基础研究 文章编号:0253-3626(2010)02-0206-03

大鼠血管内皮生长因子 shRNA 表达质粒的构建及鉴定

费春梅,周善璧
(重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建大鼠血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)短发夹 RNA(Short hairpin RNA,shRNA)真核表达质粒,为利用 RNA 干扰技术(RNA interference, RNAi)从转录后水平抑制角膜新生血管的研究做准备。方法:用 DNA 重组技术根据大鼠 VEGF mRNA 序列设计并合成 3 条 shRNA 寡核苷酸片段,退火形成双链并克隆进入载体 pSilencer2.0 U6 中,进行酶切鉴定和测序。结果:酶切证明构建的 shRNA 序列已插入载体,经测序证明与设计的相同,获得大鼠 VEGF shRNA 表达质粒。结论:成功构建了 3 条大鼠 VEGF shRNA 真核表达质粒,为靶向 VEGF 的 RNAi 抑制角膜新生血管奠定了基础。

【关键词】血管内皮生长因子;RNA 干扰;质粒;shRNA
【中国图书分类法分类号】R772.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-17

Construction and identification of VEGF shRNA eukaryotic expression plasmid in rat

FEI Chun-mei, et al
(*Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct rat vascular endothelial growth factor short hairpin RNA eukaryotic plasmid expression vector, in order to provide a basis for inhibition of corneal neovascularization by RNA interference. *Methods*: Three different shRNAs targeting the coding sequence of the rat VEGF mRNA were designed. After annealing the formed double stranded DNAs were inserted into the plasmid pSilencer2.0 U6. Then the recombinant plasmids were identified by enzyme digestion and DNA sequencing. *Results*: The three VEGF shRNAs were successfully inserted into the plasmid vector, and the coding sequences of the obtained shRNAs were consistent with the designed fragments. *Conclusion*: The recombinant plasmids of VEGF shRNAs were successfully constructed, which will be useful to inhibit corneal neovascularization.

【Key words】VEGF; RNA interference; Plasmid; Short hairpin RNA

正常角膜无血管状态是维持角膜透明性的最重要因素之一,但在感染、外伤、免疫排斥反应和其他病理情况下,易形成新生血管,其不仅严重影响视力,而且是角膜移植的高危危险因素之一。最近研究显示,角膜新生血管形成可能与控制血管生成的血管生成因子和血管生成抑制因子平衡失调有关,而血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)在血管生成的生理和病理过程中起中心调控作用,因此,阻断 VEGF 的表达可有效抑制和消除角膜新生血管的形成。

RNA 干扰可以使靶基因的 mRNA 降解、组织或细胞中的靶基因表达减少或沉默。具有效果最强,持续时间长,甚至可持续至下一代;具有基因序列特异性,且可同时抑制多个基因,抑制效率互不干扰及不受注射部位的影响等优点。RNA 干扰自 1998 年发现以来[1],在哺乳动物细胞应用小干扰 RNA 介导 RNA 干扰取得了重大进展[2-4],应用小干扰RNA 介导 RNA 干扰在眼部的应用也取得了重大进展[5-7]。本实验拟构建以大鼠 VEGF 基因为靶向的 shRNA 真核表达质粒载体,使 VEGF 的表达减少或沉默,为利用基因沉默技术从转录后水平抑制角膜新生血管的研究做准备。

作者介绍:费春梅(1982-),女,硕士,
研究方向:眼表疾病与角膜移植。
通讯作者:周善璧,男,教授,E-mail:zhoushanbi@yahoo.com.cn。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂

pSilencer2.0 U6 质粒购自 Ambion 公司,*BamH* Ⅰ、*Hind* Ⅲ限制性核酸内切酶、DL 2000 DNA marker、T4 DNA 连接酶及缓冲液均购自大连 TaKaRa 公司,质粒小量提取试剂盒及 DNA 纯化回收试剂盒均购自 Omega 公司。

