基础研究 文章编号:0253-3626(2010)10-1524-04

Ezrin 基因 shRNA 表达载体的构建及鉴定

王忠良[1],李旭良[2],李 明[1],张德文[1],刘传康[1],覃佳强[1],刘官倍[3]
(1.重庆医科大学附属儿童医院骨科,重庆 400014;2.重庆医科大学附属儿童医院泌尿外科,重庆 400014;3.儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室,重庆 400014)

【摘 要】目的:设计并构建能有效下调 Ezrin 蛋白表达的短发夹状 RNA(Small hairpin RNA,shRNA)表达载体,探讨载体介导的 RNA 干扰技术用于预防性治疗骨肉瘤肺转移的可行性。方法:依据小干扰 RNA(Small interfering RNA,siRNA)靶序列的设计原则,以 Ezrin 蛋白编码基因 Villin2 为靶基因,合成两对编码短发卡结构的两条 DNA 序列,经退火合成 DNA 双链,再克隆至 shRNA 表达载体 pGenesil-1 质粒中,转化后进行酶切鉴定和 DNA 序列测定。将构建的载体用脂质体介导转染大鼠骨肉瘤 UMR106 细胞株,采用 RT-PCR 和 Western blot 法检测细胞 Ezrin 蛋白在 mRNA 和蛋白水平的表达。结果:成功构建 2 个针对 Ezrin 蛋白的 shRNA 表达载体;其转染大鼠骨肉瘤 UMR106 细胞后,细胞 Ezrin 蛋白表达在 mRNA 及蛋白水平上的表达均显著下降。结论:Ezrin 蛋白的 shRNA 表达载体能显著抑制大鼠骨肉瘤 UMR106 细胞 Ezrin 蛋白的表达,本研究为预防性治疗骨肉瘤肺转移的实验奠定基础。

【关键词】Ezrin 蛋白;RNA 干扰;骨肉瘤;肺转移;表达载体
【中国图书分类法分类号】Q782 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-11-19

Cloning and identification the shRNA expression plasmid for Ezrin gene

WANG Zhong-liang, et al
(*Department of Orthopaedics, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct small hairpin RNA (shRNA) expression plasmids which can effectively knock down Ezrin protein expression, and to explore carrier-mediated RNA interference technology for the preventive treatment of osteosarcoma lung metastases. *Methods*: According to the criteria of designing small hairpin RNA (siRNA), two villin2 (coding gene of Ezrin protein) shRNA template DNA sequences were designed and synthesized. The annealed shRNA template was inserted into expression vector pGenesil-1. The positive plasmids were identified by enzyme digestion and DNA sequencing. Then the plasmids were transfected into rat osteosarcoma UMR106 cells with liposome mediation, and the expressions of Ezrin mRNA and its protein were detected by RT-PCR and Western blot. *Results*: Two shRNA expression plasmids for Ezrin were constructed successfully. After the transfection, the Ezrin expressions in rat osteosarcoma UMR106 cells were significantly decreased in both mRNA and protein levels. *Conclusion*: The shRNA expression plasmid for Ezrin can significantly inhibit Ezrin protein expression in rat osteosarcoma UMR106 cells, this study set up a foundation for experiments of prophylactic treatment of osteosarcoma pulmonary metastasis.

【Key words】Ezrin; RNA interference; Osteosarcoma; Lung metastasis; Expression plasmid

肿瘤转移是恶性肿瘤生物学特征之一,也是肿瘤临床治疗的难题。肺转移是骨肉瘤目前最常见的死亡原因。Ezrin 蛋白是细胞膜和细胞骨架间的一种连接蛋白,其表达增高与许多肿瘤的转移和预后密切相关[1-3]。

本实验应用 pGenesil-1 质粒构建靶向 Villin2 基因(Ezrin 蛋白的编码基因)的短发夹状 RNA(Small hairpin RNA,shRNA)的表达载体,以期为防治肿瘤的转移提供新思路。

作者介绍:王忠良(1973-),男,主治医师,博士,研究方向:小儿骨肿瘤及 Perthes 病。
通讯作者:李旭良,男,教授,E-mail: 4829855@163.com。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

T4 DNA 连接酶、TaKaRa DNA Fragment Purification Kit Ver.2.0 试剂盒、TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.2.0 试剂盒、TaKaRa RNA PCR Kit Ver.3.0 试剂盒、Wide Range DNA Marker(500 ~ 12 000)均购自大连 TaKaRa 公司,特级胎牛血清购自天津 TBD 公司,细胞培养基 RPMI1640 购自 Gibico 公司,阳离子脂质体 Liprofectamine™2000、Trizol、MOPS 购自 Invitrogen 公司,DEPC 购自华舜公司,琼脂糖购自华美公司,Westen 及 IP 细胞裂解液、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、

SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5×)、预染蛋白质分子量标准、Tubulin 抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 均购自碧云天生物技术研究所，兔源 Ezrin 单克隆抗体购自 Cell Signaling Technology 公司，PVDF 膜，购自美国 Millipore 公司，化学发光试剂盒，购自北京中山公司，胰蛋白酶均购自 Sigma 公司，HEPES Merck 公司分装。

1.2 菌种、质粒、细胞株和细胞培养

大肠杆菌 *E.coli*.DH5α 为重庆医科大学附属儿童医院中心实验室保存。pGenesil-1 质粒载体购自武汉市晶赛生物技术有限公司，由 pEGFP-C1 质粒改造获得。UMR106 细胞株购自第四军医大学实验动物中心，常规培养于含青链双抗、10%胎牛血清的 1640 培养液中，37℃、5% CO_2、饱和湿度条件下培养，3～4 d 用 0.25%胰蛋白酶 -0.02%EDTA 消化传代 1 次，传代比例 1∶3。

1.3 shRNA 的设计及其表达载体的构建

1.3.1 shRNA 的设计和合成 根据 GenBank 提供的大鼠 Ezrin 蛋白的编码基因 Villin2 的 cDNA 序列（NM_019357），分别针对编码区 84～102 bp 和 1 616～1 635 bp 设计shRNA1 和 shRNA2，并设计 19 个随机且与所有基因均无明显同源性的核苷酸序列 shRNAHK 做为阴性对照。茎环结构为 9 个与 Villin2 不互补的非同源碱基(TTCAAGACG)，末端终止子为 TTTTT，并在末端设计上 *Hand* Ⅲ和 *BamH* Ⅰ酶切位点(斜体所示)，BLAST 检索设计的 DNA 片段序列的特异性，由武汉市晶赛生物有限公司合成 DNA 序列，具体 DNA 序列如下：

pshRNA1-Villin2

BamH Ⅰ sense loop antisense 终止子 *Hand* Ⅲ

5'-*GATCC* [illegible] TTCAAGACG [illegible] TTTTTTGTCGACA-3'

3'-G [illegible] AAGTTCTGC [illegible] AAAAAACAGCTG*TTCGA*-5'

pshRNA2-Villin2

BamH Ⅰ sense loop antisense 终止子 *Hand* Ⅲ

5'-*GATCC* [illegible] TTCAAGACG [illegible] TTTTTTGTCGACA-3'

3'-G [illegible] AAGTTCTGC [illegible] AAAAAACAGCTG*TTCGA*-5'

pshRNAHK-Villin2

BamH Ⅰ sense loop antisense 终止子 *Hand* Ⅲ

5'-*GATCC* [illegible] TTCAAGACG [illegible] TTTTTTGTCGACA-3'

3'-G [illegible] AAGTTCTGC [illegible] AAAAAACAGCTG*TTCGA*-5'

1.3.2 shRNA 表达载体的构建 用无菌、无核酸酶的超纯水分别充分溶解单链的 DNA 片段的正义链和反义链，分别取 2 μl 与 16 μl 退火缓冲液充分混匀，94℃孵育 5 min，缓慢降温，30℃孵育 90 min，然后缓慢冷却至 4℃。*Hand* Ⅲ和 *BamH* Ⅰ双酶切 pGenesil-1 质粒使之线性化并加以纯化(按说明书方法进行)，与 1 μl 上述退火产物双链 DNA 片段在 T4 DNA 连接酶作用下 4℃水浴过夜。连接产物转化感受态细菌 DH5α，100 μg/ml Kanamycin 筛选阳性菌落。

1.4 pshRNA-Villin2 质粒的鉴定

1.4.1 酶切鉴定 随机挑取 2 个阳性菌落进行培养，抽提质粒，*Xba* Ⅰ和 *Hand* Ⅲ双酶切鉴定，酶切反应产物 1.5%琼脂糖凝胶电泳，EB 染色后，胶凝成像系统照相。

