有,是将 Bcap-37 细胞株接种至裸鼠增殖形成的肿块组织;T₄ DNA Ligase、rTaq 酶、RNase 抑制剂、dNTP、Universal Genomic DNA Extraction 试剂盒购自 TaKaRa 公司;固相 RNase 清除剂购自北京天恩泽基因科技有限公司;焦磷酸二乙酯(DEPC)、聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)、β-巯基乙醇、二硫苏糖醇(DTT)、购自生工生物工程(上海)股份有限公司;乙二醇二乙醚二胺四乙酸(EGTA)、乙基苯基聚乙二醇(NP-40)、MgCl₂ 购自 Sigma 公司;苯甲基磺酰氟(PMSF)购自 Bio Basic Inc 公司;脱氧胆酸钠购自 Amresco 公司;苏木精染色液购自碧云天生物技术研究所;接头与引物均为生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 端粒酶活性的测定

端粒酶的提取参考 Gollahon 的方法^[15]。取 100 mg 人乳腺癌细胞株 Bcap-37 的肿瘤组织块移入预冷的研钵中,加液氮研磨至粉末,加 200 μL 预冷的端粒酶裂解液(10 mM Tris-HCl(pH7.5);1 mM EGTA(pH8.0);0.1 mM PMSF;5 mM β-巯基乙醇;1% NP-40;0.25 mM 脱氧胆酸钠;10%甘油;150 mM NaCl;1 mM MgCl₂)及 100 U RNase 抑制剂,充分匀浆后将研磨液转入 1.5 mL EP 管,置于冰上 25 min,16 000 r/min 离心 20 min,取上清保存于一80℃。通过 NanoDrop 2000 Spectrophotometer 测定端粒酶提取液总蛋白的含量,重复 3 次,取平均值。

酶促反应采用陈波的方法^[16]。酶促反应体系(50 μL):2.5 μL Tris-HCl(1 M,pH8.3),10 μL MgCl₂(25 mM),5 μL EGTA(100 mM),2.5 μL KCl(1 M),0.5 μL Triton X-100(10%),0.5 μL DTT(100 mM),5 μL BSA(100 ng/μL),1 μL dNTP(无 dCTP,各 2.5 mM),3 μL 前导引物(20 mM),1 μL 端粒酶提取液总蛋白(2 μg/μL),19 μL DEPC-H₂O。酶促反应设正常组及灭活处理

组(灭活条件:65℃,10 min),酶促反应条件:23℃,30 min;65℃,10 min。反应完毕后将酶促反应液与 50 μL 氯仿混合,通过常规短片段 DNA 回收方法回收酶促反应产物。通过 NanoDrop 2000 Spectrophotometer 测定 ssDNA 含量,重复 3 次,取平均值。

1.2.2 端粒长度的测定

从人乳腺癌细胞株 Bcap-37 的肿瘤组织块中提取人类基因组 DNA,提取操作使用宝生物工程(大连)有限公司的 Universal Genomic DNA Extraction 试剂盒,具体步骤参见该试剂盒说明书。根据 NCBI 数据库人类基因组 DNA 设计出可特异性扩增人类 18 号染色体短臂端粒的上游引物。

接头制备体系(40 μL,5 μM):10 μL 20 μM Link1;10 μL 20 μM Link2;2 μL 10× adapter buffer(100 mM Tris-acetate(pH7.5);100 mM Mg-acetate;500 mM K-acetate);加入 18 μL 无菌蒸馏水,混匀,3 000 r/min 离心 15 s;94℃,DNA 变性 3 min,于室温缓慢冷却 20 min,重复 DNA 加热变性及降温复性的操作两次。接头标记为 Linker。将基因组 DNA 与 Linker 进行连接。连接体系:1 μL 10×T4 DNA Ligase Buffer;1 000 ng 基因组 DNA 样品;0.5 μL 5 μM Linker;0.5 μL 350 U/μL T₄ DNA Ligase;用 ddH₂O 补至 10 μL,混匀后 16℃ 连接过夜;65℃,15 min 终止反应。加入 40 μL 无菌蒸馏水,浓度稀释至 20 ng/μL,作为 PCR 反应模板于 4℃ 保存。

