

Livin siRNA 表达质粒的构建及其对宫颈癌 HeLa 细胞的作用

黄雪坤¹, 梁景耀², 李光仪¹

(1. 佛山市第一人民医院妇产科, 广东 佛山 528000,
2. 中山大学中山医学院药理教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】构建和鉴定针对人抑凋亡基因 livin 的 siRNA 质粒载体, 并研究其对宫颈癌 HeLa 细胞的作用。【方法】设计和合成针对人 livin 基因的 siRNA 寡核苷酸, 定向克隆入质粒载体 pmU6, 脂质体瞬时转染入 HeLa 细胞中, 用 RT-PCR 技术检测 livin 基因的 mRNA 表达水平, Western Blot 技术检测 Livin 蛋白表达水平。用 MTT 法分析 HeLa 细胞增殖改变, 流式细胞仪检测 HeLa 细胞周期变化。【结果】livin siRNA 表达质粒能高效而特异地剔除 HeLa 细胞中 livin 的表达, 抑制肿瘤细胞增殖 ($P < 0.05$), 将 HeLa 细胞阻止在 G1 期。【结论】livin 基因的 siRNA 对 HeLa 细胞增殖和细胞周期调控有重要影响, 细胞凋亡可能是导致其细胞死亡的主要原因。

关键词: livin; siRNA; 宫颈癌; 细胞凋亡

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2008)04-0435-04

Construction of Livin siRNA Expression Plasmid and Its Effects on Cervical Cancer HeLa Cell

HUANG Xue-kun¹, LIANG Jing-yao², LI Guang-yi¹

(1. The First People's Hospital of Foshan, Foshan 528000, China; 2. Department of Pharmacology, Zhongshan School of Medicine, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To construct and identify an expression plasmid of siRNA targeting human inhibitor of apoptosis gene livin and to investigate its effects on cervical cancer HeLa cell. 【Methods】The sequences targeting livin gene were designed and synthesized, then cloned into the eukaryotic expression vector pmU6 in definite direction. The livin siRNA plasmid was transiently transfected into HeLa cells via Lipofectamine™ 2000. mRNA expression of livin gene was detected by RT-PCR, livin protein by Western Blot. The effects of the plasmid on HeLa cell proliferation were analyzed by MTT assay, on the cell cycle by flow cytometry. 【Results】The livin siRNA plasmid knocked down livin expression in HeLa cells specifically and obviously, inhibited tumor cell proliferation ($P < 0.05$) and arrested the HeLa cells at G1 phase. 【Conclusion】The livin siRNA in HeLa cell plays a crucial role in cell proliferation and cell cycle progression. Apoptosis might be the main way of the cell death.

Key word: livin; siRNA; cervical cancer; apoptosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(4):435-438, 443]

恶性肿瘤细胞往往因为抑凋亡基因高表达而出现永生^[1]。为此, 如何敲除这些抑凋亡基因就成为基因治疗肿瘤研究的重要目标。Livin 是近年来发现的人类凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis proteins, IAP) 家族的新成员, 在大多数正常成人

组织不表达, 而在多种肿瘤组织中常出现过表达, 能抑制凋亡刺激剂诱发的细胞凋亡, 其抗细胞凋亡的作用甚至强于 Survivin 和 Bcl-2^[2,3]。RNA 干扰是近年来兴起的一项基因调控新技术, 它属于转录后基因沉默机制, 能特异而高效地沉默靶基因^[4]。

收稿日期: 2008-03-06

基金项目: 佛山市科技攻关项目 (200508017)

作者简介: 黄雪坤 (1973-), 女, 广东新会人, 硕士, 副主任医师; 梁景耀, 博士生, 通讯作者. Email: yingyao582@sina.com

