DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.23.011
第26卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 23
2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

文章编号:1000-5404(2004)23-2111-03

论著

*eola*1下调表达对ECV304细胞增殖的影响

刘月明,杨宗城,梁自文,苏踊跃,罗向东,陈 渝,梁光萍,陈 建 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 设计和构建人类新基因人内皮高表达脂多糖相关因子1(endothelium-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor1, *eola*1)特异性的小干扰RNA表达载体si*eola*1,建立*eola*1下调表达模型,观察*eola*1下调表达对细胞增殖的影响。方法 设计靶点特异性的寡核苷酸,连接到经*Bam*HⅠ-*Hind*Ⅲ酶切线性化的pSlincer3.1/H1质粒上;转染重组质粒到ECV304细胞,通过定量RT-PCR实验检测靶基因的抑制情况;对转染si*eola*1质粒的细胞进行细胞计数,并应用流式细胞仪观察细胞周期的变化。结果 构建的小RNA干扰质粒si*eola*1转染ECV304细胞能够抑制靶基因*eola*1的表达;细胞计数和流式细胞仪检测结果显示*eola*1表达抑制后,细胞生长周期延长。结论 成功构建了针对*eola*1基因的siRNA质粒;细胞计数和流式细胞仪检测结果初步确认*eola*1具有抑制ECV304细胞增殖的作用。

关键词:RNA干扰;ECV304;*eola*1;转染
中图法分类号:R322.12;R329.28;R394.12 文献标识码:A

Effects of down-regulated expression of *eola*1 on the proliferation of ECV304 cells

LIU Yue-ming, YANG Zong-cheng, LIANG Zi-wen, SU Yong-yue, LUO Xiang-dong, CHEN Yu, LIANG Guang-ping, CHEN Jian (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To design and construct H1 promoter-based small interfering RNA (siRNA) expression vectors and to detect the effects of down-regulated expression of endothelium overexpression LPS associated factor 1 (*eola*1) on the proliferation of ECV304 cells. **Methods** DNA oligonucleotides targeting *eola*1 were synthesized and inserted into BamHI-HindIII linearized pSinencer3.1/H1 plasmid. The empty vector pSilencer3.1/H1 and recombinant vector si*eola*1 were transfected into the ECV304 cells. The expression level of *eola*1 of transfected cell strains was measured by RT-PCR. The cell growth of transfected cell strains was observed by cell count and flow cytometry. **Results** The vector-base RNAi could knockdown *eola*1 gene expression specifically. The down-expression of *eola*1 accelerated the proliferation of ECV304 cells. **Conclusion** Vector-based siRNA expression plasmids could down-regulate the expression of targeting gene - *eola*1, which accelerates the proliferation of ECV304 cells.

Key words: RNA interference, ECV304, *eola*1, proliferation

人内皮高表达脂多糖相关因子1(endothelium-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor1, *eola*1)系本实验室利用抑制消减杂交技术在内毒素激活的人脐静脉内皮细胞差异表达基因中发现并克隆的新基因[1]。经过生物信息学分析显示该基因定位于人类染色体Xq27.3,含有一个完整的开放阅读框(ORF),预测其编码蛋白质*eola*1含螺旋-转角-螺旋(HTH)模体和酪氨酸激酶Ⅱ、蛋白激酶C磷酸化位点。我们前期应用酵母双杂交技术发现*eola*1和金属硫蛋白2A(metallothionein 2A, MT2A)存在相互作用,并通过免疫共沉淀进行了验证。MT2A属于金属硫蛋白家族,具有重要的生物学功能,已有研究证明MT2A与细胞的增殖、分化关系密切。存在直接相互作用的蛋白往往功能密切相关,因此我们拟采用RNA干扰技术建立*eola*1下调表达模型,观察*eola*1表达下调对细胞增殖的影响。

RNA干扰是一种序列特异性的转录后基因沉默现象,它受与靶基因序列同源的双链RNA所诱导[2]。RNA干扰为生物学家提供了功能基因研究的快速和简便的方法。载体介导的RNA干扰方法是新近发展

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371468)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371468)
作者简介:刘月明(1974-),男,河南省信阳市人,博士,主治医师,主要从事生物信息学、内皮细胞损伤及其信号转导方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)65461987
通信作者:梁自文,电话:(023)68754138;E-mail:liangzw@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2004-09-10;修回日期:2004-11-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

