文章编号:1000-5404(2009)10-0931-04

论著

Caveolin-1 RNA干扰慢病毒载体的构建及其对肝癌细胞株SMMC7721侵袭的影响

张志波,蔡 磊,郑树国,熊 燕,董家鸿 (第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 构建人Caveolin-1 RNA干扰慢病毒载体,探讨慢病毒介导的Caveolin-1 RNA干扰对人肝癌细胞株SMMC7721侵袭能力的影响。**方法** 应用pGCSIL-GFP-Caveolin-1 RNA干扰慢病毒载体感染SMMC7721,检测其转导效率、mRNA和蛋白水平的敲除效率,并检测对SMMC7721侵袭能力的影响。**结果** pGCSIL-GFP-Caveolin-1 RNA干扰慢病毒载体感染SMMC7721的转导效率为(96.0±1.2)%;Caveolin-1 mRNA水平的敲除率约90%;Western blot显示感染后Caveolin-1蛋白水平显著下降;感染后SMMC7721的侵袭能力显著下降。**结论** 慢病毒载体构建的Caveolin-1 RNA干扰能有效敲除SMMC7721中Caveolin-1的表达,显著降低SMMC7721侵袭能力。

关键词: 慢病毒;Caveolin-1;RNA干扰;侵袭
中图法分类号: R394-33;R730.23;R735.7 **文献标识码:** A

Construction of recombinant lentivirol expression vector carrying human Caveolin-1 with RNA interference and its effect on invasiveness of SMMC7721 cells

ZHANG Zhi-bo, CAI Lei, ZHENG Shu-guo, XIONG Yan, DONG Jia-hong (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct a lentivial expression vector of human Caveolin-1 with RNA interference and study its effect on the invasiveness of human hepatoma cell line SMMC7721. Methods After the lentiviral expression vector of human Caveolin-1 with RNA interference (pGCSIL-GFP-Caveolin-1 RNAi) was transduced into SMMC7721 cells, the transduction efficiency, the Caveolin-1 mRNA level were determined by real-time PCR, the expression of Caveolin-1 protein was measured by Western blot analysis. Its significance for the invasiveness of SMMC7721 cells were detected with the aid of Transwell. Results The transduction efficiency of our constructed vector pGCSIL-GFP-Caveolin-1 RNAi to SMMC7721 cells was (96.0±1.2)%. The Caveolin-1 mRNA level was knocked down by 90%. The expression of Caveolin-1 protein was significantly declined. The invasiveness of SMMC7721 cells was significantly descented. Conclusion A recombinant lentivirol expression vector carrying human Caveolin-1 with RNA interference is successfully constructed, and it knocks down the expression of Caveolin-1 in SMMC7721 cells efficiently and decrease the invasiveness of the cells significantly.

Key words: lentivirus; Caveolin-1; RNA interference; invasiveness

Caveolin-1是细胞膜上内陷微区域的主要结构蛋白,与肿瘤形成和肿瘤侵袭转移等多种生命活动相关[1-5]。目前,对Caveolin-1在肿瘤发生过程中的作用尚存在分歧,且对其在肝细胞癌侵袭转移中的作用知之甚少。我们通过研究慢病毒载体构建的人Caveolin-1 RNA干扰(RNA interference,RNAi),探讨其对人肝癌细胞株SMMC7721侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

1.1.1 主要材料 人肝癌细胞株SMMC7721和病毒包装细胞293T由本实验室保存,为贴壁细胞。慢病毒表达载体pGCSIL-GFP质粒、辅助包装原件载体pHelper 1.0和pHelper 2.0质粒(上海吉凯基因技术有限公司),DMEM培养基、胎牛血清(Gibco公司,美国),Transwell侵袭小室(Millipore,美国),水平电泳槽、电泳仪(Bio-Rad公司,美国),PCR仪(GeneAmp,新加坡);台式高速离心机购自Beckman,紫外/可见光凝胶成像系统(Vilber Lourmat,法国),紫外分光光度计(Beckman Coulter DU800,美国),Light Cycler Real-time quantitative PCR扩增仪

作者简介:张志波,男,福建省泉州市人,硕士,主治医师,主要从事肝胆胰肿瘤方面的研究。E-mail:zbzhang_1234@163.com
通信作者:董家鸿,E-mail:dongjh301@163.com
收稿日期:2008-11-21;修回日期:2008-12-03

