

荧光定量 PCR 法检测肿瘤细胞端粒酶活性的变化^{*}蒋玉艳¹ 何 敏² 杨 莉² 李开鹏³

(1 广西壮族自治区疾病预防控制中心 南宁 530021 2 广西医科大学公共卫生学院 南宁 530021

3 广西南宁市农业局 南宁 530028)

摘要 目的: 利用荧光定量 PCR 法检测端粒酶抑制剂作用于人肝癌细胞 SMMC-7721 后端粒酶活性的变化, 探讨其抑制端粒酶活性的可能机制, 为端粒酶抑制剂的临床应用提供理论依据。方法: 利用荧光染料 SYBR-Green I 建立一种新的端粒酶活性检测方法: FQ-TRAP 法。利用 FQ-TRAP 法检测端粒酶抑制剂作用后肿瘤细胞端粒酶活性变化。结果: 端粒酶抑制剂作用后, 肝癌细胞端粒酶活性都有变化, 其中以 ASODN, EGCG, AZT 抑制效果较明显。结论: 端粒酶 FQ-TRAP 法是一种特异性、灵敏度、重复性都较好, 可快速、简便及定量检测人端粒酶活性的方法, 端粒酶抑制剂作用后癌细胞端粒酶活性的变化, 为端粒酶抑制剂的临床应用提供理论依据。

关键词: 定量 PCR; 肝癌细胞; 端粒酶抑制剂; 端粒酶活性

中图分类号: R446.6 文献标识码: A

Using fluorescence quantitative PCR to detect telomerase activity
in human hepatocellular carcinoma cellsJIANG Yu-yan¹, HE Min², YANG Li², LI Kai-peng³

1 Center for Disease Control and Prevention of Guangxi Zhuangzu Autonomous Region, Nanning 530021

2 Guangxi Medical University, Nanning 530021

3 Agricultural Bureau of Nanning City, Nanning 530028, Guangxi, China

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanisms of telomerase inhibitors in the inhibition of telomerase activity and offer theoretical foundation for its clinical application. **Methods:** Through combining real-time quantitative PCR with TRAP assay and SYBR-Green I, a novel method (FQ-TRAP assay) quantitative detecting telomerase activity was established in the present study. The telomerase activity of carcinoma cells influenced by telomerase inhibitors was detected by FQ-TRAP assay. **Results:** The telomerase activity of 100 cells in cell extract was detected by a novel real-time quantitative telomerase detection method (FQ-TRAP). The FQ-TRAP is a sensitive, special and repetitive method of telomerase activity assay. Telomerase activity of carcinoma cells influenced by various telomerase inhibitors was detected by FQ-TRAP assay. The down-regulation of telomerase activity of cells treated with various telomerase inhibitors was observed in every group, obviously in ASODN, EGCG, AZT groups in SMMC-7721 cells. **Conclusion:** FQ-TRAP is a rapid, sensitive, specific and reliable method to quantify telomerase activity.

Key word: The real-time quantitative PCR; Hepatocellular cancer cell; Telomerase inhibitors; Telomerase activity

端粒酶是由小分子 RNA 和蛋白质组成的一种具有逆转录酶活性的核糖核蛋白酶, 以自身 RNA 为模板逆转录合成端粒 DNA, 以补偿细胞分裂时染色体末端的缩短^[1, 2]。近年来的研究发现, 85-95% 的人肿瘤细胞中可以检测到端粒酶活性^[3], 端粒酶的活性与癌症的发生发展密切相关^[4-5]。所以, 灵敏而简便的端粒酶活性检测方法不但是深入研究端粒酶的手段, 而且具有潜在的临床应用价值。目前端粒酶活性检测方法的基本原理, 是根据端粒酶对端粒精确、特殊的合成机制, 通过测定细胞提取物(含端粒酶)将端粒重复序列添加到一个合成的寡核苷酸引物 3' 末端的能力来进行判断的, 而由于存在动力学范围有限和终点检测 PCR 产物使精确测定端粒酶活性很困难等缺点。因此本研究利用荧光染料 SYBR-Green I