为此,我们应用 RNA 干扰技术,构建 livin siRNA 真核表达质粒,初步探讨该质粒对宫颈癌细胞 HeLa 的作用机制。

1 材料和方法

1.1 设计和构建 siRNA 表达质粒

根据 GenBank 中报道的人 livin 基因(基因编号:AF311388)确定了 siRNA 序列,位置在转录启动子下游 652 ~ 671 bp,按照 Elbashir 等^[5]和 Tuschl^[6]的方法设计 shRNA(short-hairpin RNA)。正义链 5'-TTT GAG ACT TTG TCC ACA GTG TTT CAA GAG AAC ACT GTG GAC AAA GTC TCT TTT T-3'和反义链 5'-CGA GAA AAA GAG ACT TTG TCC ACA GTG TTC TCT TGA AAC ACT GTG GAC AAA GTC T-3',由上海生工生物工程服务有限公司合成。等量正义链与反义链模板退火,进而与 *Bbs*I 酶切的 pmU6 质粒(由广东医学院何承伟博士惠赠)连接,获得的重组质粒即为 livin siRNA 表达质粒,表示为 pmU6 livin。

1.2 重组质粒的筛选

因插入片段太短,无法进行内切酶鉴定,故选取 PCR 法鉴定。挑取 8 个单菌落接种于 5 mL 含 200 μ g/mL Amp 的 LB 培养基中,37℃剧烈振荡培养过夜。各取 1 mL 菌液于 1.5 mL EP 管中,次日按 QIAGEN 公司的试剂盒小量制备质粒 DNA。进行 PCR 扩增,上游引物序列为 5'-AGA GGT CAG GCA GCA TCG G-3',下游引物序列为 5'-CAA GAA ATC ATC CAC CAA ACG-3',阳性重组克隆 pmU6 livin 扩增片段长为 736 bp,空质粒 pmU6 扩增片段长为 994 bp。PCR 扩增参数为 94℃ 3min, 94℃ 30 s, 46℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 30 个循环,72℃ 10 min。PCR 扩增片段经 2% 普通琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3 细胞培养和 siRNA 质粒转染

宫颈癌细胞 HeLa 为本室自存。人宫颈癌 HeLa 细胞均生长于含 100 mL/L 胎牛血清、20 g/L 谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的 RPMI 1640 完全培养液中,置 37℃、体积分数为 5%的 CO₂ 饱和湿度孵箱内孵育。细胞转染操作按 Lipofectmine™ 2000 转染试剂盒(Invitrogen 公司)说明书进行,在 50 mm 培养皿上转染 10 μ g 质粒。对照组转染空载体 pmU6,实验组转染 pmU6 livin。

pmU6 livin 或 pmU6 质粒与表达绿色荧光蛋白的 pEGFP-N1 质粒以 3:1 的比例共转染 HeLa 细胞,荧光显微镜下计数,确定其转染效率均超过 85%。

1.4 RT-PCR 分析

转染 12、24、48 和 96 h 后收集细胞,按 TRIzol 试剂盒(Invitrogen 公司)说明书提取细胞的总 RNA。RNA 样品经逆转录反应合成 livin cDNA,然后进行 PCR 扩增。RT-PCR 扩增 livin 基因引物序列:上游引物 5'-GTC ATC GCC AGC ATC ATC AA-3',下游引物 5'-CAA GAA ATC ATC CAC CAA ACG-3',扩增片段长 432 bp;内参 GAPDH 引物序列:上游引物 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3',下游引物 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3',扩增片段长 226 bp。扩增条件:25 μ L 反应体系中 livin 引物终浓度为 0.6 μ mol/L, GAPDH 引物终浓度为 0.06 μ mol/L, dNTP 各 50 μ mol/L, MgCl₂ 1.5 mmol/L, Taq 酶 1 U。94℃变性 45 s, 55℃退火 45 s, 72℃延伸 1 min, 30 个循环,最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳(含 0.05 g/L 溴化乙啶),拍照鉴定。

