DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.04.006
第26卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 4
294 2004年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)04-0294-04

应用载体介导的RNAi技术抑制Bcl-2的表达

蹇 锐,程小星,安 静,陈 炜,王嘉丽,张俊磊,万颖杰,陈宗涛 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室,重庆 400038)

提 要:目的 应用载体介导的RNAi技术特异地干扰抗凋亡基因*bcl*-2在HeLa细胞中的表达。方法 构建利用H1启动子转录功能性siRNA的载体;在H1启动子下游分别插入含不同*bcl*-2基因特异性序列的64 nt寡核苷酸片段;将构建的质粒转染HeLa细胞,以间接免疫荧光和免疫印迹检测转染后细胞中Bcl-2的表达水平。结果 3种含不同*bcl*-2特异性序列的质粒转染后均能干扰该基因在细胞中的表达,但干扰的效果存在差异,从45%~83.5%。结论 本研究建立的载体介导的RNAi技术可成功地用于干扰Bcl-2在HeLa细胞中的表达。

关键词:载体介导;RNAi;Bcl-2;表达
中图法分类号:Q782;Q786 文献标识码:A

RNAi-mediated gene silencing of Bcl-2 expression

JIAN Rui, CHENG Xiao-xing, AN Jing, CHEN Wei, WANG Jia-li, ZHANG Jun-lei, WAN Ying-jie, CHEN Zong-tao (Department of Microbiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To silence the expression of antiapoptotic gene *bcl*-2 in HeLa cells using vector-based RNA interference (RNAi) technique. Methods A vector used to transcribe functional short interfering RNA (siRNA) was constructed, and 64 nt oligonucleotide fragment was inserted into the downstream of the H1 promoter. Plasmids containing different *bcl*-2 target sequences were transfected into HeLa cells, and then the expression level of Bcl-2 was detected by indirect immunofluorescence assay (IFA) and Western blotting. Results Vector-based RNAi had advantages over antisense RNA and synthesized siRNA because it could be delivered to the target cell more efficiently, and its effect could last longer. *bcl*-2 expression could be inhibited by plasmid-expressed siRNA. Three different targeting sequences were selected from *bcl*-2 gene, and the inhibitory effect ranged from 45% to 83.5%. Conclusion Bcl-2 expression in HeLa cells can be inhibited significantly using plasmid-based RNAi.

Key words: vector-based; RNAi; Bcl-2; expression

研究表明,*bcl*-2作为一种抗凋亡蛋白基因,可保护细胞免于病毒、氧化剂等刺激诱导的细胞凋亡,Bcl-2蛋白高表达是肿瘤发生和产生耐药的重要原因之一。因此,利用反义核酸和RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术,通过抑制Bcl-2蛋白基因的表达,达到促进肿瘤细胞凋亡的目的,是目前正积极探索的一条新的肿瘤治疗途径。

RNAi是一种从低等生物到哺乳动物都有的保守的防御反应。双链RNA(dsRNA)在细胞内被Dicer切成约19~22 nt的小片段干扰RNA(siRNA),进而形成siRNA-蛋白复合物(siRNP),siRNP通过识别、降解具有同源序列的mRNA,最终导致特异性的基因表达沉默(gene silencing)[1]。目前,已有将体外合成的siRNA转染哺乳动物细胞,并有效地干扰*bcl*-2基因表达的报道[2,3]。但是,直接向细胞内导入siRNA存在基因沉默维持时间短、体内运载难和转染效果不稳定等问题,因此限制了该技术的应用,而利用载体介导的RNAi技术将有望克服上述困难[4]。鉴于此,本研究通过自行构建能在细胞内转录出功能性siRNA的载体,并将其用于干扰抗凋亡基因*bcl*-2的表达,为下一步基因功能和治疗手段的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒及主要试剂

E. coli DH5α及pBlueScript KSII-、pCIN4质粒为本室保存,pUCmT载体、限制性内切酶及其他工具酶等购自上海生工(生物工程技

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370603)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370603)
作者简介:蹇 锐(1972-),男,重庆市人,硕士,讲师,主要从事细胞微生物学方面的研究。电话:(023)68752241
通信作者:程小星,电话:(023)68752241,E-mail:xiaoxing@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2003-07-03;修回日期:2003-12-15

