

靶向DENN-SV基因的shRNA真核表达载体的构建

骆振华¹ 李锦成^{1*} 张秀梅² 冯卓¹¹辽宁医学院附属第一医院乳腺外科, 锦州 121000; ²辽宁医学院附属第一医院心内科, 锦州 121000)

摘要 该研究根据DENN-SV序列及shRNA设计原则, 设计四个靶点序列, 退火后用DNA重组技术与pRNAi-U6.1/Neo空载体连接, 转化到感受态*E.coli*中。扩增菌株, 抽提质粒, 进行酶切、DNA测序鉴定。将重组的真核表达载体转染人乳腺癌MCF-7细胞并使用RT-PCR及Western blot检测其抑制DENN-SV mRNA表达的效率, 以MTT法绘制生长曲线。测序结果与设计序列相同, 并已成功转染进入人乳腺癌MCF-7细胞, 可见GFP(绿色荧光蛋白)表达, 且都具有抑制作用($P<0.01$), DS-1组的抑制效果最好; MTT法绘制生长曲线结果表明, 实验组经该载体转染后细胞增殖程度显著减少($P<0.05$)。该研究应用RNAi技术成功构建了小干扰RNA重组体, 为进一步研究乳腺癌基因治疗奠定了基础。

关键词 DENN-SV; 短发夹RNA; RNA干扰; MCF-7细胞系

Construction of shRNA Eukaryotic Expression Vector Targeting DENN-SV Gene

Luo Zhenhua¹, Li Jincheng^{1*}, Zhang Xiumei², Feng Zhuo¹¹Department of Breast Surgery, First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, China;²Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, China)

Abstract This research designed four target sequences (DS-1, DS-2, DS-3, DS-4) based on DENN-SV sequence and shRNA design principles, and connected them to pRNAi-U6.1/Neo empty vector using recombinant DNA technology after annealing, and transformed them into competent *E.coli*. Amplify strains, extract plasmids and conduct digestion and DNA sequencing were obtained. After transfecting recombinant eukaryotic expression vector into human breast cancer MCF-7 cells, we used RT-PCR and Western blot inhibition to restrain the efficiency of DENN-SV mRNA expression, and got the growth curves of MCF-7 by MTT assay. Sequencing results conformed that the designed sequence had been successfully transfected into human breast cancer MCF-7 cells. The expression of GFP (green fluorescent protein) was visible but inhibited ($P<0.01$). The inhibitory effect of DS-1 group was the greatest. Results of growth curves by MTT assay showed that after transfection, the cell prolife ratio of experimental group reduced significantly ($P<0.05$). The study successfully, with the application of RNAi technology, built up small interfering RNA recombinant, which laid the foundation for the further study of the breast cancer gene therapy.

Key words DENN-SV; short hairpin RNA(shRNA); RNA interference; MCF-7 cell line

IG20(insulinoma-glucagonoma)基因定位于染色体11p11, 共有36个外显子, 已经确定了7个公认的

IG20基因的剪接体, 其中在人类表达的有4种形式: IG20、MADD、IG20-SV2和DENN-SV^[1]。DENN-SV

收稿日期: 2012-08-07 接受日期: 2012-10-31

辽宁省科技厅社会发展攻关计划(批准号: 2010225034)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0416-4197723, E-mail: lijincheng01@yeah.net

Received: August 7, 2012 Accepted: October 31, 2012

This work was supported by the Social Development Research Plan of the Liaoning Province Science and Technology Department (Grant No.2010225034)

*Corresponding author. Tel: +86-416-4197723, E-mail: lijincheng01@yeah.net

是IG20基因的一个变异剪接体。1996年, Chow等^[2]克隆了一个在肿瘤组织中比在正常组织中表达高得多的基因, 取名为DENN-SV, 其在所有组织中都表达, RT-PCR显示其在肿瘤细胞中的表达水平是正常细胞的25~60倍。DENN-SV作为诱导调控肿瘤细胞凋亡的新靶点备受关注, 而成为肿瘤研究的热点。

