文章编号:1000-5404(2007)20-1929-04

论著

人肝素酶RNAi序列的筛选及鉴定

熊 震,汤旭东,房殿春,陈 婷,余松涛,陈 陵,罗元辉,杨仕明 (第三军医大学西南医院全军消化病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 筛选及鉴定有效人肝素酶(heparanase, Hpa)RNA干扰(RNA interference)序列。**方法** 通过在线网络软件选择3个Hpa RNAi的靶点,再设计1组无关序列作阴性对照。通过基因重组技术,把3个干扰片段及阴性对照片段分别克隆入质粒pGenesile-1,脂质体法稳定转染至HepG2肝癌细胞;经G418抗性筛选后各挑选2个阳性克隆进行扩大培养;Western blot检测不同克隆肝素酶蛋白的表达水平,并进一步采用RT-PCR验证筛选克隆肝素酶mRNA的表达水平。**结果** 通过在线网络软件设计3个RNA干扰序列,分别为Hpa/RNAi-1:GGCTATCTCTTCTGTTCAA,Hpa/RNAi-2:TCCTGTCCGTCACCATTGA,Hpa/RNAi-3:CTCAGTTGCTCCTGGACTA及阴性对照序列Hpa/RNAi-N:CTACCGTTGTATAGGTGT;测序证实克隆入pGenesil-1载体的3个干扰序列及阴性对照序列与设计序列完全一致;经G418抗性筛选后形成的阳性克隆采用Western blot检测其肝素酶蛋白的表达,结果表明3个干扰序列对HepG2细胞人肝素酶蛋白的表达均有抑制作用,其中Hpa/RNAi-1和Hpa/RNAi-3干扰链的抑制效果最好,分别达到57%和71%;RT-PCR检测结果亦表明Hpa/RNAi-1和Hpa/RNAi-3序列在mRNA水平对肝素酶有较好的抑制效果。**结论** 成功筛选出有效的人肝素酶RANi序列。

关键词:人肝素酶;RNA干扰;siRNA;肝癌
中图法分类号:Q556.2;Q785;R735.7 **文献标识码**:A

Screening and identification of heparanase RNAi sequence

XIONG Zhen, TANG Xu-dong, FANG Dian-chun, CHEN Ting, YU Song-tao, CHEN Ling, LUO Yuan-hui, YANG Shi-ming (Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To screen and identify the efficient heparanase (Hpa) RNAi sequence. **Methods** We chose three candidate targets of Hpa RNAi through online software and designed a set of independent sequence as negative control group. The three interference fragments and independent sequence were cloned into pGenesile-1 expression vector by gene recombination technique. The recombinant vectors were then transfected into HepG2 liver cancer cell line. After screening by G418, the expression of heparanase in the selected clones was detected by Western blot, and its mRNA expression level by RT-PCR. **Results** The three interference sequences designed with online tool respectively was Hpa/RNAi-1: GGCTATCTCTTCTGTTCAA; Hpa/RNAi-2: TCCTGTCCGTCACCATTGA; Hpa/RNAi-3: CTCAGTTGCTCCTGGACTA and negative control Hpa/RNAi-N: CTACCGTTGTATAGGTGT; The three interference sequence were cloned into pGenesil-1 vector, respectively. Sequencing analysis confirmed their correctness. Positive clones formed after their stable transfection into HepG2 and G418 screening. Compared with untransfected HepG2 and negative control, Western blot analysis showed heparanase protein in interference sequence transfected HepG2 was significantly down-regulated. Hpa/RNAi-1 and Hpa/RNAi-3 showed better inhibition effect, with their inhibition efficiency to 57% and 71% respectively; RT-PCR result proved the sequence of Hpa/RNAi-1 and Hpa/RNAi-3 could effectively down-regulate heparanase on mRNA level. **Conclusion** We successfully screen and identify the efficient heparanase RNAi sequence.

