

· 论 著 ·

稳定表达 Makorin 环指蛋白 1 基因对人宫颈癌 Siha 细胞的影响*

罗红权¹, 石艳艳^{1,2△}

(1. 四川省妇幼保健院/四川省妇女儿童医院, 成都 610031;

2. 重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心 400016)

摘要:目的 研究稳定表达 Makorin 环指蛋白 1(MKRN1)基因对人宫颈癌细胞系 Siha 细胞的影响。方法 利用作者构建的稳定表达 MKRN1 基因的 Siha 细胞株,观察 MKRN1 基因对人端粒酶逆转录酶(hTERT)基因 mRNA 转录表达水平、端粒酶活性以及其对细胞周期的影响。结果 转染 Siha 细胞后,稳定表达 MKRN1 基因明显抑制细胞 hTERT 基因 mRNA 水平的表达,明显抑制细胞中端粒酶活性,并且 G₁ 期细胞明显增加,而 S 期细胞明显减少。结论 稳定表达 MKRN1 基因可特异性降低宫颈癌细胞中 hTERT mRNA 水平,抑制癌细胞内端粒酶活性,抑制宫颈癌细胞增殖,并且阻止宫颈癌细胞从 G₁ 期进入 S 期,促进细胞凋亡。

关键词: MKRN1; pEGFP-N1 载体; Siha 细胞; 端粒酶活性; 人端粒酶逆转录酶; 细胞周期

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.15.006

中图分类号: R737.33; R73-362

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)15-1951-03

Effect of stably expressing MKRN 1 Gene on Human Siha Cells*

LUO Hong-quan¹, SHI Yan-yan^{1,2△}

(1. Sichuan Provincial Hospital for Women and Children, Chengdu, Sichuan 610031, China;

2. Molecular Medicine and Tumor Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To stably transfect MKRN1 gene in Siha cell clones for studying the effect of MKRN1 on cells. **Methods** To use the experimental group constructed MKRN1 gene Siha stable expression cell lines, observed the MKRN1 gene transcription of hTERT gene mRNA expression level of telomerase activity and its effects on cell cycle. **Results** Transfected Siha cells, stable expression MKRN1 significantly inhibited the expression of hTERT gene mRNA levels, significantly inhibited telomerase activity, and G₁ phase cells increased significantly, while the S-phase cells decreased significantly. **Conclusion** MKRN1 stable expression can specifically reduce hTERT mRNA level of cervical cancer cells, inhibit telomerase activity in cancer cells, inhibit cancer cell proliferation, and prevent cancer cells from G₁ phase to enter S phase and from S phase to M phase, in particular, the former mainly to promote apoptosis.

Key words: MKRN1; pEGFP-N1 vector; Siha cell; telomerase activity; human telomerase reverse transcriptase; cell cycle

Makorin 环指蛋白 1 (makorin ring finger protein 1, MKRN1) 是 MKRN 基因家族的祖先基因, 该基因家族在哺乳动物细胞中广泛表达^[1]。人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 亦称人端粒酶催化亚基作为其活性的限速决定因子, 是端粒酶的关键成分^[2-3]。端粒酶通常只在胎儿、微生物和癌细胞中保持活跃, 而在大多数体细胞中则被抑制。端粒酶的异常表达与恶性肿瘤发生、发展和预后密切相关^[4]。MKRN1 基因的编码产物是 hTERT 降解过程中的关键酶, 提示 MKRN1 可能是一个新的端粒酶负调控因子^[5]。本研究利用作者构建的稳定真核表达质粒^[6], 用脂质体将其转染 Siha 细胞, 观察稳定表达 MKRN1 基因对 hTERT 基因表达、端粒酶活性、细胞增殖、细胞凋亡及细胞周期的影响, 从而进一步探索宫颈癌基因治疗的新方法。

1 材料与方法

1.1 质粒与细胞 真核表达载体 pEGFP-N1-MKRN1 为作者构建。人宫颈癌细胞系 Siha 细胞由重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室保存。