本实验拟构建针对DENN-SV基因的shRNA真核表达载体, 转染进入人乳腺癌MCF-7细胞中以检测其转染效率、时效以及抑制效率, 并初步检测其对细胞增殖的影响, 为进一步研究DENN-SV基因诱导细胞凋亡效应的机制奠定基础, 为以后研究乳腺癌的基因治疗方法提供实验基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒载体pRNAi-U6.1/Neo、TOP10化学感受态大肠杆菌购自江苏百奥迈科生物技术有限公司; T4连接酶、Hind III内切酶、BamH I限制性内切酶及DNA Marker购自美国NEB公司北京分公司; DNA凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒购自美国Omega公司; 1 Kb plus DNA ladder购自天根生化科技有限公司; dNTP购于上海生工生物工程股份有限公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; RPMI-1640培养基购自Gibco公司; TRIzol、Lipfectamine-2000、Enzyme MIX均购自美国Invitrogen公司; RT-PCR一步法试剂盒购自大连宝生物公司; 兔抗人DENN-SV抗体、羊抗兔抗体(二抗)购于Santa Cruz公司; 人乳腺癌细胞系MCF-7由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 靶向DENN-SV基因的siRNA的设计 根据GenBank查询DENN-SV(AF44103)序列, 参考Ambion线上设计软件以及siRNA的设计原则, 设计4个针对DENN-SV的靶点序列(将其分别命名为DS-1、DS-2、DS-3、DS-4)。序列设计如下: DS-1: 5'-CTG GAC ACC AGA AGT TTA A-3', DS-2: 5'-CCC ACT ACT ATA GTA AAG A-3', DS-3: 5'-GAA GGG ATC AAC CTC AAA T-3', DS-4: 5'-CCC AGT CTG AAA GGA AAC A-3'。

1.2.2 DENN-SV-siRNA重组质粒的构建 设计并合成其shRNA的DNA oligo, 上游序列为: 5'-CCG GTT CTC CGA ACG TGT CAC GTT TCA AGA GAA CGT GAC ACG TTC GGA GAA TTT TTG-3',

下游序列为: 5'-AAT TCA AAA ATT CTC CGA ACG TGT CAC GTT CTC TTG AAA CGT GAC ACG TTC GGA GAA-3', 退火形成双链DNA, 同经Hind III及BamH I限制性内切酶双酶切的pRNAi-U6.1/Neo混合。然后经T4 DNA连接酶于16 °C连接过夜, 连接后的重组质粒转化感受态大肠杆菌, 经含氨苄霉素抗性的LB琼脂培养基筛选后, 抽提质粒并通过DNA测序进行鉴定。

1.2.3 基因转染 转染前将 2×10^5 细胞接种于6孔板中, 待细胞融合度达80%, 准备转染。按照Invitrogen公司Lipfectamine-2000转染试剂说明书操作以转染MCF-7细胞系。12 h后换为含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液。实验分为四个靶点实验组(DS-1、DS-2、DS-3、DS-4)、空白对照组及阴性对照组。按分组分别在转染24, 48, 72 h后于倒置荧光显微镜下观察增强型绿色荧光蛋白的表达情况。

1.2.4 RT-PCR测定转染后靶基因的表达 以GenBank中DENN-SV基因序列(AF440103)为模板, 设计引物序列, 扩增产物长度为193 bp, 上游引物: 5'-ATG CAG GGA CAG ATA CAA ACG-3', 下游引物: 5'-AAC TTG TTG AGC TGG GTC TCA-3'。按照RT-PCR一步法试剂盒说明书操作, 2%琼脂糖凝胶电泳后使用凝胶成像系统分析条带。反应程序为: (1)50 °C, 30 min; (2)94 °C, 20 min; (3)94 °C, 30 s; 60 °C, 30 s; 72 °C, 1 min; 30个循环。取反应液5 μ L进行电泳。采用图像分析软件分析条带。

