文章编号:1000-5404(2007)23-2215-04

论著

抑制 FoxO1 基因表达的 siRNA 重组腺病毒载体的构建及功能鉴定

卢忠燕[1],甘立霞[1],王 哲[1],何凤田[1],邹全明[2],曹廷兵[3] (第三军医大学:[1]基础医学部生物化学与分子生物学教研室,[2]医学检验系临床微生物学及免疫学教研室,重庆 400038,[3]大坪医院野战外科研究所内分泌科,重庆市高血压病研究所,重庆 400042)

提 要:目的 构建针对转录因子 FoxO1 的 siRNA 腺病毒载体,并鉴定重组腺病毒在人肝癌细胞系 HepG2 中对内源性 FoxO1 基因表达的影响。**方法** 设计并合成针对 FoxO1 的 siRNA 的靶 DNA 序列,克隆于穿梭载体 pAdTrack-CMV 中,与腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1 在 BJ5183 细菌中进行同源重组,转染 293 细胞,包装得到含 si-FoxO1 的重组腺病毒,体外转染人肝癌细胞系 HepG2,Western blot 检测 FoxO1 蛋白表达水平的变化。**结果** 成功构建针对 FoxO1 的 siRNA 重组腺病毒载体,该重组腺病毒能显著抑制 HepG2 细胞中 FoxO1 蛋白的表达($P<0.01$)。**结论** 成功构建了针对 FoxO1 的 siRNA 重组腺病毒载体,能有效抑制 HepG2 细胞中 FoxO1 的表达。

关键词:FoxO1;siRNA;腺病毒载体;HepG2 细胞
中图法分类号:R394-33;R394.2;R735.7 **文献标识码**:A

Recombinant adenovirus vector construction of siRNA targeting FoxO1 and its functional characterization

LU Zhong-yan[1], GAN Li-xia[1], WANG Zhe[1], HE Feng-tian[1], ZOU Quan-ming[2], CAO Ting-bing[3] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, [2]Department of Clinical Microbiology, College of Medical Laboratory, Chongqing 400038, [3]Institute of Hypertension Research, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To construct an adenovirus vector that expresses small interfering RNA (siRNA) against FoxO1 to shutdown its gene expression. **Methods** The FoxO1 template DNA sequence was designed by using online tools. Then the sense and antisense siRNA oligonucleotide templates were chemically synthesized, annealed and cloned into adenoviral shuttle vector pAdTrack-CMV. The recombinant adenovirus vector pAd-si-FoxO1 was obtained by homologous recombination with pAdTrack-CMV and pAdeasy-1 in bacteria BJ5183. The recombined adenovirus was produced in 293 cells and subsequently infected HepG2 cells. The FoxO1 protein levels were detected by Western blot. **Results** The adenovirus vector expressing small interfering RNA for FoxO1 gene could specifically shutdown the endogenous FoxO1 protein in HepG2 cells. **Conclusion** The pAd-si-FoxO1 can effectively downregulate FoxO1 expression in HepG2 cell line.

Key words: FoxO1; siRNA; adenoviral vector; HepG2 cell line

FoxO1 蛋白(又名 FKHR)作为 FoxO 亚家族中的一员,与血糖调节密切相关,表达于多种参与糖代谢的重要组织器官,如肝脏、肌肉、脂肪和胰腺[1,2]。近年来研究揭示 FoxO1 蛋白刺激糖异生关键酶升高血糖,诱导细胞周期抑制蛋白阻断周期运行,刺激促凋亡基因表达引起细胞死亡,在糖尿病的发生及肿瘤的发展中起重要作用[2]。在培养的肝细胞中 FoxO1 蛋白可刺激糖异生途径的关键酶磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)和葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-P)的表达。在 FoxO1 转基因小鼠的肝组织中,PEPCK、G-6-P 及胰岛素样生长因子结合蛋白-1(IGFBP-1)的表达增强,出生后6个月其葡萄糖耐量测试(GTT)和胰岛素耐量测试(ITT)值均显著高于正常对照组,出现糖尿病症状[3-5]。但是,杂合子 FoxO1 基因敲除则能恢复胰岛素的敏感性,使糖尿病小鼠的症状得到改善。这表明了 FoxO1 基因在维持血糖稳定中的重要作用,提示该基因的变异可能导致糖尿病的遗传易感性,干预 FoxO1 基因表达水平可能成为治疗糖尿病的潜在靶点[2]。以腺病

