

# 逆转录病毒载体介导的端粒酶抑制基因促进肝癌细胞凋亡

马进财, 刘吉勇, 刘绍玲

马进财, 刘吉勇, 山东大学山东省立医院消化科 山东省济南市 250021  
刘绍玲, 山东省医学影像学研究所 山东省济南市 250021  
山东省医药卫生科研项目, No. CAIDBA3  
通讯作者: 刘吉勇, 250021, 山东省济南市经五路324号, 山东省立医院消化科. mjcmjc@126.com  
收稿日期: 2006-01-19 接受日期: 2006-01-24

## Apoptosis of BEL-7402 cell line mediated by retroviral vector containing antisense human telomerase RNA

Jin-Cai Ma, Ji-Yong Liu, Shao-Ling Liu

Jin-Cai Ma, Ji-Yong Liu, Department of Gastroenterology, Shandong Provincial Hospital of Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China  
Shao-Ling Liu, Shandong Provincial Medical Image Research Institute, Jinan 250021, Shandong Province, China  
Correspondence to: Ji-Yong Liu, Department of Gastroenterology, Shandong Provincial Hospital of Shandong University, 324 Jingwu Road, Jinan 250021, Shandong Province, China. mjcmjc@126.com  
Received: 2006-01-19 Accepted: 2006-01-24

### Abstract

**AIM:** To investigate the apoptosis-inducing effect of retroviral vector containing antisense human telomerase RNA (hTR) on hepatocellular carcinoma (HCC) cell line BEL-7402.

**METHODS:** The complete virus was obtained by importing the sense and antisense hTR into the PT67 cell line with electroporation. Bel-7402 cell line was then transfected with the virus. The therapeutic effect was evaluated by cell growth curve. MTT assay and flow cytometry were used to investigate the apoptosis of BEL-7402 cells.

**RESULTS:** After transfection with retroviral vector, the growth of BEL-7402 cells was obviously inhibited. The apoptotic rate was significantly higher in the cells transfected with antisense hTR than that in the cells transfected with sense hTR and normal saline controls ( $61.32\% \pm 2.24\%$  vs  $23.02\% \pm 2.13\%$ ,  $4.11\% \pm 1.00\%$ ,  $P < 0.01$ ), and the apoptotic rate was more significant when the antisense hTR-transfected cells were treated with 5-FU ( $71.71\% \pm 2.53\%$ ).

**CONCLUSION:** hTR can induce significant apoptosis of BEL-7402 cell line, and it plays a synergic role with 5-FU.

**Key Words:** Recombinant retroviral vector; Gene therapy; Hepatocellular cancer; Antisense human telomerase RNA

Ma JC, Liu JY, Liu SL. Apoptosis of BEL-7402 cell line mediated by retroviral vector containing antisense human telomerase RNA. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(10):989-992

### 摘要

**目的:** 探讨逆转录病毒载体介导的反义端粒酶抑制基因对肝癌细胞系BEL-7402的凋亡诱导作用。

**方法:** 用电穿孔的方法把正、反义端粒酶抑制基因导入包装细胞, 包装出完整的病毒, 用此病毒感染肝癌细胞系BEL-7402, 绘制细胞生长曲线来研究其抗肿瘤疗效。应用MTT、流式细胞术研究细胞凋亡情况。

**结果:** 肿瘤细胞感染逆转录病毒后, 肿瘤生长受到明显抑制, 转染反义hTR病毒组BEL-7402细胞凋亡率显著高于转染正义hTR病毒和生理盐水组( $61.32\% \pm 2.24\%$  vs  $23.02\% \pm 2.13\%$ ,  $4.11\% \pm 1.00\%$ ,  $P < 0.01$ ), 转染反义hTR与5-FU联用细胞凋亡率更高, 为 $71.71\% \pm 2.53\%$ 。