1.2.5 Western blot检测干扰后DENN-SV蛋白的表达 细胞裂解液裂解细胞, 用Bradford法测定蛋白浓度并制样。将样品加入备好的10%聚丙烯酰胺凝胶中, 电泳分离, 将蛋白转移到PVDF膜上, 封闭之后, 加入兔抗人抗体(1:500), 4 °C摇床上孵育过夜, 再加入按1:1 000稀释的连接有过氧化物酶的二抗孵育2 h, 洗膜液洗3次, 每次5 min, 最后ECL显色, 分别测DENN-SV在DS-1组、DS-2组、DS-3组、DS-4组、阴性对照组、空白组的蛋白产物条带总灰度值以及内参肌动蛋白的灰度值, 将其与肌动蛋白的比值作为目的蛋白的相对表达水平, 计算各组的抑制率。

1.2.6 MTT法检测特异性靶向抑制DENN-SV对人乳腺癌MCF-7细胞活力的影响 将处于对数生长期的人乳腺癌MCF-7细胞, 以每孔 10^4 细胞接种于96孔板上, 每板27孔, 接种5板。每板分3组, 每组9孔, 第一组转染含已确定的最佳序列即DS-1, 第二组转

染阴性对照组, 第三组不予处理。五个板分别于24, 48, 72, 96, 120 h加入MTT溶液(5 mg/mL) 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C温箱孵育4 h, 加入150 μ L DMSO, 震荡10 min溶解结晶, 使用酶联免疫检测仪490 nm测定各孔吸光度值, 反复三次取平均值, 以时间为横轴, 吸光度为纵轴绘制曲线。

1.2.7 统计学方法 采用Quantity one软件分析图像, Origin 8与SPSS15.0软件进行数据统计分析, 记录数据均用均数 \pm 标准差表示, 采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 载体构建结果

pRNAi-U6.1/Neo经两步酶切处理后进行1.0%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 发现质粒已被切开, 得到一个

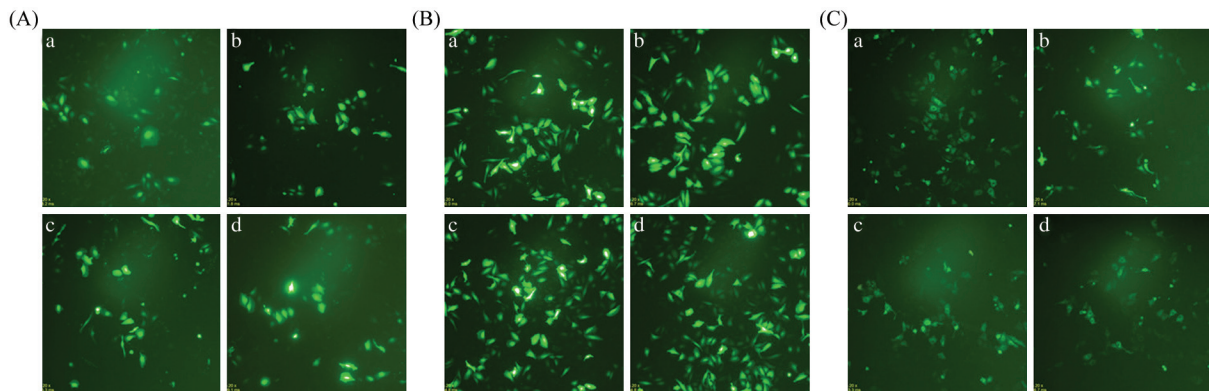
大约10 Kb的DNA片段。转入的大肠杆菌所涂平板培养基均有菌落产生。菌液培养抽提质粒经测序与设计序列一致。

2.2 真核表达载体转染MCF-7细胞

带绿色荧光蛋白的质粒转染进入MCF-7细胞, 转染24, 48, 72 h后置于倒置荧光显微镜下, 可见转染细胞有绿色荧光的表达, 未转染质粒的细胞则未出现荧光。于48 h荧光蛋白表达量最高, 72 h表达开始减弱, 见图1。

