

靶向端粒酶逆转录酶 (hTERT) RNAi 载体的构建及活性评价*

夏云^{1,2)} 林汝仙¹⁾ 郑素军¹⁾ 张敏丽¹⁾ 王升启¹⁾**

(¹⁾军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850; ²⁾重庆医科大学第一附属医院检验科, 重庆 400016)

摘要 RNA 干涉是由与特定基因同源互补的双链 RNA, 在体内以序列特异的方式引发靶基因的 mRNA 降解, 从而导致转录后基因沉默的过程。为研究内源性的 siRNA 对靶基因的抑制效果, 用 pPUR/U6 载体构建用于细胞内转录靶向 hTERT 基因的短发夹状 siRNA 表达质粒, 并评价其对 hTERT 基因的抑制效果。将 hTERT cDNA 3 565 ~ 3 583 一段 19 bp 的 DNA 序列及其反向重复序列, 用 9 bp 的连接序列连接后再接上 5 个 T 碱基, 将此段 DNA 序列克隆至 pPUR/U6 载体 U6 启动子的下游, 形成能在体内合成 hTERT 特异性短发夹状 RNA 的重组质粒载体 pPUR/U6/hTERT。将 pPUR/U6/hTERT 与对照质粒 pPUR/U6 分别转染 HepG2 细胞。采用嘌呤霉素筛选和富集转染具有抗性的细胞。收集存活的细胞接种 12 孔板、提取 RNA 和蛋白质。以细胞计数法测定细胞的生长速度, RT-PCR 和蛋白质印迹分析 hTERT 基因的表达, 端粒重复放大测定法检测端粒酶活性, 蛋白质印迹检测 p53 蛋白水平。与转染对照质粒 pPUR/U6 的细胞相比, 转染 pPUR/U6/hTERT 的细胞其 hTERT 基因表达水平显著下降, 端粒酶活性降低, 细胞生长速度变慢, p53 蛋白表达明显升高。以上结果表明, 以 DNA 质粒为载体产生的内源性短发夹状 siRNA 能高效抑制 hTERT 基因的表达, 有望成为基因功能研究的有力工具。

关键词 RNA 干扰, 端粒酶逆转录酶, p53

学科分类号 Q78

人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 是端粒酶的蛋白催化亚基, 常常只在增殖的细胞中表达, 是端粒酶活化和细胞癌变的限速步骤^[1], 抑制其表达可有效地抑制肿瘤细胞的生长和诱导凋亡, 目前已成为肿瘤基因治疗的理想靶标^[2]。RNA 干扰技术 (RNA interference, RNAi) 通过双链 RNA 产生序列特异性的转录后基因沉默, 在哺乳动物细胞内可高效特异地阻断特定基因的表达^[3]。采用体外合成 21 nt 的 siRNAs 可显著抑制 hTERT 的表达^[4]。目前, 在体外以化学方法合成或 RNA 聚合酶转录合成的 siRNAs, 转染细胞后因降解失活其抑制效果是短暂的。但如果将转录 siRNA 的 DNA 模板克隆至 RNA 聚合酶 III 的下游, 可在细胞内持续转录产生小的 RNA 分子, 通过自身折叠形成发夹样 (hairpin) 结构, 即内源性的 siRNA, 可与靶基因结合后降解 mRNA, 实现靶基因的持续抑制^[5]。本文将体外筛选到的针对 hTERT 的高效抑制作用的反义核酸序列克隆至 pPUR/U6 载体中 U6 启动子的下游, 构建 siRNA 表达载体并观察其对 HepG2 细胞 hTERT 表达的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

人肝细胞癌细胞 (HepG2) 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基 (GIBCO BRL) 中, 置 37℃ 5% CO₂ 孵箱中培养。

1.2 模板 DNA 合成

采用具有高效抑制 hTERT 表达的反义核酸泰得, 所针对的 hTERT 的一段 mRNA 序列^[6] 作为 RNA 干扰的靶序列。正义序列为 5' AGTCTG-AGGCCTGAGTGAG 3', 位于 hTERT mRNA 3' 端非编码区 (3565 ~ 3583)。按以下序列合成两条 DNA 链: 正向链为 5' AGTCTGAGGCCTGAGTGAGTT-CAAGAGACTCACTCAGGCCTCAGACTTTTTT 3'; 反向链为 5' AATTAAAAAAGTCTGAGGCCTGAGTGAGTCTCTTGAAGTCACTCAGGCCTCAGACTGGCC

