

# 慢病毒表达载体的构建及沉默FOXQ1基因在大肠癌细胞系DLD-1中的表达

白璇, 唐慧, 郎丰超, 郭强

## ■背景资料

FOXQ1(forkhead box Q1)是一种转录因子, 在大肠癌组织中呈高表达, FOXQ1基因的高表达可促进大肠癌肿瘤细胞的浸润和转移。

白璇, 郭强, 昆明医科大学 云南省第一人民医院(昆明医科大学附属昆华医院)消化内科 云南省昆明市 650032

唐慧, 云南省第一人民医院(昆明医科大学附属昆华医院)临床基础医学研究所 云南省昆明市 650032

郎丰超, 中国科学院昆明动物研究所 云南省昆明市 650032  
白璇, 在读硕士, 主要从事消化系统肿瘤分子机制的基础研究和消化内镜的临床应用。

国家自然科学基金资助项目, No. 81260323

云南省科技厅-昆明医科大学联合基金资助项目, No. 2012FB095

昆明医科大学研究生创新基金资助项目, No. 2012J004

云南省中青年学术技术带头人后备人才培养基金资助项目, No. 2013HB083

作者贡献分布: 此课题由郭强与唐慧设计; 研究过程由白璇操作完成; 唐慧负责实验指导; 郎丰超负责FOXQ1 shRNA的设计; 郭强与唐慧负责论文指导与修改; 论文写作由白璇完成。

通讯作者: 郭强, 教授, 主任医师, 650032, 云南省昆明金碧路157号, 云南省第一人民医院(昆明医科大学附属昆华医院)消化内科。gqkj003@sina.com

电话: 0871-63638772 传真: 0871-63648772

收稿日期: 2014-03-28 修回日期: 2014-04-17

接受日期: 2014-04-28 在线出版日期: 2014-07-08

## Construction of lentiviral expression vectors to silence expression of FOXQ1 gene in colorectal cancer cell line DLD-1

Xuan Bai, Hui Tang, Feng-Chao Lang, Qiang Guo

Xuan Bai, Qiang Guo, Department of Gastroenterology, Kunming Medical University, the First People's Hospital of Yunnan Province (Affiliated Kunhua Hospital of Kunming Medical University), Kunming 650032, Yunnan Province, China

Hui Tang, Institute of Basic Medicine, the First People's Hospital of Yunnan Province (Affiliated Kunhua Hospital of Kunming Medical University), Kunming 650032, Yunnan Province, China

Feng-Chao Lang, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81260323; Science and Technology Department of Yunnan Province-Kunming Medical University Joint Foundation, No. 2012FB095; Graduate Innovation Fund of Kunming Medical University, No. 2012J004; Middle Younger Academic and Technological Foregoer and Reserve Talents Cultivation Foundation of Yunnan Province, No. 2013HB083

Correspondence to: Qiang Guo, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First People's Hospital of Yunnan Province (Affiliated Kunhua Hospital of

Kunming Medical University), 157 Jinbi Street, Kunming 650032, Yunnan Province, China. gqkj003@sina.com

Received: 2014-03-28 Revised: 2014-04-17

Accepted: 2014-04-28 Published online: 2014-07-08

## Abstract

**AIM:** To construct lentiviral vectors to silence the expression of the FOXQ1 gene in colorectal cancer cell line DLD-1.

**METHODS:** According to the FOXQ1 gene sequence, three pairs of shRNAs were designed and synthesized, and then ligated to the lentiviral PLKO.1 vector. After the resulting plasmids were transfected into STB13 competent cells and cultured on ampicillin resistant culture plates, single colonies were picked to prepare plasmid DNA. The plasmids were identified by enzyme digestion and DNA sequencing. The identified plasmids and auxiliary packaging plasmids including pRSV-rev, pMDlg-pRRE, pCMV-VSV-G were jointly infected into 293-T cells by the calcium phosphate transfection method, and the lentivirus supernatants were obtained and used for infecting DLD-1 cells. After selection with puromycin, the FOXQ1-silenced cells were obtained. The efficiency of gene knockdown was then determined by real-time PCR and Western blot.

