siRNA 沉默 Musashi-1 基因表达对人 HCT116 结肠癌细胞生物学行为的影响

章福彬,朱 斌,唐 郡,刘 卫 (解放军第 105 医院消化内科,安徽 合肥 230000)

［摘 要］ **目的** 探讨表达载体介导小干扰 RNA(siRNA)对人 HCT116 结肠癌细胞 Musashi-1 基因表达的抑制作用,揭示其对结肠癌细胞生物学行为的影响。**方法** 构建靶向 Musashi-1 的 siRNA 质粒表达载体,在脂质体介导下转染 HCT116 细胞,实时定量 PCR 检测 Musashi-1 mRNA 表达水平,MTT 法检测细胞增殖活性,流式细胞仪检测细胞周期状况。**结果** DNA 测序证实 2 条 Musashi-1 siRNA 表达载体构建成功,与对照组相比均可有效抑制 Musashi-1 的表达,细胞增殖能力显著降低。**结论** Musashi-1 的 siRNA 质粒表达载体可以有效地阻断 HCT116 结肠癌细胞 Musashi-1 的 mRNA 表达从而抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。

［关键词］结肠癌;siRNA;Musashi-1 基因

［中图分类号］R735.35 ［文献标识码］A ［文章编号］1672-5042(2012)06-0604-03

Effect of Musashi-1 siRNA on proliferation of human colorectal cancer cell line HCT116

ZHANG Fu-bin, ZHU Bin, TANG Jun, LIU Wei (Department of Gastroenterology, 105th Hospital of PLA, Hefei Anhui 230000, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of siRNA on Musashi-1 gene expression of proliferation of human colorectal cancer cell line HCT116. **Methods** Two specific siRNAs of Musashi-1 were cloned into the vector pGenSil-1 and transfected into HCT116 cells by LipofectamineTM 2000. The expression levels of Musashi-1 mRNA were detected by PCR in real time. Cell proliferation was determined by MTT, and the changes in cell cycle were evaluated by flow cytometry. **Results** The siRNA sequences were successfully inserted into the eukaryotic expression vector pGenSil-1. The sequence specific siRNA efficiently down regulated the Musashi-1 expression at mRNA levels. MTT results showed that the rate of HCT116 cells was decreased markedly and the number of cells at S stage was obviously decreased. **Conclusion** The synthesized siRNA can effectively decrease the Musashi-1 gene expression and inhibit cell proliferation.

Keywords: colorectal cancer; RNA interference; Musashi-1 gene

Musashi 是一种 RNA 结合蛋白,最早发现于果蝇,在维持干细胞状态、分化和肿瘤发生方面起着重要作用。本实验通过 RNAi 技术调控人 HCT116 结肠癌细胞 Musashi-1 基因表达水平,并检测干扰后细胞生物学行为的改变,探讨 Musashi-1 基因对结肠癌细胞增殖及细胞周期的影响,为探讨结肠癌中 Musashi 基因的功能提供新的手段。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

人结肠癌细胞株 HCT116 由本实验室保存,干扰质粒载体 pGenSil-1 购于武汉晶赛公司;Musashi-1 siRNA 序列由上海吉凯公司合成,LipofectamineTM 2000 Reagent 转染试剂和 AnnexinV 凋亡试剂购于 Invitrogen 公司,总 RNA 提取试剂(Trizol)和 real time PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司。

1.2 Musashi-1 siRNA 靶序列的设计与合成

根据 GenBank 的 Musashi-1 mRNA(NM_002442)全长序列,按 siRNA 原则设计,经 BLAST 数据库分析未发现同源序列。设计基因靶点分别于 Musashi-1 基因的第 205、741 位点,靶序 CCGGAGTTA。将化学合成的正义链和反义链退火,与经 Hind Ⅲ和 BamH Ⅰ酶切后线性化 pGeneSil-1 载体连接,经筛选、酶切鉴定后测序。

［收稿日期］2012-09-10 ［修回日期］2012-10-08

1.3 细胞培养和转染

人结肠癌细胞株 HCT116 接种于含 10% 新生小牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的培养基中,细胞转染时,取对数生长期的 HCT116 细胞,以合适的细胞数接种于 6 孔培养板,用含 10% 血清不含抗生素的 DMEM 培养液、37 ℃、5% CO_2 温育过夜,次日转染。转染操作按 LipofectamineTM 2000 Reagent 说明书进行,转染 24 h 后将转染的细胞按 1∶10 稀释,将其种植于另一培养板,再经过 24 h 后,向培养液中加入 400 μg/mL 的 G418 进行抗性筛选,2 周后荧光显微镜下可见细胞克隆发出荧光,对阳性克隆进行有限稀释,扩大培养后获得稳定表达的细胞株。

