

沉默 BIRC7 基因的 Jurkat 稳定细胞系建立

吴红阳^{1,2}, 林汉良¹, 朱有凯¹, 古聪敏¹, 叶子茵¹, 张 萌¹

(1. 中山大学附属第一医院病理科, 广东 广州 510080; 2. 安徽医科大学第一医院肿瘤内科, 安徽 合肥 230022)

摘要:【目的】通过 RNA 干扰技术(RNAi)建立稳定性 BIRC7 基因沉默的 Jurkat 实验细胞模型。【方法】应用 pSilencer 4.1-CMV neo 构建 BIRC7 shRNA 表达载体,采用脂质体将载体导入 Jurkat 细胞,利用 G418 筛选出稳定表达 shRNA 细胞后,行 RT-PCR 和 Western blot 等技术检测细胞 BIRC7 表达水平。【结果】成功筛选出分别携带二种重组 shRNA 表达的 Jurkat 细胞系。与对照组细胞相比,转染 BIRC7 shRNA 的细胞 BIRC7 mRNA 表达下降约 > 70%, BIRC7 蛋白表达减少 > 60%。生长曲线显示生长速度减慢,细胞倍增时间延长,细胞凋亡率增加。【结论】稳定转染重组 BIRC7 shRNA 表达载体能有效干扰 BIRC7 基因表达,表明 RNAi 技术可以成为研究 BIRC7 基因功能的有效工具。BIRC7 有可能成为 T-淋巴瘤母细胞性白血病/淋巴瘤治疗的潜在新靶点。

关键词:白血病; BIRC7; RNAi; Jurkat 稳定细胞系

中图分类号:R392.3

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2008)02-0139-05

Establishment of Jurkat Cell Lines with Knockdown of BIRC7 Gene

WU Hong-yang^{1,2}, LIN Han-liang¹, ZHU You-kai¹, GU Cong-min¹, YE Zi-yin¹, ZHANG Meng¹

(1. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;
2. Department of Cancer Medicine, The First Affiliated Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230022, China)

Abstract:【Objective】To establish the cell lines with stable silencing BIRC7 gene expression by RNAi in T-lymphoblastic leukemia Jurkat cell line.【Methods】The vector of pSilencer 4.1-CMV neo was used to construct BIRC7 shRNA which could express shRNA targeting BIRC7 in Jurkat cell line. BIRC7 shRNA was transfected into Jurkat cells by the lipofectamine and the cells stably expressing the shRNA were selected by G418. BIRC7 mRNA and protein in the Jurkat cell line were detected by multi RT-PCR and Western blot analysis.【Results】Two Jurkat stable transfected cell lines were successfully selected. Compared with the negative control cells, multi RT-PCR and Western blot showed the expression of BIRC7 mRNA and protein were downregulated >70% and >60% respectively. The Jurkat cell line transfected with BIRC7 shRNA was decreased in the growth speed, prolonged in the time to double cell number. The apoptosis rate was increased in the cell lines transfected with BIRC7 shRNA.【Conclusions】The results showed that stable transfection with BIRC7 shRNA recombinant vector could effectively knockdown the expression of BIRC7 gene, and verified that RNAi was a powerful tool in research of BIRC7 function. BIRC7 would be a latent target in T-lymphoblastic/lymphoma leukemia therapy.

Key words: leukemia; BIRC7; RNAi; Jurkat cell lines

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(2):139-143]

BIRC7 (baculoviral IAP repeat-containing 7, livin) 是近年来发现的凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis protein, IAP) 家族成员之一。BIRC7 又称 Livin、ML-IAP 或 KIAP^[1],在正常成人的大多数组织均不表达,而在胎儿及多种类型的肿瘤存在高表达,如黑色素瘤、膀胱癌、胃癌、乳腺癌和非霍奇金

淋巴瘤^[2]等。研究发现,BIRC7 的表达水平与肿瘤的性质、分化程度、预后、治疗效果、耐药及侵袭性等有一定关系。BIRC7 选择性地高表达于肿瘤组织的这一特点,可能使其成为肿瘤治疗的一个潜在有效靶点。RNA 干扰技术(RNAi)是近年来发展起来的一种基因敲除新技术。与传统的基因沉默技术相比,