**RESULTS:** Enzyme digestion and DNA sequencing results showed that the shRNAs were successfully inserted into the PLKO.1 vector. Recombinant plasmids were transfected into 293-T cells and high-titer lentiviruses were formed. The lentiviruses was transduced into DLD-1 cells. FOXQ1-silenced cells were obtained after selection. Real-time PCR data and Western blot showed that the highest inhibitory efficiency for FOXQ1 expression was approximately 90.4%.

**CONCLUSION:** FOXQ1-silenced cells have been successfully obtained by constructing a lentivirus interference system, which provide an experimental foundation for further study of the

## ■同行评议者

肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

function of the *FOXQ1* gene in tumorigenesis.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: *FOXQ1* gene; Lentiviral vector; RNA interference; Gene silencing

Bai X, Tang H, Lang FC, Guo Q. Construction of lentiviral expression vectors to silence expression of *FOXQ1* gene in colorectal cancer cell line DLD-1. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(19): 2752-2757 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2752.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i19.2752>

## 摘要

**目的:** 构建*FOXQ1*基因shRNA慢病毒干扰系统, 沉默*FOXQ1*基因在大肠癌细胞系DLD-1中的表达。

**方法:** 根据 *FOXQ1*基因的序列, 设计合成3对shRNA干扰序列, 退火后连接到载体质粒PLKO.1-puro, 将重组质粒转化至STB13感受态中, 涂板培养挑取单菌落, 摇菌后小提质粒, 选取酶切及测序鉴定正确的重组质粒去内毒素大提, 将质粒与辅助包装质粒pRSV-rev、pMDlg-pRRE和pCMV-VSV-G利用磷酸钙法共转染293-T细胞, 收集病毒上清, 感染目的细胞DLD-1, 嘌呤霉素筛选*FOXQ1*沉默细胞, 经荧光定量PCR及Western blot检测干扰效果。

**结果:** 酶切及测序结果显示shRNA成功插入载体PLKO.1-puro中, 共转染293-T细胞成功获取病毒上清, 感染DLD1细胞, 经嘌呤霉素筛选出*FOXQ1*沉默细胞, 荧光定量PCR及Western blot鉴定*FOXQ1*基因表达最高抑制率为90.4%。

**结论:** 通过构建*FOXQ1*基因shRNA慢病毒干扰系统, 成功获取*FOXQ1*基因沉默细胞。为后续*FOXQ1*基因在肿瘤发生发展的研究奠定实验基础。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:** *FOXQ1*基因; 慢病毒载体; RNA干扰; 基因沉默

**核心提示:** 研究*FOXQ1*(forkhead box Q1)基因在大肠癌肿瘤生成中的功能及其分子机制, 有望发现*FOXQ1*基因在大肠癌发生发展中涉及的相关信号通路及其下游靶分子, 为人类大肠癌基因诊治提供新思路。

白璇, 唐慧, 郎丰超, 郭强. 慢病毒表达载体的构建及沉默*FOXQ1*基因在大肠癌细胞系DLD-1中的表达. *世界华人消化杂志* 2014; 22(19): 2752-2757 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2752.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i19.2752>