**结论:** 反义端粒酶抑制基因能明显抑制肿瘤细胞的体外生长, 与抗肿瘤药物5-FU有协同作用, 联合用药可以增强疗效, 具有明显抗肿瘤作用。

**关键词:** 重组逆转录病毒载体; 基因疗法; 肝细胞癌; 反义hTR

马进财, 刘吉勇, 刘绍玲. 逆转录病毒载体介导的端粒酶抑制基因促进肝癌细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2006;14(10):989-992  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/989.asp>

### 0 引言

原发性肝癌为我国常见的恶性肿瘤之一, 也是

### ■背景资料

目前肝癌的治疗仍以手术切除为首选的治疗方案, 但手术切除的突出问题是在术后的复发率高, 手术切除率低, 加上绝大多数患者在确诊时已属临床中晚期, 失去了手术治疗的机会。肝癌的基因治疗作为一种新的治疗方法, 越来越受到重视。

## ■研究前沿

在正常细胞恶变过程中, 癌基因激活或抑癌基因失活激活了端粒酶, 使染色体端粒稳定地维持在一定长度, 从而使癌细胞得以持续增殖。因此端粒酶不但成为一种新的肿瘤标志物, 而且也成为肿瘤基因治疗的新理想靶点。

我国恶性肿瘤防治研究的重点。肿瘤是细胞“增生性疾病”, 更是细胞死亡异常的疾病。肿瘤细胞凋亡调控对于肿瘤的发生、发展有着极其重要的作用, 为人们认识和防治包括肝癌在内的恶性肿瘤及其他重大疾病指出了新的方向。而端粒及端粒酶的发现更为肝癌的治疗增添了新的途径。反义核酸技术特异性的封闭靶基因序列, 可从分子水平上抑制病毒基因的复制、转录和翻译, 从而达到抗病毒的目的。我们旨在探讨反义端粒酶抑制基因诱导肝癌细胞凋亡, 抑制端粒酶活性, 从而抑制肝癌细胞的生长, 为肝癌基因治疗提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞系 包装细胞系PT67细胞购自上海中科院细胞库, NIH3T3购自山东医学科学院。人肝癌细胞系BEL7402为本实验室常规保存。含有新霉素磷酸转移酶II (NeoR) 重组逆转录病毒载体pLXSN由本实验室常规保存。pLXSN-hTR-EcoRI和pLXSN-hTR-BamHI质粒由刘吉勇教授构建<sup>[1]</sup>。PT67和NIH3T3细胞分别用含200 mL/L, 100 mL/L小牛血清的HG-DMEM培养液增殖, 维持液为含20 mL/L小牛血清的HG-DMEM培养液。超速冷冻离心机, 为Beckman Coulter公司产品。

1.1.2 试剂 HG-DMEM、RPMI-1640、G418购自Gibco公司。小牛血清购自杭州四季青公司。Annexin V、溴化内甾(PI)为美国Sigma公司产品。

### 1.2 方法

1.2.1 包装重组病毒 pLXSN-hTR-EcoRI和pLXSN-hTR-BamHI质粒用电穿孔的方法分别导入包装细胞系PT67细胞中。分别将电转后的PT67细胞接种在24孔板上, 50 mL/L CO<sub>2</sub>, 37℃孵箱中孵育24 h。待细胞长到50%铺满时加入含有G418浓度为300 μg/mL HG-DMEM培养液培养2 wk, 挑选阳性克隆用HG-DMEM培养液培养。

1.2.2 病毒原液提取和滴度测定 待G418抗性PT67细胞长至近满瓶时提取培养液, 用0.45 μm的滤器进行过滤, 滤液在4℃ 20 000 g离心2 h, 离心管置于冰浴条件下, 1 mL/L完全营养液回悬沉淀, 回悬时使用同一吸管以避免损失, 约每15 min吹打一次, 避免产生气泡。用pLXSN-hTR-EcoRI和pLXSN-hTR-BamHI质粒转染得到的病毒上清分别称为正义hTR病毒和反