起来的在哺乳动物细胞中特异性抑制靶基因靶基因表达的技术[3]。本研究针对 *eola*1 靶基因，选择了两段靶序列，构建到 pSilencer3.1/H1 质粒中。并初步研究了重组质粒转染 ECV304 细胞后对细胞增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

人脐静脉内皮细胞株 ECV-304(ATCC)培养于含 10%新生小牛血清 M199 培养基中。细胞转染时应用无抗、无血清 M199 培养基。

1.2 重组 *eola*1 小 RNA 干扰质粒(命名为 si*eola*1)的构建

pSilencer3.1/H1 质粒购自 Ambion 公司。靶点的选择和寡核苷酸序列的设计参照 Ambion pSilencer3.1 载体说明书，寡核苷酸序列如下：5′-ACTTTGCAATGCCCCGAAGTTCAAGAGACTTCGG GGCATTGCA AAGTTTTTTT-3′；5′-AATTAAAAAAACTTTGCAATG CCCCGAAGTCTCTTGAACTTCGG GGCATTGCAAAGTGGCC-3′。核苷酸由上海博亚生物科技公司合成。寡核苷酸以去离子水溶解(浓度为 1 μg/μl)，取 5 μl 加入 90 μl 去离子水，煮沸 5 min，自然冷却，寡核苷酸退火。用 *Bam*HⅠ 和 *Hind* Ⅲ双酶切 pSilencer3.1/H1质粒 1.0 μg，37 ℃，1 h。酶切产物进行琼脂糖电泳，紫外灯下切下线性化的条带，应用琼脂糖 DNA 回收试剂盒(Roche 公司)回收线性化载体。采用 DNA 连接试剂盒(TaKaRa 公司 Ver3.0)进行连接反应：退火的寡核苷酸 1 μl，双酶切的 pSilencer3.1/H1 5 μl，去离子水 4 μl，SolutionⅠ 10 μl，16 ℃，2 h。连接产物转化感受态 DH5α 大肠杆菌，涂氨苄青霉素(50 μg/ml)抗性 LB 平板。待单个细菌克隆形成后，挑取 2～3 个细菌克隆，摇菌扩增，抽提质粒。质粒进行 *Hind* Ⅲ酶切鉴定及测序验证。

1.3 引物设计

根据 *eola*1 基因的 cDNA 序列，设计一对引物，上游：5′-CTCCCAGGTTCAAGCAATTC-3′，下游：5′-TCTAGAATACCTCCCTTGAAG-3′。交由上海博亚生物技术有限公司合成。内参对照β-actin 的引物序列上游为：5′-CCCTGTATGCCTCTGGTC-3′，下游：5′-GTCTTTACGGATGTCAACG-3′。

1.4 细胞转染

接种 ECV304 细胞于 6 孔板，1.5× 10^5 细胞每孔，融合约 60%～80%时采用 Dotap 试剂(Roche 公司)分别转染 si*eola*1 和 pSilencer3.1/H(载体对照)到 ECV304 细胞；另外经精确计数接种细胞到 3 个 24 孔板，其中两个分别转染 si*eola*1 和 pSilencer3.1/H 用于细胞计数，另外一个 24 孔板作为未转染对照。转染方法参照 Dotap 说明书进行。

1.5 ECV304 细胞总 RNA 的提取

转染 48 h 后，细胞用预冷的 PBS 洗 3 次，采用 Tripure 试剂(Roche 公司)提取细胞总 RNA，凝胶电泳观察，并测定 A_{260}、A_{280} 值，计算 RNA 纯度。

1.6 RT-PCR 检测 *eola*1 的表达情况

采用 TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)进行 RT-PCR 反应。操作方法按试剂盒说明进行。RT 条件：50 ℃ 30 min；99 ℃ 5 min；4 ℃ 5 min；PCR 条件：94 ℃ 2 min；94 ℃ 30 s；55 ℃ 30 s；57 ℃ 30 s；72 ℃ 1.5 min，30 个循环。取各管反应产物 5 μl 进行琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像系统中进行扫描，利用 Quantity One 软件进行图像分析，计算各个检测 mRNA 与自身β-Actin 条带的密度比值。

1.7 细胞计数

从转染后 24 h 开始，每隔 24 h 3 组细胞各取 4 孔进行细胞计数(单盲)，每组计数 4× 5 次，连续观察 5 d。对尚未计数的细胞进行常规换液，整个计数过程所用培养基及小牛血清均为同一批次，血清浓度小于 10%。计数结果以时间为横轴，以细胞数为纵轴，绘制细胞周期图。