Key words: heparanase; RNAi; siRNA; hepatocellular carcinoma

基金项目:国家自然科学基金(30570841,30200123)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570841,30200123)
作者简介:熊 震(1978-),男,湖南省桃江县人,硕士研究生,医师,主要从事肝素酶方面的研究。电话:(023)65398064,E-mail:xiongzhen007@163.com
通讯作者:杨仕明,电话:(023)68765184,E-mail:shimingyang@yahoo.com.cn
收稿日期:2007-06-19;**修回日期**:2007-07-06

肝素酶是近年来发现的一种与肿瘤转移密切相关的新基因，是体内唯一能降解硫酸乙酰肝素蛋白聚糖（HSPG）的内源性糖苷内切酶，与肿瘤的血管生成，侵袭能力，转移潜能有着密切的联系，在几乎所有的中晚期恶性肿瘤中表达[1,2]。因此，肝素酶有可能成为中晚期肿瘤治疗的一个良好靶点[2,3]。最近有文献报道肝素酶抑制剂 PI-88 可以有效地延长肝癌患者的无瘤生存期，明显地延长患者的寿命[4]。RNA 干扰（RNA interference，RNAi）是近年来科学研究的重大发现，它主要是通过在转录后（post-transcriptional）水平阻断基因的表达，与传统基因组学的研究方法比较，RNAi 更迅速，更直接[5]。为此，本研究拟采用生物信息学技术，设计数条肝素酶的 RNA 干扰序列，克隆至 pGenesil-1 表达载体，然后采用脂质体法将干扰序列转染至 HepG2 肝癌细胞中，采用 Western blot 检测转染细胞肝素酶蛋白的表达，以筛选出能有效抑制肝素酶表达的干扰序列，为肝素酶 RNA 干扰的应用提供实验依据。

1 材料与方法

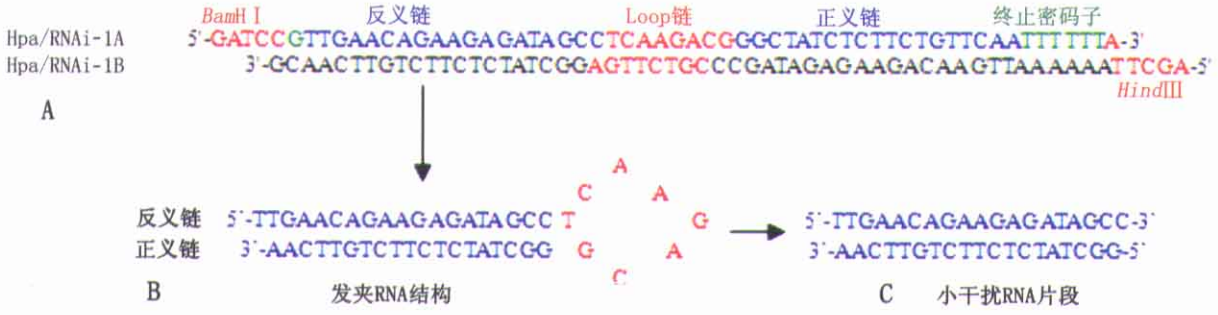
1.1 材料

DH5α 大肠杆菌菌株和肝癌 HepG2 细胞由本所保存；pGenesil-1 质粒由第三军医大学全军烧伤研究所实验室苏踊跃博士惠赠；3 条靶基因 dsDNA 及阴性对照组 dsDNA、PCR 引物都由 TaKaRa 公司合成；*Bam*HI、*Hind* Ⅲ、T_4 DNA 连接酶、质粒小抽试剂盒、逆转录试剂盒及胶回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司；G418 购自 Boehriger Mannheim 公司；琼脂粉、胰蛋白胨和酵母提取粉均购自 Oxoid 公司；DMEM（高糖）培养基购自 Gibco 公司；胎牛血清购自 Hyclone 公司；DOTAP 脂质体购自 Roche 公司；肝素酶多克隆抗体购自武汉博士德公司；2×*Taq* Plus PCR Mastermix 试剂盒和 DNA Marker 购自天根公司；TRIzol 购自 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 干扰序列设计 通过 Pubmed 网站搜索人肝素酶的 mRNA 序列，并确定代码为 AF165154 基因为本实验的目的基因。其序列长度为 1 724 bp。通过 www.genscript.com 靶点设计程序挑选 3 条靶序列，分别是 Hpa/RNAi-1：GGCTATCTCTTCTGTTCAA；Hpa/RNAi-2：TCCTGTCCGTCACCATTGA；Hpa/RNAi-3：CTCAGTTGCTCCTGGACTA 及阴性对照链 Hpa/RNAi-N：CTACCGTTGTATAGGTGT。通过目的序列构建 dsDNA，在其 5′端加上 *Bam*H Ⅰ酶切位点，3′端加上终止密码子，并在其互补链 5′端加上 *Hind* Ⅲ酶切位点。以 Hpa/RNAi-1 为例，具体见图 1。其余各链均同此方法。

