

端粒酶活性与骨肉瘤细胞分化的关系

王林^{1,2}, 文剑明¹, 张萌¹, 董书^{1,2}, 谢丹¹

(中山医科大学 1. 病理学教研室, 广东 广州 510089; 2. 孙逸仙纪念医院病理科, 广东 广州 510120)

摘要: 【目的】探讨人骨肉瘤细胞分化与端粒酶活性调节之间的关系。【方法】用维甲酸和地塞米松诱导人骨肉瘤细胞分化, 用端粒重复序列扩增法(TRAP)检测端粒酶活性及用 Northern 印迹法检测人端粒酶 RNA(hTR)表达水平的改变。【结果】经维甲酸和地塞米松处理后, 骨肉瘤细胞生长受到抑制, 碱性磷酸酶活性升高, 端粒酶活性明显下降, 且与剂量作用时间成负相关, 但 hTR 表达水平并无改变。【结论】维甲酸和地塞米松有抑制骨肉瘤细胞增殖和诱导分化的作用, 端粒酶活性下调可作为细胞分化指标, 但与 hTR 表达水平不平行。

关键词: 肿瘤, 骨组织; 骨肉瘤细胞; 细胞分化; 端粒, 末端转移酶

中图分类号: R730.231 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2000)05-0355-03

Study on the Correlation of Telomerase Activity and Differentiation of Cultured Osteosarcoma Cells

WANG Lin¹, WEN Jian-ming¹, ZHANG Meng¹, DONG Shu-kun², XIE Dan¹

(1. Department of Pathology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China; 2. Department of Pathology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the relationship between induced differentiation and regulation of telomerase activity in cultured osteosarcoma cells. 【Methods】Osteosarcoma cells were treated by different doses of retinoic acid (RA) and dexamethasone (DEX). Telomerase activity and human telomerase RNA (hTR) of treated cells were detected by telomere repeat amplification protocol (TRAP) and by Northern blotting analysis. 【Results】After treatment with RA or DEX, the growth of HOS cells was inhibited. Alkaline phosphatase activity (differentiation marker of osteogenetic cells) of the cells increased significantly. Telomerase activity decreased with increasing treatment doses and times, but the expression level of hTR did not change obviously. 【Conclusions】Both RA and DEX could inhibit cell growth and induce differentiation of HOS cells. Decreasing of telomerase activity could be considered as a marker of differentiation of HOS cells, but it does not correlate with the expression level of hTR.

Key words: neoplasia, bone tissue; osteosarcoma cells; cell differentiation; telomerase

端粒酶活性被认为是恶性肿瘤细胞的一种标志^[1], 但至今对端粒酶表达和调节方式还了解甚少^[2~4]。我们用维甲酸(retinoic acid, RA)和地塞米松(dexamethasone, DEX)处理培养的人骨肉瘤细胞, 观察细胞分化过程中端粒酶活性和人端粒酶 RNA(human telomerase RNA, hTR)表达水平的改

变, 探讨骨肉瘤细胞分化过程中端粒酶活性的调节机制。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

收稿日期: 1999-12-15

基金项目: CMB(1998-03)和孙逸仙纪念医院科研启动基金资助项目(1999137)

作者简介: 王林(1973-)女, 山东济宁人, 硕士, 现在中山医科大学孙逸仙纪念医院病理科工作。

人骨肉瘤细胞株 HOS 由上海第二军医大学引进, 常规培养。

1.2 碱性磷酸酶活性测定

将 HOS 细胞接种于 24 孔板中, 实验组加入含有 10^{-5} mol/L RA 或 DEX, 对照组加入相同量的溶剂乙醇。7 d 后两组各取 3 孔细胞计数, 取其平均值比较细胞增殖状况。其余细胞用 10 mg Triton X-100 裂解, 取上清于 Monarch 761 全自动生化分析仪测定碱性磷酸酶活性, 测定值用蛋白质浓度来校正(碱性磷酸酶单位 U/mg 蛋白)。

1.3 端粒酶活性测定

用 TRAP (telomere repeat amplification protocol)-银染色法^[5]。收集经不同浓度 RA 或 DEX 处理 3、7、10 d 后的 HOS 细胞, 按照 10^5 细胞加入 20 μ L 裂解缓冲液抽提端粒酶, 加入 TS 引物 (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'), 和 CX 引物 (5'-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3') 进行 PCR 扩增, 聚丙烯酰胺凝胶电泳后银染。用 CS-930 双波长薄层扫描仪(日本岛津)测定端粒酶条带峰下总面积代表端粒酶活性。

