

顺铂处理后几种 *hTERT* mRNA 剪接异构体的变化^{*}

杨梦莉¹, 陈香岭¹, 隋旭², 廉亚茹¹, 马春霞¹, 姚宇峰¹, 史荔¹, 马千里³, 俞建昆^{1**}

(1. 中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所, 云南昆明 650118; 2. 昆明理工大学, 云南昆明 650093; 3. 昆明医科大学第三附属医院 胸外科, 云南昆明 650118)

[摘要] 目的: 利用顺铂处理肺癌、宫颈癌细胞和人胚肾细胞, 检测人类端粒酶逆转录酶催化亚单位 (*hTERT*) mRNA 的选择性剪接是否发生变化。方法: 将培养的肺癌 A549 和 H1299 细胞, 宫颈癌 C33A、SiHa 和 CaSki 细胞及人胚肾 293FT 细胞分为实验组和对照组, 用顺铂处理实验组细胞, DMSO 处理对照组细胞; 设计 *hTERT* $\alpha + \beta +$ 、 $\alpha + \beta -$ 、 $\alpha - \beta +$ 、INS3 及 DEL[e2] 引物, 提取两组细胞的总 RNA, 利用 RT-PCR 检测 *hTERT* mRNA 剪接异构体表达。结果: 与对照组细胞相比, 随着顺铂浓度的增加, 肺癌 A549 和 H1299 细胞, 宫颈癌 C33A、SiHa 和 CaSki 细胞以及人胚肾 293FT 细胞中 *hTERT* $\alpha + \beta -$ 和 INS3 异构体比例升高, 而 DEL[e2] 异构体变化不明显。结论: 在顺铂引起的 DNA 损伤情况下, 细胞可利用 *hTERT* mRNA 选择性剪接调控机制进行调节, 通过改变不同异构体的量和所占比例, 从而调节端粒酶功能活性。

[关键词] 肺肿瘤; 宫颈肿瘤; 人胚肾细胞; 细胞, 培养的; 人类端粒酶逆转录酶催化亚单位; 顺铂

[中图分类号] R512.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)11-1279-06

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.11.009

Several Splice Isoforms of *hTERT* mRNA and Its Change in Cells after Treatment with Cisplatin

YANG Mengli¹, CHEN Xiangling¹, SUI Xu², LIAN Yaru¹, MA Chunxia¹,
YAO Yufeng¹, SHI Li¹, MA Qianli³, YU Jiankun¹

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650118, Yunnan, China; 2. Kunming University of Science and Technology, Kunming 650093, Yunnan, China; 3. Department of Thoracic Surgery, the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650118, Yunnan, China)

[Abstract] **Objective:** To determine whether there is any change of alternative splicing of *hTERT* mRNA in lung cancer and cervical cancer cells and human embryonic kidney cells after cisplatin treatment, different dose of cisplatin were used to treat these two types of cell line. **Methods:** Cultivated lung cancer A549 and H1299 cells, cervical cancer C33A, SiHa and CaSki cells and HEK 293FT cells were divided into experiment group and control group; using cisplatin to treat experiment group cells and DMSO to treat control group cells; *hTERT* $\alpha + \beta +$, $\alpha + \beta -$, $\alpha - \beta +$, INS3, DEL[e2] alternative splicing sites were selected to design primers. Total RNA of treated cells and control cells after treatment with cisplatin were extracted and RT-PCR was used to test the spliced transcripts, and their ratios of *hTERT* mRNA in cancer cells. **Results:** The results indicated that the ratio of the *hTERT* $\alpha + \beta -$ and INS3 isoform increased with the increase of the concentration of cisplatin; but the change of DEL[e2] was not obvious. **Conclusion:** The activity of telomerase may be regulated through the expression and ratio of different alternative splicing isoforms of *hTERT* when DNA impairment.