义hTR病毒。感染前24 h将NIH3T3细胞按 $1 \times 10^5$ /孔接种6孔板, 过夜。感染当天, 移去培养液, 加入低血清的培养液1 mL, 分别加入两种方法浓缩的病毒上清以及浓缩以前的病毒上清各10 μL, 50 μL, 100 μL, 每种浓度各种两孔, 再加入800 mg/L的polybrene储液至终浓度8 mg/L。37℃感染2-3 h, 加入低血清培养液3 mL将polybrene稀释至2 mg/L, 培养48 h。用选择培养液1:4分传NIH3T3细胞, 培养3 d。用含G418最小致死剂量400 mg/L的选择培养液, 共培养7-10 d后。待克隆扩散前进行克隆计数。按RCFU/mL = 克隆数/病毒原液体积来计算病毒滴度。

1.2.3 重组病毒感染BEL7402细胞及基因转导鉴定 感染前24 h将BEL7402细胞按 $1 \times 10^5$ /孔接种6孔板, 过夜。感染当天, 移去培养液, 加入低血清的培养液1 mL, 分别加入浓缩的病毒上清100 μL, 再加入800 mg/L的polybrene储液至终浓度8 mg/L。37℃感染2-3 h, 加入低血清培养液3 mL将polybrene稀释至2 mg/L, 继续培养。选感染3 d的BEL7402细胞常规方法提取DNA, 进行PCR扩增及凝胶电泳, 如果BEL7402感染了重组逆转录病毒, 则在相应的区域出现条带。

1.2.4 细胞生长曲线 BEL7402细胞按 $1 \times 10^5$ /孔接种6孔板, 分别加反义hTR病毒+5-FU、反义hTR病毒、5-FU、正义hTR病毒+5-FU、正义hTR病毒和生理盐水。各组分别命名为A、B、C、D、E、F组, 以下分组方法相同。在第1, 3, 5, 7天分别取各组细胞以4 g/L台盼蓝拒染的方法计数活细胞, 绘出生长曲线, 并按下列公式计算细胞生长抑制率。细胞生长抑制率 = (对照组细胞数 - 处理组细胞数)/对照组细胞数  $\times 100\%$ 。

1.2.5 MTT对细胞增殖凋亡的检测 BEL7402细胞按 $1 \times 10^3$ /孔接种96孔板, 于24, 48, 72 h分别加入反义hTR病毒、5-FU、反义hTR病毒+5-FU、正义hTR病毒+5-FU、正义hTR病毒和生理盐水, 每组5个复孔。于24, 48, 72 h分别加MTT 20 μL, 37℃孵育4 h后终止培养, 吸净上清, 每孔加SDS 200 μL振荡10 min, 使结晶充分溶解。490 nm酶联免疫检测仪测吸光值。

1.2.6 流式细胞仪对细胞凋亡的检测 BEL7402细胞按 $1 \times 10^5$ /孔接种6孔板, 细胞长至50%铺满时分别加反义hTR病毒、5-FU、反义hTR病毒+5-FU、正义hTR病毒+5-FU、正义hTR病毒和生理盐水。72 h进行流式细胞检测。采用Annexin V加溴化内甾(PI)双染分析方法。具体操作步骤

1 2 3 4

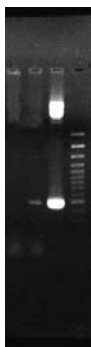


图 1 PCR凝胶电泳图谱. 1: 阴性对照; 2: 逆转录病毒感染的细胞; 3: 阳性对照; 4: 100 b DNA ladder Marker.

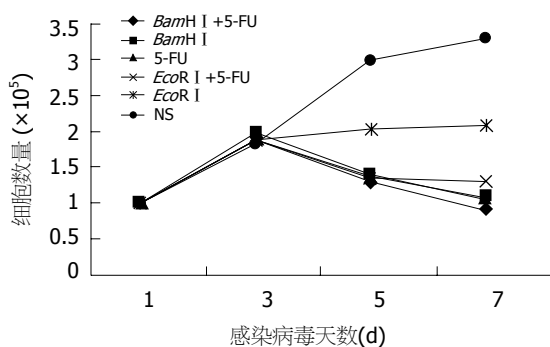


图 2 感染病毒后肝癌细胞BEL7402生长曲线.