(Roche Diagnostics 公司,瑞典), SDS-PAGE 蛋白电泳仪、蛋白转膜仪(Bio-Rad 公司,美国)。

1.1.2 主要试剂和引物 Caveolin-1 兔多克隆抗体(Santa Cruz, 美国),GAPDH 鼠单克隆抗体(Santa Cruz, 美国),山羊抗鼠 IgG 抗体-HRP 多聚体(Pierce Biotechnology, 美国),山羊抗兔 IgG 抗体-HRP 多聚体(Cell Signaling Technology, 美国),Trizol 试剂(Invitrogen, 美国),SYBR(PrimeScript™ RT-PCR kit 试剂盒[TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd],*Age* Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ (NEB),质粒大抽提试剂盒(QIAGEN),Lipofectamine 2000(Invitrogen, 美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 Real-time quantitative PCR 方法检测 SMMC7721 细胞 Caveolin-1 mRNA 的表达 同时设计 2 条 Caveolin-1 的 PCR 引物序列(a,b)。Real-time quantitative PCR:按照 Trizol 试剂使用说明书提取细胞总 RNA;琼脂糖凝胶电泳及紫外分光光度计进行定性定量分析,-70 ℃冻存。按 SYBR(PrimeScript™ RT-PCR Kit 产品说明书进行反转录反应和 Real-time quantitative PCR 扩增,主要引物采用软件 Beacon designer 2 设计,由上海吉凯基因技术有限公司合成(表 1)。反转录条件为:37 ℃ 15 min;85 ℃ 5 s;冰上冷却,cDNA 产物 -20 ℃保存。Real-time quantitative PCR 扩增条件为:95 ℃ 5 s、60 ℃ 20 s、72 ℃ 15 s PCR 反应共45 个循环;65 ℃延伸 15 s。定量数值采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析法。每组重复 2 次实验。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物序列	片段大小(bp)
Caveolin-1 *Age* Ⅰ/*Eco*R Ⅰ	上游:5′-CCTATTTCCCATGATTCCTTCATA-3′ 下游:5′-GTAATACGGTTATCCACGCG-3′	343
Caveolin-1(a)	上游:5′-CTGAGCGAGAAGCAAGTG-3′ 下游:5′-AGAGAGAATGGCGAAGTAAATG-3′	264
Caveolin-1(b)	上游:5′-CGTAGACTCGGAGGGACATC-3′ 下游:5′-AGAGGGCAGACAGCAAGC-3′	302
β-actin	上游:5′-GTGGACATCCGCAAAGAC-3′ 下游:5′-AAAGGGTGTAACGCAACTA-3′	302

1.2.2 双链 DNAoligo 制备 设计 3 个 siRNA 靶点序列,其中靶点 3 为:AATCTCAATCAGGAAGCTC,交由上海吉凯基因技术有限公司合成相应 3 对双链 DNAoligo。

1.2.3 RNA 干扰慢病毒载体构建 *Age* Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ 双酶切 pGCSIL-GFP 载体(购自上海吉凯基因技术有限公司)以使其线性化。酶切回收的载体 DNA(100 ng/μl)1 μl,退火的双链 DNA(100 ng/μl)1 μl,10×T_4 噬菌体 DNA 连接酶缓冲液 1 μl,T_4 噬菌体 DNA 连接酶 1 μl,dd H_2O 6 μl,连接反应体系 10 μl,于 4 ℃反应 12 h 制备克隆连接液。阳性克隆 PCR 鉴定:Primer(+) 0.4 μl,Primer(-) 0.4 μl,10×缓冲液 2.0 μl,$MgCl_2$ 0.5 μl,dNTPs(2.5 mmol/L) 0.8 μl,*Taq* 多聚酶 0.2 μl,菌落裂解液 1 μl(阴性对照组不加),由 ddH_2O 配置反应体系为 20 μl。PCR 反应条件:94 ℃热启动 30 s,94 ℃变性 30 s,60 ℃复性 30 s,72 ℃延伸 30 s,30 个循环,最后 72 ℃聚合 6 min。分别挑选 3 个序列的阳性克隆送美季公司进行测序鉴定。慢病毒载体的抽提和小量包装:测序鉴定正确的重组质粒 pGCSIL-GFP-Caveolin-1 RNAi 及其 2 种辅助包装原件载体质粒使用 Lipofectamine 2000 共转染 293T 细胞,培养 48 h 后,收集上清液,浓缩后得到慢病毒浓缩液,在 293T 细胞中测定慢病毒滴度。筛选最优靶点后进行病毒大量包装。

