论著

文章编号:1000-5404(2007)22-2148-04

p27Kip1 基因 shRNA 表达质粒的构建鉴定及功能研究

黄渝侃[1],张明昌[1],王 勇[2],张进祥[3],范可顺[1],张光红[1] (华中科技大学同济医学院附属协和医院:[1]眼科,[3]急诊科,武汉 430022;[2]武汉爱尔眼科医院,武汉 430030)

提 要:目的 构建细胞周期性激酶抑制剂 p27Kip1 的小发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)表达质粒,并观察其对牛角膜内皮细胞增殖能力的影响。**方法** 设计有发夹状结构的 3 条 p27Kip1-shRNA 对应模板 DNA 序列,并构建无关序列 HK-shRNA 作为阴性对照。转入带有增强型绿色荧光蛋白(EGFP)和启动子 U6 的 pGenSil-1 质粒,构建重组质粒 pGenSil-1/p27Kip1-1、pGenSil-1/p27Kip1-2、pGenSil-1/p27Kip1-3、pGenSil-1/HK。转化 DH5α 菌株,提取质粒行酶切及测序鉴定。以脂质体法将 4 个重组质粒分别导入牛角膜内皮细胞。转染后 48 h 以 Western blot 法检测 p27Kip1 蛋白水平及 MTT 法检测各实验组和对照组细胞增殖情况。**结果** 酶切及测序证实 4 个重组质粒均构建成功。3 个实验组 p27Kip1 蛋白水平分别下降了 66.41%、61.51%、71.32%,shRNA 可显著促进牛角膜内皮细胞增殖。**结论** 成功构建了针对 p27Kip1 的 RNA 干扰表达载体。

关键词:RNA 干扰;p27Kip1;质粒

中图法分类号:R322.91;R394-33;R394.2 **文献标识码**:A

Construction and identification of p27Kip1 shRNA expression plasmid and its functional investigation

HUANG Yu-kan[1], ZHANG Ming-chang[1], WANG Yong[2], ZHANG Jin-xiang[3], FAN Ke-shun[1], ZHANG Guang-hong[1] ([1]Department of Ophthalmology, [3]Department of Emergency, Union Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022; [2]Wuhan Ai'er Eye Hospital, Wuhan 430030, China)

Abstract: Objective To construct a plasmid expressing a short hairpin RNA (shRNA) targeting a cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI), p27Kip1, and evaluate its effect on the proliferation of bovine corneal endothelial cells (bCEC). **Methods** Three p27Kip1-shRNA template DNA sequences were designed and synthesized as experimental groups, a plasmid expressing irrelevant shRNA with a random combination was used as negative control. The products were inserted into the pGenSil-1 plasmid containing U6 promoter and EGFP. The recombinant plasmids of pGenSil-1/p27Kip1-1, pGenSil-1/p27Kip1-2, pGenSil-1/p27Kip1-3 and pGenSil-1/HK were constructed respectively. Then the recombinant plasmids were expanded in DH5α cells and identified by restriction enzyme and sequence analysis. The 4 plasmids were transfected into bCEC respectively by Lipofectamine 2000™. The level of p27Kip1 protein was detected by Western blotting and the proliferation of bCEC were detected by MTT 48 h after transfection. **Results** The 4 recombinant plasmids was confirmed to be constructed successfully. The inhibitory rates of p27Kip1 protein were 66.41%, 61.51% and 71.32% in the 3 experimental groups respectively, and the proliferation of bCEC was promoted significantly. **Conclusion** shRNA- p27Kip1 RNAi system has been constructed successfully. It facilitates the experimental study of the promotion of bCEC by the method of RNAi.

Key words: RNA interference; p27Kip1; plasmid

基金项目:国家自然科学基金(30500487);湖北省自然科学基金(2004ABA250)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30500487) and the Natural Science Foundation of Hubei Province (2004ABA250)

作者简介:黄渝侃(1975-),男,湖北省武汉市人,硕士研究生,主治医师,主要从事角膜病、白内障方面的研究。电话:13317175116,E-mail:huangyk1975@163.com

通讯作者:张明昌,电话:(027)85726766,E-mail:mingchangzhang@hotmail.com

收稿日期:2006-12-31;**修回日期**:2007-05-11

p27Kip1 是一种非特异性的细胞周期性激酶抑制剂(cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI)，其生物学功能是使细胞周期不能由 G_1 期转向 S 期而停滞于 G_1 期，从而抑制细胞增殖。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是近年迅速发展起来的一项基因阻断技术，它是利用与靶基因同源的小片段双链 RNA(siRNA)转染靶细胞，特异性诱导靶基因 mRNA 降解[1]，从而导致特异的转录后基因沉默现象。本研究以构建的真核表达质粒 pGenSil-1 为基础，针对 p27Kip1 基因设计并构建 shRNA 表达质粒，同时观察其对牛角膜内皮细胞(bovine corneal endothelial cells, bCEC)增殖能力的影响，为通过基因疗法解决角膜内皮功能障碍的研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料来源

