

基于小鼠*MMP-9*基因的siRNA的筛选

唐照勇^{1#} 刘 阳^{2#} 刘隆兴¹ 方廖琼^{1*}

(¹西南大学生物技术学院, 重庆 400716; ²兰州军区疾病预防控制中心, 兰州 730000)

摘要 通过GenBank数据库检索, 基于小鼠*MMP-9*基因设计特异性的siRNA干扰靶点, 克隆至pGCSi-U6/Neo/GFP载体中, 使用PEI衍生物包裹, 转染小鼠黑色素瘤B16细胞, 流式细胞仪和激光扫描共聚焦显微镜分析细胞转染情况, RT-PCR检测24, 48 h后*MMP-9*基因转录水平变化, 筛选最佳的重组质粒和干扰靶点。结果显示: 成功设计和构建了3个*MMP-9*-siRNA干扰质粒, 3个重组质粒对B16细胞的转染率分别为60.04%、63.93%和56.27%, 且3个重组质粒均能有效干扰B16细胞*MMP-9* mRNA的表达, 其中*MMP-9*-siRNA-2干扰效率最高(63%), 可持续干扰*MMP-9*基因表达。这些结果提示, *MMP-9*-siRNA-2为沉默小鼠黑色素瘤细胞*MMP-9*基因最优的siRNA重组质粒。

关键词 *MMP-9*; B16细胞; siRNA; RT-PCR

肿瘤的侵袭和转移是肿瘤患者死亡的主要原因, 而恶性肿瘤发生侵袭和转移早期的重要事件就是对细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)的降解。基质金属蛋白酶(matrix metallo-proteinase, MMPs)是一类能够有效降解基底膜和ECM的蛋白家族, *MMP-9*作为MMPs家族的主要成员, 也叫明胶酶B, 是一个分子量为92 kDa的蛋白, 它能降解ECM的主要成分IV型胶原酶, 破坏肿瘤周围的基质和基底膜屏障, 刺激肿瘤细胞穿过胞外基质进行侵袭和转移^[1-2], 甚至参与调节肿瘤血管发生^[3-4]。因此, *MMP-9*在肿瘤的发生、发展中至关重要, *MMP-9*基因是肿瘤靶向基因治疗的一个关键靶点。为此, 本文根据*MMP-9*基因序列, 选取3个干扰靶点, 设计并合成3个siRNA序列, 将其克隆至以GFP为报告基因的pGensil-1质粒上, 构建重组质粒*MMP-9*-siRNA, 转入B16细胞, 通过流式细胞仪和激光扫描共聚焦显微镜分析转染情况, 以实时定量RT-PCR检测*MMP-9*基因表达水平, 筛选特异性沉默*MMP-9*基因的干扰质粒。

1 材料与方法

1.1 材料

pGensil-1质粒载体、DH5 α 和引物合成(上海吉凯基因科技有限公司); 总RNA提取试剂盒(离心柱型)、Quant cDNA第一链合成试剂盒、2 $\times$ Taq PCR MasterMix、50 bp DNA Ladder、Marker III、Loading Buffer和Real MasterMix(SYBR Green)均购自天根生化科技(北京)有限公司; E.N.Z.A HP Plasmid Mini

Kit I(Omega公司, 美国); GenEscortII基因转染试剂(南京慧基生物技术有限公司); RPMI-1640、胎牛血清和胰蛋白酶购自Hyclone公司; 小鼠黑色素瘤B16细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 siRNA重组质粒的设计与构建

在GenBank中搜索小鼠*MMP-9* mRNA序列, 寻找合适的靶位点, 用上海吉凯基因化学技术有限公司siRNA设计软件设计并合成相应的siRNA序列, 将合成的siRNA序列和质粒分别经双酶切后, 连接构建重组质粒; 另外, 在保证和靶mRNA没有同源性的基础上, 根据碱基错配原则设计一条阴性对照siRNA序列(NC)。siRNA序列合成、重组质粒构建均委托上海吉凯基因化学技术有限公司完成。

