

MEKK2基因siRNA重组腺病毒表达载体的构建及其对MEKK2的表达抑制

钱凤英 兰风华 董荔红 黄俏佳*

(南京军区福州总医院分子医学研究中心, 福州 350025)

摘要 设计并合成针对人MEKK2基因3个不同部位siRNA靶点的模板DNA序列, 将合成的互补片段退火后克隆入pRNAT-H1.1/Adeno穿梭载体中, 并使其在大肠杆菌BJ5183中与腺病毒骨架质粒pAdEasy-1进行同源重组。将经鉴定正确的重组腺病毒质粒转染293A细胞, 包装得到具有感染能力的pAd-MEKK2-siRNA重组腺病毒。病毒体外转导人胃腺癌AGS细胞, Western blot印迹法检测其对MEKK2表达的抑制。经酶切和测序鉴定均证实pAd-MEKK2-siRNA重组腺病毒载体构建成功, 其插入序列正确无误。Western blot印迹检测结果显示, 重组腺病毒表达载体可抑制MEKK2基因的表达, 以pAd-MEKK2-siRNA2(针对MEKK2 cDNA 992-1 010的片段)抑制效果为最佳, pAd-MEKK2-siRNA1(针对MEKK2 cDNA 1 456-1 474的片段)和pAd-MEKK2-siRNA3(针对MEKK2 cDNA 1 351-1 369的片段)则未见明显的抑制效果。DNA Ladder和细胞存活测定结果表明, 敲减MEKK2的表达后, AGS细胞接受H₂O₂刺激后的凋亡受到较强抑制、细胞存活数增加, 明显高于野生型细胞和转导siRNA阴性对照腺病毒细胞接受H₂O₂刺激后的, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 而后两者之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。该研究成功地构建了针对MEKK2基因的siRNA重组腺病毒载体, 为进一步深入研究MEKK2基因在人胃腺癌细胞中的作用和功能奠定了基础。

关键词 腺病毒载体; RNA干扰; MEKK2基因; H₂O₂; 细胞凋亡

MEKK2是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 属于MAP3K家族中MEKK/SET11亚家族成员之一^[1], 普遍地表达于人类及其他哺乳动物的多种组织和细胞中。MEKK2是JNK信号途径强有力的激活剂^[2], 亦可激活ERK1/2、ERK5和P38等其他MAPK信号转导途径^[2]; 它不但调节肥大细胞中细胞因子的表达^[3-4], 而且介导表皮生长因子及成纤维细胞生长因子受体的信号转导^[5-6]。最新的研究发现, MEKK2在前列腺癌细胞和组织中过表达, 并可能与前列腺癌患者的临床分期相关^[7]。但迄今为止, MEKK2在恶性肿瘤发生发展中的作用尚不清楚, 目前, 国内外少见有这方面的研究报道; 也尚未见有MEKK2与胃腺癌关系的报道。

腺病毒siRNA表达载体具有感染效率高、基因沉默效果明显强于普通质粒siRNA表达载体的特点, 非常适用于基因功能的研究和基因治疗。因此, 本研究构建针对人MEKK2基因的siRNA重组腺病毒载体, 将其转导入人胃腺癌AGS细胞中, 沉默其MEKK2基因的表达, 并利用Western blot印迹法筛选

出对AGS细胞抑制效果最佳的MEKK2 siRNA重组腺病毒载体, 旨在为下一步深入研究MEKK2在胃腺癌细胞中的作用及功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 模板DNA退火缓冲液、RIPA细胞强裂解液和BCA蛋白定量试剂盒购自碧云天公司; 质粒DNA小抽和大抽提试剂盒及DNA凝胶回收试剂盒为OMEGA公司产品; *Mlu* I、*Xho* I、*Pme* I、*Pac* I内切酶、T4-DNA连接酶和碱性磷酸酶CIP购自New England BioLab; 真核细胞转染试剂Lipofectamine™2000、PVDF膜和ECL化学发光底物为Invitrogen产品; 脱脂奶粉为博士德公司产品; 用于MEKK2蛋白及内参GAPDH、 β -actin的Western blot

收稿日期: 2011-05-10 接受日期: 2012-01-04

福建省自然科学基金(No.2009J01181)、南京军区医药卫生科研基金(No.08MA100)和南京军区福州总医院专项基金(No.2004037)资助项目

*通讯作者。Tel: 0591-22859102, E-mail: huangqj100@126.com

印迹测定的兔抗MEKK2、兔抗GAPDH及鼠抗 β -actin抗体分别购自Upstate、Santa Cruz和Sigma公司; HRP标记的羊抗兔或鼠二抗购自Santa Cruz公司。

1.1.2 质粒 pRNAT-H1.1/Adeno腺病毒siRNA穿梭质粒购自金斯瑞公司; 含骨架质粒pAdEasy-1的大肠杆菌BJ5183购自Invitrogen公司。

1.1.3 细胞株 腺病毒包装细胞293A购自Invitrogen公司; 人胃腺癌AGS细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库。

1.1.4 培养基(液) LB培养基购自上海生工; DMEM和F12培养液购自Invitrogen公司; 胎牛血清购自四季青公司。

1.1.5 其它材料 PCR引物由南京金斯瑞公司合成; siRNA模板DNA序列由上海超世公司合成; DH5 α 菌种为本实验室保存; 胰酶为Invitrogen公司产品; 5 cm \times 7 cm医用X光胶片购自柯达(中国)公司。

