

短发夹RNA抑制外源荧光素酶在肝癌细胞中的表达

胡礼仪, 张有顺, 周新, 戴宗晴, 黄玲, 王菊

胡礼仪, 张有顺, 戴宗晴, 黄玲, 王菊, 郧阳医学院附属东风医院肝脏外科研究所 湖北省十堰市 442008

周新, 武汉大学中南医院检验科 湖北省武汉市 430071

胡礼仪, 男, 1972-09-19 生, 四川省筠连县人, 汉族, 1998 年重庆医科大学本科毕业, 2002 年武汉大学医学院临床检验诊断学专业硕士研究生, 主管技师, 研究方向为肿瘤的基因治疗。

湖北省卫生厅资助项目, No. JX1B116

项目负责人: 张有顺, 442008, 湖北省十堰市大岭路 10 号, 郧阳医学院附属东风医院肝脏外科研究所. zlib125@163.com

电话: 0719-8272283

收稿日期: 2004-06-08 接受日期: 2004-06-17

Inhibition of luciferase expression in hepatocellular carcinoma cells by short hairpin RNA

Li-Yi Hu, You-Shun Zhang, Xin Zhou, Zong-Qing Dai, Lin Huang, Ju Wang

Li-Yi Hu, You-Shun Zhang, Zong-Qing Dai, Lin Huang, Ju Wang, Hepatosurgery Institute, Dongfeng Hospital of Yungang Medical College, Shiyan 442008, Hubei Province, China.

Xin Zhou, Department of Laboratory Science, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei province, China.

Supported by Hubei Public Health Foundation, No. JX1B116

Correspondence to: Dr You-Shun Zhang, Hepatosurgery Institute, Dongfeng Hospital of Yungang Medical College, Shiyan 442008, Hubei Province, China. zlib125@163.com

Received: 2004-06-08 Accepted: 2004-06-17

Abstract

AIM: To construct a recombinant plasmid containing short hairpin RNA of luciferase in order to suppress the expression of luciferase gene in hepatocellular carcinoma cells line Bel-7402.

METHODS: Two inverted repeating oligonucleotides, double-stranded DNA which dropped temperature were designed, and then cloned into PGE-1 vector digesting by the double restricted endoenzymes to generate the plasmids pshRNA-luc, pshRNA-luc and pCMV-luc, which were cotransfected into hepatocellular carcinoma cells line Bel-7402 to detect effect of luciferase expression.

RESULTS: The size of the PCR product was 652 bp. DNA sequencing showed the sequence of recombinant plasmids pshRNA-luc was successfully constructed. The recombinant plasmids suppressed the expression of luciferase gene by 86% in Bel-7402 cells ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Short hairpin RNA of luciferase can efficiently suppress its expression in hepatocellular carcinoma cells Bel-7402.

Hu LY, Zhang YS, Zhou X, Dai ZQ, Huang L, Wang J. Inhibition of luciferase expression in hepatocellular carcinoma cells by short hairpin RNA. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(9):2045-2048

摘要

目的: 构建含荧光素酶(luciferase, luc)基因的短发夹状 RNA(short hairpin RNA, shRNA)表达质粒, 并观察其在肝癌细胞 Bel-7402 中抑制外源荧光素酶的表达。

方法: 设计的两条反向重复的多聚核苷酸序列, 退火形成双链 DNA, 再与双酶切后的载体 PGE-1 连接, 构建 pshRNA-luc 重组质粒, 与荧光素酶基因表达质粒 pCMV-luc 共转染肝癌细胞株 BEL-7402, 检测其对荧光素酶表达的影响。

结果: PCR 和 DNA 序列分析证实了重组质粒构建成功。pshRNA-luc 对共转染的 pCMV-luc 中的荧光素酶具有明显的抑制作用, 抑制率可达 86% ($P < 0.01$)。

结论: 构建的 pshRNA-luc 表达质粒能有效地抑制荧光素酶在肝癌细胞中的表达, 为 RNA 干扰用于肿瘤的基因治疗打下基础。

胡礼仪, 张有顺, 周新, 戴宗晴, 黄玲, 王菊. 短发夹 RNA 抑制外源荧光素酶在肝癌细胞中的表达. 世界华人消化杂志 2004;12(9):2045-2048

