

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.11.004

小干扰 RNA 靶向沉默 β -catenin 基因对胃癌 AGS 细胞 人端粒酶逆转录酶的影响 *

李三党¹ 景化忠¹ 韩晓鹏² 苏琳² 刘宏斌^{2Δ}

(1 兰州大学第二临床医学院 甘肃 兰州 730000; 2 兰州军区兰州总医院 甘肃 兰州 730050)

摘要 目的: 研究小干扰 RNA (short interfering RNA, siRNA) 沉默 β -catenin 基因对胃癌 AGS 细胞人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)的影响。**方法:** 用 Lipofectamine 2000 将 siRNA- β -catenin(实验组)及 siRNA-control(阴性对照组)序列转入细胞 AGS 中,同时设置正常 AGS 组(空白对照组),运用细胞计数法检测三组细胞增殖能力的变化,同时使用 western blot 检测三组细胞 β -catenin、hTERT 的表达。**结果:** 转染 72 h 后, siRNA- β -catenin 组细胞增殖能力显著低于 siRNA-control 组和正常 AGS 组($P < 0.05$), siRNA- β -catenin 组细胞 β -catenin、hTERT 表达显著低于 siRNA-control 组和正常 AGS 组($P < 0.05$)。**结论:** AGS 细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路可能参与调控 hTERT 基因转录。

关键词: 胃癌; β -catenin; 人端粒酶逆转录酶

中图分类号: Q75; R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)11-2014-04

Silencing β -catenin Expression by siRNA on Human Telomerase Reverse Transcriptase of Gastric Cancer AGS cells*

LI San-dang¹, JING Hua-zhong¹, HAN Xiao-peng², SU Lin², LIU Hong-bin^{2Δ}

(1 The second hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu, 730000, China;

2 Lanzhou General Hospital, Lanzhou, Gansu, 730050, China)

ABSTRACT Objective: To research the influence of β -catenin silencing by short interfering RNA (siRNA) on human telomerase reverse transcriptase (hTERT) of AGS cells, and explore its mechanism and relationships. **Methods:** siRNA- β -catenin (experimental group) and siRNA-control (negative control group) sequences were transfected into AGS cells by Lipofectamine 2000, and set the normal AGS cells group (blank group) at the same time. The three groups of cells proliferation ability were detected by counting method, while the expression of hTERT and β -catenin were determined by Western blot. **Results:** 72h after transfection, the proliferation ability of siRNA- β -catenin group were significantly lower than the siRNA-control group and normal AGS group ($P < 0.05$), and the expression of β -catenin and hTERT were significantly lower than siRNA-control group and normal group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Wnt/ β -catenin signaling pathway may be involved in the regulation of hTERT gene transcription.

Key words: Gastric cancer; β -catenin; hTERT

Chinese Library Classification (CLC): Q75; R735.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)11-2014-04

前言

胃癌是我国最常见的严重危害人类健康的恶性肿瘤之一,其发生发展是一个长期、渐进的过程,而在此过程中,肠化生和异型增生被多数学者认为是胃癌的癌前病变^[1]。有研究表明在大多数肿瘤中人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)的表达水平与端粒酶的活性一致,而这也被视为肿瘤发生所必须的现象^[2]。有学者报道胃癌与大多数肿瘤类似,组织中端粒酶阳性的表达率接近 80%-90%^[3],端粒酶激活能够维持端粒的长度,从而在人类肿瘤发生发展中起关键作用,但其具体的致癌机制仍不明确。Wnt/ β -catenin 信号通路

也称为经典的 Wnt 通路,作为一条非常保守同时又和肿瘤密切相关的信号通路,它不仅在调控正常细胞的发育、增殖、分化和运动中发挥重要作用;而且还参与肿瘤的发生、发展和侵袭、转移以及浸润^[4]。然而,有关 Wnt/ β -catenin 信号通路是否参与调控 hTERT 基因转录和诱导端粒酶活性的报道目前还不多见。本研究应用 RNA 干扰技术沉默胃癌 AGS 细胞 β -catenin 的表达,靶向阻断 Wnt/ β -catenin 信号通路,观察其对 hTERT 的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与方法

