

肿瘤诊断技术与基因治疗

DOI:10.11699/cyxh20130516

探讨端粒酶在沙利度胺诱导 U266 细胞增殖抑制及凋亡中的意义

吕敬龙¹, 肖青¹, 刘欣¹, 王利¹, 王欣¹, 杨泽松¹, 张红宾¹, 董浦江²
(重庆医科大学 1. 附属第一医院血液科; 2. 神经病学国家重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨端粒酶活性及人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)mRNA 的变化在监测沙利度胺诱导多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)U266 细胞增殖抑制、凋亡中的意义。**方法:**CCK-8 法测定沙利度胺对 U266 细胞增殖抑制作用;流式细胞仪检测 U266 细胞凋亡率;端粒重复序列扩增酶联免疫吸附实验(TRAP-ELISA)检测端粒酶活性;逆转录聚合酶链反应检测 hTERT mRNA 表达水平。**结果:**沙利度胺对 U266 细胞有增殖抑制和促凋亡作用,且均呈时间-浓度依赖性;10 $\mu\text{g/ml}$ 沙利度胺作用 24 h 和 48 h,端粒酶活性值分别为 (7.96 ± 0.09) 和 (7.65 ± 0.07) ,相比对照组均无明显变化($P=0.082\ 0$),hTERT mRNA 表达分别为 (2.82 ± 0.03) 和 (2.31 ± 0.04) ,与对照组相比表达均下降,差异有统计学意义($P=0.033\ 0$);50 $\mu\text{g/ml}$ 和 100 $\mu\text{g/ml}$ 沙利度胺作用 U266 细胞 24、48 h 及 72 h,端粒酶活性、hTERT mRNA 表达分别与对照组比较表达均下降,差异有统计学意义($P=0.002\ 8$)。**结论:**沙利度胺诱导 U266 细胞增殖抑制、凋亡与端粒酶有关;与端粒酶活性相比,hTERT mRNA 改变更灵敏,可作为沙利度胺治疗 MM 疗效判定指标之一。

【关键词】多发性骨髓瘤;端粒酶;凋亡;增殖抑制;沙利度胺

【中国图书分类法分类号】R733.31

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-08-24

Role of telomerase on proliferation and apoptosis of U266 cells induced by thalidomide

LV Jinglong¹, XIAO Qing¹, LIU Xin¹, WANG Li¹, WANG Xin¹, YANG Zesong¹,
ZHANG Hongbin¹, DONG Pujiang²

(1. Department of Hematology, the First Affiliated Hospital; 2. State Key Laboratory of Neurogenetics, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate significances of variation of telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in monitoring the inhibition of multiple myeloma (MM) U266 cell proliferation and apoptosis as a result of thalidomide. **Methods:** Inhibition of thalidomide on cell proliferation was determined by CCK-8 assay. Percentage of U266 cell apoptosis was measured by flow cytometry. Telomerase activity of U266 cells was performed by TRAP-ELISA. RT-PCR was used to detect the expressions of hTERT mRNA. **Results:** Thalidomide inhibited the growth of U266 cells and induced cells apoptosis in a time-dose dependent manner. Cells were treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ thalidomide for 24 h and 48 h; telomerase activities of U266 cells were respectively 7.96 ± 0.09 and 7.65 ± 0.07 , showing no significant difference compared with those in control group ($P=0.082\ 0$). Expressions of hTERT mRNA were 2.82 ± 0.03 and 2.31 ± 0.04 respectively, significantly different from those in control group ($P=0.033\ 0$). Telomerase activities and hTERT mRNA expressions of 50 $\mu\text{g/ml}$ and 100 $\mu\text{g/ml}$ groups were significantly different from those in control group ($P=0.002\ 8$). **Conclusions:** Thalidomide can inhibit U266 cell proliferation and induce its apoptosis, the mechanism of which is related with telomerase. Change is more sensitive in hTERT mRNA expression than in telomerase activity and it is an effective index when treating MM with thalidomide.

