

文章编号:1005-6947(2006)12-0927-05

· 基础研究 ·

Survivin shRNA 表达质粒的构建及其抑制 survivin 表达的初步研究

沈汉斌, 郑启昌, 王国斌, 陈道达, 卢小明

(华中科技大学同济医学院附属协和医院 腹腔镜中心, 湖北 武汉 430022)

摘要:目的 探讨 survivin 短发夹 RNA (shRNA) 的表达质粒对胆囊癌细胞 survivin mRNA 及蛋白表达的抑制作用。方法 构建 pshRNA-survivin 重组质粒, 在脂质体的介导下转染胆囊癌细胞株 GBC-SD。RT-PCR 分析 survivin mRNA 的表达; Western blot 检测 survivin 蛋白表达。结果 PCR 和 DNA 测序证实表达质粒构建成功, 并能明显地抑制 GBC-SD/survivin mRNA 的表达。结论 构建的 pshRNA-survivin 表达质粒能有效地抑制转染细胞 survivin mRNA 的表达, 从而为肿瘤的生物学治疗提供新的方法和材料。

关键词: 胆囊肿瘤/病理学; survivin 蛋白; 肿瘤抑制蛋白类

中图分类号: R735.8; R34-33 **文献标识码:** A

Construction of short hairpin RNA expression plasmid and its inhibition of survivin expression

SHEN Han-bin, ZHENG Qi-chang, WANG Guo-bin, CHEN Dao-da, LU Xiao-ming

(Department of Endoscopic Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: **Objective** To study the inhibit effect of survivin short hairpin RNA on the survivin mRNA and protein expression of gallbladder carcinoma cells. **Methods** Human gallbladder carcinoma cells (GBC-SD) were transfected with recombinant plasmid. RT-PCR and Western blot were used to analyze the changes in expression levels of survivin mRNA and protein. **Results** The size of the PCR product was 350 bp. DNA sequencing showed that the sequence of recombinant vector pshRNA-survivin was successfully constructed and suppressed the expression of (GBC-SD) survivin mRNA. **Conclusions** The recombinant plasmid constructed can inhibit the expression of survivin mRNA in transfected cells. This provides a new method and material for the biological therapy of cancer.

Key words: Gallbladder Neoplasms/pathol; Survivin Protein; Tumor Suppressor Proteins

CLC number: R735.8; R34-33 **Document code:** A

细胞凋亡障碍与肿瘤发生、发展密切相关。抑制抗凋亡基因的过表达不仅可诱导肿瘤细胞凋亡而且还可选择性地增加肿瘤细胞对以凋亡为机制的治疗方法的敏感性,从而提高肿瘤患者的总体生

存率。survivin 作为 IAP 家族成员之一,主要通过 caspase 依赖和 caspase 非依赖 2 条途径来发挥抗凋亡作用^[1]。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是新发现的一种关闭特定基因表达的技术,它通过将双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 导入细胞后,在 Dicer 酶的作用下产生有活性的短干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA), 与该段 RNA 同源的 mRNA 产生特异性降解,从而导致特异基因的转录后基因沉默现象^[2]。它具有高效性、高特异性、快

收稿日期:2005-06-28; 修订日期:2006-06-06。

作者简介: 沈汉斌,男,湖北随州人,华中科技大学同济医学院附属协和医院 (现在解放军第四七七医院) 主治医师,主要从事肝胆及微创方面的研究。

通讯作者: 沈汉斌 E-mail: shbjq@yahoo.com.cn。

速性等特点^[3],在后基因组时代的基因功能研究、抗病毒、抗肿瘤等方面具有广阔的应用前景。本研究采取基因沉默策略,利用 psiRNA-hH1 neo 载体,以 survivin mRNA 为靶序列,构建在细胞内产生短发夹状 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 的重组质粒,并初步观察其对胆囊癌细胞株 GBC-SD survivin 表达的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

表达质粒 psiRNA-hH1 neo 购自 InvivoGen 公司。人胆囊癌 GBC-SD 细胞株购自上海生化细胞所国家细胞库。感受态菌种 DH5 α 引自卫生部武汉生物制品研究所。

