

## 转染靶向 hTERT miRNA 表达框架对 K562 细胞端粒酶活性及增殖活性的影响

赵丹丹,徐 慧,李亚红,凌 晗,吴珊珊,羊金菊,彭剑雄\*

(中南大学湘雅医学院医学检验系,湖南 长沙 410013)

**[摘要]** 目的:设计靶向端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase,hTERT)的 miRNA 表达框架,探讨其对 hTERT 的表达、端粒酶活性及 K562 增殖的影响,以为慢性髓系白血病提供新的基因治疗策略。方法:构建靶向 hTERT 的 miRNA 表达框架,脂质体法转染 K562 细胞,银染法及荧光定量 PCR 法检测端粒酶活性及 hTERT 的表达情况。Annexin V/PI 双染检测细胞凋亡。结果:miRNA 表达框架转染 48 h 后,hTERT 的表达明显下降,端粒酶活性明显减低,K562 细胞凋亡率增加。结论:靶向 hTERT 的 miRNA 表达框架能够有效干扰 hTERT 的表达,抑制端粒酶活性,诱导 K562 细胞的凋亡。以 miRNA 表达框架为基础的 RNAi 技术,有望成为分子水平治疗慢性髓系白血病的有效工具。

**[关键词]** miRNA;RNAi;端粒酶;hTERT;慢性髓系白血病

**[中图分类号]** R730.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)03-293-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20160308

## Discussing the inhibition effect of miRNA expression cassettes targeting hTERT on telomerase activity and K562 proliferation activity

Zhao Dandan,Xu Hui,Li Yahong,Ling Han,Wu Shanshan,Yang Jinjü,Peng Jianxiong\*

(Department of Medical Laboratory,Xiangya Medical College of Central South University,Changsha 410013,China)

**[Abstract]** **Objective:**To design the miRNA expression cassettes targeting telomerase reverse transcriptase(hTERT)and to discuss the interfering effect on the expression of hTERT,the telomerase activity and the proliferation of K562,so as to provide a new gene therapy for chronic myeloid leukemia. **Methods:**miRNA expression cassettes targeting hTERT were constructed and transfected to K562 cells by liposome transfection. The telomerase activity and the expression of hTERT were detected by TRAP-silver staining and qPCR, respectively. Cell apoptosis rate was detected by Annexin V/PI. **Results:**After 48 h transfection,the expression of hTERT and telomerase activity were significantly reduced. The apoptosis rate of K562 cell was increased. **Conclusion:**The miRNA expression cassettes targeting hTERT can effectively interfere with the expression of hTERT,inhibit the telomerase activity and induce the apoptosis of K562 cells. RNAi technology based on the miRNA expression cassette is expected to become an efficient tool in molecular level for the treatment of chronic leukemia.

**[Key words]** miRNA; RNAi; telomerase; hTERT; chronic myeloid leukemia

[Acta Univ Med Nanjing,2016,36(03):293-297,306]

端粒为染色体末端 6 个核苷酸(TTAGGG)的重复序列,是维持染色体结构稳定及完整的重要保护

结构<sup>[1]</sup>。端粒酶依赖途径是维持端粒的重要机制。端粒酶是一种核糖核蛋白复合体,由端粒酶逆转录酶部分(telomerase reverse transcriptase,hTERT)和端粒酶 RNA 部分(telomerase RNA,hTR)两部分组成。许多研究显示端粒酶活性与肿瘤发生与演进有关<sup>[2]</sup>。白血病细胞中普遍表达端粒酶,且端粒酶活性水平显著高于正常骨髓细胞,实验证实端粒酶基因的表达和

**[基金项目]** 湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目(CY14277);国家自由探索项目(201510533374);国家研究性学习和创新性实验计划项目(201510533026)

\*通信作者(Corresponding author),E-mail:jxpeng@csu.edu.cn

端粒长度的稳定可影响病程进展,而抑制端粒酶活性能够有效诱导白血病细胞凋亡<sup>[3]</sup>。慢性髓系白血病是临床上一种发展较为缓慢的骨髓恶性克隆性疾病,病死率高,目前尚无有效治疗方法。人工 miRNA 通过模拟内源性 miRNA 干扰靶基因,具有高效干扰、低毒性、不易降解等优点,已经成为分子水平研究的重要工具<sup>[4]</sup>。而以 miRNA 表达框架为基础对端粒酶干扰的研究国内外未见报道。本实验通过构建靶向 hTERT 的 miRNA 表达框架,转染人慢性白血病 K562 细胞,检测细胞中 hTERT 表达,端粒酶活性的变化以及对细胞增殖和凋亡的影响,以期为临床慢性髓系白血病开辟一条新的基因治疗途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

