文章编号:1000-5404(2007)08-0691-04

论著

RNA干扰Neuropilins-2基因真核表达载体的构建及其鉴定

周 琪[1,2],梁后杰[2],阎晓初[1],彭秋平[2],周进明[2],吴 峰[1],钟大平[2],边志衡[2] (第三军医大学西南医院:[1]病理科,[2]肿瘤科,重庆 400038)

提 要:目的 构建Neuropilins-2(NRP2)基因RNA干扰(RNAi)的真核细胞表达载体。**方法** 以NRP2为靶基因,以pGenSil-1质粒为载体,设计构件重组体,根据GenBank数据库提供的NRP2基因核苷酸序列,按照Tuschl设计原则,选择设计两条带发夹结构的核苷酸序列,克隆到空载体pGenSil-1中,转化DH5α菌株,提取质粒,进行限制性内切酶酶切鉴定和测序分析。重组pGenSil-NRP2载体转染LOVO细胞48 h,收获细胞,采用Western blotting检测其NRP2蛋白表达。**结果** 经酶切鉴定筛选出的重组体测序结果与目的序列完全一致,重组载体构建成功。重组体pGenSil-NRP2转染LOVO细胞48 h后NRP2蛋白表达显著降低。**结论** 利用RNAi技术可成功构建抑制NRP2表达的小干扰RNA重组体。

关键词:NRP2;RNA干扰;真核表达载体
中图法分类号:Q503;Q782 **文献标识码**:A

Construction and effect of Neuropilins-2 eukaryotic expression vector for RNA interference

ZHOU Qi[1,2], LIANG Hou-jie[2], YAN Xiao-chu[1], PENG Qiu-ping[2], ZHOU Jin-ming[2], WU Feng[1], ZHONG Da-ping[2], BIAN Zhi-heng[2] ([1]Institute of Pathology, [2]Department of Phymatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct Neuropilins-2 eukaryotic expression vector for RNA interference. **Methods** Recombinant targeting on gene NRP2 was designed and established with plasmid pGenSil-1 based on NRP2 cDNA equences of Genomes. Two pairs of oligonucleotides were synthesized according to the Tuschl and inserted into plasmid pGenSil-1 to generate siRNA eukaryotic expression vector, DH5α strains were transformed, plasmid were extracted, and recombinant vectors were identified by the restriction map and the sequence analysis. The recombinant plasmid (pGenSil-NRP2) was transfected into the cultured LOVO cells. At 48 h after transfection, the whole cell protein was extracted, and the protein level was detected by Western blotting with mouse-anti-human NRP2 monoclonal antibody. **Results** Recombinant plasmids were completely coincided with the designs by the restriction map and the sequence analysis. pGenSil-NRP2 expression vector into LOVO cells down-regulated the protein level of NRP2 at 48 h after transfection. The recombinant eukaryotic expression vector were constructed successfully. **Conclusion** siRNA recombinant can be constructed successfully by RNAi technique for inhibiting NRP2 expression.

Key words: Neuropilins-2; RNA interference; eukaryotic expression vector

Neuropilins(NRPs)为跨膜糖蛋白,首先证实为神经导向因子3型分泌型semaphorins的主要受体[1],近来有学者发现它也是某些特殊亚型的血管内皮生长因子(如VEGF165、VEGF145和VEGF-C等)的一种复合受体[2]。新近发现神经轴突导向分子semaphorins3F(Sema3F)的受体Neuropilin-2(NRP2)也在胚胎脉管发育中具有重要作用,其中NRP2与淋巴管发生密切相关,可能与肿瘤的淋巴结转移相关[3]。因此我们设计构建了NRP2的RNAi真核细胞表达载体,为下一步抑制肿瘤的淋巴管生成和肿瘤细胞向淋巴管转移研究提供工具。

基金项目:国家自然科学基金(30572159)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30572159)
作者简介:周 琪(1969-),男,重庆市垫江县人,博士研究生,副主任医师,主要从事结肠癌防治方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)72096382,E-mail:qizhou112@yahoo.com.cn
通讯作者:阎晓初,电话:(023)68754434,E-mail:yxchwq@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2006-09-21;**修回日期**:2006-10-04

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒 大肠杆菌 *E. coli.* DH5α(本院中心实验室冻存),质粒 pGenSil-1 由本院内分泌科姜友昭博士惠赠(图1)。