2.3 RT-PCR检测各组抑制效率

RT-PCR结果(图2)显示, 在转染乳腺癌细胞MCF-7后, 空白组与阴性组不具有显著性差异, DS-1、DS-2、DS-3、DS-4组转染细胞皆有不同程度的DNA转录抑制效果, 抑制率分别为 $64.7\% \pm 1.71\%$ 、 $52.9\% \pm 5.35\%$ 、 $37.0\% \pm 9.13\%$ 和 $59.5\% \pm 4.37\%$ 。

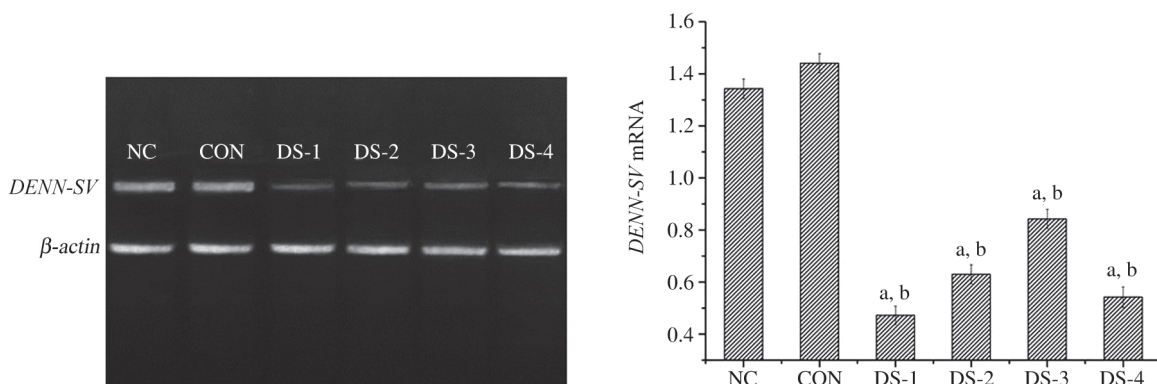


A: 24 h转染效果; B: 48 h转染效果; C: 72 h转染效果; a: DS-1-shRNA; b: DS-2-shRNA; c: DS-3-shRNA; d: DS-4-shRNA。

A: 24 h after transfection; B: 48 h after transfection; C: 72 h after transfection; a: DS-1-shRNA; b: DS-2-shRNA; c: DS-3-shRNA; d: DS-4-shRNA.

图1 各时间点绿色荧光蛋白的表达

Fig.1 Green fluorescent protein expression at different time



^a $P < 0.05$, 与NC组比较; ^b $P < 0.05$, 与CON组比较。

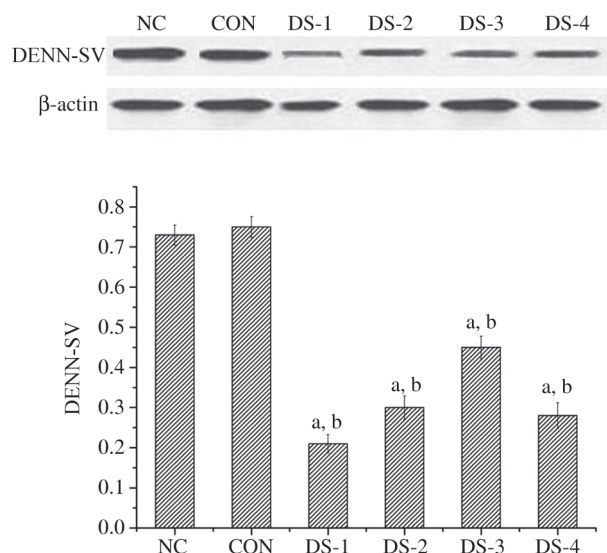
^a $P < 0.05$ compared with the NC group; ^b $P < 0.05$ compared with the CON group.

