论著

文章编号:1000-5404(2006)11-1138-03

利用 siRNA 干扰 MGMT 基因表达的初步研究

王 芳,周紫垣,刘胜学,曹 佳 (第三军医大学军事预防医学院军事毒理学教研室,重庆 400038)

提 要: 目的 采用 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术,通过构建人 O^6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(O^6-methylguanine-DNA methyltransferase gene, MGMT)基因的特异性 siRNA(small interfere RNA)真核表达载体,体外观察对人 MGMT(hMGMT)基因的沉默作用。**方法** 将合成的发卡样特异性 hMGMT RNA 干扰寡核苷酸序列插入真核表达载体并转染体外 HelaS3 细胞株,以半定量 RT-PCR 法检测 hMGMT mRNA 的表达水平,以 MTT 法检测转染后 HelaS3 细胞对 BCNU 的敏感性变化。**结果** 成功构建 MGMT siRNA 的真核表达载体;所构建的载体能够特异性降低 hMGMT mRNA 的表达水平,转染后 HelaS3 细胞对 BCNU 的敏感性增加。**结论** 该 RNA 干扰真核表达载体可以特异性干扰 hMGMT 基因的表达。

关键词: O^6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶基因;RNA 干扰;HelaS3

中图法分类号: Q503; Q782; Q786 **文献标识码**: A

Inhibition of MGMT gene by hairpin siRNA expression vector *in vitro*

WANG Fang, ZHOU Zi-yuan, LIU Sheng-xue, CAO Jia (Department of Military Toxicology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct the small interfering RNA (siRNA) eukaryotic expression vector specific to human MGMT gene (pRNATin-H1.2/Neo MGMT siRNA) to observe its silencing effect on MGMT gene *in vitro*. Methods The pRNATin-H1.2/Neo MGMT siRNA expression vector was constructed by gene recombination, then transfected into the cultured HelaS3 cells. Inhibitory effect of siRNAs was detected by semi-quantitative RT-PCR. Results The pRNATin-H1.2/Neo MGMT siRNA expression vector was successfully constructed. Cells transfected with pRNATin-H1.2/Neo MGMT siRNA could obviously inhibit the expression level of MGMT gene. Conclusion The pRNATin-H1.2/Neo MGMT siRNA expression vector could inhibit the MGMT gene expression.

Key words: MGMT gene; RNA interference; HelaS3

亚硝脲类药物如双氯乙基亚硝基脲(bischloroethyl nitrosourea, BCNU)作用于细胞 DNA,产生 O^6-烷基鸟嘌呤,引起 DNA 损伤,杀伤肿瘤细胞。而肿瘤细胞内的 O^6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(O^6-methylguanine-DNA methyltransferase gene, MGMT)能够参与修复肿瘤细胞的 DNA 烷化损伤,使细胞对亚硝脲类烷化剂产生耐药性,是降低烷化剂对肿瘤细胞杀灭效应的关键因素之一。这是许多肿瘤细胞对亚硝脲类烷化剂耐药的分子基础[1-3]。近年来人们尝试多种方法抑制 MGMT 基因表达,RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是目前最有效的基因沉默技术,能特异性抑制靶基因的转录[4]。本研究通过构建 MGMT 基因的发卡样 siRNA(small interfere RNA)真核表达载体,并转染 MGMT 活性相对较高的 HelaS3 肿瘤细胞株,观测对 MGMT 基因的沉默作用,为进一步调控 MGMT 基因表达研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒与细胞

真核表达载体 pRNATin-H1.2/Neo 购自 Genescript 公司,HelaS3 细胞株购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公司(来源于 ATCC)。大肠杆菌 JM109 由第三军医大学基础医学部生物化学教研室提供。

1.2 工具酶与主要试剂

质粒抽提试剂盒、Lipofectamine™2000 购自 Invitrogene 公司,Trizol、M-MLV 反转录酶、Oligo(dt)、RNasin、dNTPs、*Hind* Ⅲ购自赛百盛公司。*Taq* 酶购自大连宝生物公司。限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ购自上海生工公司,小牛血清购自民海生物公司。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300289)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30300289)

作者简介:王 芳(1978-),女,安徽省萧县人,硕士研究生,主要从事分子毒理学方面的研究。电话:(023)68772388

通讯作者:曹 佳,电话:(023)68752271,E-mail:caojia@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2005-12-13;**修回日期**:2006-03-21