1.2 方法

1.2.1 针对MEKK2基因的siRNA靶位的选择、确定及模板DNA的合成 从GenBank上获得人MEKK2基因编码区(cDNA)完全序列(GenBank Accession Number: NM_006609), 从Genescript公司网站寻找提供的用于siRNA靶序列设计的工具, 将MEKK2 cDNA完全序列输入该设计软件中, 按照提示进行操作, 选择MEKK2基因siRNA干扰作用靶点的三个不同的序列, 经BLAST分析, 均未发现同源序列。siRNA阴性对照(Scramble)序列(与人类及其他哺乳动物非同源的无关序列)与Ambion提供的序列一致。环(Loop)的序列为5'-TTC AAG AGA-3'。人工合成针对MEKK2基因3个不同靶序列的3对共6条及siRNA阴性对照序列1对共2条、每对互补的单链模板DNA片段, 并在正义链的5'端引入Mlu I酶切位点、在反义链的5'端引入Xho I酶切位点, 序列见表1。

表1 MEKK2和siRNA阴性对照模板DNA序列

Table1 MEKK2 and scramble siRNA template DNA sequences

靶位点 Target sites	siRNA模板DNA序列 siRNA template DNA sequences
MEKK2 cDNA 1 456-1 474 nt	Forward 5'-CGC GTC GTG ACA TAG ACA ATC CTA CTT CAA GAG AGT AGG ATT GTC TAT GTC ACT TTT TTC CAA C-3'
	Reverse 5'-TCG AGT TGG AAA AAA GTG ACA TAG ACA ATC CTA CTC TCT TGA AGT AGG ATT GTC TAT GTC ACG A-3'
	First pair
MEKK2 cDNA 992~1 010 nt	Forward 5'-CGC GTC GGC GCA AAT ATC CTG CGA GTT CAA GAG ACT CGC AGG ATA TTT GCG CCT TTT TTC CAA C-3'
	Reverse 5'-TCG AGT TGG AAA AAA GGC GCA AAT ATC CTG CGA GTC TCT TGA ACT CGC AGG ATA TTT GCG CCG A-3'
	Second pair
MEKK2 cDNA 1 351~1 369 nt	Reverse 5'-CGC GTC GCA TAT GGC GCT CTT ACT GTT CAA GAG ACA GTA AGA GCG CCA TAT GCT TTT TTC CAA C-3'
	Reverse 5'-TCG AGT TGG AAA AAA GCA TAT GGC GCT CTT ACT GTC TCT TGA ACA GTA AGA GCG CCA TAT GCG A-3'
	Third pair
siRNA negative control	Forward 5'-CGC GTC GTT CTC CGA ACG TGT CAC GTT TCA AGA GAA CGT GAC ACG TTC GGA GAA TTT TTT CCA AC-3'
	Reverse 5'-TCG AGT TGG AAA AAA TTC TCC GAA CGT GTC ACG TTC TCT TGA AAC GTG ACA CGT TCG GAG AAC GA-3'
	Scramble siRNA

1.2.2 pRNAT-H1.1/Adeno-MEKK2-siRNA穿梭载体的构建 将每对单链DNA片段混合, 进行退火反应, 退火后形成带有夹夹结构的短双链DNA, 并在5'及3'端分别形成带有Mlu I和Xho I酶切位点的粘性末端, 插入到pRNAT-H1.1/Adeno siRNA载体中。其反应体系及反应条件如下: 2 μ L(1 μ g/ μ L)模板DNA片段第一链(正义链)与2 μ L(1 μ g/ μ L)模板DNA片段第二

链(反义链)混合后加46 μ L 1 \times DNA退火缓冲液, 90 $^{\circ}$ C 3 min, 待自动冷却至37 $^{\circ}$ C孵育1 h。用T4-连接酶将上述4对退火产物分别连接入线性化的pRNAT-H1.1/Adeno载体中, 将含有针对MEKK2目的基因的重组质粒通过CaCl₂法转化入大肠杆菌Ecoli DH5 α 进行卡那霉素(Kan)抗性单克隆培养。

1.2.3 重组质粒中针对MEKK2基因的siRNA片段的

鉴定 随机挑选在LB+Kan平板上生长的重组克隆,进行质粒DNA的抽提,送南京金斯特公司进行测序鉴定,测序引物为:正向(F): 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3',反向(R): 5'-CAA AAC TAC ATA AGA CCC CCA C-3'。

1.2.4 重组腺病毒载体的构建及鉴定 分别用 *Pme* I对重组MEKK2-siRNA和阴性对照siRNA穿梭载体进行线性化,经CIP磷酸酶去磷酸化后,在大肠杆菌BJ5183中与腺病毒骨架质粒pAdEasy-1进行同源重组,用带有卡那霉素(50 μ g/mL)的LB平板进行筛选同源重组的质粒, *Pac* I酶切鉴定阳性重组子后,进行质粒DNA的大量抽提。

1.2.5 腺病毒的包装 15 μ g重组腺病毒载体经内切酶 *Pac* I酶切、乙醇纯化后,将其中的5 μ g用脂质体 Lipofectamine™2000转染入293A包装细胞中。培养5~7 d后可见细胞出现病变(CPE),表现为贴壁细胞变圆,肿胀;转染10~12 d后可见圆形细胞呈葡萄串状丛集分布于正常的293A细胞上,并出现病毒空斑。当荧光显微镜下观察到90%以上细胞出现CPE现象后,将细胞在-70 °C和37 °C反复冻融4次,3 000 \times g离心5 min,收集上清,即为原代病毒上清。