1.2 主要试剂及工具酶

RPMI-1640 培养基,新生牛血清,G418 和 Trizol 试剂购自 Gibco 公司;MMLV 逆转录酶,限制性内切酶 Bbs I 和 Xba I, RNA 抑制物为 Promega 公司产品;DNA 聚合酶购自日本 TaKaRa 公司;兔抗人 survivin 多克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购自北京中山生物工程公司;lipofectamine 2000 和 Opti-MEM 无血清培养基购自美国 Invitrogen 公司;MTT (四甲基氮唑蓝) 美国 Sigma 公司产品,用 0.01 mmol/lPBS 稀释成 5 mg/mL;DM-SO (二甲亚砜) 的自北京化工厂。DNA 片段, β -actin 和 survivin 的引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 细胞培养

GBC-SD 细胞用含 15% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱内培养。当细胞长满瓶底 80% 并贴壁后,用 0.25% 胰酶消化,倒置显微镜下见细胞间隙增大、胞质回缩时终止消化;然后分瓶再培养,待进入对数生长期(细胞贴壁、胞浆延展)约为传代后 24h 时,弃去原培养液,用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后用于实验。

1.4 质粒的构建

1.4.1 含 survivin 靶序列的短 dsDNA 分子的获得

根据 survivin mRNA 选择目标序列,按照 shRNA 的设计原则^[4],设计合成含 survivin 的 2 条反向重复多聚核苷酸序列。计算目的序列中嘌呤和嘧啶的含量百分比(G/C)。G/C 值接近 50% 较为理想,但必须大于 30% 小于 70%。目标序列为人 survivin

mRNA 翻译起始位点下游 +374 ~ +392 nt (Gene Bank nm. NM-001168) 位置的序列为基础(AG-GAAACTGCCAAGAAAGT),设计合成含 Bbs I 和 Xba I 酶切位点的寡核苷酸,正义、反义序列分别为 5' TCCCAGGAAACTGCCAAGAAAGTTC AAGAGACTTTCTTCG CAGTTTCCTTT 3' 和 5' CAAAAAAGGAAACTGCCGAA GAAAGTCTCTTGAAC TTTCTTCGCAGTTTCCT 3',正义、反义链之间被回折序列分开,在之后由 5 个“T”构成,另外列的两端保留内切酶 Bbs I 或 Xba I 的酶切位点。阴性对照双链寡核苷酸转录产物所形成的作用序列为: Oligo 1 5' TCCCATAGGGAACAGGATA-CAGATCAAGAGTCTGTATCCTGTTCCCTATTT 3', Oligo 2 5' CAAAAAATAGGGAACAGGATACAGACT CTTGATCTG-TATCCTGTTCCCTAT 3'。此序列不与任何人类基因序列同源。应用 Blast (www. ncbi. nlm. nih. gov / Blast) 在 EST 数据库查询上述序列,证实人类基因组除 survivin 外,未发现与另外任何基因同源。多聚核苷酸序列在退火缓冲液中 93 $^{\circ}$ C 热冲击 3 min,然后在至少 30 min 时间自然冷却至 37 $^{\circ}$ C,便获得退火双链 DNA 分子。

1.4.2 psiRNA-survivin 载体的构建

用限制性内切酶 Bbs I 和 Xba I 将带 H1 启动子的 psiRNA-hH1 neo 质粒进行消化。低熔点琼脂糖凝胶电泳法分离纯化酶切片段,然后与双链 DNA 分子连接。连接条件为 psiRNA-hH1 neo 载体 1 μ L, dsDNA 1 μ L, rATP 3 μ L, 10 \times ligase buffer 2 μ L, T4 DNA ligase 1 μ L, ddH₂O 12 μ L。16 $^{\circ}$ C 过夜,即得重组载体,命名为 pshRNA-survivin。

1.4.3 重组质粒的获得

制备 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞,冻存于 -70 $^{\circ}$ C 备用。分别扩增和纯化质粒。根据以上序列分别合成双链 DNA,退火连接,转化大肠杆菌,挑选克隆扩增,质粒提取,获重组质粒 pshRNA-survivin。