基金项目:国家自然科学基金(30570888,30670998);全军医学科研"十一五"计划国际合作课题(06H025)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570888, 30670998) and the Key Medical Research Project of the "Eleventh-Five Plan" of PLA (06H025)

作者简介:卢忠燕(1975-),女,四川省泸县人,博士研究生,讲师,主要从事糖代谢的调控机制方面的研究。电话:(023)68752947,E-mail:luzhongy@mail.tmmu.com.cn
通讯作者:甘立霞,E-mail:lixia.gan@mail.tmmu.com.cn
邹全明,E-mail:clinimmu@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2007-03-06;**修回日期**:2007-06-05

毒为工具,应用干扰 RNA 技术可以特异、有效的抑制细胞内靶基因的表达。本实验用小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA)技术,构建了针对 FoxO1 siRNA 腺病毒载体,并在人肝癌细胞系 HepG2 中观察其对 FoxO1 基因表达的影响,为进一步研究 FoxO1 基因的功能及其下游调节基因提供了实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1、穿梭载体 pAdTrack-CMV、大肠杆菌 BJ5183 细菌由第三军医大学大坪医院野战外科研究所高血压内分泌科曹廷兵医师惠赠。293 细胞、HepG2 细胞、大肠杆菌 DH5α 由本教研室保存。胎牛血清为天津 TBD 生物有限公司产品,DMEM 系 Gibco 产品; *Sal* Ⅰ、*Xba* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ、T_4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品;*Pme* Ⅰ和 *Pac* Ⅰ为 New England Labs 公司产品;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒均为 OMEGA 公司产品;Lipofectamine 2000 为 Invitrogen 公司产品;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体为 Pierce 产品,兔抗人 FoxO1 抗体为 Santa Cruz 公司产品,辣根过氧化物酶标记的 GADPH 抗体为博士德公司产品;化学发光试剂为 Pierce 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 人 FoxO1 基因特异性 siRNA 位点的选择及合成 采用 Ambion 生物技术公司提供的互联网 siRNA 辅助设计程序选择针对人 FoxO1 基因特异性的 siRNA 位点。依据下列规则合成针对 siRNA 的靶序列:5′-TCGA(*Sal* Ⅰ酶切位点)+正义-siRNA+GAGTACTG(环状结构含 *Sca* Ⅰ酶切位点)+反义-siRNA+TTTTT-3′;5′-CTAG(*Xba* Ⅰ酶切位点)+AAAAA+正义-siRNA+CAGTACTC+反义-siRNA-3′。由上海生工合成其靶 DNA 序列,正义链:5′-TCGAGGATAAGGGCGACAGCAACGAGTACTGGTTGCTGTCGCCCTTATCCTTTTT-3′;反义链:5′-CTAGAAAAAGGATAAGGGCGACAGCAACCAGTACTCGTTGCTGTCGCCCTTATCC-3′。设计 1 对不针对任何基因的无关序列作为阴性对照(NC):正义链:5′-TCGAGCACATTTCAAACGTAGTAGAAGAGTACTGCTACTACGTTTGAAATGTGTTTTT-3′;反义链:5′-CTAGAAAAACACATTTCAAACGTAGTAGCAGTACTCTTCTACTACGTTTGAAATGTGC-3′。

1.2.2 重组腺病毒载体的构建 将设计的单链引物退火形成双链,再将其与 *Sal* Ⅰ、*Xba* Ⅰ酶切的 pAdTrack-CMV 回收片段连接,pAdTrack-si-FoxO1 连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5α,培养克隆,提取质粒,*Sca* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ酶切鉴定。阳性克隆的质粒 *Pme* Ⅰ酶切回收后转化带骨架质粒 pAdeasy-1 的感受态大肠杆菌 BJ5183 细菌,铺板后 37 ℃培养过夜,挑取 8~10 个中等大小的菌落,小提质粒,电泳,选取相对分子质量大于 pAdeasy-1 的质粒用 *Pac* Ⅰ酶切鉴定。