1.8 流式细胞仪检测

转染后 48 h，分别消化转染 si*eola*1 和 pSilencer3.1/H1 质粒的 ECV304 细胞各 3 孔，离心，PBS 冲洗 2 次后，用 75%的乙醇充分混悬，4 ℃过夜固定，交由第三军医大学中心实验室利用流式细胞仪检测细胞周期。

1.9 统计学方法

细胞计数和流式细胞仪检测结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 统计软件包对细胞计数结果进行重复测量数据的析因分析，对流式细胞仪检测结果进行配对 t 检验。

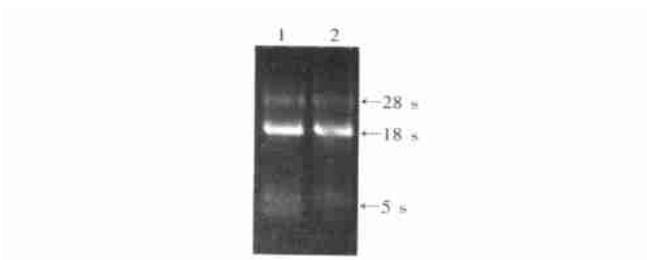
2 结果

2.1 重组 *eola*1 小 RNA 干扰质粒 si*eola*1 的构建

重组载体阳性载体可以被 *Hind* Ⅲ酶切开，测序结果经比对靶点核苷酸片断被正确克隆入 pSilencer3.1/H1 质粒中，说明 si*eola*1 构建成功。

2.2 ECV304 细胞总 RNA 的提取

图 1 为 ECV304 细胞总 RNA(各 5 μl)电泳结果，均存在 5 s、18 s 和 28 s 3 条带。两组细胞 A_{260}/A_{280} 值分别为 1.82 和 1.80。该结果表明细胞总 RNA 的提取纯度较高且没有明显降解，可以满足 RT-PCR 的需要。



1：Transfected with si*eola*1；2：Transfected with pSilencer3.1/H1

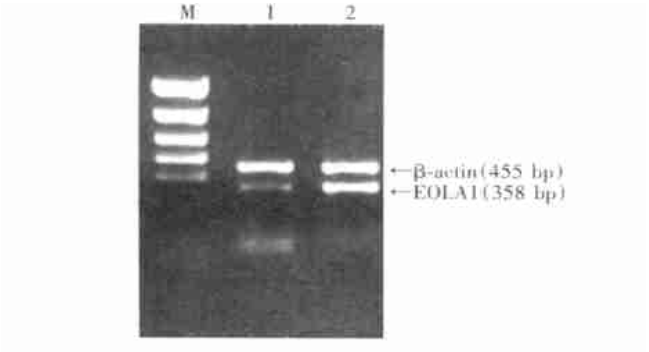
图 1 两组细胞 ECV304 总 RNA 电泳图

Fig 1 Total RNA of ECV304 cells

2.3 RT-PCR 检测 *eola*1 表达变化

图 2 为 RT-PCR 检测 *eola*1 的表达变化，转染 si*eola*1 和 pSilencer3.1/H1 组和自身β-Actin 条带的密度比值分别为 0.626 和 0.172。该结果说明转染 si*eola*1 质粒的 ECV304 细胞，其 mRNA 表达水平明显降低。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



M: λDNA *Hind* Ⅲ; 1: Transfected with si*eola*1; 2: Transfected with pSilencer3.1/H1

图 2　*eola*1 mRNA 表达变化

Fig 2　Levels of mRNA of *eola*1

2.4　细胞计数结果

表 1 显示 *eola*1 下调表达 ECV304 细胞的增殖比 *eola*1 正常表达细胞迅速, 细胞计数第 3 天两组细胞数目开始有显著差异($P<0.05$), IPTG 诱导组和非诱导组细胞数目从 3 d 开始有显著差异($P<0.01$); 细胞生长曲线显示 *eola*1 下调表达细胞的对数生长期短于正常 ECV304 细胞, *eola*1 下调表达组细胞在第 5 天进入平台期, 正常细胞仍处于对数生长期。

表 1　转染不同质粒 ECV304 细胞计数结果($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Cell count of ECV304 transfected with si*eola*1 and pSilencer3.1/H1 ($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