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2045.asp>

0 引言

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是近年发展起来的一种研究基因功能的新方法, 他通过将双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA) 导入细胞后, 在 Dicer 酶的作用下产生有活性的干扰性 RNA(small interfering RNA, siRNA), 与该段 RNA 同源的 mRNA 产生特异性降解, 从而导致特异基因表达抑制的进化保守的转录后基因沉默现象^[1-4]。他具有高效性, 高特异性, 快速性等特点。《Science》杂志将这一新发现评为 2002 年世界十大科学成就之首。RNA 干扰在基因功能研究、抗肿瘤和抗病毒基因治疗等方面均得到了广泛应用^[5-11]。我们采取基因沉默策略, 利用带 U6 启动子的 PGE-1 载体, 构建在细胞内产生短发夹状 RNA(short hairpin RNA, shRNA)的重组质粒, 并研究其在肝癌细胞中对外源性荧光素酶基因的抑制作用, 进而为应用 RNA 干扰技术来抑制外源基因的表达研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 SCS1 大肠埃希氏菌菌株和表达质粒 pGE-1、pCMV-luc 购自 Stratagene 公司; TaqDNA 聚合酶、

T4DNA 连接酶、AMV 逆转录酶、质粒提取试剂、MgCl₂、荧光素酶检测试剂盒均购自 Promega 公司; 限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Xba* I 购自 MBI 公司; Trizol 试剂盒、RPMI1640 培养基、胎牛血清、低熔点琼脂糖购自 Gibco 公司; 转染试剂 *LyoVec*TM 为 InvivoGen 公司产品; DNA 片段由上海生工生物工程有限公司合成。人肝癌细胞株 Bel-7402 为华中科技大学同济医学院免疫教研室沈关心教授惠赠, 常规培养于含 100 mL/L 胎牛血清、青、链霉素各 100 mg/L 于 RPMI 1640 培养基中, 培养条件为 37 °C、50 mL/L CO₂。待 80% 的细胞贴壁后备用。

1.2 方法

1.2.1 多聚核苷酸序列的设计及质粒的构建 根据 Luciferase mRNA 选择目标序列, 按照 shRNA 的设计原则^[12-13], 设计合成两条含 Luciferase 的反向重复序列, 并利用 BLAST 进行同源搜索, 确定其为特异性序列。正义、反义序列分别为 CGC GCT TGG TAG AGG TGG A 和 TCC ACC TCT ACC AAG CGC G。正义链与反义链之间插入 8 nt 的回折序列 GAAGCTTG; 在之后连接上 6 个 “T”, 此为 RNA 聚合酶 III 的终止子, 另外在反向重复序列的两端分别保留 *Bam* H I 或 *Xba* I 的酶切位点。将设计并合成好的多聚核苷酸, 各取 1 μL, 另外加 dH₂O 3 μL, 10 × 退火缓冲液 5 μL, 93 °C 热冲击 3 min, 然后在至少 30 min 内自然冷却至 37 °C, 即获得含 Luciferase 的退火双链 DNA (double-stranded DNA, dsDNA) 分子。然后将带 U6 启动子的 PGE-1 质粒进行扩增及提取后经电泳、紫外分光光度计检测 (*A*₂₆₀/*A*₂₈₀), 鉴定所提质粒的大小、纯度及含量。然后用限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Xba* I 进行消化, 低熔点琼脂糖凝胶电泳法分离回收酶切片段, 再用苯酚、氯仿各抽提一次, 无水乙醇沉淀 DNA。酶切线性质粒和插入片段的连接条件: PGE-1 线性载体 1 μL, dsDNA 3 μL, rATP 1 μL, 10 × Ligase buffer 1 μL, T4DNA ligase 1 μL, ddH₂O 3 μL, 4 °C 过夜, 连接产物命名为 pshRNA-luc。

