文章编号:1000-5404(2008)08-0763-03

技术方法

端粒酶逆转录酶启动子 hTERT/U6 嵌合启动子的 siRNA 表达载体的构建及鉴定

姜习新[1],张鹏辉[2],刘北忠[1],涂植光[1],杨 毅[1],刘靳波[1] (重庆医科大学:[1]医学检验系,临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆市市级重点实验室,重庆 400016,[2]附属儿童医院检验科,重庆 400016)

摘 要:目的 构建有 hTERT/U6 嵌合启动子的小干扰 RNA(small interfere RNA, siRNA)表达载体,并用分子生物学的技术和方法验证其对肝癌细胞 SMMC-7721 的效应。**方法** 构建 siRNA-EGFP-PTZU6+1 表达载体,将其转染到稳定表达 EGFP 的肝癌细胞株 7721(EGFP-7721),观察细胞荧光的变化及 RT-PCR,Western blot 筛选出更有效的 siRNA-EGFP-PTZU6+1 载体。PCR 扩增端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase promoter, hTERT)启动子的核心序列,构建针对 EGFP 基因的 hTERT/U6 嵌合启动子 siRNA 表达载体(EGFP-siRNA-PTZU6+1-U6/hTERT),正向和反向插入的 hTERT 启动子各 1 个,并将其转染至 EGFP-7721 细胞中,RT-PCR 验证其效应。**结果** RT-PCR,Western blot 结果表明两重组质粒 siRNA-EGFP-PTZU6+1 转染 EGFP-7721 细胞后 EGFP 基因的表达无统计学差异,但与对照组比较均显著抑制了 EGFP 基因($P<0.01$)。而且,RT-PCR 结果显示,反向插入的重组质粒 EGFP-siRNA-PTZU6+1-U6/hTERT 与对照组相比显著抑制了 EGFP 基因的表达($P<0.05$)。**结论** 构建的含 hTERT/U6 嵌合启动子的 siRNA 表达载体在肝癌细胞中具有功能活性,为探讨基因的靶向治疗奠定了基础。

端粒酶在多种恶性肿瘤细胞中高表达,正常细胞中除生殖细胞和造血细胞等外大多无或低表达[1]。人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)是端粒酶活性的主要调控因素,对细胞的恶性转化、肿瘤的发生、发展意义重大[2]。现已有使用 hTERT 启动子作为靶向治疗引导物,对肿瘤进行了靶向基因治疗的研究[3]。但和所有的肿瘤基因治疗一样,靶向性仍是重要制约因素。本研究将 hTERT 启动子核心片段插入 siRNA 表达载体的 U6 启动子的上游,构建 hTERT/U6 嵌合启动子的 siRNA 表达载体,为探讨能在体外靶向端粒酶阳性表达的恶性肿瘤细胞中定向抑制靶基因表达,而对端粒酶阴性表达细胞中的相同基因无影响的策略奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 T_4DNA 连接酶和 GC 高含量 PCR 扩增试剂盒均购自 TaKaRa 公司。GFP 抗体购自碧云天公司。siRNA 的 DNA 序列由上海生物技术有限公司合成。增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)质粒,siRNA 表达载体 PTZU6+1,含 hTERT 全长基因片段的 PGL3BTRP 有为本实验室保存。

1.1.2 细胞株 肝癌细胞株 SMMC-7721 为本室保存。

1.2 方法

1.2.1 构建稳定表达 EGFP 单克隆 SMMC-7721 细胞株 用脂质体将 EGFP 质粒转染至 7721 细胞,经筛选后再构建单克隆细胞株 EGFP-7721。

1.2.2 siRNA 的设计与选择 利用 siRNA 设计工具设计针对 EGFP-C1 基因的特异性 siRNA 序列的 DNA,序列 1 为 5′-CAGCCACAACGTCTAATATCAT-3′,序列 2 为 5′-AAGAACGGCATCAAGGTGAACTT-3′,loop 序列为 TTCCGT。

