

人前列腺癌PC3细胞Bloom解旋酶基因干扰载体的构建

罗霖替^{1,2} 许厚强^{2*} 刘忠伟^{2,3} 段志强² 赵佳福^{1,2} 吴萍¹ 陈福¹

(¹贵州大学生命科学学院, 贵阳 550025; ²贵州大学动物科学学院高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 贵阳 550025; ³贵州大学农学院, 贵阳 550025)

摘要 通过RNAi技术干扰人前列腺癌PC3细胞Bloom(BLM)解旋酶基因的表达。实验前期根据BLM解旋酶基因序列设计并合成两对shRNA, 插入到CMV-copGFP-T2A-Puro-H1-mcs载体, 构建针对BLM解旋酶基因的重组干扰载体CMV-copGFP-T2A-Puro-H1-mcs-BLM1、CMV-copGFP-T2A-Puro-H1-mcs-BLM2。经测序载体构建成功后, 用脂质体将所构建的载体及阴性对照载体转染前列腺癌PC3细胞, 通过荧光定量PCR和Western blot检测转染细胞的BLM解旋酶表达情况。检测结果显示, 成功构建了BLM解旋酶RNAi真核表达载体; 利用脂质体转染PC3细胞后, 荧光定量PCR和Western blot鉴定结果表明, BLM解旋酶的表达水平显著降低, 即Bloom RNAi真核表达载体在mRNA和蛋白质水平阻断了BLM解旋酶的表达。

关键词 RNAi; 前列腺癌PC3细胞; Bloom解旋酶

Construction of RNAi Vectors for RNA Interference of Bloom Helicase Gene in Human Prostate Cancer PC3 Cells

Luo Mutan^{1,2}, Xu Houqiang^{2*}, Liu Zhongwei^{2,3}, Duan Zhiqiang², Zhao Jiafu^{1,2}, Wu Ping¹, Chen Fu¹

(¹College of Life Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China; ²College of Animal Science, Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Production in the Plateau Mountains Region, Ministry of Education, Guizhou University, Guiyang 550025, China; ³College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract RNA interference (RNAi) technology was used in this research for the sake of down-regulating the expression of Bloom helicase in human prostate cancer PC3 cells. At the early stage of the experiment, vectors capable of producing short hairpin RNA (shRNA) molecule for Bloom helicase were constructed using the mammalian expression plasmid vector CMV-copGFP-T2A-Puro-H1-mcs. After the vectors were successfully constructed and confirmed by DNA sequencing, the PC3 cells were transfected with the constructed positive and negative RNAi vectors. Real-time fluorescence quantitative PCR (RTFQ PCR) and Western blot were used to examine the mRNA and protein levels in the transfected PC3 cells. The results indicated that the Bloom helicase mRNA and protein level decreased significantly after tranfection of the positive vectors in PC3 cells, while in negative plasmid transfected PC3 cells, Bloom helicase expression remained the same level as the normal cells. These data suggested that Bloom helicase expression could be inhibited by shRNA transfectants in PC3 cells at mRNA and protein levels.

Keywords RNA interference; prostate cancer PC3; Bloom helicase

收稿日期: 2015-05-18 接受日期: 2015-10-14

国家自然科学基金(批准号: 700703131123)和贵州省国际合作项目(批准号: 黔科合外G字[2011]7008号)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0851-8292183, E-mail: houqiang0524@yahoo.com

Received: May 18, 2015 Accepted: October 14, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.700703131123) and Guizhou Province International Cooperation Project (Grant No.G[2011]7008)

*Corresponding author. Tel: +86-851-8292183, E-mail: houqiang0524@yahoo.com

网络出版时间: 2015-11-12 12:26:52 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151112.1226.008.html>