^{*} [基金项目] 中国医学科学院病原生物学研究所基本科研业务费项目(2012IPB107); 高等学校博士学科点专项科研基金(新教师类)(20111106120056)

^{**} 通信作者 E-mail: yjk@imbcams.com.cn

网络出版时间: 2016-11-15 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20161115.1757.018.html>

[**Key words**] lung neoplasm; cervical neoplasm; human embryonic kidney cells; cell, cultured; human telomerase reverse transcriptase; cisplatin

端粒是真核细胞线性染色体的末端物质,由TTAGGG重复序列构成,端粒DNA序列具有高度保守性,在维持染色体稳定性中起重要作用。人端粒酶主要由两个亚单位组成,即端粒酶RNA(hTR)和催化亚单位(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)^[1]。hTERT作为端粒酶的限速酶,在端粒酶的活性调节中起关键作用。研究表明,端粒酶活性的调节主要依赖于hTERT mRNA的表达,而hTERT mRNA表达会由于选择性剪接(alternative splicing)而产生多个异构体,到目前为止已发现14种hTERT转录异构体,主要是由于外显子的缺失及内含子的插入造成的^[2-3]。Pre-mRNA选择性剪接作用可以调节hTERT基因的表达量,同时也可以改变蛋白的结构,对端粒酶活性产生重要的影响^[4]。近来研究表明,用DNA损伤试剂或者辐射处理细胞后,一些与细胞周期和凋亡相关的基因会相应的发生选择性剪接的变化^[5]。抗癌药物顺铂具有诱导细胞凋亡作用,可引起DNA链断裂,本研究选取肺癌A549、H1299细胞,宫颈癌C33A、SiHa和CaSki细胞及人胚肾293FT细胞用顺铂处理,探究hTERT的 $\alpha + \beta +$ 、 $\alpha + \beta -$ 、 $\alpha - \beta +$ 、INS3及DEL[e2]几种剪接异构体是否发生改变,并且这些异构体所占比例在顺铂不同浓度处理样品中是如何变化的,为探讨端粒酶不同剪接异构体的功能及其调控剪接信号通路和机制提供信息,为临床治疗肿瘤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与分组

细胞NCI-H1299、C33A、SiHa、CaSki及293FT购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心),A549购自中国科学院昆明动物所细胞中心。NCI-H1299细胞使用Hyclone改良型RPMI-1640培养基,其余细胞均使用Hyclone DMEM/HIGH GLUCOSE培养液(GE Healthcare Life Sciences),两种培养液均含10% FBS(Certified Foetal Serum, Biological Industries),青霉素和链霉素浓度分别为100 U/mL和100 mg/L,培养条件为37℃、5%的

CO₂。顺铂购自Sigma Aldrich公司,用DMSO溶解后使用。顺铂加入时细胞处于对数增长期,在培养皿表面覆盖率为70%~90%。5种肿瘤细胞都分为实验组和对照组,实验组细胞用不同浓度的顺铂处理,对照组细胞用相应浓度的DMSO处理;对照组中A549、H1299、C33A、SiHa、CaSki、293FT细胞加入DMSO浓度分别为56、72、63、56、42、63 $\mu\text{mol/L}$ 。实验组中A549、H1299顺铂浓度分别是7、14、21、28、35、42、49、56 $\mu\text{mol/L}$ 和9、18、27、36、45、54、63、72 $\mu\text{mol/L}$,C33A浓度为9、18、27、36、45、54、63 $\mu\text{mol/L}$,SiHa浓度为8、16、24、32、40、48、56 $\mu\text{mol/L}$,CaSki浓度为6、18、24、30、36、42 $\mu\text{mol/L}$,293FT浓度为9、18、27、36、45、54、63 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2 提取总RNA