K562 细胞由湖南省遗传重点实验室惠赠, Taq Master Mix、Taq DNA 聚合酶、dNTP、MgCl<sub>2</sub> (北京天根生化科技有限公司); DMEM 细胞培养液 (Hyclone 公司, 美国), 小牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司); PI 染料、Phusion Taq DNA 聚合酶、Lipofectamine-2000™ 转染试剂 (Life 公司, 美国); Annexin V/PI 双染试剂盒 (中国唯赞公司), SYBR Green qPCR 试剂盒 (ToYoBo 公司, 日本), RNA 提取试剂盒 (Thermo 公司, 美国), 逆转录试剂盒 (Abm 公司, 德国); ABI Stepone 荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司, 德国), FACS 流式仪检测 (Becton Dickinson 公司, 美国)。所有引物及核苷酸序列均由上海生工合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 miRNA 表达框架设计与合成

利用本实验室已构建成功的以鼠 miR-155 为基础的 miRNA 表达框架<sup>[5]</sup>, 利用 miRNA 设计软件 (<http://rnaidesigner.lifetechnologies.com>) 设计并选取评分最高的 3 条靶向 hTERT 的 miRNA 序列和 1 条随机阴性对照序列, 分别作用于 hTERT 的 2 647~2 667 (miR-1), 3 579~3 590 (miR-2) 及 3 877~3 897 (miR-3) 位点。其中 miR-1 靶点位于开放阅读框 (ORF), miR-2 及 miR-3 靶点位于 3' 非编码区 (3' UTR), 经 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 排除非特异同源序列。

#### 1.2.2 细胞培养及转染

K562 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基, 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 湿润环境下培养。取对数期细胞接种于 96 孔板或 6 孔板, 用 Lipofectamine-2000™

转染试剂进行细胞转染。以空转染试剂为空白对照组, 随机序列为阴性对照组, 实验组分别为 miR-1 组、miR-2 组、miR-3 组及 miR-2+3 组。每组设 3 个重复。

#### 1.2.3 miRNA 表达框架转染及表达鉴定

细胞转染 48 h 后, 按蛋白酶 K 及苯酚法提取 DNA, 以引物 H1R (5'-GAATTCGAACGCTGACGTC-3') 及 MR (5'-GCAAAAAGGCCATTTGTTCC-3') 扩增表达框架, 以检测 miRNA 表达框架是否转染入细胞。反应体系: 2×Taq DNA polymerase Mix 25 μL, 引物 300 nmol/L, 模板 500 ng~1 μg。95℃ 3 min, 95℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 5 min。提取总 RNA, 按 RT-PCR 试剂盒操作说明, 进行逆转录。PCR 以 GADPH 为内参基因, miRNA 上游引物 5'-AGGCTTGCTGAAGGCTGTAT-3', 下游引物 5'-TGAGTGTACCTTGTTTACCG-3'。GADPH 上游引物 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', 下游引物 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。2×Taq DNA polymerase Mix 25 μL, 引物 (10 mmol/L) 1.5 μL, 模板 500 ng~1 μg。95℃ 3 min; 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 5 min。

#### 1.2.4 TRAR-银染法检测端粒酶活性

TRAP 为检测端粒酶活性经典方法<sup>[6]</sup>。细胞转染 48 h 后, 按 Kim 法裂解细胞。端粒酶活性检测引物: TS, 5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'; ACX, 5'-GCGCGG [CTTACC]3CTAACC-3'。反应条件: 10×TRAP 5 μL, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 1.8 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 1.8 μL, TS (10 mmol/L) 1.5 μL; 25℃ 30 min, 94℃ 3 min; Taq DNA 酶 (5 U/μL) 0.5 μL, ACX (10 mmol/L) 1.5 μL, 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 33 个循环。PCR 产物用 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳及硝酸银染色检测。PAGE 胶用凝胶成像仪照相。

#### 1.2.5 TRAP-qPCR 检测端粒酶活性<sup>[7]</sup>

TRAP-qPCR 法引物同 TRAR-银染法, 以人工合成的寡核苷酸端粒酶延伸产物 TSR (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTTAG [GGTTAG]7-3') 作为标准品建立标准曲线, 起始浓度为 6.02×10<sup>6</sup>, 5 倍倍比稀释。20 μL 反应体系为: SYBR Green qPCR Mix 10 μL, ROX1 0.4 μL, TS 250 nmol/L, ACX 250 nmol/L, 细胞裂解液 (蛋白浓度 0.3 ng/μL) 或 TSR 2 μL, 加灭菌双蒸水至总体积 20 μL。25℃ 30 min, 95℃ 10 min; 95℃ 15 s, 60℃ 40 s, 40 个循环。