DMEM 细胞培养液购自 Sigma 公司。

1.3　MGMT siRNA 的设计

在 GenBank 中获得 MGMT 基因全长 mRNA 序列,用 Sirna mode of Sfold 软件(http://sfold.wadsworch.org/sirna.pl)及 Ambion 公司网站的 siRNA target finder 进行 siRNA 的设计及 RNA 二级结构的预测。通过 Blast 挑选长为 19 个碱基的特异性寡核苷酸序列(5′-GGTTGTGAAATTCGGAGAATTCAAGAGATTCTCCGAATTTCACAACC-3′为 3 对中有效的 1 对),表 1 为设计的 3 个序列。

表 1　hMGMT 特异性发卡样寡核苷酸序列

序列名称	靶序列	环	反义链
2412-1	5′-CCAGACAGGTGTTATGGAA	TTCAAGAGA	TTCCATAACACCTGTCTGG-3′
2412-2	5-′GGTTGTGAAATTCGGAGAA	TTCAAGAGA	TTCTCCGAATTTCACAACC-3′
2412-3	5′-GTGATTTCTTACCAGCAAT	TTCAAGAGA	ATTGCTGGTAAGAAATCAC-3′

1.4　pRNATin-H1.2/Neo MGMT siRNA 的构建

将合成的 DNA oligos 溶解在灭菌、无核酸酶的水中,终浓度 3 mg/ml。各取 1 μl 的正向、反向 DNA oligos 与 48 μl 的退火缓冲液混合。将混合物在 90 ℃温育 4 min,70 ℃温育 10 min,慢慢冷却至 10 ℃。采用 DNA 重组技术[5],将 siRNA 双链定向亚克隆入 H1.2 启动子引导的真核表达载体 pRNATin-H1.2/Neo,转化连接子,37 ℃培养过夜,长出的单菌落为转化菌菌落。挑单菌落接种于 5 ml LB(含 100 μg/ml 氨苄青霉素)中,37 ℃摇菌过夜。收集细菌,按说明书操作小量快速抽提质粒 DNA,1% 的琼脂糖凝胶电泳检测结果并做 PCR 鉴定重组质粒,按下述条件进行循环:94 ℃ 5 min→94 ℃ 1 min→55.4 ℃ 1 min→72 ℃ 1 min,35 个循环。部分菌液送上海生工公司测序鉴定,阳性克隆命名为 pRNATin-H1.2/Neo MGMT siRNA。

1.5　引物设计与合成

1.5.1　siRNA PCR 引物　　根据质粒载体核苷酸序列,设计如下引物,正义链:5′-TCTGGGAAATCACCATAAAC-3′,反义链:5′-CTATGAACTAATGACCCCGT-3′。扩增长度 210 bp。

1.5.2　β-actin 基因内参照引物的设计与合成　　根据 GenBank 上报告的看家基因 β-actin 的序列,利用 Primer Premier 软件设计了 β-actin 的 RT-PCR 扩增引物。上游引物:5′-GACGTGGACATCCGCAAAGAC-3′,下游引物:5′-TCAAGAAAGGGTGTAACGCAAC-3′,扩增长度 310 bp。

1.5.3　MGMT 基因 RT-PCR 扩增引物设计　　根据 GenBank 上报告的 MGMT 基因全长 mRNA 的序列,利用 Primer Premier 软件设计了 MGMT 的 RT-PCR 扩增引物。上游引物:5′-GGCTGAATGCCTATTTCCACCA-3′,下游引物:5′-TGTCGCTCAAACATCCATCCTACT-3′,扩增长度 462 bp。

1.6　重组质粒转染与稳定筛选

HelaS3 细胞常规培养于含 10 % 小牛血清的 DMEM 培养液(含双抗),以 3×10^5 个/ml 培养液于转染前 1 天接种 6 孔板(接种时换用无双抗的培养液),每孔 2 ml。按 Lipofectamine™ 2000 说明书转染细胞,同时设两种非转染对照培养(1 种对照接受抗生素筛选,另 1 种不含抗生素的阳性对照)及阳性、阴性质粒对照组。转染后 48 h 换上含 900 μg/ml G418 的培养液,每 3 天换 1 次液。2 周后改为 450 μg/ml G418 的培养液维持筛选。2 周后可见长出筛选克隆,用 PBS 冲洗后,加胰酶消化液消化后转移至培养瓶中培养。

1.7　半定量 RT-PCR 检测抑制效应

收集经稳定筛选的 3 组细胞,按 Tripure 试剂操作说明,分别提取总 RNA,紫外分光光度计定量,调整浓度为 1 μg/μl。按照 RT-PCR 试剂说明书操作,分别用 β-actin 基因和 MGMT 基因引物按下列条件进行 RT-PCR:94 ℃ 5 min→94 ℃ 1 min→94 ℃ 45 s→61 ℃ 45 s→72 ℃ 45 s,27 个循环。

