DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.23.016
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)23-2123-03

论著

siCASK重组载体构建及效应检测

孙荣距,杨宗城,苏踊跃,蔡 震,唐红英,罗向东 (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 构建针对人CASK基因的siRNA质粒,建立CASK下调表达的细胞模型,为CASK相关的细胞信号研究奠定基础。方法 选择人CASK基因不同靶点,体外合成DNA模板,经退火后插入到pSilencer3.1 hygro载体的多克隆位点。阳性重组质粒转染ECV304细胞,蛋白印迹。观察siCASK对目的蛋白表达的抑制效率。结果 酶切、测序表明以pSilencer3.1 hygro为载体的重组质粒siCASK构建成功。siCASK转染细胞后,能够明显抑制目的蛋白的表达。结论 成功构建了siRNA重组质粒,为下一步CASK功能研究奠定基础。

关键词:钙/钙调蛋白依赖的丝氨酸蛋白激酶;RNA干扰;内皮细胞
中图法分类号:Q782;Q784 文献标识码:A

Construction of siRNA plasmid targeting CASK and its roles in CASK expression

SUN Rong-ju, YANG Zong-cheng, SU Yong-yue, CAI Zhen, TANG Hong-ying, LUO Xiang-dong (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To construct small interference RNA (siRNA) plasmid targeting human calcium, calmodulin-associated serine/threonine kinase (CASK) gene and to establish CASK-downregulation ECV304 cell line in order to lay a foundation for the study of CASK related signal. **Methods** Two potential target sequences in CASK open reading frame were selected for the synthesis of DNA templates *in vitro*. The two DNA strands were annealed into dsDNA, and then the dsDNA was cloned into pSilencer3.1hygro vector. ECV304 cells were transfected with positive siRNA plasmids and the expression of CASK was observed by Western blotting. **Results** Restriction endonuclease digestion and DNA sequencing showed that siRNA plasmids based on pSilencer3.1 hygro were constructed successfully. Western blotting revealed that the CASK protein was obviously suppressed by siCASK transfection. **Conclusion** The two siRNA plasmids targeting human CASK gene, successfully constructed by us, could suppress the human CASK gene expression.

Key words: calcium, calmodulin-associated serine/threonine kinase; RNA interference; endothelium

人钙/钙调蛋白依赖性丝氨酸蛋白激酶(hCASK)广泛分布于多种组织和细胞,属于膜相关鸟苷酸激酶(MAGUK)家族成员,CASK主要生物学功能是作为一个支架蛋白质(scaffolding protein),利用其蛋白质分子中不同结构域,分别结合其他蛋白质,形成蛋白质复合体,参与细胞膜蛋白骨架构建,细胞连接形成,以及细胞内外信号转导和基因表达调控等许多重要细胞生理过程[1,2]。近年来的研究表明,一些小的双链RNA(dsRNA)可以高效特异地阻断体内特定基因表达,促使mRNA降解,诱使细胞表现出特定基因缺失的表型,称为RNA干扰(RNAi)[3]。由于RNAi可以作为一种简单有效的代替基因敲除的遗传工具,本研究运用RNAi技术和原理来构建抑制CASK的真核稳定表达载体。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和来源

pSilencer3.1-H1 hygro siRNA表达载体由Ambion公司提供;针对CASK基因的发夹siRNA寡核苷酸序列模板siCASK1和siCASK2由上海博亚公司合成;*Bam*HⅠ和*Hind*Ⅲ内切酶以及T4

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(10332060);国家自然科学基金资助项目(30277903)
Supported by the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (10332060) and the National Natural Science Foundation of China (30277903)
作者简介:孙荣距(1973-),男,黑龙江省双城市人,博士研究生,医师,主要从事细胞信号传导方面的研究。电话:(023)68754149-8082
通信作者:罗向东,E-mail:luoxd@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2004-09-10;修回日期:2004-11-22

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

连接酶由TaKaRa公司提供；质粒提取和凝胶回收试剂盒由Promega公司提供。DOTAP Liposomal转染试剂购自Roche Molecular Biochemicals公司；Anti-CASK抗体、goat anti mouse IgG HRP抗体购自Santa Cruz公司；ECL化学发光试剂购自PIERCE公司。