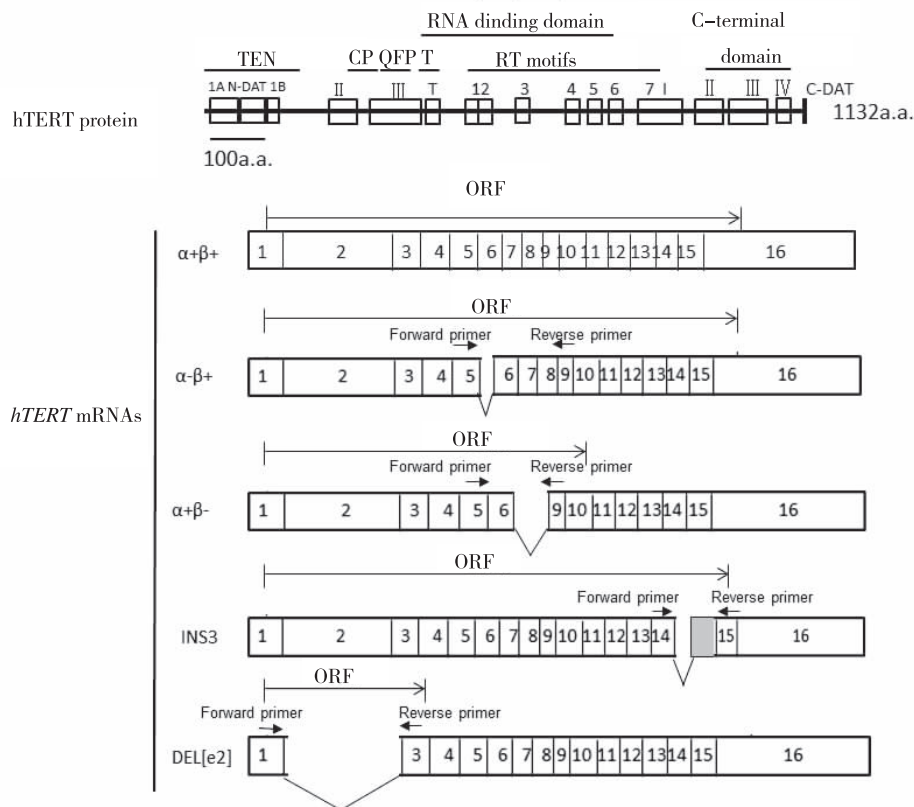
各组细胞在顺铂或DMSO处理24 h时倾倒入去培养液,用预冷的PBS冲洗1次,彻底除去PBS后,加入RNAiso Plus(TakaRa公司),按照试剂说明书程序提取总RNA。

1.3 检测异构体

oligo(dT)18引物用PrimeScript II逆转录酶(TaKaRa公司)进行逆转录反应得到cDNA第一链,再用PCR引物进行PCR扩增检测。 $\alpha + \beta -$ 和 $\alpha - \beta +$ 上游引物为5'-GCCTGAGCTGTACTTTTGT-CAAG-3',下游引物为5'-GCAAACAGCTTGTCTC-CATGTC-3'。引物设计起始于外显子5和终止于外显子9,产物大小为274、456 bp;INS3上游引物为5'-CTCCATCCTGAAAGCCAAGAAC-3',下游引物为5'-TGTCGAGTCAGCTTGAGCAG-3',引物设计起始于外显子14和终止于外显子15,产物大小为123、282 bp;DEL[e2]上游引物ACTACCGCGAG-GTGCTGC,下游引物GACGACGTACACACTCAT-CAG,引物设计起始于外显子1和终止于外显子3,产物大小259、1613 bp,如图1所示。PCR反应总体积20 μL ,94℃ 3 min预变性;94℃ 变性30 s,59℃退火30 s,72℃延伸45 s,35次循环,72℃延伸5 min。PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 数据分析

利用RT-PCR进行试验检测,实验所得数据用Bio-RAD凝胶成像仪自带分析软件处理,最终数值为3次实验结果平均值。



注:全长 $\alpha + \beta +$ 剪接异构体包含 16 个外显子和完整的 RT 结构域, $\alpha - \beta +$ 剪接异构体位于第 6 外显子处缺失 36 个核苷酸, $\alpha + \beta -$ 剪接异构体在第 7 和第 8 外显子缺失了 182 个核苷酸,INS3 剪接异构体在第 15 外显子前插入一部分内含子序列,DEL[e2]剪接异构体在第 2 外显子约 (1.3 kb) 缺失的产物

图 1 *hTERT* 选择性剪接基因结构图

Fig. 1 Alternative splicing of *hTERT* gene structure of the system

2 结果

2.1 *hTERT* $\alpha + \beta -$ mRNA 异构体的变化

与对照组细胞比较,实验组 A549、H1299、293FT、C33A、SiHa 及 CaSki 细胞随着顺铂浓度的增加, $\alpha + \beta +$ 异构体 (*a) 的比例呈先增加、后逐渐降低的趋势,而 $\alpha + \beta -$ 异构体 (*b) 的比例逐渐增加,其中 293FT、CaSki 以及 C33A 细胞中出现 36 bp 的 $\alpha - \beta +$ (*c) 目标带,变化趋势与 $\alpha + \beta +$ 异构体一致。如图 2。

2.2 *hTERT* INS3 mRNA 异构体的变化

与对照细胞相比,在实验组 A549、H1299、293FT、C33A 和 SiHa 细胞随着顺铂浓度的增加, $\alpha + \beta +$ (*b) 异构体的比例呈逐渐降低的趋势,而 INS3 异构体 (*a) 的比例逐渐增加。如图 3。