【Key words】 multiple myeloma; telomerase; apoptosis; proliferation and inhibition; thalidomide

作者介绍: 吕敬龙, Email: 13608388377@163.com,

研究方向: 血液系统疾病多发性骨髓瘤。

通信作者: 肖青, Email: 13220327680@163.com。

在多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)抗血管生成治疗药物中,沙利度胺及其衍生物近年来已得到广泛应用;但其对部分初发、难治及复发患者仍无疗效^[1-2]。目前,MM 疗效评估多在一个或几个治疗疗程后进行,因此,对于沙利度胺无效的患者接受过度治疗则难以避免。由此可见,寻求在短期内能判定沙利度胺疗效的监测指标对临床治疗 MM 患者有着极其重要的意义。

端粒酶作为一种核糖蛋白复合体,具有将端粒重复序列整合到染色体末端以保持肿瘤细胞持续增殖的能力。近年来研究结果表明^[3],端粒酶活性及人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)mRNA 表达水平与化疗药物诱导肿瘤细胞凋亡、抑制增殖及多药耐药有着密切联系。目前,有关端粒酶在沙利度胺诱导 MM U266 细胞凋亡、抑制增殖中作用的研究尚未见报道。本研究用不同浓度的沙利度胺作用 U266 细胞,分别在 24、48 h 及 72 h 检测端粒酶活性和 hTERT mRNA 表达水平,以揭示端粒酶在监测沙利度胺治疗 MM 中的意义。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

MM 细胞系 U266(北京肿瘤医院细胞库),小牛血清(杭州四季青),沙利度胺(常州制药),CCK-8(七海生物),Annexin V-FITC(凯基生物),端粒酶活性检测试剂盒(武汉优尔生),引物由大连宝生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8 法检测沙利度胺对 U266 细胞增殖抑制情况 取对数生长期细胞,以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中,每孔 200 μ l。实验设沙利度胺组、对照组和调零组。沙利度胺组加入沙利度胺 20 μ l,使其终浓度分别为 10、50 μ g/ml 及 100 μ g/ml;对照组加入与沙利度胺组等体积细胞培养液,调零组加入与沙利度胺组等体积的 PBS;每组设 5 个复孔。放置 37 $^{\circ}$ C 孵育箱中常规孵育,分别于 24、48 h 及 72 h 取样,每孔加入 CCK-8 20 μ l,继续孵育 2 h 后上酶标仪检测吸光度(absorbance, A)值(570 nm 处)。细胞增殖抑制率%=[1-(A 给药组-A 空白组)/(A 阴性对照组-A 空白组)] $\times 100\%$,实验重复 3 次。

1.2.2 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡 取对数生长期细胞,按 2×10^5 个/ml 接种 24 孔板,对照组常规培养,沙利度胺组加入沙利度胺 20 μ l,使其终浓度分别为 10、50 μ g/ml 及 100 μ g/ml,37 $^{\circ}$ C 继续孵育,分别在 24、48 h 及 72 h 收集细胞, PBS 洗涤 2 次,依次加入 500 μ l binding buffer、5 μ l Annexin V-FITC 及 5 μ l PI 溶液,流式细胞仪检测细胞凋亡率(实验

重复 3 次)。

1.2.3 端粒重复序列扩增酶联免疫吸附试验(TRAR-ELISA)检测端粒酶活性

1.2.3.1 PCR 扩增 收集各实验组细胞,用冷 PBS 洗涤 2 次,加入冰冷裂解缓冲液 40 μ l,4 $^{\circ}$ C 高速离心后收集上清,按试剂盒说明进行 PCR 扩增实验。

1.2.3.2 将 PCR 产物行 ELISA 检测 分别取阴性、阳性及待测样本各 2.5 μ l,加入变性剂 10 μ l,静置 10 min 后加入杂交缓冲液 100 μ l,吹打均匀,取 100 μ l 混合液至亲和素包被的微孔板中,37 $^{\circ}$ C 中孵育 2 h。洗涤 3 次后加入抗体 100 μ l,静置 30 min,依次加入四甲基联苯胺显色液及终止液。酶标仪检测各孔在 450 nm 和 690 nm 处的 A 值,依据公式: $A=A_{450\text{nm}}-A_{690\text{nm}}$ 计算端粒酶活性。