1.2 基因序列的选取及 shRNA 的设计

在 GeneBank 中查找大鼠 VEGFa 的 mRNA 全序列,基因

编号为 NM-031836，根据 Elbashir 等[2]提出的 shRNA 设计原则，选取 3 段含 23 个碱基的 VEGF 特异性靶序列作为 shRNA 目标序列（序列 1：5'-GCCCATGAAGTGGTGAAGTTCAT-3'，106~128 nt，G/C 含量 48%；序列 2：5'-GCCAGCACATAGGAGAGATGAGC-3'，338~360 nt，G/C 含量 57%；序列 3：5'-GCATAGCAGATGTGAATGCAGAC-3'，369~391 nt，G/C 含量 48%），同时按上述原则设计阴性对照序列。然后合成该目的序列的反向互补序列，5' 端为 *BamH* Ⅰ酶切位点（GATCC），中间由 7 nt 的发夹状序列（TCAAGAG）将此两段序列相连，形成茎环结构，3'端为 *Hind*Ⅲ（A）酶切位点，并加 5 个 T 作为 RNA 聚合酶Ⅲ的终止子，共形成 64 nt 的寡核苷酸正义链及其互补的反义链。合成的序列分别命名为 VEGF shRNA1，VEGF shRNA2，VEGF shRNA3，VEGF shRNA-NS。以上序列由上海捷瑞生物工程有限公司合成。其 DNA 结构为：*BamH* Ⅰ+Sense+[redacted]+Antisense+ 终止信号 + *Hind*Ⅲ，4 条 shRNA 序列分别如下：

VEGF shRNA1

Sense：5'-GATCCGCCCATGAAGTGGTGAAGTTCAT[redacted]ATGAACTTCACCACTTCATGGGCTTTTTA-3'

Antisense：3'-G[redacted]TACTTGAAGTGGTGAAGTACCCGAAAAATTCGA-5'

VEGF shRNA2

Sense：5'-GATCCGCCAGCACATAGGAGAGATGAGC[redacted]GCTCATCTCTCCTATGTGCTGGCTTTTTA-3'

Antisense：3'-G[redacted]CGAGTAGAGAGGATACACGACCGAAAAATTCGA-5'

VEGF shRNA3

Sense：5'-GATCCGCATAGCAGATGTGAATGCAGAC[redacted]GTCTGCATTCACATCTGCTATGCTTTTTA-3'

Antisense：3'-G[redacted]CAGAAGTAAGTGTAGACGATACGAAAAATTCGA-5'

VEGF shRNA-NS

Sense：5'-GATCCGGACTGTGCTATGCTCCAGTAGC[redacted]GCTACTGGAGCATAGCACAGTCCTTTTTA-3'

Antisense：3'-G[redacted]CGATGACCTCGTATCGTGTCAGGAAAAATTCGA-5'

1.3 编码 shRNA 序列的单链寡核苷酸片段的退火连接

分别用 TE buffer 165 μl 溶解上述合成的单链寡核苷酸片段；各取 4.5 μl，加入退火缓冲液（Annealing buffer）1 μl 混匀；再在 PCR 仪上进行以下循环：95℃ × 2 min→68℃ × 5 min→37℃ × 10 min→4℃ × 5 min；然后合成的片段储存于 -20℃以备用。

1.4 载体 pSilencer2.0 U6 质粒线形化处理及回收

在 20 μl 反应体系中分别加入：pSilencer2.0 U6 质粒（10 μl）+ *BamH* Ⅰ酶（2 μl）+ *Hind*Ⅲ酶（2 μl）+K buffer（2 μl）+ddH_2O（4 μl），37℃下反应 4 h 后，用 0.8%琼脂糖凝胶电泳，在凝胶成像系统的长波紫外灯下切下合成的线性质粒的凝胶，再用凝胶回收试剂盒回收。

1.5 退火片段与线性化质粒表达载体的连接及重组质粒的转化

在 10 μl 反应体系中分别加入：退火片段（6 μl）+ 线性化 pSilencer2.0 U6 质粒（2 μl）+ T4 DNA 连接酶（1 μl）+ T4 DNA 连接酶缓冲液（1 μl），16℃水浴反应 12 h。将反应后的 10 μl 连接产物加入至 100 μl DH5α 感受态细菌中，冰浴 30 min；42℃热休克 90 s；冰浴 2 min；加入 800 μl LB 培养液中，37℃振荡培养 60 min；取菌液涂于含氨苄青霉素的 LB 琼脂培养基上，37℃倒置培养 12~16 h，形成单个菌落；挑单个菌落于 5 ml 含氨苄青霉素的 LB 培养液中，37℃振荡培养 12 h；用小量质粒提取试剂盒提取质粒。