1.5 鉴定

取重组质粒菌株做多聚酶链反应(PCR)(以阳性质粒菌株作对照)。反应体系:4.0 μ L 10 \times 缓冲液,0.4 μ L dNTP (25 μ mol/L),上、下游引物各取 0.8 μ L (上游 5' AGAGGCTATTCTGCTATGAC 3',下游 5' GCTTCAGTGACAACGTCGAG 3'),0.4 μ L 10% 的 Tween 20,2.8 μ L DMSO,2.0 U TaqDNA 酶,总体积 40 μ L。挑取菌株加入 PCR 反应管中。扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,

72℃延伸1min。30个循环后,72℃延伸5min。取PCR产物和DNA Marker经2%琼脂糖凝胶电泳(0.5μg/mL溴化乙锭),凝胶成像系统拍照鉴定。另外取PCR产物进行序列测定,以证实DNA片段已克隆入载体中。

1.6 用脂质体转染细胞

GBC-SD细胞在37℃,5%CO₂孵化箱孵化,用DMEM培养基,补充10%小牛血清、100U/mL青霉素及100μg/mL链霉素。保持细胞指数生长,待细胞贴壁80%汇片后,用1:5新鲜不含抗生素的DMEM培养液稀释细胞上清,在24孔板上每孔置500μL细胞培养液。用Opti-MEM稀释lipofectamine 2000,加到质粒中形成混合物。每孔加1μL lipofectamine 2000和1μg相应质粒,轻柔混匀。在室温下孵育20min,形成lipofectamine 2000质粒复合物。将复合物加入细胞中,轻柔摇匀。37℃,5%CO₂孵育箱中孵育12h。按1:10稀释传代并换用选择培养基(600μg/mL,G418)继续培养14d,然后将出现的细胞克隆在培养瓶中扩增培养并传代建系,分别命名为GBC-SD/pshRNA-survivin(+)和GBC-SD/pshRNA-survivin(-)细胞。

1.7 逆转录(RT)-PCR检测 survivin mRNA 基因表达

以RT-PCR法检测在shRNA干预下survivin基因mRNA的表达。实验分3组:GBC-SD细胞组、GBC-SD/pshRNA-survivin(-)细胞组和GBC-SD/pshRNA-survivin(+)细胞组,每组细胞均设3个复瓶。分别于转染后24,48,72h收集细胞,用Trizol试剂提取细胞总RNA,紫外分光光度计检测其浓度[计算浓度公式:样品的A₂₆₀值×40×稀释倍数(μg/mL)]和纯度(样品的A₂₆₀/A₂₈₀值),RT-PCR二步法进行合成。PCR的总反应体系为50μL,其中包括cDNA 3μL,10×buffer 5μL,MgCl₂ 10μL,dNTP 1.5μL,Taq酶0.5μL,survivin引物各2μL,β-actin各1μL,ddH₂O 4μL。反应条件为94℃预变性5min,然后94℃30s,58℃45s,72℃1min30s;循环32次,最后72℃延伸10min。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳分析,紫外灯下观察、摄影。试验重复3次。survivin的PCR引物为5'-CTCAAGGACCACCGCATCTC-3'和5'-CCTCAATCCATGGCAGCCAG-3',合成产物为392bp;β-actin作为内参照,引物为5'-TGTACGTTGC-TATCCAGGCT-3'和5'-CTCCTTAATGTCACGCACGA-3',

合成产物为247bp。

1.8 免疫印迹(Western blot)检测 survivin 的蛋白表达

检测在shRNA干预下survivin基因蛋白的表达改变。上述3组细胞经胰酶消化后,用预冷至4℃的裂解缓冲液加入到经PBS漂洗第3天收集的培养细胞中,冰上作用20min,12000r/min离心2min后,上清液保存于-20℃。采用Bradford法测定蛋白质浓度,以50μg/孔上样,12%SDS-PAGE凝胶电泳分离,通过电转移法将蛋白质从SDS-PAGE凝胶转移至硝酸纤维素膜。后者在含5%脱脂奶粉的TTBS中37℃封闭90min,加入一抗(兔抗人survivin多克隆抗体,稀释度为1:1000)4℃孵育过夜,TTBS充分漂洗(10min×3次),加入二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG,稀释度为1:1000)37℃作用40min,TTBS充分漂洗(10min×3次);化学荧光法(ECL)显色,观察结果。