PCR 体系:2.0 μL 10×PCR Buffer(Mg²⁺ Plus 15 mM),1.6 μL dNTP Mixture(2.5 mM),0.2 μL 上游引物(20 μM),0.2 μL Link2(20 μM),10.8 μL ddH₂O,5 μL 模板 DNA(20 ng/μL),0.2 μL Taq 酶(5 U/μL)。PCR 反应参数:94℃ 3 min,(94℃ 45 s,54℃ 45 s,72℃ 50 s)×36 个循环,72℃ 延伸 10 min。凝胶电泳分析 PCR 产物,采用 1.2% 琼脂糖凝胶,4 V/cm 40 min 电泳,放入 1.0 μg/mL 溴化乙锭溶液中染色 20 min,自来水中脱色 20 min。通过 SynGene 凝胶电泳成像分析系统在 254 nm 波长下进行成像,最后用 Gene Tools 软件对电泳结果进行定量分析,以 250 bp marker 的 1 000 bp DNA 条带为标准,计算出端粒 smear 区的总量及 1/2 总量处的分子量,由此确定端粒平均长度。计算方法:端粒长度=(M-D-P-A)bp(M:端粒平均分子量,即 1/2 总量处的分子量;D:上游引物与端粒的距离;P:上游引物的长度;A:Link1 的长度。)

1.2.3 细胞核形态的观察

人乳腺癌细胞株 Bcap-37 肿瘤组织块的石蜡切

片可通过常规动物组织石蜡切片制作方法获得。切片厚度设定为 6 μm ,染色方法为 Feulgen 染色法。在肿瘤组织块脱水之前先利用苏木精对其进行短暂染色,方便观察其在石蜡中的位置。封片完成后即可在高倍显微镜下观察肿瘤组织块细胞核的形态。

2 结果与分析

2.1 端粒酶活性的测定结果分析

端粒酶活性的高低可以根据正常组 ssDNA 含量与灭活处理组 ssDNA 含量的差值来判断。根据表 1 中的数据,可知对照组 C1 样本的正常组与灭活处理组的 ssDNA 含量差值为 786 ng,MT-hTER 组 M1、M2、M3 和 M4 样本的 ssDNA 含量差值分别为 202、400、253 ng 和 731 ng,均低于对照组样本。这提示着 MT-hTER 组样本的端粒酶活性低于对照组的端粒酶活性。

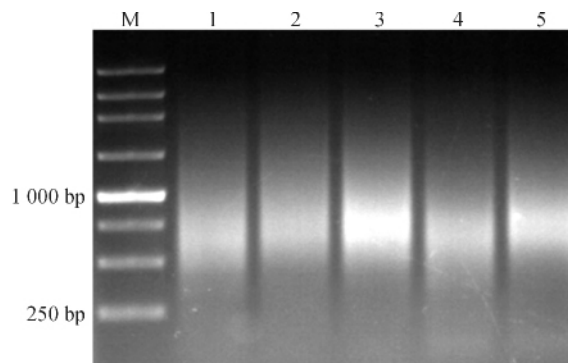
表 1 人乳腺癌细胞株 Bcap-37 肿瘤组织块 MT-hTER 组和对照组的端粒酶活性

人乳腺癌 细胞株	正常酶促 反应 ssDNA 含量/ng	酶灭活酶促 反应 ssDNA 含量/ng	两组 ssDNA 含量的 差值/ng
Bcap-37 样品			
M1	3 711 \pm 130	3 509 \pm 155	202
M2	4 021 \pm 130	3 621 \pm 75	400
C1	4 667 \pm 115	3 880 \pm 25	786
M3	3 805 \pm 45	3 552 \pm 28	253
M4	4 203 \pm 85	3 472 \pm 33	731

2.2 端粒 PCR 产物的电泳结果分析

人类基因组 18 号染色体短臂的端粒进行 PCR 扩增后,将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,然后利用 GeneTools 软件进行定量分析电泳结果(见图 1),得到 PCR 产物总量及 1/2 总量处的 DNA 分子量,从而可计算出 MT-hTER 组和对照组的端粒平均长度(见表 2)。图 1 显示,对照组 C1 样本的产物条带亮度最大,表 2 的数据可以证实这一点,对照组 C1 的 PCR 产物总量为 902.909 ng,MT-hTER 组样本 M1、M2、M3 和 M4 的 PCR 产物总量分别为 668.585、715.500、749.616 ng 和 841.607 ng,均小于对照组;通过 DNA 分子量的计算,得到对照

组样本 C1 的 18 号染色体短臂的端粒平均长度是 498 bp,MT-hTER 组样本 M1、M2、M3 和 M4 的端粒平均长度分别为 431、479、422 bp 和 475 bp,均小于对照组。这提示着 MT-hTER 组样本的端粒平均长度小于对照组样本的端粒平均长度。



M:250 bp DNA Ladder Marker;1:MT-hTER 组样本 M1;2:MT-hTER 组样本 M2;3:对照组样本 C1;4:MT-hTER 组样本 M3;5:MT-hTER 组样本 M4