重组 pGenSil-1(含 U6 启动子和 EGFP)质粒、大肠埃希菌 *E. coli* DH5α 由武汉晶赛生物工程技术公司提供。bCEC 为本实验室原代培养。各种限制性内切酶、T_4 DNA 连接酶、T_4 DNA 聚合酶、*Bam*H Ⅰ、*Hind*Ⅲ、*Sal* Ⅰ均为 NEB 公司产品。Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司。所有测序均由上海英骏生物公司完成。p27Kip1 一抗、二抗均购自 Santa Cruz 公司。

1.2　构建方法

1.2.1　序列的设计　　从 GenBank 中获取牛 p27Kip1 基因的 mRNA 序列(XM_590159)。应用 Ambion 公司 RNAi 设计软件设计出针对 p27Kip1 的总长度为 65 bp 的模板链 3 条。应用在线软件 BLAST 检索数据库排除其他基因的同源性序列。其顺序为 *Bam*H 酶切位点、19 nt 正义序列、9 nt loop 接头序列、19 nt 反义序列、12 nt RNA 聚合酶终止子(6 个 T)、*Hind* 酶切位点。针对基因编码区特异性插入片段序列，分别命名为 pGenSil-1/p27Kip1-1、pGenSil-1/p27Kip1-2、pGenSil-1/p27Kip1-3。其中 pGenSil-1/p27Kip1-1 正义链为 5′-ATCTTGGGTGGCTTATGAG-3′，反义链为 5′-CTCATAAGCCACCCAAGAT-3′。pGenSil-1/p27Kip1-2 正义链为 5′-ACATCACCCAGGACGAGAT-3′，反义链为 5′-ATCTCGTCCTGGGTGATGT-3′。pGenSil-1/p27Kip1-3 正义链为 5′-ACCCAGAGGACACGCATTT-3′，反义链为 5′-AAATGCGTGTCCTCTGGGT-3′。另设计随机阴性对照 pGenSil-1/HK 序列：正义链为 5′-ACTACCGTTGTTATAGGTG-3′，反义链为 5′-CACCTATAACAACGGTAGT-3′。根据 siRNA 靶位点及随机序列，人工合成两对互补的单链 DNA 片段。

1.2.2　线性化载体的获得和连接　　pGenSil-1 的多克隆位点：*Hind*Ⅲ－待插入 DNA 片段－*Bam*H Ⅰ－U6 启动子 *Eco*R Ⅰ－*Sal* Ⅰ－*Xba* Ⅰ－*Dra* Ⅲ。用 *Bam*H Ⅲ和 *Hind*Ⅲ双酶切该质粒，1%琼脂糖凝胶电泳回收大片段，即为线性化载体。各用 50 μl 退火缓冲液溶解上述合成 2OD 单链目的基因片段。各取 2 μl(即 2 μl p27Kip11-A +2 μl p27Kip11-B) +16 μl 退火缓冲液混匀。94 ℃水浴退火自然冷却至室温。各取1 μl 退火产物 +99 μl H_2O 做 100 倍稀释，用 *Bam*H Ⅰ +*Hind*Ⅲ双酶切该质粒，1%琼脂糖凝胶回收大片段。稀释退火片段分别与线性化 pGenSil-1 质粒表达的载体连接。

1.2.3　重组质粒的转化和筛选　　各取 5 μl 过夜连接产物转化感受态细胞 DH5α，分别涂布于含 $Kana^r$ 抗性(终浓度为 30 μg/ml)的 LB 平板上，37 ℃恒温箱培养过夜。从每个培养皿上各挑取 3 个单克隆菌落接种于 3 ml 含 $Kana^r$ 抗性(终浓度为 30 μg/ml)的 LB 培养液中，37 ℃恒温摇床(250 r/min)培养过夜。

1.2.4　重组质粒鉴定　　①酶切鉴定：按照小量质粒抽提试剂盒说明书抽提质粒并进行分析鉴定。分别用限制性内切酶 *Pst* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ消化鉴定，1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。质粒 pGenSil-1 是有 *Pst* Ⅰ的酶切位点，应该能够被 *Pst* Ⅰ所酶切，而插入目的基因片段之后，*Pst* Ⅰ酶切位点被取代，故不能被 *Pst* Ⅰ所酶切。在插入的目的基因片段里，我们设计了 1 个 *Sal* Ⅰ的酶切位点，插入在质粒 pGenSil-1 的 *Bam*H Ⅰ和 *Hind*Ⅲ之间，如若插入正确，就能被 *Sal* Ⅰ酶切出 1 条约 400 bp 的 DNA 小带。②测序鉴定：将酶切鉴定证实后的细菌培养液送上海英骏公司进行测序分析。