1.2.6 重组腺病毒的扩增和滴度测定 扩增方法如下:用原代病毒上清转导汇合度为90%的293A细胞,荧光显微镜下观察,待90%以上细胞出现CPE现象后,按以上方法收集病毒液得到第二代病毒;如此连续浸染扩增至第四代后,合并多瓶浓缩病毒液,进行病毒的滴度测定。滴度测定采用GFP阳性细胞计数法,完全按Kaneto等^[8]介绍的进行。简介如下:将浓缩的病毒液1:10 000稀释后感染293A细胞,培养18 h后,荧光显微镜下计算结果,并以公式: $\text{Pfu/mL} = 10^7 \times \text{平均GFP阳性的细胞数/视野}(\times 100)$,计算病毒的滴度。

1.2.7 细胞培养和转导 在37 °C、5%的CO₂的培养箱中,用含10%的胎牛血清的F₁₂细胞培养液培养人胃腺癌AGS细胞。在病毒转导前24 h,对AGS细胞进行定量培养,即在胰酶消化细胞后,以每孔 1.5×10^5 /孔的细胞数接种6孔板,每孔F₁₂培养液的量为2 mL。按50 MOI的量接种病毒,剩1孔细胞作为未转导的空白对照。

1.2.8 Western blot印迹检测目的蛋白的表达抑制及MEKK2表达抑制率的分析 感染后72 h用RIPA强裂解液裂解细胞,4 °C,12 000 \times g离心20 min后,收集上清,用BCA方法测定蛋白的含量后按文献^[9]的

方法进行Western blot印迹分析。第1抗体兔抗人MEKK2、GAPDH抗体的稀释度为分别为1:1 000及1:2 000,鼠抗人 β -actin抗体的稀释度为1:6 000;HRP标记的羊抗兔或鼠IgG第2抗体的稀释度为1:1 000。最后用ECL化学发光底物检测膜上的抗原-抗体复合物,通过X光片显示结果。

1.2.9 AGS细胞凋亡和存活的测定及统计学分析 在进行细胞凋亡测定前,必须将AGS细胞置于仅含0.1%胎牛血清的F12培养液中培养16 h(饥饿培养)。在细胞饥饿培养后,将H₂O₂加于细胞中,使其终浓度为2 mmol/L,作用5 h后再用新鲜培养液培养过夜。DNA Ladder法测定细胞凋亡按照DNA Ladder测定的试剂盒说明进行,当琼脂糖凝胶电泳出现阶梯状DNA Ladder时,为阳性结果。应用0.1%苔盼蓝染色法计算H₂O₂作用后AGS细胞的存活数量,并以此作为细胞存活测定的方法^[10]。

采用SPSS13.0软件进行统计学分析,组间比较采用成组 t 检验, $P < 0.05$ 判定为具有统计学意义。成组 t 检验也应用于本研究全部结果的统计学分析。

2 结果

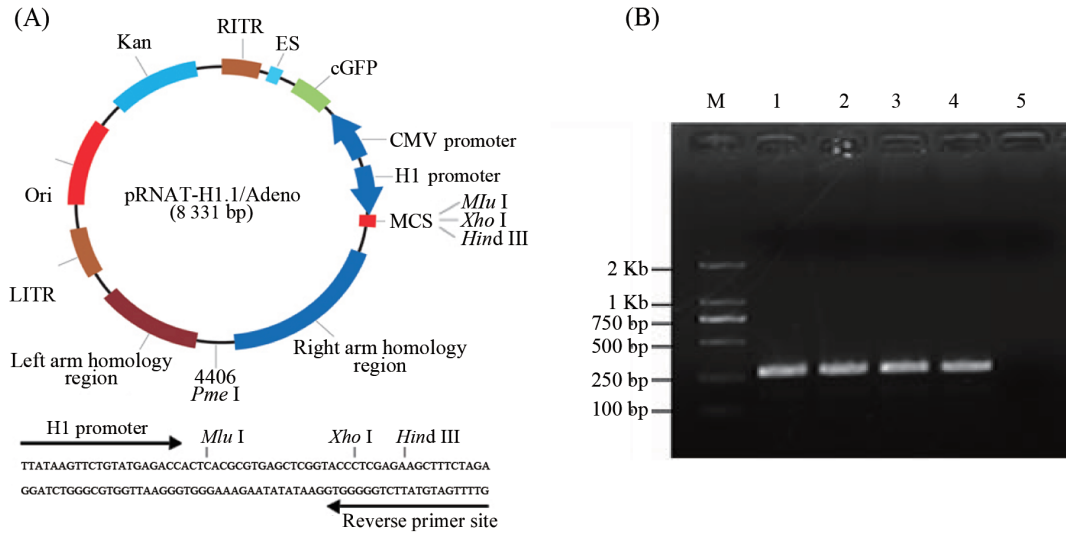
2.1 MEKK2 siRNA穿梭载体的鉴定

2.1.1 菌液PCR鉴定 在含卡那霉素的LB平板上挑选具有抗性作用的重组克隆,经PCR鉴定(用测序引物)能扩增出大小与理论预期值一致的282 bp片段(图1)。

2.1.2 测序鉴定 将重组载体送公司进行DNA测序,获得的结果证明3个针对不同靶序列的MEKK2 siRNA及阴性对照表达载体正确无误(图2),分别命名为pRNAT-H1.1/Adeno-MEKK2 siRNA1、pRNAT-H1.1/Adeno-MEKK2 siRNA2、pRNAT-H1.1/Adeno-MEKK2 siRNA3、pRNAT-H1.1/Adeno-scramble siRNA。