1.2.4 Real-time quantitative PCR 内源筛选靶点及最优靶点的敲除效率检测 小量包装获得的 3 组慢病毒分别转染 SMMC7721,感染 3 d 后荧光显微镜下观察 GFP 表达情况,若感染率低于 50% 则重新转染,若超过 50%,待感染 5 d 后,选择 3~5 个视野/孔,在荧光显微镜下观察发绿色荧光细胞的平均数与总细胞平均数的比值,估计质粒的转导效率;并收集细胞,采用 Real-time quantitative PCR 的方法检测 Caveolin-1 mRNA 的表达情况,进而判断 3 个靶点的干扰效果。Real-time quantitative PCR 方法同上。定量数值采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析法。每组重复 2 次实验。最优靶点大量包装后的病毒同法进行敲除效率的检测。实验分组:空白对照组(未感染病毒, Con);阴性对照组(感染阴性慢病毒,NC);靶点 3 实验组(感染靶点 3 构建的慢病毒,KD)。

1.2.5 Western blot 方法检测最优靶点的敲除效率 取转染后的 SMMC7721 细胞 5×10^6,以 RIPR buffer 蛋白裂解液裂解,Braford 法测蛋白浓度,于 -70 ℃冻存。细胞总蛋白每泳道上样 20 μg,混合样品缓冲液 5 μl,100 ℃加热 5 min。8% SDS 凝胶电泳,半干法转膜 90 min,以含 5% 胎牛血清的 TBST 室温封闭 2 h,一抗(Caveolin-1,1∶200;GAPDH,1∶5 000)4 ℃孵育过夜,二抗(山羊抗鼠 IgG 抗体-HRP 多聚体,1∶5 000;山羊抗兔 IgG 抗体-HRP 多聚体,1∶5 000)37 ℃ 2 h,ECL 显影。重复 2 次实验。

1.2.6 Caveolin-1 RNAi 对 SMMC7721 侵袭能力的影响 用无血清 DMEM 培养基将 Matrigel 稀释 2 倍,按每孔 60 μl 加入 12 孔 Transwell 上室,37 ℃、5% CO_2 条件下 1 h 使凝胶凝固。用无血清 DMEM 培养基制备细胞数为 1×10^5 ml^{-1} 的细胞悬液,按每孔 500 μl 接种于铺有 Matrigel 的 Transwell 上室,Transwell 下室加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。每种细胞设 3 个复孔,在 37 ℃、5% CO_2 条件下孵育。48 h 后擦去未穿膜细胞,多聚甲醛固定和结晶紫染液染色,光镜下计算 5 个低倍视野(×100)下侵袭细胞的数目,取其平均值。

1.3 统计学方法

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,配对 t 检验比较各组的敲除率差异。

2 结果

2.1 SMMC7721 细胞上 Caveolin-1 mRNA 的表达

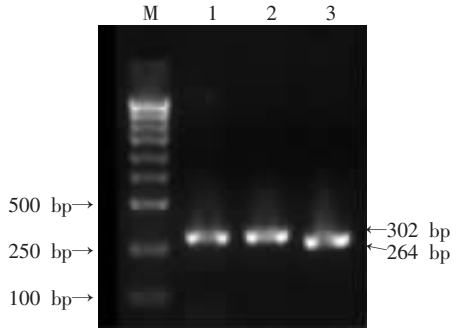
2 次实验的 Ct 值分别为:β-actin 13.18、13.12;Caveolin-1(a) 17.72、17.89;Caveolin-1(b) 19.02、19.66。PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳见相应条带(图 1)。证明 SMMC7721 细胞中存在 Caveolin-1 mRNA 的表达。