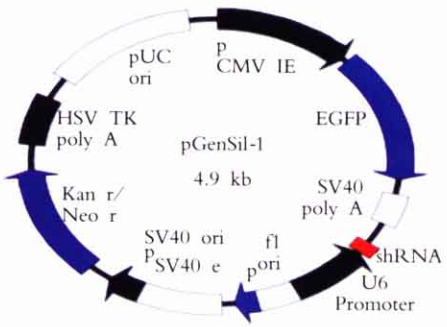


图1 重组质粒构建图

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ、*Bam*H Ⅰ、*Hind* Ⅲ T_4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司,100 bp DNA 标准、脂质体转染试剂 Lipofectamine™2000、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、DNA 片段纯化试剂盒和 LB 培养基均购自 Invitrogen 公司,NRP2 鼠抗人单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,羊抗鼠 IgG 二抗和 DAB 购自北京中杉公司,实验所用试剂均为进口或国产分析纯试剂。优质胎牛血清购自 PAA 公司,高糖型 DMEM 培养基系 Hyclon 公司产品。

1.1.3 人 LOVO 结肠癌细胞株的培养 人高转移性结肠腺癌 LOVO 细胞株(本院中心实验室冻存)。用含 10% 胎牛血清无支原体感染的 DMEM 培养基,在 37 ℃、5% CO_2 的条件下培养。

1.1.4 载体序列设计 根据 GenBank 数据库提供的 NRP2 基因核苷酸序列(基因号 GI:109658739),按照 Tuschl 设计原则[4,5],利用 Ambion 公司(http://www.ambion.com/sirnaca.html) siRNA 在线设计软件设计 1 条长度为 19 bp 的序列,根据 siRNA 表达质粒 pGenSil-1 的酶切位点的要求,由上海生工生物公司合成带有 *Bam*H Ⅰ、*Hind* Ⅲ 酶切黏性末端终止识别序列和带发夹结构的 9 bp LOOP 环的 DNA 合成引物双蒸水溶解稀释成 100 pmol/L 备用,总长度为 60 bp。序列如下:NRP2 正义:5′-GATCCCCGTCGTTTGAATTCCAAAGATTCAAGAGATCTT-TGGAACAAACGACTTTTTA-3′;反义:3′-GGGCAGCAAACTTCCTTTTTCTAAGTTCTCTAGAAACCTTAAGTTTGCTGAAAAATTCGA-5′。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌的转化与质粒提取 大肠杆菌 *E. coli.* DH5α 感受态细胞的制备与转化参照文献[6]用氯化钙法制备,质粒提取按照试剂盒说明进行,提取 DNA 的吸光度值为 1.8~2.0 时用于实验。

1.2.2 siRNA 真核表达载体的构建

1.2.2.1 引物退火 分别取 1 μl 正义与反义引物,将引物等量混合,加入 48 μl 的退火 buffer(100 mmol/L 醋酸钾 + 2 mmol/L 醋酸镁 + 30 mmol/L HEPES-KOH,pH 7.4)于 95 ℃孵育 2 min,75 ℃孵育 10 min,缓慢冷却退火引物至 4 ℃,使引物结合形成双链。

1.2.2.2 线性化载体制备 取 2 μl 退火的引物并稀释为 10 μl,取稀释后退火引物 2 μl,加入质粒 pGenSil-1 1 μg,10 × buffer 2 μl,*Bam*H Ⅰ 1 μl,*Hind* Ⅲ 1 μl,ddH_2O 14 μl,37 ℃孵育 2 h,进行双酶切反应;用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析酶切产物并回收线性化产物。

1.2.2.3 连接与转化连接体系 双酶切回收载体片段 1 μl,合成产物 2 μl,1 × 连接酶 buffer 1 μl,T_4 DNA 连接酶 1 μl,ddH_2O 5 μl,16 ℃连接过夜,转化感受态受体菌 DH5α。

1.2.2.4 重组子的筛选鉴定 取菌液涂布于含 30 μg/ml 卡那霉素的 LB 琼脂平板上,37 ℃培养 12~16 h,挑取单克隆菌落,抽提 DNA,用 *EcoR* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 进行酶切,产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,分析酶切产物,对可能重组成功的克隆进行 DNA 测序,证实重组成功后,迅速大量扩增,制备的重组载体,-20 ℃冰箱保存,质粒 pGenSil-1 扩增、提取方法参考文献[6]。