1.4 hTR 探针制备

含有 hTR cDNA 片段的 pBBS212 重组质粒(澳洲西澳大学骨外科实验室赠送)在大肠杆菌中大量扩增, 碱裂解法抽提质粒 DNA。用 *Eco*RI 酶切后在 15 g/L 琼脂糖电泳, 将 184 bp 的 DNA 片段切下来, 用 SephaglasTM Ban Prep Kit 回收后进行地高辛标记和检测。

1.5 Northern 印迹法

收集实验组和对照组的细胞, 用一步法抽提总 RNA。取 20 μ g RNA 样品在含 2.2 mol/L 甲醛的 10 g/L 琼脂糖变性胶进行电泳(80V), 经毛细管法转移至尼龙膜上, 于含 hTR 探针(25 mg/L)的杂交液中 50 $^{\circ}$ C 杂交过夜。采用地高辛检测试剂盒显示 hTR 条带位置并照相记录。再将滤膜上的探针洗去, 以“看家基因” β -actin 作为内对照, 同上进行杂交及显色。采用全自动图象分析仪(Kontron Ibas 2.0)测定各条带平均光密度代表 mRNA 含量。

2 结果

2.1 RA 和 DEX 对 HOS 细胞增殖及分化的影响

加入 RA 和 DEX 后, HOS 细胞生长变缓, 倍增时间由原来的 39 h 分别延长到 48 h 和 44 h。经

10^{-5} mol/L RA 和 10^{-5} mol/L DEX 处理 7 d 后, 活细胞计数分别为对照组的 62% 和 70%, 成骨细胞分化指标碱性磷酸酶活性较对照组分别升高 38% 和 57%, 在统计学上有显著性差异。

2.2 分化对 HOS 细胞端粒酶活性的影响

HOS 细胞经 RA 及 DEX 作用后, 端粒酶活性均有不同程度的下降, 且存在明显的剂量-时间依赖关系。用不同浓度 RA 处理相同时间时, HOS 细胞端粒酶活性较对照组均有下降, 且与浓度呈负相关(表 1)。用相同浓度 RA 处理不同时间时, HOS 细胞端粒酶活性也有下降, 且与作用时间呈负相关(见表 2)。DEX 对 HOS 细胞端粒酶活性的作用也与浓度及作用时间呈负相关(见表 3)。

表 1 不同剂量维甲酸(RA)处理 7 d 的 HOS 细胞端粒酶活性

RA concentration	Total area below the peak value curve ($\times 10^4 \text{mm}^2$)	Ratio(%)
Control	1.95	100
10^{-7} mol/L	1.11	56.7
10^{-6} mol/L	0.39	20.0
10^{-5} mol/L	0.37	19.1

表 2 经维甲酸(RA)处理不同时间后 HOS 细胞端粒酶活性

RA concentration	Total area below the peak value curve ($\times 10^4 \text{mm}^2$)	Ratio(%)
Control	2.27	100
10^{-5} mol/L 3 d	1.59	70.1
10^{-5} mol/L 7 d	1.18	52.1
10^{-5} mol/L 10 d	0.98	43.1

表 3 不同剂量地塞米松(DEX)处理不同时间后 HOS 细胞端粒酶活性

Table 3 Telomerase activity of HOS cells treated by different doses of dexamethasone (DEX) for different days

DEX concentration	Total area below the peak value curve ($\times 10^4 \text{mm}^2$)	Ratio(%)
Control	6.01	100
10^{-7} mol/L 3 d	4.58	76.2
10^{-6} mol/L 3 d	4.95	82.3
10^{-5} mol/L 3 d	4.50	74.9
10^{-7} mol/L 7 d	2.21	36.7
10^{-6} mol/L 7 d	3.17	52.7
10^{-5} mol/L 7 d	0.81	13.5

2.3 RA 和 DEX 对 HOS 细胞 hTR 的影响

将未处理组 HOS 细胞 hTR 与 β -actin 条带平均吸光度的比值定为 100%, 其余各处理组 hTR 与 β -actin 条带平均吸光度的比值与其相比得 Ratio 值。结果显示 HOS 细胞经 10^{-5} mol/L RA 及 10^{-5} mol/L DEX 分别处理 3、7 d 后 hTR 表达量与未处理组相比并无明显改变(见表 4)。

表 4 维甲酸(RA)或地塞米松(DEX)处理后 HOS 细胞端粒酶 RNA (hTR) 的表达

Table 4 The expression of human telomerase RNA of HOS cells treated by retinoic acid or dexamethasone