1.3　细胞培养和转染

1.3.1　细胞取材和培养　　新生小牛来自武汉市吴家山奶牛场，于宰杀后立即将牛眼取出，用无菌的浓度为 0.02% 的氧氢化汞溶液及生理盐水冲洗后，于 2 h 内用冰瓶运回，进行组织培养。bCECs 采用 Bonanno 等[2] 的方法培养。待 5 ~ 7 d 细胞融合后进行传代，传至第 3 代细胞即可用于实验研究。

1.3.2　细胞转染　　转染前 1 d 消化细胞，用无双抗含 10% 胎牛血清的培养基稀释细胞，在 96 孔板中加接种 20 个孔，每个孔加 100 μl。共 4 组，各 5 个复孔。分别设 pGenSil-1/HK、pGenSil-1/p27Kip1-1、pGenSil-1/p27Kip1-2、pGenSil-1/p27Kip1-3 组。细胞密度为 50% ~60%。孵育过夜。同法种 6 孔板。按 Lipofectamine™2000 试剂盒说明转染各组细胞。

1.4　Western blot 检测 p27Kip1 蛋白表达

转染后 48 h 提取 6 孔板内各组细胞总蛋白并以 Bradford 法检测上清液中蛋白浓度。取等量蛋白进行 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳，电泳后转移蛋白至 NC 膜上。用含 5% 脱脂奶粉封闭后，以体积比为 1∶200 的抗 p27Kip1 抗体 4 ℃孵育，NC 膜过夜。洗膜，加体积比为 1∶2 000 的 HRP 标记的二抗室温孵育 1. 5 h。ECL(PIERCE)显色。图片经光密度图像扫描仪(HP)扫描，使用 Image Quant 程序对条带进行灰度测定。

1.5　MTT 法检测 shRNA 对角膜内皮细胞增殖的影响

MTT 法参考文献[3]，细胞转染后 48 h 将 96 孔板各孔的培养液弃去，每孔加入 5 mg/ml 的四氮唑蓝溶液 20 μl，于37 ℃培养箱中继续孵育 4 h，小心吸弃培养液，每孔加入150 μl DMSO，振荡混匀后在酶联免疫测定仪上测各孔在570 nm 的吸光度值[$D(570)$]。计算增殖率：增殖率(%) =[实验孔 $D(570)$ －对照孔 $D(570)$]/对照孔 $D(570)$ ×100%。结果取平均值，重复 3 次。

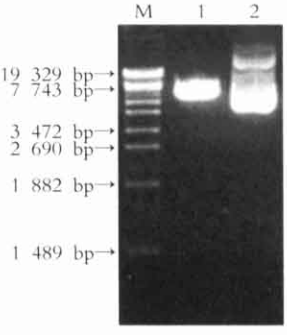
1.6　统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

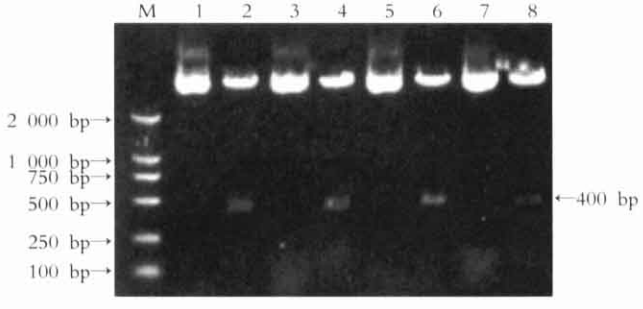
2.1 重组质粒酶切鉴定结果

经酶切鉴定分析，*Sal* Ⅰ酶切后的琼脂糖电泳图可见1条约400 bp的酶切片段。经酶切鉴定分析，质粒pGenSil-1/HK、pGenSil-1/p27Kip1-1、pGenSil-1/p27Kip1-2、pGenSil-1/p27Kip1-3均符合设计要求(图1、2)。送转化菌液测序，结果完全符合设计要求。