Bloom(BLM)解旋酶是RecQ家族中的一个重要的组成成员,它参与了DNA的复制、重组等细胞代谢过程,在维持端粒和染色体的稳定性中也发挥着重要作用。BLM解旋酶基因的突变可导致Bloom综合征的发生^[1]。Bloom综合征是一种罕见的隐性常染色体遗传疾病,患者不仅遗传不稳定,并且易患多种类型癌症^[2-3]。根据本实验室前期的研究发现,在前列腺癌细胞中BLM解旋酶普遍高表达,即BLM解旋酶基因的高表达会导致前列腺癌细胞的癌变^[4],并且通过体外对BLM解旋酶的药物实验发现,某些药物(如甘草次酸等)可以抑制BLM解旋酶的活性,从而阻碍BLM解旋酶与DNA的结合^[5]。

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是近年来广泛使用的基因沉默技术,是由双链RNA引起的序列特异性基因沉默。RNAi具有明显的特异性和高效性特征,与其他方法相比, RNAi技术在基因功能研究上具有异于其他基因沉默技术的优点:容易开展、简单易行、实验周期短、成本低。小分子干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)的合成方法有几种,目前化学合成的siRNA虽然可以高效特异性地抑制外源性和内源性基因的表达,但是由于不稳定在人体内很容易被降解,导致RNA干扰作用只是瞬时作用。于是,基于DNA载体的RNAi重组载体在体内表达siRNA的技术便发展了起来。多数siRNA表达载体依赖三种RNA聚合酶III启动子(polIII)中的一种,操纵一段短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)在哺乳动物细胞中表达。RNAi载体的构建需要两段编码短发夹RNA序列的DNA单链经退火克隆到相应载体中polIII启动子下游,同时需要经过测序以保证克隆的序列正确。本文拟构建RNAi载体对前列腺癌PC3细胞中BLM解旋酶基因表达进行抑制研究,为随后探明BLM解旋酶基因表达抑制后的PC3细胞的生物学作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

前列腺癌PC3细胞为中国科学院上海细胞库购买,本实验室传代保种,具体方法为:使用含有10%血清、100 μ L/mL卡那霉素、100 μ L/mL氨苄霉素的DMEM/F12培养基,于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的条件下培养,待细胞密度长至80%左右经胰蛋白酶消化,使用含有DMSO的冻存液冻存保种。空载体(CMV-copGFP-T2A-Puro-H1-mcs)购自广州辉骏公司;大肠杆菌DH5 α 为本实验室制备保存; *Bam*H I和*Eco*R I限制性核酸内切酶从生工生物工程有限公司购买; T4连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司; RNA提取试剂盒、反转录试剂盒、荧光定量PCR试剂盒、细胞裂解液、BCA蛋白定量试剂盒均购自康为世纪生物技术有限公司; Western blot试剂盒购自碧云天碧云天生物技术有限公司; 一抗和二抗分别购自Life和Abcam公司; LipofectamineTM 2000购自Invitrogen公司; OPTI-MEM培养基购自Gibco公司。

1.2 方法

1.2.1 Bloom-shRNA序列的设计合成 根据NCBI上BLM解旋酶基因的靶序列,按照shRNA的设计原则,由上海吉玛公司设计合成两条针对BLM解旋酶基因的DNA模板,其序列为: *Bam*H I酶切位点、21 nt正义链、9 nt成环结构、21 nt反义链、RNA酶III转录终止位点(6个T)、*Eco*R I酶切位点。阴性对照序列为: *Bam*H I酶切位点、21 nt打乱顺序正义链、9 nt成环结构、21 nt打乱顺序反义链、RNA酶III转录终止位点(6个T)、*Eco*R I酶切位点。模板序列和阴性对照经BLAST比对均确认与BLM解旋酶以外的已知人类基因无同源性(表1)。

1.2.2 表达载体的构建 将合成的寡核苷酸片段退火并用*Bam*H I和*Eco*R I双酶切,然后与同样经*Bam*H I和*Eco*R I双酶切并经过琼脂糖凝胶纯化的载体(带有绿色荧光标签)进行连接,连接产物转化到