1.2.3 重组腺病毒载体的包装、扩增及滴度测定 取 4 μg pAd-si-FoxO1 质粒,*Pac* Ⅰ酶切后回收,用 Lipofectamine 2000 转染 293 细胞,24 h 后倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达。培养细胞 10~15 d 后细胞脱落 80%,收集细胞。-80 ℃/室温反复冻溶 3~4 次,收集病毒上清。病毒上清重复感染 293 细胞,扩增病毒。将收集到的病毒用 GFP 阳性细胞计数法进行滴度测定[6]:96 孔细胞培养板中接种 293 细胞 1×10^4/孔,培养 24 h,按梯度加入稀释病毒液,18 h 后在荧光倒置显微镜下观察绿色荧光细胞的数量,以荧光消失孔(前 1 孔阳性细胞数≥5)或荧光消失的前 1 孔(前 1 孔阳性细胞数<5)为计量孔(1 U),病毒滴度=(1 U×计量孔相对于第 1 孔的稀释倍数)/第 1 孔加入病毒的体积,得出滴度=$5^n\times10$ U/ml。

1.2.4 HepG2 细胞的转染 取病毒上清,按 MOI 为 50 感染 HepG2 细胞,荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达,48 h 后,提取细胞总蛋白。SDS-PAGE 电泳:用 PVDF 膜 250 mA 湿转 2 h,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,一抗(FoxO1 1∶500、GADPH 1∶2 500)孵育过夜,TBST(0.05 mol/L Tris,0.15 mol/L NaCl,0.1% 吐温-20,pH 7.6)洗膜 3 次,每次 15 min,二抗(1∶2 000)室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 15 min。化学发光系统显色、曝光、显影、定影后晾干保存。用凝胶成像系统 Guantity One 定量分析。

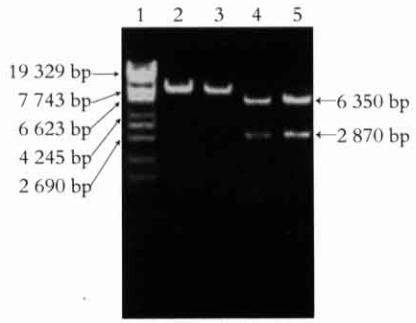
1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 Prism 作图分析软件,组间比较用 t 检验。

2 结果

2.1 重组腺病毒载体的构建及鉴定

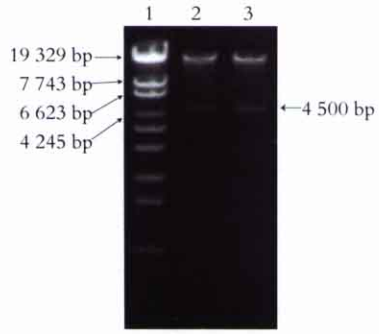
带 FoxO1-siRNA 和阴性对照的腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV 重组成功,pAdTrack-CMV 上无 *Sca* Ⅰ酶切位点,而外源片段带有 1 个 *Sca* Ⅰ酶切位点,pAdTrack-si-FoxO1、pAdTrack-si-NC 载体 *Sca* Ⅰ/*Eco*R Ⅰ双酶切鉴定,产生 2 870 bp 和 6 350 bp 两片段;pAdTrack-CMV 载体 *Sca* Ⅰ/*Eco*R Ⅰ双酶切只能线性化(图 1)。



1:标准;2:pAdTrack-NC;3:pAdTrack-FoxO1-siRNA;4:pAdTrack-NC/*Sal* Ⅰ *Eco*R Ⅰ酶切鉴定;5:pAdTrack-FoxO1-siRNA/*Sal* Ⅰ *Eco*R Ⅰ酶切鉴定

图 1 pAdTrack-FoxO1-siRNA、pAdTrack-NC 酶切鉴定

因 pAdTrack-CMV 载体多克隆位点前后均为重复序列,故不能直接测序。本实验将 pAdTrack 用 *Eco*R Ⅰ/*Eco*R Ⅴ双酶切后,回收 2 900 bp 小片段,反向测序。测序引物为:5′-TTATGGGACTTTCCTACTTG-3′(反向互补链)。pAdTrack-si-FoxO1、pAdTrack-si-NC 测序鉴定结果正确。将正确克隆的 pAdTrack-si-FoxO1、pAdTrack-si-NC 转化带骨架质粒 pAdeasy-1 的感受态大肠杆菌 BJ5183 细菌,*Pac*Ⅰ酶切鉴定,阳性重组腺病毒质粒出现 1 条大于 2 300 bp 的大片段和 1 条 4 500 bp 的小片段(图 2)。