2.2 双酶切 pGCSIL-GFP 载体、电泳

酶切后载体进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,显示 7.5 kb 的条带。

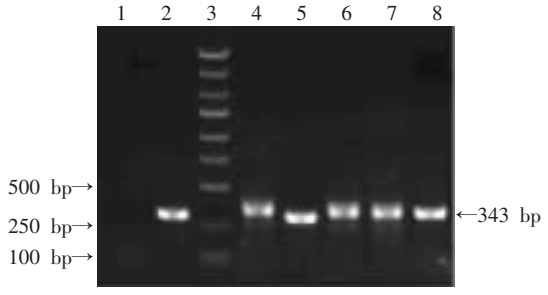
2.3　pGCSIL-GFP-Caveolin-1 RNAi 重组质粒的阳性克隆鉴定

pGCSIL-GFP-Caveolin-1 RNAi 重组质粒阳性克隆的 PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳见图 2,测序鉴定结果与人 Caveolin-1 基因序列一致。



M:标准;1:β-actin; 2: Caveolin-1(b); 3: Caveolin-1(a)

图 1　SMMC7721 细胞 Caveolin-1 mRNA 表达



1:ddH_2O;2:空载体;3:标准;4 – 8:靶点 3 pGCSIL-GFP-Caveolin-1 连接产物

图 2　pGCSIL-GFP-Caveolin-1 RNAi 重组质粒阳性克隆鉴定

2.4　pGCSIL-GFP-Caveolin-1 RNAi 慢病毒对 SMMC7721 细胞的转导效率

先鉴定 3 个靶点构建的 pGCSIL-GFP-Caveolin-1 RNAi 慢病毒对 SMMC7721 细胞的转导效率和 Caveolin-1 mRNA 水平的敲除效率,3 个靶点的转导效率均在 90% 以上,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析法比较 Caveolin-1 mRNA 水平定量检测结果,空白对照组(1.44 ± 0.05),阴性对照组(1.00 ± 0.02),靶点 1(0.23 ± 0.08),靶点 2(0.52 ± 0.06),靶点 3(0.18 ± 0.03)。确认靶点 3 的转导效率和敲除效率最高,即对靶点 3 构建 pGCSIL-GFP-Caveolin-1 RNAi 慢病毒大量包装,并进行相应鉴定。转染 SMMC7721 细胞后 5 d 免疫荧光结果见图 3,转导效率为(96.0 ± 1.2)%。

2.5　pGCSIL-GFP-Caveolin-1 RNAi 慢病毒对 SMMC7721 细胞中 Caveolin-1 mRNA 和蛋白水平敲除效率

Real-time quantitative PCR 检测显示,靶点 3 构建 pGCSIL-GFP-Caveolin-1 RNAi 慢病毒转染后 5 d 对 SMMC7721 细胞 Caveolin-1 mRNA 的敲除效率约 90%,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析法比较定量检测结果,靶点 3 实验组(0.05 ± 0.01)与空白对照组(1.25 ± 0.08)、阴性对照组(1.05 ± 0.39)的比较差异均有统计学意义(P = 0.004、0.004)。Western blot 检测结果显示,靶点 3 构建 pGCSIL-GFP-Caveolin-1 RNAi 慢病毒转染后对 SMMC7721 细胞 Caveolin-1 蛋白有显著敲除作用(图 4)。

2.6　pGCSIL-GFP-Caveolin-1 RNAi 慢病毒对 SMMC7721 细胞侵袭能力的影响

空白对照组、阴性对照组、靶点 3 实验组 48 h 发生侵袭的细胞数分别为(42.16 ± 2.69)、(40.01 ± 3.45)、(15.87 ± 1.12)个/低倍视野,靶点 3 实验组与前 2 组比较差异均有统计学意义(P < 0.01)。