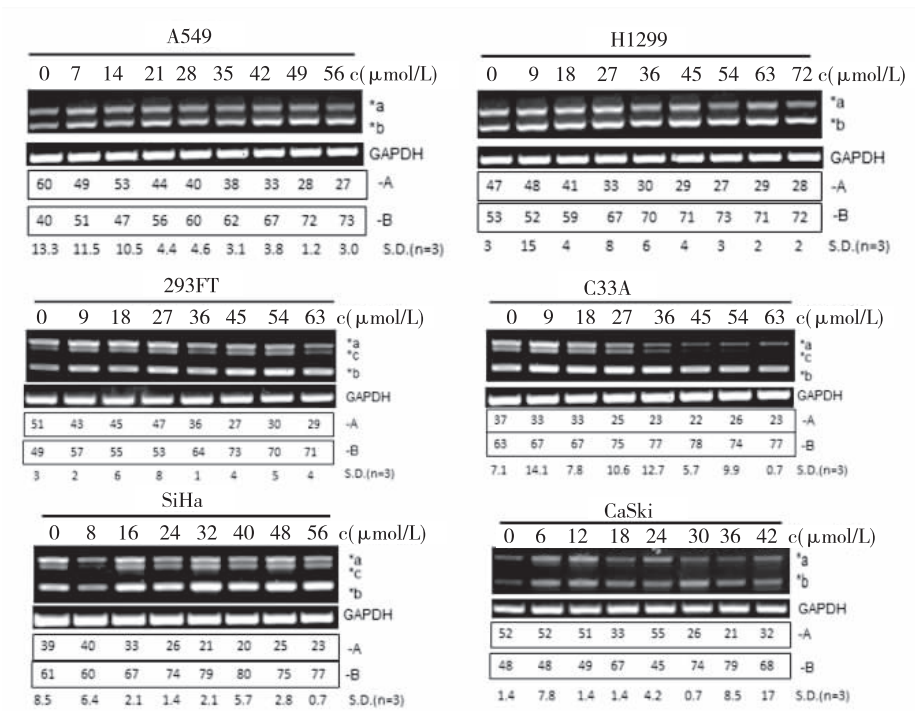
2.3 *hTERT* DEL[e2] mRNA 异构体的变化

实验组 A549、SiHa、H1299 细胞中, $\alpha + \beta +$ 异

构体 (*a) 和异构体 DEL[e2] (*b) 与对照细胞相比,变化趋势不明显。在 C33A 细胞中, $\alpha + \beta +$ 异构体 (*a) 变化趋势不明显,因 DEL[e2] 异构体缺失,导致 DEL[e2] (*b) 未出现目标条带。

3 讨论

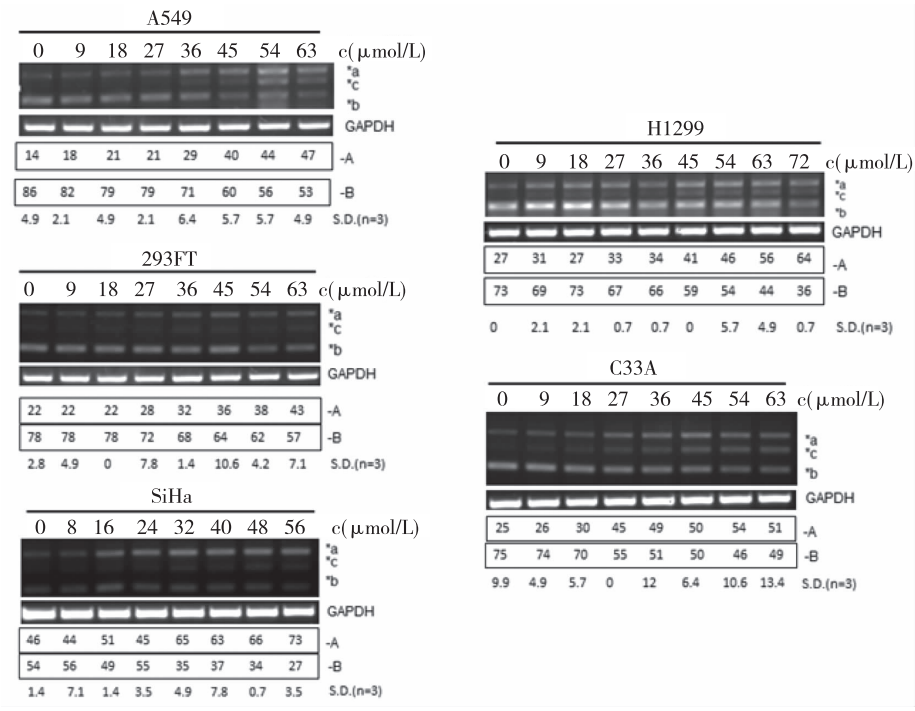
hTERT 是端粒酶功能的限速酶,端粒酶的活性是由 *hTERT* 在转录水平调控的,*hTERT* 的转录存在着选择性剪接的现象。已有研究表明,过表达 $\alpha + \beta +$ 异构体和 $\alpha + \beta -$ 异构体都有保护细胞在顺铂处理情况抗凋亡的作用,因 $\alpha + \beta -$ 异构体 RT 功能结构域的缺失,导致其没有端粒酶活性^[6]。本文研究结果显示, $\alpha + \beta -$ 异构体在顺铂处理时,随着顺铂浓度增加而所占比例逐渐增高,可能原因是在顺铂造成 DNA 损伤时,细胞生长分裂受抑制,高表达的 $\alpha + \beta -$ 转录水平导致端粒酶处于低活性状态,有利于细胞阻滞于 G2 期检查点进行 DNA