收稿日期:2007-07-08

基金项目:中山大学临床医学研究“5010”计划项目(2007045;2007049)

作者简介:吴红阳(1970-),男,安徽合肥人,博士,主治医师,E-mail:why970@yahoo.com.cn;林汉良,通讯作者,男,教授,博士生导师

RNAi具有细胞穿透能力强、实验投入少、周期短、操作简便等优势,在基因治疗研究中发挥重要作用^[3]。已有文献报道白血病细胞系 Jurkat 细胞株是一个较理想的RNAi实验细胞模型^[4,5]。BIRC7 基因在 Jurkat 细胞中也呈高表达。应用 RNAi 技术干扰 BIRC7 基因在 Jurkat 细胞中的表达文献报道较少。本文旨在通过 RNAi 建立稳定性 BIRC7 基因沉默的 Jurkat 实验细胞模型,探讨 BIRC7 基因与 T 淋巴瘤细胞性白血病/淋巴瘤的相关性。

1 材料与方法

1.1 试剂

shRNA 表达载体 pSilencer 4.1-CMV neo (Ambion 公司), Trizol/Lipofectamine 2000 及无血清培养基 OPTI-MEMI (Invitrogen 公司),逆转录试剂盒(MBI 公司), DNA 内切酶、连接酶(大连 Takala 公司), 鼠抗人 BIRC7 抗体 (Alpha Diagnostic International公司)、鼠抗人 β -actin 抗体、羊抗鼠 IgG 抗体(武汉博士德公司)、化学发光底物(普利来公司)、PCR 扩增仪(Applied Biosystems 公司)、电泳仪

(BIO-RAD 公司)。

1.2 细胞培养

Jurkat 细胞株购自上海细胞库。细胞复苏后用不含抗生素的细胞培养基(RPMI-1640 + 15%胎牛血清)放置在 37℃含体积分数 5%的 CO₂ 培养箱内培养。

1.3 构建针对 BIRC7 基因的 shRNA

根据 Crnkovic-Mertens I 等的实验结果^[7]及 shRNA 设计原则^[6], 序列 5'-GGA AGA GAC UUU GUC CAC A-3' 被用于构建针对 BIRC7 基因的 shRNA,核苷酸片段位于 AF311388 mRNA 第 473~493 碱基之间序列。具体序列如下:P1, 5'-GATCC-GGAAGAGACTTTGTCCACA-TTCAAGAGA-TGTGG ACAAAGTCTCTTCCTT A-3'; P2, 5'-AG CTT-AAGGAAGAGACTTTGTC CACA-TCTCTTGA A-TG TGGACAAAGTCTC TCCG-3'。上述二条寡核苷酸模板链由上海生工公司合成。

pSilencer 4.1-CMV neo 载体含有 *Bam*H I 和 *Hind* III 两个克隆位点, 酶切后可连接表达目的 shRNA 的寡核苷酸模板; 此外该载体携带的 neo 基因赋予细胞 G418 抗性。目的 shRNA 和载体结构见图 1。

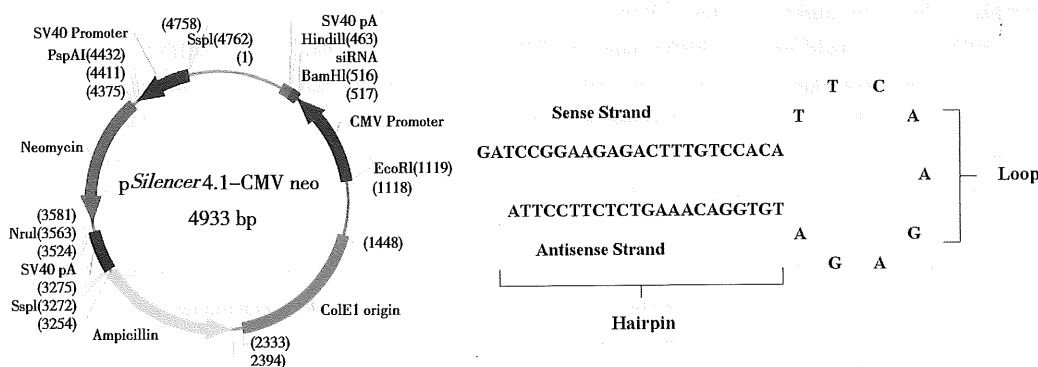


图 1 重组 shRNA 表达载体(左)及载体表达的 shRNA 结构(右)示意图

Fig.1 The vector of pSilencer 4.1-CMV neo (left) and its expressing BIRC7 shRNA structure