1.4.2 重组质粒的测序鉴定 将筛选的重组质粒送往上海申友生物技术有限公司进行序列分析，构建的重组质粒命名为 pshRNA-Villin2。

1.5 pshRNA-Villin2 对 UMR106 细胞株 Ezrin 表达的影响

1.5.1 质粒中量提取及细胞转染 细胞长至板底覆盖率达 90%时，按 Invitrogen 转染试剂盒说明书进行转染实验，具体分组如下：①正常细胞；②脂质体；③pshRNAHK-Villin2；④pshRNA1-Villin2；⑤pshRNA2-Villin2。倒置荧光显微镜下分别于转染后 24、48、72 h 观察细胞生长及增强型绿色荧光蛋白(Enhanced green fluorescence protein，EGFP)表达情况。

1.5.2 RT-PCR 法检测 Ezrin 在 mRNA 水平的表达 转染 48 h 后提取细胞总 RNA，检测纯度及完整性，按 TaKaRa RNA PCR Kit Ver.3.0 试剂盒说明书方法逆转录成 cDNA，检测 Ezrin mRNA 的表达水平，引物序列：Ezrin 正向：5'-ATTCCGGCCAAGTTCTAC-3'，反向：5'-GCGCATGTACAGCTCGTG-3'，产物大小：643 bp；内参 β-actin 正向：5'-CCATTGAACACGGCATTGTC-3'，反向：5'-GGCCATCTCTTGCTCGAAGT-3'，产物大小：476 bp。反应条件：94℃，2 min，1 个循环；94℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 30 s，32 个循环；72℃，7 min，1 个循环。1.5%琼脂糖凝胶电泳，胶凝成像系统照相，Quantity One 软件半定量分析。

1.5.3 Western blot 检测 Ezrin 蛋白表达 提取转染 pshRNAHK-Villin2、pshRNA1-Villin2、pshRNA2-Villin2 脂质体 72 h 的细胞和正常细胞的总蛋白，十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白样本，电转移至 PVDF 膜上，室温下封闭液封闭 1 h，0.2 ml/cm² 膜的比例加入一抗体(兔源 Ezrin 单克隆抗体，1:1 000 稀释)4℃过夜，TBST 振荡洗涤后加入二抗体(辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG，1:100 稀释)，室温轻轻振荡 2 h，TBST 洗涤后按化学发光试剂盒操作说明，加入化学发光试剂反应 5 min，应用凝胶成像系统观察并照相，Quantity one 软件半定量分析。

2 结 果

2.1 重组质粒 pshRNA-Villin2 的构建、电泳鉴定及测序

经 BLAST 检索，证实设计好的 Villin2 寡核苷酸片段仅与 Villin2 的编码基因有同源性，且有明显的特异性，可用于 shRNA 的构建。

将退火后形成的 DNA 双链成功克隆进双酶切处理的 pGenesil-1 质粒载体，得到重组质粒 pshRNA-Villin2。重组质粒经 *Hand* Ⅲ和 *Xba* Ⅰ双酶切应产生 405 bp 和 4.5 kb 两个片段，而 pGenesil-1 质粒经 *Hand* Ⅲ和 *Xba* Ⅰ双酶切后产生的小片段应为 376 bp，小于重组质粒。另外，由于重组质粒 shRNA 片段上的 *Sal* Ⅰ酶切位点被甲基化不能切开，所以重组质粒只能被 *Sal* Ⅰ酶线性化，不能切成两个片段，而 pGenesil-1 质粒可被 *Sal* Ⅰ酶切成 352 bp 和 4.5 kb 两个片段。电泳鉴定结果显示筛选克隆与理论值相符(见图 1)，证实此克隆为阳性克隆。

筛选阳性克隆所提质粒经上海申友生物公司测序，pshRNA1-Villin2、pshRNAHK-Villin2 测序结果与初始设计完全一致，pshRNA2-Villin2 shRNA 正义链上一个碱基不符合设计，根据 RNAi 原理，起关键作用的在于 shRNA 的反义链，该链正确，仍可用于 RNA 干扰实验。

2.2 重组质粒转染 UMR106 细胞效率的观察

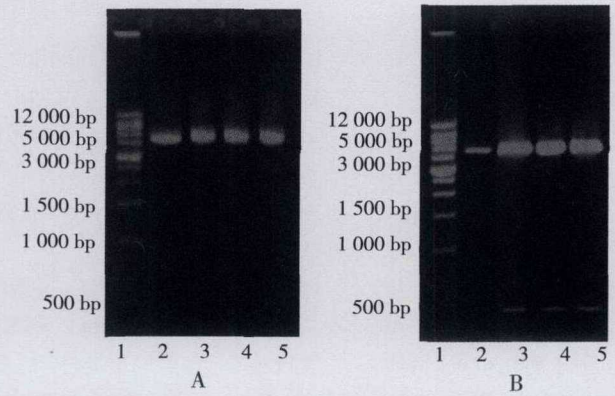
重组质粒内具有 EGFP 报告基因，荧光显微镜观察显示转染 24 h 后细胞中即有较多 EGFP 蛋白表达(显示绿色荧光)，转染 48 h 发光细胞数可达 90%(图 2)。说明对 UMR106 细胞，Lipofectamine™2000 具有很高的转染效率。