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

术服务有限公司), 转染试剂 LipofectAMINE 购自美国 Invitrogen 公司, 质粒及细胞基因组 DNA 提取试剂盒为上海华舜(生物工程有限公司)产品, ECL 试剂、小鼠抗 Bcl-2 单抗(C-2)为美国 Santa Cruz 公司产品, 辣根过氧化物酶及 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 购自北京中山(生物技术有限公司), 其他为国产分析纯试剂。

1.2　引物及 Bcl-2 特异 64 nt 寡核苷酸的设计与合成

根据 Brummelkamp 等[4] 报道及 H1 RNA 基因序列(GenBank 序列号为 X16612), 自行设计两对引物: H-out1 (5′-GTGGCATCG TTCCTTTC-3′)位于 H1-RNA 基因序列的第－339～－324 碱基位, H-out2 (5′-TGGCCGTGAGTCTGTTC-3′)位于 H1-RNA 基因序列的第 244～260 碱基位, 用于扩增 H1-RNA 基因的部分片段, 扩增产物为 600 bp; H1F (5′-AGGAATTCGAACGCTGACGTCATCA-3′)位于 H1-RNA 基因序列的第－230～－207 碱基位, 含 *Eco*R Ⅰ 酶切位点, H1R (5′-GAAGCTTAGATCTGTGGTCTCATACA-3′)位于 H1-RNA 基因序列的第－21～－9 碱基位, 含 *Hin*d Ⅲ和 *Bgl* Ⅱ 酶切位点, 扩增产物为 227 bp 的 H1 启动子。

从人 *bcl*-2 的 mRNA 基因(GenBank 序列号为 M14745)中选择 3 段 19 个碱基的特异性序列, 分别设计 3 对 64 nt 寡核苷酸, 每条寡核苷酸包括: 两端用于形成酶切位点(*Hin*d Ⅲ和 *Bgl* Ⅱ)的序列、作为终止信号的 5 个胸嘧啶核苷(T)、两个反向互补排列的 19 nt *bcl*-2 特异性序列由一个 9 nt 的间区隔开, 用于形成茎环结构, 每对 64 nt 寡核苷酸退火后形成两端各带 *Hin*d Ⅲ和 *Bgl* Ⅱ 位点的双链, 见表 1 及图 1, 以上引物及寡核苷酸均由上海申友(生物技术有限责任公司)合成。

表 1　合成的 64 nt 寡核苷酸

Tab 1　Oligonucleotides used in RNAi

	Sequence	Location
Oligo51	5′ gatcccc**G**TACATCCATTATAAGCTG**T**tcaagagaCAGCTTATAATGGATGTA**C**ttttggaaa 3′	82～100
	5′ agcttttccaaaaa**G**TACATCCATTATAAGCTG**t**ctcttgaaCAGCTTATAATGGATGTA**C**ggg 3′	
Oligo429	5′ gatcccc**C**TGGGGGAGGATTGTGGCC**T**tcaagagaGGCCACAATCCTCCCCCAG**T**ttttggaaa 3′	460～478
	5′ agcttttccaaaaa**C**TGGGGGAGGATTGTGGCC**t**ctcttgaaGGCCACAATCCTCCCCCA**G**ggg 3′	
Oligo654	5′ gatcccc**G**ACTCTGCTCAGTTTGGCC**T**tcaagagaGGCCAAACTGAGCAGAGTC**T**ttttggaaa 3′	685～703
	5′ agcttttccaaaaa**G**ACTCTGCTCAGTTTGGCC**t**ctcttgaaGGCCAAACTGAGCAGAGTC**G**ggg 3′	

Capital letters indicate *bcl*-2-targeting sequences, including sense strand and complementary antisense strand, forming a hairpin structure after transcription

