

溶瘤腺病毒介导 RNA 干扰人端粒酶逆转录酶抑制 HeLa 细胞生长

刘艳华*, 郑骏年, 毛立军, 孙方浩, 温儒民, 张宝福, 李 望, 刘俊杰, 裴冬生

Inhibitory Effects of Oncolytic Adenovirus with hTERT Small Interference RNA on Proliferation of Human Cervical Cancer HeLa Cells

LIU Yan-hua*, ZHENG Jun-nian, MAO Li-jun, SUN Fang-hao, WEN Ru-min, ZHANG Bao-fu, LI Wang, LIU Jun-jie, PEI Dong-sheng

Laboratory of Urology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China

(* Present: Department of Oncology, Affiliated Xuzhou Central Hospital of Southeast University Medical College, Xuzhou 221009)

Corresponding Author: ZHENG Jun-nian, E-mail: zhengjunnian@sina.com.cn

Abstract: Objective To study the effects of suppressing cell proliferation and hTERT gene expression on HeLa cells with ZD55-TERT-siRNA, an oncolytic adenovirus associated small interference RNA targeting hTERT gene. **Methods** ZD55-EGFP, an E1b-55kD gene-deleted oncolytic adenovirus, AD-TERT-siRNA, a replication-deficient adenovirus expressing hTERT-siRNA and AD-EGFP, a replication-deficient adenovirus were used as control groups. Human cervical carcinoma HeLa cells were infected by these four kinds of adenoviruses using different titers respectively. Cytotoxicity was tested by crystal violet staining. Cell proliferation was assayed by MTT method. hTERT expression levels of transfected HeLa cells were detected by RT-PCR, Western blot and immunocytochemistry respectively. The expression of E1A protein was examined by immunocytochemistry and Western blot. **Results** The cytotoxicity and inhibitory effects of ZD55-TERT-siRNA on HeLa cells were the most significant while ZD55-EGFP and AD-TERT-siRNA were more potent than AD-EGFP. Adenoviral particles could be detected in tumor cells infected by ZD55-TERT-siRNA and ZD55-EGFP, but not in the cells infected with AD-TERT-siRNA and AD-EGFP. The most significant inhibition of hTERT expression were observed in lysates from HeLa cells infected with ZD55-TERT-siRNA. **Conclusion** ZD55-TERT-siRNA has the most significant antitumor effect and can significantly knockdown hTERT expression.

Key words: Cervical cancer; Oncolysis adenovirus; Small interference RNA; Human telomerase reverse transcriptase

摘 要: 目的 观察表达人端粒酶逆转录酶 siRNA(hTERT-siRNA)的溶瘤腺病毒 ZD55-TERT-siRNA 对体外培养人宫颈癌 HeLa 细胞生长及 hTERT 基因表达的影响。 **方法** 以溶瘤腺病毒 ZD55-EGFP、表达 hTERT-siRNA 的增殖缺陷腺病毒 AD-TERT-siRNA 和增殖缺陷腺病毒 AD-EGFP 作为对照组。不同滴度四种病毒分别感染 HeLa 细胞, 结晶紫法检测细胞毒作用, MTT 法测定细胞生长抑制率; RT-PCR、Western blot、免疫细胞化学(ICC)法分别检测 hTERT 的 mRNA、蛋白质及抗原表达, Western blot 和 ICC 法分别测定腺病毒 E1A 蛋白及抗原表达。 **结果** 对 HeLa 细胞的生长抑制作用和细胞毒作用 ZD55-TERT-siRNA>AD-TERT-siRNA 和 ZD55-EGFP>AD-EGFP; ZD55-TERT-siRNA 和 ZD55-EGFP 感染的 HeLa 细胞表达 E1A; 抑制 hTERT 表达作用依次为 ZD55-TERT-siRNA>AD-TERT-siRNA