1：标准；2：pAdeasy-NC/*Pac* Ⅰ酶切鉴定；3：pAdeasy-FoxO1-siRNA/*Pac* Ⅰ酶切鉴定

图 2　重组腺病毒载体质粒 pAdeasy 的酶切鉴定

2.2　重组腺病毒载体的产生及滴度测定

用 pAdeasy-si-NC、pAdeasy-si-FOXO1 转染包装细胞 293 细胞，24 h 后倒置荧光显微镜下可观察到绿色荧光蛋白的表达，培养细胞 10～15 d 后可观察到 90% 以上细胞表达绿色荧光蛋白（图 3）。收集、重复感染 293 细胞扩增病毒后，用 GFP 阳性细胞计数法进行滴度测定，病毒滴度均为 5×10^{12} U/ml。

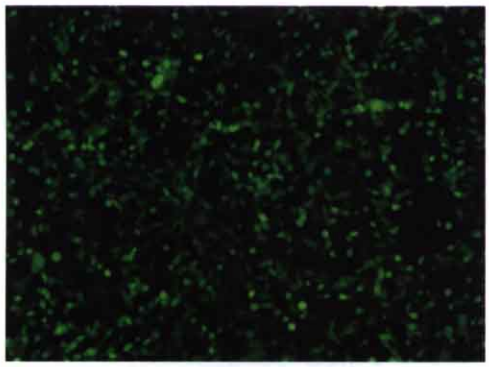


图 3　293 细胞包装重组腺病毒载体的绿色荧光蛋白的表达
（倒置荧光显微镜×100）

2.3　在 HepG2 细胞中评价重组腺病毒载体的活性

取 pAdeasy-si-NC、pAdeasy-si-FoxO1 病毒上清，按 MOI（病毒数/细胞数）为 50 感染 HepG2 细胞，24 h 后可观察到细胞变形，倒置荧光显微镜下可观察到绿色荧光蛋白的表达（图 4）。Western blot 分析 pAdeasy-si-FoxO1 抑制 FoxO1 的表达，结果见图 5。FoxO1 相对蛋白含量/GADPH 相对蛋白含量分析表明，FoxO1-siRNA 组较 NC 组有非常显著差异（$P<0.01$）。经统计学分析 FoxO1-siRNA 的抑制效果达 65%。

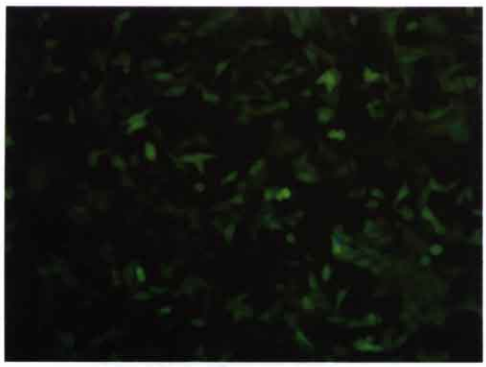
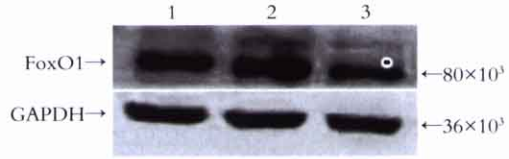


图 4　重组腺病毒载体感染 HepG2 的绿色荧光蛋白的表达
（倒置荧光显微镜×200）



1：HepG2；2：si-NC；3：si-FoxO1

图 5　HepG2 细胞转染 siRNA 重组腺病毒载体、NC 腺病毒载体的 Western blot 结果

3　讨论

RNAi 是一种高效、特异的阻断体内特定基因表达的重要手段，能促使 mRNA 降解，诱使细胞表现出特定基因缺失的表型。由外源导入的双链 RNA 进入细胞后，能被 RnaseⅢ家族中的 1 个称为 Dicer 的酶特异识别，以一种 ATP 依赖的方式逐步切割降解为 19～21 bp 的双链 RNA（siRNA），每个片段的 3′端都有 2 个碱基突出。siRNA 双链结合 1 个核酶复合物从而形成 RNA 诱导的沉默复合物（RNA-induced silencing complex，RISC）。激活的 RISC 通过碱基配对定位到同源 mRNA 转录本上，并在距离 siRNA 3′端 12 个碱基的位置切割 mRNA[7,8]。RNAi 自发现以来，已广泛应用于基因功能、肿瘤和病毒性疾病治疗等的研究。作为 RNAi 的关键效应分子，siRNA 获取的主要方法包括化学合成、体外转录、RNase Ⅲ降解 dsRNA、构建 siRNA 表达载体等。在已知特异性靶序列的前提下，构建 siRNA 表达载体具有实验周期短、费用低、经稳定转染细胞后能产生持久抑制效应等优点，实用于长期研究基因的功能[9]。