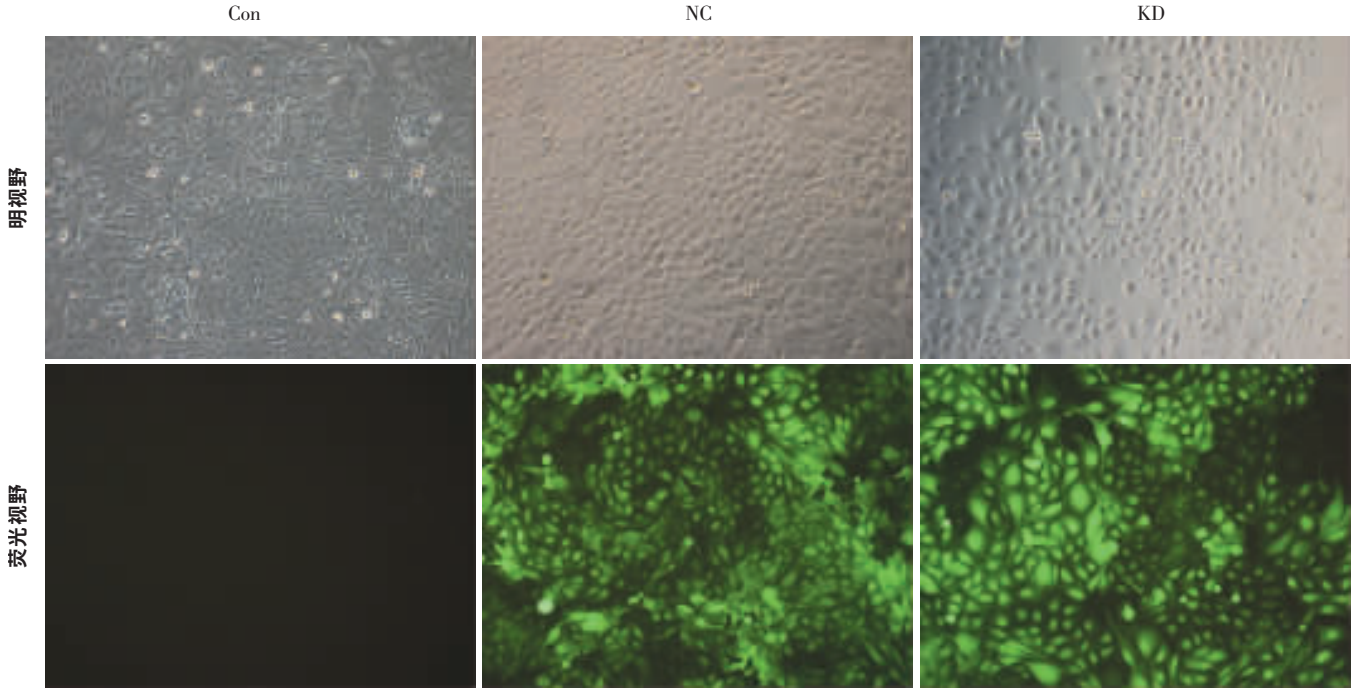
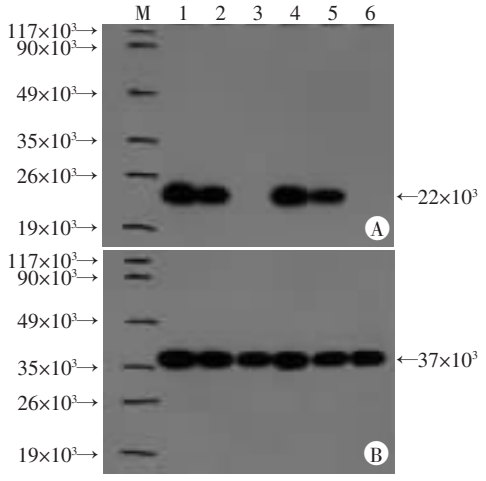


图 3　空白对照组(Con)、阴性对照组(NC)、靶点 3 实验组(KD)感染 SMMC7721 的明视野和荧光视野观察　(×100)



A：Caveolin-1；B：GAPDH

M：蛋白标准；1,4：空白对照组；2,5：阴性对照组；3,6：靶点3实验组

图4 不同处理组 SMMC7721 中 Caveolin-1 蛋白表达水平比较

3 讨论

最初对 Rous 肉瘤病毒转染的鸡胚胎成纤维细胞研究发现[1]，Caveolin-1 在肿瘤发生过程中失活。随后有学者发现人 Caveolin-1 基因位于 7 号染色体的抑癌基因区域上[2]，因此认为 Caveolin-1 是抑癌基因。然而，最近有越来越多的研究发现，Caveolin-1 表达与肿瘤分级、分期、转移和预后差密切相关[3-5]。在肝细胞癌的研究中，Yerian 等[6]发现 Caveolin-1 表达与肝癌发生发展有关。而 Zhou 等[7]对不同侵袭能力的小鼠肝癌细胞株研究表明，Caveolin-1 能促进肿瘤淋巴道转移。因此，Caveolin-1 可能在肝细胞癌侵袭转移过程中发挥着重要作用，但具体作用及机制尚不明确，需寻找更为理想的实验技术进行研究探讨。