* 基金项目: 国家科技部、财政部科技惠民计划项目(2012GS620101); 甘肃省科技厅科技重大专项资助项目(2010GS04390)

作者简介: 李三党(1987-),男,硕士研究生,主要研究方向: 消化道肿瘤及其微创治疗,电话: 18293192178, E-mail: xiaowo0704@163.com

Δ 通讯作者: 刘宏斌, E-mail: LiuHongbin999@163.com

(收稿日期: 2014-11-18 接受日期: 2014-12-04)

人胃癌细胞系 AGS 由兰州大学第二临床医学院普外科实验室馈赠,胎牛血清、DMEM/F12 培养液购于 Hyclone 公司, Lipofectamine 2000、siRNA- β -catenin、siRNA-Negative control 及 siRNA Reagent System 购于 Santa Cruz 公司,兔抗人 β -catenin 抗体、兔抗人 hTERT 抗体、兔抗人 β -actin 抗体购于 Abcam 公司,羊抗兔二抗购于北京中杉金桥, RNA 反转录试剂盒购于 Promega 公司。

1.2 实验仪器

生物安全柜 (Forma Scientific 公司), CO₂ 细胞培养箱 (Thermo Electron corporation 公司), 紫外/可见分光光度计 (NanoDrop 公司), 凝胶电泳仪 (Amersham Biosciences 公司) 等。

1.3 细胞培养及转染

配制含 10% 胎牛血清浓度的 DMEM/F12 完全培养基,将细胞置于 37℃、5% CO₂ 浓度、饱和湿度的细胞培养箱常规培养。转染前一天将处于对数生长期的胃癌 AGS 细胞接种于 6 孔板内,每孔接种 2×10^5 个细胞,待细胞贴壁程度达 60% 时应用 Lipofectamine 2000 将 siRNA- β -catenin 和 siRNA-Negative control 转染至胃癌 AGS 细胞,同时设置正常 AGS 组(空白对照组)。转染 6 h 以后加入与转染试剂等体积的 2 倍血清浓度的完全培养基继续培养 24-72 小时,转染成功后用于细胞增殖实验、western blot 检测等。

1.4 细胞增殖实验检测

将转染 24 h 后的 siRNA- β -catenin、siRNA-Negative control 和正常 AGS 组(空白对照组)的细胞用 0.25% 的胰蛋白酶消化制备成细胞悬液,以 5×10^3 个细胞接种于 24 孔板内,每孔加入 200 μ L 完全培养基,常规培养。分别于第 1、2、3、4、5、6、7 天同一时间随机选择消化 3 个孔,并计算细胞总数,每孔计数 3 次取平均值,并以细胞数为纵坐标,时间为横坐标绘制细胞生长曲线图。

1.5 RT-PCR 测定目标基因的转录水平

将转染 72 h 后的 AGS 细胞用 TRIzol 试剂盒提取总 RNA。使用分光光度计分别测定 260 nm、280 nm 和 320 nm 处吸光度值并计算 RNA 总量。RNA 转录根据 Promega 公司试剂盒按说明书进行操作。

1.6 western blot 检测转染后细胞相关蛋白的表达

将转染 72 小时后的 siRNA- β -catenin、siRNA-Negative control 和正常 AGS 细胞分别用 PBS 缓冲液冲洗 3 次,每瓶细胞加入 100 μ L RIPA 和 1 μ L PMSF 于冰上裂解 30 min,使用干净细胞刮刀刮净细胞瓶底,收集细胞碎片和裂解液至 1.5 mL EP 管,4℃、12000 $\times$ g 离心 10 min。吸取上清液转移至 1.5 mL EP 管,使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,然后加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液沸水浴 5 min,行蛋白变性处理。根据目标蛋白分子量选择合适浓度的分离胶。浓缩胶先使用 80 V 电压约 30 min,然后转至 120 V 恒压电泳约 60 min 至溴酚蓝刚好跑出分离胶,终止电泳。选择 300 mA 恒定电流模式进行转膜,5%脱脂奶粉室温封闭 PVDF 膜 2 h,分别孵育对应的一抗(1:800),4℃过夜。二抗(1:7000)室温孵育 2 h。使用 ECL 超敏发光液在暗室中曝光,选择目标条带吸光度值与对应 β -actin 吸光度值的比值来判断目标蛋白表达的强弱。