1.2.2 质粒扩增、载体构建及鉴定 取 2 μl 质粒 pGenesil-1 转化至感受态 DH5α 大肠杆菌中，隔夜后从平板上挑取克隆进行扩增，抽提，*Bam*H Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切，电泳，胶回收后把合成的 4 条 dsDNA 分别连入质粒 pGenesil-1。并再次分别进行扩增，抽提且依次命名为 pGenesil-Hpa/RNAi-1、pGenesil-Hpa/RNAi-2、pGenesil-Hpa/RNAi-3、pGenesil-Hpa/RNAi-N。送 TaKaRa 公司进行测序鉴定。



A：以 Hpa/RNAi-1 为基础构建的 dsDNA；B：在细胞内形成发夹 RNA 结构；C：Dicer 酶切后形成小干扰 RNA 片段

图 1 Hpa/RNAi-1 的 dsDNA 设计及作用原理

1.2.3 细胞培养、稳定转染、克隆筛选及扩大培养 用高糖 DMEM +5% 胎牛血清培养 HepG2 细胞。采用 DOTAP 脂质体法将上述 4 种表达载体，即 pGenesil-Hpa/RNAi-1、pGenesil-Hpa/RNAi-2、pGenesil-Hpa/RNAi-3、pGenesil-Hpa/RNAi-N 分别转染至 HepG2 肝癌细胞，转染 12 h 后更换无血清培养基为含血清培养基，48 h 后荧光倒置显微镜下观察，拍照。G418 抗性筛选，浓度为 300 μg/ml，3 周后可见阳性克隆形成。倒置荧光显微镜下观察，拍照。挑取阳性克隆，分别命名为 HepG2/pGenesil-Hpa/RNAi-1、HepG2/pGenesil-Hpa/RNAi-2、HepG2/pGenesil-Hpa/RNAi-3、HepG2/pGenesil-Hpa/RNAi-N。

1.2.4 Western blot 检测 按文献[6]进行。在 100 ml 培养瓶中培养未转染 HepG2 细胞和分别转染 pGenesil-Hpa/RNAi-1、pGenesil-Hpa/RNAi-2、pGenesil-Hpa/RNAi-3、pGenesil-Hpa/RNAi-N 并经抗性筛选后的 HepG2 细胞。待细胞汇合率达到 80% ~90% 时，用蛋白提取液分别处理各组细胞，收集总蛋白；BCA 法定量后 SDS-PAGE 电转膜；免疫抗体反应；最后化学增强发光法（ECL）显带；以 GAPDH 为内参照。

1.2.5 RT-PCR 检测所筛选克隆 mRNA 的表达 用 RT-PCR 检测所筛选出有效干扰序列对 HepG2 细胞在 mRNA 水平的抑制作用。在 100 ml 培养瓶中培养未转染 HepG2 细胞和分别转染 pGenesil-Hpa/RNAi-1、pGenesil-Hpa/RNAi-3、pGenesil-Hpa/RNAi-N 的 HepG2 细胞。待细胞汇合率达到 80% 时，用 TRIzol 提取各组细胞总 RNA；逆转录得到 cDNA；以 β-actin 为内参，PCR 扩增；电泳检测。其中 Hpa 上游引物为：5′-GAATGGCCCTACCAGGAGCA-3′，下游为：5′-AACGCATTTAGGCCAAAGATCAAG-3′，产物大小为 146 bp；β-actin 上游引物为：5′-GTTGCGTTACACCCTTTCTTGACA-3′，下游为：5′-GCACGAAGGCTCATCATTCAAAA-3′，产物大小为 346 bp。