* 国家高技术“863”计划资助项目 (2001AA234041) 和国家自然科学基金资助项目 (3017111)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-66932211, E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2004-06-18, 接受日期: 2004-07-28

3'. 正向链为 RNA 编码链, 由正义序列和与之反向互补的反义序列经 9 bp 的环 (下划线部分) 连接而成. 斜体部分为转录终止信号. 体内转录后可返折形成 9 nt 环状连接的发夹样双链 RNA 结构, 3'端悬挂 5 个 U 碱基. 反向链下划线部分为 *Apa* I 及 *Eco*R I 的酶切位点. 两条 DNA 链在退火缓冲液中中等摩尔比混合, 95℃ 5 min, 缓慢退火至室温形成双链 DNA.

1.3 含 DNA 模板的 siRNA 表达质粒构建

pPUR/U6 质粒由沈志渊教授 (University of New Mexico School of Medicine) 惠赠^[7]. 质粒采用 *Apa* I 酶切后, 回收纯化 (Wizard DNA Clean-Up System, Promega 公司), 再用 *Eco*R I 消化, 回收纯化后得到线性化载体, 与退火形成的双链模板 DNA 连接过夜, 转化感受态细菌 DH5 α , 在含氨苄的 LB 平板中培养 16 h 后挑选菌落, PCR 筛选阳性克隆. PCR 前向引物为 5' CACAGACTTGTGGG-AGAAGC 3', 反向引物为 5' ACTCACTCAGGCC-TCAGAC 3'. 预计扩增片段 330 bp 左右. 将阳性菌落提取质粒, 以 PCR 前向引物作为正向测序引物进行 DNA 测序 (CEQ2000XL DNA Analysis System, Beckman Coulter) 以确定插入序列正确. 将测序正确的质粒置 -20℃ 保存.

1.4 细胞转染

转染前一天用胰酶消化培养瓶中的细胞, 用无双抗含 10% 小牛血清的 DMEM 稀释细胞, 浓度约为 7×10^4 /ml, 35 mm 直径的 6 孔板每孔加入 2 ml 细胞悬液, 培养 24 h 左右细胞丰度约为 60%. 采用 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen 公司) 脂质体以无血清和无双抗 DMEM 转染 2 μ g 重组质粒, 同时转染 2 μ g 空白质粒 pPUR/U6 作为对照.

1.5 质粒转染细胞的筛选

质粒转染 24 h 后, 将 6 孔板中的细胞消化至培养瓶中, 继续培养 24 h 后, 加入嘌呤霉素使终浓度为 2 mg/L. 继续培养 72 h 将绝大部分未转染的细胞杀死, 在培养液中维持嘌呤霉素终浓度为 1 mg/L 进行抗生素压力筛选至细胞生长密度为 70% ~ 80% (约需两周时间), 完成细胞筛选及富集.

1.6 RT-PCR 分析 hTERT mRNA 的表达

采用 Trizol 一步法 (Invitrogen 公司) 提取细胞总 RNA, 取 2 μ g RNA 进行逆转录 (Superscriptase II, Invitrogen 公司) 得到 cDNA. 特异性 hTERT 扩增的正向引物序列为: 5'

TCTACCGGAAGA-GTGTCTGGAGCAA 3', 反向引物为 5' GCTCCCACGA-CGTAGTCCATGTTCA 3', 扩增片段 202 bp. 特异性 β -actin 扩增正向引物序列为 5' TTCA-GGTTTACTCAGTCATCC 3', 反向引物为 5' CCAAAT-GCGGCATCTTCAAACCC 3', 扩增片段 317 bp. 20 μ l PCR 反应体系先加入 hTERT 引物, 94℃ 4min, 94℃ 30 s、61℃ 30 s、72℃ 30 s 进行 7 个循环后, 再加入 β_2 -actin 引物再进行 27 个循环以避免 β -扩增出现平台期. PCR 产物经 2% 琼脂糖电泳后凝胶成像 (Bio-Rad, Gel Doc 1000). 抑制率计算参照文献 [6].