## 0 引言

叉头框(forkhead, Fox)蛋白是一类转录因子(transcription factor, TF), 其家族成员众多生物学功能广泛, 涉及胚胎发育、细胞周期、糖类和脂类代谢、生物老化、免疫调节等多种生物学过程, 且其突变和表达异常与发育畸形、代谢性疾病以及肿瘤发生均有关<sup>[1]</sup>. *FOXQ1*(forkhead box Q1)基因属于Fox家族的Q亚族, 近年研究发现*FOXQ1*基因在不同来源肿瘤的发生发展中起着重要作用<sup>[2-6]</sup>, 研究探讨*FOXQ1*在肿瘤发生发展中的功能, 对未来人类肿瘤的诊治具有深远意义. 核酸干扰(RNA interference, RNAi)是由双链RNA(double strand RNA, dsRNA)介导的、具有序列特异性的转录后基因沉默现象, 其作用机制具有普遍性、特异性、高效性、位置效应等特点<sup>[7]</sup>. 在沉默基因的表达方面, 因为任何导致或者促进疾病发生的蛋白质都容易受RNAi影响, 已被广泛应用于探索基因功能和传染性疾病及恶性肿瘤的基因治疗领域<sup>[8]</sup>. 本文通过构建*FOXQ1*基因shRNA慢病毒表达载体, 并获得*FOXQ1*基因沉默细胞, 为进一步研究*FOXQ1*在肿瘤发生发展中的功能奠定实验基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 慢病毒表达载体质粒PLKO.1-puro, 包装结构质粒 pRSV-rev、pMDlg-pRRE, 包膜蛋白质粒pCMV-VSV-G以及STB13感受态细胞均由中国科学院昆明动物研究所馈赠; shRNA由上海生工生物工程有限公司合成; 293-T细胞及大肠癌细胞系DLD-1均购自中国科学院细胞库; 质粒小提试剂盒及无内毒素质粒大提试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; 限制性内切酶 *Age* I、*Eco*R I、*Nco* I、T4 DNA ligase购自Takara公司; RPMI 1640培养基、DMEM培养基及0.05%胰蛋白酶均购自Hyclone公司; 澳洲特级胎牛血清及青霉素-链霉素溶液购自Bioind公司; 2×HBS及25 mol/L CaCl<sub>2</sub>由中国科学院昆明动物研究所馈赠并自行配制; 嘌呤霉素购自Solarbio公司; Biozol Reagent购自Biomiga公

## ■ 研究前沿

FOX(forkhead box)转录因子家族分子参与多种生物学活性的调控, 近年研究表明, 作为家族成员的*FOXQ1*基因在肿瘤发生发展中发挥重要作用, 但该基因在大肠癌中的功能机制尚未阐明。

## ■ 相关报道

Abba、Kaneda、Myatt、郭强及唐慧等分别研究了FOXQ1在大肠癌组织中的表达,结果表明FOXQ1基因在大肠癌组织中高表达,并与肿瘤细胞的浸润和转移密切相关。

表 1 FOXQ1基因的siRNA靶序列

序列名称	序列(5'→3')
siRNA-A	CTCCATCAAACGTGCCTTA
siRNA-B	GCTATTGACCGATGCTTCA
siRNA-C	CTTGAAAGCAAGTGTGATT

司, GoScontrolipt<sup>TM</sup> Reverse Transcontroliption System试剂盒购自Promega公司, SYBR Premix Ex Taq II购自Takara公司; 鼠抗人FOXQ1抗体和兔抗人 $\beta$ -actin抗体均购自Abcam公司; HRP-Goat Anti-Mouse IgG(H+L)与HRP-Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)均购自Proteintech公司; Tween-20购自Amresco; 疏水性PVDF转印膜购自Millipore公司; 脱脂奶粉购自完达山公司; 细胞蛋白提取液、蛋白酶抑制剂混合物III型、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒及SDS蛋白上样缓冲液均购自武汉博士德生物有限工程公司; BCA蛋白定量试剂盒购自碧云天生物技术研究所; SuperSignal West Pico HRP化学发光底物购自美国Pierce公司; 预染蛋白Marker购自Thermo公司; 6孔细胞培养板及10 cm<sup>2</sup>细胞培养皿购自BD falcon公司; 病毒超滤离心管购自Millipore公司; 琼脂糖凝胶成像及Western blot凝胶成像所用仪器为Chemidoc XRS化学发光成像系统; RNA浓度测定所用仪器为NanoDrop; 实时定量PCR扩增仪为罗氏LightCycler 480; 测序由上海生工生物工程有限公司完成。