2　结果

2.1　测序结果

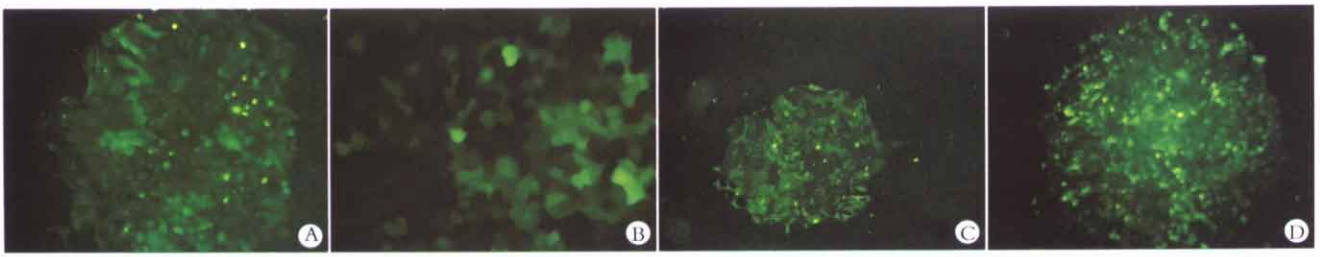
3 条干扰序列及阴性对照序列克隆至 pGenesil-1 表达质粒后进行测序，测序结果经比对后，证实插入基因片段与各设计序列完全匹配，说明本研究所构建的 RNA 干扰载体序列完全正确，可以用于下一步实验。

2.2　稳定转染及克隆筛选

HepG2 细胞稳定转染后 48 h 后于倒置荧光显微镜下观察荧光表达情况，结果各组细胞中均有绿色荧光表达，转染效率大约 20% ~30%。稳定转染后的 HepG2 细胞经 G418 抗性筛选 3 周后得到阳性克隆，荧光倒置显微镜下可见大量的绿色荧光蛋白表达（图 2），分别命名为 HepG2/Hpa-RNAi-1、HepG2/Hpa-RNAi-2、HepG2/Hpa-RNAi-3、HepG2/Hpa-RNAi-N。在严格无菌条件下各挑选 2 个克隆，最终 HepG2/Hpa-RNAi-1 和 HepG2/Hpa-RNAi-3 均有 1 个克隆扩大培养失败，其余均扩大培养成功。

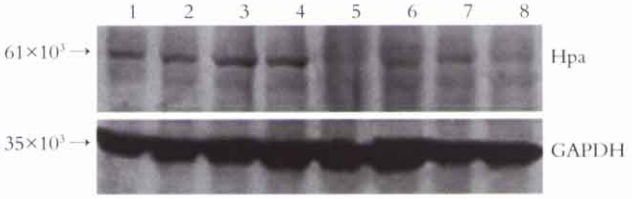
2.3　Western blot 检测结果

同时对未转染的 HepG2 细胞和分别转染 pGenesil-Hpa/RNAi-1、pGenesil-Hpa/RNAi-2、pGenesil-Hpa/RNAi-3、pGenesil-Hpa/RNAi-N 的 HepG2 细胞中 Hpa 蛋白表达进行检测，结果显示，相比未转染组和阴性对照组细胞，3 个干扰序列组细胞的 Hpa 蛋白表达量均有不同程度的下调，而阴性对照和未转染组的 Hpa 蛋白表达无明显差别（图 3）。进一步利用 Quantity One 软件对 Western blot 检测图进行分析，结果表明 Hpa/RNAi-1 的抑制率为 57%，Hpa/RNAi-2 的抑制率大约为 43%，Hpa/RNAi-3 的抑制率为 71%。所以我们选择 Hpa/RNAi-1、Hpa/RNAi-3 为有效干扰序列。



A：HepG2/Hpa-RNAi-1；B：HepG2/Hpa-RNAi-2；C：HepG2/Hpa-RNAi-3；D：HepG2/Hpa-RNAi-N

图 2　G418 抗性筛选 3 周后阳性克隆的荧光检测　（倒置荧光显微镜 ×100）

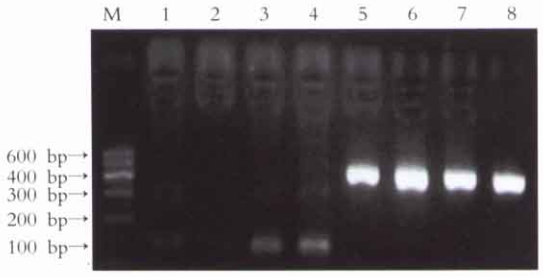


1，2：HepG2；3，4：HepG2/Hpa-RNAi-N；5：HepG2/Hpa-RNAi-1；6，7：HepG2/Hpa-RNAi-2；8：HepG2/Hpa-RNAi-3