建立一种新的端粒酶活性定量检测方法: FQ-TRAP 法, 期望通过荧光定量 PCR 法检测端粒酶抑制剂作用后端粒酶活性的变化情况, 为端粒酶抑制剂的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞株: SMMC-7721 由广西医科大学肿瘤医院提供; RPMI-1640 培养基为 GIBCO 产品; 1:250 胰蛋白酶为 GIBCO 产品; 新生牛血清: 杭州四季青生物材料研究所; SYBR Green I: 上海开放科技有限公司; 端粒酶活性检测试剂盒: TRAP-ELISA, 从 Roche 公司购买; 针对端粒酶 RNA 的反义寡核苷酸(ASODN)序列: 5'-CTCAGTTAGGGTTAGACAA-3', 正义

* 基金项目: 广西科技厅资助项目(基金编号: 桂科青 0135008)

作者简介: 蒋玉艳, (1977-), 硕士, 0771-5313649, (0)13471025829, E-mail: jennylinn@163.com

(收稿日期: 2006-04-12 接受日期: 2006-06-06)

寡核苷酸(NODN): 5' - CATGACAGTTGCCCAATGC - 3'; 针对端粒酶催化亚基(*hTERT*)的反义寡核苷酸(HASODN)序列: 5' - GGAGCGCGCGGCATCGCGGG - 3'; 正义寡核苷酸(HNODN): 5' - CCCGCGATGCCGCGCGCTCC - 3'; 经 GenBank BLAST 分析, 证实与已知人类基因无同源性; 以上寡核苷酸为全硫代修饰, 由上海生工公司合成; 盐酸阿霉素: ADM, 为 Phamacia & Upjohn, Inc. 的产品; 没食子酰表没食子儿茶素(Epigallocatechin gallate, EGCG), 逆转录酶抑制剂(3' - azi - do - 3' - deoxythymidine, AZT), 全反式维甲酸(*all trans-retinoic acid*, ATRA)为 Sigma 产品; 实时荧光定量 PCR 仪: icycler iQ, 美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人肝癌细胞株 SMMC-7721 生长在含 10% 新生牛血清、100 U/ml 的青霉素及链霉素的 RPMI-1640 完全培养液中, 置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养, 定期观察, 每 3~4 天换液、传代一次, 传代采用 0.25% 的胰蛋白酶消化法进行; 选用对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 荧光定量 PCR 法检测端粒酶活性(FQ-TRAP 法)

端粒酶提取液的准备: 收集经不同端粒酶抑制剂作用 48 小时后的细胞, 消化制成单细胞悬液(1×10^5 个/ml), 根据端粒酶 TRAP-ELISA 试剂盒, 用 PBS 洗 2 次, 置 2~8℃, 3000g, 离心 10min, 弃去上清液, 加入 200 μ L 裂解液(溶液 1), 冰上裂解 30min, 2~8℃, 16000g, 离心 20min, 小心吸取上清液至一经过 DEPC 水处理的 EP 管中, 分装, 10 μ L/管, -80℃ 保存备用, 作为以下 PCR 反应的模板。

实时荧光定量 PCR: 25 μ L 反应体系, 主要包括反应混合物(溶液 2) 12.5 μ L, 模板 1 μ L, 20 $\times$ SYBR Green I 1.25 μ L。PCR 反应: 25℃ 30min, 94℃ 5min; 然后 94℃ 30s, 50℃ 30s, 72℃ 90s, 40 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min。结果判定: 以 4 次实验平均 CT 值表示端粒酶活性。CT 值大者, 模板数小, 表示酶活性低, CT 值小者, 模板数大, 表示酶活性高。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{X} \pm s$ 表示, 用 SPSS 10.0 For windows 软件进行数据的统计分析。