1.4 Real time PCR 检测

按 Trizol 法提取总 RNA,据反转录试剂盒操作方法获得单链 cDNA,取 cDNA 作为模板进行 Real-time PCR 检测。采用嵌合荧光检测法,采用 50 μl 反应体系(2 × SYBR Premix Ex TaqTM 25 μl,上游引物 1 μl,下游引物 1 μl,50 × ROX Reference Dye 1 μl,cDNA,溶液 4 μl,DEPC H_2O 18 μl) 95 ℃预变性 180 s; 95 ℃ 20 s,60 ℃ 60 s,40 个循环。用 pGEM-Musashi 质

粒和 pGEM-GAPDH 质粒,系列稀释同时扩增,制作标准曲线。记录各管扩增 CT 值,换算出基因拷贝数。以 Musashi 基因拷贝数与 GAPDH 基因拷贝数的比值作为其相对表达水平,Musashi 引物序列为:正义 5′-GTTTCGGCTTCGTCACTTTC-3′,反义 5′-GAGTCACCATCTTGGGCTGT-3′;GAPDH 引物序列为:正义 5′-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3′, 反义 5′-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3′。

1.5 MTT 法检测细胞生长曲线

将转染后的干扰组、空载体组细胞制备成 3×10^3 个细胞悬液,接种于 96 孔培养板中,每孔 200 μl,于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养。每天取一板进行 MTT 反应,每孔分别加入 5 mg/mLMTT 20 μl,37 ℃孵育 4 h 后弃去上清,每孔均加入二甲基亚砜 100 μl,轻微振荡使紫蓝色沉淀溶解。用酶标仪测定 490 nm 波长处的吸光度(D),计算细胞的抑制率。细胞生长抑制率(%) = [(对照组 A490 nm - 实验组 A490 nm)/对照组 A490 nm] ×100%。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期

转染后的干扰组、空载体组细胞接种于 6 孔板中,收集转染后扩增的细胞和空载体组细胞各 1×10^6 个,70% 冰乙醇固定,碘化丙啶(PI)染色,测定细胞周期情况。

1.7 统计学分析

应用 SPSS 10.0 统计软件,计量采用均值 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较单因素方差分析,$P<0.05$ 为统计学有差异。

2 结果

2.1 Musashi siRNA 真核表达质粒的鉴定及观察

测序结果证实插入寡核苷酸序列与设计的靶点序列完全吻合,说明重组载体构建成功。质粒中含有编码 GFP 的基因,故转染细胞在荧光显微镜下可激发出绿色荧光(图 1)。

a: siRNA-1;b:siRNAi-2

图 1 G418 抗性筛选后阳性克隆荧光倒置显微镜检测结果

2.2 Musashi siRNA 对 HCT116 细胞 Musashi mRNA 表达的影响

实时荧光定量 PCR 检测结果显示:siRNA-1 组及 siRNA-2 组的 mRNA 相对表达量分别为(0.37 ± 0.040)和(0.33 ± 0.025),与空载体对照组(0.87 ± 0.034)比较,siRNA1 ~ siRNA2 均可下调 Musashi mRNA 的表达,siRNA-1 ~ siRNA-2 间差异无统计学意义(图 2)。

*:与空载体组比较,$P<0.05$

图 2 Real time PCR 检测结果

2.3 Musashi siRNA 对 HCT116 细胞增殖的影响

Musashi siRNA 转染 HCT116 细胞后 1、2、3、4 d 与对照组比较,siRNA-1、siRNA-2 组细胞增殖减慢。细胞转染 2 d 后的抑制率较 1 d 显著增加,但 4 d 的抑制率较 3 d 增加不明显,转染 4 d 后抑制率较前下降。空载体对照组细胞的抑制率无明显变化(图 3)。

图 3 Bim-1 RNAi 对 HCT116 细胞增殖的影响

2.4 Musashi siRNA 对 HCT116 细胞周期的影响

与空载体组细胞比较,干扰组细胞出现 G0/G1 期阻滞,在 S 期和 G2/M 期细胞数下降,以上结果提示 Musashi 的 RNA 干扰可以使 HCT116 细胞停滞于 G0/G1 期,明显抑制 HCT116 细胞的增殖($P<0.05$),见表 1。

表 1 Musashi siRNA 对 HCT116 细胞周期分布影响($\bar{x}\pm s$,%)

组别	细胞周期		
	G0/G1	S	G2/M
空载体组	45.36 ± 4.56	40.11 ± 3.24	14.09 ± 6.12
siRNA-1	80.35 ± 4.33	15.69 ± 2.36	4.90 ± 1.68
siRNA-2	82.36 ± 3.68	14.39 ± 3.82	3.78 ± 4.71

3 讨论

干细胞是一类具有自我更新和增殖分化潜能的原始细胞,近年来提出在肿瘤的瘤体内也存在与干细胞具有相似生物学活性的一类细胞群体,科学家命名这种存在于肿瘤细胞群体中的特殊细胞为肿瘤干细胞

(cancer stem cell)[1],肿瘤干细胞在肿瘤的发生发展中起着关键性作用,它位于肠黏膜隐窝基底部[2],与肠道肿瘤的形成密切相关,有研究表明结肠癌的形成是通过持续性基因突变产生的,这种基因突变可能发生在肠道干细胞水平。