## 1.2 方法

1.2.1 设计合成shRNA: 根据FOXQ1的mRNA全序列, 得到siRNA靶序列(表1), 设计合成两条shRNA的模板单链, 包括Age I 酶切位点, 19 nt 靶核苷酸序列, 茎环结构(CTCGAG), 靶序列互补序列, RNA ployIII聚合酶转录终止点(TTTTT), EcoR I 酶切位点, 共设计3条干扰序列, 命名为shRNA-A、shRNA-B和shRNA-C(表2)。shRNA序列由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.2 设计合成RT-PCR引物: 根据FOXQ1的基因序列设计引物, 上游引物FOXQ1-F: 5'-GGCAACGGGCTACAGCTTTA-3', 下游引物FOXQ1-R: 5'-GGCACCCACACATACATAATCAA-3'。GAPDH作为内参基因, 序列为: 上游引物GAPDH-F: 5'-TGA CTTCAACAGCGACACCCA-3', 下游引物GAPDH-R: 5'-CACCCCTGTTGCTGTAGCCAAA-3'。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.3 慢病毒载体构建与鉴定: 将合成的shRNA寡核苷酸定量混合, 退火后形成双链的shRNA, 载体质粒PLKO.1-puro经限制性内切酶Age I 和EcoR I 双酶切后, 电泳, 切胶回收, 用T4 DNA ligase将shRNA与载体质粒PLKO.1-puro连接, 形成重组质粒PLKO.1-FOXQ1-shRNA-A、PLKO.1-FOXQ1-shRNA-B和PLKO.1-FOXQ1-shRNA-C, 将各重组质粒转化至感受态STB13中, 分别涂布于氨苄青霉素抗性LB平板中, 37 °C培养14 h, 挑取单菌落PLKO.1-FOXQ1-shRNA-A、PLKO.1-FOXQ1-shRNA-B和PLKO.1-FOXQ1-shRNA-C, 每组5个, 摇菌12 h, 小提质粒, 送上海生工测序。每组挑选一个序列正确的重组质粒, 用去内毒素大提试剂盒提取质粒, 测浓度, 限制性内切酶EcoR I 和Nco I 酶切鉴定。

1.2.4 慢病毒的包装: 接种 $3 \times 10^6$ 个293-T细胞于10 cm<sup>2</sup>培养皿中, 用DMEM完全培养基, 5%CO<sub>2</sub>、37 °C孵箱培养, 待24 h后细胞密度长至50%-70%时转染, 利用磷酸钙转染法将重组质粒PLKO.1-FOXQ1-shRNA与辅助包装质粒pRSV-rev、pMDlg-pRRE和pCMV-VSV-G以8  $\mu$ g : 4  $\mu$ g : 4  $\mu$ g : 4  $\mu$ g共转染293-T细胞, 转染6 h后更换新鲜培养液, 转染48 h后分别收集病毒上清培养液, 0.45  $\mu$ m筛子过滤病毒液至超滤离心管, 获得浓缩病毒液VshRNA-A、VshRNA-B和VshRNA-C, 以相同的方法包装不含siRNA-FOXQ1序列的空病毒载体为VshRNA-control, 四组浓缩病毒液分装后保存于-80 °C保存或直接用于感染DLD1细胞。

1.2.5 感染DLD1细胞: 分为四个实验组: (1)VshRNA-A; (2)VshRNA-B; (3)VshRNA-C; (4)VshRNA-mix, 第四组即前三组病毒按1 : 1 : 1混合, 并同时设立一个对照组: VshRNA-control。接种DLD1细胞于6孔板, 每孔 $3 \times 10^5$ 个细胞, 用1640完全培养液5%CO<sub>2</sub>、37 °C孵箱培养, 24 h后细胞密度长至50%-70%, 更换新鲜培养液, 加入浓缩病毒液, 每组3孔, 病毒感染24 h后用10  $\mu$ g/mL的嘌呤霉素筛选细胞, 同时设置阴性组(不加病毒不加嘌呤霉素, 单纯的DLD1细胞), 阴性加药组(不加病毒加8  $\mu$ g/mL嘌呤霉素, 用于观察阴性细胞死亡情况), 筛选3-5 d, 每2 d更换培养液, 最终获得五株细胞: DshRNA-A、DshRNA-B、DshRNA-C、DshRNA-mix和DshRNA-control。

1.2.6 RT-PCR检测FOXQ1基因相对表达量:



表 2 FOXQ1基因的shRNA序列

名称	Age I	正义链	Loop	反义链	终止子	EcoR I
shRNA-A	5'-CCGG	CTCCATCAAACGTGCCTTA	CTCGAG	TAAGGCACGTTTGATGGAG	TTTTT	G-3'
	3'-	GAGGTAGTTTGCACGGAAT	GAGCTC	ATTCGTGCAAACCTACCTC	AAAAA	CTTAA-5'
shRNA-B	5'-CCGG	GCTATTGACCGATGCTTCA	CTCGAG	TGAAGCATCGGTCAATAGC	TTTTT	G-3'
	3'-	CGATAACTGGCTACGAAGT	GAGCTC	ACTTCGTAGCCAGTTATCG	AAAAA	CTTAA-5'
shRNA-C	5'-CCGGT	CTTGAAAGCAAGTGTGATT	CTCGAG	AATCACACTTGCTTTCAAG	TTTTT	G-3'
	3'-AA	GAACTTTCGTTCACTACTAA	GAGCTC	TTAGTGTGAACGAAAGTTC	AAAAA	CTTAA-5'