1.2.2 重组质粒鉴定 取阳性质粒菌株和重组质粒菌株做 PCR, 引物序列为上游 5′ - CGT CGA TTT TTG TGA TGC TCG TCA G-3′, 下游 3′ -GAA GCA TTT ATC AGG GTT ATT GTC TCA TG-5′, PGE-1 扩增产物的分子大小为 605 bp, pshRNA-luc 为 652 bp。PCR 反应体系如下: 10 × 缓冲液 4.0 μL, dNTP (25 μmol/L) 0.4 μL, 上、下游引物各取 0.8 μL (10 μmol/L), Tween20 (100 g/L) 4 μL, DMSO 2.8 μL, TaqDNA 酶 2.0 U, 总体积 40 μL, 挑取质粒菌株加入 PCR 反应管中, 其扩增条件为: 94 °C 变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环后, 72 °C 延伸 5 min。取 PCR 产物和 DNA Marker 经 50 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染观察并拍照。另外将 PCR 产物送上海博亚生物技术有限公司进行序列分析, 进一步证实 DNA 片段已克隆入载体中。

1.2.3 细胞转染及荧光素酶基因表达的检测 Bel-7402 细胞 1 × 10⁵ 接种于 6 孔板, 37 °C、50 mL/L CO₂ 培养, 待 80% 细胞贴壁后, 换入无血清的 RPMI 1640 培养基 800 μL, 同时分别加入 AB 混合液 200 μL (A 液: 一定量的质粒稀释于 100 μL 无血清 RPMI1640 中; B 液: 25 μL 脂质体稀释于 100 μL 无血清 RPMI 1640 中, 混合 AB 液, 置室温孵育 30 min), 培养 5 h 后加入小牛血清终止转染, 24 h 后换完全培养基, 然后培养不同时间备用。实验设 pCMV-luc 单独转染组和 pCMV-luc、pshRNA-luc 共转染组以及 pCMV-luc、pGE-1-neg 共转染组, 实验重复 3 次。质粒转染细胞培养 24-72 h 观察 (仅 48 h 照相), 细胞单层直接在荧光显微镜下观察荧光素酶在细胞内表达的变化, 并拍照。另外在转染细胞培养 48 h 后, 采用荧光素酶检测试剂盒, 按照其推荐的步骤进行操作, 用荧光素酶测试仪进行手动测定。每个样本重复 3 次, 取平均值。

统计学处理 数据采用 mean ± SD 表示, 用 SPSS10.0 统计软件进行 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 具有统计学差异。

2 结果

2.1 shRNA 表达质粒的构建 pshRNA-luc 重组质粒的构建过程以及其在细胞内从 DNA 模板产生 shRNA 的策略 (见图 1)。

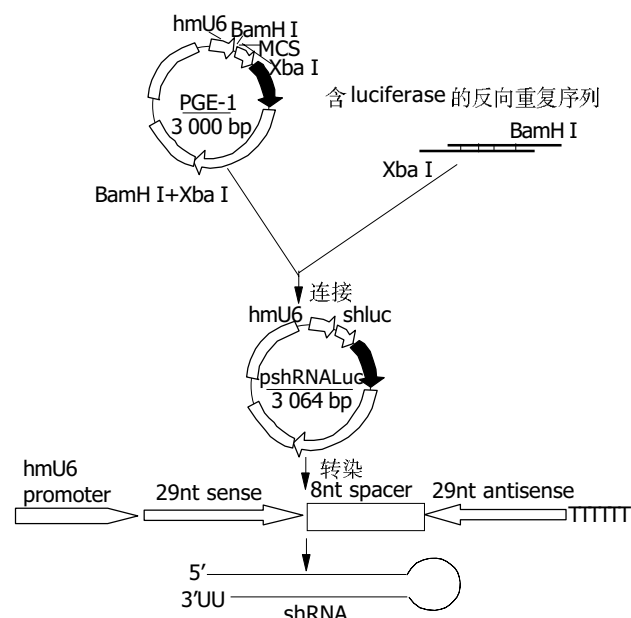


图 1 pshRNA-luc 重组质粒的构建过程及体内由 DNA 模板产生 shRNA 的策略。

2.2 PCR 产物电泳分析 将阳性质粒菌株和重组质粒菌株分别做 PCR, 取 PCR 产物 0.5 μL 用于 50 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染结果显示, 在分子大小 605 bp 和 652 bp 处分别有一条清楚的带, 与预计的相符 (图 2)。另外 DNA 测序结果进一步证实了序列已克隆入载体中。