1.2 发夹siRNA模板序列设计

siRNA模板序列设计借助于互联网站：www.ambion.com。CASK基因起始密码子下游约100 bp的外显子1和2上分别选取2个RNAi靶点，即siCASK1和siCASK2，每个靶点21个碱基序列，做为siRNA的两个臂，设计loop区，并带上*Bam*HⅠ和*Hind*Ⅲ位点。化学合成siRNA模板，长度均为63 bases，CASK1号靶点模板序列：CASK1：5′-GATCCATTGTTGATGTAGCCAAGTTCAAGTTTCAAGAGAACTTGGCTACATCAACAATTTTTTTGGAAA-3′；CASK1a：5′-AGCTTTTCCAAAAAAATTGTTATGTAGCCAAGTTCTCTTGAAACTTGGCTACATCAACAATG-3′；CASK2号靶点模板序列：CASK2：5′-GATCCGTCCAGGGTTAAGTACAGATTCAAGAGATCTGTACTTAACCCTGGACTTTTTTGGAAA-3′；CASK2a：5′-AGCTTTTCCAAAAAAGTCCAGGGTTAAGTACAGATCTCTTGAATCTGTACTTAACCCTGGACG-3′。分别加无菌去离子水1∶100稀释，使终浓度都为1 μg/μl；正向和反向模板序列各取2 μl于1× DNA线性化溶液，使总体积为50 μl，90 ℃煮3 min，冷却到37 ℃温育1 h，使发夹siRNA模板线性化，退火核苷酸进一步稀释，使终浓度为10 ng/μl。

1.3 siCASK1和siCASK2载体构建

*Bam*HⅠ和*Hind*Ⅲ双酶切pSilencer3.1-H1 hygro载体，使之线性化，凝胶回收DNA载体片段，T4连接酶进行连接反应，退火核苷酸(1.2步骤，10 ng/μl)和线性化载体片段比例为1∶5，反应体系10 μl，16 ℃过夜；连接产物转化感受态大肠杆菌DH5α，挑菌落克隆，抽提质粒，*Bam*HⅠ和*Hind*Ⅲ双酶切初步鉴定，并将候选克隆进一步测序，以证实载体构建成功，阳性重组质粒命名为siCASK1和siCASK2。

1.4 siCASK1和siCASK2载体对目的蛋白抑制效率的比较

siCASK1、siCASK2以及pNegative无关对照载体分别转染人ECV304细胞，按照1 μg质粒DNA加5 μl DOTAP转染试剂的比例进行转染，培养48 h后，RIPA裂解液冰上裂解细胞，提取细胞总蛋白，BCA法进行蛋白定量，平行设计4组：ECV304 control、pNegative、siCASK1及siCASK2，每组细胞蛋白总量30 μg上样，聚丙烯酰胺凝胶电泳，Western Blot检测CASK蛋白表达，anti-CASK抗体稀释比例1∶500，羊抗鼠IgG HRP稀释比例1∶5 000，均用4%BSA进行稀释，ECL化学发光法显色。

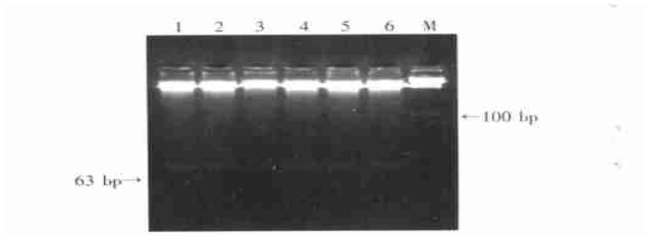
2 结果

2.1 重组siCASK1和siCASK2载体酶切鉴定

从siCASK1和siCASK2重组转化菌中各挑取3个克隆，经*Bam*HⅠ和*Hind*Ⅲ双酶切，均可见不足100 bp的目的片段，酶切鉴定结果均为阳性克隆，如图1。

