文章编号:1000-5404(2006)02-0097-04

论著

APE1 siRNA 表达载体的构建及其对骨肉瘤细胞 APE1 表达的抑制作用

王 东[1,2],仲召阳[1,2],李增鹏[2],张沁宏[2],卿 毅[1],杨宇馨[1] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]肿瘤中心,[2]病理科,重庆 400042)

提 要:目的 构建DNA损伤修复基因脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶APE1 siRNA表达载体pSilence APE1,观察其对骨肉瘤细胞HOS和9901APE1蛋白表达的抑制作用。**方法** 设计合成APE1 siRNA cDNA序列与线性化pSilence 2.0-U6质粒连接后构建APE1 siRNA表达载体pSilence APE1,经酶切鉴定和测序确认。应用免疫组化检测骨肉瘤细胞APE1蛋白的表达,同时应用免疫印迹检测其对APE1基因的敲低作用的量效和时效关系。**结果** 通过双酶切鉴定和测序分析,成功构建了APE1 siRNA表达载体。免疫组化和免疫印迹证实pSilence APE1对骨肉瘤细胞APE1基因具有特异性"敲低"作用,其抑制APE1基因表达效率为72%~95%,而且其抑制作用以3.0 μg pSilence APE1转染第3天最为显著。**结论** 成功构建了APE1 siRNA表达载体pSilence APE1,并且该载体能有效地敲低骨肉瘤细胞APE1基因表达。

关键词: 骨肿瘤; RNA干扰;脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶
中图法分类号: R394-33;R73-36;R738.1 **文献标识码:** A

Construction of APE1 siRNA expression vector and its inhibition to APE1 in osteosarcoma cells

WANG Dong[1,2], ZHONG Zhao-yang[1,2], LI Zeng-peng[2], ZHANG Qin-hong[2], QING Yi[2], YANG Yu-xin[2] ([1]Cancer Center, [2]Department of Pathology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To construct DNA damage and repair gene apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1) siRNA expression vector pSilence APE1 and investigate its inhibitory effect on the expression of APE1 in osteosarcoma cell HOS and 9901 *in vitro*. **Methods** An expression plasmid of a short hairpin RNA target APE1, pSilence APE1 was constructed and transfected to 9901 and HOS cell by lipofectamine. The expression of APE1 protein in HOS and 9901 osteosarcoma cells posttransfected with pSilence APE1 was detected by immunohistochemistry. Meanwhile, the dose-effect and time-effect relationship of APE1 gene silence induced by pSilence APE1 were measured using Western blot analysis. **Results** After evaluation and sequencing, the APE1 siRNA expression vector pSilence APE1 was constructed successfully. The result of Western blotting and immunohistochemistry showed that APE1 protein in osteosarcoma cells could be knocked down specifically by pSilence APE1, and the inhibition rate of APE1 expression was 72% -95%. The best inhibition of expression of APE1 gene was 3.0 μg and at the 72 h using pSilence APE1. **Conclusion** APE1 siRNA expression vector pSilence APE1 is successfully constructed that can significantly knock down APE1 gene expression in osteosarcoma cells.

Key words: osteosarcoma; RNA interference; apurinic/apyrimidinic endonuclease

DNA损伤和修复机制的紊乱被认为是癌症演进的发病机制[1]。我们研究发现,DNA损伤修复基因脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶(apurinic/apyrimidinic endonuclease, APE1)在骨肉瘤中呈高表达,与骨肉瘤恶性生物学行为以及肿瘤的分化不良相关[2]。本研究以APE1为靶点,体外构建APE1 siRNA表达载体pSilence APE1,并转染人骨肉瘤细胞HOS和9901,观察其对骨肉瘤细胞APE1基因的敲低作用以及量效和时效关系,为今后以DNA损伤修复途径为靶点的肿瘤基因治疗提供实验依据。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30340044,30472004),第三军医大学校管课题(XG200357)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30340044, 30472004) and the Scientific Research Foundation of the Third Military Medical University (XG200357)