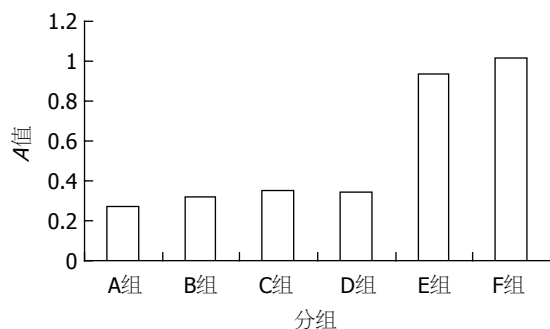


图 3 MTT检测病毒感染后肝癌细胞BEL7402生长抑制情况.

按说明书进行, 染色后Annexin V 阳性加PI阴性者为凋亡细胞. 流式细胞仪检测凋亡率.

## 2 结果

2.1 病毒滴度及基因转导鉴定(图1) 浓缩逆转录病毒滴度为 $0.95 \times 10^6$ . 目的基因片段为490 bp, 加上基因载体上的引物片段50 bp共540 bp. 从图1可以看出阴性对照在540 bp处没有条带, 说明其不含有目的基因. 而逆转录病毒感染的细胞、阳性对照在540 bp处有条带, 说明病毒感染的细胞含有目的基因.

2.2 细胞生长曲线及细胞生长抑制率 从表1细胞生长抑制率可以看出随时间延长, 细胞生长抑制率逐渐增大, A组最明显(表1), 生长曲线见图2.

表 1 细胞生长抑制率

分组	时间		
	3 d	5 d	7 d
A组	-0.022	0.567	0.727
B组	-0.076	0.533	0.679
C组	-0.027	0.54	0.67
D组	-0.021	0.547	0.6
E组	-0.021	0.32	0.36
F组			

表 2 流式细胞检测结果 (mean  $\pm$  SD, %)

分组	凋亡细胞比率
A组	71.71 $\pm$ 2.53
B组	61.32 $\pm$ 2.24
C组	36.82 $\pm$ 2.42
D组	36.46 $\pm$ 1.71
E组	23.02 $\pm$ 2.13
F组	4.11 $\pm$ 1.00

2.3 MTT检测结果 MTT检测病毒感染后肝癌细胞BEL7402生长抑制情况, 发现各组生长中A组生长抑制最明显(图3).

2.4 流式细胞检测结果 除C、D两组之间外, 其余各组之间 $P < 0.01$ , 有显著差异(表2).

## 3 讨论

端粒酶是由小分子RNA和蛋白质组成的一种特殊核糖核蛋白逆转录酶. 人端粒酶包括3个组分: 端粒酶RNA(human telomerase RNA, hTR)、端粒酶相关蛋白(telomerase-associated protein, TEP I)和端粒酶催化亚单位(telomerase catalytic subunit, hTERT). 端粒酶以自身hTR为模板, 逆转录合成端粒, 端粒是染色体末端的保护性结构, 为一段高度重复的碱基序列, 其作用是维持染色体的稳定性和完整性, 防止染色体断裂和重组.

绝大多数正常体细胞端粒酶呈阴性, 端粒在细胞分裂过程中逐渐缩短, 使细胞进入衰老状态, 即第一死亡期(M1期), 细胞停止分裂而死亡, 若细胞被病毒感染或抑癌基因突变, 则可越过M1期继续分裂, 端粒渐缩短直至达到关键阈值, 即第二死亡期(M2期), 绝大多数细胞死亡, 极少数细胞在此阶段激活端粒酶使端粒功能恢复, 细胞永生化和发展成为肿瘤细胞. 端粒酶通过维持端粒长度, 在细胞衰老、永生化和癌变

### 应用要点

反义hTR与5-FU联合用药, 可以提高疗效, 相应减少5-FU的用量, 降低其毒副作用, 对于治疗肝癌有一定价值.