>ZD55-EGFP、AD-EGFP。 **结论** 溶瘤腺病毒介导 RNA 干扰 hTERT 能有效抑制 HeLa 细胞生长及 hTERT 基因表达。

关键词: 宫颈癌; 溶瘤腺病毒; RNA 干扰; 人端粒酶逆转录酶(hTERT)

中图分类号: R737. 33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2009)10-0811-04

收稿日期: 2008-07-21; 修回日期: 2009-04-30
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30700999); 江苏省高校自然基金资助项目(06KJB320114)
作者单位: 221002 江苏徐州, 徐州医学院附属医院泌尿外科(* 现单位: 221009 江苏徐州, 东南大学医学院附属徐州中心医院肿瘤内科)
通信作者: 郑骏年, E-mail: zhengjunnian@sina.com.cn
作者简介: 刘艳华(1981-), 女, 硕士, 住院医师, 主要从事肿瘤生物治疗的研究

0 引言

RNA 干扰技术是新近发展起来的一种封闭基因表达的有效方法,已被成功用于抑制肿瘤生长^[1]。研究显示溶瘤腺病毒载体能介导 RNA 干扰靶向作用于肿瘤细胞^[2]。许多研究显示超过 85% 的人类肿瘤有端粒酶逆转录酶活性增高^[3]。本研究将针对 hTERT 的小干扰 RNA(hTERT-siRNA)表达模板插入溶瘤腺病毒,研究其对体外培养人宫颈癌 HeLa 细胞的生长抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒和细胞株 ZD55-EGFP 和 AD-EGFP 由中国科学院生命科学研究刘新垣院士惠赠。ZD55-TERT-siRNA 和 AD-TERT-siRNA 由本室构建^[4]。人宫颈癌 HeLa 细胞株购于中国科学院细胞研究所。

1.1.2 主要试剂 四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)均为 Sigma 公司产品;标准胎牛血清购于天津血液研究所;DMEM 培养液购于美国 Gibco 公司;RT-PCR 试剂盒为美国 Promega 公司产品;第二步法免疫组织化学法检测试剂购自北京中杉金桥;hTERT、 β -actin 和 E1A 抗体均为美国 Santa Cruz 公司产品;BCA 蛋白质定量试剂盒购自碧云天。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与病毒感染 HeLa 细胞株用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。将处于对数生长期的 HeLa 细胞按 1×10^6 个/孔、 1×10^5 个/孔、 1×10^4 个/孔分别接种于 6 孔板、24 孔板、96 孔板中,接种 24 h 后,含 10% 胎牛血清的培养液换成无血清培养液,感染 ZD55-TERT-siRNA、ZD55-EGFP、AD-TERT-siRNA 和 AD-EGFP 四种病毒 1 h 后,去除培养液,PBS 洗 1 遍后加含 5% 胎牛血清的培养液培养。

1.2.2 MTT 法检测 HeLa 细胞生长抑制率 MOI = 10 的四种病毒感染 HeLa 细胞后第 24 h、48 h、72 h 和 96 h,各培养孔中加入 5 mg/ml 的 MTT 10 μ l 孵育 4 h,弃去培养液,每孔加入 DMSO 100 μ l,震荡 10 min,应用 Bio-Rad550 酶标仪测每孔 490 nm 波长的光吸收值(OD 值),每组设 3 个复孔取均值,计算其抑制率:抑制率 = $(1 - \text{实验组 OD 值均值} / \text{空白组 OD 均值}) \times 100\%$ 。

1.2.3 结晶紫染色法检测细胞毒作用 分别以 0、1、10、100 MOI 的四种病毒感染培养于 24 孔板中的 HeLa 细胞,PBS 组为阴性对照组,37℃、5% CO₂ 条件下培养 6 天后,吸净培养液,每孔加 500 μ l