## ■创新盘点

本文首次通过构建FOXQ1慢病毒表达载体获得大肠癌FOXQ1基因沉默细胞系, RT-PCR及Western blot证实FOXQ1 mRNA及蛋白在大肠癌细胞系DLD-1中的表达显著降低。

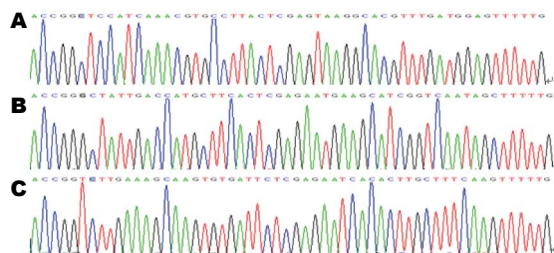


图 1 重组质粒PLKO.1-FOXQ1-shRNA测序结果. A: PLKO.1-FOXQ1-shRNA-A; B: PLKO.1-FOXQ1-shRNA-B; C: PLKO.1-FOXQ1-shRNA-C.

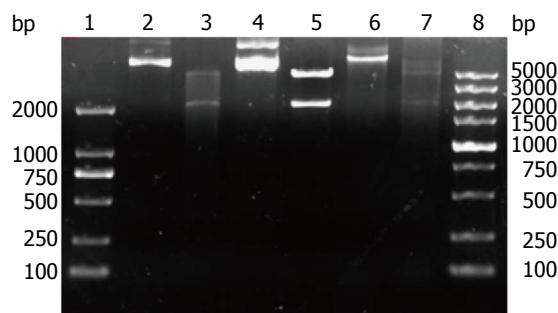


图 2 重组质粒电泳及双酶切鉴定电泳. 1: DL2000; 2: PLKO.1-FOXQ1-shRNA-A; 3: PLKO.1-FOXQ1-shRNA-A双酶切; 4: PLKO.1-FOXQ1-shRNA-B; 5: PLKO.1-FOXQ1-shRNA-B双酶切; 6: PLKO.1-FOXQ1-shRNA-C; 7: PLKO.1-FOXQ1-shRNA-C双酶切; 8: DL5000.

DLD1细胞感染慢病毒72 h后, 弃去培养液, 用Biozol Reagent试剂裂解以上5株细胞和DLD1细胞, 提取细胞总RNA, 取2  $\mu$ g RNA经Promega逆转录试剂盒逆转录获得cDNA第一链, 取2  $\mu$ L cDNA作为模板, 利用SYBR Green及实时定量PCR扩增仪扩增FOXQ1基因, 收集荧光信号, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算出FOXQ1基因在各组细胞中的相对表达量。

**1.2.7 Western blot分析FOXQ1蛋白质:** DLD1细胞感染慢病毒96 h后, 弃去培养液, 5组细胞各用PBS洗1次, 加入150  $\mu$ L细胞裂解液, 并快速将裂解的细胞刮离皿底壁, 4  $^{\circ}$ C下继续裂解30 min, 收集蛋白至1.5 mL离心管中, 12000 r/min离心15 min, 吸取上清液, 利用BCA法蛋白浓度检测试剂盒进行蛋白定量后, 加入等体积的上样缓冲液煮沸5 min. 以每孔20  $\mu$ g的蛋白量进行10%SDS-PAGE电泳, 将蛋白电转至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉封闭1 h后, 分别加入FOXQ1和 $\beta$ -actin一抗摇床4  $^{\circ}$ C孵育过夜, TBST液洗膜3-5次后, 分别以辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG-HRP及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG-HRP为二抗, 室温摇床孵育1 h, 经TBST液洗膜30 min, 表面滴加SuperSignal West Pico HRP化学发光底物, 于Chemidoc XRS化学发光成像系统中曝光显影。