M：标准；1：线性化pGenSil-1质粒(用*Bam*H Ⅰ+*Hind* Ⅲ双酶切)；2：pGenSil-1质粒

图1 线性化pGenSil-1质粒电泳图



M：DNA标准(DL 2000)；1，3，5，7：分别为pGenSil-1/p27Kip1-1、pGenSil-1/p27Kip1-2、pGenSil-1/p27Kip1-3、pGenSil-1/HK质粒经*Pst* Ⅰ酶切结果；2，4，6，8：分别为pGenSil-1/p27Kip1-1、pGenSil-1/p27Kip1-2、pGenSil-1/p27Kip1-3、pGenSil-1/HK经*Sal* Ⅰ酶切产物

图2 pGenSil-p27Kip1-siRNA重组质粒酶切鉴定

2.2 细胞转染结果

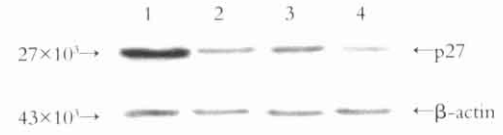
转染后24 h，在倒置荧光显微镜下观察pGenSil-1质粒同步转染的bCECs，结果显示，各组细胞均表达EGFP，表达强度未见显著性差异($P>0.05$)，转染的效率为30%～40%。

2.3 p27Kip1蛋白水平鉴定结果

与pGenSil-1/HK组相比，pGenSil-1/p27Kip1-1、pGenSil-1/p27Kip1-2、pGenSil-1/p27Kip1-3组分别使bCEC的p27Kip1蛋白水平降低了66.41%、61.51%、71.32%，各组比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。见图3。

2.4 shRNA对角膜内皮细胞增殖的影响

pGenSil-1/p27Kip1-1、pGenSil-1/p27Kip1-2、pGenSil-1/p27Kip1-3组均对角膜内皮细胞有明显的促进增殖作用，与对照组比较有明显的差异($P<0.01$)，3个实验组间比较无显著性差异($P>0.05$)。见表1。



1：pGenSil-1/HK组；2：pGenSil-1/p27Kip1-1组；3：pGenSil-1/p27Kip1-2组；4：pGenSil-1/p27Kip1-3组

图3 siRNA对bCEC p27Kip1蛋白水平的影响

表1 MTT法检测shRNA对角膜内皮细胞增殖的影响($n=15$，$x\pm s$)

组别	D(570)	增殖率(%)
pGenSil-1/HK	0.108±0.016	-
pGenSil-1/p27Kip1-1	0.213±0.021[a]	97.2
pGenSil-1/p27Kip1-2	0.229±0.033[a]	112.0
pGenSil-1/p27Kip1-3	0.208±0.017[a]	92.6

a：$P<0.01$，与pGenSil-1/HK比较

3 讨论

细胞增殖分化有赖于细胞周期活动。在细胞周期中存在一些控制点，控制着细胞周期的进展，其中G_1期到S期就是非常重要的。这些控制点控制是由细胞周期蛋白(cyclin)、细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent kinases，CDK)及其负调节亚基CKI共同完成的。CDK既能与cyclin结合促进细胞周期进程，又能与CKI结合，抑制细胞分裂。p27Kip1基因是一个调控细胞周期并抑制细胞分裂的CKI基因，p27Kip1蛋白几乎可以抑制所有的cyclin-CDK复合物的激酶活性，其中包括cyclin E-CDK，而cyclin E是G_1期的限速因子。p27Kip1一方面能抑制已结合到cyclin并被激活的CDK活性；另一方面也可以抑制CDK的激活过程，最终抑制细胞周期G_1期到S期的转变[4]。

角膜内皮细胞(corneal endothelial cells，CECs)是位于角膜后表面的一层细胞，在维持角膜的正常厚度及透明性中起关键作用。人CEC在成年后无增殖能力，且细胞密度随年龄及在各种眼部疾病的影响下不断减少。当其密度下降到某一临界值时会出现功能失代偿而最终导致失明。研究表明，CECs是处于增殖静止阶段即G_1期的细胞群，其特性包括：低增殖能力，表达G_1期相关细胞周期蛋白，停滞于S期前[5]。对CECs p27Kip1的检测表明其表达明显高于角膜其他部分组织[6,7]。细胞周期终止的成人CECs因无增殖能力而不能再生，培养的人CECs增殖能力极有限并且难以传代，故我们在体外培养bCECs的基础上，通过RNA干扰p27Kip1的方法对其细胞周期静止的调控机制进行干预并诱导其增殖。

