维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)08-0822-04

RNA 干扰技术抑制鼻咽癌细胞内源性绿色荧光蛋白的表达

王祎琴[1],彭 惠[2],洪苏玲[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉头颈外科;2. 重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立稳定表达绿色荧光蛋白(GFP)的鼻咽癌细胞株;观察不同转染浓度的短发卡状 RNA 对鼻咽癌细胞内源性 GFP 的抑制效率及细胞毒性。方法:转染 pEGFP-N1 至鼻咽癌细胞株 HNE1,G418 筛选获得稳定表达 GFP 的 HNE1-GFP 细胞株;利用针对 GFP 基因的短发卡状 RNA 表达载体 shGFP,以不同浓度 shGFP 转染 HNE1-GFP,荧光显微镜观察细胞荧光强度,软件分析荧光抑制效率,MTT 检测细胞毒性,RT-PCR 检测 GFPmRNA 水平改变,Western Blot 检测 GFP 蛋白水平改变。结果:绿色荧光稳定表达于传代 HNE1 细胞中; shGFP 能够显著抑制该细胞中 GFP 的表达,抑制效率分别为 49.7%,84.8%,86.7%且无细胞毒性;GFP 在 mRNA 和蛋白水平的表达均有明显下降。结论:稳定表达 GFP 的鼻咽癌细胞株成功建立;RNA 干扰载体可抑制鼻咽癌细胞中 GFP 的表达,其抑制效率有明显的浓度依赖性且无明显细胞毒性。该系统能够用于鼻咽肿瘤的 RNA 干扰机制研究中。

【关键词】鼻咽肿瘤;绿色荧光蛋白;短发卡状 RNA;RNA 干扰

【中国图书分类法分类号】R739.63 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-11-03

The inhibition of intrinsic expression of GFP in nasopharyngeal carcinoma by RNA interferencing

WANG Yiqin, et al

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

【Abstract】*Objective*: To construct a nasopharyngeal carcinoma cell strain expressing GFP stably and observe the inhibition effect and cytotoxicity of short hairpin RNA targeting the intrinsic GFP. *Methods*: HNE1 cells transfected with pEGFP-N1 were followed by the screening with G418 to obtain the stable nasopharyngeal carcinoma cell strain expressing GFP(HNE1-GFP); shGFP, a vector expressing short hairpin RNA targeting GFP, was transfected into HNE1-GFP with various levels. The fluorescence was observed by fluorescent microscope. The inhibition ratios and cytotoxicity of shRNA were analyzed by software and MTT, respectively; The protein and mRNA level of GFP were detected by Western Blot and RT-PCR, respectively. *Results*: The GFP gene was expressed stably within HNE1-GFP cell line; shGFP suppressed the intrinsic expression of GFP with the ratios of 49.7%, 84.8% and 86.7% , respectively, without significant cytotoxicity. *Conclusion*: A nasopharyngeal carcinoma cell strain expressing GFP stably is established successfully; The inhibition effect of RNA interference is demonstrated in nasopharyngeal carcinoma cells and it is characterized by the significant concentration dependence and rare cytotoxicity.

【Key words】 Nasopharyngeal neoplasms; Green fluorescent protein; Short hairpin RNA; RNA interference

RNA 干扰(RNA interferencing,RNAi)是短双链 RNA 即小干扰 RNA (small interferencing RNA, siRNA) 介导的对同源基因转录后水平的抑制作用[1],是细胞发育基因水平的重要调节方式和宿主抵抗病毒感染的一种重要手段[2],也成为基因组功能研究及基因治疗的重要工具。绿色荧光蛋白(GFP)是分子量为 27ku 的胞浆蛋白。GFP 对细胞无毒性,其表达可用荧光显微镜直接观察,因此作为报告基因广泛应用于基因工程实验中。本实验将 GFP 基因整合进 HNE1 细胞基因组,建立了稳定表达 GFP 的鼻咽癌细胞株(HNE1-GFP);利用前期构建的针对 GFP 的短发夹状 RNA (small hairpin RNA,shRNA) 的表达载体 shGFP, 观察不同浓度 shGFP 对 HNE1-GFP 表达的抑制作用和细胞毒性大小,从而建立一个直观稳定的 RNA 干扰实验体系,为进行 RNA 干扰的机制研究奠定基础。

作者介绍:王祎琴(1978-),女,博士,
主要研究方向:鼻咽癌发病机制和基因治疗。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