1.2.4 逆转录聚合酶链反应检测端粒酶 hTERT mRNA 水平 hTERT mRNA 扩增引物序列:上游 5'-GTCATCGCCAGCAT-CATC-3',下游 5'-TGGAGGTC-TGTCAAGGTAG-3'。 β -actin 作为内参照:上游 5'-GCATTGGAGCAGAGGTTTAC-3',下游 5'-AGGTCAGCGATGAAGGTATC-3'。收集各实验组细胞,用 TRIzol 提取液提取细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA。PCR 扩增条件:95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s,共进行 38 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存。2%琼脂糖凝胶上进行电泳(实验重复 3 次)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行分析。数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。实验结果各参数采用重复测量方差分析;Spearman 进行相关分析。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 沙利度胺对 U266 细胞的增殖抑制作用

10、50 μ g/ml 及 100 μ g/ml 沙利度胺分别作用 U266 细胞 24、48 h 及 72 h,发现其对 U266 细胞增殖抑制作用呈时间-剂量效应关系,结果见图 1。

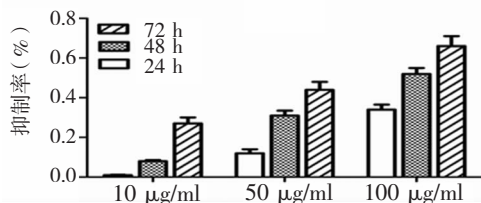


图 1 沙利度胺对 U266 细胞增殖抑制情况

Fig.1 Effects of thalidomide on inhibitory rate of U266 cells

2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡率情况

10、50 μ g/ml 及 100 μ g/ml 沙利度胺分别作用 U266 细胞 24、48 h 及 72 h 后,各实验组细胞均有凋亡现象,并且呈时间-浓度依赖性。结果如表 1 所示,不同浓度沙利度胺组凋

亡率表达均增加,与对照组比较,差异均有统计学意义($P=0.001\ 5$)。各时间组间比较, $F=818.09,P=0.001\ 5$;不同浓度沙利度胺组间比较, $F=1\ 839.61,P=0.000\ 0$ 。

表 1 沙利度胺对 U266 细胞凋亡率的影响 (% , $\bar{x} \pm s$)
Tab.1 Effects of thalidomide on apoptosis of U266 cells (% , $\bar{x} \pm s$)

实验分组	作用时间 (h)		
	24	48	72
对照组	1.74 ± 0.16	2.57 ± 0.23	3.24 ± 0.14
10 μg/ml 沙利度胺	6.88 ± 0.43 ^a	17.07 ± 1.22 ^a	25.07 ± 1.54 ^a
50 μg/ml 沙利度胺	22.29 ± 1.82 ^a	32.04 ± 1.74 ^a	46.11 ± 2.18 ^a
100 μg/ml 沙利度胺	39.23 ± 1.74 ^a	55.14 ± 2.34 ^a	64.57 ± 1.80 ^a

注:a,与对照组相比, $P=0.001\ 5$

2.3 沙利度胺对 U266 细胞端粒酶活性的影响

对 10、50 μg/ml 及 100 μg/ml 沙利度胺作用 24、48 h 及 72 h 后 U266 细胞中端粒酶活性进行测定,发现 10 μg/ml 沙利度胺作用 24 h 和 48 h,端粒酶活性相比对照组无统计学差异($P=0.082\ 0$),而 72 h 时端粒酶活性降低,相比对照组有统计学意义($P=0.001\ 9$)。50 μg/ml 和 100 μg/ml 沙利度胺作用 U266 细胞 24、48 h 及 72 h 后,端粒酶活性均降低,相比对照组亦有统计学差异($P=0.002\ 8$)。结果如表 2 所示,50 μg/ml 和 100 μg/ml 浓度沙利度胺组端粒酶活性均下调,与对照组比较,差异均有统计学意义($F=6\ 444.78,P=0.000\ 0$);各时间组间比较,差异有统计学意义($F=448.72,P=0.000\ 6$)。