2.2 重组腺病毒pAdEasy-1-MEKK2 siRNA的构建及鉴定

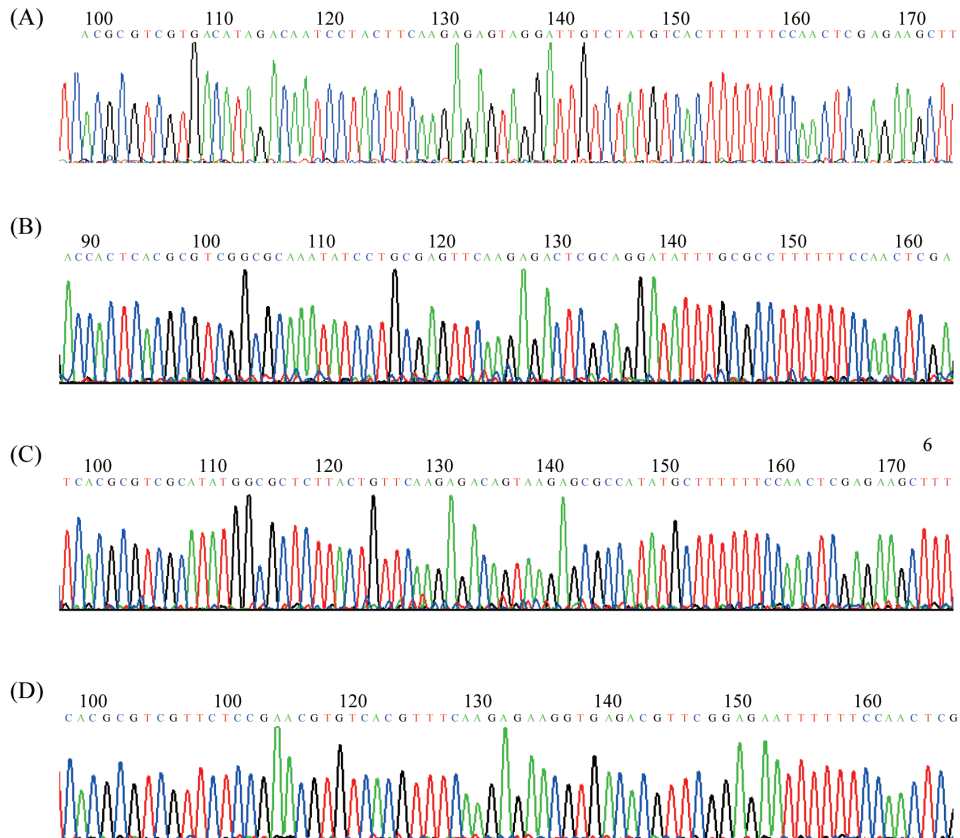
Pme I线性化的穿梭质粒pRNAT-H1.1/Adeno siRNA与骨架质粒pAdEasy-1在BJ5183菌内能够发生同源重组,重组质粒可在卡那霉素抗性的培养基中生长,根据质粒大小进行初步筛选:比穿梭载体大,接近骨架载体的可初步判定为阳性重组子,分别命名为pAd-MEKK2-siRNA1、pAd-MEKK2-siRNA2、pAd-MEKK2-siRNA3和pAd-Scramble-siRNA。用 *Pac* I酶切重组质粒可出现一个大约30 Kb的大片段和一个4.5 Kb或3.0 Kb的特征性条带得以鉴定(图3)。



A: pRNAT-H1.1/Adeno示意图; B: PCR鉴定pRNAT-H1.1/Adeno-MEKK2-siRNA; M: DL2 000 DNA标准; 泳道1: siRNA阴性对照腺病毒载体; 泳道2-4: pRNAT-H1.1/Adeno-MEKK2-siRNA1~3的PCR鉴定结果; 泳道5: PCR阴性对照的PCR鉴定结果。

A: pRNAT-H1.1/Adeno map; B: the results of pRNAT-H1.1/Adeno-MEKK2-siRNA identified by PCR; M: DL2 000 DNA marker; Lane1: pRNAT-H1.1/Adeno-scramble siRNA; Lane2: pRNAT-H1.1/Adeno-MEKK2-siRNA1; Lane3: pRNAT-H1.1/Adeno-MEKK2-siRNA2; Lane4: pRNAT-H1.1/Adeno-MEKK2-siRNA3; Lane5: negative control.

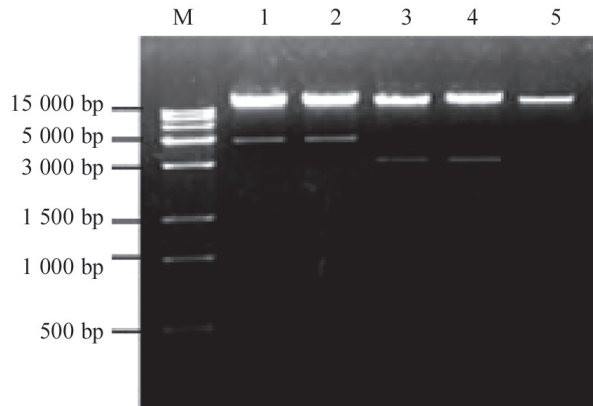
图1 PCR鉴定MEKK2 siRNA表达载体
Fig.1 MEKK2 siRNA expression vector identified by PCR



A~C: pRNAT-H1.1/Adeno-MEKK2 siRNA1~3的测序鉴定结果; D: siRNA阴性对照载体的测序鉴定结果。

A: pRNAT-H1.1/Adeno-MEKK2 siRNA1; B: pRNAT-H1.1/Adeno-MEKK2 siRNA2; C: pRNAT-H1.1/Adeno-MEKK2 siRNA3; D: pRNAT-H1.1/Adeno-Scramble siRNA.

