

靶向 hTERT 的小干扰 RNA 诱导前列腺癌 PC3 细胞凋亡的机制

王 建,何志巍 (广东医学院中美联合肿瘤研究所,广东 东莞 523808)

摘要: [目的] 研究靶向人端粒酶逆转录酶(hTERT)的 siRNA 诱导前列腺癌 PC3 细胞凋亡的分子机制。[方法] 化学合成的靶向 hTERT 的 siRNA 以脂质体法转染 PC3 细胞;应用寡核苷酸芯片技术分析细胞凋亡相关基因的转录谱变化;应用 Western blot 检测细胞中 hTERT、肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 TRAIL、凋亡抑制基因 Bcl-2 和胞浆 Cyt c 的蛋白水平变化;流式细胞术分析细胞凋亡率变化;比色法测定 Caspase-3 和 Caspase-8 的相对活性改变。[结果] 靶向 hTERT 的 siRNA 能有效抑制 hTERT 基因表达;转染 hTERT-siRNA 48h 后可引起 TRAIL 的表达上调,Bcl-2 表达下调,Cyt c 释放增加,Caspase-3 活性增强,细胞凋亡率升高。[结论] 靶向 hTERT 的小干扰 RNA 通过活化线粒体信号传导途径诱导 PC3 细胞凋亡。

关键词: 端粒酶逆转录酶;RNA 干扰;凋亡;前列腺癌

中图分类号: R737.25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2012)03-0211-04

Mechanism of Induction of Apoptosis by siRNA Targeting hTERT in Prostatic Cancer PC3 Cells

WANG Jian, HE Zhi-wei

(Sino-America United Cancer Institute, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China)

Abstract: [Purpose] To study the molecular mechanism of induction of apoptosis by siRNA targeting hTERT in prostatic cancer PC3 Cells. [Methods] PC3 cells were transfected with chemical synthesized siRNA-hTERT by liposome method. The microarray assay was adopted to explore the transcriptional profiling of apoptosis associated genes. The protein levels of hTERT, TRAIL, Bcl-2 and cytosolic Cyt c were detected by Western blot assay. The apoptosis rate was determined by flow cytometry. The relative activity of Caspase-3 and Caspase-8 was measured by colorimetric assay. [Results] The siRNA-hTERT suppressed the expression of hTERT gene significantly. Forty-eight hours after transfection, the expression level of TRAIL was increased, the expression of Bcl-2 was down regulation, the releasing of cytosolic Cyt c enhanced, the activation of Caspase-3 increased, and the apoptosis rate increased. [Conclusion] siRNA-hTERT induces apoptosis of PC3 cells via activating mitochondrial signal transduction pathway.

Key words: hTERT; RNAi; apoptosis; prostatic cancer

人端粒酶逆转录酶(hTERT)是端粒酶的催化亚基,能够以端粒酶 RNA 为模板逆转录合成端粒 DNA。hTERT 表达与端粒酶活性密切相关,限于生殖细胞、干细胞和 90% 以上的恶性肿瘤细胞,而在大多数正常人体细胞中没有表达^[1]。随着研究的深入,发现 hTERT 的功能不仅仅是合成端粒,还具有抵抗细胞凋亡的作用,抑制肿瘤细胞 hTERT 的表达,可引起非端粒依赖的快速凋亡^[2,3]。本研究使用

化学合成的 siRNA 干扰前列腺癌 PC3 细胞 hTERT 基因的表达,通过相关分子生物学技术检测,进一步探讨其诱导凋亡的机制。

1 材料与方法

1.1 材 料

前列腺癌 PC3 细胞购自中科院上海细胞库;新生牛血清购自 Gibco 公司;siRNA-hTERT 序列由上海吉凯基因化学技术有限公司合成,靶序列为

收稿日期:2011-08-26;修回日期:2011-09-30
E-mail:wangjian0419@yahoo.cn

GAGCCAGUCACCUUCA; 兔抗 hTERT、Bcl-2、TRAIL、Cyt c 抗体购自 Santa Cruz 公司; 癌症基因芯片 (IntelliGene Human Cancer CHIP Ver.4) 购自 TaKaRa 公司; Trizol、Cy3-dUTP、Cy5-dUTP 购自 Invitrogen 公司; Caspase-3、Caspase-8 活性检测试剂盒购自 R&D 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染