1.9 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS 10.0统计软件对数据进行方差分析。

2 结果

2.1 shRNA 表达质粒的构建

pshRNA-survivin重组表达质粒的构建过程及体内从DNA模板产生shRNA的策略见图1。

2.2 PCR 产物电泳鉴定

结果显示,在325bp和381bp处分别有1条明亮的带,与预计的相符(图2)。

2.3 RT-PCR 分析

瞬时转染前和转染后收集24,48h和72h细胞提取总RNA,RT-PCR半定量检测细胞survivin mRNA的表达,以β-actin作为内参照。转染pshRNA-survivin后的GBC-SD细胞survivin mRNA表达不同程度地受到抑制,其水平显著下调。转染后72h GBC-SD细胞组、GBC-SD/pshRNA-survivin(-)细胞组和GBC-SD/pshRNA-survivin(+)细胞组的吸光光度值分别为 1.324 ± 0.009 , 1.318 ± 0.012 和 0.375 ± 0.011 (图3)。经方差分析,GBC-SD/pshRNA-survivin(+)细胞组与GBC-SD细胞组及GBC-SD/pshRNA-survivin(-)细胞组mRNA表达量之间存在统计学差异($P < 0.05$)。

图1 质粒构建图

2.4 survivin 的蛋白水平变化

应用 Western blot 检测前 3 d GBC-SD 细胞及 GBC-SD/pshRNA-survivin (-) 细胞 survivin 蛋白表达,与对照相比较均无显著变化;GBC-SD/pshRNA-

M: Marker; 1: pshRNA-survivin 扩增产物; 2: psiRNA-hH1 neo 扩增产物

图2 PCR 扩增产物琼脂糖电泳图

survivin (+) 细胞 survivin 蛋白表达随时间递增而降低,第 1 天,第 2 天,第 3 天分别降低了 12%, 25% 和 80% (图 4)。

M: Marker; 1-3: GBC-SD 细胞组; 4-6: 转染 GBC-SD/pshRNA-survivin (-) 细胞后 24, 48, 72 h 的 RT-PCR; 7-9: 转染 GBC-SD/pshRNA-survivin (+) 细胞后 24, 48, 72 h

图3 转染后 RT-PCR

1: GBC-SD 细胞; 2: GBC-SD/pshRNA-survivin (-) 细胞; 3: GBC-SD/pshRNA-survivin (+) 细胞

图4 转染后蛋白水平变化

3 讨论

目前在哺乳动物细胞中用作抑制基因的主要办法是使用单链的反义寡核苷酸。但由于存在多种不利因素,其使用受到了很大的限制。自 1998 年 Fire 等^[5]首次提出 RNA 干扰以来,很快便成为生命科学领域的研究重点之一。RNAi 具有抑制作用强、稳定性高、细胞摄取相对容易等优点,正逐渐取代反义核酸,成为新的研究热点^[6]。

RNAi 是一种全新的基因治疗手段,在哺乳动物细胞中诱导 RNAi 的关键在于如何有效地合成 siRNA。合成方法主要有化学合成、体外转录和构建带启动子(主要为 H1 多聚酶 III 和 U6 启动子)和相应发夹结构基因的载体,导入细胞后转录出 shRNA 诱导 RNAi。3 种方法均有成功的报道^[7]。但由于化学合成和体外转录转染有效率低、抑制作用短暂等缺点,因此限制了其应用和推广。本实验构建质粒

产生 shRNA 的方法所产生的 shRNA 体内抑制目的基因的效果与合成 siRNA 者相似,但花费小、成本低,可在细胞内稳定产生 shRNA,在转染时还可克服合成 siRNA 可能造成的 RNase 污染^[8]。

survivin 在多种肿瘤表达的普遍性,使应用靶向 survivin 的阻断性免疫治疗或基因治疗促进肿瘤细胞凋亡的抗肿瘤疗法成为可能。目前多采用反义寡核苷酸、反义 RNA 以及核酶技术进行抑制 survivin 表达的研究^[9]。RNAi 技术运用过程中的关键是目的基因靶序列的选择。本研究通过构建靶向 survivin siRNA 真核表达载体,经稳定转染肿瘤细胞并进行细胞效应的研究发现,其在 mRNA 及蛋白质水平对 survivin 的抑制率达 80% 而不影响 β -actin 的表达,对照组 siRNA 对 survivin 的表达无明显影响。这说明笔者构建的 siRNA 不仅作用强大而且具有特异性。