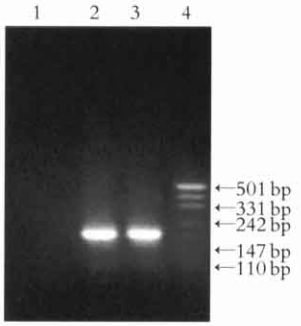
1.8　转染细胞对 BCNU 的敏感性

采用 MTT 法,分别将 5×10^4 个/ml 转染的及未转染的 HelaS3 细胞,接种于 96 孔板,37 ℃,5% CO_2 全湿培养,24 h 后加入 BCNU(12.5 ~ 400 μg/ml),同时设阴性对照,继续培养。48 h 后换上新鲜培养基,每孔加入 20 μl 新鲜配制的 MTT 工作液,继续培养 4 h。1 000 r/min 离心 10 min,小心吸尽培养基,每孔加入 150 μl DMSO,37 ℃摇床轻摇使蓝色颗粒充分溶解。用酶标仪测定每孔 490 nm 处 OD 值,计算 IC_{50}。

2　结果

2.1　pRNATin-H1.2/Neo MGMT siRNA 真核表达载体的构建

2.1.1　pRNATin-H1.2/Neo MGMT siRNA 的构建　　本研究依据 GenBank 提供的 MGMT 基因 mRNA 序列,设计合成的发卡样 MGMT siRNA,采用 DNA 重组技术,将互补的双链 MGMT siRNA 定向亚克隆入 pRNATin-H1.2/Neo 真核表达载体,转化连接子,获得阳性克隆,提取质粒,通过 PCR 扩增,所得 PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳,扩增目的片段 210 bp(图 1)。



1:空白对照;2,3:PCR 产物;4:DNA 标准

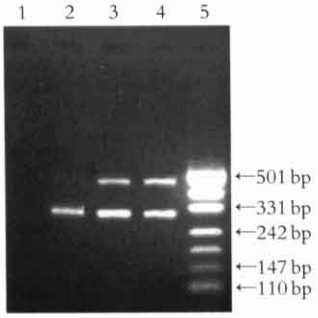
图 1　重组质粒的 PCR 扩增鉴定

2.1.2　pRNATin-H1.2/Neo MGMT siRNA 质粒的鉴定　　取 pRNATin-H1.2/Neo MGMT siRNA 克隆质粒菌液送上海生工公司测序鉴定,结果插入的发卡样序列完全正确。

2.2　发夹式 siRNA 对 MGMT 的抑制作用

取 RT-PCR 产物 10 μl 进行 2 % 琼脂糖凝胶电泳,结果可以看出 3 组样品在 310 bp 处均可见到 β-actin 基因的条带,转染组在预期大小约 462 bp 处条带很弱,说明靶基因 MGMT 表达受到抑制,而正常对照组、阴性对照质粒组在预期大小约462 bp处分

别可以看到1条较亮带，说明扩增出了靶基因（图2）。



1：空白对照；2：siRNA 转染的 HelaS3 细胞；3：阴性对照；4：未转染的 HelaS3 细胞；5：DNA 标准

图2 转染后 MGMT mRNA 表达变化

2.3 转染细胞对 BCNU 的敏感性

采用 MTT 法分析转染的 HelaS3 细胞对 BCNU 的敏感性增加，未转染的 HelaS3 细胞 MGMT 表达较高，其 IC_{50} 为 210 μg/ml，而转染后的细胞 IC_{50} 为 70 μg/ml，敏感性提高3倍。结果表明转染 siRNA 真核表达载体的 HelaS3 细胞对 BCNU 的敏感性增加。