注：* a 表示 $\alpha + \beta +$ 异构体，* b 表示 $\alpha - \beta +$ 异构体，* c 表示 $\alpha + \beta -$ 异构体；- A 表示 $\alpha + \beta +$ 异构体剪接百分比；- B 表示 $\alpha + \beta -$ 异构体剪接百分比；c 表示顺铂浓度

图 2 肿瘤细胞中 *hTERT* $\alpha + \beta$ - mRNA 异构体的变化

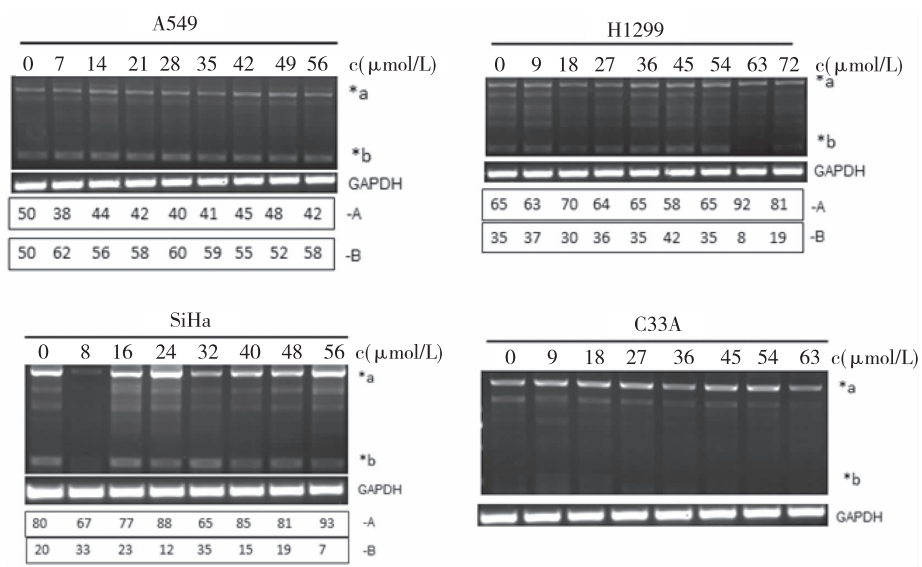
Fig. 2 Change of alternative splicing of *hTERT* $\alpha + \beta$ - mRNA in tumour cells after treatment with different dose of cisplatin



注：* a 表示 $\alpha + \beta +$ 异构体，* b 表示 $\alpha - \beta +$ 异构体，* c 表示 $\alpha + \beta -$ 异构体；- A 表示 $\alpha + \beta +$ 异构体剪接百分比；- B 表示 $\alpha + \beta -$ 异构体剪接百分比；c 表示顺铂浓度

图 3 肿瘤细胞中 *hTERT* INS3 mRNA 异构体的变化

Fig. 3 Change of alternative splicing of *hTERT* INS3 mRNA in tumour cells after treatment with different dose of cisplatin