表 2 沙利度胺对 U266 细胞端粒酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.2 Effects of thalidomide on telomerase activity of U266 cells ($\bar{x} \pm s$)

实验分组	作用时间 (h)		
	24	48	72
对照组	8.16 ± 0.10	8.02 ± 0.09	8.16 ± 0.06
10 μg/ml 沙利度胺	7.96 ± 0.09 ^a	7.81 ± 0.10 ^a	6.56 ± 0.15 ^b
50 μg/ml 沙利度胺	5.85 ± 0.12 ^b	5.02 ± 0.10 ^b	4.11 ± 0.14 ^b
100 μg/ml 沙利度胺	4.35 ± 0.11 ^b	3.35 ± 0.07 ^b	2.76 ± 0.04 ^b

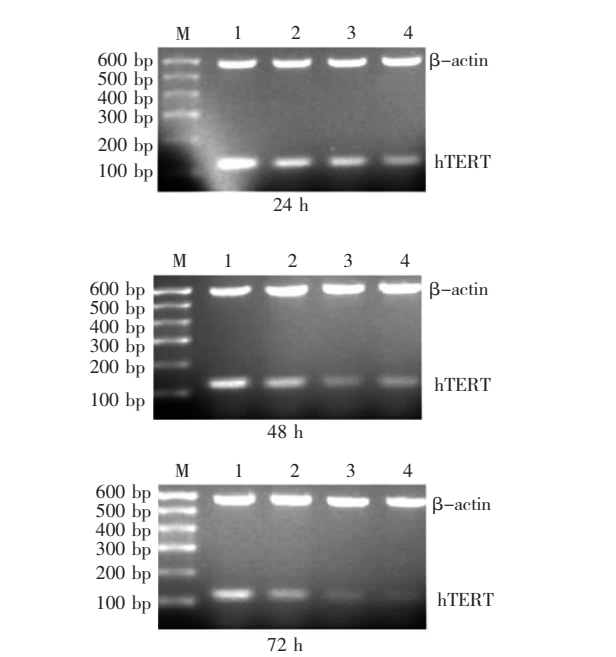
注:与对照组相比,a, $P=0.082\ 0$,b, $P=0.002\ 8$

2.4 沙利度胺对 U266 细胞 hTERT mRNA 的影响

分别在 24、48 h 及 72 h 检测经 10、50 μg/ml 及 100 μg/ml 沙利度胺处理的 U266 细胞中 hTERT mRNA 表达水平,结果显示对照组细胞 hTERT mRNA 表达无改变,不同浓度沙利度胺组细胞 hTERT mRNA 表达均下调,且随时间延长及浓度升高而降低。结果如图 2、表 3 所示,不同浓度沙利度胺组 hTERT mRNA 表达均下调,与对照组比较,差异均有统计学意义($P=0.000\ 0$)。各时间组间比较,差异有统计学意义($F=252.92,P=0.002\ 7$);不同浓度沙利度胺组间比较,差异有统计学意义($F=4\ 353.11,P=0.000\ 0$)。

2.5 细胞增殖抑制率、凋亡率与 hTERT mRNA 及端粒酶活性的关系

对细胞增殖抑制率、凋亡率与 hTERT mRNA、端粒酶活性变化进行相关性分析,结果见表 4。



M. Marker; 1. 对照组; 2. 10 μg/ml 沙利度胺处理组; 3. 50 μg/ml 沙利度胺处理组; 4. 100 μg/ml 沙利度胺处理组

图 2 10、50 μg/ml 及 100 μg/ml 沙利度胺分别作用 U266 细胞 24、48 h 及 72 h 时 hTERT mRNA 表达情况
Fig.2 Expressions of hTERT mRNA after U266 cells being treated with 10, 50 μg/ml and 100 μg/ml thalidomide for 24, 48 h and 72 h