RA or DEX concentration (10^{-5} mol/L)	hTR band	β -actin band	hTR/ β -actin	Ratio(%)
Control	0.191	0.160	1.19	100
RA 3 d	0.181	0.155	1.17	98
RA 7 d	0.194	0.148	1.32	110
DEX 3 d	0.189	0.156	1.22	102
DEX 7 d	0.183	0.152	1.21	101

3 讨论

文献报道, DEX 能诱导大鼠骨髓干细胞向成骨细胞分化^[6], 分化后的成骨细胞表达骨钙素 mRNA, V 型胶原的合成增加, 而 I、II 型胶原合成减少, 碱性磷酸酶活性明显升高。本实验观察到在 HOS 细胞培养中, 加入 RA 和 DEX 后细胞生长变缓, 碱性磷酸酶活性升高, 从而进一步证实了 RA 和 DEX 有生长抑制和分化诱导作用。现认为, RA 诱导细胞分化机制与 DEX 类似, 它可与胞浆中的视黄酸结合蛋白结合, 运输到核内并作用于转录基因, 影响细胞增殖和分化。

肿瘤细胞在恶性转化的过程中伴随有端粒酶的激活^[7, 8], 通过诱导肿瘤细胞分化可使端粒酶活性下调^[2~4], 因此人们推测肿瘤恶性和逆转均与端粒酶活性有着密切的关系。有人将有端粒酶活性的细胞和无端粒酶活性的细胞混合后发现端粒酶活性并不受抑制, 将有端粒酶活性的细胞抽提物与含量不同的已诱导分化的细胞抽提液(端粒酶活性减弱)混合, 也未检测到端粒酶活性受抑制^[1], 说明分化细胞抽提物中并无端粒酶活性抑制剂, 因此端粒酶活性降低是细胞分化的指标之一。

本实验在诱导 HOS 细胞分化过程中发现端粒酶活性下降, 但 hTR 表达量并无改变, 这与文献报道相似^[9]。另一方面, HL-60 等细胞株被诱导分化

后可检测到端粒酶活性下降和 hTR 水平降低相一致^[3]。推测在细胞永生过程中, hTR 表达不是决定端粒酶活性高低的唯一因素, 不同细胞类型端粒酶活性调控机制存在着差异。

本实验加入 RA 或 DEX 后, 第 3 天检测端粒酶活性已有明显下降, 说明在诱导分化过程中, HOS 细胞的端粒酶活性下降是一个早期事件。经 RA、DEX 处理至第 10 天时, 端粒酶活性下降更显著, 在第 14 天细胞出现衰亡。

综上所述, 我们认为, RA 和 DEX 可诱导体外培养的 HOS 细胞分化, 在分化过程中, 端粒酶活性明显减弱, 但端粒酶活性下调与 hTR 表达量不平行。因此 hTR 水平不是端粒酶活性强弱的标志。

参考文献:

- [1] Kim N W, Piatyszek M A, Prowse K R, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cell and cancer[J]. *Science*, 1994, 266(5193): 2011.
- [2] Sharma H W, Sokoloski J A, Perez J R, *et al.* Differentiation of immortal cells inhibits telomerase activity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(26): 12343.
- [3] Albanell J, Han W, Mellado B, *et al.* Telomerase activity is repressed during differentiation of maturation-sensitive but not resistant human tumor cell lines[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(7): 1503.
- [4] Bestilny L J, Brown C B, Miura Y, *et al.* Selective inhibition of telomerase activity during terminal differentiation of immortal cell lines[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(16): 3796.
- [5] Wen J M, Sun L B, Zhang M, *et al.* A non-isotopic method for the detection of telomerase activity in tumour tissues: TRAP-silver staining assay[J]. *Mol Pathol*, 1998, 51(2): 110.
- [6] Leboy P S, Beresford J N, Devlin C, *et al.* Dexamethasone induction of osteoblast mRNAs in rat marrow stromal cell cultures[J]. *J Cell Physiol*, 1991, 146(3): 370.
- [7] Counter C M, Botelho F M, Wang P, *et al.* Stabilization of telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes[J]. *J Virol*, 1994, 68(5): 3410.
- [8] Shay J W. Telomerase in human development and cancer[J]. *J Cell Physiol*, 1997, 173(2): 266.
- [9] Avilion A A, Piatyszek M A, Gupta J, *et al.* Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(3): 645.

(编辑 黄小延)