图2 RT-PCR检测各组DENN-SV mRNA的表达

Fig.2 DENN-SV mRNA expression in different groups analyzed by RT-PCR

2.4 RNA干扰后蛋白质表达的变化

结果(图3)显示, 空白组的蛋白表达与阴性对照组相比不存在显著的统计学差异, 在四组实验组中, DENN-SV蛋白的表达均受到了不同程度的抑制, 抑制率分别为68.7%±1.71%, 49.4%±5.35%, 32.6%±9.13%, 51.2%±4.37%, 其中以DS-1组抑制效率最高。



^a $P < 0.05$, 与NC组比较; ^b $P < 0.05$, 与CON组比较。

^a $P < 0.05$ compared with the NC group; ^b $P < 0.05$ compared with the CON group.

图3 Western blot显示DENN-SV基因的表达
Fig.3 DENN-SV protein expression in different groups analyzed by Western blot

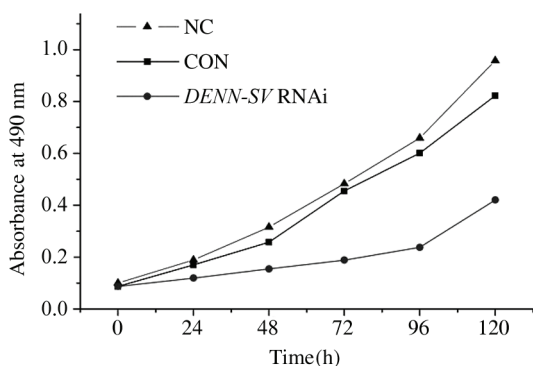


图4 人乳腺癌MCF-7细胞增殖曲线
Fig.4 Growth curves of human breast cancer MCF-7 cells by MTT assay

2.5 MTT检测MCF-7活力

MTT检测结果表明, 空白组与对照组细胞生长

迅速, 两组之间无显著差异($P > 0.05$), 实验组经转染后细胞增殖显著减少, 与前两组相比有显著性差异($P < 0.05$), 说明真核载体抑制DENN-SV表达后可引起人MCF-7细胞活力降低, 其机理尚需进一步研究。根据吸光度值绘制的增殖曲线见图4。

3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率呈逐年增高趋势, 且趋于年轻化。当前肿瘤治疗面临两大问题, 即患者对化疗药物的耐受与化疗药物对机体产生的许多副作用。现有研究表明, TNF相关凋亡诱导配体(TNF related apoptosis inducing ligand, TRAIL)可以选择性地诱导癌细胞凋亡, 同时不引起正常细胞的死亡^[3-7]。然而, 人乳腺癌细胞株MCF-7对TRAIL的杀伤作用并不敏感, 该细胞对TRAIL具有一定的耐受性^[8]。因此, 探索出既能杀死乳腺癌细胞又不损伤人体正常细胞的治疗手段已成为当前研究的热点。许多研究表明, 恶性肿瘤的发生发展及其对化疗的敏感程度是与细胞凋亡机制密切相关的。

RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术是近年兴起的分子生物学技术, 是指双链RNA导入细胞, 通过发夹状RNA或双链RNA与特异性mRNA结合, 诱导同源mRNA降解导致基因表达抑制的现象, 又称基因沉默, 是一种转录后基因沉默(post transcriptional gene silencing, PTGS)现象。RNAi技术具有其他技术不具有的高度特异性、高效性、可遗传性, 并简单易行、使用周期短、成本较低, 其相对反义核苷酸技术的优势为可进行高通量基因功能分析。RNAi技术为肿瘤疾病的基因治疗研究提供了重要研究手段^[9]。