用于真核表达的载体有逆转录病毒载体、腺病毒载体、单纯泡状病毒等，其中以逆转录病毒载体和腺病毒载体最常用。腺病毒载体作为外源 DNA 导入真核细胞的工具，具有以下优点：宿主范围广，包装容量大，对人致病性低；在增殖和非增殖细胞中感染和表达基因；能有效进行增殖，滴度高；与人类基因同源；无需辅助病毒，可容纳 8 kb 外源 DNA；不整合到染色体中，无插入致突变性，安全性好；能在悬浮培养液中扩增；能同时表达多个基因等[10]。本实验中选取了复制缺陷型腺病毒 AdEasy 系统中穿梭质粒 pAdTrack-CMV 和骨架质粒 pAdeasy-1。pAdTrack 带有 CMV 启动子，并含有表达绿色荧光蛋白的基因，可以方便的观察转染效果；骨架质粒 pAdeasy-1 缺失了腺病毒复制所必需的 E1 区基因。而 293 细胞是转化了 E1 区基因的包装细胞，可以提供腺病毒缺失的基因编码产物，这决定了复制缺陷型腺病毒在靶细胞中只有 1 次感染机会而无复制能力，避免腺病毒对靶细胞的损害。

本实验中，设计并构建了靶向 FoxO1 的 siRNA 真核表达载体，其转录产物可在细胞内形成 1 个具有反向重复序列的茎环结构的发夹样 RNA（shRNA），此

shRNA 随后被加工成 siRNA，降解 FoxO1 mRNA，从而阻断 FoxO1 基因表达的目的。进行 RNAi 研究，目的基因靶序列的选择至关重要，针对不同的靶序列，干扰的效果可能相差甚远。本实验成功构建了带有 FoxO1 siRNA 的重组腺病毒 FoxO1-siRNA，转染 HepG2 细胞后明显抑制 FoxO1 的蛋白表达水平，降低了 FoxO1 蛋白的表达后对肝脏葡萄糖输出的影响，我们将在体内实验中进一步确认。

参考文献：

[1] Barthel A, Schmoll D, Unterman T G. FoxO proteins in insulin action and metabolism[J]. Trends Endocrinol Metab, 2005, 16(4): 183 - 189.

[2] 甘立霞. FoxO 转录因子在代谢调节及肿瘤抑制中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(12): 1347 - 1350.

[3] Kamei Y, Mizukami J, Miura S, *et al*. A forkhead transcription factor FKHR up-regulates lipoprotein lipase expression in skeletal muscle [J]. FEBS Lett, 2003, 536(1 - 3): 232 - 236.

[4] Nakae J, Kitamura T, Silver D L, *et al*. The forkhead transcription factor FoxO1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression[J]. J Clin Invest, 2001, 108(9): 1359 - 1367.

[5] Zhao X, Gan L, Pan H, *et al*. Multiple elements regulate nuclear/cytoplasmic shuttling of FOXO1: characterization of phosphorylation- and 14-3-3-dependent and -independent mechanisms [J]. Biochem J, 2004, 378(Pt 3): 839 - 849.

[6] 江千里，王健民，温丽敏，等. 批量快速测定法测定标志基因为 GFP 的重组病毒滴度[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(9): 1034 - 1035.

[7] Hammond S M, Caudy A A, Hannon G J. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA[J]. Nature Rev Gen, 2001, 2(2): 110 - 119.

[8] Duxbury M S, Whang E E. RNA interference: a practical approach [J]. J Sueg Res, 2004, 117(2): 339 - 344.

[9] 管海涛，薛兴欢，王西京，等. 靶向 survivin 的 siRNA 抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖并诱导其凋亡[J]. 中华肿瘤杂志, 2006, 28(5): 326 - 330.

[10] 汤正好，马会慧，臧国庆，等. 抗 HBc-ScFv 基因复制缺陷型腺病毒载体的构建及其体外表达[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(6): 734 - 738.