**统计学处理** 实验所得数据采用mean  $\pm$  SD

表示, 各组之间的比较采用单因素方差分析(ANOVA)进行组间差异显著性检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 重组质粒PLKO.1-FOXQ1-shRNA测序鉴定** 将选取的15个样本送至上海生工生物工程有限公司测序, 检测载体插入位点外源的shRNA是否正确插入, 将测序得到插入位点核酸序列与前期设计的shRNA对比, 结果显示3个实验组PLKO.1-FOXQ1-shRNA-A, PLKO.1-FOXQ1-shRNA-B, PLKO.1-FOXQ1-shRNA-C准确率分别为2/5, 3/5, 2/5(图1), 双链shRNA已正确插入慢病毒表达载体中。

**2.2 重组质粒PLKO.1-FOXQ1-shRNA电泳检测及双酶切鉴定** 将测序正确的3个重组慢病毒表达载体去内毒素大提, 经电泳, 可见一>5000 bp的条带, 与预期的7000 bp相符, 经EcoR I和Nco I双酶切后, 可见大小约为5000和2000 bp的两条带, 均与预期相符(图2)。

**2.3 RT-PCR检测FOXQ1基因相对表达量** 结果显示, 各组FOXQ1基因shRNA慢病毒感染DLD1细胞, FOXQ1基因的表达量均有降低(图3), 与

## ■应用要点

本文成功构建了大肠癌FOXQ1沉默细胞,为后续进行体内实验,研究FOXQ1基因在大肠癌发生发展中的功能、分子机制等奠定实验基础。

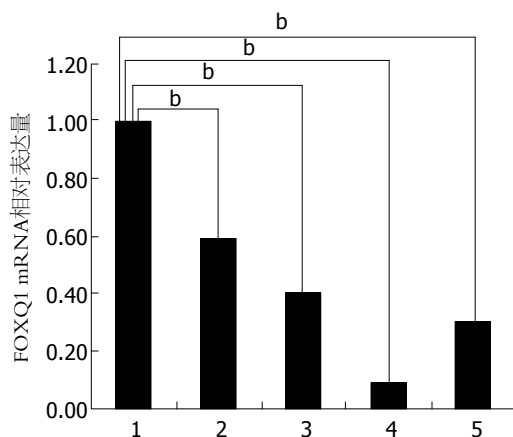


图3 RT-PCR检测FOXQ1基因mRNA相对表达量。1: DshRNA-control; 2: DshRNA-A; 3: DshRNA-B; 4: DshRNA-C; 5: DshRNA-mix. <sup>b</sup> $P < 0.01$ .

DshRNA-control组细胞相比, DshRNA-A、DshRNA-B、DshRNA-C和DshRNA-mix组细胞FOXQ1表达抑制率分别约为39.7% ( $P < 0.01$ ), 59.6% ( $P < 0.01$ ), 90.4% ( $P < 0.01$ ), 70.5% ( $P < 0.01$ ). 可见shRNA-C干扰片段对FOXQ1基因表达抑制效果最为明显. 说明实验中设计的慢病毒携带shRNA干扰片段能有效抑制FOXQ1基因在大肠癌细胞系DLD1中的表达, 并且shRNA-C干扰片段对FOXQ1基因表达抑制效果最为显著.

2.4 Western blot分析FOXQ1蛋白质 结果显示, 与DshRNA-control组细胞相比, 各组FOXQ1基因shRNA慢病毒感染DLD1细胞, FOXQ1蛋白表达均降低(图4), 其中shRNA-C干扰片段对FOXQ1蛋白表达抑制效果最为明显. 说明实验中设计的慢病毒携带shRNA干扰片段能有效抑制FOXQ1基因和蛋白质在大肠癌细胞系DLD1中FOXQ1蛋白的表达.