Plasmid	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	*F*	*P*
si*eola*1	5.7±2.9	11.8±5.2	25.8±11.6	39.3±18.4	40.2±17.3		
pSilencer3.1/H1	5.6±2.6	11.2±5.4	17.5±8.1 *	23.6±9.2 *	31.9±16.7 *	84.08	0.00
Control	5.7±2.5	12.3±6.1	19.2±8.5 *	24.6±12.3 *	29.7±14.3 *		

*: $P<0.01$, *vs* si*eola*1

2.5　流式细胞仪检测 *eola*1 下调表达对 ECV304 细胞周期的改变

结果显示转染 si*eola*1 质粒组处于 G_0/G_1 期的细胞少于 pSilencer3.1/H1 组; si*eola*1 组处于 S 期的细胞明显多于 pSilencer3.1/H1 组($P<0.05$); 两组处于 G_2/M 期的细胞基本相同(表 2)。

表 2　转染 *eola*1 RNA 干扰载体后细胞周期的改变($n=3$)

Tab 2　Changes of cell cycles of ECV304 transfected with varied vectors ($n=3$)

Plasmid	G_0/G_1(%)	*t*	*P*	G_2/M(%)	*t*	*P*	S(%)	*t*	*P*
si*eola*1	43.94±8.91	1.33	0.28	32.90±74.24	0.05	0.96	23.00±84.88	2.79	0.02
pSilencer3.1/H1	51.42±2.04			33.13±0.83			15.44±1.30 *		

*: $P<0.05$, *vs* si*eola*1

3　讨论

严重烧伤患者由于外源性细菌感染或肠源性细菌和内毒素(LPS)移位, 易于诱发脓毒症, 引起失控性炎症反应, 死亡率很高。目前已证实 LPS 是脓毒症的主要启动子, 它与可溶性 CD14 分子结合活化血管内皮细胞, 内皮细胞的活化在脓毒症的发生、发展中具有重要作用。本室长期致力于 LPS 对血管内皮细胞损伤机制的研究, 此前本室应用抑制性消减杂交方法发现了一个脐静脉内皮细胞上与 LPS 刺激相关的新基因 *eola*1, 其全长 cDNA 被 GeneBank 接受(登录号: AY074889), 我们前期研究发现 *eola*1 和 MT2A 存在相互作用。MT2A 属于金属硫蛋白家族, 具有重要的生物学功能, 已有研究证明 MT2A 与细胞的增殖、分化关系密切[4]。存在直接相互作用的蛋白往往功能密切相关, 因此本研究中我们采用 RNA 干扰技术使 *eola*1 下调表达, 观察 *eola*1 表达下调对细胞增殖的影响。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是新近发展起来的一项反基因技术, 与传统的反义技术相比, RNAi 技术对基因表达的阻断效应更加有效; 与基因敲除或突变相比, RNAi 技术则有操作简便、投入资金少、实验周期短等优势。

本实验采用的 pSilencer3.1/H1 质粒系统是一个由 H1 启动子控制的 siRNA 表达质粒, 模板为含有靶点序列回文结构, 这样细胞内合成的 RNA 为发夹样双链结构。这种 RNA 干扰策略成本低、可操作性强, 应用这种方法, 我们设计和构建了针对靶基因 *eola*1 的 siRNA 表达质粒 si*eola*1, 并转染 ECV304 细胞, 通过半定量 RT-PCR 检测转染细胞靶基因被抑制的效果。结果表明, si*eola*1 质粒转染 ECV304 细胞能够下调 *eola*1 基因的表达。我们利用细胞计数和流式细胞仪技术观察 *eola*1 下调表达对 ECV304 细胞增殖的影响, 结果显示 *eola*1 基因被抑制可以促进 ECV304 细胞的增殖。我们推测 *eola*1 可能是通过 MT2A 对细胞的增殖发生影响。在将来的研究中我们将进一步了解清楚 MT2A 与 *eola*1 的相互作用关系, 建立 *eola*1 上调和下调表达模型, 通过这些模型观察 LPS 刺激对 MT2A 表达的影响及细胞增殖的改变。

参考文献:

[1] 梁自文, 杨宗城, 罗向东. 人类新基因 *eola*1 全长 cDNA 序列的克隆[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(3): 封 2.

[2] 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.

[3] 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.

[4] Jin R, Chow V T, Tan P H, *et al*. Metallothionein 2A expression is associated with cell proliferation in breast cancer[J]. Carcinogenesis, 2002, 23(1): 81-86.

(编辑　刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net