载体双酶切后琼脂糖电泳后回收备用。用 TE 缓冲液将两条寡核苷酸链溶解后混匀,按以下条件退火形成双链:95℃ 30 s,72℃ 2 min,37℃ 2 min,25℃ 2 min;经 T4 DNA 连接酶作用连入载体相应的克隆位点;连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ;挑取琼脂平板上的菌落增菌培养,取 1 μ L 菌液作 PCR 扩增 (Primer 1:5'-AGG CGA TTA AGT TGG GTA-3';Primer 2:5'-CGG TAG GCG TGT ACG GTG-3'),目的条带大小为 243 bp;阳性标本经测

序鉴定连接正确后,大量培养以抽提高纯度载体 DNA 用于细胞转染。

1.4 细胞转染和筛选稳定表达目的 shRNA 细胞

细胞转染前 1 d,Jurkat 细胞更换新鲜培养基,次日在 24 孔板上按每孔 1.25×10^6 个细胞/mL 培养基比例接种 8 孔。其中 2 孔做 2 种未转染阴性对照。用 50 μ L 无血清培养基 OPTI-MEMI 分别稀释 Lipofectamine 2000 和载体 DNA,两者比例为 1 μ L:0.8 μ g;5 min 内将两者混匀,室温孵育 20 min

后加入 Jurkat 细胞中;在 CO₂ 培养箱孵育 4 h 后每孔细胞加进 PHA (1 μ g/mL)。对照孔为仅加 Lipofectamine 2000 以及加无血清培养基 OPTI-MEMI 和 Lipofectamine 2000。培养 24 h 后每孔细胞分成 3 孔,分别加入 G418 (500 μ g/mL);以后每 3 d 更换细胞培养基和 G418;待对照孔细胞被全部杀灭后停止 G418 筛选,用含体积分数 20%胎牛血清培养基培养具有 G418 抗性的细胞;待其增殖到较多数量后转到培养瓶培养;定期用 G418 清除失去抗性的细胞。另外同时转染无功能表达的 shRNA 质粒并筛选出 Jurkat 细胞作为阴性对照 shRNA (pCMV 组)。用酚氯仿提取细胞基因组 DNA。以细胞基因组 DNA 作为模板,用载体的测序引物进行扩增以验证载体是否成功转染细胞。目的产物在琼脂糖凝胶上电泳条带为 243 bp。

1.5 RT-PCR 和多重 PCR 检测 BIRC7 RNA 表达

用 Trizol 提取 RNA,cDNA 合成采用 MBI 逆转录试剂盒。多重 PCR 取 cDNA 作为模板同时扩增 BIRC7 DNA 和 GAPDH,其中扩增 BIRC7 引物为 P1:5'-CAG AGC TGG AAG CGC GGG GA,P2:5'-GGC ACT TTC AGA CTG GAC CT;内参 GAPDH 引物序列 P1:5'-AGG TCA TCC ATG ACA ACT TTG GTA,P2:5'-CTG CTT CAC CTT CTT GAT GTT GT。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min,然后 94 $^{\circ}$ C 50 s,59 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增 BIRC7 产物大小为 246 bp,GAPDH 产物大小为 308 bp。凝胶分析系统测定各条带积分光密度值(以灰度表示)。以同一管中 BIRC7 和 GAPDH 产物条带积分光密度值之比反映 BIRC7 mRNA 的表达程度。

1.6 Western blot 检测

细胞总蛋白用 RIPA 细胞裂解液抽提,BCA 法进行定量。蛋白行不连续 SDS-PAGE 凝胶电泳分离,其中分离胶浓度为体积分数 12%。蛋白分离后电转膜至 PVDF 膜上。按常规方法进行封闭、一抗、二抗作用后,加入发光底物 Super ECL Plus Western blotting,在暗房内曝光后将胶片显影固定。Mias 图像分析系统测定各条带灰度值。以同一管 BIRC7 和 β -Actin 条带积分光密度值之比(BIRC7/ β -Actin)反映 BIRC7 蛋白的表达程度。