注: *a 表示 $\alpha + \beta +$ 异构体, *b 表示 $\alpha - \beta +$ 异构体, *c 表示 $\alpha + \beta -$ 异构体; -A 表示 $\alpha + \beta +$ 异构体剪接百分比; -B 表示 $\alpha + \beta -$ 异构体剪接百分比; c 表示顺铂浓度

图 4 肿瘤细胞中 *hTERT* DEL[e2] mRNA 异构体的变化

Fig. 4 Change of alternative splicing of *hTERT* DEL[e2] mRNA in tumor cells after treatment with different dose of cisplatin

损伤修复。此外, Shusen Zhu 等^[7] 人报道了 INS3 异构体可抑制端粒酶活性, 细胞生长变缓, 具有负调控功能。本实验结果显示 INS3 异构体随着顺铂浓度增加, 比例逐渐增加, 由此可以推测在顺铂处理作用下, INS3 异构体因 RT 结构域的不完整导致端粒酶活性逐渐降低, 但 INS3 异构体是否也具有抗凋亡作用还需进一步探究。hTERT DEL[e2] 在顺铂处理下, 无明显变化, 但目前 DEL[e2] 异构体与端粒酶活性的相关性还未曾报道, 是进一步需要研究的问题。几种剪接异构体的变化说明在应对顺铂引起的 DNA 损伤中, *hTERT* mRNA 剪接异构体的水平和比例的变化是引起端粒酶功能活性降低的一种调节方式。

近年来研究发现 NF- κ B 信号通路的激活与 hTERT 的表达和端粒酶活性有关。利用 NF- κ B 抑制剂姜黄素抑制神经母细胞瘤细胞的 NF- κ B 信号通路, 可以明显的抑制端粒酶活性, *hTERT* mRNA 和蛋白表达^[8]。Sykorova 等^[9] 实验进一步说明 NF- κ B 可以通过对 *hTERT* 启动子的增强调节而调节 hTERT 的表达。此外, DEL[e4-13] 异构体通过剪接调控能够在端粒酶阳性和阴性细胞中增强 Wnt 信号^[10], 但是在顺铂造成的 DNA 损伤情况下, $\alpha + \beta -$ 的活性是否与 Wnt 信号通路有关, NF- κ B 信号通路的激活与 hTERT 的表达和端粒酶活

性影响还未有人报道, 以上已证实的研究结果将为本试验进一步研究在顺铂造成细胞 DNA 损伤情况下, 探究引起 hTERT 剪接变化的信号通路奠定基础。

目前已报道在 DNA 损伤情况下, TERT 会从核内转位至线粒体, 在线粒体中的 TERT 能够降低线粒体中活性氧 ROS (reactive oxygen species) 水平, 减轻线粒体 DNA (mtDNA) 损伤, 通过增强线粒体功能从而提高细胞应对 DNA 损伤能力使细胞呈现抗凋亡的效应^[11], 且 $\alpha + \beta +$ 和 $\alpha + \beta -$ 异构体在顺铂处理下都具有抗凋亡的作用^[6], 过表达 $\alpha + \beta +$ 异构体可提高基因组稳定性和 DNA 修复^[12]。本实验结果显示随着顺铂浓度增加, $\alpha + \beta -$ 异构体比例增加, 文献已报道 $\alpha + \beta +$ 和 $\alpha + \beta -$ 异构体都能定位于线粒体, 推测 $\alpha + \beta -$ 与 $\alpha + \beta +$ 异构体可能具有帮助或协同 DNA 修复功能, 即在线粒体中通过增加顺铂诱导的 DNA 损伤修复从而对细胞进行凋亡保护, 但这一问题还需进一步证实。而对于 INS3 和 DEL[e2] 异构体在顺铂处理下, *hTERT* 是否会从核转移至线粒体, 能否减轻线粒体 DNA 损伤, 异构体的变化是否与凋亡耐受有关, 这些问题还未曾报道, 因此这些异构体是否能转移到线粒体中发挥相应的功能有待研究, 线粒体转移定位以及凋亡的变化将成为下一步探究目标。在顺铂处