1.7 统计学分析

数据采用 SPSS19.0 软件包进行统计分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两独立样本之间比较采用 t 检验,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 胃癌 AGS 细胞转染后增殖能力的变化

实验组 (siRNA- β -catenin 组) 和对照组 1 (siRNA-control 组)、对照组 2 (Blank 组) 相比,从转染第 3 天开始增殖出现差异,第 4 天明显低于对照组 ($P < 0.05$),其增殖受到明显抑制 (如下图 1)

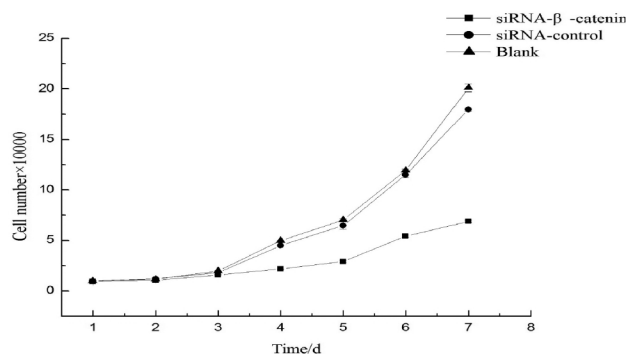


图 1 siRNA 转染前后胃癌 AGS 细胞生长曲线

Fig. 1 Gastric cancer AGS cell growth curve before and after transfection with siRNA- β -catenin

2.2 siRNA- β -catenin 转染胃癌 AGS 细胞后对 β -catenin mRNA 和 hTERT mRNA 的影响

RT-PCR 分析可知,转染 72 h 后 siRNA-Negative control 组 (对照组 2) 与正常细胞组 (对照组 1) 相比为 0.89 vs 0.91 和 0.67 vs 0.69,无明显差异 ($P > 0.05$);而与 siRNA- β -catenin 组 (实验组) 相比,siRNA- β -catenin 组分别降低了 53% 和 52% ($P < 0.05$,图 2)。

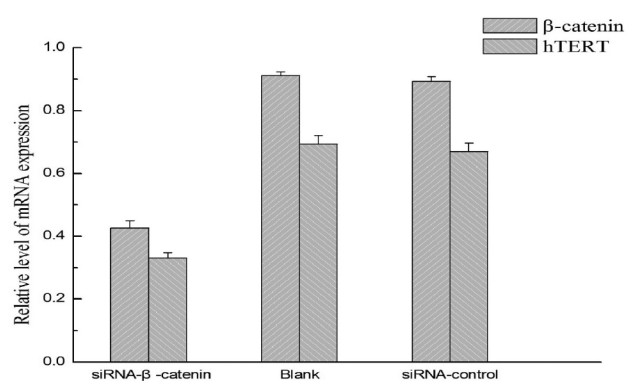


图 2 siRNA 转染前后胃癌 AGS 细胞 mRNA 相对表达情况

Fig. 2 Relative mRNA expression before and after AGS cells transfection with siRNA

2.3 siRNA- β -catenin 转染胃癌 AGS 细胞后对 β -catenin 和 hTERT 蛋白的影响

转染 72 h 后 β -catenin 和 hTERT 的蛋白表达,siRNA-Negative control 组 (对照组 2) 与正常细胞 Blank 组 (对照组 1) 相比分别为 3.19 vs 3.16 和 1.43 vs 1.44,无明显差异 ($P > 0.05$);而