DENN-SV是IG20基因(现已发现7个变异剪接体, 其中IG20、MADD、IG20-SV2及DENN-SV在人体组织中有表达)的一个变异剪接体, 其在所有组织中都有表达, RT-PCR显示其在肿瘤细胞中的表达水平是正常细胞的25~60倍^[1]。蛋白结构分析揭示, DENN-SV编码的蛋白的C-端有一个死亡结构域, 提示其可能参与了调控细胞凋亡的信号转导。DENN-SV能刺激HeLa细胞增殖, 如在HeLa细胞中过表达DENN-SV, 细胞增殖迅速, 在软琼脂上形成较多、较大的克隆, 并且对TNF- α 、TRAIL、表白亚乙替、长春花碱和 γ -射线引起的死亡具有耐受性^[1]。同时, 用

TNF- α 和放线菌酮处理过表达DENN-SV的HeLa细胞, caspase-8和caspase-3的活性并不升高^[10]。而在卵巢癌细胞PA-1中, 抑制IG20的表达后过表达DENN-SV, 可以增强细胞增殖和降低细胞对肿瘤坏死因子、TRAIL及 γ -辐射诱导的细胞凋亡^[11]。有研究表明, 在甲状腺滤泡癌细胞中沉默DENN-SV, 给予TRAIL处理后, 癌细胞对TRAIL更加敏感^[11]。由于DENN-SV在肿瘤细胞中特异性高表达, 并起到以上作用, 因此研究其在抗肿瘤药物的筛选及肿瘤治疗方面有重要意义。

本实验根据RNAi原理设计了四个针对DENN-SV的靶点序列, 并成功构建了shRNA真核表达载体, 转染进入人乳腺癌MCF-7细胞。实验结果显示, 设计构建的四个载体对DENN-SV的表达皆可起到显著的抑制作用, 通过RT-PCR及蛋白印迹技术筛选出了最佳靶点序列, 并初步检测到其抑制癌细胞活力的效应, 为以后研究该基因抑制凋亡的作用机制提供了实验基础, 为探索乳腺癌的基因治疗、寻找新的治疗靶点提供了实验依据。

参考文献 (References)

- 1 Efimova EV, Al-Zoubi AM, Martinez O, Kaithamana S, Lu S, Arima T, *et al.* IG20, in contrast to DENN-SV, MADD splice variants suppresses tumor cell survival, and enhances their susceptibility to apoptosis and cancer drugs. *Oncogene* 2004; 23(5): 1076-87.
- 2 Chow VT, Lee SS. DENN, a novel human gene differentially expressed in normal and neoplastic cells. *DNA Seq* 1996; 6(5): 263-73.
- 3 Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, *et al.* Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 1993; 364(6440): 806-9.
- 4 Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11(2): 255-60.
- 5 Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, *et al.* Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand *in vivo*. *Nat Med* 1999; 5(2): 157-63.
- 6 Mitsiades N, Poulaki V, Tseleni-Balafouta S, Koutras DA, Stamenkovic I. Thyroid carcinoma cells are resistant to FAS-mediated apoptosis but sensitive to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res* 2000; 60(15): 4122-9.
- 7 Prabhakar BS, Mulherkar N, Prasad KV. Role of IG20 splice variants in TRAIL resistance. *Cancer Res* 2008; 14(2): 347-51.
- 8 Rachner TD, Benad P, Rauner M, Goettsch C, Singh SK, Schoppet M, *et al.* Osteoprotegerin production by breast cancer cells is suppressed by dexamethasone and confers resistance against TRAIL-induced apoptosis. *J Cell Biochem* 2009; 108(1): 106-16.
- 9 Subramanian M, Pilli T, Bhattacharya P, Pacini F, Nikiforov YE, Kanteti PV, *et al.* Knockdown of IG20 gene expression renders thyroid cancer cells susceptible to apoptosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(4): 1467-71.
- 10 Al-Zoubi AM, Efimova EV, Kaithamana S, Martinez O, El-Idrissi Mel-A, Dogan RE, *et al.* Contrasting effects of IG20 and its splice isoforms, MADD and DENN-SV, on tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis and activation of caspase-8 and -3. *J Biol Chem* 2001; 276(50): 47202-11.
- 11 Waterhouse PM, Wang MB, Lough T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 2001; 411(6839): 834-42.