图2 测序鉴定三个MEKK2 siRNA和siRNA阴性对照表达载体的插入序列
Fig.2 The inserts sequencing results of the three different MEKK2 siRNA and scramble siRNA



M: DL2 000 DNA标准; 泳道1: siRNA阴性对照腺病毒载体*Pac I*酶切鉴定结果; 泳道2~4: pRNAT-H1.1/Adeno-*MEKK2* siRNA1~3的*Pac I*酶切鉴定结果; 泳道5: pAdEasy-1空载体*Pac I*酶切鉴定结果。

M: DL2 000 DNA marker; Lane1: pAd-Scramble-siRNA; Lane2: pAd-*MEKK2*-siRNA1; Lane3: pAd-*MEKK2*-siRNA2; Lane4: pAd-*MEKK2*-siRNA3; Lane5: pAdEasy-1 empty vector.

图3 应用*Pac I*酶切鉴定*MEKK2*重组腺病毒表达载体

Fig.3 *MEKK2* siRNA recombinant adenovirus expression vector identified by *Pac I* digestion

2.3 重组腺病毒的包装、扩增及滴度测定

重组腺病毒质粒转染293A细胞, 培养5~7 d后出现细胞病变(CPE), 表现为贴壁细胞变圆, 肿胀, 并逐渐从壁上脱落下来; 转染10~12 d后可见圆形细胞呈葡萄串状从集分布于正常的293A细胞上, 并出现病毒空斑。由于腺病毒载体携带了GFP报告基因, 可用荧光显微镜观察。在荧光显微镜下, 转染48 h后, 可见约10%左右的293A细胞有GFP的表达, 荧光表达随时间增强; 5 d后GFP表达细胞呈灶样聚集, 10 d后可

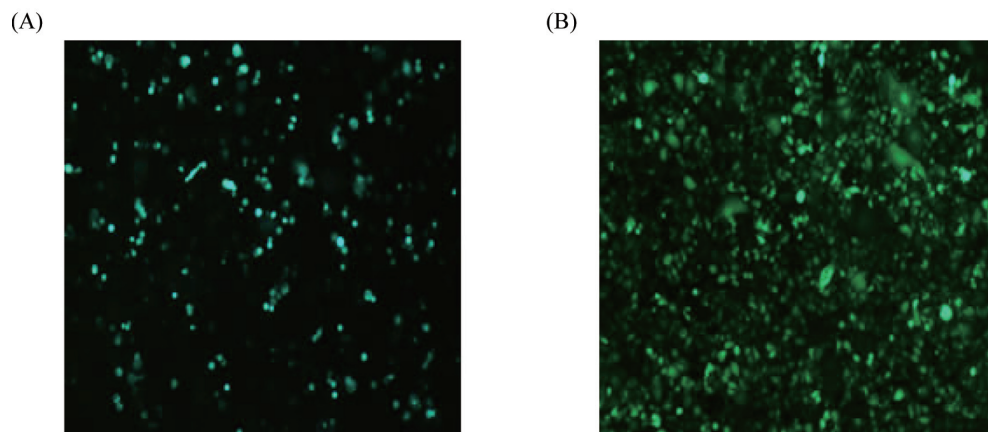
见病毒空斑, 代表结果见图4。收集包装成功的病毒裂解液, 转导293A细胞可观察到同样的结果(图4)。

2.4 病毒滴度测定(GFP计数法)

Kaneto等^[8]介绍的测定和计算病毒滴度的方法是将病毒1:10 000稀释后再感染293A细胞、培养18 h后在荧光显微镜下观察GFP阳性的细胞数以计算结果, 并以公式: 病毒滴度(Pfu/mL)= $10^7 \times$ 平均GFP阳性的细胞数/视野(100 \times), 计算出病毒滴度。在本实验中, 病毒的最终稀释度为1:1 000 000, 以此稀释度感染293A细胞, 培养18 h后, 荧光显微镜下计算GFP阳性细胞数为每视野(100 \times)平均44个, 因此病毒的滴度为 4.4×10^{10} pfu/mL。

2.5 Western blot法分析*MEKK2* siRNA各表达载体对*MEKK2*基因表达的抑制作用

应用抗*MEKK2*为第一抗体的Western blot检测了AGS细胞转导pAd-*MEKK2*-siRNA各表达载体后, *MEKK2*表达受到抑制的情况, 经灰度扫描分析软件计算各区带密度值, 按下述方法计算抑制率: 先计算各组*MEKK2*/GAPDH的值, 然后计算各pAd-*MEKK2*-siRNA表达载体组的*MEKK2*/GAPDH除以未转导对照组的*MEKK2*/GAPDH, 得出各组的*MEKK2*相对表达率, 其抑制率为1-*MEKK2*相对表达率。结果显示: 3个pAd-*MEKK2* siRNA表达载体中的1个——pAd-*MEKK2* siRNA2(针对*MEKK2* cDNA 992-1 010的片段)可有效地抑制*MEKK2*基因的表达, pAd-*MEKK2*-siRNA1(针对*MEKK2* cDNA 1 456-1 474的片段)和pAd-*MEKK2*-siRNA3(针对*MEKK2* cDNA 1 351-1 369的片段)则未见明显的抑制效果(图5)。

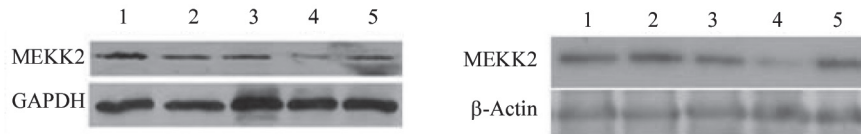


A: 重组腺病毒包装过程中表达的绿色荧光蛋白(GFP); B: 重组腺病毒感染293A细胞。

A: the expression of green color protein (GFP) in the process of recombinant adenovirus package; B: 293A cells infected by recombinant adenovirus.