质粒 pEGFP-N1,pTZU6+1,JM109 菌株为重庆医科大学感染性疾病分子生物学重点实验室保存提供。*Taq* DNA 聚合酶,dNTP 及相应 buffer,限制性内切酶 *Sal* I、*Xba*I 及相应 buffer,T4 连接酶均购自 Takara 公司。质粒小量抽提试剂盒,PCR 产物纯化及胶回收试剂盒为 omega 产品。细胞转染用 Lipofectamine2000 reagent 为 invitrogen 公司产品。人鼻咽癌细胞株 HNE1 为重庆医科大学检验系保存。细胞培养用小牛血清为杭州四季青公司产品。细胞基因组 DNA 提取试剂盒购自天为时代公司。RNA 提取试剂 Trizol,MTT 试剂均购自北方同正公司, RT-PCR 试剂盒(二步法)为 TOYOBO 公司产品。兔抗 GFP 抗体(一抗)为美国 BD 公司产品;兔抗 actin 抗体(一抗),HRP 标记的羊抗兔 IgG(二抗)和浓缩型 DAB 试剂盒购自北京中山生物技术公司。其余常用试剂均自行配制。

1.2 载体构建

根据 shRNA 的设计原则[3] ,化学合成特异性针对 GFP 编码区 126～144bp 的 siRNA 片段,如下:

5'-TCGAGGCTGACCCTGAAGTTCATCGAGTACTGGATGAACTTCAGGGTCAGCTTTTT-3'

5'-CTAGAAAAAGCTGACCCTGAAGTTCATCCAGTACTCGATGAACTTCAGGGTCAGCC-3'

取等量 100mmol/L 的 DNA 片段混合, 在退火缓冲液(100mmol/L NaCl)中 95℃加热 5min,缓慢降至室温,乙醇沉淀法纯化 DNA 双链。双链 DNA 片段与用 *Sal* I 和 *Xba* I 双酶切的转录载体 pTZU6+1 进行连接, 转化大肠埃希菌 JM109,Amp 抗性筛选,阳性克隆(shGFP)送庆医科大学感染性疾病分子生物学重点实验室测序,鉴定序列正确性。

1.3 稳定表达 GFP 的细胞株的建立

1.3.1 细胞转染 选择生长状态良好的 HNE1 细胞,以 1×10^5 个细胞/孔接种 24 孔细胞培养板,待细胞生长到 90%左右时, 用 invitrogen 公司 Lipofectamine2000 阳离子脂质体转染试剂,将质粒 pEGFP—N1 转染细胞。转染时,每孔脂质体用量为 2μl,质粒为 0.8μg。

1.3.2 G418 筛选阳性细胞克隆 转染后换用含 1000μg/ml G418,20%小牛血清以及青链霉素的细胞培养液继续培养。荧光显微镜观察 GFP 表达情况。2、3 周未发荧光细胞死亡,表达 GFP 的细胞形成肉眼可见的细胞团, 在荧光显微镜下挑取荧光表达强烈的单个细胞团接种至 96 孔板, 并继续用相同细胞培养液筛选。至细胞生长密度达 90%时传代至 24 孔板,6 孔板及 100ml 培养瓶,扩大培养后液氮冻存。

1.3.3 PCR 鉴定基因整合 利用细胞基因组 DNA 提取试剂盒提取细胞基因组 DNA, 进行 PCR 鉴定 GFP 基因的存在,正常 HNE1 细胞为对照。上游引物为 5'-GATGGTACCCTATGGTGAGCAAGGGC-3', 下游引物为 5'-GACAGTACTGCTTGTACAGCTCGTCCA-3',产物长度约 0.7kb。PCR 反应体系为 25μl:*Taq* buffer2.5μl,$MgCl_2$ 2μl,dNTP(2.5mmol/L each) 2μl,上下游引物(20umol/L)各 1μl,模板 DNA 1μg,Taq 聚合酶 1U,ddH_2O 补足至 25μl。反应条件为:94℃5min;94℃ 30s,57℃30s,72℃30s,循环 35 次后 72℃保温 10min。PCR 扩增产物以 1.5%低熔点琼脂糖凝胶电泳,成像鉴定。