作者简介: 王 东(1964-),男,天津市人,博士,主任医师,教授,主要从事肿瘤化疗、放疗的分子机制及基因治疗方面的研究,发表论文50余篇。电话:(023)68757706,E-mail: dongwang64@hotmail.com

收稿日期: 2005-07-21;**修回日期:** 2005-11-04

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM培养基、胎牛血清和RPMI1640(Gibico公司),Lipo-

fectamine 2000（Invitrogen 公司）；*Hind* Ⅲ、*Bam*H Ⅰ、*Eco*R Ⅰ（Roche 公司）；凝胶 DNA 回收试剂盒（Promega 公司）；T_4 DNA 连接酶（大连 TaKaRa 公司），分子量标记物（华美公司）；pSilence 2.0-U6 质粒（Ambion 公司）；pCDNA3.1EGFP 由第三军医大学新桥医院孙建国博士惠赠；鼠抗 Beta-actin 抗体、APE1 兔抗人单克隆抗体（novus biologicals，Litlleton CO）。

1.2 细胞培养

人骨肉瘤细胞株 9901 由第四军医大学西京医院骨科研究所范清宇教授馈赠，含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液培养；HOS 购自北京协和细胞库，10% 胎牛血清 MEM 培养基培养，37 ℃，5% CO_2 常规培养传代。

1.3 APE1 特异的 siRNA 表达载体构建和鉴定

参照 Wang 等[3]设计的 APE1 siRNA cDNA 序列，应用 Ambion 公司设计软件确定 pSilence2.0-U6 表达载体的插入序列（www.ambion.com）。同时试剂盒提供了与人类基因无同源性的无关序列作为阴性对照（表 1）。合成的双链 DNA，退火缓冲液中 90 ℃孵育 3 min，然后冷却到 37 ℃ 1 h，得到退火双链 DNA；与线性化 pSilence2.0-U6 载体用 T_4 DNA 连接酶连接，构建 APE1siRNA 的表达质粒 pSilence APE1，转入大肠杆菌 DH5α，氨苄平板筛选，挑选阳性克隆，提取质粒并行 *Eco*R Ⅰ/*Hind* Ⅲ双酶切鉴定和 DNA 测序。

表 1 siRNA 表达载体的模板序列

靶基因	选取序列	模板序列
APE1	5′-GTCTGGTACGACTCG-AGTACC-3′	5′-GATCCGCTGGTACGACTGGAGTA-CCTTCAAGAGAGGTACTCCAGTCGT-ACCAGACTTTTTTGGAAA-3′
无关序列	5′-ACTACCGTTGTTATA-GGTG-3′	5′-GATCCACTACCGTTGTTATAGGTG-TTCAAGAGAACCCTATAACAACGGT-AGTTTTTTGGAAA-3′

1.4 pSilence APE1 质粒转染

按试剂盒说明 Lipofectamine2000 脂质体的用量为 1∶2，为了确定在此条件下质粒的转染效率，首先用 2、3、4 μg 报告基因 pcDNA3.1EGFP 转染骨肉瘤细胞，荧光显微镜观察绿色荧光表达细胞，初步判断转染效率。

将处于对数生长期的 9901 和 HOS 细胞浓度调整为 2×10^5/ml，选 5 ml 接种于 6 孔培养板中培养过夜。10 mmol/L HEPES 缓冲液将 3 μg 质粒 DNA 稀释至 100 μl，以 1∶2 比例加入 Lipofectamine 2000（总体积为 200 μl），室温放置 15 min。将待转染细胞 PBS 洗涤后，加入质粒 DNA/脂质体复合物 200 μl，37 ℃，5% CO_2，饱和湿度培养 4～8 h，换新鲜培养液继续培养。实验同时设 pSilence 对照转染为阴性对照组。