1.2 主要材料 高保真 Taq DNA 多聚酶、RT-PCR 试剂盒 (TOYOBO 公司)、TRIZOL 试剂 (北京鼎国生物技术有限责任公司)、质粒提取试剂盒 (美国 Omega 生物技术公司)、

DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司)、小牛血清 (杭州四季青公司)、Lipo-fectAmineTM 2000 (Invitrogen 公司)、端粒酶活性检测试剂盒 TRAP-Hyb Kit (华美生物工程公司) 等。

1.3 引物设计 参考 GenBank 中登录的 hTERT 基因序列 (NM_013446), 采用 Premier5.0 软件设计 PCR 引物, 内参采用 β -actin, 见表 1。引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 hTERT 基因 PCR 扩增引物序列

基因	引物序列	扩增长度 (bp)
hTERT	上游 5'-GTCCGAGGTGCCCTGAGTA-3'	184
	下游 5'-AGCTGGAGTAGTCGCTCTGC-3'	
β -actin	上游 5'-ACGAGACCACCTTCAACTCCATC-3'	304
	下游 5'-TAGAAGCATTGCGGTGGACGA-3'	

1.4 制备转染用质粒 用质粒提取试剂盒分别提取重组真核表达质粒 pEGFP-N1-MKRN1 和空载体 pEGFP-N1, 用微量核酸蛋白检测仪定量, 结果为 A260/A280 > 1.8, 用该质粒转染

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30872758, 30800410)。

△ 通讯作者, 电话: 15223418531; E-mail: suibian22056@163.com。

Siha 细胞。

1.5 细胞培养 将质粒转染及获得稳定表达 MKRN1 的 Siha 细胞用含 10% 小牛血清 1640 培养基于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养并传代。转染前 24 h, 取传代 4 次以上且处于对数生长期的 Siha 细胞以 1 × 10⁵ /mL 传于 24 孔板, 使细胞融合至 70% ~ 80%; 转染前用无血清 1640 洗涤细胞。参照脂质体 Lipo-fectAmineTM 2000 转染试剂盒说明书进行转染: (1) 50 μL 无血清 1640 分别稀释 1.0 μg DNA, 室温孵育 5 min; (2) 50 μL 无血清 1640 分别稀释 2 μL Lipo-fectAmineTM 2000, 室温孵育 5 min; (3) 将 (1)、(2) 中的液体混合, 室温孵育 20 min; (4) 将混合液体加入 24 孔板内, 轻轻混匀, 放入细胞培养箱中, 37 °C、5% CO₂ 培养; (5) 转染 6 h 后更换成含 10% 小牛血清 1640 培养基继续培养。转染 48 h 后, 用胰蛋白酶消化细胞, 重新铺在直径为 10 cm 细胞培养皿中, 待细胞贴壁后, 用含 G418 (500 μg/mL) 选择性培养基加压筛选 6 周, 即获得具有抗性的阳性细胞克隆。用荧光显微镜观察细胞内绿色荧光蛋白的表达。挑取有绿色荧光蛋白表达的细胞单克隆, 扩增培养。将筛选出的稳定表达人 MKRN1 的 Siha 细胞及稳定转染 pEGFP-N1 空载体的 Siha 细胞分别命名为 Siha-MKRN1 细胞和空载体转染细胞。

1.6 RT-PCR 法检测转染细胞 hTERT 基因 mRNA 转录水平 收集 Siha-MKRN1 细胞和空载体转染细胞。用 Trizol 试剂按说明书抽提各组细胞总 RNA, 用微量核酸蛋白检测仪进行定量检测。采用 RT-PCR 法检测^[7]。按反转录试剂盒说明书进行反转录: 20 μL 体系中加入总 RNA 2 μg、随机引物 1 μL、5 RT 缓冲液 4 μL、RNase 抑制剂 (20 u/μL) 1 μL、dNTP (10 mmol/L) 2 μL、M-MLV 逆转录酶 1 μL、DEPC 水补足至 20 μL, 混匀; 反应条件: 25 °C、10 min, 40 °C、60 min, 70 °C、10 min 后终止反应。以 β-actin (304 bp) 为内参进行 PCR 反应。10 μL 体系中加入 cDNA 模板 0.5 μL、PCR mixture 5 μL、hTERT 和 β-actin 上、下游引物各 0.5 μL, 灭菌水补足至 10 μL, 混匀。反应条件: 30 °C、10 min, 42 °C、20 min, 99 °C、5 min。以逆转录产物 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 反应体系 20 μL, 反应条件为 95 °C 预变性 2 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 20 s, 共 25 个循环; 72 °C 延伸 5 min。用 2% 琼脂糖凝胶, 取等体积 RT-PCR 产物电泳, 并采用 Bio-Rad 凝胶成像系统照相。Quantity One 软件测定 hTERT 和 β-actin 基因光密度值, 以 hTERT/β-actin 比值进行分析。