结肠癌是我国常见恶性肿瘤,其预后不良,早期诊断可以提高患者生存率。作为肠道干细胞的特异性分子标记之一的 Musashi-1 越来越受到人们的重视。人 Musashi-1 由 362 个氨基酸组成,N 端含有 2 个保守的 RRM(RNA Recognize Domain)结构域。Musashi 家族分子能够在多个层面上决定细胞命运,包括维持干细胞的状态、细胞的分化和肿瘤的发生等[3]。苏沐等[4]认为正常肠道干细胞标记物 Musashi-1 有可能成为结直肠癌干细胞样肿瘤细胞特异性标记,龚剑峰等[5]则对 Musashi-1 启动子进行了克隆及功能分析,为应用该启动子进行肠道干细胞的分离和纯化提供条件。赵晔等[6]采用免疫组织化学对正常的胃黏膜、小肠黏膜及降结肠黏膜中 musashi-1、端粒酶逆转录酶(TERT)、Oct-4 和 Nestin 的表达情况进行研究,认为 Musashi-1 是胃肠道相对特异的干细胞标记物。本研究则是构建了 Musashi-1 的两个 siRNA 真核表达载体(siRNA-1、siRNA-2),转染人结肠癌细胞株 HCT116 细胞,运用实时荧光定量测定 Musashi-1 mRNA 的表达,结果发现,siRNA-1、siRNA-2 均能抑制 Musashi-1 的表达,同时应用 MTT 和流式细胞技术分析细胞的生长曲线和周期分布,发现 Musashi-1siRNA 能够使细胞增殖速度减慢,并使细胞停滞于 G0/G1 期。

总之,本研究通过使用靶向 Musashi-1 的 siRNA,有效抑制了 Musashi-1 基因在结肠癌细胞中的表达,还能在体外特异性抑制结肠癌细胞的分裂增殖,为探讨结肠癌中 Musashi 基因的功能提供新的手段。

[参考文献]

[1] Reya T, Morrison SI, Clarke MF, et al . Stem cell, cancer and cancer stem cell[J]. Nature, 2001, 414(6859): 105 - 111.

[2] Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties lessons for and from the crypt[J]. Development 1990, 110(4): 1001 - 1020

[3] 杨爱萍,姜 藻,陈 静. Musashi-1、Ki-67 的表达与食管鳞癌的临床意义[J]. 中国现代医生, 2009, 47(32): 58 - 60.

[4] 苏 沐,姜 藻. 5-FU 对 SW480 细胞 Musashi-1 基因表达的影响[J]. 东南大学学报(医学版), 2007, 26 (3): 198 - 201.

[5] 龚剑锋,朱维铭,高 翔,等. 肠道干细胞特异性表达基因 Musashi-1 启动子的克隆及功能分析[J]. 肠外与肠内营养, 2006, 13(5): 257 - 264.

[6] 赵 晔,李建生,马长路. 胃肠道干细胞标记物的筛选[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2006, 15(2): 199 - 202.

(编辑:蒋登金)

·个案与短篇·

介绍两种采集动脉血气分析标本隔绝空气的方法

彭 雪,黄茂华,陈润新 (第三军医大学西南医院耳鼻咽喉科,重庆 400038)

[关键词] 动脉血气分析;标本;隔绝空气
[中图分类号] R446.11 [文献标识码] B [文章编号] 1672-5042(2012)06-0606-01

动脉血气分析在现代医学中应用越来越多,血气分析能客观反映呼吸衰竭的性质和程度,是判断患者有无缺氧和二氧化碳潴留的可靠方法,它已成为抢救过程中不可缺少的临床监测指标,对指导氧疗、调节机械通气的各参数以及纠正酸碱失衡有重要意义[1]。为避免血液标本污染和分析值偏差,要注意减少血液和空气的接触时间,采集标本后立即用橡皮塞封闭针头严格隔绝空气,否则血液中的二氧化碳逸出,使测定结果降低,影响检验的准确性[2-3]。一般传统使用药剂玻璃瓶的橡皮塞来做血气针针尖的空气隔绝材料,但这种材料的取材方法会增加护理人员手部划伤或扎伤的危险性,也相对繁琐[4]。而且橡皮塞质地硬,必须双手操作,增加了针刺伤的危险。笔者利用动脉血气分析基本原理在临床工作中对动脉血气分析标本隔绝空气的方法进行了改进,现介绍如下。

1 材料与方法

方法一(针头回套液封法):将采集前用以润滑针管壁的肝素溶液注入到穿刺针针帽中,待穿刺完毕后,立即单手持针,将针头回套入针帽中(图 1a),再将针帽与针座回套扣牢(图 1b)。

方法二(橡皮泥替代法):将市场购买的橡皮泥分成小块备

[收稿日期] 2012-06-27 [修回日期] 2012-07-07

(下转第 609 页)