表1 两条干扰序列及一条阴性对照

Table 1 Two interference vectors and one negative control

名称 Name	序列 Sequences
shRNA-1	5'-GCA GCG ATG TGA TTT GCA TCG TTC AAG AGA CGA TGC AAA TCA CAT CGC TGC TTT TTT G-3'
shRNA-2	5'-GCT TCA GCA GCG GAA CAT AAG TTC AAG AGA CTT ATG TTC CGC TGC TGA AGC TTT TTT G-3'
Negative control	5'-CGG AGC TAT GAG TTG TAC CTG TTC AAG AGA CAG GTA CAA CTC ATA GCT CCG CTT TTT TG-3'

DH5a感受态细胞中, 涂板过夜培养, 并挑取单菌落进行培养, 提取质粒进行酶切鉴定。通过DNA测序来确定阳性克隆。

1.2.3 表达载体转染PC3细胞 将PC3细胞按 1×10^5 /孔的数量转种于24孔培养板, 添加DMEM/F12培养液(含10%胎牛血清、100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 卡那霉素、100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 氨基苄霉素), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养细胞密度至80%左右, 分别用重组载体、阴性对照及空载体转染PC3细胞, 以未转染重组载体的PC3细胞为未转染对照组。各转染组每孔载体用量为1.25 μL , 脂质体用量为2 μL 。载体和脂质体分别用无血清的OPTI-MEM稀释。转染后6 h更换为含10%胎牛血清无抗生素的DMEM/F12培养液。转染24~48 h后于荧光倒置显微镜下观察转染效率。

1.2.4 RTFQ PCR检测mRNA水平 转染48 h后按康为公司RNA提取试剂盒说明书进行细胞总RNA的提取。取5.0 μL 总RNA, 按照逆转录试剂盒说明书进行cDNA合成反应, 将逆转录生成的各组cDNA稀释相同倍数, 使每组浓度至大约10 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 之后进行实时荧光定量PCR检测。利用Primer 5.0软件设计BLM上下游引物。上游引物序列为: 5'-CCA GCC TCC CAA AGG TCT AAG-3', 下游引物序列为: 5'-TGC TAT TGG CTC CTG ATG TCG-3', 扩增片段大小约100 bp。以 β -actin基因为内参基因, 上游引物序列为: 5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3', 下游引物序列为: 5'-AGC CTT CTC GAT GGT GGT GAA GAC-3', 扩增片段大小为300 bp左右。扩增体系具体为: SYBR 10 μL 、上游引物0.4 μL 、下游引物0.4 μL 、cDNA 4 μL , 加水补足到20 μL 。扩增条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s, 共40个循环; 每次循环后于95 $^{\circ}\text{C}$ 收集荧光信号, 将产物从55 $^{\circ}\text{C}$ 升温至95 $^{\circ}\text{C}$, 温度每升高0.5 $^{\circ}\text{C}$ 读1次荧光值。每组设4个复孔, 实验重复3次以上, 以 β -actin作为参照, 计算Ct均值, 应用相对定量法 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 进行定量分析。

1.2.5 Western blot检测蛋白质水平 收集转染72 h后的PC3细胞使用细胞裂解液将各组细胞裂解, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min离心5 min, 取上清。BCA法测定蛋白质浓度, 调整蛋白质浓度与体积, 将蛋白质定量至50 μg , 每组蛋白质中均加入蛋白体积1/4体积的上样缓冲液, 混匀煮沸5 min, 冷却后SDS-PAGE电泳, 转PVDF膜, 脱脂奶粉封闭。加入一抗(兔抗人BLM), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, TBST