结晶紫染色液(2% 结晶紫溶于 20% 甲醇溶液)染色 15 min,自来水冲净多余染料。

1.2.4 RT-PCR 检测 hTERT mRNA 表达 以 Trizol 取细胞总 RNA。使用 Access RT-PCR 系统进行 RT-PCR,按说明书进行操作。 β -actin 为内参用于半定量分析,引物序列:上游:5'-CTGG-GACGA CATGGAGAAAA -3',下游:5'-AAG-GAAGGCTGGAAGAGTGC -3',扩增片段 564 bp。hTERT 引物序列:上游:5'-TCTACCG-GAAGAGTGTCTGGAGCAA-3',下游:5'-GCTC-CCACGA CGTAGTCCATGTTC A-3',扩增片段 210 bp。产物经 1% 琼脂糖电泳。

1.2.5 Western blot 检测 Western blot 检测 hTERT 及 E1A 表达, β -actin 作为对照。HeLa 细胞裂解液提取细胞核蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳分离蛋白质后,将蛋白转移到硝酸纤维素膜。然后分别加入 β -actin、E1A 和 hTERT 一抗(1:500 稀释),37℃ 温育 2 h,再加入二抗,37℃ 温育 1 h 后 DAB 显色,凝胶成像系统拍摄并进行灰度分析。hTERT 蛋白表达率(%) = 实验组蛋白相对含量/空白对照组相对含量。

1.2.6 免疫细胞化学染色法检测 hTERT 及 E1A 表达 HeLa 细胞感染病毒 48 h,弃去培养液,按第二步法免疫组织化学检测试剂盒说明进行免疫染色后,倒置显微镜下拍照。结果判定:hTERT 及 E1A 阳性反应物为胞核浅棕至深棕色颗粒。取五个不同视野分别计算细胞核呈棕红色的细胞数占总细胞数的百分比取均值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 统计软件分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析,假设检验水准按 $\alpha = 0.05$ 判定, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ZD55-TERT-siRNA 对 HeLa 细胞的细胞毒作用

结果见图 1。结晶紫染色结果显示,MOI = 1 时 ZD55-TERT-siRNA 可以将 HeLa 细胞基本杀灭,MOI = 10 时 ZD55-TERT-siRNA 可以将细胞全部杀灭。而 MOI = 10 时 ZD55-EGFP、AD-TERT-siRNA 只能将细胞部分杀灭,两种病毒的细胞毒性作用相仿。AD-EGFP 无明显细胞毒性作用。结果表明 ZD55-TERT-siRNA 杀伤 HeLa 细胞作用优于 ZD55-EGFP 和 AD-TERT-siRNA。

2.2 ZD55-TERT-siRNA 对 HeLa 细胞增殖的影响

结果见图 2。感染病毒 72 h,ZD55-TERT-siR-

NA、ZD55-EGFP、AD-TERT-siRNA、AD-EGFP 对 HeLa 细胞的生长抑制率(%)分别为(65.2 ± 2.3)、(34.4 ± 3.1)、(31.2 ± 2.6)、(17.2 ± 3.4)，ZD55-TERT-siRNA 抑制作用最强，ZD55-EGFP 和 AD-TERT-siRNA 比较差异无统计学意义($P>0.05$)，AD-EGFP 的细胞抑制作用最低；随着时间的延长 ZD55-TERT-siRNA 的抗增殖作用上升幅度明显大于对照组。

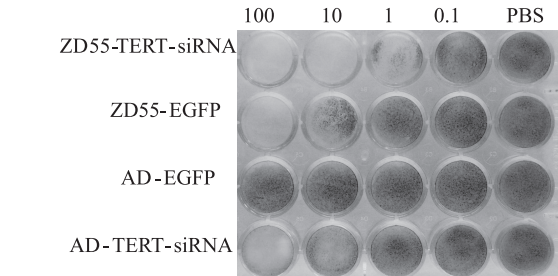


图 1 结晶紫测病毒对 HeLa 细胞的细胞毒作用
Figure 1 Cytotoxicity of four kinds of adenoviruses in HeLa cells tested by crystal violet staining