2 结果

2.1 端粒酶 FQ-TRAP 法特异性检测结果

人肝癌细胞株 SMMC-7721 的细胞提取液, 以及 4 种阴性对照样本同时进行定量 PCR 反应, 以检测 FQ-TRAP 法的特异性。4 种阴性对照按照如下方法设立: ①以裂解液替代细胞提取液, 用以监测是否有 PCR 污染; ②细胞提取液热灭活: 85℃, 10min, 用以灭活端粒酶的蛋白质, 作检测样本的自身对照; ③ RNase A 处理细胞提取液: 用以灭活端粒酶的 RNA 模板, 作检测样本的自身对照; ④空白对照: 不含模板, 用以监测是否有 PCR 污染。实验组及对照组均设 3 个平行管。结果发现, SMMC-7721 细胞提取液平均 CT 值为 19.45 最小, 表示酶活性最高, 而 4 种阴性对照均没有检测到 CT 值(以 N/A 表示), 说明阴性对照组没有检测到端粒酶活性。结果如图 1 所示。

PCRAmp/ Cycle Graph for FAM-490

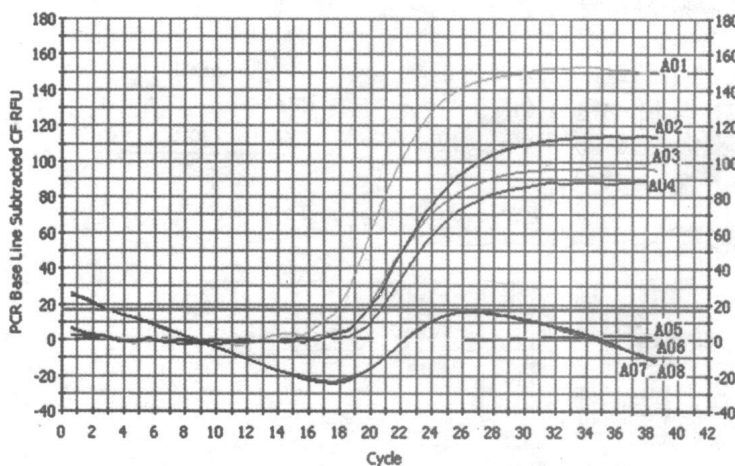


图 1 端粒酶 FQ-TRAP 法特异性检测结果

* 注: 其中: A01~A04 表示阳性细胞株(SMMC-7721), A05 表示空白对照, A06 表示不含抽提液的裂解液, A07 表示热灭活, A08 表示 RNase A 处理。其 CT 值分别为: A01(17.8), A02(20.6), A03(19.7), A04(19.7), A05(N/A), A06(N/A), A07(N/A), A08(N/A)。

Fig. 1 Peculiar measuring result

* Note: A01~A04: positive cells (SMMC-7721), A05: the blank, A06: the cracked liquid not including extraction liquid, A07: hot deactivation, A08: dealt with RNase A. Its CT value including: A01(17.8), A02(20.6), A03(19.7), A04(19.7), A05(N/A), A06(N/A), A07(N/A), A08(N/A).

2.2 端粒酶 FQ-TRAP 法灵敏度试验

人肝癌细胞株 SMMC-7721 的抽提液(1×10^6 个/ml), 用裂解液按稀释倍数依次为 1、10、100、1000、10000、100000 稀释

后进行 FQ-TRAP 实验, 随着模板浓度的稀释, CT 值也随着增大, 最大模板稀释度可达 10000 即 FQ-TRAP 法可检测 1×10^2 细胞数的端粒酶活性。结果见图 2。

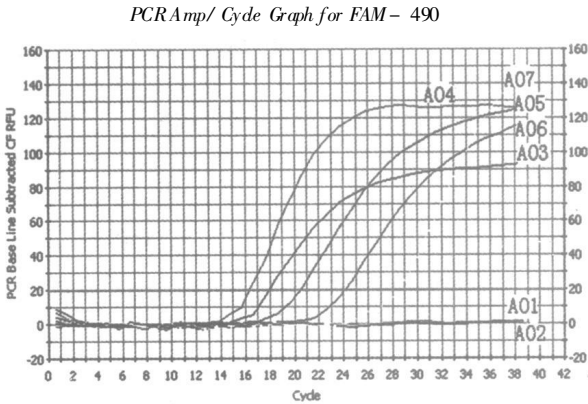


图 2 灵敏度试验结果

* 其中: A01 表示空白对照, A02 表示阴性对照(裂解液), A03、A04、A05、A06、A07、A08 表示模板, 稀释倍数依次为 1、10、100、1000、10000、100000。其 CT 值分别为: A01(N/A), A02(N/A), A03(17.9), A04(16.3), A05(20.4), A06(24.1), A07(28.4), A08(N/A)。