1.2.2.5 pGenSil- NRP2 抑制 LOVO 细胞 NRP2 表达的检测 LOVO 细胞为高转移性结肠腺癌细胞,表达一定水平 NRP2。转染前 1 天,将生长良好的人 LOVO 结肠癌细胞株用无抗生素、含血清培养基调整细胞数量为 5×10^5/ml,接种于 24 孔板中。待细胞生长至密度为 70% ~90% 时,进行转染。用不含抗生素和血清的培养基将 0.8 μg 和 Lipofectamine™2000 试剂 2.4 μl 分别用稀释至 50 μl,混匀后室温放置 5 min,然后将二者混合均匀,室温放置 20 min 后加入不含抗生素和血清的培养基的培养孔中。多孔转染按上述比例批量制作转染混合物进行转染。转染后 6 h,换含血清的培养基,培养 24 h 和 48 h 于倒置荧光显微镜下观察表达增强的绿色荧光蛋白(EGFP)的情况。收获细胞并检测 NRP2 蛋白表达。以 pGenSil-1 空载体转染为对照。

1.2.2.6 Western blotting 检测 NRP2 蛋白表达 快速制备法提取胞浆蛋白,经电泳、转膜后杂交,一抗为鼠抗人 NRP2 单抗,二抗为羊抗鼠 IgG,DAB 显色。

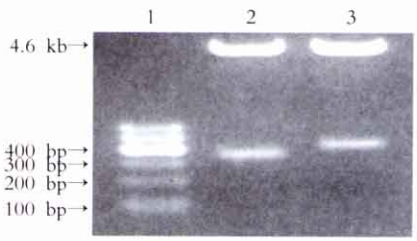
1.3 统计学处理

数据用 $x \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 重组质粒与空载体酶切鉴定

将重组质粒与空载体酶切回收产物进行电泳检测,发现环状质粒已被切开,大片段约为 4.6 kb,重组质粒小片段为 410 bp,空载体小片段为 350 bp,见图2。



1:标准;2:空载体;3:pGenSil-NRP2

图2 重组质粒 pGenSil-NRP2 酶切电泳图谱

2.2　重组质粒的测序鉴定

重组质粒经自动基因测序仪测序（上海生工生物公司，测序样品号：0608005P）结果与设计序列完全相符（位于 180 ~ 240 bp），所含目的基因序列准确无误，重组质粒构建成功，见图 3。

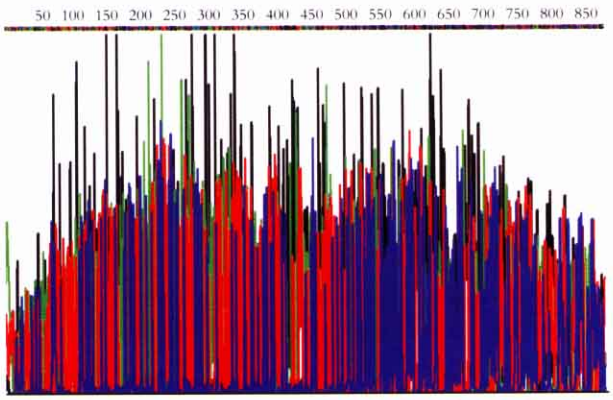
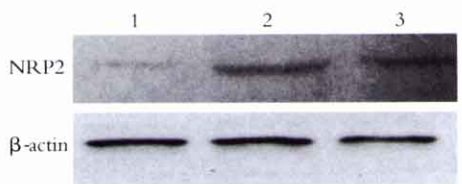


图 3　重组质粒 pGenSil-NRP2 基因测序图（插入片段位于 180 ~ 240 bp）

2.3　LOVO 细胞的转染结果

LOVO 细胞转染 pGenSil-NRP2 或空载体（pGenSil-1）质粒 12 h 后，于倒置荧光显微镜下观察 EGFP 的表达，24 h 开始可见 EGFP 表达，48 h 表达最强，72 h 后 EGFP 表达逐渐减弱。

pGenSil-NRP2 对 LOVO 细胞 NRP2 表达的抑制 pGenSil-NRP2 转染 LOVO 细胞后 48 h 后，Western blotting 检测细胞内 NRP2 蛋白水平，未转染、pGenSil-1 转染和 pGenSil-NRP2 转染 NRP2 蛋白表达强度分别为（2.11 ± 0.06）、（2.09 ± 0.05）和（0.53 ± 0.82）。统计学分析表明，pGenSil-NRP2 转染 LOVO 细胞后，NRP2 蛋白表达水平明显下调（$P < 0.05$），其抑制率为 74.9%；pGenSil-1 转染 LOVO 细胞后，对 NRP2 蛋白表达水平无抑制作用（$P > 0.05$），见图 4。



