

端粒酶逆转录酶反义寡核苷酸对视网膜色素上皮细胞增殖的抑制作用

朱宝义,王为农,潘小凤

摘要 目的 研究视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞中端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)表达及其反义寡核苷酸(antisense oligonucleotides ASODN)对其表达和细胞增生的抑制作用,为增生性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy, PVR)治疗探索基因治疗新途径。方法 体外培养兔眼 RPE 细胞,在不同时间采用链霉亲和素-生物素化过氧化物酶复合物(streptoavidin-biotin-enzyme complex, SABC)免疫组织化学法检测 TERT 的表达;不同浓度的 TERT ASODN 和正义寡核苷酸(sense oligodeoxynucleotides SODN)分别作用于体外培养的 RPE 细胞,采用免疫组织化学方法检测 TERT 的表达;四唑盐比色法(MTT)检测在不同浓度的 TERT ASODN 和 SODN 作用下 RPE 细胞生长活性及其生长抑制率。结果 体外培养兔眼 RPE 细胞可表达 TERT,在 5,10 μ mol/L ASODN 作用下,TERT 的表达明显受抑制,TERT ASODN 能明显抑制 RPE 细胞增生活性,并呈剂量依赖性。结论 TERT ASODN 能序列特异性地抑制 RPE 细胞 TERT 表达和增生活性。**关键词** 视网膜色素上皮;反义寡核苷酸类;端粒酶逆转录酶

Antisense oligonucleotides of TERT inhibit proliferation of RPE cells Bao-Yi Zhu, Wei-Nong Wang, Xiao-Feng Pan. Tangdu hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China

Abstract **Aim** To investigate telomerase reverse transcriptase (TERT) gene expression in retinal pigment epithelium (RPE) cells and inhibition of antisense oligonucleotides (ASODN) encoding TERT mRNA to gene expression and proliferation of RPE cells, so as to search for new genetic therapeutic methods for proliferative vitreoretinopathy (PVR). **Methods** Rabbit RPE cells cultured *in vitro* were detected for TERT expression by streptoavidin-biotin-enzyme complex (SABC) immunohistochemistry at different times. The ASODN and sense oligodeoxynucleotide (SODN) encoding TERT were delivered to the RPE cells at different concentrations, then TERT expression were detected by immunohistochemistry. Exposed to different concentrations of ASODN and SODN, growth activity and suppressive rate of RPE cells were measured by MTT methods. **Results** TERT expression were remarkably suppressed in the RPE cells treated with 5 and 10 μ mol/L TERT ASODN. TERT ASODN significantly inhibited proliferative activity of RPE cells in a dose dependent manner. **Conclusion** ASODN complementary to TERT mRNA can sequence-specifically suppress TERT expression in RPE cells and cellular proliferative activity.

Keywords retinal pigment epithelium (RPE); antisense oligonucleotides (ASODN); telomerase reverse transcriptase (TERT)

增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 是一种难治性致盲眼病, 主要与视网膜色素上皮 (RPE) 细胞的病理性增生有关。目前常用的玻璃体手术治疗无法从细胞水平彻底清除病变组织且难以防止手术后再增生; 一般的抗增生药物如 5-氟尿嘧啶、阿霉素等由于对生物组织毒性大、选择性差难以应用。端粒 (telomere) 可完成染色体末端的复制, 防止染色体免遭融合、重组和降解。端粒酶 (telomerase) 能以自身的 RNA 组分为模板合成端粒 DNA 序列, 保持端粒的长度, 从而与细胞寿命和细胞增殖密切相关。端粒酶逆转录酶 (telomerase reverse transcriptase, TERT) 作为端粒酶蛋白主要组分, 被称为端粒酶活性作用

作者单位: (710033) 中国西安第四军医大学唐都医院眼科

的限速因子^[1]。端粒酶通常在除永生细胞系外的正常组织无活性表达, 而 TERT 则可在正常组织中表达^[2]。鉴于 TERT 在细胞增生过程中的重要作用, 我们利用反义核酸治疗技术, 通过封闭 TERT 基因表达而抑制 RPE 细胞增生, 为防治 PVR 探索基因治疗的新途径。