1.4 MTT 比色实验观察 shGFP 载体在鼻咽癌细胞中的细胞毒性

细胞转染将状态良好的 HNE1-GFP 细胞按 1×10^4 个细胞/孔接种 96 孔板,待细胞生长到 90%左右时进行转染,每孔脂质体用量为 0.5μl, 干扰质粒 shGFP 设为 3 个浓度级别:2:5,1:3,1:5,对照质粒 pTZU6+1 4.0μg,未转染细胞为空白对照。

96 孔板细胞转染后继续培养至第 3 天, 每个浓度级别及对照组分别随机选取 3 孔,加入 MTT 溶液(5mg/ml)20μl, 37℃培养 4h 后终止培养, 弃上清, 每孔加入 150μl DMSO 振荡 10min。选择 490nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值,记录结果。

1.5 shGFP 对鼻咽癌细胞内源性 GFP 表达的干扰作用

1.5.1 细胞转染 将状态良好的 HNE1-GFP 细胞按 5×10^5 个细胞/孔接种 6 孔板, 待细胞生长到 90%左右时进行转染,每孔脂质体用量为 10μl,对照质粒 pTZU6+1 4.0μg,干扰质粒 shGFP 设为 3 个浓度级别:2:5,1:3,1:5。

1.5.2 荧光显微镜观察细胞荧光表达 细胞转染后分别于 24h,48h,72h 及 96h 观察绿色荧光蛋白的表达情况,利用荧光分析软件计算荧光抑制效率。

1.5.3 RT-PCR 检测 GFP mRNA 水平 6 孔板细胞转染后继续培养至 96h,收集细胞。用 Trizol 试剂提取各浓度组别及对照组别细胞总 RNA。 按照 RT-PCR 试剂盒 (二步法)说明得到基因组 cDNA,再以甘油三磷酸脱氢酶(G3PDH)基因为内参, 扩增 GFP 目标基因。GFP 基因的上游引物为 5'-GTAGCGGCTGAAGCACTGCA-3',下游引物为 5'-GTCCA TG CCGAGAGTGAT-3',扩增产物为 5.0kb。hG3PDH 的上游引物为 5'ACCACAGTCCATGCCATCAC 3',下游引物为 5'TCC ACCACCCTGTTGCTGTA3',扩增产物为 0.45kb。RT 反应体系如下:5×TOYOBO RT Buffer 4μl,dNTP Mix 2μl,RNAase Inhibitor 1μl,Random Primer 1μl,细胞总 RNA10μl,ReverTra Ace 1μl,ddH_2O 补足至 20μl。反应条件:30℃ 10min;42℃ 20min;99℃ 5min;4℃ 5min。GFP 目标基因和内参 PCR 反应体系如下:10×Taq buffer 2.5μl, dNTP Mix 2μl ,GFP 基因和 G3PDH 基因上下游引物均分别 1μl,cDNA 模板 5μl,Taq 酶 0.25μl,ddH_2O 补足至 25μl。反应条件: 94℃ 3min;94℃ 40s,58℃ 40s,72℃ 75s,循环 35 次后 72℃保温 10min。PCR 扩增产物以 2.5%低熔点琼脂糖凝胶电泳,成像鉴定。

1.5.4 Western Blot 检测 GFP 蛋白表达水平 6 孔板细胞转染后继续培养至 96h,收集细胞。Western Blot 按《分子克隆第三版》实验操作指南进行,一抗稀释度为 1:300,二抗稀释度为 1:1000,以 β-actin 为内参照。磷酸盐缓冲液洗膜后,按

维普资讯 http://www.cqvip.com

照浓缩型 DAB 试剂盒说明加入过氧化物酶，凝胶成像仪鉴定。

2 结 果

2.1 shGFP 重组质粒的构建与鉴定

重组质粒 shGFP 测序证实序列正确。

2.2 稳定表达 GFP 的细胞株的鉴定

G418 筛选的细胞株 HNE1-GFP 连续传代培养两月余，冻存后再行复苏培养，细胞绿色荧光的强度均未见减弱。以该细胞株基因组 DNA 为模板，PCR 扩增得到了 GFP 基因特异性片段(图 1)，证实 GFP 基因已经成功地整合进 HNE1 细胞基因组。