2.3 荧光素酶的表达水平 荧光显微镜观察 pshRNA-luc

和pCMV-luc共转染后肝癌细胞内荧光的表达明显比单独转染组减少(图3)。取细胞裂解液2 μ L测定荧光素酶活性, pshRNA-luc 共转染组比单独转染组降低了86%, $P < 0.01$, 而阴性质粒组与单独转染组差异很小(图4)。

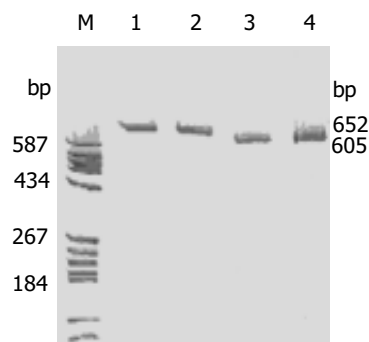


图2 质粒PCR扩增产物聚丙烯酰胺电泳图。M: Marker; 1、2: 为pshRNA-luc扩增产物; 3、4: 为PGE-1扩增产物。

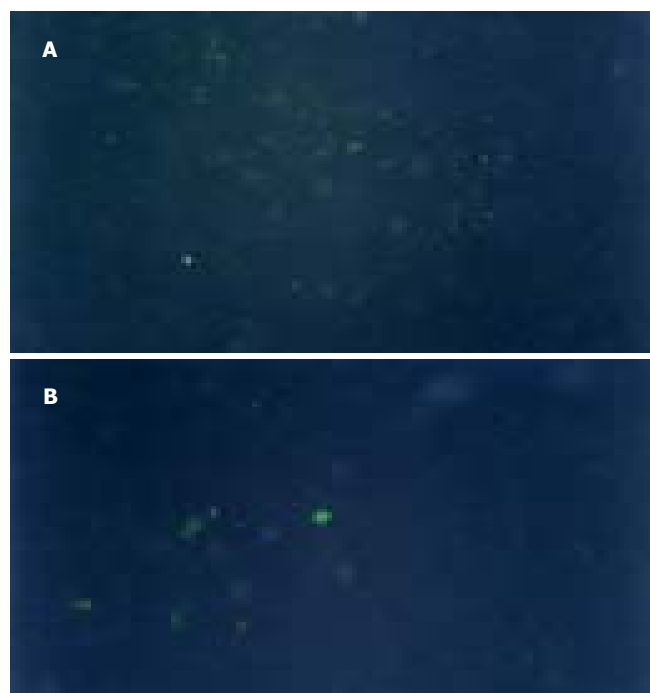


图3 荧光显微镜观察 luciferase 在肝癌细胞中的表达变化。A: pCMV-luc 转染组; B: pshRNA-luc 和 pCMV-luc 共转染组。

