维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)04-0399-04

RNA 干扰 EGFR 基因家族真核表达载体的构建

黄 环[1],吴永忠[2],李少林[3],郭启帅[1],林远洪[1],彭志平[3]

(1.重庆医科大学附属第一医院肿瘤科,重庆 400016;2.重庆市肿瘤研究所,重庆 400030;
3.重庆医科大学基础医学院放射医学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建针对表皮生长因子受体(Epidermal growth factor recepter,EGFR)家族的小分子发夹状 RNA(Small hairpin RNA,shRNA)干扰质粒表达载体,为本课题下一步研究提供有力工具。方法:选择放疗不敏感的卵巢癌细胞 SKOV3 中高表达的 EGFR 家族同源性基因为靶基因,根据 shRNA 的设计原则,设计实验组及对照组 shRNA。体外合成 2 段编码短发夹 RNA 序列的 DNA 单链,退火,克隆到相应载体 pGensil-1 的 pol Ⅲ启动子下游。结果:经酶切和 DNA 测序鉴定成功构建了 EGFR 家族同源性基因的 RNA 干扰表达载体,分别命名为 pGensil-1-E 及 pGensil-1-C。为下一步体外、体内实验奠定了基础。

【关键词】EGFR 家族;RNA 干扰;真核细胞表达载体
【中国图书分类法分类号】Q784 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-10

Construction of eukaryotic expression plasmid experssing shRNA targeting EGFR gene family

HUANG Huan,et al

(*Department of Oncology,the First Affiliated Hospital,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To construct the eukaryotic expression plasmid expressing shRNA targeting EGFR gene family as a tool for following experiments in vitro and in vivo. *Methods*:EFGR family highly expressed in low radiosensitive ovarian cancer cells SKOV3,chosen highly expressed homologous genes in EFGR family as targeted gene. According to guidelines for shRNA design,designed experimental shRNA and negative control shRNA. In vitro synthesized 2 of the coding sequence of short hairpin RNA DNA single-strands,annealing,and cloned into the corresponding vector pGensil-1 of pol Ⅲ promoter downstream,named pGensil-1-E and pGensil-1-C. Confirmed by restrict endonuclease digestion and DNA sequencing. *Conclusions*:Eukaryotic expression plasmid experssing shRNA targeting homologous genes in EFGR family was constructed successfully.

【Key words】EFGR family;RNA interference;Eukarvotic expression vector

妇科恶性肿瘤是危及妇女生命的顽症。三大妇科恶性肿瘤分别是宫颈癌、卵巢癌和子宫内膜癌。而卵巢癌是妇科恶性肿瘤中死亡率最高的肿瘤。因卵巢癌临床早期无症状,鉴别其组织类型及良、恶性相当困难,卵巢癌行剖腹探查术中发现肿瘤局限于卵巢的仅占 30%,大多数已扩散到子宫,双侧附件,大网膜及盆腔各器官,所以卵巢癌无论在诊断和治疗上确是一大难题。5 年生存率仅 25%~30%。由于卵巢恶性肿瘤其病理类型复杂,定性、定位诊断及分期未经腹腔镜或剖腹探查,难以明确。

作者介绍:黄 环(1981-),女,硕士,
研究方向:基因放疗增敏。
通讯作者:吴永忠,男,主任医师,教授,E-mail:cqmdwyz@yahoo.com.cn。
基金项目:重庆市自然科学基金资助课题(2005-BB-5134)。

RNA 干扰(RNA interference,RNAi)是近年来研究的热点。与传统的基因治疗方式相比,RNAi 具有的高效性、高遗传性、特异性高的特点,使其在癌基因组功能研究和肿瘤基因治疗中已显示出其强大的效果。RNAi 可以利用基因家族中多个基因具有一段同源性很高的保守序列这一特性,针对这一区段序列设计相应的双链 RNA(Double strand RNA,dsRNA)分子。这样,只需要注射一种 dsRNA 分子即可产生多个基因同时剔除的表现。也可同时注射多种 dsRNA 而将多个序列不相关的基因同时剔除。RNAi 可用于抗肿瘤药物的筛选[1],促进肿瘤细胞凋亡,显著抑制细胞增长[2]。应用 RNAi 还可以提高肿瘤细胞对化疗的敏感性[3]及对放疗的敏感性[4]。RNAi 中发