2.2 重组siCASK载体抑制目的基因表达

转染siCASK1和siCASK2载体的ECV304细胞，CASK蛋白表达受到抑制，如图2。

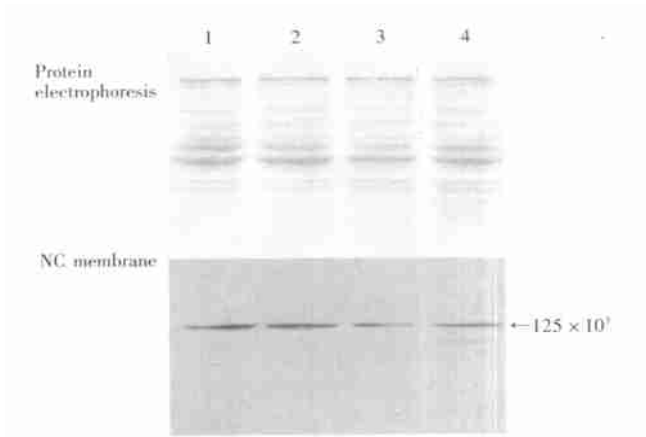


1，2，3：siCASK1 recombinant vectors；4，5，6：siCASK2 recombinant vectors；M：*Hind*Ⅲ DNA marker

1，2，3：siCASK1 recombinant vectors；4，5，6：siCASK2 recombinant vectors；M：*Hind*Ⅲ DNA marker

图1 重组siCASK1和siCASK2载体酶切鉴定

Fig 1 Identification of recombinant plasmids siCASK1 and siCASK2 by endonuclease digestion



1：ECV304 control；2：pNegative；3：siCASK1；4：siCASK2

图2 重组siCASK1、siCASK2质粒对CASK蛋白表达的影响

Fig 2 Effects of siCASK1 and siCASK transfection on the expression of CASK protein

3 讨论

RNAi是指内源性或外源性双链RNA介导的细胞内mRNA发生特异性降解，从而导致靶基因的表达沉默，产生相应的功能表型缺失的现象，这一现象属于转录后的基因表达沉默机制(posttranscriptional gene expression silence，PTGS)。RNAi在哺乳动物细胞中通常用于阻断特定基因的表达从而研究基因的功能，常见的做法是将靶向特定基因的大约21碱基长短的双链siRNAs(small interfering RNAs)，或者是45-50-mer的发夹结构RNA(small hairpin RNA，shRNA)转染到细胞。shRNA在细胞内会自动被加工成为siRNA，从而引发基因沉默或者表达抑制[4]。RNAi技术已经成功应用于研究基因功能、基因敲除、基因表达调控等许多领域。现在有多个报道证明通过质粒表达siRNAs同样

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

可以抑制特定基因的表达。pSilencer siRNA 表达载体系列是用于在培养的哺乳动物细胞中表达 siRNA 的一系列载体。在载体上包含有 RNA Pol Ⅲ启动子, 氨苄抗性基因和大肠杆菌复制子, 只要将编码一小段对应目的基因特异序列的、其 RNA 能形成发夹结构的 DNA 序列插入载体中 Pol Ⅲ启动子的下游, 转入哺乳动物细胞, 载体就能表达出发夹结构的 RNA, 这种 RNA 很快在细胞中加工成为 siRNA[5]。

本研究选择 CASK 外显子的两个靶点化学合成两对 siRNA 模板, 分别连接到 pSilencer 3.1 载体上, 构建载体 siCASK1 和 siCASK2, 经过酶切和测序证实目的片段已成功构建到载体上, 将两个载体分别转染 ECV304 细胞, 蛋白印迹证实转染重组载体 siCASK1 和 siCASK2 的细胞成功抑制了 CASK 基因表达, 进一步证明 siCASK1 和 siCASK2 重组载体构建成功。构建 siCASK 载体对于研究 CASK 参与的内皮细胞损伤后的胞内信号传导通路, 有非常重要的意义。

参考文献:

[1] 齐　洁, 罗向东, 罗　勤. 人 CASK/LIN2 下游信号分子的初步研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 2000, 17(6): 404－408.

[2] Cohen A R, Woods D F, Marfatia S M, *et al*. Human CASK/LIN2 binds syndecan-2 and protein 4.1 and localizes to the basolateral membrane of epithelial cells[J]. J Cell Biol, 1998, 142(1): 129－138.

[3] 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.

[4] Bernstein E, Caudy A A, Hammond S M, *et al*. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference[J]. Nature, 2001, 409(6818): 363－366.

[5] Brummelkamp T R, Bernads R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. Science, 2002, 296(5567): 550－553.