1.7 生长曲线

在 24 孔板上每孔接种细胞 2×10^5 个,共 21 孔。细胞经 G418 筛选培养,每天取 3 孔细胞用计

数板分别进行计数,取平均值作为当天的细胞增殖数,连续计数 7 d,将结果绘成曲线图。分别比较转染 BIRC7 shRNA 和无功能 shRNA 载体细胞的生长曲线。

1.8 细胞周期

将待检测细胞按每孔 5×10^5 个接种到 6 孔板上,细胞经 G418 筛选培养,培养 3 d 后收集细胞,于 4 $^{\circ}$ C 下用体积分数 70%乙醇固定,采用 PI 法在流式细胞仪上检测细胞周期。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 软件,计量数据均以均数 $\pm$ 标准差表示,多组均数间的显著性检验用方差分析,两组均数间的比较用 *t* 检验。流式细胞仪检测细胞凋亡率为计数资料,两个率的比较采用 χ^2 检验或大样本 *U* 检验。 $P < 0.05$ 为统计学差异显著。

2 结果

2.1 表达 BIRC7 shRNA 载体 pSilencer CMV 的鉴定结果

从携带 pSilencer CMV-4.1 neo 大肠杆菌 DH5 α 中提取载体 DNA,分别做 *Bam*H I 单酶切和 *Bam*H I + *Eco*R I 双酶切。琼脂糖电泳显示单酶切得到单一的大小约 4 900 bp 条带;双酶切得到一条约 4 200 bp 和另一条约 650 bp 的条带(图 2)。

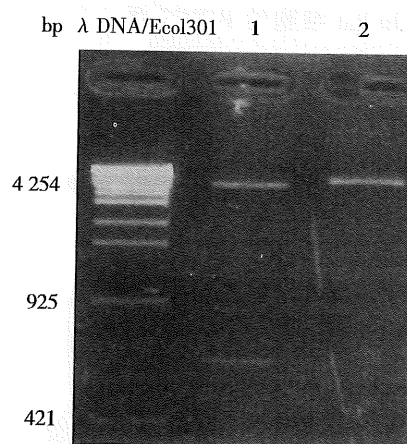


图 2 载体 DNA 双酶切和单酶切图

Fig.2 Digesting the vector by *Bam*H I or with *Eco*R I showed two right products

1: Digested by *Bam*H I and *Eco*R I; 2: Digested only by *Bam*H I.

2.2 成功构建重组 shRNA 表达载体

提取经过鉴定的 shRNA 表达载体 DNA,经

*Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后, 与合成的 DNA 模板链连接, 成功转化大肠杆菌 DH5 α 得到阳性菌落; 取菌液 PCR 扩增, 产物大小符合 243 bp。增菌培养后提取载体 DNA 进行测序, 结果证实表达 shRNA 的 DNA 模板链已成功插入载体的正确位置。针对 BIRC7 基因的重组 shRNA 载体命名为 BIRC7 shRNA, 无功能 shRNA 载体命名为 pCMV。

2.3 成功转染和筛选携带重组 shRNA 表达载体的细胞系

Jurkat 细胞分别转染二种重组 shRNA 表达载体。第 12~17 天后, 分别出现 G418 抗性细胞; 扩大培养后抽提细胞基因组 DNA, 用载体的测序引物 PCR 均扩增出 243 bp 的目的条带; 在转染细胞和未转染细胞中分别加入 1 000 μ g/mL 的 G418 第 3~6 天后, 未转染进去的细胞几乎全部死亡, 转染进去的细胞无明显死亡。转染细胞用含 300 μ g/mL G418 培养基继续培养 2 个月, 细胞保持稳定增殖。实验证明成功筛选出携带两种重组 shRNA 表达载体的 Jurkat 细胞株。

2.4 稳定转染 BIRC7 shRNA 的细胞 BIRC7 基因 mRNA 和蛋白表达下调

提取稳定转染 Jurkat 细胞 RNA 检测 BIRC7 基因的表达情况。RT-PCR 检测结果提示稳定转染 BIRC7 shRNA 细胞 mRNA 的表达水平低于对照 pCMV 细胞, 下降约 > 70%(图 3)。Western blot 结果显示, 相对于转染 pCMV 的细胞, 转染 BIRC7 shRNA 的 Jurkat 细胞的 BIRC7 蛋白质表达减少 > 60%(图 4)。