3 讨论

MGMT 可将烷化剂作用下形成的 O^6 位甲基鸟嘌呤（O^6-methylguanine，O^6MG）上的甲基转移到自身的活性半胱氨酸残基上，从而有效地修复 DNA 损伤，是目前报道的修复 DNA 烷化损伤的一个关键酶，被认为是肿瘤细胞对烷化剂类肿瘤药耐药的基础。为了提高化疗的敏感性，Manome 等[6,7]曾报道用反义 RNA 技术封闭 MGMT 基因的表达，有效逆转脑肿瘤细胞对烷化剂氯乙酸亚硝脲（CENU）的耐药性，但效应较低，选择序列比较盲目。而 RNA 干扰是双链 RNA 分子在 mRNA 水平关闭相应序列基因表达或使其沉默的过程，它的特异性在于所挑选片段的特异性，因为凡是与之配对的相关基因均受其干扰，所以采用 RNA 干扰技术研究基因的功能，所挑选的短链寡核苷酸片段必须是该基因所特有的，基因 Blast 为我们提供挑选特异性片段的最佳平台。近年来 RNA 干扰技术广泛用于基因功能研究，成为研究热点[8-10]。本研究挑选由19个碱基组成的寡核苷酸序列（5′-GGTTGTGAAATTCG-GAGAATTCAAGAGATTCTCCGAATTTCACAACC-3′）为作为干扰片段，此段有效序列位于整个 MGMT mRNA 的447～468 bp处，Blast 分析与 MGMT 有100%的同源性，与其他 mRNA 序列相似性低，最多有16个碱基一致，显示该序列具有良好特异性。发卡样双链 RNA 干扰表达载体的特点是，转染入细胞后，在胞内自身的 RNA 聚合酶Ⅲ（RNA polymerase Ⅲ，pol Ⅲ）的作用下，自动释放出双链靶序列的 siRNA 短片段，干预相关mRNA的转录，下调相应基因的表达。本研究设计合成 MGMT 基因的特异性发卡样双链 siRNA 短片段，再将变性、复性后的 siRNA 短片段插入 H1.2 启动子引导的真核表达载体（pRNATin-H1.2/Neo）中，构建 pRNATin-H1.2/Neo MGMT siRNA 真核表达载体。获得阳性克隆，取克隆做 PCR、测序鉴定，所插入的片段正确无误。该表达载体转染进入体外培养的 HelaS3 后，结果显示，pRNATin-H1.2/Neo MGMT siRNA 转染组细胞能显著抑制胞内 MGMT 基因表达水平（与正常对照和阴性对照载体 pRNATin-H1.2/Neo 转染对照相比）。转染后的 HelaS3 细胞对化疗药物 BCNU 的敏感性增强。另外，该载体是可以诱导的载体，启动区含有四环素调控的位点，这为我们进一步调控性干扰目的基因 MGMT 的表达奠定了基础。

参考文献：

[1] BOBOLA M S, BERGER M S, ELLENBOGEN R G, *et al*. O^6-Methylguanine-DNA methyltransferase in pediatric primary brain tumors: relation to patient and tumor characteristics[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(3): 613-619.

[2] CHRISTMANN M, PICK M, LAGE H, *et al*. Acquired resistance of melanoma cells to the antineoplastic agent fotemustine is caused by reactivation of the DNA repair gene MGMT[J]. Int J Cancer, 2001, 92(1): 123-129.

[3] LIU L, SCHWARTZ S, DAVIS B M, *et al*. Chemotherapy-induced O^6-benzylguanine-resistant alkyltransferase mutations in mismatch-deficient colon cancer[J]. Cancer Res, 2002, 62(11): 3070-3076.

[4] LEIRDAL M, SIOUD M. Gene silencing in mammalian cells by preformed small RNA duplexes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 295(3): 744-748.

[5] 萨姆布鲁克 J，拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂译. 第3版. 北京：科学出版社，2002：68-71.

[6] MANOME Y, YOSHINAGA H, WATANABE M, *et al*. Adenoviral transfer of antisenses or ribozyme to O^6-methylguanine-DNA methyltransferase mRNA in brain-tumor model resistant to chloroethyl-nitrosourea[J]. Anticancer Res, 2002, 22(4): 2029-2036.

[7] NAGANE M, ASAI A, SHIBUI S, *et al*. Application of antisense ribonucleic acid complementary to O^6-methylguanine-deoxyribonucleic acid methyltransferase messenger ribonucleic acid for therapy of malignant gliomas[J]. Neurosurgery, 1997, 41(2): 434-440.

[8] YING C, DE-CLERCQ E, NEYTS J. Selective inhibition of hepatitis B virus replication by RNA interference[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 309(2): 482-484.

[9] LIPSCOMB E A, DUGAN A S, RABINOVITZ I, *et al*. Use of RNA interference to inhibit integrin (alpha6beta4)-mediated invasion and migration of breast carcinoma cells[J]. Clin Exp Metastasis, 2003, 20(6): 569-576.

[10] CAO M, REN H, PAN X, *et al*. Inhibition of EGFP expression by siRNA in EGFP-stably expressing Huh-7 cells[J]. J Virol Methods, 2004, 119(2): 189-194.

（编辑 张大春）