1.3 siRNA重组质粒转染B16细胞

将构建好的重组质粒转染B16细胞, 实验按重组质粒分组, 设阴性对照组和正常B16细胞的空白组, 每组设3个复孔, 24 h和48 h作为两个转染后观察时间点。取对数生长期B16细胞, 以24 h检测点约4 $\times$ 10⁵/孔, 48 h检测点约2 $\times$ 10⁵/孔接种六孔板(Costar公司), 每孔加2 mL含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、相对湿度95%, 培养24 h至细胞稳定贴壁生长后, 按照GenEscortII转染试剂说明

收稿日期: 2012-04-18 接受日期: 2012-06-15

重庆市教委科学技术研究(No.KJ090302)资助项目

*共同第一作者

*通讯作者。Tel: 023-68485223, E-mail: lqfang06@163.com

书操作, 将各组重组质粒包裹后转染B16细胞。转染24 h后, 收集 2×10^6 个细胞, 流式细胞仪(Bection-Dickinson, 美国)检测细胞转染率; 转染48 h后TCS SP2型激光扫描共聚焦显微镜(Leica, 德国)观察细胞形态及荧光表达情况。

1.4 实时定量RT-PCR测定MMP-9基因的表达变化

收集转染后24 h和48 h的各组细胞, 参照总RNA提取试剂盒(离心柱型)实验步骤提取总RNA, 将提取的总RNA用RNase-free ddH₂O溶解, -80 °C保存。用quant cDNA第一链合成试剂盒合成cDNA, 以Real MasterMix(SYBR Green)进行实时定量RT-PCR分析, β -actin为分子内参, 引物由上海吉凯基因化学技术有限公司合成。MMP-9(249 bp)上游引物: 5'-ACA GCC AAC TAT GAC CAG-3', 下游引物: 5'-TGC CAC CAG GAA CAG G-3'; β -actin(263 bp)上游引物: 5'-GAG ACC TTC AAC ACC CCA GC-3', 下游引物: 5'-ATG

TCA CGC ACG ATT TCC C-3'。PCR反应条件为: 95 °C预变性1 min; 95 °C变性10 s, 60 °C退火30 s, 68 °C延伸60 s采集荧光, 循环45次; 95 °C保温1 min, 以0.4 °C/s的间隔从68 °C到95 °C读板, 获得融解曲线。独立重复实验3次, 数据以平均值 $\pm$ 标准差表示, 使用SPSS17.0软件进行统计分析, 结合 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算方法显示各组的基因表达水平。

2 结果

2.1 siRNA干扰序列及重组质粒构建

见表1, 根据小鼠MMP-9基因序列(NM_013599.2)选择了三个靶位点, 针对这些靶位点设计了3对siRNA序列。将所有的序列分别插入pGensil-1载体U6 Promoter和CMV Promoter之间的多克隆位点, 获得的重组质粒分别命名为: MMP-9-siRNA-1、MMP-9-siRNA-2和MMP-9-siRNA-3。载体图谱如图1。

表1 根据siRNA靶位点所设计的shRNA寡聚核苷酸序列
Table 1 shRNA oligonucleotides designed according to the siRNA target sites

组别 Groups	shRNA序列 shRNA sequences
MMP-9-1	5'-AAG GAC GGC AAA TTT GGT TTC TTC AAG AGA GAA ACC AAA TTT GCC GTC CTT-3'
MMP-9-2	5'-GAC TAC GAT AAG GAC GGC AAA TTC AAG AGA TTT GCC GTC CTT ATC GTA GTC-3'
MMP-9-3	5'-GAC CAT CAT AAC ATC ACA TAC TTC AAG AGA GTA TGT GAT GTT ATG ATG GTC-3'

方框部分代表发卡结构。
Box represents the hairpin structure.