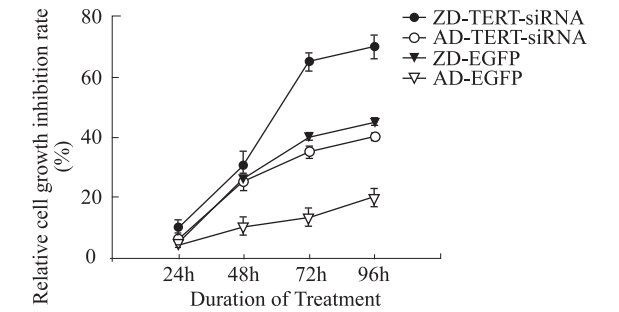


图 2 MTT 法测感染病毒后 HeLa 细胞生长抑制率
Figure 2 Cell inhibitory rate was determined by MTT assay

2.3 ZD55-TERT-siRNA 在 HeLa 细胞中的复制
结果见图 3。E1A 基因是腺病毒复制所必需的基因，其检出标志腺病毒复制。免疫细胞化学染色及 Western blot 显示，E1A 抗原在 ZD55-TERT-siRNA、ZD55-EGFP 感染细胞中大量表达，在 AD-TERT-siRNA、AD-EGFP 和阴性对照组细胞中无表达。

2.4 ZD55-TERT-siRNA 明显下调 HeLa 细胞中 hTERT mRNA 及蛋白的表达

ZD55-TERT-siRNA、ZD55-EGFP、AD-TERT-siRNA、AD-EGFP 和阴性对照组细胞 hTERT-mRNA 表达率(%)分别为(25.2 ± 2.3)、(88.1 ± 2.3)、(52.3 ± 1.2)、(86.5 ± 2.3)、100，见图 4。Western blot 显示 hTERT 蛋白表达率(%)分别为(35.9 ± 1.2)、(86.6 ± 2.3)、(52.3 ± 1.2)、(89.4 ± 1.3)、100%。免疫细胞化学染色显示 hTERT 抗原阳性表达率(%)分别为(27.2 ± 2.9)、(88.5 ± 2.2)、(46.5 ± 2.4)、(85.5 ± 2.1)、(92.8 ± 2.3)，见图 5；

ZD55-TERT- siRNA 感染细胞 hTERT 表达最低，与其他各组比较差异均有统计学意义($P<0.01$)；AD-TERT-siRNA 感染组与 ZD55-EGFP、AD-EGFP 感染组比较差异有统计学意义($P<0.05$)；ZD55-EGFP、AD-EGFP 组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

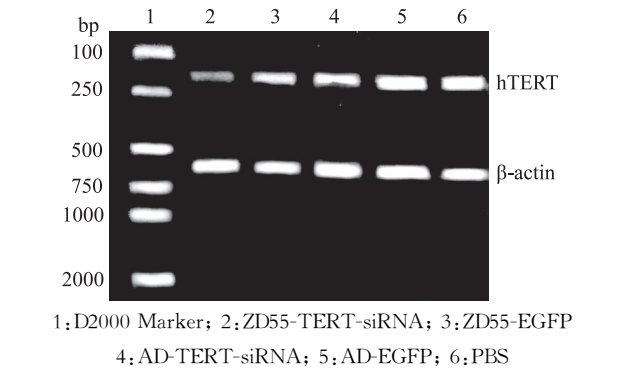


图 4 RT-PCR 检测病毒感染后 HeLa 细胞中 hTERT-mRNA 水平， β -actin 作上样
Figure 4 RT-PCR analysis of hTERT mRNA levels in HeLa cells, β -actin protein was used as a loading control