1.2.3 PTZU6+1-EGFP-siRNA 载体的构建与鉴定 siRNA 的 DNA 片段与 PTZU6+1 线性载体连接后转化至 DH5α、筛选并测序。

1.2.4 PTZU6+1-EGFP-siRNA 载体筛选 ①将重组质粒 1(PTZU6+1-EGFP-siRNA1)和重组质粒 2(PTZU6+1-EGFP-siRNA2),分别转染 EGFP-7721 细胞株,24 h 后观察荧光蛋白的表达变化。②24 h 后提取 RNA 逆转录成 cDNA。针对 EGFP-C1 基因设计 PCR 上游引物:5′-CGTCCATGCCGAGAGTGATC-3′,PCR 下游引物:5′-CCGACAACCACTACCTGAGC-3′进行 RT-PCR 扩增,从 mRNA 水平鉴定 2 条 siRNA 的干扰效率。PCR 反应条件:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 20 s,55 ℃退火 20 s,72 ℃延伸 20 s。共 30 个循环。③Western blot 从蛋白水平检测 EGFP基因的抑制情况。将转染干扰质粒的 EGFP-7721 细胞,48 h 后提取蛋白。兔抗水母的 GFP 抗体为 1∶200、GAPDH 单克隆抗体 1∶500,羊抗兔 IgG-HRP 二抗为 1∶1 000,用 ECL 化学发光系统检测。

1.2.5 PCR 扩增 hTERT 启动子的核心片段 根据 hTERT 调控区 5′端 DNA 序列,设计正向插入的 hTERT 启动子核心片段的 PCR 上游引物:5′-AGGTACCACAGACGCCCAGGACCGCGC-3′,其 PCR 下游引物:5′-AGGAATTCGGCCAGGGCTTCCCACGTG-3′,上游引物和下游引物的 5′端分别加上 *Kpn* Ⅰ 和

基金项目:国家自然科学基金(30400539,30400166)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400539,30400166)

作者简介:姜习新,女,湖南省长沙市人,硕士研究生,检验师,主要从事肿瘤的治疗靶向性方面的研究。电话:13527340115,E-mail:jiangxixin0501@163.com
通信作者:涂植光,电话:(023)68485759

收稿日期:2007-11-01;修回日期:2007-12-01

*Eco*R Ⅰ的酶切位点;反向插入的 hTERT 启动子核心片段 PCR 上游引物:5′-AGCTTAAGACAGACGCCCAGGACCGCGC-3′ 其 PCR 下游引物:5′-AGGGTACCGGCCAGGGCTTCCCACGTG-3′,上游引物和下游引物的5′端分别加上端分别加上 *Eco*R Ⅰ和 *Kpn* Ⅰ的酶切位点。引物扩增片段大小为 250 bp。以 PLG3BTRP 质粒为模板,进行 PCR 扩增,将正向和反向插入的 hTERT 核心启动子片段 PCR 产物分别经 *Eco*R Ⅰ和 *Kpn* Ⅰ双酶切,琼脂糖凝胶电泳分离,胶回收 PCR 酶切产物。

1.2.6 hTERT/U6 嵌合启动子的 PTZU6 + 1-EGFP-siRNA 载体的构建 PTZU6 + 1-EGFP-siRNA 质粒的线性载体 hTERT 启动子核心片段胶回收产物相连后转化至 DH5α 并筛选,随机调取单克隆测序。

1.2.7 RT-PCR 鉴定 hTERT/U6 嵌合启动子的 PTZU6 + 1-EGFP-siRNA 载体的活性 ①转染:将构建好的正向插入的和反向插入的 hTERT/U6 嵌合启动子的 PTZU6 + 1-EGFP-siRNA 载体(μg)与脂质体(μl)以 1∶4比例转染至 EGFP-7721 细胞株中。②48 h 后提取 RNA,逆转录成 cDNA。③PCR 扩增:反应条件如前。

1.3 统计学处理

所有检测实验均重复 3 次,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 11.5 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 PTZU6 + 1-EGFP-siRNA 载体的构建与鉴定

重组质粒 1 和重组质粒 2 经 *Sal* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切后呈现两条带,分别为 59 bp 的干扰片段和约 3.7 kb 的线性载体片断。空载体为单一的一条带(图略)。将重组质粒送往重庆医科大学分子传染病研究所测序,结果表明 siRNA 成功连接到 PTZU6 + 1 载体上。