表 3 沙利度胺对 U266 细胞 hTERT mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.3 Effects of thalidomide on hTERT mRNA of U266 cells ($\bar{x} \pm s$)

实验分组	作用时间 (h)		
	24	48	72
对照组	3.22 ± 0.05	3.17 ± 0.04	3.2 ± 0.08
10 μg/ml 沙利度胺	2.82 ± 0.03 ^a	2.31 ± 0.04 ^a	1.96 ± 0.06 ^a
50 μg/ml 沙利度胺	2.15 ± 0.07 ^a	1.67 ± 0.05 ^a	1.51 ± 0.05 ^a
100 μg/ml 沙利度胺	1.23 ± 0.04 ^a	1.17 ± 0.03 ^a	1.02 ± 0.04 ^a

注:a,与对照组相比, $P=0.000\ 0$

表 4 细胞增殖抑制率、凋亡率与 hTERT mRNA、端粒酶活性相关性分析
Tab.4 Correlation between inhibitory, apoptosis rate and hTERT mRNA, telomerase activity

变量		相关系数 (r_s)	P 值
增殖抑制率	hTERT mRNA ^a	-0.930	0.000
	端粒酶活性 ^b	-0.944	0.000
凋亡率	hTERT mRNA ^c	-0.970	0.000
	端粒酶活性 ^d	-0.974	0.000
端粒酶活性	hTERT mRNA ^e	0.965	0.000

注:a,hTERT mRNA 与增殖抑制率相关性分析;b,端粒酶活性与增殖抑制率相关性分析;c,hTERT mRNA 与细胞凋亡率相关性分析;d,端粒酶活性与细胞凋亡率相关性分析;e,hTERT mRNA 与端粒酶活性相关性分析

3 讨论

沙利度胺又称酞胺哌啶酮,其作用机制主要为抗血管生成、抑制骨髓瘤细胞黏附于骨髓基质细胞以及诱导骨髓瘤细胞凋亡。1999 年 Singhal 等^[4]首次报道沙利度胺治疗 84 例难治性 MM 病人,获得完全缓解率 10%,总有效率 32%,自此开始应用于 MM 的治疗。目前,MM 疗效评估多在 1 个或几个治疗疗程后进行,对于沙利度胺无效的患者很容易造成过度治疗。因此,寻求一种短期内能反应沙利度胺疗效的监测指标十分必要。

端粒酶是一种特殊 RNA 依赖性 DNA 聚合酶,具有维持细胞永生性功能^[5]。化疗作为治疗肿瘤的主要手段之一,主要通过抑制细胞增殖、诱导凋亡来实现抗肿瘤作用。近年来研究发现,端粒酶对肿瘤细胞 DNA 的保护作用可以抵抗由化疗药物引起的肿瘤细胞凋亡,从而导致化疗药物疗效减弱、耐药及失效^[6-7]。由此可见,监测端粒酶在化疗药物诱导肿瘤细胞凋亡及增殖抑制中的变化对判定化疗药物疗效有着极其重要的意义。本实验在沙利度胺诱导 MM U266 细胞凋亡及抑制增殖时,对 hTERT mRNA 及端粒酶活性进行检测。

hTERT 作为端粒酶活性的调节因子,与端粒酶活性关系密切。研究资料显示^[8-9],下调 hTERT mRNA 表达,端粒酶活性明显降低,使得端粒无法及时修补而缩短,从而促使染色体不稳定以致细胞凋亡。另外,通过检测肿瘤脱落细胞、血液及患者分泌物等临床标本,发现端粒酶活性及 hTERT mRNA 对肿瘤治疗疗效及预后的判断很有意义^[10-11]。因此,深入研究端粒酶在肿瘤发生发展中的机理十分必要。本研究从端粒酶活性、hTERT mRNA 二方面对沙利度胺诱导 MM U266 细胞增殖抑制、凋亡进行探讨。结果显示,沙利度胺对 U266 细胞凋亡及增殖抑制作用均呈时间-浓度依赖性。10、50 $\mu\text{g/ml}$ 及 100 $\mu\text{g/ml}$ 沙利度胺作用 24、48 h 及 72 h 后,hTERT mRNA 表达呈时间-剂量效应关系。10 $\mu\text{g/ml}$ 沙利度胺作用 24 h 和 48 h,端粒酶活性未见明显改变,而 72 h 可见端粒酶活性降低;50 $\mu\text{g/ml}$ 和 100 $\mu\text{g/ml}$ 沙利度胺作用 U266 细胞 24、48 h 及 72 h 后,端粒酶活性均降低。以上结果提示 hTERT mRNA 改变相比端粒酶活性变化更敏感,可作为沙利度胺治疗 MM 疗效监测指标。同时,对 U266 细胞的增殖抑制率、凋亡率与 hTERT mRNA 及端粒酶活性进行相关性分析,