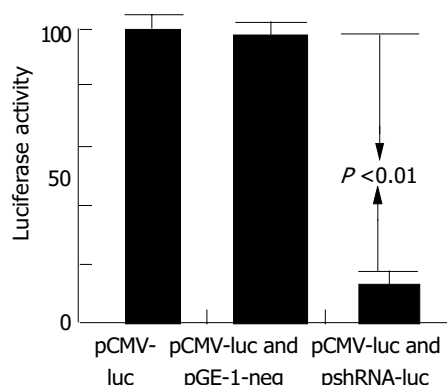


图4 荧光素酶活性检测结果。

3 讨论

自1998年Fire *et al*^[14]首次提出RNA干扰的概念以来,他很快就成为分子生物学领域研究的主要技术手段之一,在人类基因功能研究、信号转导及基因治疗方面已显现出了巨大的前景。目前利用RNAi对乙型肝炎^[15-16]、丙型肝炎^[17]、白血病^[18]、艾滋病^[19]的研究已取得了一定进展,成功地下调了相关基因的表达。研究表明,siRNA具有抑制作用强、稳定性高、细胞摄取相对容易等优点,正逐渐取代反义核酸,成为新的研究热点^[20]。诱导哺乳动物细胞RNAi的关键在于如何有效合成短干扰RNA,目前siRNA来源有:(1)化学合成,(2)体外转录,(3)利用载体导入相应的发夹结构基因,然后在启动子(主要为H1多聚酶III和U6启动子)的作用下转录出shRNA,进而直接在细胞内诱导RNAi。虽然均有成功试验的报道^[21-23],但由于化学合成和体外转录费用较高,转染效率低,抑制作用短暂,且需要多次重复导入等缺点,因此限制了其应用和推广。我们所构建的质粒产生shRNA的方法所产生的shRNA体内抑制目的基因的效果与合成siRNA相似,但花费小、成本低,可在细胞内稳定产生shRNA,且在转染时还可克服合成siRNA可能造成的RNase污染^[24]。

由于荧光素酶作报告基因具有灵敏度高、易检测等特点,所以他广泛应用于分子生物学研究中^[25-26]。我们构建了在细胞内产生荧光素酶shRNA的重组质粒,并探讨其对所转染的报告基因荧光素酶表达水平的影响。结果表明:转染pshRNA-luc后能有效并特异地抑制了外源荧光素酶在肝癌细胞中的表达,其抑制率达80%以上($P < 0.01$),与Ma *et al*^[27]的研究结果相似。我们的实验结果明确地显示,在肝癌细胞中U6启动子转录短发状RNA介导的RNA干扰可以显著地降低相应序列基因的表达,而且这种抑制是特异的,说明我们的发夹样结构设计合理,通过PGE-1载体构建对靶基因表达的shRNA重组质粒,导入肿瘤细胞后,在细胞内直接诱导RNAi的方法可行^[28]。这在肝癌细胞系中利用RNAi来研究目的基因的功能奠定了基础,也为利用导入含外源基因的短发夹RNA来进行肿瘤基因治疗提供理论依据。RNAi用于肿瘤的研究才刚刚开始,但是已经显示出了巨大的潜力,将成为肿瘤基因治疗的新希望^[29-31]。

4 参考文献

- Sharp PA. RNA interference-2001. *Genes Dev* 2001;15:485-490
- Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002;418:244-251
- Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003;67:657-685
- 任玥欣, 宋于刚, 陈学清. RNAi研究进展. *世界华人消化杂志* 2004;12: 748-750
- Wang QC, Nie QH, Feng ZH. RNA interference: Antiviral weapon and beyond. *World J Gastroenterol* 2003;9:1657-1661
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference.