1.5 Western blot 分析骨肉瘤细胞 APE1 基因的表达

将 HOS 及 9901 骨肉瘤细胞，分 pSilence APE1 组、pSilence 对照组和单独脂质体组 3 组。用 3 μg RNAi 质粒处理2 d。收集细胞，PBS 洗涤 2 次，按 1×10^7 细胞加入 100 μl 细胞裂解液裂解细胞，低温 12 000 r/min 离心 10 min，取上清液加入 2× SDS 凝胶加样缓冲液沸水煮沸 5 min，取上清测定蛋白浓度。取相同量蛋白上样，用 12% 聚丙烯酰胺凝胶分离。转 PVDF 膜，先后加入兔抗人 APE1 抗体（1∶2 000）和鼠抗 Beta-actin 抗体（1∶1 000）；加入二抗：3% BSA 40 ml + 抗兔 HRP-IgG 8 μl（工作浓度为 1∶5 000），同时加入 3% BSA 40 ml + 抗鼠 HRP-IgG 16 μl，室温反应 1 h；洗膜；混合等体积 Bottle 1 和 2 与 PVDF 膜共孵育 1 min。将 PVDF 膜与 X 线片一同放入暗盒中曝光 3～10 min。显影后清水漂洗，再定影。Image-pro plus 4.5 图像分析系统测定各条带灰度值。

1.6 pSilence APE1 质粒敲低骨肉瘤细胞 APE1 基因的时效及量效关系

分组同前。给予 3 μg pSilence APE1 处理 1、2、3、4 d 并通过 Western blot 检测骨肉瘤细胞 APE1 蛋白的表达。给予 2、3、4 μg pSilence APE1 处理 2 d 并通过 Western blot 检测骨肉瘤细胞 APE1 蛋白的量。Image-pro plus 4.5 图像分析系统测定各条带灰度值。

1.7 免疫组化检测

对上法处理过的细胞 48 h 后，S-P 法免疫组化染色，以细胞核出现棕黄、棕褐色细颗粒状为阳性细胞。

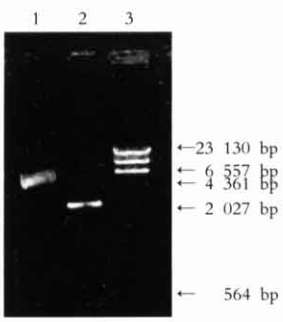
1.8 统计学处理

数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，。采用 SPSS 10.0 统计进行方差分析和均数间多重比较。

2 结果

2.1 APE1siRNA 表达载体的酶切鉴定

pSilence APE1 重组子经 *Eco*R Ⅰ/*Hind* Ⅲ双酶切后，得到分别为 3.1 kb 的载体片段和 398 bp 的小片段。2% 琼脂糖电泳中能够明显分辨不同大小的两个小片段（图 1），初步表明载体 pSilence APE1 构建成功。



1：pSilence APE1；2：pSilence APE1 经 *Eco*R Ⅰ/*Hind* Ⅲ双酶切；3：λDNA/*Hind* Ⅲ

图 1 pSilence APE1 质粒酶切鉴定

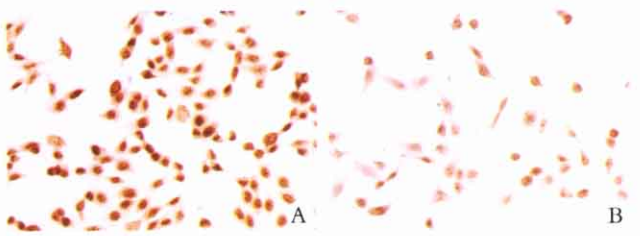
2.2 pSilence APE1 质粒测序报告

对鉴定阳性克隆质粒送北京赛百盛生物工程技术服务有限公司，测序结果如下：CGTTGTAAACGACGGCCAGTGCCA-AGCTTTTCCAAAAAAGTCTGGTACGACTGGAGTACCTCTCTTG-AAGGTACTCCAGTCGTACCAGCGGATCCCGCGTCCTTTCCACA-AGATATATAAACCCAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTACGGT-AAGCATATGA（划线部分为插入序列），经过对比，检测质粒中含有目的序列，进一步确证 pSilence APE1 构建成功。