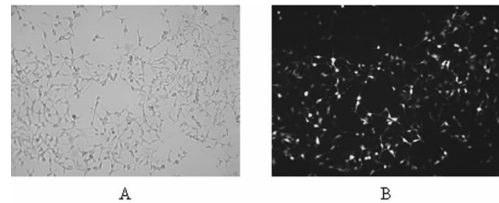
1.7 PCR-TRAP 法检测转染后对细胞端粒酶活性的影响 收集转染 48、72、96 h 的 Siha 细胞各 1 × 10⁶ 个, 4 000 r/min (离心半径 10 cm) 离心 10 min, 沉淀加入裂解液, 取上清液 2 μL 做 TRAP 反应模板。在 PCR 反应管中各加入反应混合物 45 μL, 混匀, 离心数秒, 置 25 °C 水浴 30 min。用 PCR 仪扩增, 各孔加入杂交反应液反应, 洗板, 加显色剂 A、B 各 1 滴, 37 °C 避光显色 10 min, 加终止液, 在酶标仪上 (450 nm/595 nm) 测得吸光度 A 值, 判断端粒酶活性。以空载体转染细胞作为对照组。

1.8 流式细胞仪检测转染后对细胞生长周期的影响 实验按下述步骤进行: (1) 将 Siha 细胞接种于 6 孔板中, 接种密度为 1 × 10⁶ 个/孔, 孵箱中 37 °C、5% CO₂ 培养 24 h。(2) 质粒转染操作方法参照脂质体 Lipo-fectAmineTM 2000 转染试剂盒说明书。分别用空载体 pEGFP-N1、重组载体 pEGFP-N1-MKRN1 转染 Siha 细胞, 同时设立未转染质粒对照组。37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 6 h, 更换完全培养基, 再培养 42 h。(3) PBS 清洗细胞 2 次, 0.25% 胰酶消化, 加入完全培养基终止消化, 用巴氏

管反复吹打制备成单细胞悬液, 移入 EP 管中。(4) 4 °C、1 000 × g 离心 6 min, 弃上清液。(5) 加入 1 mL PBS 重新悬浮细胞, 4 °C、1 000 × g 离心 5 min, 弃上清液。(6) 加入 300 μL PBS 重新悬浮细胞, 一边振荡一边逐滴加入 70% 预冷乙醇 1 mL。(7) 固定后 4 °C 避光过夜, 送流式细胞术实验室检测, 以激发波长 488 nm 测定, 并用 Modfit LT 2.0 软件分析细胞周期分布。

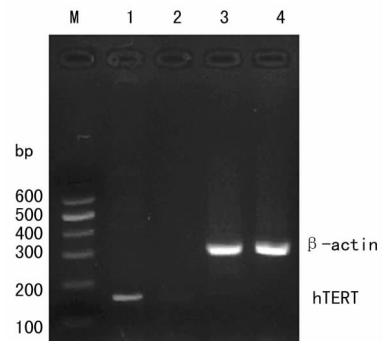
2 结果

2.1 转染细胞 pEGFP-N1-MKRN1 绿色荧光蛋白的表达 转染细胞 48 h 后, 在荧光显微镜下可观察到强绿色荧光蛋白的表达, 见图 1。表明构建的重组 pEGFP-N1-MKRN1 载体已在 Siha 细胞中稳定表达。