1.7 蛋白质印迹检测 hTERT 蛋白的表达

收集经嘌呤霉素抗性筛选的细胞, PBS 缓冲液洗涤细胞 1 次, 离心弃上清, 加入 100 μ l 预冷的 RIPA-PIC 细胞裂解液 (Roche 公司), 置冰上 40 min. 4℃, 10 000 g 离心 15 min, 取上清进行蛋白质定量 (Lowry 酚试剂法). 取 50 μ g 蛋白质加入 2 $\times$ 上样缓冲液, 经 100℃ 5 min 变性后用 8% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离. 蛋白质半干转移至 PVDF 膜上 (hybond-polyvinylidene difluoride membranes, Amersham Biosciences). 用含 8% 奶粉的 TBST 缓冲液 4℃ 封闭过夜. 加入 1:2 000 稀释的 hTERT 一抗 (兔抗人 IgG, Alpha diagnostic) 和 1:2 000 稀释的 β -actin 一抗 (鼠抗人 IgG, Sigma 公司) 室温 1 h, TBST 洗涤 3 次, 加入 1:10 000 稀释的 hTERT 二抗 (羊抗兔 IgG, 北京中山生物技术有限公司) 和 1:2 000 稀释的 β -actin 二抗 (羊抗鼠 IgG, 北京中山生物技术有限公司) 室温 1 h, TBST 洗涤 4 次. 加 ECL 显色剂 (北京中山生物技术有限公司) 1 min, X 光胶片曝光成像 (Kodak X-ray processor).

1.8 蛋白质印迹检测 p53 表达

采用 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质, 随后作蛋白质印迹. 一抗 (北京莱博生物技术研究所在) 稀释度 1:500; 二抗 (北京中山生物技术有限公司) 稀释度 1:10 000.

1.9 端粒酶活性测定

采用以 PCR 法为基础的端粒酶活性检测试剂盒 (TRApeze Telomerase Detection Kit, Chemicon 公司) 测定端粒酶活性. 细胞沉淀加入 200 μ l CHAPS 裂解缓冲液置冰上 30 min, 4℃、12 000 r/min 离心 20 min, 取上清作蛋白质定量 (Lowry 酚试剂法), 细胞裂解液置 -70℃ 保存. 以下反应均应避免 RNase 污染. 在反应管中依次加

入 $10 \times \text{TRAP}$ 反应缓冲液 $5 \mu\text{l}$, $50 \times \text{dNTP Mix}$ $1 \mu\text{l}$, TS Primer $1 \mu\text{l}$, TRAP Primer Mix $1 \mu\text{l}$, Taq Polymerase $1 \mu\text{l}$ (2 U), 双蒸水 $39 \mu\text{l}$, 细胞裂解液 $2 \mu\text{l}$ ($0.2 \mu\text{g}$), 混匀, 室温放置 30 min , 94°C 30 s , 56°C 30 s , 72°C 30 s , 共扩增 30 个循环. 取 $10 \mu\text{l}$ 产物作 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 1 mg/L EB 染色 30 min , 蒸馏水漂洗 10 min , 凝胶成像 (Bio-Rad 公司, Gel Doc 1000).

1.10 细胞生长速度测定

将稳定转染 siRNA 重组质粒和对照质粒的细胞, 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基稀释成 $3.5 \times 10^4/\text{ml}$, 接种 12 孔板, 每孔 1 ml , 置 37°C $5\% \text{ CO}_2$ 孵箱中培养. 每 24 h 消化细胞计数, 每次平行计数 3 次, 直至第 6 天, 以时间为横坐标, 细胞数为纵坐标绘制细胞生长曲线.