实验分为 4 组: A 组为空白对照组; B 组为阴性 siRNA 对照组; C 组为转染试剂对照组; S 组为 siRNA-hTERT 组。

转染前一天以 2×10^5 /孔的细胞浓度接种于 6 孔板; 转染时在 400 μ l 的无血清培养基中稀释 5 μ g siRNA, 加入 15 μ g RNAi-Mate 试剂充分混合, 室温放置 30min, 形成 siRNA/RNAi-Mate 复合物; 将 siRNA/RNAi-Mate 复合物加入 6 孔板中, 轻轻混匀; 细胞在 37 $^{\circ}$ C 温育 48h 后进行转染后检测。

1.2.2 芯片杂交与检测

采用一步法提取空白对照组和干扰组细胞总 RNA, 反转录合成 cDNA 探针, 用 Cy3-dUTP 标记空白对照组, 用 Cy5-dUTP 标记干扰组。两种探针混合经乙醇沉淀后加入到 20 μ l 的杂交液中。标记的探针和芯片 95 $^{\circ}$ C 5min 变性处理后, 将变性的探针滴在盖玻片与芯片点样面之间, 60 $^{\circ}$ C 16h 杂交。杂交后芯片依次用 $2 \times$ SSC+0.2% SDS, $0.1 \times$ SSC+0.2% SDS, $0.1 \times$ SSC 溶液清洗, 室温凉干。芯片用 ScanArray 4000 扫描仪进行扫描, 并用 ImaGene3.0 软件分析 Cy3 和 Cy5 两种荧光信号的强度比值。用以下两个条件作为判定基因差异表达的标准: ratio>2.0 或 ratio<0.5; Cy5 和 Cy3 其中之一荧光强度必须>200。

1.2.3 Western blot 检测

转染 48h 后, 裂解细胞提取蛋白, 其中 Cyt c 的蛋白提取限定在不含线粒体的胞浆部分: 收集细胞于预冷的匀浆缓冲液 (250mmol/L Sucrose, 20mmol/L Hepes/KOH, pH 7.5, 10mmol/L KCl, 1.5mmol/L MgCl₂, 1mmol/L EDTA, 1mmol/L DTT, 0.1mmol/L PMSF) 重悬, 移入玻璃匀浆器冰浴匀浆 5min, 匀浆液于 4 $^{\circ}$ C、1 000r/min 离心 10min, 共 2 次, 取上清于 4 $^{\circ}$ C、12 000r/min 离心 15min, 收集上清即为不含细胞核和线粒体的胞浆成分^[4]。用酚试剂法进行定量后, 将含有等量蛋白的细胞裂解液用样品缓冲液溶解, 置于 SDS-PAGE 电泳分离, 用半干转方法转移至硝酸纤维素膜, 室温下封闭 1h; 分别加入特异的抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 加碱性磷酸酶标记的二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 用碱性磷

酸酶显色液显色后扫描成像。

1.2.4 流式细胞术分析

转染 48h 后收集各组细胞, PBS 清洗 2 遍后再用其重悬, 进行 Annexin V-FITC 和 PI 的双重体外活体染色, 使用 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒依照其说明书进行操作, 染色后在 LAB-FACS 流式细胞仪上进行流式细胞计数, 用 CellQuest 软件进行数据分析。

1.2.5 Caspase-8、Caspase-3 活性分析

使用比色法检测 Caspase-8、Caspase-3 的活性。 2×10^6 个细胞经 PBS 清洗后加入 Lysis Buffer 溶解细胞团块, 溶解物在冰上孵育 10min, 4 $^{\circ}$ C 离心提取总蛋白并进行定量。在 96 孔板中进行以下操作: 每孔加入 100 μ l 细胞溶解物、50 μ l reaction buffer, 然后加入 5 μ l 比色底物 (DEVD-pNA), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h 后用酶标仪测定 405nm 波长下的吸光度 (A_{405}), 各组与空白对照组相比, 计算活性比, 以此来表示 Caspase-8、Caspase-3 酶活性。

1.3 统计学处理

统计学分析使用 SPSS11.0 软件进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hTERT-siRNA 抑制 hTERT 基因表达

Western blot 结果显示 (图 1), 3 个对照组目的条带的灰度没有显著差异, 而干扰组的电泳条带灰度较 3 个对照组有明显减弱, 计算干扰抑制率为 75.9%。可见, 这个 siRNA 干扰序列可有效地抑制 hTERT 蛋白表达。