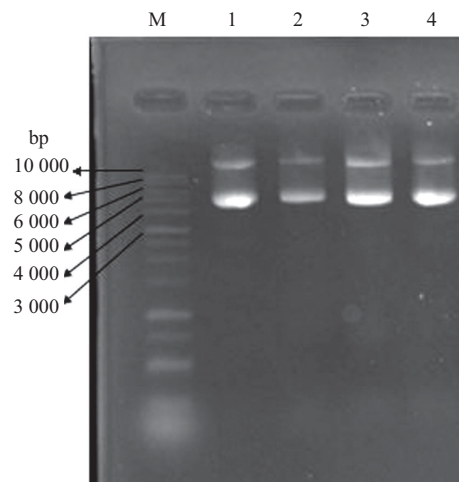
洗膜3次, 加入二抗(羊抗兔)孵育1 h, TBST洗膜3次, 加入Super Signal发光液, Bio-Rad成像系统成像分析。每组实验重复4次。

1.2.6 统计学处理 应用SPSS 19.0软件进行分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ (平均数 \pm 标准差)表示, 两组以上数据采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 干扰BLM解旋酶基因重组载体的构建及鉴定

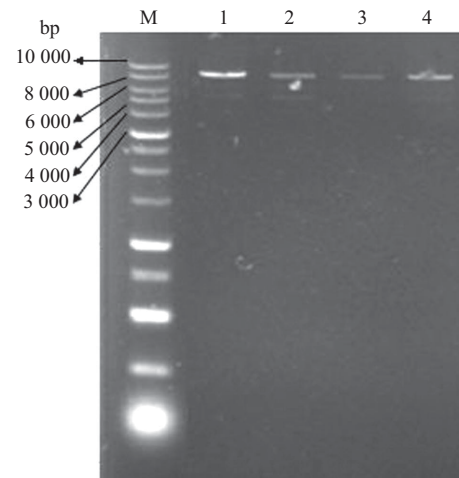
挑取单菌落摇菌提取质粒, 将重组质粒于1%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 结果在8 000 bp处出现重组质粒



M: DNA marker; 1: shRNA-1; 2: shRNA-2; 3: 阴性对照; 4: 空载体。
M: DNA marker; 1: shRNA-1; 2: shRNA-2; 3: negative control; 4: empty vector.

图1 重组载体克隆后鉴定

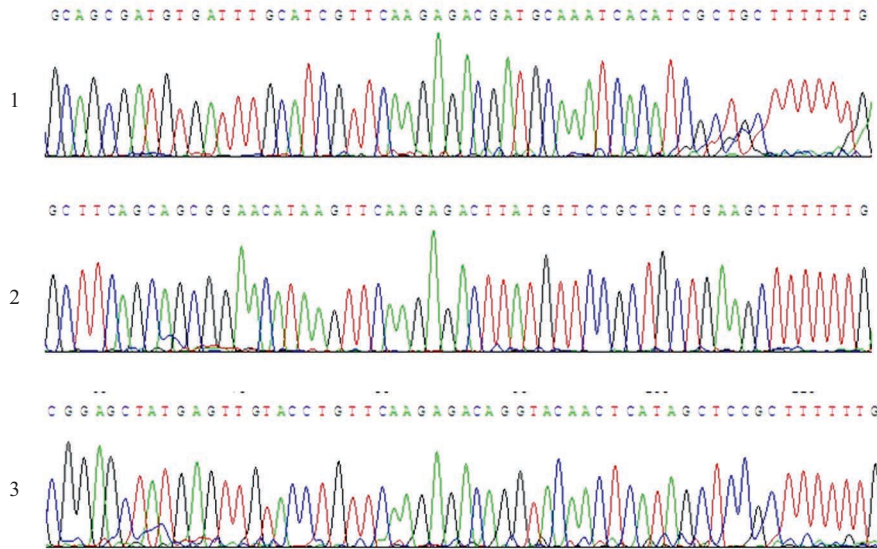
Fig.1 Electrophoresis detection of recombinant vectors



M: DNA marker; 1: shRNA-1; 2: shRNA-2; 3: 阴性对照; 4: 空载体。
M: DNA marker; 1: shRNA-1; 2: shRNA-2; 3: negative control; 4: empty vector.

图2 重组载体酶切后鉴定

Fig.2 The digested results of the recombinant vectors



1: shRNA-1; 2: shRNA-2; 3: 阴性对照测序结果。
1: shRNA-1; 2: shRNA-2; 3: negative control.