2.3 质粒转染效率观察和免疫组化染色结果

在荧光显微镜下观察，在蓝色荧光激发下，可见部分细胞

发出强度不等的绿色荧光。经细胞计数荧光阳性的细胞百分率分别为 28%、43% 和 62%。免疫组化染色，pSilence control 对照组和单独脂质体组多数细胞中出现明显的棕黄、棕褐色细颗粒状核着色，而 pSilence APE1 组细胞着色较淡，阳性细胞数目较少（图 2）。

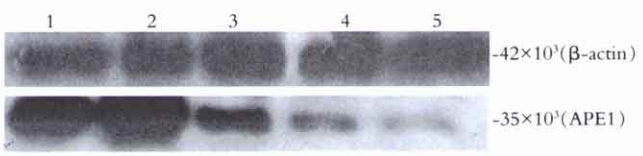


A：HOS 细胞转染对照质粒；B：HOS 细胞转染 pSilence APE1

图 2　APE1 蛋白在骨肉瘤细胞 HOS 中表达　（S-P ×400）

2.4　pSilence APE1 诱导 HOS、9901 细胞 APE1 基因沉默的量效和时效关系

免疫印迹条带光密度值分析显示，pSilence APE1 2、3、4 μg 分别转染 HOS 和 9901 细胞 2 d，APE1 表达降低，HOS 沉默效率分别为 85%、95%、86%，9901 沉默效率分别为 72%、85%、78%。结果表明 pSilence APE1 2 ~ 4 μg 均可明显诱导 APE1 基因沉默，其中以 3 μg 作用明显，而且转染的细胞能维持较好的生长状态。以 pSilence APE1 3 μg 转染 HOS 和 9901 细胞培养 1 ~ 3 d，APE1 沉默效率分别约为 85%、95%、90%，9901 沉默效率分别为 72%、85%、91%。其中以转染 2 ~ 3 d APE1 基因表达敲低作用最为显著（图 3 - 5）。