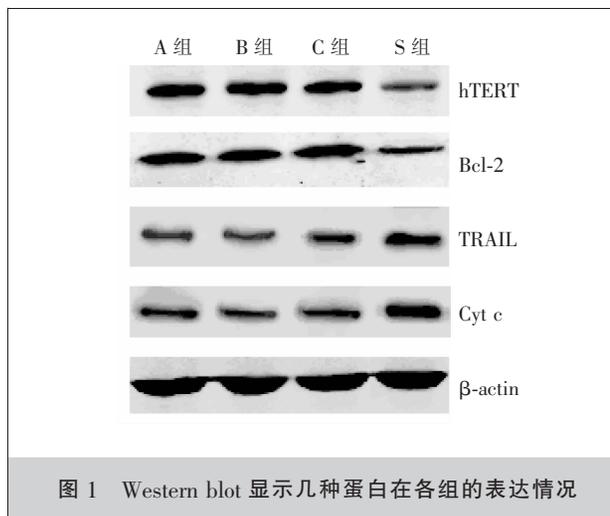


图 1 Western blot 显示几种蛋白在各组的表达情况

表1 干扰组与对照组的凋亡相关差异表达基因的芯片分析结果

基因登录号	基因名	干扰组与对照组荧光强度比值(Cy5/Cy3)
NM_000633	Bcl-2	0.33
NM_003810	TRAIL	3.24

注:荧光强度比值<0.5为表达下调,>2为表达上调。

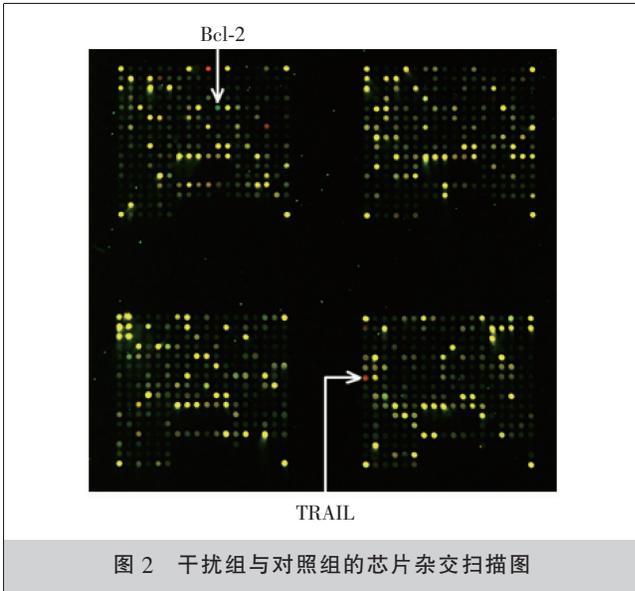


图2 干扰组与对照组的芯片杂交扫描图

表2 各组的细胞凋亡率及 Caspase-3 和 Caspase-8 的活性变化

组别	例数	细胞凋亡率 (%)	caspase-3 活性比 (%)	caspase-8 活性比 (%)
A	5	6.34±0.69		
B	5	7.47±0.92	107.58±2.61	105.18±2.59
C	5	7.88±0.83	105.78±2.92	104.99±3.36
S	5	26.44±3.81*	139.12±3.55*	107.21±2.68#

注:*,与对照组比较 $P<0.01$;#,与对照组比较 $P>0.05$ 。

2.2 hTERT 基因 RNA 干扰对凋亡相关基因表达的影响

图2为芯片杂交后的扫描结果,杂交点由红色向绿色表示信号由强至弱,红色表示表达上调,绿色表示表达下调,黄色表示表达无改变。将空白对照组和转染组的信号强度(即 Cy3 和 Cy5 两种荧光信号强度)分别进行分析,并将两组信号强度进行对比,以差异为2倍以上为标准确定差异表达基因。分析结果显示,在差异表达的基因中有两个与细胞凋亡相关(表1),其中 Bcl-2 表达下调(ratio 值<0.5),TRAIL 表达上调(ratio 值>2.0)。而后又在蛋白水平上经 Western blot 进行了验证,结果与芯片分析相一致(图1)。

2.3 hTERT 基因的 RNA 干扰诱导 PC3 细胞凋亡

用流式细胞术进行细胞凋亡率分析可见,各对照组之间的细胞凋亡率差异无统计学意义,而干扰组与对照组比较,凋亡率均

显著性增高 ($P<0.01$),说明 siRNA 特异性抑制 hTERT 表达能有效地诱导 PC3 细胞凋亡。见表2。

2.4 hTERT 基因的 RNA 干扰激活凋亡的线粒体途径

转染 48h 后,各组 Caspase-8 活性比无显著性差异,而干扰组 Caspase-3 活性比与对照组比较差异有显著性,表现为活性比增高(表2)。Western blot 显示,干扰组的胞浆 Cyt c 蛋白含量较对照组也有显著的增高(图3)。说明 hTERT 基因表达被抑制后可引起 Cyt c 的释放增加和 Caspase-3 的活性增高,而对 Caspase-8 的活性无明显影响。