图4 *MEKK2* siRNA重组腺病毒包装和转导293A细胞(100 \times)

Fig.4 *MEKK2* siRNA recombinant adenovirus packaged and transduced in 293A cells(100 \times)



泳道1: 未转导腺病毒的亲代细胞; 泳道2: siRNA阴性对照腺病毒转导AGS细胞; 泳道3~5: MEKK2 1~3腺病毒转导AGS细胞。

Lane 1: un-transduced AGS cells; Lane 2: AGS had been transduced with pAd-scramble-siRNA; Lane 3~5: AGS had been transduced with pAd-MEKK2-siRNA 1, 2, and 3.

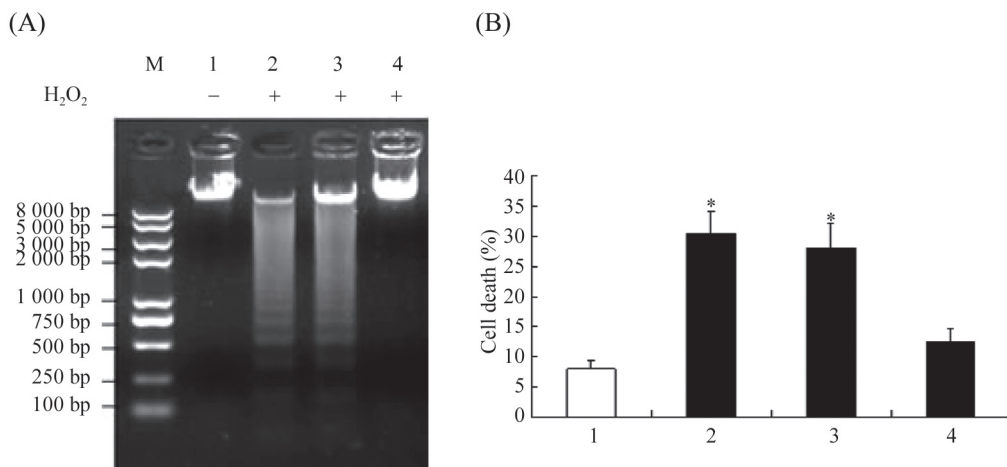
图5 Western印迹法分析MEKK2 siRNA和siRNA阴性对照腺病毒对MEKK2的表达抑制

Fig.5 Western blot analysis the expression of MEKK2 and GAPDH or β -Actin after AGS cells had been transduced with MEKK2 siRNA and siRNA negative control recombinant adenovirus

2.6 敲减MEKK2的表达降低H₂O₂诱导的AGS细胞的凋亡、增加细胞的存活

DNA Ladder法细胞凋亡测定结果表明, AGS野生型细胞和感染siRNA阴性对照腺病毒的细胞对H₂O₂的作用敏感, 经2 mmol/L H₂O₂作用5 h后, 在琼脂糖凝胶电泳中均出现肉眼可见的DNA Ladder(图6A); 而感染MEKK2 siRNA2腺病毒的细胞对H₂O₂具有抵抗作用, 接受同样浓度的H₂O₂作用同样的时间后无DNA Ladder出现。

苔盼蓝染色法计算细胞存活结果表明, 经2 mmol/L H₂O₂作用5 h后, AGS野生型细胞和感染siRNA阴性对照腺病毒的细胞, 细胞死亡数明显高于感染MEKK2 siRNA腺病毒的细胞。野生型细胞和感染siRNA阴性对照腺病毒的细胞平均死亡数(\pm SD)分别为: 30.5% \pm 3.5%和28.0% \pm 4.2%(图6B); 而感染MEKK2-siRNA2腺病毒的细胞的死亡数为12.5% \pm 2.1%(图6B, 与前两者相比, $P < 0.05$)(成组 t 检验, 下同), 而前两者之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。



A: DNA梯度降解法测定H₂O₂诱导的AGS细胞凋亡; M: DL2 000 DNA标准; 泳道1: 未经H₂O₂刺激的亲代细胞; 泳道2: 经H₂O₂刺激的亲代细胞; 泳道3: AGS细胞先转导siRNA阴性对照腺病毒, 再接受H₂O₂刺激; 泳道4: AGS细胞先转导MEKK2 siRNA2腺病毒, 再接受H₂O₂刺激; B: 苔盼蓝染色法测定细胞死亡, * $P < 0.05$, 与未经H₂O₂刺激的亲代细胞或先转导pAd-MEKK2-siRNA2, 再接受H₂O₂刺激的AGS细胞比较。

A: H₂O₂ induced AGS cell apoptosis was determined by DNA Ladder assay; M: DNA marker; Lane 1: wild type AGS cells without H₂O₂ treatment; Lane 2: wild type cells with H₂O₂ treatment; Lane 3: AGS was transduced with pAd-Scramble-siRNA, then stimulated with H₂O₂; Lane 4: AGS was transduced with pAd-MEKK2-siRNA2, then stimulated with H₂O₂; B: the average percentages of dead cells detected by trypan blue method; * $P < 0.05$, vs wild type AGS cells without H₂O₂ treatment or AGS cells transduced with pAd-MEKK2-siRNA2, then stimulated with H₂O₂.