显示沙利度胺诱导的细胞增殖抑制及凋亡率变化与 hTERT mRNA 及端粒酶活性改变成负相关。

综上所述,沙利度胺诱导 U266 细胞凋亡、增殖抑制,可能与其下调 hTERT mRNA 转录水平、抑制端粒酶活性有关;但其对 hTERT mRNA 转录水平、端粒酶蛋白的翻译或修饰水平的具体作用靶点,尚待进一步研究。

参考文献

- [1] Prince H M, Schenkel B, Mileskin L. An analysis of clinical trials assessing the efficacy and safety of single-agent thalidomide in patients with relapsed or refractory multiple myeloma[J]. *Leuk Lymphoma*, 2007, 48(1): 46-55.
- [2] Reske T, Fulciniti M, Munshi N C. Mechanism of action of immunomodulatory agents in multiple myeloma[J]. *Med Oncol*, 2010, 27(s1): 7-13.
- [3] Zvereva M I, Shcherbakova D M, Dontsova O A. Telomerase: structure, functions, and activity regulation[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2010, 75(13): 1563-1583.
- [4] Singhal S, Mehta J, Desikan R, et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma[J]. *N Engl J Med*, 1999, 341(21): 1565-1571.
- [5] Gillis A J, Schuller A P, Skordalakes E. Structure of the *Tribolium castaneum* telomerase catalytic subunit TERT[J]. *Nature*, 2008, 455(7213): 633-637.
- [6] Deeb D, Gao X, Liu Y, et al. Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by oleanane triterpenoid (CDDO-Me) in pancreatic cancer cells is associated with the suppression of hTERT gene expression and its telomerase activity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 422(4): 561-567.
- [7] Liu X D, Fan R F, Zhang Y, et al. Down-regulation of telomerase activity and activation of caspase-3 are responsible for tanshinone I-induced apoptosis in monocyte leukemia cells in vitro[J]. *Int J Mol Sci*, 2010, 11(6): 2267-2280.
- [8] Liu F J, Barchowsky A, Oprea P L. The Werner syndrome protein suppresses telomeric instability caused by chromium(VI) induced DNA replication stress[J]. *PLoS One*, 2010, 5(6): e11152.
- [9] Doerfler L, Harris L, Viebranz E, et al. Differential genetic interactions between Sgs1, DNA-damage checkpoint components and DNA repair factors in the maintenance of chromosome stability[J]. *Genome Integr*, 2011, 2: 8.
- [10] Bahnassy A A, Fawzy M, El-Wakil M, et al. Telomerase expression as complementary prognostic factor in neuroblastoma[J]. *J Egypt Natl Canc Inst*, 2010, 22(4): 191-200.
- [11] 柳笋, 陈公琰, 王 萌, 等. 长春瑞滨对人肺腺癌 Anip973 细胞凋亡和端粒酶表达的影[J]. *中华肿瘤杂志*, 2010, 32(10): 743-747.
- [12] Liu J J, Chen G Y, Wang M, et al. Effects of vinorelbine on apoptosis and expression of telomerase activity in human lung adenocarcinoma cells in vitro[J]. *Chin J Oncol*, 2010, 32(10): 743-747.

(责任编辑: 关蕴良)