慢病毒（lentivirus）载体是以人类免疫缺陷型病毒（HIV）为基础发展起来的基因治疗载体，它对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力，并可以在体内较长期的表达。慢病毒为“自杀”性病毒，即病毒感染目的细胞后不会再感染其他细胞，也不会利用宿主细胞产生新的病毒颗粒，安全性好[8]。慢病毒载体已成为当前基因治疗中载体研究的热点。

本研究先设计 3 个 siRNA 靶点序列（靶点 1、2 未列出），筛选出最优干扰靶点序列 3，并成功构建相应的 pGCSIL-GFP-Caveolin-1 RNAi 慢病毒载体，通过感染人肝癌细胞株 SMMC7721，3 d 后转导效率为（96.0 ± 1.2）%。稳定转染 SMMC7721 5 d 后，对其 Caveolin-1 mRNA 表达水平的敲除率达 90%，与空白对照组、阴性对照组比较差异均有统计学意义。利用 Western blot 方法检测，结果显示 pGCSIL-GFP-Caveolin-1 RNAi 对其 Caveolin-1 蛋白水平亦有显著敲除作用。在本研究中未能测出其干扰后的 Caveolin-1 蛋白表达，考虑与 Western blot 本身实验技术的敏感性有关。但综合分析两个方面的鉴定结果，都有力证实了慢病毒载体系统能有效介导 Caveolin-1 RNAi 对靶细胞目的基因的敲除作用，并使其在靶细胞中长期稳定的表达，可成为今后基因治疗的理想载体。本研究进一步检测 pGCSIL-GFP-Caveolin-1 RNAi 慢病毒载体感染 SMMC7721 后对其侵袭能力的检测，观察到 Caveolin-1 RNAi 后能使 SMMC7721 的侵袭能力显著下降，表明 Caveolin-1 表达与肝癌细胞株的侵袭有关。

总之，本研究成功利用慢病毒系统构建 Caveolin-1 RNAi 的载体，并能显著敲除靶细胞 SMMC7721 中目的基因 Caveolin-1 的 mRNA 和蛋白表达，证实了该系统有望成为今后基因治疗的理想载体。Caveolin-1 RNAi 后 SMMC7721 的侵袭能力显著下降，证实 Caveolin-1 参与了肝癌的侵袭转移，为下一步进行肝癌中 Caveolin-1 的功能学实验研究奠定了基础。

参考文献：

[1] Glenney J R Jr. Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus [J]. J Biol Chem, 1989, 264 (34): 20163 - 20166.

[2] Engelman J A, Zhang X L, Lisanti M P. Genes encoding human Caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers [J]. FEBS Lett, 1998, 436 (3): 403 - 410.

[3] Moon K C, Lee G K, Yoo S H, *et al*. Expression of Caveolin-1 in pleomorphic carcinoma of the lung is correlated with a poor prognosis [J]. Anticancer Res, 2005, 25 (6C): 4631 - 4637.

[4] Barresi V, Cerasoli S, Paioli G, *et al*. Caveolin-1 in meningiomas: expression and clinico-pathological correlations [J]. Acta Neuropathol, 2006, 112 (5): 617 - 626.

[5] Yang G, Addai J, Wheeler T M, *et al*. Correlative evidence that prostate cancer cell-derived Caveolin-1 mediates angiogenesis [J]. Hum Pathol, 2007, 38 (11): 1688 - 1695.

[6] Yerian L M, Anders RA, Tretiakova M, *et al*. Caveolin and thrombospondin expression during hepatocellular carcinogenesis [J]. Am J Surg Pathol, 2004, 28 (3): 357 - 364.

[7] Zhou H, Jia L, Wang S, *et al*. Divergent expression and roles for Caveolin-1 in mouse hepatocarcinoma cell lines with varying invasive ability [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 345 (1): 486 - 494.

[8] Rubinson D A, Dillon C P, Kwiatkowski A V, *et al*. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference [J]. Nat Genet, 2003, 33 (3): 401 - 406.

（编辑 邓强庭）