维普资讯 http://www.cqvip.com

挥作用的小分子 siRNA 的制备较常用方法有:化学合成、体外转录、长片断 dsRNAs 经 RNase Ⅲ降解体外制备 siRNA 以及通过 siRNA 表达质粒载体或者病毒载体,PCR 制备的 siRNA 表达框在细胞中表达产生 siRNA。本实验选择常用的质粒表达载体,因为质粒表达载体的优点是可以进行较长期研究,带有抗生素标记的载体可以在细胞中持续抑制靶基因的表达,持续数星期甚至更久。以 EGFR 家族中高度同源的基因序列为靶序列,构建及验证了 shRNA 质粒表达载体。为本课题下一步体外、体内实验提供了有力的工具。

1 材料方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5α,由本实验室保存。真核表达质粒 pGensil-1 购于武汉晶赛生物工程技术有限公司,对照质粒 HK 由该公司赠送。T4 DNA Ligase,限制性内切酶 *BamH* Ⅰ、*Sal* Ⅰ、*Hind* Ⅲ及质粒提取试剂盒购于大连宝生物工程有限公司。胶回收试剂盒购于 invitrogen 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 靶点的选择和 EGFR 基因家族同源序列 RNAi 寡核苷酸的合成 根据 RNAi 的设计原则及质粒 Pgenesil-1 的多克隆位点(MCS)特点,选择 EGFR 家族同源性基因片段(TGGGGTCGTCAAAGACGTT)为模板,设计引物结构为:*BamH* Ⅰ+Sense+Loop+Antisense+终止信号+*Sal* Ⅰ+*Hind* Ⅲ。质粒 Pgenesil-1 的多克隆位点(MCS)为:(-*Hind* Ⅲ-ShRNA-*BamH* Ⅰ-U6 Promotor-*EcoR* Ⅰ-*Sal* Ⅰ-*Xba* Ⅰ-Dra Ⅱ-)。在插入的目的基因片段里,设计了 1 个 *Sal* Ⅰ的酶切位点,插入在质粒 Pgenesil-1 的 *BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ之间,如若插入正确,就能被 *Sal* Ⅰ酶切出 1 条约 400bp 的 DNA 小带。本实验构建了 2 个表达载体,干扰 EGFR 家族的 pGensil-1-E 及对照 pGensil-1-C。DNA 模板引物如下:

pGensil-1-E-A

5'-GATCCGTGGGGTCGTCAAAGACGTTCTATGGACAAACGTCTTTGACGACCCCATTTTTTGTCGACA-3';

pGensil-1-E-B

5'-AGCTTGTCGACAAAAAATGGGGTCGTCAAAGACGTTTGTCCATAGAACGTCTTTGACGACCCCACG-3';

将 DNA 模板引物随机排列后与基因库做 Blast 比对,无明显同源性后设计阴性对照如下:

pGensil-1-C-A

5'-GATCCGCAGGTGCGGAATATCTGTTTCAAGACGACAGATATTCCGCACCTGCTTTTTTGTCGACA-3';

pGensil-1-C-B

5'-AGCTTGTCGACAAAAAAGCAGGTGCGGAATATCTGTCGTCTTGAAACAGATATTCCGCACCTGCG-3';

以上引物交大连宝生物公司合成。

1.2.2 单链目的基因片段的退火连接 各用 50μl annealing buffer 溶解上述合成 2OD 单链目的基因片段。各取 2μl(即 2μl A 链 +2μl B 链)+16μl annealing buffer 混匀。94℃水浴退火自然冷却至室温。各取 1μl 退火产物 +99μl H_2O 做 100 倍稀释储存备用。