1.5 Western Blot 分析

转染后 12、24、48 和 96 h 收细胞并裂解细胞,取 50 μ g 处理后的蛋白样品进行 SDS-PAGE,电转移至 NC 膜,50 g/L 脱脂奶粉封闭 1 h,与 1:1 000 稀释后的鼠抗人 Livin 单克隆一抗(Alexsis 公司),或兔抗人 β -Actin 单克隆一抗(Santa Cruz 公司)孵育过夜,TBST 洗膜,然后与 1:2 000 稀释(用封闭液)后的抗小鼠或抗兔-辣根过氧化物酶标志的 IgG 二抗(北京中山生物公司)孵育 1 h, TBST 洗膜后,加入 ECL 试剂,曝光,显影,定影,对 X 光底片拍照,永久保存。

1.6 细胞增殖检测

采用 MTT(Amresco 公司)法,转染前按 0.5×10^4 细胞/孔种植在 96 孔板,转染 0、12、24、48 和 96 h 后,每孔加入 10 μ L 的 5 g/L MTT,继续温育 4 h,然后加入 100 μ L DMSO,震荡 15 min,酶标仪读取光密度值 A_{570} 按下列公式计算细胞增殖抑制率,抑制率 $=(1-A_A/A_B) \times 100$,其中, B 为对照组平均 A 值, A 为实验组平均 A 值。

1.7 流式细胞术分析细胞周期

收集细胞,4℃条件下用 70% 冰冷乙醇固定过夜,离心,细胞重悬于 PBS 中 30 min,再加 RNase A 室温下处理 30 min,然后加碘化丙啶(PI;上海

华舜公司)至 20 mg/L,避光染色 30 min 以上,上样于 EPTCSXL-31240 流式细胞仪进行细胞周期的分析。

2 结 果

2.1 重组质粒 PCR 筛选结果

重组质粒的琼脂糖凝胶电泳筛选结果显示(图 1),第 1 泳道为空质粒 pmU6(对照组),第 2~5,7~9 泳道为插入针对人 livin 基因的 siRNA 寡核苷酸片段的阳性重组质粒 pmU6 livin,第 6 泳道为没有成功插入针对 livin 基因的 siRNA 片段的空质粒 pmU6。

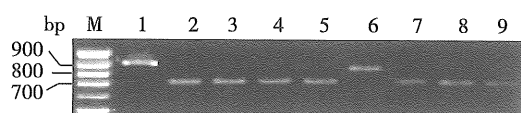


图 1 重组质粒 pmU6 livin 的筛选

Fig. 1 The screening of recombinant pmU6-livin plasmid

1: Clones transfected by pmU6 (control); 2~5, 7~9: Positive clones of pmU6 livin; 6: Negative clones of pmU6 livin

2.2 RNA 干扰抑制 livin 基因的 mRNA 表达

RT-PCR 的琼脂糖凝胶电泳检测结果显示, pmU6 livin 干扰质粒转染 HeLa 细胞 48 h 后, livin 基因的 mRNA 表达已受到明显抑制(图 2, 泳道 4)。而转染对照质粒 pmU6, livin 基因的 mRNA 表达明显高于转染干扰质粒(图 2, 泳道 1)。

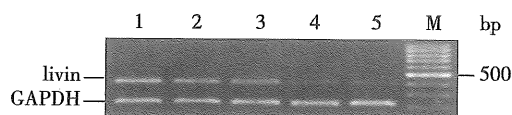


图 2 pmU6 livin 质粒对 HeLa 细胞 livin mRNA 表达水平的影响

Fig. 2 Effect of pmU6 livin plasmid on livin mRNA level in HeLa cells

1: Transfected with pmU6 (control); 2: 12 h after transfected with pmU6 livin; 3: 24 h after transfected with pmU6 livin; 4: 48 h after transfected with pmU6 livin; 5: 96 h after transfected with pmU6 livin; M: DNA Marker

2.3 RNA 干扰抑制 livin 基因的蛋白表达

Western Blot 结果显示, pmU6 livin 干扰质粒转染 HeLa 细胞 48 h 后, 内源性 Livin 蛋白的表达明显降低, 而转染对照质粒 pmU6 中 Livin 蛋白的