胆囊癌早期症状不明显,诊断时多数已属晚期,往往失去手术时机。胆囊癌并非很少见,患病率占消化道肿瘤的第6位^[10]。患者预后非常差。据报道,5年生存率AJCC(American Joint Committee on Cancer)I期为60%,II期和III期分别只有5%和1%^[11]。胆囊癌不易被早期发现,治疗过程中易对化疗药物产生耐受,是其治愈率低的主要原因。本文以人胆囊癌GBC-SD细胞为主要对象,研究胆囊癌GBC-SD细胞在shRNA干预下survivin mRNA及蛋白的表达被显著抑制,为进一步诱导胆囊癌细胞对化疗的敏感性提供了实验材料和理论支持。

参考文献:

- [1] Liu T, Brouha B, Grossman D. Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in survivin-targeted melanoma cells[J]. *Oncogene*, 2004, 23(1):39-48.
- [2] Hamon GJ. RNA interference[J]. *Nature*, 2002, 418(6894):244-252.
- [3] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediates RNA interference in cultured mammalian cells[J]. *Nature*, 2001, 411(6836):494-498.
- [4] Elbashir SM, Harborth J, Weber K, et al. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs[J]. *Methods*, 2002, 26(2):199-213.
- [5] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in caenorhabditis elegans[J]. *Nature*, 1998, 391(6669):806-809.
- [6] Aoki Y, Cioca D, Oidaira H, et al. RNA interference may be more potent than antisense RNA in human cancer cell lines[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2003, 30(1):96-98.
- [7] Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, et al. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence specific silencing in mammalian cells[J]. *Genes & Development*, 2002, 16(8):948-951.
- [8] Sui G, Soohoo C, Affarelli B, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(8):5515-5518.
- [9] Pennati M, Binda M, Colella G, et al. Ribozyme mediated inhibition of survivin expression increases spontaneous and drug induced apoptosis and decreases the tumorigenic potential of human prostate cancer cells[J]. *Oncogene*, 2004, 23(2):386-394.
- [10] Endo K, Ashida K, Miyake N, et al. E-Cadherin gene mutations human intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *J Pathol*, 2001, 193(2):310-317.
- [11] Joo YE, Park CS, Kim HS, et al. Prognostic significance of E-Cadherin/Catenin expression in gastric cancer[J]. *J Korean Med Sci*, 2000, 15(3):655-666.

中南大学学报(医学版) 征稿、征订启事

Journal of Central South University (Medical Sciences)

《中南大学学报(医学版)》原名《湖南医科大学学报》,为教育部主管、中南大学主办的医药卫生类综合性学术期刊。本刊是中国科技论文统计源期刊、中国生物医学核心期刊及中国期刊方阵的“双效”期刊;多次被国家和省部级新闻和出版部门评为优秀科技期刊;并被美国《医学索引》(IM, MEDLINE),荷兰《医学文摘》(EM),美国《化学文摘》(CA),美国《生物学文摘》(BA),俄罗斯《文摘杂志》(AJ, VINITI),中国科学引文数据库(核心库)(CSCD),《中文核心期刊要目总览》,台湾华艺 CEPS 中文电子期刊等国内外多家重要数据库和权威文摘期刊收录。

本刊创刊于1958年,为双月刊,铜版纸彩色印刷,逢双月月末出版,A4开本,国内外公开发行。定价:15元,国内统一刊号:CN43-1427/R,国际标准刊号:ISSN 1672-7347;国内邮发代号:42-10,国外邮发代号:BM422;各地邮局(所)均可订阅,漏订者也可直接与本刊编辑部联系订阅。

欢迎投稿,欢迎订阅。

地址:湖南省长沙市湘雅路110号湘雅医学院75号信箱。邮编:410078。电话:0731-4805495;0731-4805496。传真:0731-4804351。E-mail:xyxb2005@126.com;xyxb@xysm.net,Http://xybx.xysm.net。Http://hnykdx.periodical.net.cn。