1 材料和方法

1.1 材料 摘取健康灰色家兔眼球, 按常规酶消化法眼杯内收获 RPE 细胞, 加入含 200mL/L 新生牛血清的改良 Eagle 培养液 (Dublecco's modified Eagle medium, DMEM), 吹打制成细胞悬液; 最后以细胞密度 5×10^7 /mL 接种于培养瓶中, 置 37 $^{\circ}$ C、饱和湿度、50mL/L CO₂ 的培养箱中培养和传代。取第 3 代的培养细胞, 用博士德公司试剂盒作角蛋白免疫

组织化学检测。

1.2 方法

1.2.1 RPE 细胞 TERT 免疫化学检测 取第 5 代的 RPE 细胞,以细胞数为 $5 \times 10^7/L$ 的密度接种于置有玻片的 24 孔板($500 \mu L/$ 孔)。 $37^\circ C$ $50 mL/L$ CO_2 条件下,在含 $200 mL/L$ 新生牛血清的培养液培养 24、48、72h 后,取出长有细胞的玻片用 SABC 法作 TERT 免疫组织化学检测:一抗为 TERT 小鼠抗人(兔、鼠)单克隆抗体(Boster 产品),滴度 1:100,二抗为羊抗鼠生物素化二抗(1:100)。

1.2.2 ODN 作用下 RPE 细胞 TERT 表达 寡核苷酸(oligodeoxyribonucleotide,ODN)备用原液的制备采用与以 TERT mRNA 翻译起始密码子为起点的一段序列,与该序列互补的为 ASODN,与该序列相同的为 SODN,序列分别为: 5'- GAG CGC GGG TCA TTG TGCT-3' (ASODN) 5'- AGC ACA ATG ACCCGCGCTC-3' (SODN)。由上海百沃斯生物公司采用 DNA 生物合成仪合成,全硫代修饰,聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化后冻干粉保存。临用前再加入 DMEM 液,稀释成 2.5、5 和 $10 \mu mol/L$ 使用。取第 5 代的 RPE 细胞,以细胞数 $5 \times 10^4/mL$ 密度接种于置有玻片的 24 孔板($500 \mu L/$ 孔),常规培养 24h 后,吸弃含血清培养液,每孔分别加入 $500 \mu L$ 的含有上述 3 种浓度的 ASODN 和 SODN 的 DMEM 液,及无 ODN 混合液的空白对照 DMEM 液。在 $37^\circ C$ 、 $50 mL/L$ CO_2 条件下孵育 12h 后加入含 $200 mL/L$ 新生牛血清的培养液 $500 \mu L/$ 孔,继续培养 12h,取出长有细胞的玻片按前述 SABC 法作 TERT 免疫组织化学检测。结果采用盲法计数,细胞核内呈棕黄染色为阳性标志。每张培养玻片随机选取四周及中央视野,在显微镜下计数阳性细胞率,其平均值即代表 TERT 阳性表达率。各实验组分别与空白对照组比较,采用方差分析行统计学处理。

1.2.3 RPE 细胞活性检测 MTT 试验进行 RPE 细胞的活性检测。取第 5 代 RPE 细胞,以细胞数为 $1 \times 10^8/L$ 密度的细胞悬液接种 96 孔板, $100 \mu L/$ 孔。常规培养 24h 后换以含上述 3 种浓度(每一浓度 6 个平行孔)的 ASODN 和 SODN 混合液 DMEM 液, $100 \mu L/$ 孔,分别作为反义组和正义对照组,并各设空白对照。在 $37^\circ C$ $50 mL/L$ CO_2 条件下孵育 12h 后,每孔加入含 $200 mL/L$ 新生牛血清的培养

液 $100 \mu L$ 继续培养 12h,然后每孔吸出上清液 $100 \mu L$ 再加 $5 g/L$ MTT $20 \mu L$,继续培养 4h 后,弃去上清液,加入二甲亚砜 $150 \mu L$,振摇 15min,于酶标仪 550nm 波长下测吸光度(A)。A 值用($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析行统计学处理。