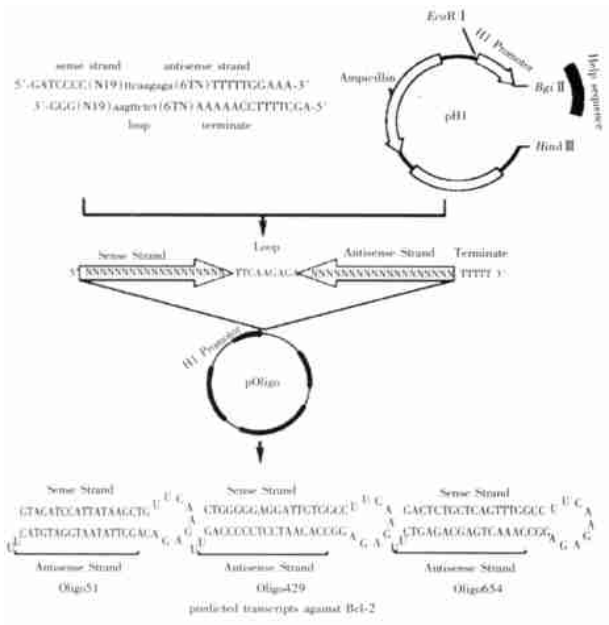


图 1　质粒的构建

Fig 1　Construction of the plasmid

1.3　质粒的构建

以提取的 HeLa 细胞基因组 DNA 为模板, 用 H-out1/H-out2 行 PCR, 扩增产物与 pUCm-T 载体连接后转化 *E. coli* DH5α; 挑取白斑菌落, 提取质粒。

以上述质粒为模板, 再用 H1F/ H1R 行 PCR 扩增 H1 启动子, 同上 T-A 克隆并提取质粒; 经 *Eco*R Ⅰ 与 *Hin*d Ⅲ双酶切后, 将片段插入 pBlueScript KS Ⅱ, 测定插入片段序列。

用 *Bgl* Ⅱ 单酶切 pCIN4, 并将 1 172 bp 的酶切产物作为辅助序列插入上述构建载体的 *Bgl* Ⅱ 酶切位点中, 转化 *E. coli* DH5α 并提取质粒, 重组后的载体命名为 pH1。

用 *Hin*d Ⅲ和 *Bgl* Ⅱ 将 pH1 载体线性化, 将合成的 3 对 *bcl*-2 特异的 64 nt 寡核苷酸退火后, 插入上述线性化载体, 对质粒进行酶切分析并测定插入片段序列, 阳性重组质粒分别命名为 pOligo51、pOligo429、pOligo654(图 1)。

1.4　细胞培养及转染

HeLa 细胞株(本室保存)用 DMEM(Hyclone)培养基(含 15% 小牛血清、100 U/ml 青霉素及 100 μg/ml 链霉素)于 37 ℃, 5% CO_2 孵箱内培养, 当细胞生长至 80% 融合时传代。转染前一天, 将对数生长期的 HeLa 细胞以 3×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 于 24 h 以内、细胞融合达 40%～60%时进行转染, 方法参照产品说明书, 每孔分别加入 2 μg 质粒与 10 μl LipofectAMINE, 转染 4 h, 转染所用培养基不含小牛血清及双抗, 以空载体及不加质粒转染作为对照。

1.5　间接免疫荧光

接种细胞前在 6 孔板内放入盖玻片, 于转染后 24～72 h 收获, PBS 漂洗后, 4 ℃丙酮固定 10 min, 以 PBS 稀释 Bcl-2 单抗(工作浓度为 1∶20), 4 ℃反应 18 h, 以含 0.01% 伊文思蓝的 PBS 稀释 FITC 标记的羊抗鼠 IgG(工作浓度为 1∶50), 37 ℃反应 1 h, 50% 甘油-PBS 封片、镜检(BX51 型 OLYMPUS 荧光显微镜), 以正常 HeLa 细胞、空载体转染作为阳性对照, 以 PBS 代替 Bcl-2 单抗作为阴性对照。

1.6　免疫印迹

于转染后 24～72 h 用胰蛋白酶消化细胞, PBS 洗涤 1 次, 每孔细胞均以 100 μl PBS 悬浮, 样品与 2× SDS 上样缓冲液[0.1 mol/L Tris-HCl(pH 6.8), 4% SDS, 20% 甘油, 0.1% 溴酚蓝, 5% β-巯基乙醇] 等体积混合, 超声破碎, 沸水浴 5 min, 取 10 μl 上样电泳, 行 SDS-PAGE(5% 积层胶、12% 分离胶)。

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

采用半干转印仪(BIO-RAD 公司),以 15 V 恒压转印 45 min,将凝胶中的蛋白质转移至 PVDF 膜上。PVDF 膜以含 2%脱脂奶粉的 TTBS[0.1 mol/L Tris-HCl(pH 7.6),0.9% NaCl,0.1% Tween-20]室温封闭 2 h,Bcl-2 单抗(工作浓度为 1∶200)4 ℃反应过夜,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(工作浓度为 1∶2 000)室温反应 2 h。用 ECL 试剂检测印迹膜,于暗室内用 X 线片曝光,显影后用光密度扫描系统(BIO-RAD 公司 GS-710 型)测定 Bcl-2 蛋白表达被干扰的相对水平。