1：HOS 细胞；2：对照质粒；3：pSilence APE1 2 μg；4：pSilence APE1 3 μg；5：pSilence APE1 4 μg

图 3　免疫印迹显示 pSilence APE1 敲低 HOS 细胞 APE1 基因的量效关系

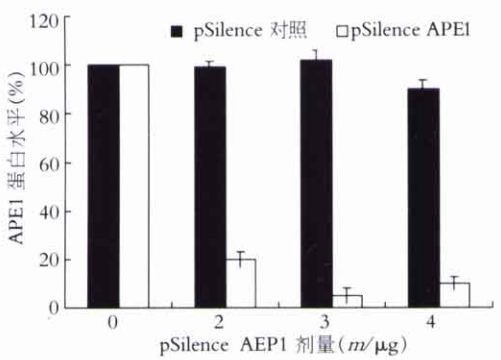


图 4　pSilence APE1 敲低 HOS 细胞 APE1 蛋白表达的量效关系（n =3）

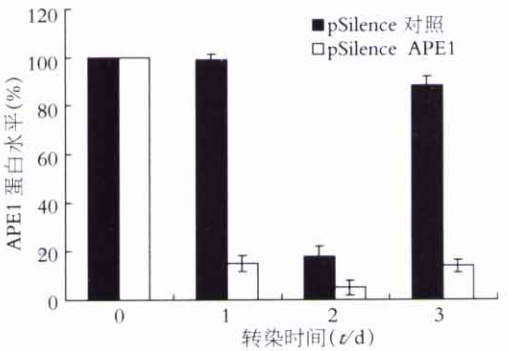


图 5　pSilence APE1 转染不同时相对 HOS 细胞 APE1 蛋白表达的抑制作用　（n =3）

3　讨论

RNAi 是一种序列特异性的转录后基因沉默现象，它通过双链 RNA（dsRNA）引起序顺同源的 mRNA 的降解，而敲低目标基因的表达[4]。具有作用的高稳定性、高效率性、小分子性、高特异性以及高穿透性等特点[4,5]。RNAi 能维持基因组中转座子的稳定、防御病毒感染和参与胚胎发育中相关基因表达的调节，防止自私基因序列过量增殖。因此，RNAi 作为研究基因功能的新工具，可广泛用于研究细胞信号转导通路和细胞生长分化过程；发现新的药物靶位点；研究药物作用的生化特点和开展基因治疗[5,6]。目前，siRNA 的来源主要有化学合成、体外转录和表达载体细胞内转录 3 种。因为 siRNA 片段通过载体导入细胞，可获得高效稳定表达，且无其他方法的细胞毒性，故 RNAi 研究多采用这种方法。

APE1 为 DNA 碱基切除修复途径的限速酶，是细胞 DNA 放射性损伤和烷化剂致伤重要的修复因子，具有两种与碱基切除修复有关（AP 核酸内切酶和 3/-磷酸二酯酶活性）的双功能酶。此外，APE1 还具有氧化还原功能（reduction-oxidation，redox），通过维持细胞内多种转录因子的激活还原态，而参与多种关键的细胞反应，如氧化应激，转录因子调节，细胞周期控制与凋亡[7,8]。多项研究表明[9,10]，APE1 在多种肿瘤细胞中存在高表达，且其表达与肿瘤的恶性程度和预后密切相关，而应用 RNAi 技术阻断 APE1 基因的表达，可显著抑制肿瘤细胞的生长、增殖，诱导细胞凋亡和抑制裸鼠移植瘤的生长[3]。

我们构建 APE1 siRNA 表达载体 pSilence APE1 经酶切鉴定和测序表明构建正确有效，并通过脂质体导入 HOS 和 9901 骨肉瘤细胞，观察其对骨肉瘤细胞 APE1 蛋白的敲低作用以及时效和量效关系。实验结果显示，APE1 siRNA 可敲低骨肉瘤细胞 APE1 基

因表达，APE1 蛋白表达抑制以 3.0 μg 作用 3 d 最为显著。其诱导基因沉默效率达到 72% ~95%。而 pSilence 对照组和单独脂质体组的 APE1 蛋白表达无明显变化，表明 pSilence APE1 对骨肉瘤细胞 APE1 基因沉默具有高效和特异性，其沉默效果在转染后 4 d 开始恢复到正常稳定状态。本研究结果为今后以 APE1 为靶点的骨肉瘤基因治疗提供了实验基础。

参考文献：

[1] PUGLISI F, BARBONE F, TELL G, *et al*. Prognostic role of APE/Ref-1 subcellular expression in stage Ⅰ-Ⅲ breast carcinomas[J]. Oncol Rep, 2002, 9(1): 11-17.

[2] 仲召阳，王 东，李增鹏，等. 骨肉瘤中 APE1 的表达及其与血管生成的关系[J]. 第三军医大学学报，2005，27(10)：1045-1048.

[3] WANG D, LUO M, KELLEY M R. Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition[J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(6): 679-686.

[4] TOMARI Y, ZAMORE P D. Perspective: machines for RNAi[J]. Genes Dev, 2005, 19(5): 517-529.

[5] SHANKAR P, MANJUNATH N, LIEBERMAN J. The prospect of silencing disease using RNA interference[J]. JAMA, 2005, 293(11): 1367-1373.

[6] HANNON G J. RNA interference[J]. Nature, 2002, 418(6894): 244-251.

[7] JULY L V, BERALDI E, SO A, *et al*. Nucleotide-based therapies targeting cluster in chemosensitize human lung adenocarcinoma cells both *in vitro* and *in vivo*[J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(3): 223-322.

[8] KAKOLYRIS S, GIATROMANOLAKI A, KOUKOURAKIS M, *et al*. Nuclear localization of human AP endonuclease 1 (HAP1/Ref-1) associates with prognosis in early operable non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. J Pathol, 1999, 189(3): 351-357.