Fig. 2 The result of the sensitivity

* Note: A01: the blank, A02: negative (cracked liquid), A03, A04, A05, A06, A07, A08: the template, it is successively 1, 10, 100, 1000, 10000, 100000 to dilute the multiple. Its CT value including: A01(N/A), A02(N/A), A03(17.9), A04(16.3), A05(20.4), A06(24.1), A07(28.4), A08(N/A)

2.3 重复性试验

人肝癌细胞株 SMMC-7721 的抽提液于同一次实验中平行测定 5 次结果, 其 CT 值为 16.7±0.3674, 计算批内变异系数 CV 值; 同一样本在不同时间的实验中分别测定 5 次结果, 其 CT 值为 17.16±0.8678, 计算批间 CV 值。结果见表 1。

表 1 重复性试验结果

Table 1 The result of repeated experimention

实验次数		CT 值		CV 值
		$\bar{X}$	SD	
批内	5	16.7	0.3674	2.2
批间	5	17.16	0.8678	5.06

2.4 FQ-TRAP 法检测端粒酶抑制剂作用后 SMMC-7721 细胞端粒酶活性变化

结果见表 2, 各实验组 CT 值与对照组比较, 发现各组端粒酶抑制剂(浓度如下表所示)作用于肝癌细胞(1×10^5 个/mL) 48 小时后, 端粒酶活性均有变化, 且具有统计学意义, $P <$

0.05。其中以 ASODN、EGCG、AZT 等变化最大, 说明这三种端粒酶抑制剂对肝癌 SMMC-7721 细胞的端粒酶活性有明显的抑制作用, 结果见图 3、4。

表 2 端粒酶抑制剂作用后肝癌 SMMC-7721 细胞端粒酶活性的变化
Table 2 The variety of telomerase activity on human hepatocellular carcinoma cdl's (SMMC-7721 cdl) treated by telomerase inhibitor

端粒酶抑制剂	作用浓度		作者时间 (h)	CT 值 ($\bar{X} \pm S$)	P 值
	$\mu\text{mol/L}$	mg/L			
CONTROL	0	0	48	18.2±0.7	
ASODN	6		48	35.2±2.3	0.0003
NODN	6		48	26.1±3.5	0.0186
HSODN	5		48	25.7±1.0	0.0004
HNODN	5		48	25.4±1.4	0.0013
EGCG		125	48	28.8±2.1	0.0012
AZT	20000		48	28.0±0.7	0.0001
ADM		1.25	48	22.7±0.2	0.0004
ATRA	10		48	27.1±2.4	0.0035

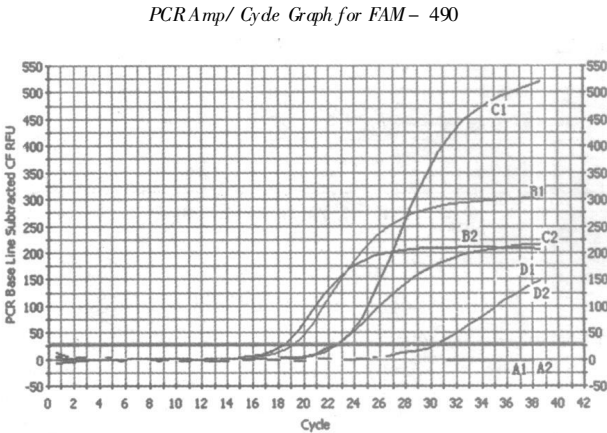


图 3 ADM、AZT 处理后定量 PCR 结果

* 其中: A1、A2 表示空白对照, B1、B2 表示阳性对照(7721 细胞), C1、C2 表示 ADM 处理, D1、D2 表示 AZT 处理。其 CT 值分别为: A1(N/A), A2(N/A), B1(18.4), B2(19.1), C1(22.6), C2(22.6), D2(30.5), D1(28.6)。