2.2 载体筛选的荧光表达

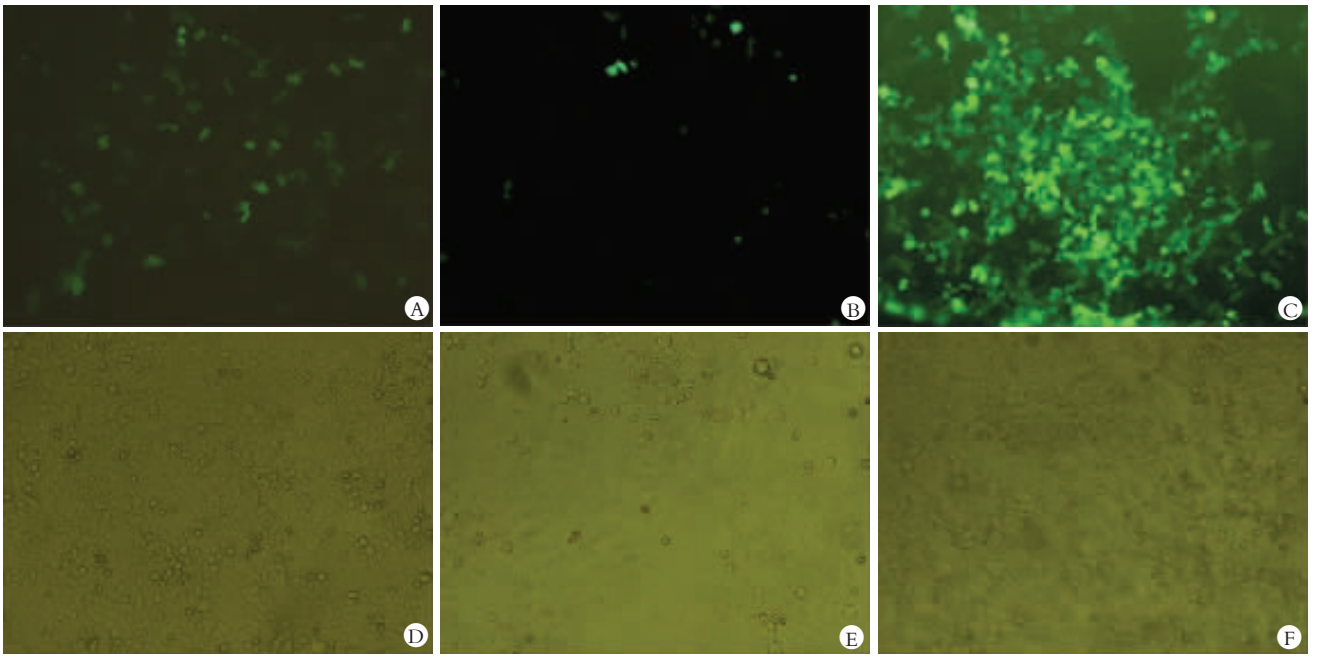
将重组质粒 1 和重组质粒 2 转染至稳定表达绿色荧光蛋白的 7721 细胞株后,从图 1 可看出转染重组质粒 1(图 1A)和 2(图 1B)与未转染质粒(图 1C)的 SMMC-7721 细胞相比,荧光表达均明显下降,而且 2 条干扰片段间干扰效果无明显的差别。

2.3 半定量 RT-PCR 结果

转染 PTZU6 + 1-EGFP-siRNA 质粒后的 EGFP-7721 细胞株的 RT-PCR 结果显示扩增片段大小,分别为 108 bp 和 446 bp(图 2)。统计分析结果表明,EGFP 扩增产物的强度与内对照 GAPDH 的比值在空白组和转染重组质粒 1 的实验组分别为(0.845 ± 0.016)和(0.453 ± 0.006),两者差异有统计学意义($P < 0.01$, $n = 3$);而空白组和转染重组质粒 2 的实验组分别为(0.845 ± 0.016)和(0.496 ± 0.015),两者差异有统计学意义($P < 0.01$, $n = 3$)。转染重组质粒 1 和 2 两组,差异无统计学意义($P > 0.05$, $n = 3$)。所以,我们筛选重组质粒 2 作为连接 hTERT/U6 嵌合启动子的载体。