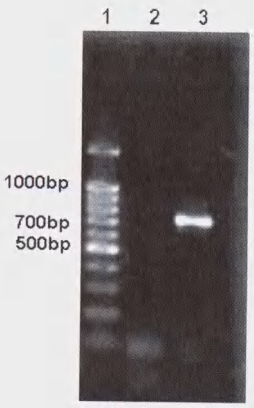


图 1 PCR 方法检测整合的 GFP 基因

2.3 shGFP 的细胞毒性观察

MTT 提示，干扰质粒组，对照质粒组及未转染质粒组吸光光度值的平均值差异无统计学意义，$P>0.05$。说明干扰质粒组 shGFP 2:5，1:3，1:5 三个浓度级别均没有明显的细胞毒性(图 2)。

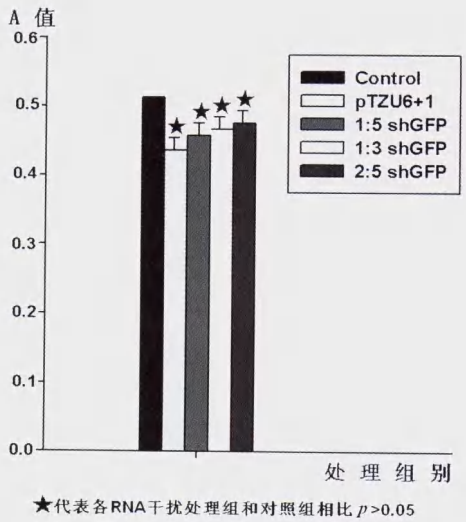


图 2 shGFP 在 HNE1-GFP 细胞中的细胞毒性检测

2.4 荧光观察

细胞转染 shGFP 后 96h 绿色荧光蛋白表达的抑制效果最明显。荧光显微镜观察 1:3 和 2:5 浓度级别组抑制作用十分明显，1:5 浓度级别组抑制作用较明显(图 3)。荧光光密度分析表明各干扰组荧光光密度平均值较对照组差异有统计学意义 ($P<0.05$)。各干扰组荧光表达抑制率分别为：49.7%，84.8%，86.7%(图 4)。

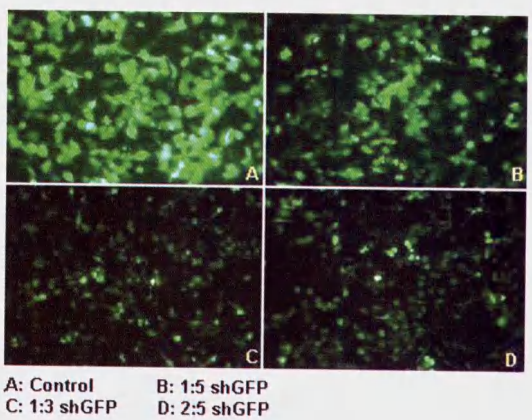


图 3 shGFP 转染 HNE1-GFP 细胞 96h 后荧光观察

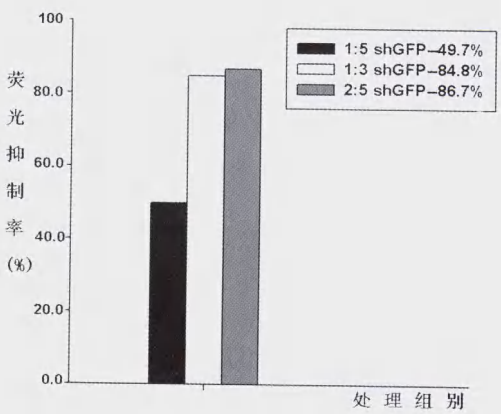


图 4 不同浓度 shGFP 组的荧光表达抑制率

2.5 shGFP 对 GFP mRNA 的抑制作用

shGFP 各浓度级别组转染 HNE1-GFP 细胞后 96h，收集细胞行 RT-PCR，结果显示各浓度级别组 GFP mRNA 水平均有下降，且 2:5 和 1:3 浓度级别组 GFP mRNA 表达下降明显(图 5)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

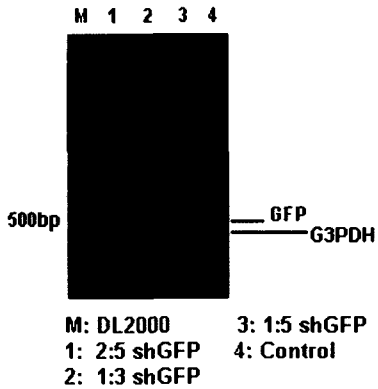


图 5 RT-PCR 检测 HNE1-GFP 细胞转染不同浓度 shGFP 后 mRNA 水平

2.6 Western Blot 检测 GFP 蛋白表达水平

Western Blot 结果显示 1:3 和 2:5 浓度级别组较对照组 GFP 蛋白表达明显降低，而 1:5 浓度组 GFP 蛋白表达与对照组相比无明显差异(图 6)。