过程中发挥重要作用。他的表达水平与恶性肿瘤的发生、发展和预后密切相关,因此已成为新的肿瘤标志物和治疗靶点。在绝大多数恶性肿瘤细胞中高表达,他通过延长端粒而维持肿瘤细胞的持续增殖能力。因此,端粒酶不但成为一种新的肿瘤标志物,而且也成为肿瘤基因治疗的新理想靶点。

由于反义核酸技术特异性封闭靶基因序列,可以从复制、转录和翻译水平发挥作用,具有高稳定性和特异性。因而在基因调控及治疗中备受重视。研究报道hTR的反义核酸可以抑制端粒酶的活性,从而抑制肿瘤细胞的增殖生长<sup>[2-3]</sup>。已有文献报道反义hTR对乳腺癌、宫颈癌、胃癌和结直肠癌等多种肿瘤细胞有抑制作用<sup>[4-7]</sup>。有研究表明,以hTR为靶目标的反义基因治疗能抑制端粒酶活性并进一步诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[8-9]</sup>。

本研究发现反义hTR抑制肿瘤细胞生长,引起细胞凋亡具有时间依赖性<sup>[7]</sup>。肿瘤细胞在其端粒酶受到抑制后仍需经过一些细胞分裂周期才出现凋亡。推测可能由于端粒酶活性被抑制后需经过一段时间大量消耗的端粒无法补充才导致细胞死亡。这与Feng *et al*<sup>[5]</sup>报道的用反义hTR转染人Hela细胞增殖23-26个周期以后细胞开始死亡结果较接近。反义hTR与5-FU有明显的协同作用,联合用药,可以提高疗效,同时可以相应

减少5-FU的用量,减少其毒副作用。反义hTR治疗肝癌具有潜在的临床应用价值。

#### 4 参考文献

- 1 王丛笑,刘吉勇,赵跃然,焦玉莲,马春燕,杨崇美. 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. 中国肿瘤生物治疗杂志 2005; 12: 51
- 2 Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33: 787-791
- 3 Kushner DM, Paranjape JM, Bandyopadhyay B, Cramer H, Leaman DW, Kennedy AW, Silverman RH, Cowell JK. 2-5A antisense directed against telomerase RNA produces apoptosis in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2000; 76: 183-192
- 4 Bisoffi M, Chakerian AE, Fore ML, Bryant JE, Hernandez JP, Moyzis RK, Griffith JK. Inhibition of human telomerase by a retrovirus expressing telomeric antisense RNA. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1242-1249
- 5 Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J. The RNA component of human telomerase. *Science* 1995; 269: 1236-1241
- 6 张晓伟,童坦君. 端粒酶反义腺病毒载体对乳腺癌细胞MCF-7端粒酶的抑制作用. 中华病理学杂志 2000; 29: 188-191
- 7 王智勇,徐文怀,田凤军,王振军,吕英谦,鞠晓明,朱静. 反义人类端粒酶RNA逆转录病毒载体构建及其对结直肠癌细胞的抑制作用. 中华胃肠外科杂志 2003; 6: 36-39
- 8 谢万灼,林茂芳. 端粒酶RNA的反义寡核苷酸诱导白血病细胞凋亡的研究. 中华血液学杂志 2001; 22: 245-248
- 9 陈拥军,朱正纲,冯润华,李建芳,刘炳亚,尹浩然. 反义人端粒酶RNA组分基因对胃癌细胞端粒酶活性的影响. 消化外科 2002; 1: 185-189

电编 张敏 编辑 王瑾晖

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

•消息•

## 第十八届全国中西医结合防治消化系统疾病学术会议

本刊讯 第十八届全国中西医结合防治消化系统疾病学术会议将于2006-08在哈尔滨举行,现将征文通知如下:

### 1 稿件要求及截稿日期

全文(3000字),结构式摘要(1000字),电脑打印(附软盘)或E-mail, 2006-05-31截稿。

### 2 联系方式

哈尔滨市南岗区学府路45号解放军第211医院中医科 孙旗立; 邮编: 150080; 电话: 0451-57752440; E-mail: 211zyke@163.com.