理下异构体比例的变化可能是一种应对外界刺激细胞耐受相适应的现象,以适应细胞维持基因组稳定的生理功能需要。

4 参考文献

- [1] Blackburn EH. Telomere states and cell fates[J]. *Nature*, 2000(408):53-56.
- [2] Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, et al. The putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization[J]. *Cell*, 1997(90):785-795.
- [3] Saeboe-Larssen S, Fossberg E, Gaudernack G. Characterization of novel alternative splicing sites in human telomerase reverse transcriptase (hTERT): analysis of expression and mutual correlation in mRNA isoforms from normal and tumour tissues [J]. *BMC Molecular Biology*, 2006(7):26.
- [4] Wojtyla A, Gladych M, Rubis B. Human telomerase activity regulation [J]. *Molecular Biology Reports*, 2011(38):3339-3349.
- [5] Albert H, Battaglia E, Monteiro CD, et al. Genotoxic stress modulates CDC25C phosphatase alternative splicing in human breast cancer cell lines[J]. *Molecular Oncology*, 2012(6):542-552.
- [6] Listerman I, Sun J, Gazzaniga FS, et al. The major reverse transcriptase-incompetent splice variant of the human telomerase protein inhibits telomerase activity but protects from apoptosis [J]. *Cancer Research*, 2013(73):2817-2828.
- [7] Zhu S, Rousseau P, Lauzon C, et al. Inactive C-terminal telomerase reverse transcriptase insertion splicing variants are dominant-negative inhibitors of telomerase [J]. *Biochimie*, 2014(101):93-103.
- [8] Aravindan N, Veeraraghavan J, Madhusoodhanan R, et al. Curcumin regulates low-linear energy transfer gamma-radiation-induced NFkappaB-dependent telomerase activity in human neuroblastoma cells, *International journal of radiation oncology*[J]. *Biology Physics*, 2011(79):1206-1215.
- [9] Sykora E, Fajkus J. Structure-function relationships in telomerase genes[J]. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 2009(101):375-392, 371,392.
- [10] Hrdlickova R, Nehyba J, Bose HR, et al. Alternatively spliced telomerase reverse transcriptase variants lacking telomerase activity stimulate cell proliferation[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2012(32):4283-4296.
- [11] Singhapol C, Pal D, Czapiewski R, et al. Mitochondrial telomerase protects cancer cells from nuclear DNA damage and apoptosis[J]. *PLoS One*, 2013(8):e52989.
- [12] Sharma GG, Gupta A, Wang H, et al. hTERT associates with human telomeres and enhances genomic stability and DNA repair[J]. *Oncogene*, 2003(22):131-146.

(2016-07-20 收稿,2016-10-12 修回)
中文编辑: 文箫颖; 英文编辑: 赵毅

(上接第 1278 页)

15 g/kg,根据急性毒性剂量分级标准,梨麦消食咀嚼片属无毒级;Ames 试验、小鼠精子畸形试验、小鼠骨髓微核试验结果均为阴性;30 d 喂养试验显示大鼠体质量、总食物利用率、血液学指标、血液生化指标、脏器比以及肝、脾、肾、睾丸和卵巢的病理组织学检查均未见明显改变。综上所述,在本研究剂量范围内梨麦消食咀嚼片毒理学是安全的,可对该产品进一步的开发。

4 参考文献

- [1] 全甲钊,曲波,王蓓蓓,等. 功能性消化不良的发病机制[J]. *世界华人消化杂志*, 2013(9):785-790.
- [2] 吴柏瑶,张法灿,梁列新. 功能性消化不良的流行病学[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2013(1):85-90.
- [3] 安丽,曹国强,张照兰. 张照兰教授治疗功能性消化不良临床经验[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011(24):278-280.
- [4] 冷本家. 中医经验方加减治疗功能性消化不良的临床疗效[J]. *中国社区医师*, 2015(26):75.
- [5] 柳秀真. 中医对脾胃气虚型功能性消化不良疗效观察[J]. *中西医结合心血管病杂志*, 2015(15):117-118.
- [6] 陈苏宁,史业东,马丽. 中医为主要措施治疗功能性消化不良复发率的 Meta 分析[J]. *世界华人消化杂志*, 2010(27):2938-2941.
- [7] 许雷鸣,胡燕平,武谷,等. 现行药物、保健食品和化妆品 Ames 试验方法的比较分析[J]. *安徽医药*, 2013(9):1595-1597.
- [8] 卫生部卫生法制与监督司. 保健食品检验与评价技术规范(2003 版)[S]. 北京:人民卫生出版社,2003.

(2016-08-01 收稿,2016-10-22 修回)
中文编辑: 周凌; 英文编辑: 赵毅