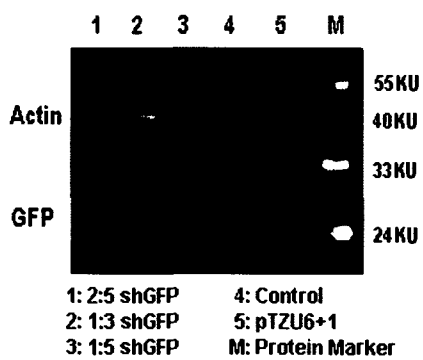


图 6 Western Blot 检测 HNE1-GFP 细胞转染不同浓度 shGFP 后 GFP 表达水平

3 讨 论

RNA 干扰现象是自然界中普遍存在的进化上高度保守的基因组水平的免疫监控机制，在植物、真菌、线虫和哺乳动物中均证实了此现象的存在[3-5]。目前 RNA 干扰技术作为研究工具主要适用于两方面，一是单个靶基因功能研究，通过沉默某个功能未知基因的 RNA 转录而研究其生理病理功能；二是功能基因组的研究，目前已经构建了 RNA 干扰分子文库，从全基因组水平研究整个基因组的功能[6,7]。RNA 干扰技术除了作为研究基因功能的工具之外，在基因治疗方面也赢得了许多研究者的推崇[2,8-10]。20nt 左右的短双链 RNA(siRNA)可在真核细胞内降解同源互补的 mRNA，从而抑制疾病相关靶基因的表达，达到治疗疾病的目的。

RNA 干扰技术在鼻咽癌疾病中的研究还较少，我们设计该研究的目的是建立一个带报告基团的鼻咽癌细胞株，通过转染转录 shRNA 的表达载体，观察 RNA 干扰现象在鼻咽癌细胞中是否有干预作用及作用强度，细胞毒性，及其下游的抑制效应。在我们的实验中，我们通过观察鼻咽癌细胞中荧光表达的减少，直接证实了 RNA 干扰载体作为基因治疗工具在鼻咽癌治疗中的前期可行性。首先 RNA 干扰载体在鼻咽癌细胞中没有明显的细胞毒性；其次，RNA 干扰载体在鼻咽癌细胞内表达特异性 shRNA，可特异性抑制靶基因的 mRNA 和蛋白的表达；第三，RNA 干扰载体抑制靶基因效率有浓度依赖性，在无细胞毒性前提下，浓度越高抑制效率越高。

另外，该实验成功建立了稳定表达绿色荧光蛋白的鼻咽癌细胞株，通过观察绿色荧光蛋白表达的强弱可直接了解干预因素的作用强度，利用该体系，我们可以进行 RNAi 抑制因子的筛选，并可以研究 RNA 干扰作用途径中的成分及影响因素。另外我们还将利用该体系筛选特异性脱氧核酶，研究其在鼻咽癌细胞中的干预作用。总之，本研究所建立的利用 RNA 干扰机制干扰内源性 GFP 表达的体系，为我们进一步研究 RNAi 作用机制及其影响因素奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Donald K. ScienceBreakthrough of the Year[J]. Science,2002;298:2283.

[2] Gitlin L KSAR. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells[J]. Nature,2002;418:430-434.

[3] Van der Krol AR MLBMMJSAR. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression[J]. Plant Cell,1990;2:291-299.

[4] Fire A XSMMKSDSMCC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans[J]. Nature,1998;391:806-811.

[5] Elbashir SM HJLWYAWKTT. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. Nature, 2001;411:494-498.

[6] Berns K HEMJBTVAHMea. A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathways[J]. Nature,2003;428:431-437.