图 3　Western blot 检测 HepG2 干扰及未干扰细胞肝素酶蛋白的表达

2.4　RT-PCR 检测结果

采用 RT-PCR 技术检测 Hpa/RNAi-1、Hpa/RNAi-3 干扰序列对 HepG2 肝癌细胞肝素酶 mRNA 的抑制作用，从图 4 可以看出 Hpa/RNAi-1、Hpa/RNAi-3 两条干扰序列可以明显抑制 HepG2 肝癌细胞肝素酶 mRNA 的表达。



M：DNA 标准；1：HepG2/Hpa-RNAi-1 肝素酶；2：HepG2/Hpa-RNAi-3 肝素酶；3：HepG2/Hpa-RNAi-N 肝素酶；4：未转染 HepG2 细胞肝素酶；5：HepG2/Hpa-RNAi-1β-actin；6：HepG2/Hpa-RNAi-3β-actin；7：HepG2/Hpa-RNAi-Nβ-actin；8：未转染 HepG2 细胞 β-actin

图 4　RT-PCR 扩增产物电泳图

3　讨论

Hpa 基因定位于 4 号染色体 q21.3 位置，其 cDNA 长度为 1 629 bp，开放阅读框编码 543 个氨基酸，相对分子质量为 61.2×10^3[7-9]。Hpa mRNA 在脾脏、淋巴结、胸腺、外周血白细胞、骨髓及胎肝等免疫组织中均可检测到，而在除胎盘以外的成熟非免疫组织（如心脏、骨骼肌及胰腺等）均不表达，但在转移性的恶性肿瘤细胞中普遍存在，包括肝细胞癌、膀胱癌、大肠癌、胃癌等。所有这些研究意味着人肝素酶在肿瘤的发生、发展、转移及康复中有着极其重要的作用[2,3]。由于肝素酶在恶性肿瘤中的广泛表达的特性，人们一直在利用各种方法寻找其抑制剂[4,10,11]。

近年来，随着 RNAi 技术的不断成熟进步，特别是 RNAi 在哺乳动物中得到应用后，其在构建基因敲减动物模型和研究遗传疾病中的作用越来越突出。我们可以按拟定的方式来关闭非必需或致病基因的功能。最近有学者通过 RNAi 诱导基因沉默的方法检测肝素酶在乳腺癌的表达水平[12]，发现此方法对乳腺癌的肝素酶蛋白的表达有明显的抑制作用。本实验通过生物信息学技术，设计并构建了 3 个不同于他人的 shRNA 载体，并采用 Western blot 技术来研究基因敲减后肝素酶在干扰及未干扰的 HepG2 肝癌细胞中的表达，结果表明经过 RNA 干扰后，肝癌 HepG2 细胞中的 Hpa 蛋白

均有不同程度的下调,这表明RNA干扰对肝癌HepG2细胞的肝素酶的具有显著的抑制作用。我们同时亦发现1号和3号链效果优于2号链,表明在进行RANi实验时,精确的靶点选择对干扰效果有着直接的影响。这些结果为我们将来进一步研究肝素酶RNA干扰对肝癌HepG2细胞的生物学行为的影响及其侵袭能力的改变等奠定了基础,也为将来利用RNA干扰技术研究其他肿瘤提供了参考依据。

参考文献:

[1] Eccles S A. Heparanase: breaking down barriers in tumors[J]. Nat Med, 1999, 5(7): 735-736.

[2] 杨仕明,汤旭东,陈 婷,等. 肝素酶:一种新的广谱的肿瘤转移相关抗原在中晚期肿瘤免疫治疗中的作用研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(8): 849-854.

[3] 陈 陵, 杨仕明, 房殿春, 等. 肝素酶: 抗肿瘤转移的新靶点[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12 (2): 439-442.

[4] Chen P J, Lee P H, Lin D Y, *et al*. Novel heapranase inhibitor PI-88 extends disease free survival in a randomized phase II adjuvant clinical trial in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) after curative resection[J]. J Hepatology, 2007, 46(Suppl 1): S293.