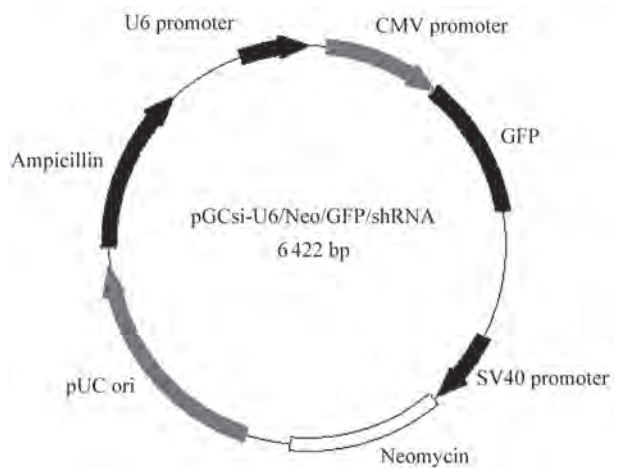
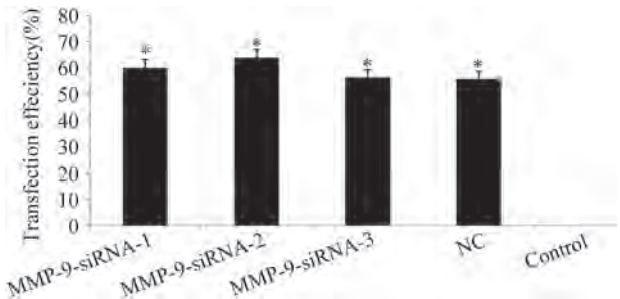


图1 pGCsi-U6/Neo/GFP/shRNA质粒载体
Fig.1 pGCsi-U6/Neo/GFP/shRNA plasmid vector

2.2 siRNA重组质粒转染B16细胞

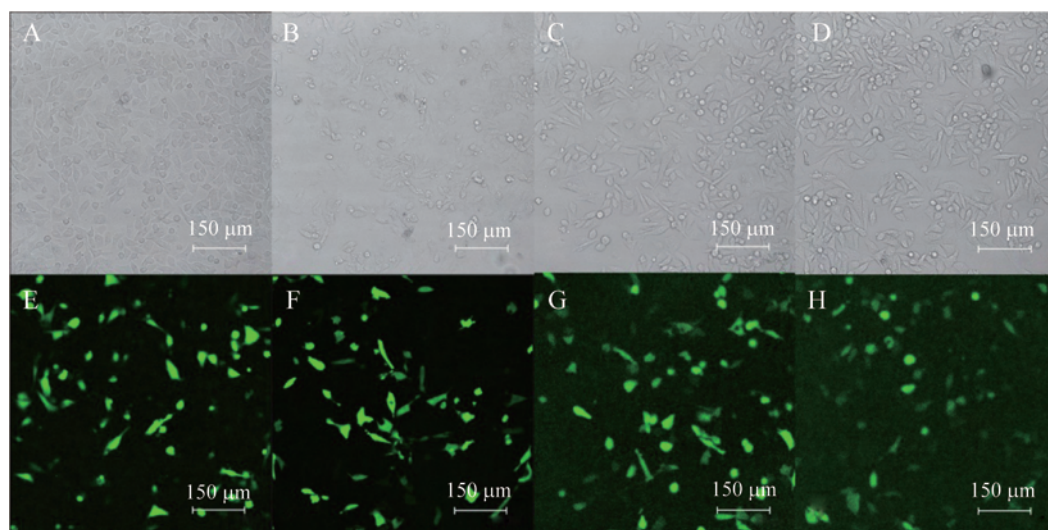
从图2可见, 流式细胞仪测定的各组转染率分别



*P<0.05, 与对照组比较。结果以mean $\pm$ SD表示, n=3。
*P<0.05 vs control. Data are represented as mean $\pm$ SD, n=3.

图2 流式细胞仪测定各组重组质粒转染率
Fig.2 Transfection efficiency of each group analyzed by FCM

为MMP-9-siRNA-1组60.04% $\pm$ 3.83%, MMP-9-siRNA-2组63.93% $\pm$ 0.51%, MMP-9-siRNA-3组56.27% $\pm$ 0.94%, NC组55.84% $\pm$ 1.52%, 与空白对照组(0.06% $\pm$ 0.01%)比较差异显著, 具有统计学意义(P<0.05), 质粒转染效率较高。激光扫描共聚焦显微镜观察各组