Fig. 3 The result of quantitative PCR treated by ADM、AZT

* Note: A1, A2: the blank, B1, B2: the positive (7721 cells), C1, C2: dealt with ADM, D1, D2: dealt with AZT. Its CT value including: A1(N/A), A2(N/A), B1(18.4), B2(19.1), C1(22.6), C2(22.6), D2(30.5), D1(28.6).

PCR Amp/ Cycle Graph for FAM - 490

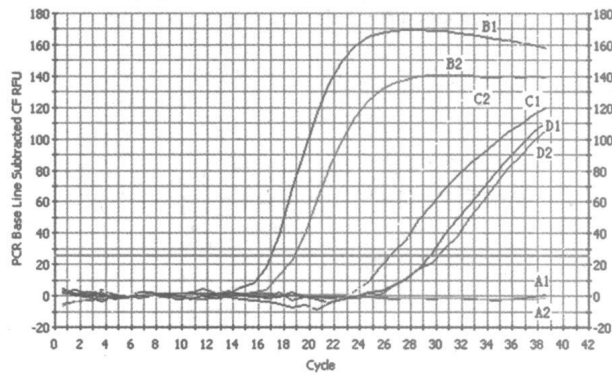


图4 ATRA、EGCG 处理后定量PCR 结果

* 其中: A1、A2表示空白对照, B1、B2表示阳性对照(7721 细胞), C1、C2表示 ATRA 处理, D1、D2表示 EGCG 处理。其 CT 值分别为: A1(N/A), A2(N/A), B1(17), B2(18.8), C1(26.4), C2(25.8), D1(29.5), D2(30.2)。

Fig.4 The result of quantitative PCR treated by ATRA, EGCG

* Note: A1, A2: the blank, B1, B2: the positive (7721 cells), C1, C2: dealt with ATRA, D1, D2: dealt with EGCG. Its CT value including: A1(N/A), A2(N/A), B1(17), B2(18.8), C1(26.4), C2(25.8), D1(29.5), D2(30.2)

3 讨论

端粒酶结构和功能的特殊性使得其活性的测定在整个端粒酶与癌症的关系研究中显得尤为重要。1985年 Greider 等最早提出的端粒重复序列扩增法^[6], 这只是一定性的检测方法。此方法灵敏度低, 所需样本量大, 检测时间长, 需大量同位素, 因此并不实用。于是 Kim^[2]等于 1994 年创立了利用 PCR 反应扩增端粒酶合成产物的端粒重复序列扩增法 (TRAP), 但也存在不少问题, 如动力学范围有限和终点检测 PCR 产物使精确测定端粒酶活性很困难等。本文所研究的主要问题就是 ASODN、NODN、hTERT、EGCG、ATRA、AZT、ADM 等几种端粒酶抑制剂作用后端粒酶活性的变化情况, 传统的定性及半定量的端粒酶活性检测方法并不能很好的解决这个问题, 因此参照文献^[7-8]报道的方法, 本研究将定量 PCR 与 TRAP 法结合起来, 采用荧光染料 SYBR Green I, 建立了一种新的端粒酶活性检测方法: 荧光定量 PCR 法 (FQ-TRAP)。本研究以多次实验平均 CT 值表示端粒酶活性, CT 值大者, 模板数小, 表示酶活性低, CT 值小者, 模板数大, 表示酶活性高。结果显示, 肝癌细胞有非常高的端粒酶活性, 其平均 CT 值为 19.45, 而空白对照及阴性对照组无反应, 其 CT 值为 N/A。说明此法特异性高。端粒酶活性的检测, 不仅要求细胞表达端粒酶的所有成分, 而且它们必须被正确组装成一个有功能的单位, 能够在端粒末端添加重复序列, 所以获得有活性细胞是端粒酶活性检测的基本要求^[9]。本研究发现, 此法可检测到 102 个细胞的水平, 比传统 PCR 法具有更高检测的灵敏度^[7]。同时经多次重复实验发现, FQ-TRAP 法重复性好, 变异性小, 从而使端粒酶测定更快、更简便、更适于大规模样本分析。