1.6 质粒 DNA 浓度测定

抽提的质粒 DNA 冰浴溶解后，应用分光光度计分别测定 260 nm，280 nm 处吸光度值（A）：A_{260} 和 A_{280}，根据 A_{260}/A_{280} 比值判断抽提质粒 DNA 纯度。质粒 DNA 浓度计算：将 A_{260} 定为 1 时 DNA 含量为 50 μg/ml，浓度（C）=A_{260} × 50 × 稀释倍数。

1.7 阳性克隆质粒的酶切

将重组的阳性克隆质粒用 *BamH* Ⅰ和 *Hind*Ⅲ进行酶切，双酶切反应体系：质粒 DNA（5 μl）+ *BamH* Ⅰ（1 μl）+ *Hind*Ⅲ（1 μl）+ 缓冲液 K（1 μl）+ddH_2O（2 μl），共 10 μl 反应体系充分混匀，37℃水浴箱中反应 2 h，取上述酶切产物和 DNA Marker 在 3.5%琼脂糖凝胶中电泳鉴定。

1.8 质粒测序分析鉴定

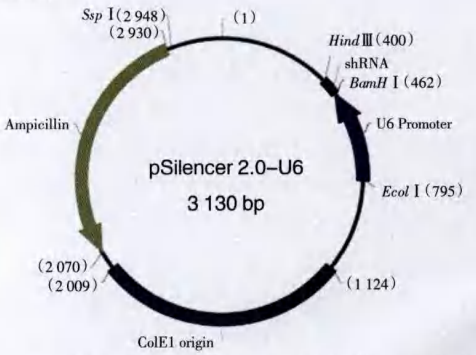
为进一步验证克隆进入质粒载体序列的准确性，将酶切后出现 64 bp 电泳条带的阳性重组质粒菌液送大连宝生物工程有限公司测序。

2 结 果

2.1 重组质粒构建模式图，质粒大小为 3 130 bp。见图 1。

2.2 质粒 DNA 浓度及纯度

所抽提的质粒 DNA 浓度在 340~370 ng/μl 之间，A_{260}/A_{280} 比值均为 1.82，说明所提质粒 DNA 纯度较高，含蛋白量极低。



Ampicilin 为氨苄青霉素抗性，shRNA 使用 U6 启动子

图 1 pSilencer2.0 U6 质粒结构图

2.3　重组质粒的酶切鉴定

4 种重组质粒经 *BamH* Ⅰ和 *Hind*Ⅲ双酶切后，均可以线性化且线性化后质粒大小约为 3 130 bp，双酶切下的小 DNA 片段大小约为 64 bp，与所设计插入的 shRNA 序列大小相一致。见图 2。

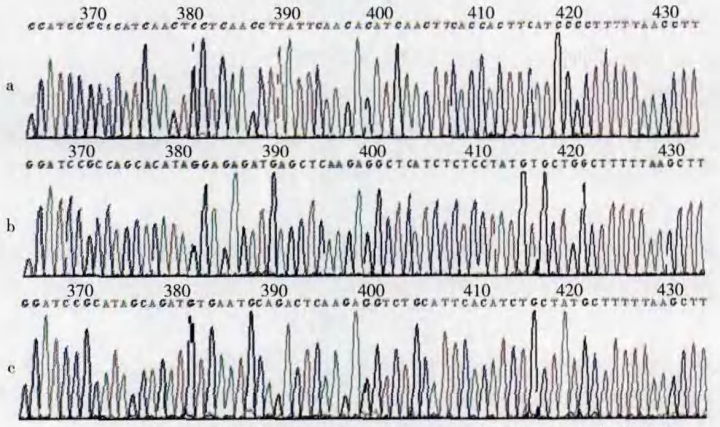


条带 M 为 DL2 000 Maker；条带 a、b、c 分别为质粒 VEGF，shRNA1、2、3 和 VEGF shRN-NS 经 *BamH* Ⅰ和 *Hind*Ⅲ双切酶后电泳图

图 2　重组质粒酶切鉴定电泳图谱

2.4　质粒测序结果

重组的阳性 shRNA 质粒的测序结果与我们设计合成的 shRNA 序列完全一致，序列无突变，见图 3。证明我们合成的靶向大鼠 VEGF 的 shRNA 序列已插入到载体 pSilencer2.0 U6 中，成功地构建了实验所需的重组质粒。



a、b、c 分别为质粒 VEGF shRNA1、2、3 插入的 shRNA 序列部分

图 3　重组质粒部分测序结果(插入 shRNA 序列)