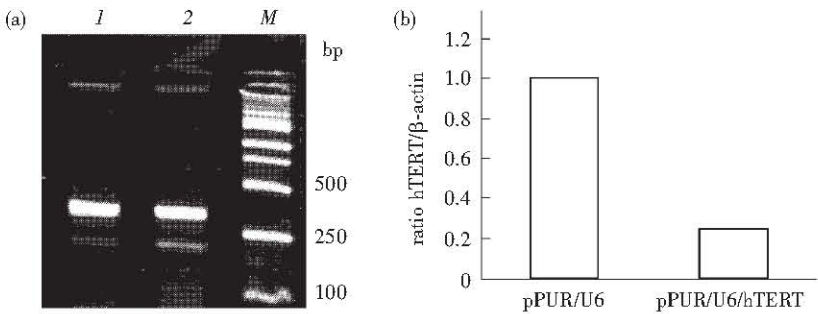


Fig. 1 siRNA inhibits hTERT mRNA expression

(a) RT-PCR to detect the mRNA expression of hTERT. 1: pPUR/U6/hTERT; 2: pPUR/U6; M: Molecular mass marker.
(b) Quantitation of RT-PCR results by scanning densitometry of DNA bands.

2.3 siRNA 对 hTERT 蛋白表达水平的影响

采用蛋白质印迹分析靶基因 hTERT 与对照基因 β-actin 的蛋白质表达水平 (图 2). 结果显示与

2 结 果

2.1 siRNA 重组质粒的筛选及鉴定

挑选在氨苄平板上生长的菌落, 经 PCR 筛选, 阳性克隆扩增片段大小为 330 bp 左右, 经测序证明插入的双链 DNA 片段序列正确.

2.2 siRNA 对 hTERT mRNA 表达水平的抑制作用

采用半定量 RT-PCR 测定靶基因 hTERT 与内对照基因 β-actin mRNA 的表达水平, 结果显示, 与 pPUR/U6 空质粒转染的对照细胞相比, siRNA 质粒表达载体对 β-actin 无抑制作用, 而对靶基因 hTERT mRNA 表达具有明显的抑制作用 (图 1a). 采用光密度扫描法计算各条带 DNA 的含量, 将对照的 hTERT/β-actin 比值定为 1 , 则转染 pPUR/U6/hTERT 细胞的 hTERT/β-actin 比值为 0.25 , siRNA 对 hTERT mRNA 表达的抑制率为 75% (图 1b).

对照相比, β-actin 的水平几乎无变化, 而转染 siRNA 质粒的细胞 hTERT 蛋白表达水平明显下降 (图 2a). 采用光密度扫描法计算各条带蛋白质的

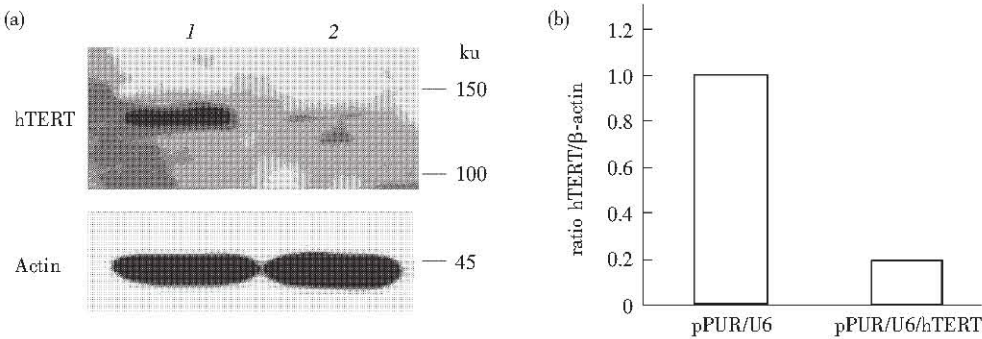


Fig. 2 siRNA inhibits hTERT protein expression

(a) Detection of hTERT protein expression by Western-blot. 1: pPUR/U6; 2: pPUR/U6/hTERT.
(b) Quantitation of Western-blot results by scanning densitometry of blot bands.

含量, 将对照的 hTERT/ β -actin 比值定为 1, 则转染 pPUR/U6/hTERT 细胞的 hTERT/ β -actin 比值为 0.19, 抑制率为 81% (图 2b).