3 讨论

腺病毒载体是目前肿瘤基因治疗常用病毒载体，构建时为保证安全，将腺病毒复制的必需基因 E1 区删除，使得病毒不能复制。但增殖能力的丧失也导致转染效率低、抗癌基因表达量不足^[5]。腺病毒 E1b55kD 蛋白能对抗 p53 蛋白的抗病毒复制作用，因此 E1b55kD 蛋白缺失的腺病毒在正常细胞内无法复制，而在 p53 突变的肿瘤细胞中复制不受影响，这种 E1b55kD 蛋白缺失腺病毒被称为条件增殖腺病毒 (Conditionally replicative adenovirus, CRAd)。CRAd 载体能够在肿瘤细胞内选择性增殖，从而使抗癌基因大量扩增，显著增强杀伤肿瘤作用^[6]。由于超过一半肿瘤 p53 丢失，某些肿瘤如结肠癌 p53 丢失更高达 70%，因此 CRAd 载体具有很大应用范围。中科院刘新垣院士将 CRAd 改造成具有酶切位点的载体 pZD55，插入治疗基因后包装成具有增殖能力的基因-病毒系统在体内外取得显著治疗效果^[7]。

RNA 干扰是目前最有效的基因沉默技术。已证实针对 hTERT 基因的 siRNA 可有效抑制宫颈癌增殖、促进凋亡，但作用短暂是其致命缺点^[8]。为提高治疗效果，我们构建了 ZD55-TERT-siRNA，以 ZD55-EGFP、AD-TERT-siRNA、AD-EGFP 为对照组。四种病毒对宫颈癌细胞影响的对比研究发现，ZD55-TERT- siRNA 抑制 HeLa 细胞生长及细胞毒作用最强。ZD55-TERT-siRNA、ZD55-EGFP

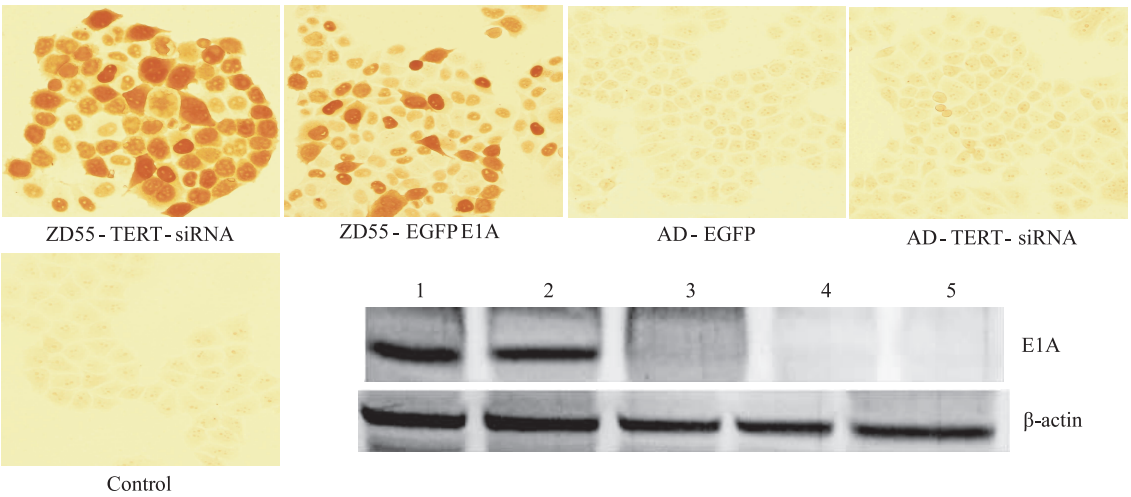


图 3 免疫细胞化学(SP×200)和 Western blot 检测 HeLa 细胞中 E1A 表达

Figure 3 E1A protein level in HeLa cells after infection were analyzed by immunocytochemistry (SP×200) and Western blot