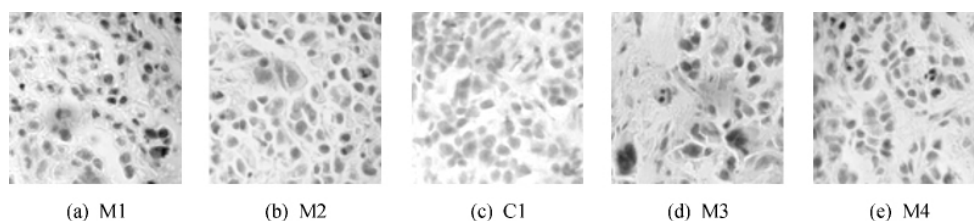
图 1 人类 18 号染色体短臂端粒 PCR 扩增产物电泳结果

表 2 人类 18 号染色体短臂端粒 PCR 扩增产物定量分析结果

人乳腺癌细胞株 Bcap-37 样本	PCR 产物 总量/ng	1/2 总量的 分子量/bp	端粒平均 长度/bp
M1	668.585	765	431
M2	715.500	813	479
C1	902.909	832	498
M3	749.616	756	422
M4	841.607	809	475

2.3 肿瘤组织块石蜡切片的结果分析

人乳腺癌细胞株 Bcap-37 肿瘤组织块石蜡切片在高倍光学显微镜下可观察到被 Schiff 试剂染成紫红色的细胞核的具体形态(见图 2)。结果显示:MT-hTER 组样本 M1、M2、M3 和 M4 的细胞核形态不稳定,大小不均一,发生较多细胞核固缩导致的致密浓染以及染色质边缘化现象,而对照组样本 C1 的细胞核形态较稳定,大小较均一,与 MT-hTER 组样本类似的细胞凋亡现象较少发生。这表明 MT-hTER 组样本的细胞凋亡率高于对照组样本的细胞凋亡率。



(a):MT-hTER 组 M1 样本;(b):MT-hTER 组 M2 样本;(c):对照组 C1 样本;(d):MT-hTER 组 M3 样本;(e):MT-hTER 组 M4 样本

图 2 人乳腺癌细胞株 Bcap-37 肿瘤组织块 MT-hTER 组与对照组的细胞核形态($\times 1\,000$)

3 讨论

研究端粒酶 RNA 模板定点突变对人乳腺癌细胞株 Bcap-37 的作用主要从三个方面入手,分别为检测细胞内端粒酶的活性、端粒的平常长度以及细胞凋亡的情况。这三个对象在自然状态与突变状态之间的差异可以让我们得到该突变的作用及程度。

本研究中端粒酶活性的测定结果能直接反映出端粒酶 RNA 模板的突变对端粒酶活性的影响。端粒酶提取液中端粒酶的活性维持效果在很大程度上决定了测定结果的准确性,因此在制备端粒酶提取液时需要在提取过程中保持端粒酶在细胞内的活性。通过清除实验器皿和试剂的 RNase,在端粒酶提取液中加入 RNase 抑制剂,以及将提取液分装冻存这三个步骤可有效地维持端粒酶 RNA 的完整性,从而保持其自然活性。酶促反应过后,测定正常组和灭活处理组酶促产物 ssDNA 含量及计算其差值得到样本的端粒酶活性,结果表明对照组的端粒酶活性大于 MT-hTER 组样本的端粒酶活性,这提示着人端粒酶 RNA 模板定点突变在一定程度上改变了端粒酶活性。

本研究中测定端粒平均长度的方法是在端粒 3'端 G 悬突单链上连接特殊接头,在端粒上游设计特殊引物,通过 PCR 扩增出染色体的端粒,利用凝胶成像系统和 GeneTools 软件定量分析得到端粒的平均长度。通过在提取过程中保持基因组 DNA 完整性以及确定 PCR 扩增最佳条件可有效地保证结果的准确性。结果显示 MT-hTER 组样本的端粒平均长度均小于对照组样本的端粒平均长度,这提示着人端粒酶 RNA 模板定点突变在一定程度上改变了端粒的平均长度。造成这个现象的原因可能是 TER 改变下调了端粒酶活性,从而延缓端粒延伸速度,最终使得 MT-hTER 组样本的端粒平均长度小于对照组样本的端粒平均长度。