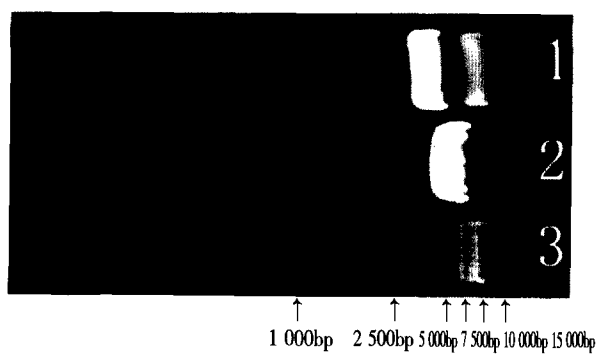
1.2.3 稀释退火片段与线性化 Pgenesil-1 质粒表达载体的连接 质粒 Pgenesil-1 的 *BamH* Ⅰ+*Hind* Ⅲ双酶切,1%琼脂糖凝胶回收大片段。反应条件:Pgenesil-11ug,10×M Buffer 2μl,*BamH* Ⅰ 1μl,*Hind* Ⅲ 1μl,加 ddH_2O 至 20μl,37℃水浴过夜。连接反应条件:稀释退火片段 1μl,线性化 Pgenesil-1 质粒载体 1μl,10×Ligase Buffer 1μl,T4 DNA Ligase 1μl,ddH_2O 6μl 22℃水浴反应过夜。

1.2.4 连接产物转化感受态大肠肝菌 DH5α 及阳性克隆的鉴定 各取 5μl 过夜连接产物转化感受态细胞 DH5α,分别涂布于含 Kanar 抗性(终浓度为 30μg/ml)的 LB 平板上,37℃恒温箱培养过夜。从培养皿上各挑取 3 个单克隆菌落接种于 3ml 含 Kanar 抗性(终浓度为 30μg/ml)的 LB 培养液中,37℃恒温摇床(250r/min)培养过夜。提取质粒后,分别用 *Sal* Ⅰ做酶切鉴定。反应条件:质粒 DNA 8μl,10×H Buffer 1μl,*Sal* Ⅰ 1μl,37℃水浴反应 3h,1% Agase 凝胶电泳。

2 结 果

2.1 质粒 Pgenesil-1 的 *BamH* Ⅰ+*Hind* Ⅲ双酶切,1%琼脂糖凝胶回收大片段

2.2 重组质粒酶切鉴定 1% Agase 凝胶电泳



1.Pgenesil-1 质粒; 2.线性化 Pgenesil-1 质粒(用 *BamH* Ⅰ+*Hind* Ⅲ双酶切); 3.DL15 000; Marker.15 000bp、10 000bp、7 500bp、5 000bp、2 500bp、1 000bp

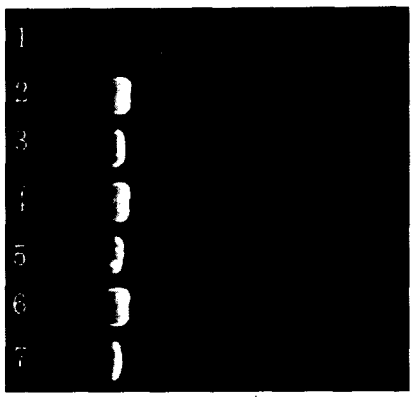
图 1 质粒酶切电泳图

电泳图谱(见图 2)。

2.3 测序报告

斜体字体为设计序列

维普资讯 http://www.cqvip.com



约 400bp

1.DL2000 Marker;2 000bp、1 000bp、750bp、500bp、250bp、100bp; 2.pGensil-1-E;3.pGensil-1-E *Sal* Ⅰ;4.pGensil-1-C;5.pGensil-1-C *Sal* Ⅰ;6.HK;7.HK *Sal* Ⅰ

图 2 重组质粒酶切鉴定

pGensil-1-E-B

GGTTaCAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTC ACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGT GGTTTGTCCAAA