3　讨　论

RNAi 是真核生物中普遍存在的一种自然现象，是机体为了抵抗病毒入侵的一种天然保护作用，它是由双链 RNA（Double stranded RNA，dsRNA）启动的序列特异的转录后基因沉默过程。双链 RNA 被核酸内切酶 Dicer 切割成有活性的 21~23 bp 小干扰 RNA(siRNA)，并与相关蛋白质结合成 RNA 诱导沉默复合物(siRNA induced silencing complex，RISC)，它识别并特异性降解靶 mRNA，从而导致靶基因的功能失活[8,9]。同时细胞内还存在信号扩增：即以 mRNA 为模板，shRNA 为引物，在 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RNA dependent RNA polymerase，RdRp)的作用下合成新的 dsRNA，新合成的 dsRNA 继续被 Dicer 酶所识别，切割产生更多的是 shRNA，新产生的 shRNA 与不同于 Dicer 酶的 RNA 酶结合，再次形成 RISC 复合物，继续降解靶 mRNA，产生级联放大效应[10]。RNAi 的一个显著特征是它的高效性，微量的 dsRNA 分子就可以完全使转录的靶 RNA 失去活性，并且这种失活状态可以延续的通过细胞分裂传递到未经处理的细胞和组织中，有的甚至可以传递数代。

不同序列 siRNA 诱导 RNAi 的效率有差异[11]，因此对 siRNA 的设计是进行 RNAi 过程中关键性的一步。一般 siRNA 的设计应遵循 Elbashir[2]等提出的设计原则，要点如下：从目标基因开放阅读框起始密码下游 75~100 个碱基位置开始，寻找“AA”二连序列后的 19~23 个碱基序列为目的序列，分析获得的序列，选择 GC 比例在 40%~55%之间的靶基因序列作为优选；设计 siRNA 时不要针对 5’和 3’端的非编码区；将潜在的序列和相应的数据库(人、小鼠或大鼠等等)进行比较，排除和其他编码序列 /EST 同源的序列，如使用 Blast 等。本实验按上述原则设计了针对 VEGF 的 3 条 shRNA 序列，合成了 3 条 64 nt 并含有 VEGF shRNA 序列的寡核苷酸，利用基因重组技术构建 RNAi 质粒。通过双酶切及测序鉴定，从插入基因序列、长度和插入方向上与实验设计完全一致，同时设计了通用的阴性对照质粒。利用载体表达出的 dsRNA 为发夹结构，与直接导入 siRNA 相比，DNA 质粒更易导入细胞内，而且质粒导入细胞后存在时间长且稳定，对靶基因的表达抑制效率高，便于进行较长时间的基因功能研究。实验中将上述 3 条寡核苷酸序列插入到 pSilencer2.0 U6 载体的 U6 启动子下游，在序列的下游加入 TTTTT 作为转录终止信号，U6 启动子能被 RNA 聚合酶Ⅲ识别，使用带有 U6 启动子的载体在转录短链 RNA 时具有很强的优势，并且倾向于从嘌呤碱基开始转录，其转录终止序列为 polyT[12]，限制了 RNA 的大小而不引起干扰素样的非特异作用。

RNA 干扰在哺乳动物细胞中一般使用浓度极低，由于 RNAi 有明显的级联放大效应，抑制靶向蛋白效果较反义技术可能要明显一些[13]。VEGF shRNA 质粒的成功构建，为大家了解该质粒的 RNA 干扰功能及其对 VEGF 功能影响的进一步研究奠定了基础，并为角膜新生血管的基因治疗提供了新的方法。

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]　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.

[3]　Salah Z，Maoz M，Pokroy E，et al.Protease-activated receptor-1 (hPar1)，a survival factor eliciting tumor progression[J].Mol Cancer Res，2007，5(3)：229-240.