图3 重组载体测序结果

Fig.3 The sequencing results of the recombinant vectors

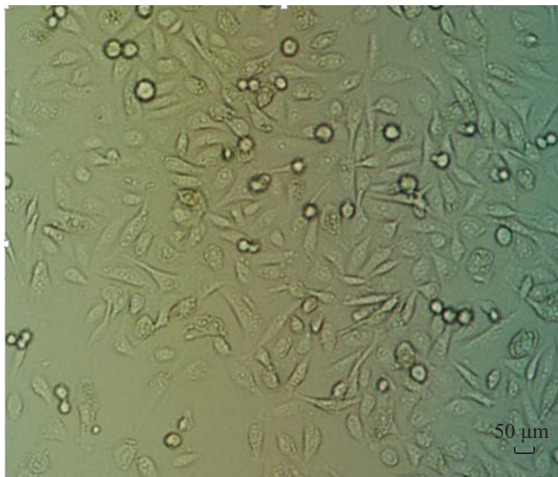


图4 正常光下转染后的PC3细胞

Fig.4 PC3 cells after being transfected with recombinant vectors observed under the normal light

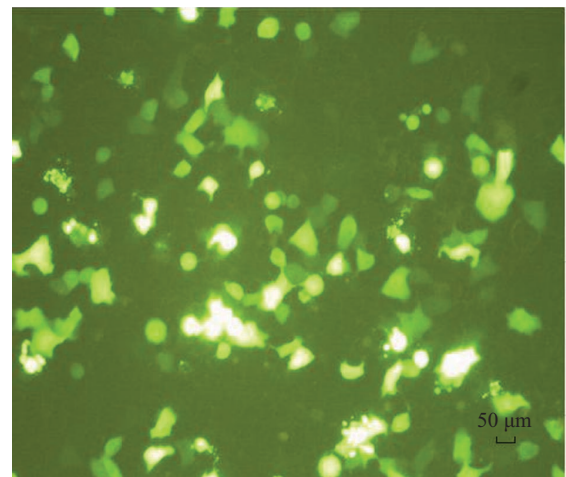


图5 荧光显微镜下转染重组载体后的PC3细胞

Fig.5 PC3 cells after being transfected with recombinant vectors observed under the fluorescence microscope

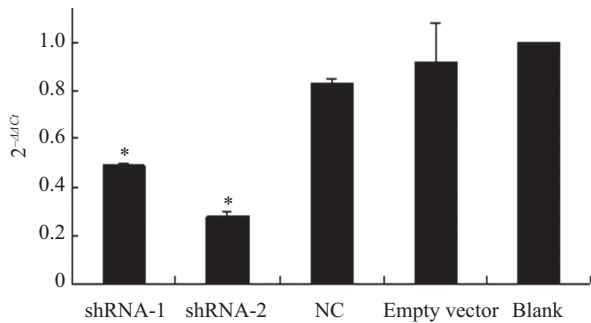
条带。由于质粒为环状的所以有拖带现象(图1), 为进一步确认质粒, 分别用*Bam*H I和*Eco*R I将质粒双酶切。然后进行电泳, 结果表明, 在约7 800 bp处出现空载体的片段, 由于此电泳所用的胶浓度为1%, 而目的片段太小, 与载体差距太大未能显示(图2)。将鉴定为阳性的克隆菌液送上海英骏公司进行测序。DNA测序结果显示, 所构建的两个干扰载体及一条阴性对照均含有所设计的目的片段, 其序列与设计的靶向寡核苷酸序列完全一致(图3), 进一步证实目的片段已正确插入载体, 干扰BLM解旋酶基因重组载体构建成功。

2.2 BLM解旋酶基因重组载体转染效率的检测

重组载体、阴性对照及空载体转染PC3细胞后24 h在荧光倒置显微镜下观察细胞发光情况, 发现被转染后的细胞发出绿色荧光(图5), 表明构建的重组载体成功转入PC3细胞中。

2.3 RNA干扰后, PC3细胞BLM解旋酶mRNA水平的变化

转染siRNA 48 h后, shRNA-1和shRNA-2两实验组的mRNA水平与空白组相比明显要低, 基因沉默的效率分别为51%和72%, 差异极显著($P < 0.01$), 具有统计学意义。而阴性对照组和空载体组与空白对



* $P < 0.01$, 与空白组比较。

* $P < 0.01$ vs blank group.