表达量明显高于转染干扰质粒组(图 3)。

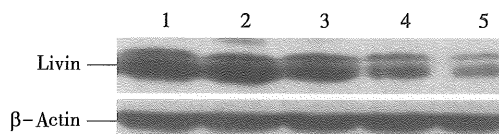


图 3 pmU6 livin 质粒对 HeLa 细胞 Livin 蛋白表达水平的影响

Fig. 3 Effect of pmU6 livin plasmid on Livin protein level in HeLa cells

1: Transfected with pmU6 (control); 2: 12 h after transfected with pmU6 livin; 3: 24 h after transfected with pmU6 livin; 4: 48 h after transfected with pmU6 livin; 5: 96 h after transfected with pmU6 livin

2.4 细胞增殖检测

MTT 分析结果显示, 用 pmU6 livin 质粒转染 HeLa 细胞 0、12、24、48、96 h 后, 相对对照组, 其细胞增殖抑制率分别为 1.3%、9.5% ($P < 0.05$)、13.7% ($P < 0.05$)、18.7% ($P < 0.05$)、21.4% ($P < 0.05$), 而转染质粒 pmU6 的 HeLa 细胞增殖未见改变(图 4)。

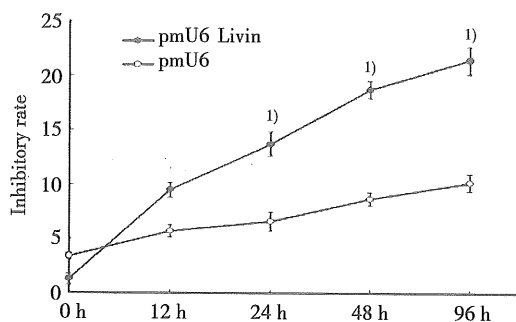


图 4 pmU6 livin 质粒对 HeLa 细胞增殖的影响

Fig. 4 Effect of pmU6 livin plasmid on cell proliferation of HeLa cells

1) $P < 0.05$ VS pmU6, $n=5, \bar{x} \pm s$

2.5 细胞周期检测

流式细胞仪分析结果显示, pmU6 livin 质粒转染入 HeLa 细胞 24 h 后, 与对照组比较, 其 G1 期细胞比例显著降低, 并出现凋亡峰, 转染 48 h 后, 实验组与对照组的凋亡峰比例进一步上升(图 5)。

3 讨 论

恶性肿瘤细胞凋亡失衡与肿瘤发生、发展和消退有着密切关系^[1]。抑制 IAPs 家族成员蛋白表

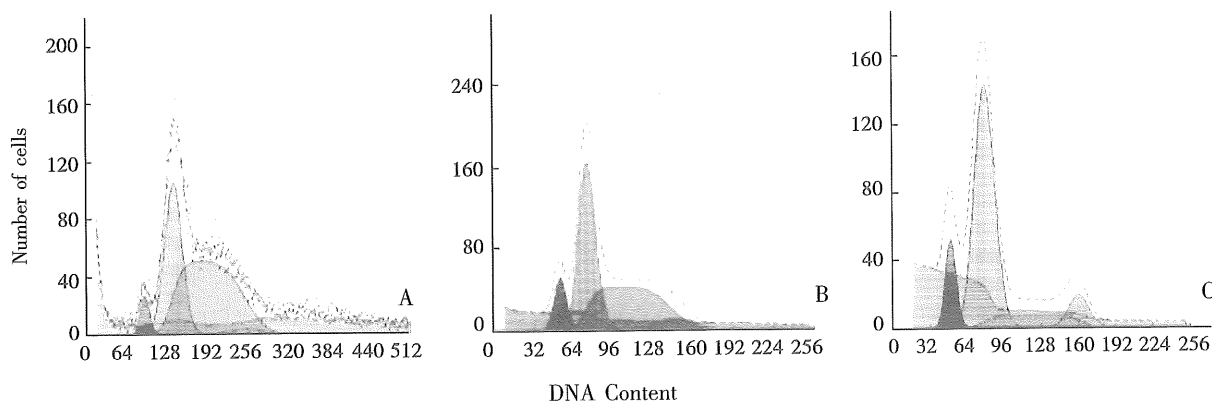


图 5 流式细胞仪检测 pmU6-livin 质粒作用前后 HeLa 细胞周期变化

Fig.5 Cell cycle of HeLa cells before and after RNAi analyzed by flow cytometry

A: Transfected with pmU6(control); B: 24 h after transfected with pmU6 livin; C: 48 h after transfected with pmU6 livin