#### 1.2.6 RT-qPCR 检测 hTERT mRNA 表达

转染 48 h 后收集 K562 细胞, 提取总 RNA, 按 RT-PCR 试剂盒操作说明, 进行逆转录。qPCR 以

GADPH 为内参基因,hTERT 上游引物 5'-CGGAA-GAGTGTCT GAGCAA-3',下游引物 5'-GGAT-GAAGCGGAGTCTGGA-3'。GADPH 上游引物 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',下游引物 5'-TC-CACCACCCTGTTGCTGTA-3'。SYBR Green qPCR Mix 10  $\mu$ L,ROX1 0.4  $\mu$ L,引物 250 nmol/L,模板 500 ng。95 $^{\circ}$ C 10 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 40 s (40 个循环)。hTERT mRNA 相对表达量以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法分析。

### 1.2.7 流式检测细胞周期

细胞转染后 48 h,收集细胞,Annexin V 和 PI 各 5  $\mu$ L,室温 10 min,调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL,FACS 流式仪检测。

### 1.3 统计学方法

数据统计分析应用 SPSS11.8 统计软件,结果采用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验(方差齐)或 Dunnett 检验(方差不齐), $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miRNA 表达框架转染及表达鉴定

由于本研究 miRNA 表达框架是以 miR-155 为基础,因此 3 条人工合成的 miRNA 框架及最终表达的 pri-miRNA 片段长度相同,并具有相同的侧翼序列。琼脂糖凝胶电泳显示 miRNA 表达框架的 PCR 产物为 365 bp,与预期结果一致(图 1)。miRNA RT-PCR 产物为 127 bp,内参 GADPH 为 396 bp,与预期序列一致。

### 2.2 RT-qPCR 检测 hTERT mRNA 表达

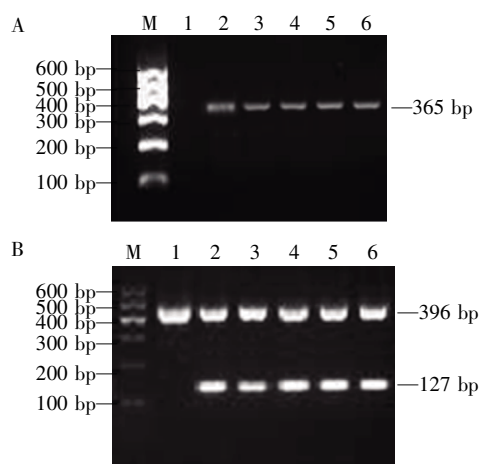
荧光定量检测 hTERT mRNA 表达结果显示,干扰组 hTERT mRNA 相对表达量分别为 miR-1 组  $0.54 \pm 0.04$ ,miR-2 组  $0.37 \pm 0.06$ ,miR-3 组  $0.19 \pm 0.02$ ,miR-2+3 组  $0.03 \pm 0.01$ 。各干扰组 hTERT mRNA 相对表达量明显低于阴性对照组 ( $0.88 \pm 0.53$ )( $P < 0.05$ ,图 2)。表明靶向 hTERT 的 miRNA 表达框架能够有效抑制端粒酶活性。

### 2.3 TRAP-银染法定性检测端粒酶活性

与空白对照组比较,各实验组 K562 细胞端粒酶活性均受到不同程度的抑制,miR-1,miR-2,miR-3,miR-2+3 组端粒酶抑制率分别为 ( $52.30 \pm 1.24$ )%、( $68.40 \pm 3.54$ )%、( $75.18 \pm 2.45$ )%、( $82.67 \pm 3.10$ )%,阴性对照组未见明显抑制[( $5.27 \pm 3.60$ )%](图 3)。