2.5 稳定转染 BIRC7 shRNA 后细胞生物学特征改变

与未转染细胞和转染 pCMV 的细胞相比, 转

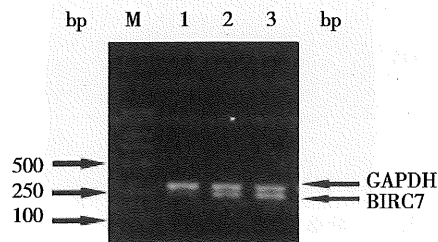


图 3 三种 Jurkat 细胞株 BIRC7 mRNA 的表达
Fig.3 BIRC7 mRNA expression in the three groups of Jurkat cell lines

M: Marker; GAPDH: Positive control; 1: Transfected cell lines by BIRC7 shRNA; 2: Transfected cell lines by pCMV; 3: Untransfected cell lines.

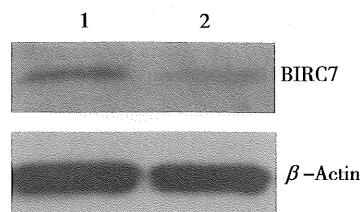


图 4 BIRC7 蛋白在二种转染 Jurkat 细胞株中的表达
Fig.4 BIRC7 protein expression in the two groups of transfected Jurkat cell lines

β -Actin: Positive control; 1: Transfected cell lines by pCMV; 2: Transfected cell lines by BIRC7 shRNA.

染 BIRC7 shRNA 表达载体的 Jurkat 细胞的生长曲线显示增长速度减慢, 细胞倍增时间延长 (图 5)。流式细胞仪检测结果提示, 未转染的 Jurkat 对照组细胞凋亡率为 1.3%。转染 pCMV 载体细胞的凋亡率与未转染组细胞相比变化不大, 为 1.7%, 但转染 BIRC7 shRNA 载体的细胞凋亡率出现增加, 为 6.5% ($P > 0.05$)。在细胞周期方面的改变主要为转染 BIRC7 shRNA 载体后细胞出现 G₁-S 期阻滞, G₂ 期细胞百分比下降。

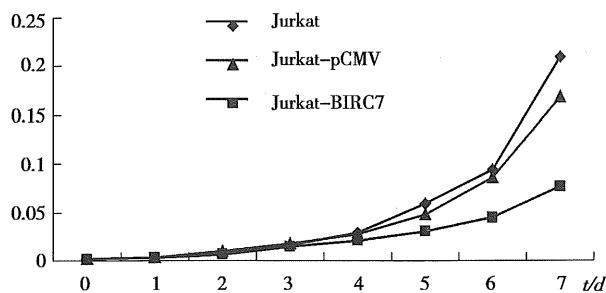


图 5 三株 Jurkat 细胞生长曲线图

Fig.5 The growth curve for three groups of Jurkat cell lines

3 讨 论

本研究用 RNA 干扰技术成功构建了携带重组 BIRC7 shRNA 和 pCMV 表达载体的两种 Jurkat 细胞系, 在基因和蛋白水平上均检测到目的基因 BIRC7 表达下调, 而且沉默效果好, 特异性高, 为进一步研究 BIRC7 基因在 T 淋巴母细胞性白血病/淋巴瘤细胞中的功能及可能的分子机制提供了很好的实验细胞模型。

RNA 干扰现象本身是生物进化过程中细胞的一种保护性机制, 机体可因此避免外源性基因(如

病毒、转座子)在宿主细胞内表达,清除一些生命发育过程中出现的异常 mRNA。我们在实验中针对 BIRC7 基因 19 个 nt 设计的 shRNA 和 pCMV 序列,前者能导致 BIRC7 基因表达下调,后者则不导致 BIRC7 基因失活。这一结果验证了 RNA 干扰具有的高度特异性。

设计有效的双链小 RNA 片段是实现 RNA 干扰的关键。选取 RNAi 目标序列时需遵循文献^[6]的原则。目前设计靶向 siRNA 序列已可使用软件或在网站上进行筛选(如 http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html)或利用已被证实具有 RNA 干扰效果的 siRNA 片段,这些 siRNA 片段也可在相关网站上查到。