达, 诱导肿瘤细胞发生凋亡, 是目前肿瘤靶向治疗的一个新的研究方向。Livin 是人类凋亡抑制蛋白家族的新成员, 具有杆状病毒 IAP 重复序列 (baculoviral IAP repeats, BIR), BIR 结构域是其发挥抗凋亡作用的必需结构^[3]。Livin 在大多数正常成人组织中不表达, 特异性高表达于人的胚胎组织以及大多数人类实体瘤细胞中, 如黑色素瘤、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、膀胱癌、胃癌、前列腺癌、白血病、非小细胞肺癌 (NSCLC) 以及淋巴瘤等^[7-10]。Livin 通过抑制信号转导过程中的效应分子 caspase-3/-7/-9 的活性, 抑制多种凋亡刺激剂诱发的细胞凋亡^[9,11]。因此, 通过干预阻断 Livin 表达, 可能诱导肿瘤细胞的凋亡。

基因敲除能取得很好的效果, 但其方法太复杂, 在临床应用上可行性不大。利用 RNA 干扰技术沉默特定基因, 可实现快速、高效、个体化的基因治疗, 且在需要的时候可以解除这种抑制, 恢复基因的表达, 就像使用药物一样, 在疾病基因治疗上有广阔的应用前景^[12]。siRNA 的制备方法之一为 siRNA 表达载体法^[13]: 通过转染含有 RNase 启动子 U6 或 H1 及其下游一小段特殊结构的质粒到宿主细胞体内, 转录出 shRNA (small hairpin RNAs), shRNA 在胞内被 RNA III 核酸内切酶剪切成 siRNA, 从而识别并降解同源基因的 mRNA, 最终达到抑制作用。在本实验中, 我们针对 livin 基因的编码区设计了 shRNA 序列, 并构建了可在真核细胞内表达 RNAi 序列的质粒, 转染入细胞后在 mRNA 水平和蛋白水平成功特异性地沉默 livin 基因表达,

从而引起宫颈癌细胞系 HeLa 发生细胞增殖抑制, 这为以 livin 基因为靶点的肿瘤基因治疗提供实验依据和新思路。

参考文献:

- [1] 张敏燕, 张正民, 韩仲明. 凋亡调控基因 Bcl-2/Bax 与肿瘤 [J]. 国外医学: 耳鼻喉科学分册, 2004, 28(1): 40-43.
- [2] Gazzaniga P, Gradilone A, Giuliani L, et al. Expression and prognostic significance of livin, survivin and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer [J]. Ann Oncol, 2003, 14(1): 85-90.
- [3] Liu B, Han M, Wen JK, et al. Livin/ML-IAP as a new target for cancer treatment [J]. Cancer Lett, 2007, 250(2): 168-176.
- [4] 夏忠胜, 朱兆华, 张立勇, 等. MDR1 siRNA 对结肠癌细胞多药耐药性的影响 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2007, 28(3): 268-273.
- [5] Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, et al. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate [J]. EMBO J, 2001, 20(23): 6877-6888.
- [6] Tuschl T. Expanding small RNA interference [J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(5): 446-448.
- [7] Chang H, Schimmer AD. Livin/melanoma inhibitor of apoptosis protein as a potential therapeutic target for the treatment of malignancy [J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(1): 24-30.
- [8] Zhu Z, Wang Y, Ding X, et al. Expression and prognostic significance of livin in the progression of bladder cancer [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2008, 28(1): 90-92.
- [9] Grzybowska-Izydorczyk O, Smolewski P. The role of (下转 443 页 to page 443)