### 2.4 TRAP-qPCR 法定量检测端粒酶活性

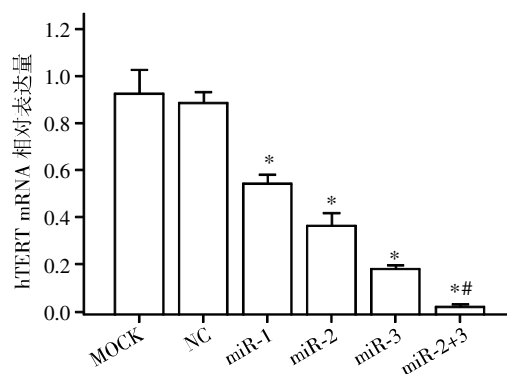
荧光定量检测端粒酶活性,以端粒酶延长产物



A:miRNA 表达框架转染细胞情况;B:miRNA 在细胞内表达情况。M:marker;1:MOCK(仅含脂质体);2:NC(阴性对照);3:miR-1;;4:miR-2;5:miR-3;6:miR-2+3。

图 1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Figure 1 Identification of PCR product by agarose gel electrophoresis



MOCK:仅加入脂质体;NC:阴性对照。与 MOCK 和 NC 组比较,\* $P < 0.05$ ;与 miR-1 和 miR-2 组比较,\* $P < 0.05$ 。

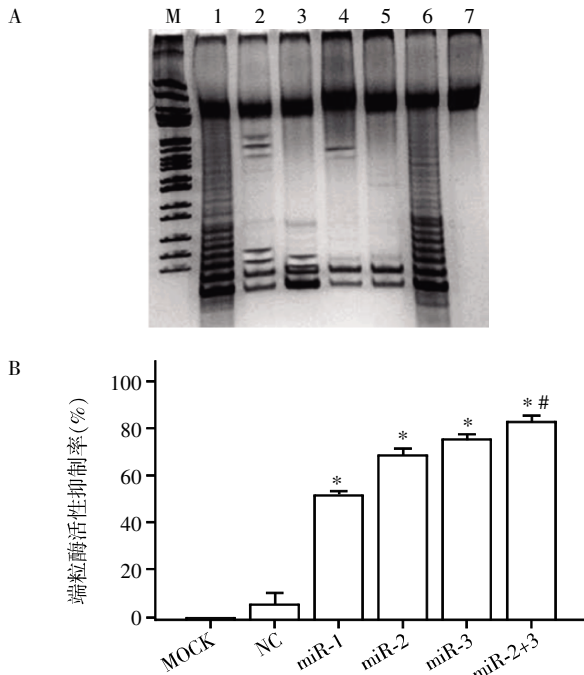
图 2 hTERT mRNA 相对 GADPH 的表达量

Figure 2 The relative mRNA levels of hTERT were determined by real-time PCR

量反映端粒酶活性,结果显示,干扰组端粒酶活性分别为 miR-1 组  $2215.86 \pm 38.72$ ,miR-2 组  $1464.24 \pm 158.72$ ,miR-3 组  $1085.77 \pm 62.64$ ,miR-2+3 组  $925.08 \pm 50.51$ 。干扰组端粒酶活性明显低于阴性对照组 ( $11125.82 \pm 492.66$ )( $P < 0.05$ ,图 4)。表明靶向 hTERT 的 miRNA 表达框架能够有效抑制端粒酶活性。

### 2.5 流式检测细胞凋亡

流式检测结果显示干扰组 K562 细胞凋亡率分别为 miR-1 组 ( $24.36 \pm 4.23$ )%,miR-2 组 ( $35.10 \pm 2.38$ )%,miR-3 组 ( $42.97 \pm 3.07$ )%,miR-2+3 组 ( $68.12 \pm 1.53$ )%。各干扰组细胞凋亡率较阴性对照组 ( $4.10 \pm 0.51$ )%明显增高( $P < 0.05$ ,图 5)。表明靶向 hTERT 的 miRNA 表达框架能够有效诱导 K562



A: 端粒酶活性检测银染图; B: 端粒酶活性抑制率定量分析。M: Marker; 1: MOCK (仅含脂质体); 2: miR-1; 3: miR-2; 4: miR-3; 5: miR-2+3; 6: 阴性对照; 7: 空白对照(裂解液代替细胞裂解物)。与 MOCK 和 NC 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 miR-1 和 miR-2 组比较, # $P < 0.05$ 。