使用合适的表达载体是获得稳定 RNA 干扰效果的另一个重要方面。本实验使用 pSilencer CMV-4.1 neo 表达载体具有一些突出的特点:带有新霉素标记有利于使用 G418 筛选;采用经过修改的 CMV 启动子,启动细胞内 RNA pol II 合成 shRNA,类似于细胞合成 mRNA 的生物过程;在质粒载体框内用一个修改的 SV40 多聚腺苷信号作为合成终止信号;shRNA 合成后,被 exportin-5 主动运输到细胞浆,然后被 RNase III 酶 Dicer 识别和裂解,产生 RNAi^[7]。使用这类载体,需要订购二段编码短发夹 RNA 序列的 DNA 单链,退火,克隆到载体的启动子下游。

由于涉及到克隆,载体成功转染至细胞还存在一定的效率,在某种程度上有机遇的成分包含在内。例如我们在载体转化至感受态细胞时实验仅用一次就获成功,测序后证明克隆序列完全正确。而在筛选 2 个具有 G418 抗性细胞的克隆时,实验反复多次花费了较多的时间。细胞一旦转染成功,siRNA 表达载体就可以在细胞内不断地稳定产生所需的 siRNA 分子,能较长时间的抑制目的基因表达。在我们的实验中,每周给予 G418 重复筛选细胞 1~2 次,3 月后检测 BIRC7 表达水平仍能保持相似的基因表达下调效果,从而为未来的实验提供了基础。

抑制基因的表达对基因的功能研究具有重要意义^[8]。随着 BIRC7 基因表达下调,我们观察到 Jurkat 细胞生长曲线反映出细胞生长速度受到抑

制,表明 BIRC7 表达降低后,细胞凋亡增加,单位时间内细胞数量增长减慢,倍增时间因而延长。流式细胞仪结果显示细胞在细胞周期上也出现一些变化。相对于转染 pCMV 的 Jurkat 细胞,转染 BIRC7 shRNA 的 Jurkat 细胞凋亡率增加。尽管凋亡率增加无显著性差异,其原因确实可能存在转染效率的问题,也可能存在其它基因参与凋亡的调控。我们的结果与文献报道一致。实验结果进一步表明 BIRC7 在 T-淋巴母细胞性白血病/淋巴瘤的发生、发展中起着重要作用,抑制 BIRC7 基因的表达对 T-淋巴母细胞性白血病/淋巴瘤细胞的生长速度、细胞凋亡均能产生明显的影响。BIRC7 基因可作为 T-淋巴母细胞性白血病/淋巴瘤治疗中的一个潜在靶点。

参考文献:

- [1] Vucic D, Stennicke HR, Pisabarro MT, et al. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas[J]. *Curr Biol*, 2000, 10 (21): 1359-1366.
- [2] Wu H, Ma Y, Zhu Y, et al. Expression of BIRC7 protein and mRNA in non-Hodgkin's lymphoma [J]. *Leuk Lymphoma*, 2006, 47(6): 1110-1116.
- [3] 薛祥云,龙永平,刘宁. RNA 干扰与肿瘤的基因治疗 [J]. *中华神经医学杂志*, 2005, 4(3): 317-319.
- [4] Crnkovic-Mertens I, Hoppe-Seyler F, Butz K. Induction of apoptosis in tumor cells by siRNA-mediated silencing of the livin/ML-IAP/KIAP gene[J]. *Oncogene*, 2003, 22(51): 8330-8336.
- [5] 朱有凯,林汉良,马怡晖,等. 在不同应激状态下 MDM2 基因对 Jurkat 细胞的作用 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2005, 26(5): 545-548.
- [6] Reynolds A, Leake D, Boese Q, et al. Rational siRNA design for RNA interference[J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(3): 326-330.
- [7] Yi R, Qin Y, Macara IG, et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs[J]. *Genes Dev*, 2003, 17(24): 3011-3016.
- [8] 赖东明,刘璐,李文滨,等. Fas-siRNA 对小鼠肝缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2004, 25(4): 322-325.

(编辑 王晓鹰)