图6 敲减MEKK2的表达降低H₂O₂诱导的AGS细胞凋亡

Fig.6 Knock-down MEKK2 decreased AGS cells apoptosis in response to H₂O₂ treatment

3 讨论

胃癌是世界各地最为常见的恶性肿瘤之一^[1], 我国福建、山东、浙江等沿海地区为胃癌高发区,

胃癌死亡率占恶性肿瘤的第一位, 全国胃癌平均死亡率高达十万分之二十人。因此, 弄清胃癌的发病机制, 寻找针对胃癌靶向治疗的手段和方法将具有

重要的意义。

MAPK信号转导主要途径包括ERK、JNK和P38途径, 它们的异常已被证明与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关^[12-13]。MAPK参与多种细胞功能的调控, 尤其是在细胞增殖、分化与凋亡中起着关键作用, 是受外界刺激时决定细胞命运的关键性因素。目前, 已经清楚生长因子的刺激可激活ERK1/2, 其持续活化最终可促进细胞增殖和恶性转化, 导致肿瘤的发生与发展^[14-15]。研究已证明MEKK2可在多种非肿瘤细胞内激活JNK、ERK1/2、P38和ERK5, 是这些细胞中调控MAPK信号途径的关键性激酶之一^[1-2, 16]。新近, Cazares等^[7]应用蛋白质组学、蛋白印迹和免疫组化等方法, 发现MEKK2在多种前列腺癌细胞株和前列腺癌组织中过表达, 并发现其过表达可能与患者的临床分期有关。但迄今为止, MEKK2在恶性肿瘤细胞中的作用及其信号转导途径的下游信号分子尚不清楚, 它是否也具有调控肿瘤细胞中的MAPK, 包括ERK、JNK、P38等信号途径的活性至今为止也不清楚。

腺病毒siRNA表达载体既可感染增殖期细胞也可感染非增殖细胞, 感染效率高, 病毒颗粒易于包装产生, 而且滴度高、抑制效果明显强于普通质粒载体, 因此非常适用于基因功能的研究和基因治疗; 腺病毒不整合到染色体中, 故无插入致突变性。这些优点, 使腺病毒siRNA表达载体的应用越来越受到人们的重视。

在本研究中, 我们以pRNAT-H1.1/Adeno为穿梭载体, 采用细菌内同源重组AdEasy系统, 通过siRNA技术, 构建针对人MEKK2基因的siRNA重组腺病毒载体, 应用基因转染技术, 将其转染入293A细胞, 在该细胞中成功地包装成含MEKK2 siRNA的腺病毒颗粒后, 转导入人胃腺癌AGS细胞, 有效地沉默了MEKK2的表达, 并利用Western blot法筛选出对恶性肿瘤细胞抑制效果最佳的siRNA表达载体, 获得了高效沉默MEKK2基因表达的AGS细胞株。通过DNA Ladder和细胞存活测定, 检测了野生型AGS细胞、转导siRNA阴性对照腺病毒的AGS细胞和转导针对MEKK2基因的siRNA腺病毒的AGS细胞接受H₂O₂刺激后细胞凋亡或存活的变化, 发现敲减MEKK2的表达后, AGS细胞接受H₂O₂刺激后的凋亡受到较强抑制、细胞存活数增加。MEKK2是JNK的强激活剂, JNK的激活已被证明可增加H₂O₂诱导

的细胞凋亡, 而抑制JNK的活性则可降低H₂O₂诱导的细胞凋亡^[17]。敲减MEKK2的表达是否通过抑制JNK的激活从而降低H₂O₂诱导的细胞凋亡有待进一步的研究。

我们的结果为下一步深入研究MEKK2在胃腺癌细胞中的作用和功能、研究MEKK2在胃腺癌发生发展中的可能作用及寻找胃腺癌的可能治疗靶点奠定了基础。

参考文献 (References)