CTCATCAATGTATCTTAACGCGTCCCGGGA*AG CTTGTCGACAAAAAAATGGGGTCGTCAAAGACGTTT GTCCATAGAACGT*

*CTTTGACGACCCCACG*GATCCCGCGTCCTTTC CACAAGATATTTAAACCCAAGAAATCGAAATACT TTCAAGTTACGGTA

AGCATATGATAGTCCATTTTAAAACATAATTT TAAAACTGCAAACTACCCAAGAAATTATTACTTTC TACGTCACGTATT

TTGTACTAATATCTTTGTGTTTACAGTCAAATT AATTCTAATTATCTCTCTAACAGCCTTGTATCGTAT ATGCAAATATG

AAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCTTCCTG CCCGACCTTGGCGCGCGCTCGGCGCGCGGTCACG CTCCGTCACGTGGGG

CGTTTTGCCTGCGCGTCTTTCCACTGGGGGAA TTCGTCGACTCTAGACACTACGTGAACCATCACCC TAATCAAGTTTTT

TGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCG GAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTA-GAGCTTGACG GGGAAAGCCGGCG

AACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCG AAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAG CGGTCACGCTGCGCGT

AACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCG CTACAGGGCGCGACAGGTGGCACTTTTCGGGGAA ATGTGCGCGGAACCC

CTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATA TGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATG CTCA

pGensil-1-C-B

TGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAAT TTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGT TGTGGTTTGTCCA

AACTCATCAATGTATCTTAACGCGTCCCGGGA *AGCTTGTCGACAAAAAAAGCAGGTGCGGAATATCT GTCGTCTTGAAACA*

*GATATTCCGCACCTGCG*GATCCCGCGTCCTTT CCACAAGATATATAAACCCAAGAAATCGAAATAC TTTCAAGTTACGGT

AAGCATATGATAGTCCATTTTAAAACATAATT TTAAAACTGCAAACTACCCAAGAAATTATTACTTT CTACGTCACGTAT

TTTGTACTAATATCTTTGTGTTTACAGTCAAAT TAATTCTAATTATCTCTCTAACAGCCTTGTATCGTA TATGCAAATAT

GAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCTTCCT GCCCGACCTTGGCGCGCGCTCGGCGCGCGGTCAC GCTCCGTCACGTGGT

GCGTTTTGCCTGCGCGTCTTTCCACTGGGGGA ATTCGTCGACTCTAGACACTACGTGAACCATCACC CTAATCAAGTTTT

TTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATC GGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTG ACGGGGAAAGCCGGC

GAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGC GAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTA GCGGTCACGCTGCGCG

TAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCC GCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGA AATGTGCGCGGAACC

CCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAAT ATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAAT GCTTCAATAATA

TTGAAAAAGGAAGAGTCCTGAGGCGGAAAG AACCAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTG

维普资讯 http://www.cqvip.com

GAAAGTCCCCAGGCTC

CCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAAG

CAGAAGTATGCAAAGCATGCATCCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCGCCCCTAACT

CCGGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATG

3 讨 论

图 1 中,线性化质粒与超螺旋质粒相比,电泳速度较慢,在大约 4 900bp 的位置,符合二者的特点,初步鉴定线性化质粒酶切成功,为下一步重组载体的构建打下了基础。在插入的目的基因片段里,设计了一个 *Sal* Ⅰ的酶切位点,插入在质粒 Pgenesil-1 的 *BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ之间,如若插入正确,就能被 *Sal* Ⅰ酶切出 1 条约 400bp 的 DNA 小带。图 2 中,在 400bp 的位置,可见 DNA 条带,酶切鉴定重组质粒构建成功。通过测序鉴定,如结果中斜体部分和设计的序列 pGensil-1-E-B 5'-AGCTTGTCGACAAAAAATGGGGTCGTCAAAGACGTTTGTCCATAGAACGTCTTTGACGACCCCACG-3 与 pGensil-1-C-B 5'-AGCTTGTCGACAAAAAAGCAGGTGCGGAATATCTGTCGTCTTGAAACAGATATTCCGCACCTGCG-3'分别相同,表明 2 个重组质粒载体 pGensil-1-E 和 pGensil-1-C 构建成功,为本课题下一步的实验研究打下了坚实的基础。