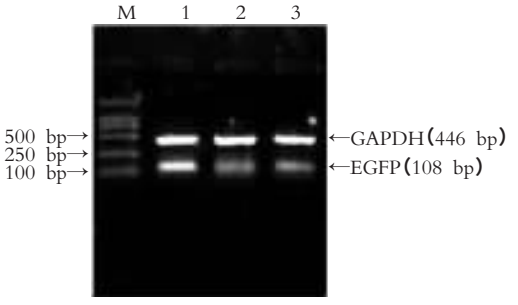
2.4 Western blot 结果

EGFP-7721 细胞转染重组质粒 1 后与对照组相比,GFP 蛋白表达明显下降,表达量(与内对照 β-tubulin 的灰度值比值)由(0.945 ± 0.036)下降到(0.461 ± 0.006)($P < 0.01$, $n = 3$),两者差异有统计学意义;而转染重组质粒 2 与对照组相比 GFP 蛋白也表达明显下降,表达量(与内对照 β-tubulin 的灰度值比值)由(0.945 ± 0.036)降至(0.456 ± 0.005)($P < 0.01$, $n = 3$)两者差异有统计学意义;重组质粒 1 和 2 相比,差异无统计学意义($P > 0.05$, $n = 3$),说明两条干扰片段的干扰效果无差别(图 3)。我们挑选了重组质粒 2 作为后续研究的载体。



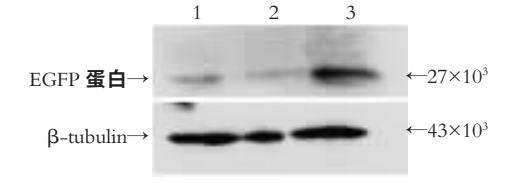
A,B,C:荧光显微镜观察;D,E,F:光镜观察; A,D: 转染 PTZU6 + 1-EGFP-siRNA1; B,E:转染 PTZU6 + 1-EGFP-siRNA2; C,F:未转染干扰质粒的 EGFP-7721

图 1 转染 PTZU6 + 1-EGFP-siRNA 后 EGFP-7721 细胞的荧光显微镜和光镜观察结果 (×100)



M:DNA 标准; 1:未转染干扰质粒的 SMMC-7721 提取 RNA 后 RT-PCR; 2:转染重组质粒 1 的 SMMC-7721 提取 RNA 后 RT-PCR; 3:转染重组质粒 2 的 SMMC-7721 提取 RNA 后 RT-PCR

图 2　RT-PCR 鉴定 PTZU6 +1-EGFP-siRNA 质粒



1:转染重组质粒 1 的 SMMC-7721 荧光蛋白表达; 2:转染重组质粒 2 的 SMMC-7721 荧光蛋白表达; 3:未转染干扰质粒的 SMMC-7721 荧光蛋白表达

图 3　Western blot 鉴定 PTZU6 +1-EGFP-siRNA 质粒

2.5　端粒酶逆转录酶启动子 hTERT 的核心片段 PCR 扩增图谱

分别用正向和反向插入的 hTERT 启动子核心片段的 PCR 引物,以 PGL3BTRP 为模板,用 GC 高含量 PCR 扩增试剂盒,两者都扩增出 250 bp 的产物。

2.6　hTERT/U6 嵌合启动子的 PTZU6 + 1-EGFP-siRNA 载体测序和酶切鉴定

将重组质粒 2 酶切后与正向和反向插入的 hTERT 启动子核心片段的 PCR 胶回收产物相连,正反两方向各构建 1 个。

2.7　RT-PCR 鉴定 hTERT/U6 嵌合启动子的 PTZU6 +1-EGFP-siRNA 载体结果

结果显示,反向的插入的 hTERT/U6 嵌合启动子启动活性明显高于正向插入的,两者间存在显著性差异($P < 0.05$)。而且转染反向插入的质粒的 EGFP-7721 细胞与未转染的相比,两者间存在显著性差异($P < 0.05$)。由此可见,在 EGFP-7721 细胞中反向插入的嵌合启动子的质粒活性要高(图略)。