[5] Arenz C, Schepers U. RNA interference: from an ancient mechanism to a state of the art therapeutic application? [J]. Naturwissenschaften, 2003, 90(8): 345-359.

[6] Chen L, Liang G P, Tang X D, *et al*. *In vitro* anti-tumor immune response induced by dendritic cells transfected with hTERT recombinant adenovirus[J]. Biochem Biophy Res Commun, 2006, 351(4): 927-934.

[7] Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, *et al*. Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis[J]. Nat Med , 1999, 5(7): 793-802.

[8] Hulett M D, Freeman C, Hamdorf B J, *et al*. Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis[J]. Nat Med, 1999, 5(7): 803-809.

[9] McKenzie E, Tyson K, Stamps A, *et al*. Cloning and expression profiling of Hpa2, a novel mammalian heparanase family member[J]. Biochem Biophys Res Commum, 2000, 276(3): 1170-1177.

[10] Cai Y G, Fang D C, Chen L, *et al*. Dendritic cells reconstituted with a human heparanse gene induce potent cytotic T-cell response against gastric tumor cells *in vitro*[J]. Tumor Biol, 2007, 28(4): 238-246.

[11] Uno F, Fujiwara T, Takata Y, *et al*. Antisense-mediated suppression of human heparanase gene expression inhibits pleural dissemination of human cancer cells[J]. Cancer Res, 2001, 61(21): 7855-7860.

[12] Zhang Z H, Chen Y, Zhao H J, *et al*. Silencing of heparanase by siRNA inhibits tumor metastasis and angiogenesis of human breast cancer *in vitro* and *in vivo*[J]. Cancer Biol Ther, 2007, 6(4): 587-595.

(编辑 王小寒)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2007)20-1932-01

幼女卵巢畸胎瘤蒂扭转1例

程 湘,谢荣凯,陈正琼 (第三军医大学新桥医院妇产科,重庆 400037)

患儿,女,8岁,因腹痛15 d入院。15 d前无明显诱因出现下腹疼痛,无恶心呕吐,口服"驱虫药"3 d,腹痛消失3 d,未特殊处理。3 d前腹痛加重,伴发热和肛门坠胀,仍无恶心、呕吐、腹泻和便秘,夜间睡眠差,食欲减退。查体:发育正常,精神稍差,神清合作,生命体征平稳,心肺无异常。下腹正中可扪及一包块,约12 cm×10 cm,边界不清,不活动,压痛明显。超声波检查:盆腔可见幼儿子宫,前方见一异常回声区,大小约10 cm×10 cm,包膜完整,大部分为无回声,伴有多个隔膜回声,边缘可见少部分类实性回声。提示:盆腔多房性囊性包块。行剖腹探查术,见右侧附件增大约12 cm×10 cm,表面发黑,蒂部扭转540°,行右侧附件切除术。病理报告:卵巢成熟型囊性畸胎瘤(右侧)。

讨论

成熟型畸胎瘤是卵巢肿瘤中较常见的良性肿瘤[1]。由于肿瘤含有部分实性成分,当肿瘤体积达5~10 cm时容易发生蒂扭转。本病可发生于任何年龄,20~40岁居多,也可见于女婴[2,3]。成年女性患者常见发生蒂扭转,而幼女发生蒂扭转者罕见。本例患儿年龄较小、瘤体位置在卵巢,活动度大,其体积大小又容易发生蒂扭转,引起腹痛,当扭转后发生部分自行回复时,疼痛可有一定程度的缓解。治疗需要及时切除已坏死的附件组织,避免引起严重并发症。

关键词:卵巢畸胎瘤;幼女

中图法分类号:R737.31 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] 刘雪翔, 谷兴军. 腹腔镜手术切除卵巢成熟畸胎瘤43例体会[J]. 实用临床医药杂志, 2005, 9(7): 56-57.

[2] 雷光萍. 幼儿卵巢畸胎瘤1例[J]. 四川医学, 2004, 25(7): 761.

[3] 蒋 静. 幼儿腹膜后巨大畸胎瘤1例[J]. 川北医学院学报, 2004, 19(3): 195.

(编辑 陈聪连)

作者简介:程 湘(1963-),女,重庆市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事女性内分泌与妇科肿瘤方面的研究,发表论文20篇。电话:(023)68774542

收稿日期:2007-01-12;修回日期:2007-03-20