2.4 siRNA 抑制 hTERT 对 p53 表达的影响

p53 是重要的肿瘤抑制基因, 原位表达 hTERT 可降低 p53 水平^[8]. 为了检测抑制 hTERT 的表达是否对 p53 的表达有影响, 采用蛋白质印迹检测了 p53 蛋白水平, 结果表明, 转染 pPUR/U6/hTERT 质粒表达载体的 HepG2 细胞 p53 水平明显升高 (图 3).

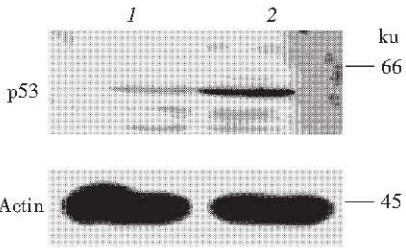


Fig. 3 Down-regulating hTERT expression increase p53 protein level

1: pPUR/U6; 2: pPUR/U6/hTERT.

2.5 siRNA 抑制 hTERT 对端粒酶活性的影响

由于 hTERT mRNA 表达水平与端粒酶活性密切相关^[1], 我们进一步检测了转染 siRNA 表达质粒后细胞的端粒酶活性. 结果表明, 转染 pPUR/U6/hTERT 质粒表达载体的 HepG2 细胞端粒酶活性降低 (图 4).

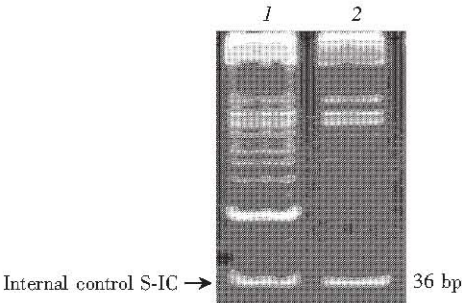


Fig. 4 Down-regulating hTERT expression decrease telomerase activity

1: pPUR/U6; 2: pPUR/U6/hTERT.

2.6 siRNA 对细胞生长速度的影响

由于端粒酶的活性与细胞增殖有密切的关系, 为观察端粒酶活性降低后是否会抑制肿瘤细胞的生长, 我们以细胞计数法测定 HepG2 细胞生长速度.

以时间 (天) 为横坐标, 以细胞数为纵坐标绘制细胞生长曲线. 结果表明, 转染 pPUR/U6/hTERT 的 HepG2 细胞生长速度与对照 pPUR/U6 空质粒相比变慢 (图 5). 表明针对 hTERT 的 siRNA 能抑制 HepG2 细胞的生长.

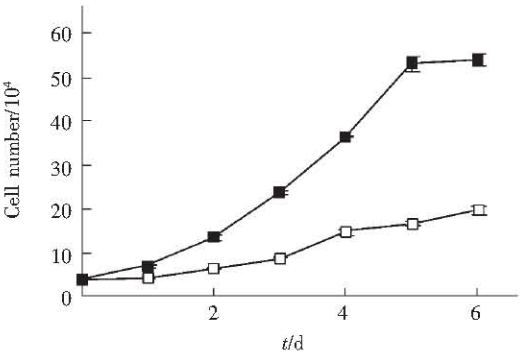


Fig. 5 Down-regulating hTERT expression inhibit HepG2 cell growth

Cells treated with pPUR/U6 and pPUR/U6/hTERT respectively in 12 well plate were harvested and counted in triplicate every 24 hour. The data were presented as $\bar{x} \pm s$. $\square$ — $\square$: pPUR/U6/hTERT; $\blacksquare$ — $\blacksquare$: pPUR/U6.