2.3 RT-PCR 检测 UMR106 细胞中 Ezrin mRNA

重组质粒 pshRNA-Villin2 转染 UMR106 细胞 48 h 后提取细胞总 RNA，RT-PCR 检测琼脂糖凝胶电泳结果表明(见图 3)：扩增的 Ezrin mRNA 电泳带存在明显差异。应用Quantity One 软件进行半定量分析，脂质体组、HK 阴性对照组、pshRNA1-Villin2 和 pshRNA2-Villin2 转染组 Ezrin 蛋白mRNA 表达分别为正常细胞的 99.23%、98.89%、23.12%和 30.25%。

2.5 Western blot 检测 UMR106 细胞中 Ezrin 蛋白的表达

Western blot 检测结果如图 4：pshRNA1-Villin2 和 pshRNA2-Villin2 转染组 Ezrin 的表达明显弱于正常细胞组，而脂质体组和 HK 阴性对照组与正常细胞组间无明显差异，说明 shRNA 干扰显著抑制了 Ezrin 蛋白的表达。半定量分析示脂质体组、HK 阴性对照组、pshRNA1-Villin2 和 pshRNA2-Villin2 转染组 Ezrin 蛋白表达分别为正常细胞的 99.02%、98.15%、25.32%和 35.56%。



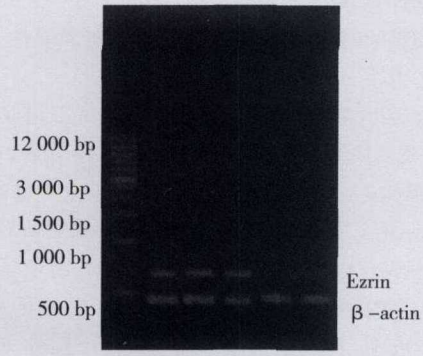
1.DNA marker；2. pGenesil-1；3. pshRNAHK-Villin2；4. pshRNA1-Villin2；5. pshRNA2-Villin2；A. *Sal* Ⅰ单酶切 B *Hand*Ⅲ和 *Xba* Ⅰ双酶切

图 1 重组质粒的酶切鉴定



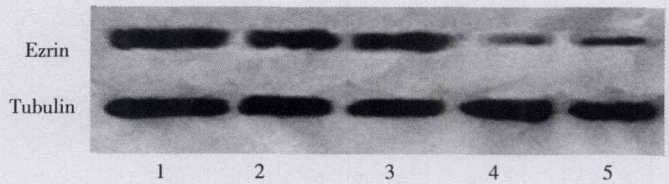
A. pshRNA1-Villin2; B. pshRNA2-Villin2; C. pshRNAHK-Villin2

图 2 转染 pshRNA-Villin2 48 h 后 UMR106 细胞胞浆中 EGFP 的表达(×100)



1. DNA marker；2. normal cell；3. Lipofectamine™2000；4. *pshRNAHK-Villin2*；5. *pshRNA1- Villin2*；6. *pshRNA2-Villin2*

图 3 RT-PCR 法检测 UMR106 细胞内 Ezrin 蛋白基因转录的抑制效果



1. normal cell；2. Lipofectamine™2000；3. pshRNAHK-Villin2；4. pshRNA1-Villin2；5. pshRNA2- Villin2

图 4 Western blot 法检测 UMR106 细胞内 Ezrin 蛋白的表达水平

3 讨 论

骨肉瘤是青少年最常见的恶性骨肿瘤，恶性程度高，约30%～40%患者5年内死亡[4]。肿瘤肺转移是骨肉瘤最主要的死亡原因。肿瘤的远处转移是一个多步骤、多环节共同参与的复杂过程，众多活性因子参与其中。Ezrin蛋白是Bretscher首先在鸡的小肠上皮细胞刷状缘中纯化的一种细胞膜与细胞骨架间的连接蛋白，参与细胞形态维持、运动、粘附、信号传递和生存等多种功能。已经发现Ezrin蛋白的高表达与胰腺癌、乳腺癌、卵巢上皮性癌、横纹肌肉瘤和子宫内膜癌等多种恶性肿瘤的预后和转移相关[1~3]。而且已有多项研究证实Ezrin在高转移骨肉瘤细胞株明显过度表达，与骨肉瘤的复发和转移密切相关[5~7]。小鼠肺转移模型进一步研究证实Ezrin能增强骨肉瘤细胞在肺内的生存能力，采用反义核酸技术和Ezrin-T567A无义突变体下调Ezrin表达能显著下调肿瘤细胞在肺内的存活能力[8]。因此，Ezrin可能成为基因治疗抑制骨肉瘤转移的一个靶点。