- 1 Cheng J, Yu L, Zhang D, Huang Q, Spencer D, Su B. Dimerization through the catalytic domain is essential for MEKK2 activation. *J Biol Chem* 2005; 280(14): 13477-82.
- 2 Su B, Cheng J, Yang J, Guo Z. MEKK2 is required for T-cell receptor signals in JNK activation and interleukin-2 gene expression. *J Biol Chem* 2001; 276(18): 14784-90.
- 3 Garrington TP, Ishizuka T, Papst PJ, Chayama K, Webb S, Yujiri T, et al. MEKK2 gene disruption cause loss of cytokine production in response to IgE and c-kit ligand stimulation of ES cell-derived mast cells. *EMBO J* 2000; 19(20): 5387-95.
- 4 Chayama K, Papst PJ, Garrington TP, Pratt JC, Ishizuka T, Webb S, et al. Role of MEKK2-MEK5 in the regulation of TNF- α gene expression and MEKK2-MKK7 in the activation of c-Jun N-terminal kinase in mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(8): 4599-604.
- 5 Kesavan K, Lobel-Rice K, Sun W, Lapadat R, Webb S, Johnson GL, et al. MEKK2 regulates the coordinate activation of ERK5 and JNK in response to FGF-2 in fibroblasts. *J Cell Physiol* 2004; 199(1): 140-8.
- 6 Sun W, Wei X, Kesavan K, Garrington TP, Fan R, Mei J, et al. MEK kinase 2 and the adaptor protein Lad regulate extracellular signal-regulated kinase 5 activation by epidermal growth factor via Src. *Mol Cell Biol* 2003; 23(7): 2298-308.
- 7 Cazares LH, Troyer D, Mendrinis S, Lance RA, Nyalwidhe JO, Beydoun HA, et al. Imaging mass spectrometry of a specific fragment of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 2 discriminates Cancer from uninvolved prostate tissue. *Clin Cancer Res* 2009; 15(17): 5541-51.
- 8 Kaneto H, Xu G, Song KH, Suzuma K, Bonner-Weir S, Sharma A, et al. Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic β -cell function through the induction of oxidative stress. *J Biol Chem* 2001; 276(33): 31099-104.
- 9 Huang Q, Yang J, Lin Y, Walker C, Cheng J, Liu ZG, et al. Differential regulation of interleukin-1 receptor and Toll-like receptor signaling by MEKK3. *Nat Immunol* 2004; 5(1): 98-103.
- 10 Cheng G, Chan J, Wang Q, Zhang W, Sun C, Lu-Hai Wang LH. Twist transcriptionally up regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel. *Cancer Res* 2007; 67(5): 1979-87.

- 11 Stewart BW, Kleihues P. World cancer report. Lyon: IARC press, 2003, 197-201.
- 12 Lu Z, Cox-Hipkin MA, Windsor WT, Boyapati A. 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 regulates proliferation and survival of cancer cells with an activated mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cancer Res* 2010; 8(3): 421-32.
- 13 Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R. The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813(9): 1619-33.
- 14 Whyte J, Bergin O, Bianchi A, McNally S, Martin F. Key signaling nodes in mammary gland development and cancer. Mitogen-activated protein kinase signalling in experimental models of breast cancer progression and in mammary gland development. *Breast Cancer Res* 2009; 11(5): 209-23.
- 15 Singh RK, Lokeshwar BL. The IL-8-regulated chemokine receptor CXCR7 stimulates EGFR signaling to promote prostate cancer growth. *Cancer Res* 2011; 71(9): 3268-77.
- 16 Maruyama T, Kadowaki H, Okamoto N, Nagai A, Naguro I, Matsuzawa A, *et al.* CHIP-dependent termination of MEKK2 regulates temporal ERK activation required for proper hyperosmotic response. *EMBO J* 2010; 29(15): 2501-14.
- 17 Ishikawa Y, Kitamura M. Anti-apoptotic effect of quercetin: Intervention in the JNK- and ERK-mediated apoptotic pathways. *Kidney Int* 2000; 58: 1078-87.

Construction of *MEKK2* siRNA Recombinant Adenovirus Vector and Its Effect on the Inhibition of *MEKK2* Expression

Qian Fengying, Lan Fenghua, Dong Lihong, Huang Qiaojia*

(Research Center for Molecular Medicine, Fuzhou General Hospital, Fuzhou, 350025, China)

Abstract Three different siRNA template DNA sequences of *MEKK2* gene were designed by Genscript siRNA design software. The corresponding DNA fragments were synthesized *in vitro*, annealed and then cloned into the pRNAT-H1.1/Adeno shuttle vector. The recombinant shuttle vectors were confirmed by DNA sequencing, then transformed into *Escherichia coli* BJ5183 carrying backbone plasmid pAdEasy-1 to obtain adenovirus plasmid through homologous recombination. The adenovirus plasmid was transfected into 293A cells to form adenovirus particle. Followed, the adenovirus particles were transduced into AGS cells. Western blot was carried out to analyze the suppression effect of *MEKK2* adenovirus expression vectors in AGS cells and to screen the best vector that had the highest effect on inhibition of *MEKK2* expression. DNA sequencing confirmed that the *MEKK2* siRNA adenovirus expression vector were successfully constructed and the results of Western blot showed that one of the three *MEKK2* siRNA adenovirus vectors (pAdeno-*MEKK2* siRNA2, targeting *MEKK2* cDNA sequences of 992-1 010) could effectively silence *MEKK2* expression in AGS cells. No obvious inhibition effect was found in pAdeno-*MEKK2* siRNA1 (targeting *MEKK2* cDNA sequences of 1 456-1 474) and pAdeno-*MEKK2* siRNA3 (targeting *MEKK2* cDNA sequences of 1 351-1 369). In conclusion, the recombinant pAd-*MEKK2*-siRNA expression vector targeted on *MEKK2* was successfully constructed, which can effectively suppress *MEKK2* expression in AGS cells. The apoptosis induced by H₂O₂ was significantly lower, whereas cell survival number was significantly higher in *MEKK2* knocked down AGS cells than those in transduced siRNA negative control cells or wild type cells ($P < 0.05$). This study will provide a foundation for further investigation on the function of *MEKK2* gene in gastric adenocarcinomas cells.

Key words adenovirus vector; RNA interference; *MEKK2* gene; H₂O₂; cell apoptosis

Received: May 10, 2011 Accepted: January 4, 2012

This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (No.2009J01181), Medical Scientific Research Foundation of Nanjing Command (No.08MA100) and Fuzhou General Hospital Special Foundation (No.2004037)

*Corresponding author. Tel: 86-591-22859102, E-mail: huangqj100@126.com