3 讨 论

RNA 干扰 (RNAi) 通过内源性表达或外源性介导 siRNA 以序列特异性的方式有效抑制内源性基因的表达, 目前已成为广泛应用的研究基因功能的有力工具. 并且有潜在的医药研究和开发价值. 外源性 siRNA 的产生主要依靠化学合成或利用 RNA 聚合酶进行体外转录合成, 对靶基因的抑制作用较为短暂, 成本高且抑制效果与转染效率密切相关. 内源性表达 siRNA 是将转录 siRNA 具有反向重复序列的 DNA 模板, 克隆至 RNA 聚合酶 III (Pol III) 转录单位中, 以质粒 DNA 为载体转染哺乳动物细胞, 利用细胞中 RNA 聚合酶持续转录合成 RNA, 这种 RNA 内部互补折叠形成发夹样结构, 在细胞内酶的作用下迅速形成 siRNA, 可在更长的时间内抑制靶基因的表达^[9]. 将编码针对 hTERT siRNA 的 DNA 模板, 定向克隆至第三类 Pol III 启动子——U6 启动子的下游, 由于 U6 启动子几乎所有元件均位于转录起始区的上游, 因此几乎任何小于 400bp 的插入序列都能被有效转录. 在遇见 4~5 个连续的 T 时会终止转录, 形成内源性表达的 RNA, 其正义链 (19 nt) 的 3' 端与反义链 (19 nt) 的 5' 端由 9 bp 的环连接, 互补折叠形成发夹样结构, 3' 端悬挂 5 个 U, 此种结构的 RNA 与

体外合成的 siRNA 一样, 能有效地诱导靶基因的 RNAi^[10].

研究表明, 靶基因的二级结构是影响 siRNA 效率的主要因素^[11]. siRNA 的活性与其和靶基因 mRNA 的可结合性 (accessibility) 密切相关, 针对靶基因的不同序列 siRNA 的抑制作用差异很大^[12]. 因此筛选有效的靶序列是 RNA 干扰成功的关键. 由于 RNAi 可认为是一种反义机制, siRNA 和 RNase H 依赖的寡核苷酸都具有位置依赖性. 采用针对同一位点设计的 siRNA 和反义核酸其活性具有明显的相关性, 即反义核酸活性高者, siRNA 活性也好^[13]. 我们先前的研究采用体外转录的方法合成了一系列 siRNA, 其中 4 条在遵循 siRNA 设计原则上采用随机筛选的方法设计, 而另外 2 条 (其中一条为本文采用的序列) 在遵循 siRNA 设计原则的基础上, 参照了我室以芯片杂交和 RNase H 酶原位消化技术为基础建立的全基因寻靶技术筛选的特异性抑制 hTERT 的反义核酸序列. 体外试验表明, 这 2 条 siRNA 的活性优于随机筛选的序列 (另文发表). 与本文序列相同的反义核酸 (癌泰得) 具有较强的抑制 hTERT 表达活性^[6,8], 以该序列设计 siRNA 并构建稳定表达的质粒载体, 在 HepG2 细胞中同样可特异性地高效抑制 hTERT mRNA 和蛋白质表达, 这可能是由于该序列能与 hTERT mRNA 较好地结合, 从而启动对靶基因的切割反应. 提示反义核酸的作用位点极有可能也是 siRNA 的作用位点^[13]. 因此以高通量反义核酸寻靶技术指导 siRNA 的设计能显著提高 siRNA 的抑制效率, 不失为 siRNA 序列筛选的有效方法.

hTERT mRNA 的水平与端粒酶活性密切相关, 是调节端粒酶活性的限速步骤, 在细胞增殖及永生过程中发挥重要作用^[1]. 在端粒酶阴性的细胞中表达 hTERT 能活化端粒酶活性, 促进细胞的生长^[14], 而特异性抑制 hTERT 的表达可降低端粒酶的活性^[6], 抑制肿瘤细胞的生长^[15]和诱导细胞发生凋亡^[16]. 我们采用 siRNA 抑制 hTERT 表达后虽然发现 HepG2 细胞端粒酶的活性降低, 但未检测到明显的细胞死亡, 只是细胞生长速度明显低于对照, 与 Masutomi 等^[17]的结果相似, 其机制可能是抑制 hTERT 基因表达可使细胞进入 S 期延缓, 而在 G2/M 期阻滞.

近来的研究表明, p53 与 hTERT 之间存在相互作用^[16], 本文检测到表达 siRNA 的 HepG2 细胞 p53 表达水平明显增高. p53 增高在不同的细胞和

环境下一般可引起两种结果: a. 促进细胞凋亡; b. 诱导细胞周期停滞^[18]. 但在有的细胞中过量表达 p53 虽可通过下调 hTERT 的转录, 抑制端粒酶的活性, 但不会诱导细胞凋亡^[19], 甚至野生型 p53 增高, 可对抗 hTERT 下调介导的细胞有丝分裂机制的改变和基因组的不稳定性, 保证细胞的存活和增殖^[16]. 我们观察到的细胞生长变慢而不是细胞凋亡, 有可能与 p53 增高有关.