RNA干扰(RNA interference，RNAi)现象是由与靶基因序列同源的双链RNA(Double-stranded RNA，dsRNA)引发的广泛存在于生物体中的序列特异性基因转录后的沉默过程。RNAi是最近科学研究的一个重大发现，具有极其重要的理论和实际意义，已有多项研究证实瘤体内局部注射小干扰RNA(Small interfering RNA，siRNA)及相关转染试剂成功抵制了肿瘤的生长，延长了实验动物的存活时间[9~11]，在肿瘤的治疗方面具有光明的应用前景。

本研究针对Ezrin蛋白的编码基因Villin2设计并构建shRNA的表达载体，以期通过RNAi降低Ezrin蛋白的表达，减少骨肿瘤的肺转移，增加肿瘤的治愈率。我们按照Elbashir[12]及Reynolds[13]的原则进行设计的两个针对Villin2基因的siRNA序列，Reynolds方法评分均为6分，所得分数较高，可用于RNA干扰。

本研究采用Lipofectamine™2000将重组质粒转染进大鼠骨肉瘤细胞株UMR106细胞中，转染效率高，达90%。检测干扰效果结果表明：构建的两个针对Villin2重组质粒均能有效抑制UMR106细胞内Ezrin蛋白的表达，以pshRNA1-Villin2抑制作用最为明显。本实验成功构建了针对Villin2的siRNA表达载体，为进一步实验研究治疗骨肉瘤肺转移的方法奠定了基础。

参 考 文 献

[1] 丁雪松，秦治明.CD44V6.与Ezrin在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J].重庆医科大学学报，2009，34(7)：862-866.

[2] Elliott B E，Meens J A，SenGupta S K，et al.The membrane cytoskeletal crosslinker ezrin is required for metastasis of breast carcinoma cells[J]. Breast Cancer Res，2005，7(3)：R365-373.

[3] Kobel M，Langhammer T，Huttelmaier S，et al. Ezrin expression is related to poor prognosis in FIGO stage I endometrioid carcinomas[J]. Mod. Pathol，2006，19(4)：581-587.

[4] Bruce B，Khanna G，Ren L，et al. Expression of the cytoskeleton linker protein ezrin in human cancers [J].Clin Exp Metastasis，2007，24(2)：69-78.

[5] Park H，Cabrini R L，Araujo E S，et al. Expression of ezrin and metastatic tumor antigen in osteosarcomas of the jaw[J].Tumori，2009，95(1)：81-86.

[6] Xu-Dong S，Zan S，Shui-Er Z，et al.Expression of Ezrin correlates with lung metastasis in Chinese patients with osteosarcoma[J].Clin Invest Med，2009，32(2)：E180-88.

[7] Ferrari S，Zanella L，Alberghini M，et al. Prognostic significance of immunohistochemical expression of ezrin in non-metastatic high-grade osteosarcoma [J]. Pediatr Blood Cancer，2008，50(4)：752-756.

[8] Khanna C，Wan X，Bose S，et al. The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis [J]. Nat Med，2004，10(2)：182-186.

[9] Pille J Y，Denoyelle C，Varet J，et al. Anti-RhoA and anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro and in vivo [J].Mol Ther，2005，11(2)：267-274.

[10] Kim WJ，Christensen LV，Jo S，et al.Cholesteryl oligoarginine delivering vascular endothelial growth factor siRNA effectively inhibits tumor growth in colon adenocarcinoma[J].Mol Ther，2006，14(3)：343-350.

[11] 张晓静，葛银林，侯 琳，等.KDR为靶的siRNA抑制乳腺癌细胞增殖的体内外研究[J].细胞与分子免疫学杂志，2008，24(1)：58-61.

[12] Elbashir S M，Lendeckel W，Tuschl T. RNA interfering is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs[J].Genes Dev，2001，15(2)：188-200.

[13] Reynolds A，Leake D，Boese Q，et al. Rational siRNA design for RNA interference [J]. Nat. Biotechnol，2004，22(3)：326-330.

(责任编辑：关蕴良)