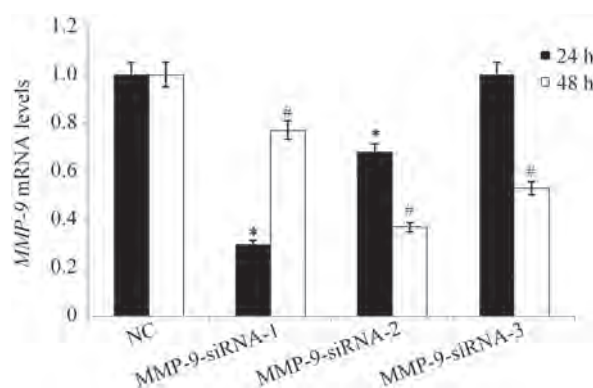


A,E: MMP-9-siRNA-1组; B,F: MMP-9-siRNA-2组; C,G: MMP-9-siRNA-3组; D,H: NC组。

A,E: MMP-9-siRNA-1 group; B,F: MMP-9-siRNA-2 group; C,G: MMP-9-siRNA-3 group; D,H: NC group.

图3 各组siRNA质粒转染细胞的白光和荧光图(LSCM, 200×)

Fig.3 Fluorescent and white light images of transfected cells in each siRNA group(LSCM, 200×)



* $P < 0.05$, # $P < 0.05$, 与NC组比较。

* $P < 0.05$, # $P < 0.05$ vs NC group.

图4 各组siRNA质粒转染细胞的MMP-9 mRNA表达水平

Fig.4 MMP-9 mRNA levels of transfected cells in each siRNA group

细胞形态良好且均有较强的绿色荧光表达(图3)。

2.3 siRNA干扰对MMP-9 mRNA表达的影响

实时定量RT-PCR检测干扰24 h和48 h后各组的MMP-9 mRNA表达水平的变化,判断对MMP-9基因的下调情况。与阴性对照组比较,细胞转染24 h后,MMP-9-siRNA-1和MMP-9-siRNA-2组细胞基因下调比例分别为70%、32%($P < 0.05$),而MMP-9-siRNA-3组与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$);转染48 h后,MMP-9-siRNA-1、MMP-9-siRNA-2和MMP-9-siRNA-3各组细胞MMP-9基因水平均有不同程度的下调,其中MMP-9-siRNA-2干扰效率可达63%(图4)。

3 讨论

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是由与目的基因同源的双链RNA诱导的转录后基因沉默现象。其作用机制是通过导入外源或内源性双链RNA,引起生物体或细胞内同源mRNA降解,从而可有效导致外源性以及内源性基因的沉默^[5]。RNAi具有高效性、高特异性、ATP依赖性和可传播性,即沉默效应可以在不同细胞甚至生物体间长距离传递和维持,并可传递给子一代^[6-7]。RNAi能特异性地剔除或者沉默特定的基因,已经广泛地应用于脊椎动物和无脊椎动物基因功能分析^[8-9],以及恶性肿瘤的靶向基因治疗研究^[10-11]。

本文设计和构建了3个siRNA重组质粒,采用一种由可生物降解的分枝状PEI衍生物与其它组分复合而成的GenEscort™II转染试剂转染B16细胞,有效地提高了转染率,保证了干扰效率。转染B16细胞后流式细胞仪检测各实验组均有较高的转染效率,其中以MMP-9-siRNA-2为最高(63.93%)。为更准确地反应重组质粒的转染情况,本文采用激光扫描共聚焦显微镜进行逐点、逐行、逐面快速扫描成像,而非普通的荧光显微镜,从图3可以看出细胞形态良好,高表达绿色荧光,表明各组质粒成功转染。比较各重组质粒实时定量RT-PCR结果可以看出MMP-9-siRNA-1和MMP-9-siRNA-2对MMP-9基因的下调比例较高,在24 h时,MMP-9-siRNA-1干扰效率为70%,MMP-9-

siRNA-2在48 h时具有最高干扰效率63%, 一般认为, RNAi的对基因的靶向沉默在48 h达到mRNA水平下调的高峰^[12-13], 而MMP-9-siRNA-2从24 h到48 h表现出持续的干扰效力并呈现出上升趋势。本文采用瞬时转染法转染B16细胞, 转染效率虽较低, 但抑制效率可达63%, 表明转染细胞的实际有效干扰率远远高于63%。综合而言, MMP-9-siRNA-2干扰质粒为最优重组质粒。

本实验成功构建并筛选出了针对小鼠B16细胞MMP-9的干扰质粒, 为进一步研究MMP-9基因沉默后对B16细胞侵袭和迁移力的影响, 以及通过在动物实验模型上的研究, 从而揭示MMP-9在恶性肿瘤发生及转移中的作用和意义, 为肿瘤的分子治疗奠定了基础。