Masutomi 等^[17]报道 siRNA 抑制 hTERT 基因表达虽可降低端粒酶活性, 但细胞端粒缩短并不明显. 目前认为端粒 DNA 复制存在两种机制, 除了端粒酶活性之外, 细胞还可以通过一个特殊的 DNA 重组机制 (alternative telomere lengthening pathway, ALT) 进行端粒复制^[20]. 其细胞间端粒 DNA 存在高水平的互换^[21]. 通常情况下, 端粒酶活性对 ALT 途径具有抑制作用, 但在端粒酶活性受到抑制的条件下, 细胞会激活 ALT 途径来维持端粒的稳定性, 从而维持细胞的长期生存^[22]. 本文中稳定表达 siRNA 的细胞除了 p53 增高使细胞存活外, 还有可能是通过 ALT 途径维持细胞的增殖, 至于具体的机制有待进一步研究.

转染表达内源性 siRNA 的真核表达质粒较外源性 siRNA 具有下列优点: a. 重组质粒一旦构建成功, 可大量生产并成本低廉; b. 通过抗生素的筛选, 可有效地富集转染的细胞, 克服外源 siRNA 转染效率不高而造成分析中背景较高的缺陷; c. 转染的质粒可在体内稳定表达 siRNA, 实现靶基因的持续抑制. 本文在富集细胞后 2 周左右用蛋白质印迹检测 hTERT 蛋白表达水平仍被明显抑制, 为进一步研究基因功能奠定了基础.

致谢 在本研究中, 沈志渊教授提供质粒载体, 丁雨、樊玉伟在 DNA 合成及测序工作中给予了大力支持协助, 在此一并表示谢意.

参 考 文 献

- 1 Kyo S, Inoue M. Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: How can we apply them for cancer therapy?. *Oncogene*, 2002, **21** (4): 688 ~ 697
- 2 Ulaner G A, Hu J F, Vu T H, *et al.* Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res*, 1998, **58** (18): 4168 ~ 4172
- 3 Hannon G J. RNA interference. *Nature*, 2002, **418** (6894): 244 ~ 251
- 4 Kosciolk B A, Kalantidis K, Tabler M, *et al.* Inhibition of telomerase activity in human cancer cell by RNA interference. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2003, **2** (3): 209 ~ 216