（编辑 王小寒）

（上接 2211 页）

前后的注意事项，并介绍腔镜辅助手术的安全性、美容效果以减轻患者的不良情绪。

2.1.2 常规检查及术前饮食护理 手术前明确肿瘤的性质，完善心、肝、肾、肺等重要器官的检查[改善患者的营养状况，进食高热量、高蛋白、高维生素、易消化的饮食，提高机体的抵抗力，以达到手术的耐受性。

2.1.3 皮肤护理 按要求做好术区的皮肤准备，备皮时仔细操作，避免割伤皮肤，保持皮肤的完整性。协助医师做好手术区的标记。

2.2 术后护理

2.2.1 体位 术后采取去枕平卧，保持呼吸道通畅，防止呕吐物误吸而引起窒息。平卧 6 h 后改为半卧位，以利于呼吸和引流。术后抬高患侧肢体，在患肢垫一软枕或特制的功能垫，使患肢平行于胸部。

2.2.2 生命体征的观察 术后持续低流量吸氧、心电监测，观察脉搏、呼吸、血压，监测 24 h。如出现血压下降、心率增快应观察有无活动性出血。

2.2.3 饮食 术后 6 h 无恶心、呕吐等麻醉反应，即可进食半流质饮食，逐步恢复至普通饮食。保证足够的热量和维生素，增加营养，利于术后康复。

2.2.4 伤口护理 胸部伤口用无菌棉垫覆盖，并用绷带适度加压包扎，建立皮瓣与胸廓的血运关系，使皮瓣存活，减少皮下积液。密切观察伤口敷料有无渗血渗液。如绷带有滑动松脱，需重新包扎，使皮瓣与胸壁紧贴，以促进愈合。伤口包扎时暴露乳头、乳晕，观察乳头、乳晕皮肤的颜色及血运情况，并嘱患者避免碰撞、压迫。如乳头部位皮肤出现发紫、肿胀，说明静脉回流障碍，应立即报告医师，进行必要的处理。因切除了乳房皮下腺体，假体植入后，由于皮肤薄、血运差，乳房易发生缺血、坏死。护理时应注意皮肤保温，避免局部受压，术后密切观察乳房皮肤有无水肿，颜色有无变化等，有异常及时处理。观察再造乳房的形态，避免假体上移、滑动，告知患者避免剧烈活动。

2.2.5 伤口引流护理 伤口引流管接负压吸引，以引流皮瓣下的渗液、积气，使皮瓣紧贴胸壁，避免坏死、感染，促进愈合。妥善固定，以免引流管扭曲、受压、脱落，经常挤压引流管，挤压时从近端向远端，两手交替进行，注意观察引流液的颜色、性质和量。一般术后第 1 天引流液为血性液体，不超过 200 ml，第 2 天逐渐减少，术后 3 ~ 5 d 引流液减少至每日 15 ml 以下时即可拔除引流管，此后如发现少量皮下积液可自行吸收，不必抽液，以免穿刺时刺破假体。

2.2.6 功能锻炼 鼓励和协助患者早期行患侧上肢的功能锻炼。如无特殊情况，术后 24 h 内开始活动手、腕部、肘部，术后 1 周做肩部运动，10 d 做手指爬墙运动，活动循序渐进，直至患肢能高举过头，自行梳理头发。

2.2.7 出院指导 注意加强营养，保持良好的心情，继续行患肢功能锻炼。术后半年内避免剧烈活动，行乳房自我检查，发现包块及时就诊，定期复查。

3 讨论

腔镜辅助下行皮下乳房切除加假体植入乳房成行术具有伤口小、美观、术后恢复快等优点，符合女性完美的追求，消除了患者生理、心理上的痛苦。手术前后的护理直接影响手术的效果和术后的并发症的发生。加强心理护理，完善常规术前准备，观察皮瓣血运情况，防止乳头、乳晕受压，持续有效的引流，加强患肢功能锻炼，防止并发症的发生，是确保腔镜辅助下行皮下乳房切除加假体植入乳房成行术成功的关键，从而可大大提高患者的生活质量和自信心。

关键词：腔镜；乳房假体置入；护理

中图法分类号：R655.8 **文献标识码**：B

参考文献：

[1] 范林军，姜 军，杨新华，等. 腔镜辅助乳房皮下切除假体植入一期乳房重建 21 例[J]. 第三军医大学学报, 2007, 19(16): 1627 - 1629.

[2] 范林军，姜 军，陈 莉，等. 内镜辅助下皮下乳房切除假体植入乳房成形术[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(13): 1385 - 1387.

（编辑 陈聪连）