与 siRNA- β -catenin 组(实验组)相比,siRNA- β -catenin 组分别 降低了 35%和 41%($P < 0.05$,图 3)。

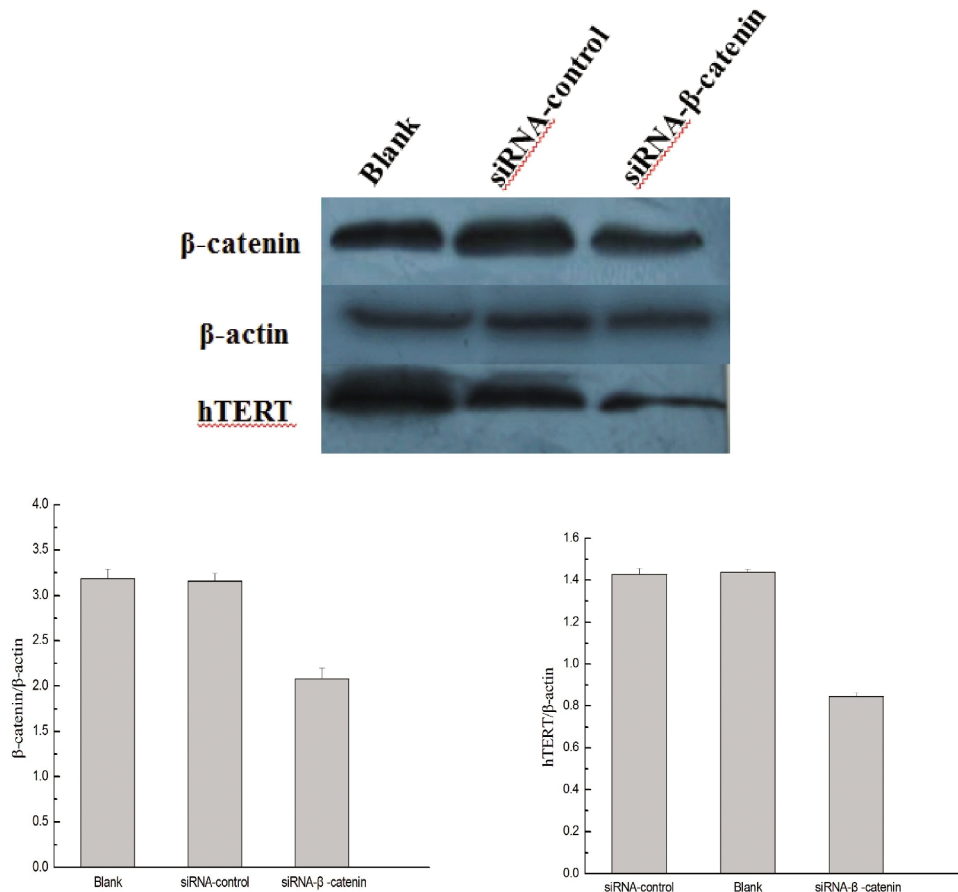


图 3 siRNA 转染前后胃癌 AGS 细胞蛋白相对表达情况

Fig. 3 Relative protein expression before and after AGS cells transfected with siRNA

3 讨论

小分子干扰 RNA (short interfering RNA, siRNA) 双链 3' 端含有 2 个突出的碱基并在 5' 端含有磷酸基的特殊结构使其成为基因沉默效应的关键^[59]。siRNA 在与对应的蛋白结合形成 RNA 诱导沉默复合物后随即解旋成单链状态, 进一步激活 RNA 诱导沉默复合物特异性识别靶序列结合至靶向 mRNA 上, 从而切断并降解靶向 mRNA, 最终阻断或沉默相应基因的表达^[7]。对基因沉默的高效、特异性, 使得 RNA 干扰技术 (RNAi) 被广泛应用于细胞中有关基因功能和基因治疗的研究^[8]。Wnt 信号通路失调与人类大多数的肿瘤有关, 而关键分子 β -catenin 控制着这一通路的稳定性, 它是一种具有正反两种功能的蛋白质^[9]。一方面, 与粘连蛋白 E-Cadherin 相互作用维护上皮细胞表型的稳定^[10]; 另一方面, 当它转入细胞核以后, 可以与 DNA 结合因子家族如 TCF (T 细胞因子)/LEF-1 (淋巴细胞增强因子-1) 相结合^[11]。 β -catenin 基因结合的特点是在他们启动子/增强子区域存在共结合位点 TCFs/LEF-1, 称为 TCF-4 结合子 (TBE)^[12]。通常只有少量的 β -catenin 存在于细胞质内, 而细胞核中不存在。当其由细胞质大量转入细胞核后, 会导致细胞生物学发生变化, 从而使其成为肿瘤的一种标志物^[13]。端粒酶普遍存在于人类肿瘤细胞和肿瘤干细胞中, 而在大多数正常组织及细胞中其几乎不存在。hTERT 催化亚基的表达水平决定