- Cancer Cell* 2002;2:243-247
- 7 Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 2003;9:347-351
 - 8 成军, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚. RNA干扰与抗肝炎病毒治疗前景的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1264-1266
 - 9 李宁, 范学工. RNA干扰的抗病毒效应. *世界华人消化杂志* 2003;11:1769-1772
 - 10 陆嵘, 房静远. RNA干扰技术与消化系统肿瘤的基因治疗. *世界华人消化杂志* 2004;12:959-961
 - 11 万志红, 王宇明. 基因功能研究新途径 - RNA干扰. *世界华人消化杂志* 2004;12:962-964
 - 12 Tuschl T. Expanding small RNA interference. *Nat Biotechnol* 2002;20:446-448
 - 13 Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 2002;26:199-213
 - 14 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-811
 - 15 Tang N, Huang AL, Zhang BQ, Yan G, He TC. Potent and specific inhibition of hepatitis B virus antigen expression by RNA interference. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2003;83:1309-1312
 - 16 Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology* 2003;37:764-770
 - 17 Kronke J, Kittler R, Buchholz F, Windisch MP, Pietschmann T, Bartenschlager R, Frese M. Alternative approaches for efficient inhibition of hepatitis C virus RNA replication by small interfering RNAs. *J Virol* 2004;78:3436-3446
 - 18 Scherr M, Battmer K, Winkler T, Heidenreich O, Ganser A, Eder M. Specific inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA. *Blood* 2003;101:1566-1569
 - 19 Jacque JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 2002;418:435-438
 - 20 Morrow T. Making sense of antisense and interference. *Manag Care* 2003;12:62-63
 - 21 Donze O, Picard D. RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e46
 - 22 Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:6047-6052
 - 23 Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 2002;16:948-958
 - 24 Sui G, Soohoo C, Affarell B, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:5515-5520
 - 25 Liang XS, Lian JQ, Zhou YX, Nie QH, Hao CQ. Inhibitory effect of IRES specific inhibitor RNA on HCV IRES mediated protein translation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:157-160
 - 26 Chen YC, Song C, Luo CQ. Short hairpin RNAs induced RNA interference in human cells. *Ai Zheng* 2003;22:566-570
 - 27 Ma X, Lu X, Peng J, Tan S, Yuan Z, Yin F, Wang H, Wu X, Hou Y. Inhibition of luciferase expression in mammalian cells by AAV vector plasmid mediated Luciferase shRNA. *Zhonghua Shiyen He Linchuang Bingduxue Zazhi* 2002;16:253-255
 - 28 Miyagishi M, Taira K. Development and application of siRNA expression vector. *Nucleic Acids Res Suppl* 2002;2:113-114
 - 29 Cioca DP, Aoki Y, Kiyosawa K. RNA interference is a functional pathway with therapeutic potential in human myeloid leukemia cell lines. *Cancer Gene Ther* 2003;10:125-133
 - 30 Ichim TE, Li M, Qian H, Popov IA, Rycerz K, Zheng X, White D, Zhong R, Min WP. RNA interference: a potent tool for gene-specific therapeutics. *Am J Transplant* 2004;4:1227-1236
 - 31 Borkhardt A. Blocking oncogenes in malignant cells by RNA interference-new hope for a highly specific cancer treatment. *Cancer Cell* 2002;2:167-168

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎征订《英语科技论文撰写与投稿》

本书是英语科技论文写作与投稿的指南读物, 可作为理工科研究生的教学用书或自学教材, 也可供科研人员和科技编辑的案头查阅和浏览。

书中全方位地分析和展示了科技写作的技巧与诀窍, 介绍了当前国际主流科技期刊对稿件的基本要求。从论文选题、投稿期刊的选择及作者署名与分工等方面阐述了科技论文写作前的准备工作, 通过大量实例分析介绍了英文题名和摘要撰写中应遵循的基本原则 - 准确(Accuracy)、简洁(Brevity)和清楚(Clarity), 分别从写作技巧、时态和语态的使用等方面介绍了科技论文正文各部分(引言、材料与方法、研究结果、讨论、结论)的撰写, 举例说明了致谢的写作要点及图表制作的注意事项, 总结了各主要参考文献体例的特点、格式及相关著录规范。

本书还较为全面地介绍了国际单位制(SI)及其使用中应注意的问题, 结合实例举证, 从选词、重要语法和文体等方面系统阐述了科技英语写作的文法与表达, 较为详尽地总结了英文标点符号的使用, 从稿件录排、投稿信写作、校样改正等方面阐述了如何投稿及与编辑联系, 综述了作者、编辑和审稿人在同行评议过程中的交流与互动。

本书论述缜密、案例丰富。为方便读者进一步追溯和研读相关资料, 书中按章节形式标引了参考文献约 220 篇(次)。

编著: 任胜利, 理学博士, 《自然科学进展》责任编辑, 1998 年以来先后在 *Science*, *Nature*, *Scientometrics*, *Learned Publishing*, 《科学通报》、《编辑学报》、《中国科技期刊研究》等期刊上发表文献计量学、科技编辑与写作方面的论文 30 余篇。出版: 科学出版社。定价: 28 元 + 2 元(邮费)。邮购地址: 100085, 国家自然科学基金委员会科学基金杂志社办公室, 北京市海淀区双清路 83 号。联系人: 刘俐, 程宇。联系电话: 010-62327204; 传真: 010-62326921。开户银行: 中国工商银行北京北太平庄支行 开户名: 国家自然科学基金委员会科学基金杂志社, 帐号: 0200010009200062483。(国家自然科学基金委员会科学基金杂志社 2004-05-20)