2 结果

2.1 RPE 细胞免疫组织化学鉴定 原代培养的兔 RPE 细胞多呈扁型或多角形,细胞质内富含棕褐色颗粒,传代后色素颗粒消失,细胞形态转为梭形。角蛋白阳性细胞细胞质呈棕黄色着色,阳性率几乎达 100%。

2.2 ASODN 对 RPE 细胞 TERT 表达的抑制 TERT 免疫组织化学检测显示阳性表达细胞核呈斑块状或点状染色,其中部分染色较淡呈弱阳性表达(图 1)。免疫组织化学检测显示 5、 $10 \mu mol/L$ 的 ASODN 对 TERT 的表达有明显的抑制作用,其表达阳性率分别为 $(27 \pm 6)\%$ 、 $(24 \pm 6)\%$,而空白对照组 TERT 的表达阳性率为 $(38 \pm 5)\%$,与该对照组比较 $P < 0.01$,有显著统计学意义。SODN 各浓度组作用下的阳性表达率与空白对照组相近($P > 0.05$,表 1)。

2.3 ASODN 对 RPE 细胞增生活性的抑制作用 ASODN 2.5、5 和 $10 \mu mol/L$ 浓度组与 $0 \mu mol/L$ 浓度组比较,细胞的 A 值有显著意义。这提示 ASODN 对 RPE 细胞的抑制作用可能具有剂量依赖性。SODN 组各浓度与 $0 \mu mol/L$ 浓度组比较,均无显著性的意义(表 2)。

表 1 ODN 作用下 RPE 细胞的 TERT 表达阳性率 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

分组	0 $\mu mol/L$	2.5 $\mu mol/L$	5 $\mu mol/L$	10 $\mu mol/L$
ASODN TERT	38 ± 5	35 ± 5^a	27 ± 6^b	24 ± 6^b
SODN TERT	38 ± 5	39 ± 6	39 ± 7	37 ± 6

^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$ vs $0 \mu mol/L$ 组

表 2 ODN 作用下 RPE 细胞的增殖率 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

分组	0 $\mu mol/L$	2.5 $\mu mol/L$	5 $\mu mol/L$	10 $\mu mol/L$
ASODN TERT	0.84 ± 0.13	0.77 ± 0.14^a	0.53 ± 0.07^b	0.49 ± 0.09^b
SODN TERT	0.84 ± 0.13	0.87 ± 0.12	0.82 ± 0.15	0.79 ± 0.09

^a $P < 0.05$ vs $0 \mu mol/L$ 组; ^b $P < 0.01$ vs 2.5 $\mu mol/L$ 组

3 讨论

PVR 主要表现为增生细胞在视网膜和玻璃体腔形成具有收缩能力的细胞性膜,RPE 细胞作为一类主要的细胞成分参与了这种病理性增生过程^[3,4],通过控制 RPE 细胞增生相关基因表达而抑制其反应性增生过程,有望防治 PVR。端粒酶是一种 RNA 依赖性的 DNA 聚合酶,主要由端粒酶 RNA 组分

(TR)、TERT 和端粒酶相关蛋白 (TEP1) 3 个亚单位组成。TR 是端粒 DNA 合成的模板,TEP1 功能尚未明确,TERT 是端粒酶的催化亚基,是决定端粒酶活性的限速因子。TERT 可在端粒酶活性阴性的细胞异位表达,从而使端粒酶活性重现,使细胞寿命延长。Oh 等^[5]报道 TERT 的过度表达可引起心肌细胞端粒酶活性显著增高,从而呈现增生、肥厚以及寿命延长,Minamino 等^[6]报道缺氧时大鼠肺血管平滑肌细胞端粒酶活性显著增高,细胞寿命延长,均提示 TERT 与细胞增殖密切相关。本实验证实,RPE 细胞可表达 TERT,其阳性表达率与细胞的增生活性呈正相关,提示 TERT 可能是 PVR 的发病机制之一。