图6 转染各重组载体的PC3细胞中BLM解旋酶基因mRNA水平
Fig.6 The mRNA levels of Bloom helicase gene in PC3 cells transfected with different recombinant vectors

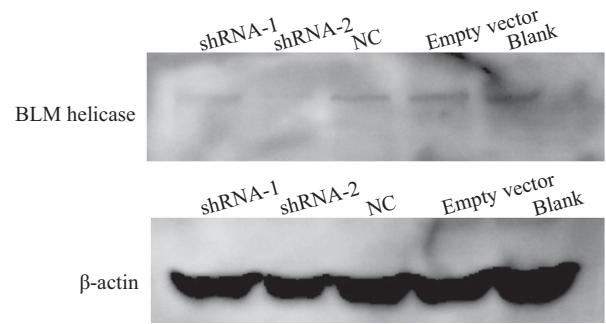


图7 各组重组质粒转染细胞后其BLM解旋酶蛋白质水平
Fig.7 Bloom helicase protein level of PC3 cells transfected with recombinant vectors

表2 各组重组载体转染细胞后细胞mRNA水平的对比

Table 2 The contrast of BLM helicase gene mRNA level in PC3 cells transfected with recombinant vectors

名称	shRNA-1	shRNA-2	阴性对照	空载体	空白组
Name	shRNA-1	shRNA-2	Negative control	Empty vector	Blank
$\Delta\Delta Ct$	1.01	1.74	-0.27	-0.03	0
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	0.49	0.28	0.83	0.92	1.00
$\bar{x} \pm s$	0.49±0.01	0.28±0.02	0.83±0.02	0.92±0.16	1.00±0.00

\bar{x} 表示各重复组 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的平均数, s 表示标准差。

\bar{x} indicated the average number of $2^{-\Delta\Delta Ct}$ for each group and s indicated the standard deviation.

照组相比均没有明显变化, 差异不显著($P > 0.05$), 无统计学意义(图6和表2)。

2.4 RNA干扰后PC3细胞BLM解旋酶蛋白质水平的变化

各重组质粒转染PC3细胞72 h后, 各组细胞BLM解旋酶蛋白质水平发生变化。shRNA-1和shRNA-2组BLM解旋酶蛋白质水平与空白组相比明显降低, 阴性对照组和空载体组与空白组相比差别均较小(图7), 表明RNAi载体有效地抑制了前列腺癌PC3细胞中BLM解旋酶蛋白质的水平。

3 讨论

近年来, 围绕以RecQ解旋酶家族为潜在药物靶标的基础研究越来越为国际广大科研工作所重视^[7-8]。认识这类酶的结构、功能及其致病的分子基础以便开展与癌症发生有关的BLM解旋酶的致病机理的基础研究, 对进一步认识该酶家族在癌症生物学中的作用非常有帮助, 以此为契机的基因治疗为包括肿瘤在内的多种人类疾病提供新的治疗靶点, 为抗癌药物的开发提供新的途径和策略^[9-10]。

RNAi指在进化过程中由双链RNA(double-strand-

ed RNA, dsRNA)诱发的、高度保守的、同源 mRNA 高效特异降解的现象^[11-12]。RNAi技术可靶向剔除或阻碍特定基因的表达, 由于其具有特异性、高效性等特点^[13], 在国际上已被广泛用于检索基因功能、恶性肿瘤的基因治疗等领域^[14]。