A: 普通视野 (×20); B: 荧光视野 (×20)。

图 1 荧光显微镜下 Siha 细胞中绿色荧光蛋白的表达



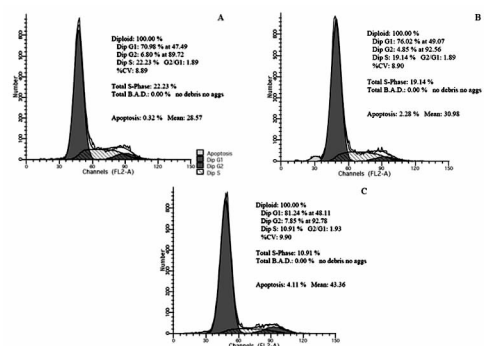
M: Marker; 1, 3: 空载体转染细胞; 2, 4: Siha-MKRN1 细胞。

图 2 RT-PCR 检测 hTERT 基因 mRNA 水平的表达

表 2 端粒酶活性检测结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	吸光度值 (450 nm/595 nm)
对照组	1.43 ± 0.11
转染 48 h 组	1.29 ± 0.09 *
转染 72 h 组	1.20 ± 0.13 *
转染 96 h 组	1.12 ± 0.12 *

*: 与对照组比较, $P < 0.01$ 。



A: 未转染阴性对照; B: 空载体转染细胞; C: Siha-MKRN1 细胞。

图 3 MKRN1 作用 Siha 细胞后流式检测细胞周期结果

2.2 转染细胞 hTERT 基因 mRNA 的转录水平 转染后 48

h, Siha-MKRN1 细胞和空载体转染细胞的 hTERT 基因 mRNA 转录水平比较, 差异明显, 见图 2。Siha-MKRN1 细胞对细胞 hTERT 基因 mRNA 的转录具有明显抑制作用。

2.3 转染后对细胞端粒酶活性的影响 与空载体转染细胞对照组比较, 转染 48、72、96 h 后的 Siha-MKRN1 细胞吸光度值 (450 nm/595 nm) 均明显降低 ($P < 0.01$), 见表 2。

2.4 流式细胞仪检测细胞周期结果 与对照组比较, 稳定表达 MKRN1 后, G_1 期细胞明显增加, 而 S 期细胞明显减少, 见图 3。

3 讨 论

宫颈癌是妇科常见恶性肿瘤之一, 其发病率近年来呈上升趋势。目前宫颈癌常规手术及放、化疗治疗方法对提高患者生存率及改善预后效果不佳, 因此探索宫颈癌的基因治疗方案已成为目前研究的热点^[8]。同时, 进一步深入探索, 对于阐明肿瘤发生、发展的分子机制、开发新的肿瘤分子诊断和治疗方法、降低恶性肿瘤的发病率和死亡率等都具有重要的理论和现实意义。

科学家在 1984 年发现了一种能维持端粒长度的端粒酶, 并发现端粒酶能维持人类生殖细胞和癌细胞端粒的长度。端粒酶是一种核糖核蛋白复合体, 目前研究认为端粒酶复合体由 6 个部分组成^[9], 其核心成分为 hTERT^[10]。hTERT 基因 mRNA 与端粒酶活性表达一致, 导入外源性 hTERT 基因能有效延长细胞的生命周期, 甚至可使其达到永生, 且不改变细胞的正常功能^[11]。下调 hTERT 表达可引起端粒缩短, 破坏染色体稳定性而抑制细胞生长并促进细胞凋亡, 逆转肿瘤细胞恶性表型^[12]。普通人类细胞稳定表达转染的端粒酶能够无限分裂, 证明了端粒的缩短控制着复制衰老^[13-14]。Fujiwara 等^[15]研究发现, 可以利用 hTERT 的启动子来诊断和治疗癌症。