RNAi是一种双链RNA诱导同源序列特异的mRNA降解的现象。2001年Tuschl首先成功地将RNAi

技术用于哺乳类细胞[8]。与传统反义干扰技术(如反义核苷酸)相比,RNAi有明显放大作用,其抑制作用更强。而与传统基因敲除相比,RNAi显效更快,其将具有反向重复序列的模板克隆至聚合酶Ⅲ(pol Ⅲ)转录单位中,以质粒DNA为载体转染哺乳动物细胞,利用细胞中聚合酶持续转录合成RNA,这种内部互补折叠形成的短发卡样dsRNA被酶样物质(dicer)切割形成21或23个碱基的双链,即siRNA[9]。目前已广泛应用于基因功能研究及基因治疗的研究。

本实验已经成功构建了阻断p27Kip1基因表达的RNAi序列,并克隆至pGenSil-1质粒中,通过转染至bCEC,初步证实其可降低p27Kip1表达并起到促bCEC增殖作用,为今后进一步研究p27Kip1-shRNA对角膜内皮细胞功能影响的研究奠定实验基础。

参考文献:

[1] Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al*. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans[J]. Nature, 1998, 391(6669): 806-811.
[2] Bonanno J A, Srinivas S P, Brown M. Effect of acetazolamide on intracellular pH and bicarbonate transport in bovine corneal endothelium[J]. Exp Eye Res, 1995, 60(4): 425-434.
[3] 覃跃龙, 舒茂琴, 江明宏. ORC1基因RNA干扰对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(11): 1161-1163.
[4] Kuo M Y, Hsu H Y, Kok S H, *et al*. Prognostic role of p27(Kip1) expression in oral squamous cell carcinoma in Taiwan[J]. Oral Oncol, 2002, 38(2): 172-178.
[5] Joyce N C. Proliferative capacity of the corneal endothelium[J]. Prog Retin Eye Res, 2003, 22(3): 359-389.
[6] Lee H T, Kay E P. Regulatory role of PI 3-kinase on expression of Cdk4 and p27, nuclear localization of Cdk4, and phosphorylation of p27 in corneal endothelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(4): 1521-1528.
[7] 张红旭, 张明昌. 细胞周期依赖性激酶抑制剂P27、P21在人角膜上皮的表达研究[J]. 临床眼科杂志, 2004, 12(3): 195-197.
[8] Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, *et al*. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. Nature, 2001, 411(6836): 494-498.
[9] Sui G, Soohoo C, Affiar el B, *et al*. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(8): 5515-5520.

(编辑 汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2007)22-2151-01

个案与短篇

急腹症腹腔镜探查100例诊治体会

王立明,杨 华,张朝军,陈组林,程应东,马 丹,蔡瑜娇,肖卫东,马小干,罗云生 (第三军医大学新桥医院普通外科,重庆 400037)

急腹症是普通外科的常见病和多发病,发病率约占普通外科疾病的1/4。腹腔探查是明确急腹症的重要诊断手段之一,随着腹腔镜技术的发展,运用腹腔镜行腹腔探查术将在临床应用中逐步普及。本科自2002年9月至2006年3月运用腹腔镜行腹腔探查术100例,现总结报告如下。

1 材料与方法

1.1 临床资料

本组100例中男性58例,女性42例,年龄18~74岁,平均44岁。全部患者均以急腹症入院,发病时间4~48 h,平均6.8 h。其中有腹部既往手术史11例,其余均为首次发病。

1.2 腹腔镜检查方法

常规建立气腹。根据体查发现可疑病变部位,确立观察孔和操作孔的位置,腹腔镜进腹后探查顺序与剖腹探查原则相同,首先进行全腹腔观察,根据术中所见如腹腔积液、积脓、积血或消化液外溢及纤维素附着等情况,多可发现病变来源。在外伤或未发现明确病变而行全面探查时,应先探查实质性脏器,再探查空腔脏器,肠管等空腔脏器因其游离性较大,故可在最后探查。

2 结果

2.1 诊断

100例患者均采用腹腔镜探查最终以明确诊断,其中急性阑尾炎34例(34%),消化道穿孔20例(20%),腹腔肿瘤18例(18%),腹腔粘连12例(12%),妇科疾病10例(10%)(卵巢囊肿蒂扭转4例、急性盆腔炎4例、黄体破裂1例、宫外孕破裂1例),急性肠系膜淋巴结炎2例(2%),原发性腹膜炎2例(2%),急性坏死性小肠炎1例(1%),结核性腹膜炎1例(1%)。诊断正确率达100%。

2.2 治疗结果

所有患者在入院后2 h内在全麻下行腹腔镜腹腔探查术。34例急性阑尾炎行腹腔镜阑尾切除术;20例消化道穿孔,其中

(下转2155页)

作者简介:王立明(1965-),男,湖北省武汉市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事消化道肿瘤发病机制方面的研究,发表论文30篇。电话:(023)68774405

收稿日期:2007-04-19;修回日期:2007-06-12