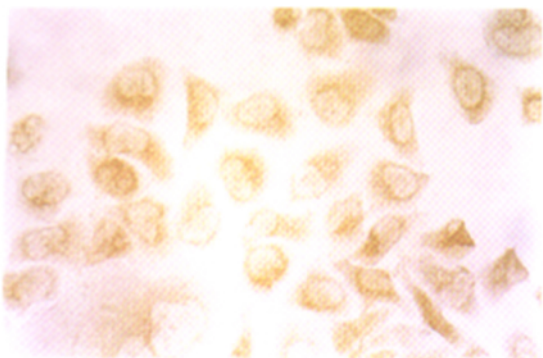


图 1 兔 RPE 细胞 TERT 的阳性表达 SABC×400

ASODN 特异性抑制基因表达的能力的主要作用机制之一是与翻译起始密码子结合,通过一种直接的空间效应阻断核糖体与 mRNA 结合及翻译起始。我们采用硫代修饰的 ASODN(S-ASODN),即核苷酸片段骨架磷上的羟基被巯基取代。S-A-ASODN 无论在胞核或胞质内与 RNA 结合,均可大量诱导激活核糖核酸酶 H,促进对 RNA 的降解;无论在细胞内外,S-ASODN 均具有很强的抗核酸酶活性^[7]。本实验结果显示,ASODN 可显著抑制 TERT 在 RPE 细胞中的表达,这证实了 ASODN 具有较好的效能,而 SODN 则对 TERT 表达没有明显作用。

反映细胞活性的 A 值也间接反映了细胞增生功能状态,我们在检测 TERT 表达同时采用 MTT 比色法检测了 ODN 对细胞增生的影响。统计学分析显示 ASODN 对 RPE 细胞的体外增生有不同程度的抑制,并呈浓度依赖性,而 SODN 作为 ASODN 的对照处理,则无显著性影响,从而显示出 A-SODN 序列特异性抑制基因表达及细胞增生的作用。同时,在不同浓度 ASODN 的作用下,TERT 的阳性表达率与 RPE 细胞的生长抑制有明显相关性,提示 TERT 可能是 RPE 细胞增生的机制之一。ASODN 对 TERT 的抑制作用则为临床上治疗 PVR 提供一条很好的思路,但其具体机制尚需进一步探讨。

参考文献

- 1 Cao Y, Li H, Mu FT, Ebisui O, Funder JW, Liu JP. Telomerase activation causes vascular smooth muscle cell proliferation in genetic hypertension. *FASEB J*, 2002;16(1):96-98
- 2 Kolquist KA, Ellisen LW, Counter CM, Meyerson M, Tan LK, Weinberg RA, Haber DA, Gerald WL. Expression of TERT in early premalignant lesions and subset of cells in normal tissues. *Nat Genet*, 1998;19:182-188
- 3 Jerdan JA, Pepose JS, Michels RG, Hayashi H, de Bustros S, Sebag M, Glaser BM. Proliferative vitreoretinopathy membranes: an immunohistochemical study. *Ophthalmology* 1989;96:801-810
- 4 Wu WC, Kao YH, Tseng HY. The cell cycle distribution of cultured human retinal pigmented epithelial cells under exposure of anti-proliferative drugs. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2003;19(1):83-90
- 5 Oh H, Taffet GE, Youker KA, Entman ML, Overbeek PA, Michael LH, Schneider MD. Telomerase reverse transcriptase promotes cardiac muscle cell proliferation, hypertrophy, and survival. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001;98(18):10308-10313
- 6 Minamino T, Mitsialis SA, Kourembanas S. Hypoxia extends the life span of vascular smooth muscle cells through telomerase activation. *Mol Cell Biol*, 2001;21(10):3336-3342
- 7 Jiang YA, Luo HS, Zhang YY, Fan LF, Jiang CQ, Chen WJ. Telomerase activity and cell apoptosis in colon cancer cell by human telomerase reverse transcriptase gene antisense oligodeoxynucleotide. *World J Gastroenterol*, 2003;9(9):1981-1984

(收稿日期:2003-10-17)