MKRN1 在进化上非常保守, 是一个重要的调节端粒酶活性的基因。端粒酶阳性细胞中 MKRN1 基因的过表达能够加速 hTERT 的降解, 降低端粒酶的活性, 从而降低端粒的长度, 促使癌细胞衰老和死亡, 而对于正常细胞则没有损伤^[16]。本研究结果证实, 稳定表达 MKRN1 的 Siha 细胞, 对 hTERT 基因 mRNA 的转录具有明显的抑制作用。而且, 作者前期 MTT 法功能鉴定实验表明, 转染后的 Siha 细胞的增殖能力相比空载体对照细胞明显降低, 提示稳定表达后可抑制宫颈癌细胞的恶性增殖^[6]。这种抑制作用发生于细胞周期的哪个时相呢? 为此, 本研究利用流式细胞技术对转染后细胞的细胞周期进行分析。结果显示, 与对照组比较, 稳定表达 MKRN1 后, G_1 期细胞明显增加, 而 S 期细胞明显减少, 提示稳定表达 MKRN1 后, 其在宫颈癌细胞从 G_1 期向 S 期进展过程中发挥了重要作用。

本研究结果表明, 宫颈癌 Siha 细胞稳定表达 MKRN1 可从源头控制 hTERT 基因的表达, 抑制端粒酶活性, 抑制宫颈癌细胞的恶性增殖, 并且抑制作用发生在细胞周期的 S 期, 从而为探索宫颈癌基因治疗的新方法提供了依据。

参考文献:

[1] Munoz-Jodran JL, Gorss GA. Telomere shortening and cell cycle arrest in trpnaosome a burcei expressing human telomeric repeat factor[J]. Mol Biochem Parasitol, 2001, 114(1): 169.
[2] Kraemer K, Fuessel S, Schmidt U, et al. Antisense-mediated hTERT inhibition specifically reduces the growth of

human bladder cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9 (10 Pt 1): 3794.

- [3] Cao Y, Li H, Deb S, et al. TERT regulates cell survival independent of telomerase enzymatic activity[J]. Oncogene, 2002, 21(20): 3130.
[4] Oh BK, Lee CH, Park C, et al. Telomerase regulation and progressive telomere shortening of rat hepatic stem-like epithelial cells during in vitro aging[J]. Exp Cell Res, 2004, 298(2): 445.
[5] Kim JH, Park SM, kang MR, et al. Ubiquitin ligase MKRN1 modulates telomere length homeostasis through a proteolysis of hTERT[J]. Genes&Dev, 2005, 19(7): 776.
[6] 石艳艳, 刘涛, 张琴, 等. 真核表达载体 pEGFP-N1-MKRN1 的构建及其在 Siha 细胞中的表达[J]. 第四军医大学学报, 2009, 3(23): 2707.
[7] 林茂芳, 孟小莉. 高三尖杉酯碱诱导白血病细胞凋亡与人端粒酶逆转录酶及端粒酶的关系[J]. 上海医学, 2003, 26(6): 285.
[8] Jiang M, Milner J. Selective silencing of viral gene E6 and E7 expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells using small interfering RNAs[J]. Methods Mol Biol, 2005, 292: 401.
[9] Chang JT, Chen YL, Yang HT, et al. Differential regulation of telomerase activity by six telomerase subunits[J]. Bur J Biochem, 2002, 269(14): 3442.
[10] Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, 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.
[11] Abdallah BM, Haack-Sorensen M, Burns JS, et al. Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite [corrected] extensive proliferation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 326(3): 527.
[12] Akiyama M, Yamada O, Kanda N, et al. Telomerase overexpression in K562 leukemia cells protects against apoptosis by serum deprivation and double-stranded DNA break inducing agents, but not against DNA synthesis inhibitors[J]. Cancer Lett, 2002, 178: 187.
[13] Wang J, Hannon GJ, Beach DH. Risky immortalization by telomerase[J]. Nature, 2000, 405(6788): 755.
[14] Sen A, Kallos MS, Behie LA. Passaging protocols for mammalian neural stem cells in suspension bioreactors [J]. Biotechnol Prog, 2002, 18(2): 337.
[15] Fujiwara T, Urata Y, Tanaka N, et al. Telomerase-specific oncolytic virotherapy for human cancer with the hTERT promoter[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2007, 7(2): 191.
[16] Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer[J]. Eur J Cancer, 1997, 33(5): 787.