参考文献 (References)

- 1 Lakka SS, Gondi CS, Yanamandra N, Olivero WC, Dinh DH, Gujrati M, *et al.* Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis. *Oncogene* 2004; 23(27): 4681-9.
- 2 Kunigal S, Lakka SS, Gondi CS, Estes N, Rao JS. RNAi-mediated downregulation of urokinase plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase-9 in human breast cancer cells results in decreased tumor invasion, angiogenesis and growth. *Int J Cancer* 2007; 121(10): 2307-16.
- 3 Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, *et al.* Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000; 2(10): 737-44.
- 4 Hawinkels LJ, Zuidwijk K, Verspaget HW, de Jonge-Muller ES, van Duijn W, Ferreira V, *et al.* VEGF release by MMP-9 mediated heparan sulphate cleavage induces colorectal cancer angiogenesis. *Eur J Cancer* 2008; 44(13): 1904-13.
- 5 Lipardi C, Wei Q, Paterson BM. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell* 2001; 107(3): 297-307.
- 6 Arenz C, Schepers U. RNA interference: From an ancient mechanism to a state of the art therapeutic application? *Naturwissenschaften* 2003; 90(8): 345-59.
- 7 Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 2000; 101(1): 25-33.
- 8 Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 2002; 26(2): 199-213.
- 9 Premssirut PK, Dow LE, Kim SY, Camiolo M, Malone CD, Miething C, *et al.* A Rapid and scalable system for studying gene function in mice using conditional RNA interference. *Cell* 2011; 145(1): 145-58.
- 10 Lares MR, Rossi JJ, Ouellet DL. RNAi and small interfering RNAs in human disease therapeutic applications. *Trends Biotechnol* 2010; 28(11): 570-9.
- 11 Gencer S, Cebeci A, Irmak-Yazicioglu MB. Silencing of the MMP-3 gene by siRNA transfection in gastric cancer AGS cells. *J Gastrointest Liver Dis* 2011; 20(1): 19-26.
- 12 McManus MT, Haines BB, Dillon CP, Whitehurst CE, van Parijs L, Chen J, *et al.* Small interfering RNA-mediated gene silencing in T lymphocytes. *J Immunol* 2002; 169(10): 5754-60.
- 13 Alemán LM, Doench J, Sharp PA. Comparison of siRNA-induced off-target RNA and protein effects. *RNA* 2007; 13(3): 385-95.

Construction and Screening of siRNA Recombinant Plasmids for Mouse *MMP-9* Gene Silencing

Tang Zhaoyong^{1#}, Liu Yang^{2#}, Liu Longxing¹, Fang Liaoqiong^{1*}

(¹College of Biotechnology, Southwestern University, Chongqing 400716, China; ²Center for Disease Control and Prevention, Lanzhou Military Area Command of Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730000, China)

Abstract Specific siRNA interference target sites were designed according to the sequence of mouse *MMP-9* gene in GenBank, and oligonucleotides were synthesized and inserted into pGCsi-U6/Neo/GFP plasmid to constitute the recombinant plasmids, the siRNA recombinant plasmids were transfected into B16 cells by PEI derivative, which was confirmed by flow cytometry and laser scanning confocal microscope observation, and the interfering efficiency was evaluated by Real-time quantitative RT-PCR analysis. The results showed that three *MMP-9*-siRNA interference plasmids were designed and constructed successfully. Transfection efficiency of the three *MMP-9*-siRNA recombinant plasmids were 60.04%, 63.93% and 56.27%, respectively, and the expression of *MMP-9* mRNA in B16 cells was effectively down-regulated. The *MMP-9*-siRNA-2 had the highest interference efficiency (63%) and persistent interference. The results suggested that *MMP-9*-siRNA-2 is the optimal recombinant plasmid for silencing *MMP-9* gene of mouse B16 cell.

Key words *MMP-9*; B16 cell; siRNA; RT-PCR

Received: April 18, 2012 Accepted: June 15, 2012

This work was supported by the Science and Technology Research Project of Chongqing Education Committee (No.KJ090302)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: 86-23-68485223, E-mail: lqfang06@163.com