[9] TANNER B, GRIMME S, SCHIFFER I, *et al*. Nuclear expression of apurinic/apyrimidinic endonuclease increases with progression of ovarian carcinomas[J]. Gynecol Oncol, 2004, 92(2): 568-577.

[10] FUNG H, DEMPLE B. A vital role for APE1/Ref1 protein in repairing spontaneous DNA damage in human cells[J]. Mol Cell, 2005, 17(3): 463-470.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2006)02-0100-01

四胞胎1例

王 琳，常 青，江 露 （第三军医大学西南医院妇产科，重庆 400038）

孕妇，31岁，2005年12月8日因"孕36⁺⁵周，孕2产1，下腹胀痛伴心慌3 d"入院。孕前月经周期规则，未使用促排卵药物。末次月经：2005年3月23日，预产期：2005年12月30日。孕3个多月时在当地医院B超检查：宫内四胎。孕7个多月出现双下肢水肿，12月5日孕妇出现下腹胀痛，入院前1 d出现心慌、气促，夜间不能平卧。2003年3月自行足月顺产1男婴，出生体质量3 250 g，分娩时会阴Ⅲ度裂伤，未缝合。入院时体温37.2 ℃，血压143/87 mmHg。宫高43 cm，腹围112 cm，B超：4个胎儿双顶径分别为：7.3、7.6、7.8、8.1 cm，胎儿露分别为两头及两臀。入院次日临产，12月9日10:15宫口开全，10:19娩第1胎儿，6 min内4个胎儿相继娩出。分娩1男3女，体质量分别为1 410、1 355、1 455、1 135 g。新生儿评分：1个为9分，另3个为10分，均因低体质量儿转入儿科。产后出血500 ml，用欣母沛(前列腺素)250 μg宫颈注射，米索前列醇600 μg舌下含服，阴道流血减少。现已产后7 d，母子均平安。

讨论

多胎妊娠发生率按Hellin公式1∶80ⁿ⁻¹计算，四胎发生率为1∶512 000分娩人数。四胎及以上者世界报道不足百例，母子平安者仅为数例。四胞胎因子宫过度膨胀，极易发生早产[1]。本例能妊娠至37周分娩，实属不易。多胎孕产妇并发症多，胎儿围生期死亡率高。我们认为早期产前检查及B超确诊极为重要。营养食品应多样化，补充钙剂、铁剂，预防贫血，低蛋白血症，浮肿及妊娠高血压疾病。多休息，抑制宫缩与可能保胎连起月，如在孕34周前有先兆临产症状，应用地塞米松促进胎儿肺成熟，适时结束分娩以提高新生儿成活率。多胎妊娠分娩方式有一、二，文献[2]报道三胎以上及孕周超过35周皆行剖宫产结束分娩。本例因系经产妇，阴道分娩条件好，临产后产程短，经阴道分娩产后出血少，4子均平安出世。产后我们采取了积极的措施预防产后出血，欣母沛系前列腺素制剂，有强烈的子宫收缩作用，预防产后出血效果好。因子宫极度膨胀，采用剖宫产极易发生产后出血。低体质量儿护理极为重要，指导母乳喂养，预防新生儿并发症的出现。

关键词：四胞胎；多胎妊娠

中图法分类号：R714.3 文献标识码：B

参考文献：

[1] 王中瑜，郭丽萍，黄雅文，等. 四胞胎极低出生体重儿的抢救效果[J]. 中华围产医学杂志，2001，4(2)：119-120.

[2] 赵君荷，张气上. 四胞胎1例报告[J]. 宁夏医学院学报，1995，17(1)：95-96.

（编辑 汪勤俭）

作者简介：王 琳(1961-)，女，四川省巴中市人，博士，副主任医师，副教授，主要从事高危妊娠方面的研究，发表论文20篇。电话：(023)68765369

收稿日期：2005-12-20；修回日期：2005-12-26