3 讨论

肿瘤细胞以高端粒酶活性来维持端粒长度,如果抑制了端粒酶活性,肿瘤细胞的端粒则不会继续延长,当细胞继续分裂至端粒无法保护染色体末端时,细胞则会因为染色体的失稳、融合而最终走向死亡。然而进一步的研究显示,端粒酶逆转录酶 hTERT 活性被抑制后,肿瘤细胞在端粒出现复制性缩短前生长迅速被抑制并发生快速凋亡。Saretzki 等^[9]利用核酶来抑制卵巢癌细胞系的 hTERT 表达,转染核酶后三天端粒酶活性被抑制,细胞大量死亡,而端粒没有发生缩短。当利用该核酶对正常细胞进行处理时,

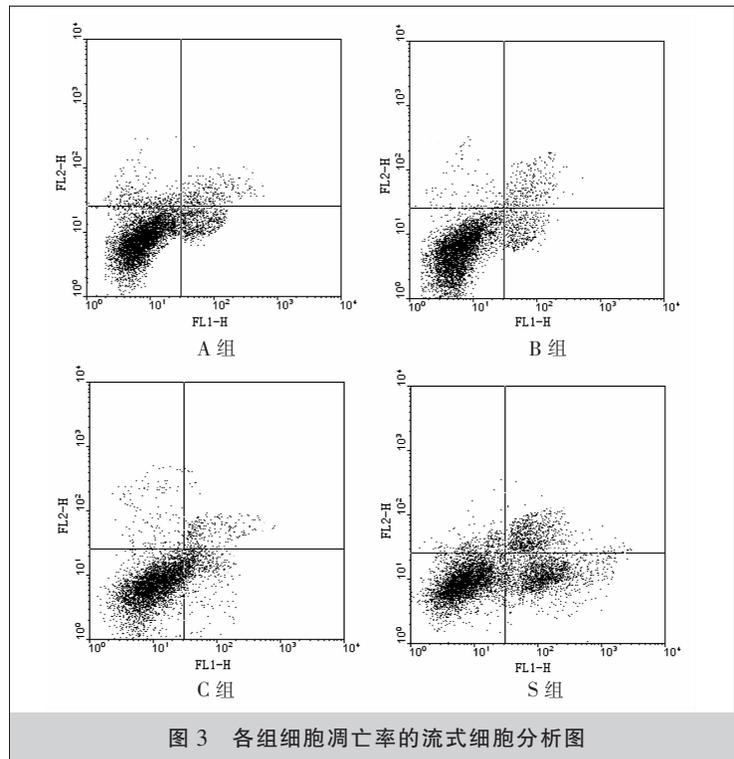


图3 各组细胞凋亡率的流式细胞分析图

正常细胞的生长则没有受到影响。而后在肠癌细胞系 SW480、胃癌细胞系和人前列腺癌细胞系中,在 hTERT 被抑制后都观察到了类似的现象^[6,7]。说明端粒酶除了合成端粒还有其他功能,hTERT 的抑制可通过某种非端粒依赖途径引起细胞凋亡。

本研究使用化学合成的 siRNA 转染前列腺癌 PC3 细胞干扰其 hTERT 的表达,通过对干扰前后的差异表达基因的芯片分析,筛选出 2 个差异表达的与凋亡密切相关的基因,其中表达上调的是 TRAIL,表达下调的是 Bcl-2,而后又在蛋白水平上对其进行了验证。TRAIL 属于 TNF 超家族,具有典型跨膜蛋白结构,与其受体结合能诱导肿瘤细胞凋亡而对正常细胞无影响^[8]。Smith 等^[9]通过载体在乳腺上皮细胞 HMECs 异位表达 hTERT,引起了 TRAIL 的表达下调,说明 hTERT 对 TRAIL 起负调控作用。Bcl-2 能保护线粒体外膜的完整性,防止线粒体释放一系列促凋亡因子。Bcl-2 的过表达能通过失活 Caspase-3 抑制各种因素引起的凋亡^[10]。