（编辑　刘洪娥）

（上接 2116 页）

2　结果

10 例患者咽旁间隙 CT 和 MRI 表现分正常或基本正常、咽旁间隙变窄和消失 3 种情况。

2.1　咽旁间隙正常或基本正常

3 例, 2 例为病变早期, CT 显示肿块局限于咽隐窝, 未侵犯咽旁间隙或轻度变窄。MRI 表现为鼻咽侧或后壁局限软组织影, 脂肪间隙高信号区轻度受压, 翼内外肌信号显示清晰。另 1 例为晚期病变, CT 和 MRI 均显示鼻咽顶后壁病变, 主要向鼻咽顶后方向发展, 破坏蝶骨底和斜坡基底部, 但向两侧发展较慢, 咽旁间隙基本正常。

2.2　咽旁间隙变窄

4 例, CT 上咽旁间隙变窄, 其内见低于肌肉密度的略低密度线影, 两侧不对称。MRI 上有 3 种情况: ①肿块推尚未突破肌筋膜(1 例), 咽旁间隙的高信号脂肪线影变窄; ②肿块已突破肌筋膜, 侵犯腭帆张提肌、翼内肌等(2 例)。③颈动脉鞘区内肿大淋巴结推压所致。

2.3　咽旁间隙消失

3 例, CT 上表现为鼻咽侧壁软组织影向外侧扩展, 咽旁间隙为较高密度的软组织影占据, 各结构间界限消失。MRI 上咽旁间隙为低信号的肿瘤所充满占据。

3　讨论

咽旁间隙为位于咽肌嚼肌之间的三角形纤维脂肪间隙, 内含丰富的脂肪组织, 广义的咽旁间隙还包括颈动脉鞘区[1]。鼻咽癌早期咽旁间隙可无变化或仅有轻度受压等。按 AJCC 鼻咽癌分期标准, 咽旁间隙侵犯分期至少为 T2b 期。

CT 主要依赖间接改变如咽旁间隙变窄、变形等推断咽旁间隙受累。部分患者 MRI 上表现为咽旁间隙的高信号脂肪受压, 但其连续性无中断, 翼内外肌信号正常, 尚不足以诊断为咽旁间隙受侵。且约 30% 的正常人两侧咽旁间隙是不对称的[4]。另外本组中 1 例 CT、MRI 显示颈动脉鞘区肿大淋巴结推压而导致咽旁间隙变窄, 并非咽旁间隙肿瘤侵犯。咽旁间隙被软组织占据导致咽旁间隙消失者, CT 与 MRI 的判断是一致的。一般而言, 咽旁间隙正常绝大部分为早期患者, 但也有例外情况, 本组 1 例患者肿块位于鼻咽顶后壁, 向上后发展, 肿瘤已破坏蝶骨基底部和颅底, 并侵入蝶窦, 但两侧咽旁间隙均无明显异常改变, 也无颈部淋巴结肿大, King 等[5] 也报道了类似病例。这种情况虽然较为少见, 但值得临床关注。

综上所述, 咽旁间隙受累是鼻咽癌分期的重要依据, 与患者预后密切相关。作者认为, 咽旁间隙正常的患者中有少数并非早期, 而是病变向后或上方向发展, 咽旁间隙尚未受累的晚期病变。对于 CT 上咽旁间隙变窄或变形的, 可能部分患者尚未达到咽旁间隙受累的程度, MRI 有助于鉴别。对于咽旁间隙消失的晚期病变 CT 与 MRI 均能较准确地反映病变的范围和程度。

关键词: 咽旁间隙; 鼻咽癌; CT; MRI
中图法分类号: R730.44　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 张为龙, 钟世镇. 临床解剖学丛书, 头颈部分册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988. 404－405.

[2] Teo P, Lee W Y, Yu P. The prognostic significance of parapharyngeal tumour involvement in nasopharyngeal carcinoma[J]. Radiother Oncol, 1996, 39(3): 209－221.

[3] Chua D T, Sham J S, Kwong D L, *et al*. Prognostic value of paranasopharyngeal extension of nasopharyngeal carcinoma. A significant factor in local control and distant metastasis[J]. Cancer, 1996, 78(2): 202－210.

[4] Cheung Y K, Sham J S, Chan F L, *et al*. Computed tomography of parapharyngeal spaces: normal variations and criteria for tumour extension[J]. Clin Radiol, 1992, 45(2): 109－113.

[5] King A D, Teo P, Lam W W, *et al*. Parapharyngeal space involvement in nasopharyngeal cancer: detection by CT and MRI[J]. Clin Oncol (Rcoll Radiol), 2000, 12(6): 397－402.

（编辑　陈聪连）

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