- 5 Tuschl T. Expanding small RNA interference. *Nat Biotech*, 2002, **20** (5): 446 ~ 448
- 6 Du Q Y, Wang X B, Chen X J, *et al.* Antitumor mechanism of antisense candidate targeting human telomerase reverse transcriptase. *World J Gastroenterol*, 2003, **9** (9): 2030 ~ 2035
- 7 Meng X B, Yuan Y, Maestas A, *et al.* Recovery from DNA damage-induced G2 arrest requires actin-binding protein Filamin-A/actin-binding protein 280. *J Biol Chem*, 2004, **279** (7): 6098 ~ 6105
- 8 Wang S Q, Lin L, Chen Z D, *et al.* Effect of antisense oligonucleotides targeting telomerase catalytic subunit on tumor cell proliferation *in vitro*. *Chin Sci Bull*, 2002, **47** (5): 993 ~ 997
- 9 Shi Y. Mammalian RNAi for the masses. *Trends in Genetics*, 2003, **19** (1): 9 ~ 12
- 10 Pau C P, Good P D, Winer I, *et al.* Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotech*, 2002, **20** (5): 505 ~ 507
- 11 Bohula E A, Salisbury A J, Sohail M, *et al.* The efficacy of small interfering RNAs targeted to the type1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R) is influenced by secondary structure in the IGF1R transcript. *J Bio Chem*, 2003, **278** (18): 15991 ~ 15997
- 12 Lee N S, Dohjima T, Bauer G, *et al.* Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcript in human cells. *Nat Biotech*, 2002, **20** (5): 500 ~ 505
- 13 Vickers T A, Koo S, Bennett C F *et al.* Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. *J Biol Chem*, 2003, **278** (9): 7108 ~ 7118
- 14 Xiang H, Wang J, Mao Y, *et al.* Human telomerase accelerates growth of lens epithelial cells through regulation of genes mediating RB/E2F pathway. *Oncogene*, 2002, **21** (23): 3784 ~ 3791
- 15 Kraemer K, Fuessel S, Schmidt U, *et al.* Antisense-mediated hTERT inhibition specifically reduces the growth of human bladder cancer cells. *Clin Cancer Res*, 2003, **9** (10): 3794 ~ 3800
- 16 Cao Y, Li H, Deb S, *et al.* TERT regulates cell survival independent of telomerase enzymatic activity. *Oncogene*, 2002, **21** (20): 3130 ~ 3138
- 17 Masutomi K, Yu E Y, Khurts S, *et al.* Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell*, 2003, **114** (2): 241 ~ 253
- 18 Fridman J S, Lowe S W. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 2003, **22** (56): 9030 ~ 9040
- 19 Kanaya T, Kyo S, Hamada K, *et al.* Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. *Clin Cancer Res*, 2000, **6** (4): 1239 ~ 1247
- 20 Grobely J V, Kulp-McEliece M, Dominique B. Effects of reconstitution of telomerase activity on telomere maintenance by the alternative lengthening of telomeres (ALT) pathway. *Human Molecular Genetics*, 2001, **10** (18): 1953 ~ 1961
- 21 Londono-Vallejo J A, Der-Sarkissian H, Cazes L, *et al.* Alternative lengthening of telomeres is characterized by high rates of telomeric exchange. *Cancer Res*, 2004, **64** (7): 2324 ~ 2327
- 22 Neumann A A, Reddel R R. Telomere maintenance and cancer—look, no telomerase. *Nat Rev Cancer*, 2002, **2** (11): 879 ~ 884

Expression of siRNA Target Against Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) for Gene Silencing by Constructing DNA-based Plasmid Vector *

XIA Yun^{1,2)}, LIN Ru-Xian¹⁾, ZHENG Su-Jun¹⁾, ZHANG Min-Li¹⁾, WANG Sheng-Qi¹⁾ **

(¹⁾ Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China;

²⁾ Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract RNA interference (RNAi) is the process of sequence-specific posttranscriptional gene silencing initiated by double-stranded RNA that is homologous to the silenced gene. To investigate the inhibitory effect of endogenous siRNA on target gene, a DNA-based vector was constructed for intracellular transcription of a hTERT specific short hairpin RNA (shRNA) and evaluate the silencing effect for hTERT gene expression. hTERT cDNA sequences from nucleotides 3565 ~ 3583 followed by 9 bp to form a loop and the corresponding antisense hTERT nucleotides followed by five thymines were cloned to the downstream of the U6 promoter in pPUR/U6 vector, resulting in the RNA interference vector pPUR/U6/hTERT. The constructed vector pPUR/U6/hTERT and the vacant vector pPUR/U6 were transferred into HepG2 cells respectively by Liposome-mediated transfection. The antibiotic-resistant transfected cells were selected and enriched by applying puromycin in culture medium. The surviving cells were seeded in 12-well plate for assaying cell growth rate by cell counting or harvested for evaluation of hTERT gene expression by RT-PCR and Western-blot assay. Telomerase activity was determined by TRAP (Telomerase Repeat Amplification Protocol) and p53 expression level was assayed by Western-blot. Compared to the cells transfected with pPURU6 control vector, pPUR/U6/hTERT caused efficient down-regulation of hTERT gene expression and telomerase activity. It also significantly increased p53 expression level and inhibited cell growth. These results suggested that the endogenous hairpin siRNA produced by DNA plasmid is capable of mediating robust hTERT gene inhibition. It is promised to be a potential tool for gene function analysis.

Key words RNA interference, human telomerase reverse transcriptase, p53

* This work was supported by grants from The State 863 High Technology R&D Project of China (2001AA234041) and The National Nature Science Foundation of China (3017111) .

** Corresponding author. Tel: 86-10-66932211, E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn

Received: June 18, 2004 Accepted: July 28, 2004