3　讨论

RNAi 技术在肿瘤治疗方面的研究已较广泛,但是 siRNA 不具有靶向恶性肿瘤细胞的能力,造成 RNAi 效应的不确定性,大部分的试验都局限于体外实验,仅少数涉及动物体研究。近年来,使用肿瘤特异性启动子在转录水平控制目的基因的表达以获得肿瘤特异靶向性已成为肿瘤基因治疗的研究热点[4]。hTERT 高度的特异性使其完全有可能作为基因靶向治疗的引导物,定向杀灭或抑制肿瘤细胞而对正常的细胞无影响。hTERT 启动子现在已成功地应用于肝癌、肺癌、宫颈癌、膀胱癌、骨肉瘤等的靶向基因治疗中[5]。因此,将 hTERT 启动子作为恶性肿瘤的靶向基因治疗引导物无论在理论上还是在技术上都是切实可行的。本研究构建的 hTERT/U6 嵌合启动子的 siRNA 表达载体,可望有一定的肿瘤细胞靶向性。

本实验运用的 siRNA 表达载体 PTZU6 +1 质粒不带有绿色荧光蛋白的基因,我们设计针对 EGFP 基因的 siRNA,当 PTZU6 +1-siRNA-EGFP 重组质粒转染到稳定表达绿色荧光蛋白的细胞中时,可以在荧光显微镜下直接观察到干扰质粒的效果,结合 RT-PCR 和 Western blot,可以从细胞,mRNA 和蛋白水平鉴定干扰质粒的效果。这有利于我们进行干扰质粒的筛选,为进一步的靶向性和可行性的研究提供最直接的实验依据。然而 PTZU6 +1 质粒中的 U6 启动子虽有一定的肿瘤细胞的靶向性,其特异性却不高,本研究率先将 hTERT 启动子定向克隆于表达 siRNA 的 DNA 载体 U6 启动子的上游,构建正反方向的 hTERT/U6 嵌合启动子的 siRNA 的表达载体,并验证其在肝癌细胞中的活性,期望能在以后的实验中提高 siRNA 的靶向恶性肿瘤细胞的能力。因 siRNA-hTERT/U6-PTZU6 +1 质粒具有通用性,故本研究还可为 siRNA 提供一共用平台,通过设计不同靶基因的 siRNA 的基因片段,可以替换 siRNA 转录模板,利用细菌内同源重组方便、快速的特点,构建含有肿瘤细胞不同靶基因 siRNA,使 siRNA 表达载体可能在体内外靶向端粒酶阳性表达的恶性肿瘤细胞,定向抑制不同的靶基因的表达,而对端粒酶阴性表达的正常细胞中的相同基因无影响,为 RNAi 技术的靶向性研究奠定基础。

关键词: 端粒酶逆转录酶启动子;嵌合启动子;siRNA 表达载体;PTZU6 +1;siRNA

中图法分类号: R394-33　　**文献标识码**: B

参考文献:

[1] Saldanha S N, Andrews L G, Tollefsbol T O. Analysis of telomerase activity and detection of its catalytic subunit, hTERT[J]. Anal Biochem, 2003, 315(1): 1 -21

[2] 李力人, 万德森, 潘志忠, 等. 端粒酶送转录在结肠癌组织中表达的临床意义[J]. 癌症, 2004, 23(增刊): 1502 -1507.

[3] Fujiwara T, Urata Y, Tanaka N. Telomerase-specific oncolytic virotherapy for human cancer with the hTERT promoter[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2007, 7(2): 191 -201

[4] Painter R G, Lanson N A, Jin Z, *et al*. Conditional expression of a suicide gene by the telomere reverse transcriptase promoter for potential post-therapeutic deletion of tumor-genesis[J]. Cancer Sci. 2005 Sep; 96(9): 607 -613.

[5] Yang L F, Zhao Y, Zeng L, *et al*. hTERT/re-caspase-3 system induce apoptosis in hTERT-positive cancer cells[J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(11): 1546 -1553.

(编辑　栾　嘉)