### 3 讨论

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是我国发病率最高的三大肿瘤之一, 并且每年以4.2%的速度增长, 远超2%的国际增长水平<sup>[9]</sup>. 人FOXQ1基因定位于人体6号染色体短臂25.3区(6p25.3), 全长2319 bp, 仅含1个外显子, 编码403个氨基酸<sup>[10]</sup>, 其功能可以稳定结合靶基因启动子区域的GC盒等核心元件, 控制基因转录活性而发挥生物效应<sup>[11]</sup>. 近年研究证实FOXQ1 mRNA在大肠癌中呈高表达, 同时FOXQ1的高表达能增强大肠癌肿瘤细胞的转移和浸润<sup>[3,5]</sup>. 我们的前期研究表明, FOXQ1 mRNA和蛋白质的表达水平随着大肠腺瘤→大肠腺癌这一病理进程逐步升

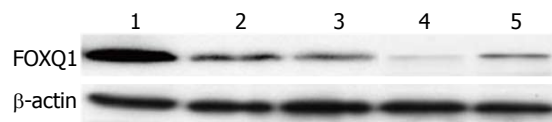


图4 Western blot检测FOXQ1基因蛋白相对表达量。1: DshRNA-control; 2: DshRNA-A; 3: DshRNA-B; 4: DshRNA-C; 5: DshRNA-mix.

高<sup>[6,12]</sup>, 同时FOXQ1基因在大肠腺瘤癌变过程中, 在包括表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)信号通路在内的众多信号通路中发挥一定作用<sup>[13,14]</sup>. 为进一步研究FOXQ1基因在大肠癌发生发展中的功能, 本文通过构建FOXQ1基因shRNA慢病毒表达载体, 沉默大肠癌细胞DLD1中FOXQ1基因的表达, 建立稳定的FOXQ1基因沉默细胞, 为下一步开展体内实验奠定实验基础.

RNAi技术近年发展突飞猛进, 成为基因组学和蛋白组学研究的主要手段之一, 在人类基因功能、信号转导和基因诊断治疗研究方面显示出巨大的前景. 慢病毒载体因其转染效率高, 可以感染分裂期细胞和非分裂期细胞, 免疫反应小, 无复制能力, 可转移基因片段较大, 目的基因与宿主基因组整合, 实现目的基因的较长时间表达等优点, 成为基因功能研究和基因治疗的有力手段<sup>[15,16]</sup>. 以HIV-1来源为代表的慢病毒载体由载体成分和包装成分组成. 载体成分含有包装、逆转录和整合所需的顺式作用元件, 同时具有异源启动子控制下的多克隆位点, 以及插入的外源目的基因. 包装成分含有编码产生病毒颗粒所必需的蛋白的结构基因<sup>[8]</sup>. 本文用VSV-G代替HIV-1的包膜蛋白使病毒感染细胞能力增强, 四质粒共转染293T细胞, 可获得高滴度、高感染力而不能复制的安全性慢病毒载体<sup>[15]</sup>. shRNA是包括两个短反向重复序列的RNA序列, 他可以克隆到表达载体并表达短的siRNA的DNA分子. 利用慢病毒构建的shRNA载体, 可以在感染后整合到受感染细胞的基因组, 进行长时间地稳定表达, 具有高效、稳定、特异性强等特点<sup>[17,18]</sup>.

本实验针对FOXQ1基因设计干扰片段shRNA, 利用慢病毒携带shRNA感染人大肠癌细胞DLD1, 并将目的基因整合到细胞的基因组中, 高效、稳定、持续地产生siRNA特异性地抑制FOXQ1基因的表达. 三组干扰片段是针对FOXQ1基因的不同位点设计的, 通过RT-

PCR及Western blot检测FOXQ1基因干扰效果, shRNA-C组抑制效率最高, 达90.4%。为后续今后深入研究FOXQ1基因在结直肠肿瘤发生发展中的作用机制奠定了良好的实验基础。