[4]　Wang P，Wu P，Zhang J，et al.Positive regulation of tumor necrosis factor-alpha by ganglioside GM3 through Akt in mouse melanoma B16

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)02-0209-04

NS398 逆转溶血磷脂酸拮抗顺铂抑制卵巢癌细胞增殖作用的研究

熊学华,彭真年
(重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察环氧化酶-2(Cyclooxygenase-2,COX-2)抑制剂 NS398 对溶血磷脂酸(Lysophosphatidic acid,LPA)拮抗顺铂抑制卵巢癌细胞细胞增殖作用的影响,并探讨其可能机制。方法:体外培养人卵巢癌细胞 3AO,MTT 法检测 NS398 对 LPA 拮抗顺铂抑制 3AO 细胞增殖的影响;流式细胞仪检测细胞周期变化;RT-PCR 检测 LPA 单独或合用 NS398 对 3AO 细胞表达 COX-2 的影响。结果:LPA 对顺铂抑制卵巢癌细胞增殖有拮抗作用,并降低 G_0/G_1 期的细胞比率;联合用 NS398 后,卵巢癌细胞的生长显著受抑制, 同时 G_0/G_1 期细胞比率上升;RT-PCR 结果显示 40 μmol/L LPA 能促进 COX-2 的表达, 而合用 NS398 后 COX-2 表达降低。结论: NS398 可能通过抑制 COX-2 表达,实现逆转 LPA 拮抗顺铂抑制卵巢癌细胞细胞增殖的作用。

【关键词】溶血磷脂酸;环氧化酶-2;顺铂;NS398;3AO 细胞;卵巢癌
【中国图书分类法分类号】R737.31 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-10-08

Study of NS398 reversing the antergy of lysophosphatidic acid for the inhibiting effect of cisplatin in the proliferation of huanman ovarian cancer

XIONG Xue-hua, et al
(*Department of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of NS398, cyclooxygenase-2(COX-2)-inhibitor, on the antergy of lysophosphatidic acid (LPA) for the inhibiting effect of cisplatin(DDP) in the proliferation of huanman ovarian cancer , and to analyze its possible mechanism. *Methods*: Human ovarian cancer cell line(3AO) were cultured in vitro. The effect of NS398 on the antergy of LPA for the inhibiting effect of DDP in the proliferation of 3AO cells were measured by MTT. Cell cycle of 3AO were analysed by flow cytometry (FCM). The effect of LPA alone or in combination with NS398 on the expression of COX-2 of 3AO cells were measured with RT-PCR. *Results*: LPA showed antergy on the inhibiting effect of DDP in the proliferation of 3AO cells, and decrease the proportion of cells in the G_0/G_1 phase of the cell cycle. Whereas, combined with NS398 in culture, the proliferation of were significantly inhibited, and the the proportion of cells in the G_0/G_1 phase of the cell cycle was raised. RT-PCR results revealed that 40 μ mol/L LPA could promote the expression of COX-2 in 3AO cells, and in combination with NS398, the expression of

作者介绍:熊学华(1981-),男,硕士,
研究方向:妇产科肿瘤。
通讯作者:彭真年,男,副教授,E-mail:pznpeng@Hotmail.com。

cells[J].Biochem Biophys Res Commun,2007,356(2):438-443.
[5] Samuel J. Reich, Joshua Fosnot, et al.Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model[J].Molecular Vision,2003,9:210-216.
[6] Cashman SM, Bowman L, Christofferson J, et al.Inhibition of choroidal neovascularization by adenovirus-mediated delivery of short hairpin RNAs targeting VEGF as a potential therapy for AMD[J].Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006,47(8):3496-3504.
[7] Seta F, Patil K, Bellner L, et al.Inhibition of VEGF expression and corneal neovascularization by siRNA targeting cytochrome P450 4B1[J] Prostaglandins Other Lipid Mediat,2007,84(3-4):116-127.
[8] Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, et al.RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals[J].Cell,2000,101(1):25-33.
[9] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T.RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs[J].Genes Dev,2001,15(2):188-200.
[10] Lipardi C, Wei Q, Paterson BM.RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs[J].Cell,2001,107(3):297-307.
[11] Hohjoh H.RNA interference (RNA (i)) induction with various types of synthetic oligonucleotide duplexes in cultured human cells[J]. FEBS Lett,2002,521(1-3):195-199.
[12] Miyagishi M, Taira K.U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells[J].Nat Biotechnol,2002,20(5):497-500.
[13] Sijen T, Fleenor J, Simmer F, et al.On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing[J].Cell, 2001,107(4):465-476.

(责任编辑:关蕴良)