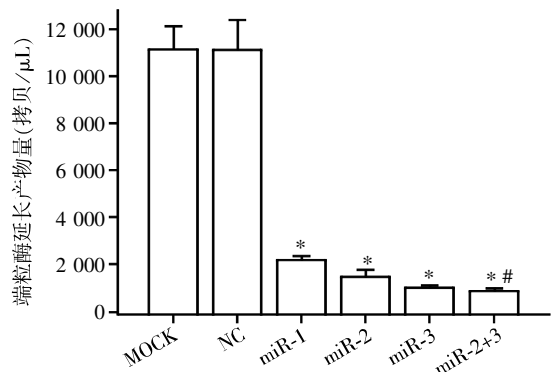
图 3 端粒酶活性检测银染图

Figure 3 Telomerase activity was determined by TRAP-silver staining

细胞凋亡, 抑制细胞增殖。

### 3 讨论

研究表明, 端粒长度与肿瘤恶性程度成负相

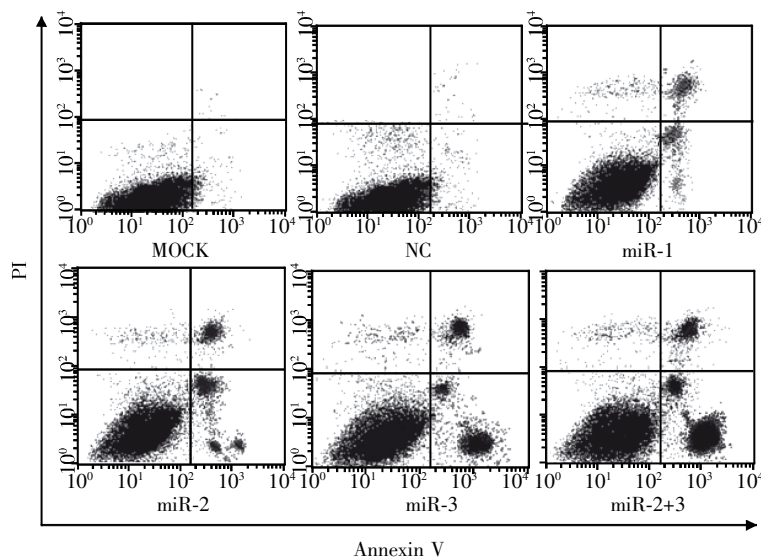


MOCK: 仅加入脂质体; NC: 阴性对照。与 MOCK 和 NC 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 miR-1 和 miR-2 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 4 荧光定量 PCR 法检测端粒酶活性

Figure 4 Telomerase activity was detected by real-time PCR

关。即短端粒肿瘤细胞恶性程度往往高于端粒相对较长的肿瘤细胞<sup>[8-9]</sup>。机制可能为短的端粒有利于肿瘤细胞逃脱自身免疫监视作用, 而缩短的端粒又是端粒酶激活的重要因素之一<sup>[10]</sup>。端粒酶在肿瘤细胞的发生发展中起着重要作用, 大部分肿瘤细胞中端粒酶活性增高, 而正常体细胞中端粒酶则表现为无活性或低活性。许多研究显示端粒酶活性与肿瘤发生与演进有关<sup>[10]</sup>。发生转移的肿瘤细胞中端粒酶活性明显高于未发生转移的肿瘤细胞<sup>[11]</sup>。在慢性白血病的研究中也发现, 端粒酶活性越高越易引起慢性白血病急变, 而端粒酶活性的改变出现在急变之前<sup>[12]</sup>。由此推测端粒酶激活在癌变及疾病进展过程中起着重要作用。在肿瘤细胞中, 端粒酶激活不仅能够延长端粒, 使细胞



MOCK: 仅加入脂质体; NC: 阴性对照。与 MOCK 和 NC 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 miR-1 和 miR-2 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 5 Annexin V/PI 双染检测细胞凋亡

Figure 5 Cell apoptosis was detected by Annexin V/PI double-staining

永生,还与细胞内多种癌症相关因子均有着重要联系,与肿瘤预后不良密切相关<sup>[13-14]</sup>。因此,检测端粒酶活性能够为肿瘤诊断、预后判定及复发提供一定依据。