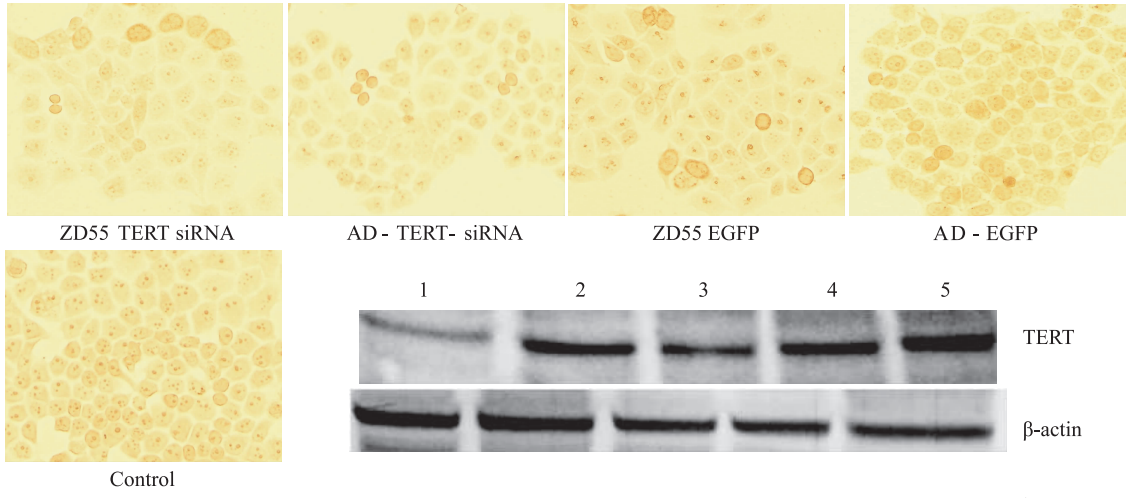


图 5 免疫细胞化学(SP×200)和 Western blot 检测 HeLa 细胞中 hTERT 表达

Figure 5 hTERT protein level in HeLa cells after infection were analyzed by immunocytochemical (SP×200) and Western blot

感染的 HeLa 细胞表达 E1A, AD-EGFP、AD-TERT-siRNA 感染的 HeLa 细胞不表达 E1A,说明溶瘤腺病毒能在 p53 突变的 HeLa 细胞中复制。RT-PCR 法、Western blot 及免疫细胞化学法证实抑制 hTERT 表达作用依次为 ZD55-TERT-siRNA>AD-TERT-siRNA>ZD55-EGFP、AD-EGFP。

综上所述,ZD55-TERT-siRNA 能在 HeLa 细胞中复制,并明显增强 RNA 干扰抑制 HeLa 细胞 hTERT 表达作用,其抑制 HeLa 细胞增殖及诱导细胞毒作用也显著增强。ZD55-TERT-siRNA 为宫颈癌的治疗提供了一个新途径。

参考文献:

[1] Bernards R, Brummelkamp TR, Beijersbergen RL, et al. shRNA libraries and their use in cancer genetics [J]. Nature methods, 2006,3(6):701-706.

[2] 陈家存,郑骏年,毛立军,等. 表达 Ki67 基因小干扰 RNA 的选

择性增殖溶瘤腺病毒的构建[J]. 中华实验外科杂志,2006,23(7):849-852.

[3] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomere ase activity with immortal cells and cancer[J]. Science ,1994,26(6):2011-2015.

[4] 毛立军,郑骏年,郑宏祥,等. 转录 hTERT 基因 shRNA 的溶瘤腺病毒的构建及抗肿瘤效应[J]. 实用肿瘤杂志,2007,22(1):12-17.

[5] Dobbelt stein M. Replicating adenoviruses in cancer therapy [J]. Curr Top Microbiol Immunol,2004,273(7):291-334.

[6] Morley S, Macdonald G, Kim D, et al. The dl1520 virus is found preferentially in tumor tissue after direct intratumoral injection in oral carcinoma[J]. Clin Cancer Res,2004,10(6):4357-4362.

[7] Zhao LL, Gu JF, Dong AW, et al. Potent antitumor activity of oncolytic adenovirus expressing mda-7/IL-24 for colorectal cancer[J]. Human Gene Ther, 2005,16(9):845-858.

[8] 李欣,沈志伟,薛晓荣,等. 特异性人端粒酶催化亚单位基因小干扰 RNA 对 HeLa 细胞生长的抑制作用[J]. 细胞生物学杂志,2006,6(8):861-866.

[编辑:贺文;校对:黄园玲]