着端粒酶的酶活性, 是人类端粒酶活性速率的限制因素并被认为是端粒酶功能和活动的一个敏感指标^[14]。hTERT 基因的表达与癌细胞具有高度特异性并和端粒酶活性紧密相关; 因此, 它是肿瘤无限增殖的关键蛋白和重要标志之一^[15]。尽管对端粒酶在癌细胞中的调节给与极大关注, 但目前还不清楚癌细胞是如何获取端粒酶重新激活的能力以及某些常见的信号通路是否会影响 hTERT 在肿瘤细胞中的表达。

国外学者 Stefanie Jaitner 等^[16]通过研究证明在人类结肠癌组织 hTERT 基因的转录是通过 β -catenin 直接调控的, 并与 C-Myc 基因无明显关系。这与 Takakura 等^[17]报道的 β -catenin 在人类结肠直肠癌中除了通过已发现的间接效应外还能直接调节 hTERT 基因表达的结果一致。另外 Greider CW 等^[18]研究指出 β -catenin 可以同时控制 Wnt 信号通路自我更新和端粒酶活性, 从而将结肠癌生物学的两个基本特征联系起来。Yong Zhang 等^[19]研究发现通过 β -catenin 基因特异性 shRNA 沉默内源性 β -catenin 表达可以显著的降低细胞 hTERT 的表达, 并可以抑制端粒酶活性、加速端粒长度的缩短; 相反, 使用 Wnt 信号通路的激活剂 LiCl 可以增加并稳定 β -catenin 的蛋白水平, 同时有效提升端粒酶活性以及 hTERT mRNA 的表达水平。有学者发现在一些非肿瘤细胞中也存在类似的现象, Katrin Hoffmeyer 等^[20]研究指出, 在小鼠干细胞中使用小分子干扰 RNA (siRNA) 敲除 β -catenin 会降低 TERT 的表达和端粒酶的

活性。在本实验中,我们使用特异性 siRNA 靶向沉默胃癌 AGS 细胞 β -catenin 的表达,结果细胞增殖受到明显抑制,同时 β -catenin 和 hTERT 在基因和蛋白水平的表达都明显降低,而且显示出 hTERT 随着 β -catenin 的抑制而变化,由此我们推测在胃癌 AGS 细胞中 hTERT 的转录表达受 β -catenin 的调控,并可能是 Wnt/ β -catenin 信号通路的一个目标基因。由于 hTERT 是 C-Myc 众所周知的目标基因^[21],而 hTERT 启动子的核心区含有 2 个 C-Myc 基因结合位点,C-Myc 基因能够通过此结合位点直接诱导调控细胞内 hTERT 基因的转录。因此 Wnt/ β -Catenin 信号通路很可能是通过 C-Myc 基因而间接参与调控细胞端粒酶 hTERT 的活性。另外 hTERT 基因的启动子/增强子中包含 TCF 结合区(TBE)^[22],而在 Wnt 信号通路的中,由于胞质 β -catenin 的稳定积累然后易位至细胞核可以与 DNA 的结合组分 LEF/TCF 蛋白质家族形成 β -catenin·TCF4 复合物从而激活 Wnt 靶基因表达,进而直接参与 hTERT 的调控。由此我们推测,进一步深入研究 β -catenin 及 Wnt/ β -catenin 信号通路参与转录调节 hTERT 及端粒酶的作用可以促进我们对肿瘤发生发展的认识。

参考文献(References)