#### 4 参考文献

- 1 曹冬梅, 卢建. 叉头框(Fox)转录因子家族的结构与功能. 生命科学 2006; 18: 491-496
- 2 Xia L, Huang W, Tian D, Zhang L, Qi X, Chen Z, Shang X, Nie Y, Wu K. Forkhead box Q1 promotes hepatocellular carcinoma metastasis by transactivating ZEB2 and VersicanV1 expression. *Hepatology* 2014; 59: 958-973 [PMID: 24005989 DOI: 10.1002/hep.26735]
- 3 Kaneda H, Arai T, Tanaka K, Tamura D, Aomatsu K, Kudo K, Sakai K, De Velasco MA, Matsumoto K, Fujita Y, Yamada Y, Tsurutani J, Okamoto I, Nakagawa K, Nishio K. FOXQ1 is overexpressed in colorectal cancer and enhances tumorigenicity and tumor growth. *Cancer Res* 2010; 70: 2053-2063 [PMID: 20145154 DOI: 10.1158/0008-5472]
- 4 Christensen J, Bentz S, Sengstag T, Shastri VP, Anderle P. FOXQ1, a novel target of the Wnt pathway and a new marker for activation of Wnt signaling in solid tumors. *PLoS One* 2013; 8: e60051 [PMID: 23555880 DOI: 10.1371/journal.pone.0060051]
- 5 Abba M, Patil N, Rasheed K, Nelson LD, Muduluru G, Leupold JH, Allgayer H. Unraveling the role of FOXQ1 in colorectal cancer metastasis. *Mol Cancer Res* 2013; 11: 1017-1028 [PMID: 23723077 DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0024]
- 6 唐慧, 郭强, 李丽, 张进萍, 王金丽, 严新民. 叉头框蛋白Q1在结直肠癌和结直肠腺瘤中的异常表达和基因突变. 中华消化杂志 2011; 31: 106-111
- 7 毛俊, 牟秋菊, 李连宏, 陶雅军, 范姝君, 王波, 于晓棠. RNA干扰Notch1基因对乳腺癌MCF-7细胞增殖及凋亡的影响. 临床与实验病理学杂志 2012; 28: 11-14
- 8 李妍, 杜红延, 李红卫. 慢病毒载体及其在RNA干扰技术中的应用与发展. 分子诊断与治疗杂志 2013; 5: 55-60
- 9 郑荣寿, 张思维, 吴良有, 李光琳, 赵平, 赫捷, 陈万青. 中国肿瘤登记地区2008年恶性肿瘤发病和死亡分析. 中国肿瘤 2012; 21: 11-12
- 10 Katoh M, Katoh M. Human FOX gene family (Review). *Int J Oncol* 2004; 25: 1495-1500 [PMID: 15492844]
- 11 Bieller A, Pasche B, Frank S, Gläser B, Kunz J, Witt K, Zoll B. Isolation and characterization of the human forkhead gene FOXQ1. *DNA Cell Biol* 2001; 20: 555-561 [PMID: 11747606]
- 12 Tang H, Guo Q, Zhang C, Zhu J, Yang H, Zou YL, Yan Y, Hong D, Sou T, Yan XM. Identification of an intermediate signature that marks the initial phases of the colorectal adenoma-carcinoma transition. *Int J Mol Med* 2010; 26: 631-641 [PMID: 20878084]
- 13 唐慧, 邹云莲, 寿涛, 郭强, 严新民. 应用基因芯片技术检测参与大肠腺瘤癌变的表皮生长因子受体信号通路. 昆明医学院学报 2010; 31: 25-29
- 14 唐慧, 董虹, 寿涛, 何旭, 邹云莲, 李丽, 严新民, 郭强. 参与大肠腺瘤癌变过程的信号通路初探. 中华临床医师杂志(电子版) 2010; 4: 28-34
- 15 梁艳, 李涛, 周克元. 慢病毒载体在RNA干扰中的应用进展. 国际检验医学杂志 2010; 31: 1282-1284
- 16 Kaur P, Nagaraja GM, Asea A. Combined lentiviral and RNAi technologies for the delivery and permanent silencing of the hsp25 gene. *Methods Mol Biol* 2011; 787: 121-136 [PMID: 21898232 DOI: 10.1007/978-1-61779-295-3\_10]
- 17 Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, Mizuno H, Yu EY, An DS, Sabatini DM, Chen IS, Hahn WC, Sharp PA, Weinberg RA, Novina CD. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA* 2003; 9: 493-501 [PMID: 12649500]
- 18 Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 6047-6052 [PMID: 11972060]

#### 同行评价

本文具有一定指导意义。

编辑 田滢 电编 鲁亚静





Published by **Baishideng Publishing Group Inc**  
8226 Regency Drive, Pleasanton,  
CA 94588, USA  
Fax: +1-925-223-8242  
Telephone: +1-925-223-8243  
E-mail: [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