本实验采用RNAi技术, 以BLM解旋酶基因为靶基因, 设计并构建两条能够在细胞内表达并靶向针对BLM解旋酶基因的siRNA表达载体, 应用脂质体法转入前列腺癌PC3细胞中。通过荧光定量PCR和Western blot检验重组干扰载体对PC3细胞中BLM解旋酶基因和蛋白表达的影响, 结果表明, 重组干扰载体在mRNA和蛋白水平可有效抑制PC3细胞中BLM解旋酶基因的表达, 为临床基因靶向治疗前列腺癌奠定了良好的基础。

参考文献 (References)

- German J, Roe AM, Leppert MF, Ellis NA. Bloom syndrome: An analysis of consanguineous families assigns the locus mutated to chromosome band 15q26.1. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91(14): 6669-73.
- Hickson ID. RecQ helicases: Caretakers of the genome. Nat Rev Cancer 2003; 3(3): 169-78.
- Cheok CF, Bachrati CZ, Chan KL, Ralf C, Wu L, Hickson ID.

- Roles of the Bloom's syndrome helicase in the maintenance of genome stability. *Biochem Soc Trans* 2005; 33(Pt 6): 1456-9.
- 4 孟惠惠, 许厚强, 刘金河, 王时雄. 三种癌细胞株中Bloom综合征解旋酶(BLM)的表达水平高于正常细胞. *细胞与分子免疫学杂志* (Meng Huihui, Xu Houqiang, Liu Jinhe, Wang Shixiong. Three kinds of cancer cell lines in Bloom syndrome helicase (BLM) expression level is higher than that of normal cells. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*) 2014; 30(6): 649-51.
 - 5 刘金河, 许厚强, 孟惠惠, 罗霖蕾. 甘草次酸对Bloom解旋酶生物学特性的影响. *中国生物化学与分子生物学报* (Liu Jinhe, Xu Houqiang, Meng Huihui, Luo Mutan. Effects of glycyrrhetic acid on biological properties of bloom syndrome helicase. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*) 2014; 30(9): 919-26.
 - 6 方晓亮, 潘骏, 顾正勤, 康健, 齐隽. RNAi抑制人前列腺癌PC3细胞EphB4基因表达的实验研究. *中华男科学杂志* (Fang Xiaolian, Pan Jun, Gu Zhengqin, Kang Jian, Qi Jun. Inhibitory effect of RNAi on the expression of EphB4 gene in human prostate cancer PC3 cells. *Chinese Journal of Andrology*) 2009; 23(6): 6-10.
 - 7 Xi XG. Helicases as antiviral and anticancer drug targets. *Curr Me Chem* 2007; 14(08): 883-915.
 - 8 Sampath A, Padmanabhan R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. *Antiviral Res* 2009; 81(1): 6-15.
 - 9 Hanada K, Iwazaki M, Ihashi S, Ikeda H. UvrA and UvrB suppress illegitimate recombination: Synergistic action with RecQ helicase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(11): 5989-94.
 - 10 Thompson LH, Schild D. Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res* 2002; 509(1): 135-49.
 - 11 Xia H, Mao Q, Paulson HL, Davidson BL. siRNA mediated gene silencing *in vitro* and *in vivo*. *Nat Biotechnol* 2002; 20(10): 1006-10.
 - 12 Wilson RC, Doudna JA. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biophys* 2013; 42: 217-39.
 - 13 秦玉新, 蒙凌华, 丁健. RNA干扰技术的研究进展. *中国药理学通报* (Qin Yuxin, Meng Linghua, Ding Jian. Research of progresses of RNA interference. *Chinese Pharmacological Bulletin*) 2007; 23: 421-4.
 - 14 赵晓艳, 孙立新. RNA干扰技术在肿瘤治疗中的研究进展. *国际肿瘤学杂志* (Zhao Xiaoyan, Sun Lixin. Research progress of RNAi in tumor treatment. *Journal of International Oncology*) 2014; 41(3): 177-9.