以端粒酶作为靶子, 筛选新的抗肿瘤药物是近年来抗肿瘤研究的一个新的方向。国内外不少学者开展针对端粒酶的反义核酸技术^[10-11] 尤其是核酶^[12-14] 方面的研究工作, 他们的研究结果发现针对端粒酶的反义核酸技术可使恶性肿瘤细

胞端粒酶活性降低、增殖能力下降或出现凋亡, 从而认为该技术有望应用于肿瘤的基因治疗。针对 hTERT^[15] 的反义核苷酸具有抑制肿瘤细胞端粒酶活性及诱导细胞凋亡的作用, 从而使肿瘤细胞生长进入危机并大量死亡。AZT 是一种逆转录酶的抑制剂, 在 DNA 复制时可以掺入链中而使复制终止, AZT 在体外有抑制肿瘤细胞增殖的作用^[16], 对体外培养的肝癌细胞、大肠癌细胞及肺癌细胞都有作用, 同时 AZT 降低端粒酶活性达 50% 左右, 并可使 HeLa 细胞的端粒发生不可逆变的缩短^[17], 说明 AZT 很可能是一种有效的抗癌药物。ATRA 是一种细胞诱导分化剂, 可以诱导多种肿瘤细胞产生凋亡, ATRA 通过诱导肿瘤细胞分化而出现端粒酶活性的抑制^[18] 并且发现端粒酶活性的下调是分化过程中的一件早期事件^[19]。ADM 作为治疗肝癌的有效药物, 它可能通过与 DNA 结合, 抑制核酸的合成和有丝分裂而达到抗肿瘤目的^[20], ADM 对胃癌 SGC-7901 细胞端粒酶活性有轻度抑制作用^[21]。EGCG 作为从绿茶中提取出来的最主要的酚类化合物, 流行病学和动物实验均已证明其能抑制肿瘤生长。但其确切机制目前还不清楚, 有人认为^[22,23] EGCG 可通过下调端粒酶活性, 诱导肝癌细胞凋亡。总之, 以上几种端粒酶抑制剂均具有抑制端粒酶活性的作用。

本研究利用 FQ-TRAP 法检测 ASODN、NODN、hTERT、EGCG、ATRA、AZT、ADM 等几种端粒酶抑制剂作用于肝癌细胞后, 端粒酶活性均有抑制作用, 与以上的文献报道一致, 而作用大小因抑制剂种类不同而不同, 其中以 ASODN、EGCG、AZT 抑制效果较明显。这可能是因为不同的端粒酶抑制剂有不同的作用机制而引起的。端粒酶是一个抗凋亡的基因, 因而调控端粒酶组分, 下调端粒酶活性可能诱导肿瘤细胞凋亡^[24], 但目前人们最感兴趣的是, 端粒酶抑制剂是否可作为抗肿瘤的 药物, 以及其抗肿瘤的 可能机制。因此, 本文研究的 8 种端粒酶抑制剂是否都具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用, 仍需要进一步研究证实。