为了进一步明确 hTERT 基因沉默诱导 PC3 细胞凋亡的机制,本研究对凋亡的死亡受体途径和线粒体途径分别进行了探讨,结果显示,hTERT 表达被抑制后,胞浆 Cyt c 的含量增高,Caspase-3 的活性增强,而 Caspase-8 的活性无显著性变化。由此可见,siRNA 抑制 hTERT 诱导 PC3 细胞凋亡是通过线粒体途径来实现的,即 hTERT 表达的抑制导致 Bcl-2 的水平下调,进而引起线粒体膜通透性增强,使 Cyt c 等促凋亡因子释放增加,启动 Caspase 级联反应,激活下游的 Caspase-3,引起细胞凋亡^[11,12]。凋亡的死亡受体途径的关键酶 Caspase-8 的活性并没有因为 TRAIL 的表达上调而改变,可能由于 TRAIL 凋亡通路需要 FADD 分子的参与,单纯的 TRAIL 水平升高不足以活化 Caspase-8,或者可能因为细胞中诱骗受体的存在^[13,14]。

可见,化学合成的 siRNA 能有效抑制 hTERT 的表达,进而通过下调 Bcl-2 激活线粒体途径来诱导前列腺癌 PC3 细胞凋亡。

参考文献:

- [1] Kraemer K,Schmidt U,Fuessel S,et al. Microarray analyses in bladder cancer cells: inhibition of hTERT expression down-regulates EGFR [J]. *Int J Cancer*,2006,119 (6): 1276-1284.
- [2] Rahman R, Latonen, Wiman KG. hTERT antagonizes p53-

induced apoptosis independently of telomerase activity[J]. *Oncogene*,2005,24(8):1320-1327.

- [3] Folini M, Brambilla C, Villa R, et al. Antisense oligonucleotide-mediated inhibition of hTERT, but not hTERC, induces rapid cell growth decline and apoptosis in the absence of telomere shortening in human prostate cancer cells[J]. *Eur J Cancer*,2005,41(4):624-634.
- [4] 刘晓萍,文小玲,邹少娜,等. EGCG 活化线粒体途径诱导人胃癌细胞凋亡[J]. *南华大学学报*,2007,35(4):499-502.
- [5] Saretzki G, Ludwig A, von Zglinicki T, et al. Ribozyme-mediated telomerase inhibition induces immediate cell loss but not telomere shortening in ovarian cancer cells[J]. *Cancer Gene Ther*,2001,8(10): 827-834.
- [6] Folini M, Pennati M, Zaffaroni N. Targeting human telomerase by antisense oligonucleotides and ribozymes[J]. *Curr Med Chem Anticancer Agents*,2002,2(5): 605-612.
- [7] Hao ZM, Luo JY, Cheng J, et al. Intensive Inhibition of hTERT expression by a ribozyme induces rapid apoptosis of cancer cells through a telomere length- independent pathway[J]. *Cancer Biol Ther*,2005,4(10):1098-1103.
- [8] Szliszka E, Helewski KJ, Mizgala E, et al. The dietary flavonol fisetin enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in prostate cancer cells [J]. *Int J Oncol*,2011,39 (4):771-779.
- [9] Smith LL, Collier HA, Roberts JM. Telomerase modulates expression of growthcontrolling genes and enhances cell proliferation[J]. *Nat Cell Biol*,2003,5(5):474-479.
- [10] Jin CY, Moon DO, Choi YH, et al. Bcl-2 and caspase-3 are major regulators in *Agaricus blazei*-induced human leukemic U937 cell apoptosis through dephosphorylation of Akt[J]. *Biol Pharm Bull*,2007,30(8):1432-1437.
- [11] Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in apoptosis: bcl-2 family members and mitochondrial dynamics[J]. *Dev Cell*,2011,21(1):92-101.
- [12] Siskind LJ, Mullen TD, Romero Rosales K, et al. The BCL-2 protein BAK is required for long-chain ceramide generation during apoptosis [J]. *J Biol Chem*,2010,285 (16): 11818-11826.
- [13] Li P, Jayarama S, Ganesh L, et al. Akt-phosphorylated mitogen-activated kinase- activating death domain protein (MADD) inhibits TRAIL-induced apoptosis by blocking Fas-associated death domain (FADD) association with death receptor 4 [J]. *J Biol Chem*,2010,285 (29):22713-22722.
- [14] Hayashi S, Nishiyama T, Miura Y, et al. DcR3 induces cell proliferation through MAPK signaling in chondrocytes of osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*,2011,19 (7):903-910.