- [1] 梁增文. 胃癌前病变的研究进展 [J]. 广西医学, 2005, 27(8): 1127-1130
Liang Zeng-wen. The research progress of pathological changes before gastric carcinoma [J]. Journal of Guangxi medicine, 2005, 27(8): 1127-1130
- [2] Fabrucius EM, Kruseboitschenko U, Khoury R, et al. Immunohistochemical determination of the appropriate anti-hTERT antibodies for in situ detection of telomerase activity in frozen sections of head and neck squamous cell carcinomas and tumor margin tissues[J]. Int J Oncol, 2009, 34(5): 57
- [3] 祝荫, 吕农华, 陈江, 等. Hpylori 感染在胃癌前病变中对端粒酶相关基因及细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(14): 1448-1453
Zhu Yin, Lv Nong-hua, Chen Jiang, et al. Hpylori infection in the stomach before the lesion of telomerase genes and the influence of cell proliferation and apoptosis [J]. Journal of world Chinese digest magazine, 2009, 17(14): 1448-1453
- [4] 周威, 熊奇如. Wnt/ β -catenin 信号通路重要分子及其靶基因在原发性肝癌中的作用机制[J]. 肝胆外科杂志, 2013, 21(2): 150-155
Zhou Wei, Xiong Qi-ru. Wnt/ β -catenin signaling pathways important molecules and its mechanism of the role of target genes in primary liver cancer[J]. Journal of liver surg, 2013, 21(2): 150-155
- [5] 凌家俭, 管晓翔, 陈琪, 等. I 型糖尿病防治新方法: 构建 COX-2 SiRNA 表达载体阻断 COX-2 基因表达 [J]. 中国临床康复, 2004, 8(6): 1074-1075
Ling Jia-jian, Guan Xiao-xiang, Chen Qi, et al. New method of I diabetes prevention and control: build cox-2 expression of siRNA carrier blocking cox-2 gene expression[J]. Journal of Chinese clinical rehabilitation, 2004, 8(6): 1074-1075
- [6] 吴畏, 李文滨, 肖治宇, 等. SiRNA 沉默乙型肝炎病毒表达对 HepG2.2.15 细胞生长的影响 [J]. 岭南现代临床外科, 2008, 8(5): 361-364
Wu Wei, Li Wen-bin, Xiao Zhi-yu, et al. The influence of siRNA silence the hepatitis b virus express HepG2.2.15 cells growth [J]. lingnan modern clinical surgery, 2008, 8(5): 361-364
- [7] Lipardi C, Wei Q, Paterson BM. RNAi as random degradative PCR siRNA primers convert mRNA into dsRNA that are degraded to generate new siRNAs[J]. Cell, 2001, 107(3): 297-307
- [8] Downward J. RNA interference[J]. BMJ, 2004, 328(7450): 1245-1248
- [9] Harris TJ, Peifer M. Decisions, decisions: beta-catenin chooses between adhesion and transcription[J]. Trends Cell Biol, 2005, 15(5): 234-237
- [10] Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways[J]. Science, 2004, 303(5663): 1483-1487
- [11] Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, et al. Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin [J]. Cells Tissues Organs, 2005, 179(1): 56-65
- [12] Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, et al. XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos[J]. Cell, 1996, 86(3): 391-399
- [13] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674
- [14] Poole J C, Andrews L G, Tollefsbol T O. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT) [J]. Gene, 2011, 269(1): 1-12
- [15] Hanahan D, Weinberg R A. The hallmarks of cancer [J]. Cell, 2000, 100(1): 57-70
- [16] Stefanie Jaitner, Jana A Reiche, Achim J, et al. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is a target gene of β -catenin in human colorectal tumors[J]. Cell Cycle, 2012, 11(17): 3331-3338
- [17] Takakura M, Kyo S, Kanaya T, et al. Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells [J]. Cancer Res, 1999, 59(3): 551-557
- [18] Greider CW. Molecular biology. Wnt regulates TERT--putting the horse before the cart[J]. Science, 2012, 336(6088): 1519-1520
- [19] Yong Zhang, LingLing Toh, Peishan Lau, et al. Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Is a Novel Target of the Wnt/ β -catenin Pathway in Human Cancer[J]. J.Biol.Chem, 2012, 287(39): 32494-32511
- [20] Katrin Hoffmeyer, Angelo Raggioli, Stefan Rudloff, et al. Wnt/ β -catenin Signaling Regulates Telomerase in Stem Cells and Cancer Cells[J]. Science, 2012, 336(6088): 1549-1554
- [21] He TC, Sparks AB, Rago C, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway[J]. Science, 1998, 281(5382): 1509-1512
- [22] Hatzis P, van der Flier LG, van Driel MA, et al. Genome-wide pattern of TCF7L2/TCF4 chromatin occupancy in colorectal cancer cells[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(8): 2732-2744