参考文献

- [1] Gräder CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis [J]. *Nature*, 1989, 337: 331– 337
- [2] Kim NW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer [J]. *Science*, 1994, 266: 2011– 2015
- [3] Itoi T, Ohyashiki K, Yahata N, et al. Detection of telomerase activity in exfoliated cancer cells obtained from bile [J]. *Int J Oncol*, 1999, 15: 1061– 1067
- [4] 李欣, 李清泉, 杨炯, 等. 肺癌组织中端粒酶活性的检测 [J]. *肿瘤防治研究*, 2000, 27(4): 250– 252
- [5] Sumita T, Hanakawa H. Telomerase and oral cancer [J]. *Oral Oncol*, 2001, 37(4): 333– 340
- [6] Greider C W, Blackburn E H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts [J]. *Cell*, 1985, 43: 405 – 413
- [7] Mi Hou, Dawei Xu, Magnus B, et al. Real– Time Quantitative Telomeric Repeat Amplification Protocol Assay for the Detection of Telomerase Activity [J]. *Clinical Chemistry*. 2001, 47: 519– 524
- [8] Henning Wege, Michael S. Chui, Hai T. et al. SYBR Green real– time telomeric repeat amplification protocol for the rapid quantification of telomerase activity [J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 31(2): 3
- [9] 岳志红, 张正. 端粒酶检测技术在肿瘤诊断中的作用 [J]. *中华检验医学杂志*, 2004, 7: 401– 403
- [10] 张素珍, 黄培春, 徐永, 等. 端粒酶正义及反义寡核苷酸对鼻咽癌细胞生长分化的影响 [J]. *癌症*, 2002, 21(5): 493– 497
- [11] Ying– An J, He– sheng L, Li– Fang F, et al. Effect of antisense oligonucleotide of telomerase RNA on telomerase activity and cell apoptosis in human colon cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(3): 443– 445
- [12] Qu Y, Liu SQ, Liu BL. Attenuation of telomerase activity by hammerhead ribozyme targeting the 5'– end of hTERT mRNA [J]. *Zhonghua YiXue Yi Chuan Xue*, 2002, 19(5): 389– 392
- [13] 刘柏林, 屈艺, 刘菽秋, 等. Ribozyme 抑制端粒酶活性的肿瘤基因治疗 [J]. *中国科学(C 辑)*, 2002, 32(2): 159– 164
- [14] 赵颖海, 陈小毅, John RA. 抗端粒酶核质粒的构建筛选及其对 CNE– 2Z 细胞增殖与凋亡的影响 [J]. *癌症*, 2004, 23(1): 50– 55
- [15] Folini M, De M, Orlandi L, et al. Attenuation of telomerase activity does not increase sensitivity of human melanoma cells to anticancer agents [J]. *Eur J Cancer*, 2000, 36: 2 137
- [16] Su XL, Wen SS, Ying LC, et al. Antisense oligonucleotide targeting at the initiation of hTERT arrests growth of hepatoma cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(3): 366– 370
- [17] 陈雯, 张桥, 魏青, 等. 端粒酶抑制剂对肿瘤细胞及端粒酶活性的影响 [J]. *肿瘤*, 2000, 20(6): 415– 418
- [18] Kravets JM, Li L, Bidauski J, et al. Involvement of endogenous ceramide in the inhibition of telomerase activity and induction of morphologic differentiation in response to all– trans– retinoic acid in human neuroblastoma cells [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2003, 419(2): 110– 9
- [19] Wu LD, Chen YZ, Li NN, Wu Y. Study on telomerase activity and expression of hTERT, c– myc and bcl– 2 during terminal differentiation of HL– 60 cells induced by retinoic acid [J]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2002, 10(5): 395– 9
- [20] Yamada O, Takanashi M, Ujihara M, et al. Down– regulation of telomerase activity is an early event of cellular differentiation without apparent telomeric DNA change [J]. *Leuk Res*, 1998, 22(8): 711– 717
- [21] 韩锐主编. 肿瘤的化学预防及药物治疗 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1991: 267– 268
- [22] 朱忠超, 刘志苏, 艾中立, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯诱导肿瘤细胞凋亡并伴随端粒酶活性下调 [J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2004, 2566: 663– 666
- [23] Suzuki Y, Zsemuru M. Inhibitory effect of epigallocatechin gallate on adhesion of murine melanoma cells to laminin [J]. *Cancer Lett*, 2001, 173: 15
- [24] Nagao KM, Masahiko TS. Telomerase reverse transcriptase mRNA expression and telomerase activity in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterology*, 1999, 34: 83– 87