[7] Brummelkamp TR NSDABR. Loss of the cylindromatosis tumour

(下转第 834 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

合成,引起新生血管的形成。同时,视网膜组织在新生血管附近逐渐发生纤维增殖,最终导致视网膜前增殖膜的形成[1]。近年来,国内外对 DR 的发病机制进行了大量的研究,但都主要集中在对致血管形成因子的研究,对 ECM 在 DR 发病机制中所发挥的作用研究较少。

基质金属蛋白酶(MMPs)是一组降解细胞外基质(ECM)的内源性蛋白酶系。MMP-2、MMP-9 是 MMPs 最主要的两个成员,能降解明胶、Ⅳ型胶原、Ⅴ型胶原、Ⅶ型胶原、纤维连接蛋白和弹性蛋白,在 ECM 降解和组织重建中起非常重要的作用[2]。已有研究表明,MMP-2、MMP-9 与肿瘤浸润、肝纤维化以及新生血管形成密切相关。目前,对 MMP-2 和 MMP-9 在 DR 纤维血管膜形成过程中是否发挥作用,尚不十分清楚。目前在玻璃体内和视网膜下液都发现多种 MMPs,这些 MMPs 的细胞来源尚不明了,玻璃体细胞有分泌这些 MMPs 的能力,但玻璃体切除术后的玻璃体腔内仍然发现有 MMPs 的存在[3]。Vaughan-Thomas A 等[4]分析尸体眼玻璃体 MMPs 的含量,发现"正常"玻璃体内不仅含有 MMP-2 ,也含有 MMP-9 前体,但不随着年龄的增加而增加。而 Plantner JJ 等[5]还在玻璃体内发现 MMP-3 以及 MMPs 的组织抑制因子(Tissue inhibitors of metalloproteinases,TIMPs),这些酶是玻璃体内源性 MMPs,为人眼玻璃体中最重要的胶原酶,对于在偶然损伤中的胶原重建起着"监视"作用。

糖尿病造成 DR 的病理原因是高血糖对微小血管的损伤,它使视网膜毛细血管的内皮细胞与周细胞受损,从而导致毛细血管失去正常的屏障功能,出现渗漏现象,造成周围组织水肿、出血,继而毛细血管的闭塞引起视网膜缺血,血供与营养缺乏,导致组织坏死及新生血管生长因子的释放及因之而产生的新生血管,从而将引起视网膜大量出血与玻璃体的大量积血,导致视网膜增殖性改变,甚至视网膜脱离,或并发白内障[6]。我们研究采用逆转录聚合酶链反应(Reverse transcription polymerase chain reaction,RT-PCR)法、免疫印迹(Western-blot)法等分析了培养的血管内皮细胞中 MMP 随不同葡萄糖培养液浓度和时间的变化,细胞周期的变化情况及超微结构的改变。结果显示高浓度葡萄糖可使内皮细胞 MMP-2 表达增加、细胞增生活跃,细胞出现肿胀,体积增大,细胞质溶解、核溶解,异染色质边集,内质网扩张,出现固缩线粒体、环形线粒体,髓样结构等改变。此对于 MMPs 的进一步研究为早期诊治 DR 等微血管病变提供了实验依据。

参 考 文 献

[1] Itoh M,Omi H,Okouchi M,et al. The mechanisms of inhibitory actions of gliclazide on neutrophils-endothelial cells adhesion and surface expression of endothelial adhesion molecules mediated by a high glucose concentration[J]. J Diabetes Complications,2003;17(1):22-26.

[2] Visse R,Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases:structure,function and biochemistry[J]. Circ Res,2003;92(8):827-839.

[3] Sethi CS,Bailey TA,Luthert PJ,et al. Matrix metalloproteinase biology applied to vitreoretinal disorders[J]. Br J Ophthalmol,2000;84(6):654-666.

[4] Vaughan-Thomas A,Gilbert SJ,Duance VC. Elevated levels of proteolytic enzymes in the aging human vitreous[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2000;41(11):3299-3304.

[5] Plantner JJ,Smine A,Quinn TA. Matrix metalloproteinases and metalloproteinase inhibitors in human interphotoreceptor matrix and vitreous[J]. Curr Eye Res,1998;17(2):132-140.

[6] Raingeaud J,Gupta S,Rogers J,et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine[J]. J Biol Chem,1995;270(13):7420-7426.

(上接第 825 页)

suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB[J]. Nature, 2003;424:797-801.

[8] Damm-Welk C FUWWBA. Targeting oncogenic fusion genes in leukemias and lymphomas by RNA interference[J]. Semin Cancer Biol,2003;13:283-292.

[9] Ge Q MMNTSCSPEHea. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2003;100:2718-2723.

[10] Coburn GA CB. Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference[J]. J Virol,2002;76:9225-9231.