1：pGenSil-NRP2；2：未转染；3：pGenSil-1

图 4　Western blotting 检测 LOVO 细胞 NRP2 蛋白变化

3　讨论

NRP 家族包括 NRP1 和 NRP2 两个成员，两者具有 44% 的同源性。由胞外区、跨膜区及胞内区 3 部分组成，NRPs 的主要结构包括 2 个互补的 α1 和 α2 结构域（CUB），系 3 型 Sema 结合部位；两个凝血因子 Ⅴ/Ⅷ同源结构域（b1 和 b2 区），为 VEGF 的结合部位；1 个 meprin（MAM）区（c 结构域），含 1 个跨膜和 1 个短的细胞质部位，主要参与 NRP 二聚作用和 NRPs 与其他膜受体的相互作用[7]。Neuropilin 家族的胞内段很短，只有约 40 个氨基酸，曾认为不参与信号转导，新近发现其细胞内区也可独立转导生物学信号[8]。

目前研究发现 Neuropilins 具有两种功能：在神经导向中，NRPs 常与 3 型 Sema 和 Plexins 一起形成复合物，诱导 semaphorins 信号转导而阻滞神经节轴突生长；在脉管生成中，NRPs 为近年发现的 VEGF 新型受体，常与 VEGF165 结合。其中 NRP1 结合 Sema3A 较 Sema3F 具有更高的亲和力，而 NRP2 只与 Sema3F 结合。这样两个不同的配体（Sema 和 VEGF）结合同一受体（NRPs），并介导两个不同的过程，即神经导向和血管生成，提示这些过程可能具有共同的分子机制[1]。近年已发现血管内皮生长因子（VEGF-C 和-D）激活其受体 VEGFR3 信号通路可诱导肿瘤淋巴管生成。新近发现神经轴突导向分子 semaphorins 的两种受体 NRP1 和 NRP2 也在胚胎脉管发育中具有重要作用，其中 NRP2 与淋巴管发生密切相关。已发现在纯合子 NRP2 突变动物，主要表现为小淋巴管和毛细淋巴管缺乏或数量减少，而血管系统和其他的大集合淋巴管发育正常。提示 NRP2 对胚胎淋巴管发育具有一种选择性的需要[2]。进一步研究表明胚胎早期从静脉出芽形成的原始淋巴管并不需要 NRP2 参与，而在其后期从原有淋巴管内皮出芽形成新生淋巴管的过程中 NRP2 却十分必要。表明 NRP2 对成熟组织的毛细淋巴管形成具有非常重要的作用[3]。

癌细胞扩散转移是癌症患者死亡的重要原因，癌细胞从原发灶向远处转移主要通过血道和淋巴道播散。在实际工作中，我们通常观察到的大多数癌早期播散主要是通过淋巴管向局部淋巴结转移。新近研究也表明肿瘤淋巴管生成的程度与肿瘤周围区淋巴管密度相关，肿瘤中新生淋巴管是从肿瘤周围先前存在的淋巴管内皮细胞出芽发生[9,10]。但在淋巴内皮细胞表达 NRP2，采取使 NRP2 基因沉默可以降低淋巴内皮细胞的迁移率和小管成型、阻断淋巴管内皮细胞趋化，提示抑制 NRP2 的表达可能具有抑制肿瘤毛细淋巴管生成的可能[11]，在抑制肿瘤的淋巴结转移方面具有潜在的重要意义。

RNAi 作为抑制基因表达的手段具有高效率、高特异性、高稳定性可遗传性等优点[12]。本实验重组 PGenSil-NRP2 质粒瞬时转染 LOVO 细胞，明显抑制 NRP2 的蛋白表达，表明成功构建了 NRP2 基因 RNAi 的真核细胞表达载体，为下一步抑制淋巴内皮细胞 NRP2 表达及其在抑制肿瘤淋巴管转移的研究打下稳固的基础。

参考文献：

[1] Chen C, Li M, Chai H, *et al*. Roles of neuropilins in neuronal development, angiogenesis, and cancers[J]. World J Surg, 2005, 29(3): 271-275.

[2] Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, *et al*. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice[J]. Development, 2002, 129(20): 4797-4806.

[3] Karkkainen M J, Haiko P, Sainio K, *et al*. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins[J]. Nat Immunol, 2003, 5(1): 74-80.

[4] Elbashir S M, 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] Elbashir S M, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs[J]. Genes Dev, 2001, 15(2): 188-200.

[6] 萨姆布鲁克J, 拉塞尔D W. 分子克隆实验指南[M]. 第4版. 黄培堂, 俞炜源, 陈添弥, 译. 北京: 科学出版杜, 2005: 26.

[7] Neufeld G, Shraga-Heled N, Lange T, *et al*. Semaphorins in cancer[J]. Front Biosci, 2005, 10: 751-760.