本研究中通过制作人乳腺癌细胞株 Bcap-37 肿瘤组织块的石蜡切片,然后利用 Feulgen 染色法对细胞核进行染色,最后可在高倍光学显微镜下清晰地看到肿瘤组织块的细胞核形态结构。结果显示 MT-hTER 组样本的细胞核形态各异,大小不均一,发生较多细胞核致密浓染、染色质边缘化的现象,而对照组的细胞核形态稳定,大小较均一。这提示着人端粒酶 RNA 模板定点突变在一定程度上诱导了人乳腺癌细胞株 Bcap-37 发生细胞凋亡。造成这种现象的原因可能是端粒酶 RNA 模板的定点突变导

致端粒酶活性的下降,使得端粒无法有效延伸,从而影响端粒结构的稳定性,最终促进了人乳腺癌细胞株 Bcap-37 的细胞凋亡。

本研究提示着端粒酶 RNA 模板定点突变可能在一定程度上改变了人乳腺癌细胞株 Bcap-37 的端粒酶活性、端粒平均长度和细胞凋亡率。该结果可为端粒酶与肿瘤关系的深入研究提供参考。

参考文献:

- [1] Blackburn E H. Structure and function of telomeres[J]. *Nature*, 1991, 350(6319): 569-573.
- [2] Chin L, Artandi S E, Shen Q, et al. p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis[J]. *Cell*, 1999, 97(4): 527-538.
- [3] Allsopp R C, Vaziri H, Patterson C, et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(21): 10114-10118.
- [4] Blackburn E H, Greider C W, Szostak J W. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging[J]. *Nat Med*, 2006, 12(10): 1133-1138.
- [5] Masutomi K, Yu E Y, Khurts S, et al. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells[J]. *Cell*, 2003, 114(2): 241-253.
- [6] Meyerson M, Counter C M, Eaton E N, et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization[J]. *Cell*, 1997, 90(4): 785-795.
- [7] Sharma G G, Gupta A, Wang H, et al. hTERT associates with human telomeres and enhances genomic stability and DNA repair[J]. *Oncogene*, 2003, 22(1): 131-146.
- [8] Zhang R, Wang X, Guo L, et al. Growth inhibition of BEL-7404 human hepatoma cells by expression of mutant telomerase reverse transcriptase[J]. *Int J Cancer*, 2002, 97(2): 173-179.
- [9] Theimer C A, Feigon J. Structure and function of telomerase RNA[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2006, 16(3): 307-318.
- [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] Marusic L, Anton M, Tidy A, et al. Reprogramming of telomerase by expression of mutant telomerase RNA template in human cells leads to altered telomeres that

- correlate with reduced cell viability[J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(11): 6394-6401.
- [12] Kim M M, Rivera M A, Botchkina I L, et al. A low threshold level of expression of mutant-template telomerase RNA inhibits human tumor cell proliferation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(14): 7982-7987.
- [13] Li S, Rosenberg J E, Donjacour A A, et al. Rapid inhibition of cancer cell growth induced by lentiviral delivery and expression of mutant-template telomerase RNA and anti-telomerase short-interfering RNA[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(14): 4833-4840.
- [14] Stohr B A, Blackburn E H. ATM mediates cytotoxicity of a mutant telomerase RNA in human cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(13): 5309-5317.
- [15] Gollahon L S, Holt S E. Alternative methods of extracting telomerase activity from human tumor samples[J]. *Cancer Lett*, 2000, 159(2): 141-149.
- [16] 陈 波, 梁江丽, 田晓平, 等. 水稻愈伤组织端粒酶催化特征检测[J]. *浙江理工大学学报*, 2009, 26(4): 597-601.

Research on Effect of Telomerase RNA Template Site-specific Mutagenesis on Cancer Cell Bcap-37

WEI Jing-hang, YANG Li-yuan, ZHENG Jie, LÜ Qi, HE Dan-feng, LIU Xiao-chuan
(Bioengineering Institute, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Telomerase is rarely expressed in normal somatic cell, but highly expressed in most human malignant tumor and cell lines. This implies that telomerase activity might be closely related to tumor. This research observes the effect of telomerase RNA template site-specific mutagenesis by detecting telomerase activity, telomere length and cell apoptosis with tumor tissue block formed in nude mouse inoculated with human mammary cancer cell line Bcap-37 as the experimental material. The result shows that samples in MT-hTER group have a lower telomerase activity and shorter telomere length than the control group; the karyomorphism is not stable enough and there is cell apoptosis; however, in the control group, the karyomorphism is stable and cell apoptosis rarely occurs. Results above indicate that telomerase RNA template site-specific mutagenesis changes the telomerase activity, telomere length and cell apoptosis occurrence rate of human mammary cancer cell line Bcap-37 to a certain extent.

Key words: human mammary cancer cell line Bcap-37; telomerase activity; telomere length; cell apoptosis

(责任编辑: 许惠儿)