目前卵巢癌的治疗以手术为主,辅以化疗及放疗。放疗对卵巢癌的治疗作用似乎不突出。但近年来一些研究表明,放疗在卵巢癌的复发及姑息治疗中,有效控制了病程进展,减轻了自觉症状及提高生存率。Rades D 等[5]研究表明:放疗对卵巢癌脊髓转移受压的病人是一种有效的治疗方式,可促进运动功能的恢复及防止进一步恶化。EC 等[6]在 13 年间对 53 个复发或术后残留的卵巢癌病人研究表明,姑息放疗可以有效缓解患者的出血和疼痛症状。缓解率分别为 88%和 65%。对伴有其它症状的放疗剂量应该更高以获得更长的生存期。

上述报道均伴有不同程度的毒副作用,如早期的恶心、呕吐等胃肠道反应及粒细胞减少等,严重晚期出现肠粘连、肠梗阻需要手术解决。毒副作用的出现和放疗剂量成正相关,RNAi 技术在提高肿瘤细胞的放疗敏感性的研究中,已取得显著成果。如 Guan HT 等[7]发现导入胰腺癌细胞存活素表达的干扰载体后配合放射治疗后显著提高了细胞凋亡率。Wang T 等[8]研究发现抗辐射的乳腺癌细胞 MCF7 中过氧化物酶家族的成员之一 peroxiredoxin Ⅱ在电离辐射后表达增加,其它抗辐射的细胞株中也有类似发现,提示其在消除辐射后细胞产生的活性氧中扮演了重要角色。而干扰 peroxiredoxin Ⅱ的表达后可逆转细胞的抗辐射性。RNAi 有望使肿瘤放射治疗剂量降低,从而降低放疗的毒副作用及并发症。

很多研究表明大多数肿瘤的生长和存活依赖于多个信号途径的激活。因此,需要肿瘤的研究治疗需要多靶抑制或联合靶点抑制。由于 EGFR 家族在细胞增殖、存活和分化中的重要作用,是目前研究最多的信号传导途径之一。本实验已成功构建了针对 EGFR 家族的 shRNA 质粒表达载体,有望在下一步实验中取得卵巢癌治疗的新突破。

参 考 文 献

[1] Iorns E,Lord CJ,Turner N,et al. Utilizing RNA interference to enhance cancer drug discovery[J]. Nat Rev Drug Discov,2007;6(7):556-568.

[2] Lea JS,Sunaga N,Sato M,et al. Silencing of HPV 18 oncoproteins With RNA interference causes growth inhibition of cervical cancer cells[J]. Reprod Sci,2007;14(1):20-28.

[3] Mei YP,Zhou JM,Wang Y,et al. Silencing of LMP1 induces cell cycle arrest and enhances chemosensitivity through inhibition of AKT signaling pathway in EBV-positive nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Cell Cycle,2007;6(11):1379-1385.

[4] Shi M,Guo XT,Shu MG,et al. Enhancing tumor radiosensitivity by intracellular delivery of survivin antagonists[J]. Med Hypotheses,2007;68(5):1056-1058.

[5] Rades D,Schild SE,Dunst J,et al. Radiotherapy is effective for metastatic spinal cord compression in patients with epithelial ovarian cancer[J]. Int J Gynecol Cancer,2007;17(1):263-265.

[6] E C,Quon M,Gallant V,et al. Effective palliative radiotherapy for symptomatic recurrent or residual ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol,2006;102(2):204-209.

[7] Guan HT,Xue XH. Down-regulation of survivin expression by small interfering RNA induces pancreatic cancer cell apoptosis and enhances its radiosensitivity[J]. World J Gastroenterol,2006;12(18):2901-2907.

[8] Wang T,Tamae D. The role of peroxiredoxin Ⅱ in radiation-resistant MCF-7 breast cancer cells[J]. Cancer Res,2005;65(22):10338-10346.

(责任编辑:谭乐勤)