通过特异性干扰基因的表达, RNA 干扰已经成为基因治疗研究的重要手段<sup>[15-16]</sup>。利用特异性 siRNA 可以特异、有效地抑制多种与慢性粒细胞白血病细胞增殖、BCR-ABL 融合蛋白表达和逆转白血病细胞多重耐药相关的基因表达<sup>[17-19]</sup>。但是,还有许多问题尚需解决,如 siRNA 最优靶基因和靶位点的选择,有效的载体系统,生物安全性等。在慢性白血病的研究中发现,慢性白血病细胞中端粒酶活性普遍高于正常骨髓细胞,且端粒酶活性与病情恶性程度呈正相关,干扰 hTERT 能够有效抑制端粒酶活性,从而抑制慢性白血病细胞增殖并诱导其凋亡<sup>[20-21]</sup>。因此,靶向端粒酶的基因治疗策略有望成为治疗慢性白血病的有效途径。而常用的 siRNA 虽然干扰效果显著,但由于其与内源性 miRNA 发生过分竞争,而造成内源性 miRNA 表达紊乱,从而表现出细胞毒性<sup>[22]</sup>。本研究以 miR-155 为基础构建靶向 hTERT 的 miRNA 表达框架。miRNA 表达框架转染 K562 细胞 48 h 后, hTERT 表达量明显下降,端粒酶活性也明显降低。同时流式检测结果显示 K562 细胞凋亡率明显增高。以上结果表明,在 K562 细胞中靶向 hTERT 的 miRNA 表达框架能够有效干扰 hTERT 的表达,而 hTERT 表达下降能够明显降低端粒酶的活性,并诱导细胞凋亡,从而抑制 K562 的增殖。此外,本研究还发现靶向 3'UTR 的 miRNA 对 hTERT 的抑制率明显高于靶向 ORF 的 miRNA,此现象与内源性 miRNA 作用特点相似,推测可能是由于靶位点的易接近性不同,3'UTR 较 ORF 在二级结构上更易接近。另外,本研究将靶向 3'UTR 的 2 条 miRNA 进行联合干扰。结果发现,较单独干扰组,联合干扰组对 hTERT 的抑制效率明显增强,表明联合干扰可能是一种更为有效的干扰策略,尤其对于那些干扰效果不理想的靶位。总之,以 hTERT 为靶点的基因治疗策略,有望成为一种新型慢性白血病的治疗方案,而本研究构建的 miRNA 表达框架是一种有效、简便、安全的 RNA 干扰工具。

#### [参考文献]

[1] Blackburn EH. Telomere states and cell fates[J]. Nature,

2000,408(688):53-56

- [2] Wu XQ, Huang C, He X, et al. Feedback regulation of telomerase reverse transcriptase: new insight into the evolving field of telomerase in cancer[J]. Cell Signal, 2013, 25(12): 2462-2468
- [3] Bruedigam C, Bagger FO, Heide FH, et al. Telomerase inhibition effectively targets mouse and human AML stem cells and delays relapse following chemotherapy[J]. Cell Stem Cell, 2014, 15(6): 775-790
- [4] Winter J, Link S, Witzigmann D, et al. Loop-miRNAs: active microRNAs generated from single-stranded loop regions [J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(10): 5503-5512
- [5] 徐 慧, 范张玲, 张 旺, 等. 新型人工 miRNA 表达框架的构建及其有效性验证[J]. 临床检验杂志, 2014, 32(12): 939-943
- [6] Kim NW, Wu F. Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP) [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(13): 2595-2597
- [7] Wege H, Chui MS, Le HT, et al. SYBR green real-time telomeric repeat amplification protocol for the rapid quantification of telomerase activity [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(2): E3
- [8] Poloni A, Serrani F, Berardinelli E, et al. Telomere length, c-myc and mad-1 expression could represent prognosis markers of myelodysplastic syndrome [J]. Leuk Res, 2013, 37(11): 1538-1544
- [9] Sanchez-Espiridion B, Chen M, Chang JY, et al. Telomere length in peripheral blood leukocytes and lung cancer risk: a large Case-Control study in caucasians [J]. Cancer Res, 2014, 74(9): 2476-2486
- [10] Guenes C, Rudolph KL. The role of telomeres in stem cells and cancer [J]. Cell, 2013, 152(3): 390-393
- [11] Campbell PJ. Telomeres and cancer: from crisis to stability to crisis to stability [J]. Cell, 2012, 148(4): 633-635
- [12] Amini A, Ghaffari SH, Mortazai YA, et al. Expression pattern of hTERT telomerase subunit gene in different stages of chronic myeloid leukemia [J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(9): 5557-5561
- [13] Cong YS, Shay JW. Actions of human telomerase beyond telomeres [J]. Cell Res, 2008, 18(7): 725-732
- [14] Keo P, Choi JS, Bae J, et al. Increased stability of nucleolar PinX1 in the presence of TERT [J]. Mol Cells, 2015, 38(9): 814-820
- [15] Amarzguioui M, Rossi JJ, Kim D. Approaches for chemically synthesized siRNA and vector-mediated RNAi [J]. FEBS Lett, 2005, 579(26): 5974-5981
- [16] Denise H, Moschos SA, Sidders BA, et al. Deep sequenc-