[8] Guttmann-Raviv N, Kessler O, Shraga-Heled N, *et al*. The neuropilins and their role in tumorigenesis and tumor progression[J]. Cancer Lett, 2006, 231(1): 1-11.

[9] He Y, Rajantie I, Ilmonen M, *et al*. Preexisting lymphatic endothelium but not endothelial progenitor cells are essential for tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis[J]. Cancer Res, 2004, 64(11): 3737-3740.

[10] 阎晓初, 牟江红, 柳凤轩. 大肠癌组织淋巴管分布特点及其与转移和预后的关系[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(22): 2255-2258.

[11] Bielenberg D R, Hida Y, Shimizu A, *et al*. Semaphorin 3F, a chemorepulsant for endothelial cells, induces a poorly vascularized, encapsulated, nonmetastatic tumor phenotype[J]. J Clin Invest, 2004, 114(9): 1260-1271.

[12] Aoki Y, Gioca D P, 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(1-2): 96-102.

（编辑 张大春）

（上接690页）

经上皮层光带。50眼次DME中单纯海绵样肿胀15眼次(30%)，海绵样肿胀+囊样水肿12眼次(24%)，海绵样肿胀+神经上皮脱离13眼次(26%)，海绵样肿胀+神经上皮脱离+囊样水肿10眼次(20%)。

2.2 OCT定量研究

每眼黄斑地形图颜色分布不同：中心凹，黄斑中心1 mm直径区域视网膜平均厚度及黄斑总容积分别为(306.8±152.96)、(321.74±137.86) μm及(9.13±2.12) μm^3；相关回归分析结果显示其与最佳矫正视力都呈直线负相关，相关系数分别为$r_1=-0.6031$，$r_2=-0.6026$，$r_3=-0.6868$，P值均小于0.01。

3 讨论

近年来OCT在DME的诊治方面应用广泛，国内外学者对其图像特征已有共识，本研究定性分析结果与其他学者相似[2-4]，但以下两点值得探讨。

一是如何快速准确发现其图像特征。临床上线性扫描被应用最多，但国内文献中用4~5 mm长度，通过中心凹水平或垂直径线扫描为多[3]。扫描径线不够、长度不足，可能丢失信息，尤其在水肿轻微及中心凹未波及时更须仔细查找。本研究增加扫描径线长度和条数以获取较多信息并作定性分析，减少了漏诊可能。

二是如何定量DME。国内文献多以人工测量上述1~2个方向中心凹视网膜厚度作为黄斑水肿程度的判定指标[3]。根据临床有意义的黄斑水肿的定义，仅仅中心凹1个点的厚度，不足以反映整个黄斑的水肿状况[1]，且人工测量误差大。

黄斑地形图中白、红色代表水肿降起区域，蓝、绿色代表凹陷区域。颜色的差异直观提示水肿存在与否，面积大小及与中心凹的关系等；中心凹及9个区域视网膜平均厚度及黄斑总容积值则由计算机自动测定并整合处理所得。敏感性、特异性及重复性良好[1-4]。本研究显示黄斑中心1 mm直径区域视网膜平均厚度及黄斑总容积与中心凹视网膜平均厚度一样，与最佳矫正视力都存在直线负相关，说明它们都可以反映视网膜水肿程度及视功能，都应纳入黄斑水肿程度判定指标，临床工作中应根据水肿受累面积，选择相应参数，量化观察。

同时，以上两种方法也不是截然分开的，必要时用于定性分析的线性扫描可选用测量程序定量图中的具体病变；而用于定量的黄斑厚度地形图扫描也可选用标准化程序作定性分析。总之，OCT多个扫描和分析程序联合应用，可以减少DME的漏诊、精确观察指标。

关键词：糖尿病视网膜病变；糖尿病黄斑水肿；光学相干断层扫描

中图法分类号：R587.104 文献标识码：B

参考文献：

[1] Massin P, Vicaut E, Haouchine B, *et al*. Reproducibility of retinal mapping using optical coherence tomography[J]. Arch Ophthalmol, 2001, 119(8): 1135-1142.

[2] Otani T, Kishi S, Maruyama Y. Patterns of diabetic macular edema with optical coherence tomography[J]. Am J Ophthalmol, 1999, 127(6): 688-693.

[3] 谢[illegible]娟, 成秀泉, 李西玲, 等. 黄斑水肿的光相干断层扫描分析[J]. 中华眼底病杂志, 2004, 20(3): 152-155.

[4] 李世迎, 王[illegible], 闫正勤, 等. 高度近视眼黄斑视网膜神经上皮及厚度的OCT测量[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(5): 419-422.

（编辑 张大春）