2 结果

2.1 pH1 载体的构建

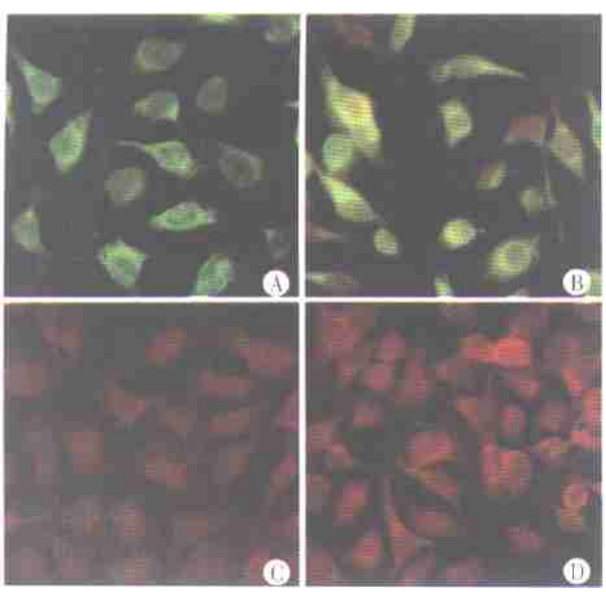
用引物 H-out1 和 H-out2 从 HeLa 细胞基因组 DNA 中扩增到 1 条 600 bp 片段,与设计相符。T-A 克隆后,以含有该片段的质粒为模板,用引物 H1F 和 H1R 扩增到 1 条 227 bp 片段,将其克隆到 pBlueScript KS Ⅱ后,经测序证实,与 H1-RNA 基因启动子序列完全相同。

2.2 构建插入 Bcl-2 特异 64nt 寡核苷酸的质粒

pH1 载体经 *Hin*d Ⅲ和 *Bgl* Ⅱ酶切后,凝胶电泳观察到被切下的辅助序列,证明该载体已被 *Hin*d Ⅲ和 *Bgl* Ⅱ线性化。3 对合成的 64 nt 寡核苷酸退火后,将其插入上述线性化的 pH1 载体,该载体原有的 *Bgl* Ⅱ酶切位点被破坏(图 1)。酶切鉴定的结果显示,所有的阳性重组质粒均不能被 *Bgl* Ⅱ切开;测序证实插入序列与设计完全相符。

2.3 间接免疫荧光和免疫印迹

间接免疫荧光的结果显示,正常 HeLa 细胞和 pH1 转染后的细胞均检测到特异性荧光,而 pOligo51、pOligo429、pOligo654 转染 HeLa 细胞后 24、48、72 h 均未观察到明显的荧光(图 2)。



A: Normal HeLa cells; B: HeLa cells tranfected with empty vector; C: Negative control; D: HeLa cells transfected with pOligo51

图 2 间接免疫荧光结果 转染 pOligo51 后 24 h Bcl-2 在 HeLa 细胞中的表达显著降低(IFA×400)

Fig 2 Indirect immunofluorescence assay shows gene silencing of Bcl-2 expression at 24 h after transfection of HeLa cells with pOligo51 (IFA×400)

免疫印迹的结果表明,与转染空载体 pH1 的对照相比,转染 pOligo51、pOligo429、pOligo654 后,HeLa 细胞的 Bcl-2 表达量明显降低(图 3),光密度扫描测定的结果显示,分别降低 83.5%、82.3%、45%(以 pH1 转染后 Bcl-2 表达量为 100%),其中 pOligo51 和 pOligo429 抑制 Bcl-2 表达的效果较强。



1: Normal HeLa cells; 2: HeLa cells tranfected with empty vector; 3: HeLa cells transfected with pOligo654; 4: HeLa cells transfected with pOligo429; 5: HeLa cells transfected with pOligo51

图 3 免疫印迹结果 显示转染后 72 h,不同质粒对 Bcl-2 表达的抑制效果

Fig 3 Western blotting analysis shows siRNA-mediated gene silencing of Bcl-2 expression at 72 h after transfection

3 讨论

质粒和病毒载体介导的 RNAi 在哺乳动物细胞都能取得有效的基因沉默,载体的启动子多用聚合酶 Ⅲ H1-RNA 基因启动子或 U6 启动子[4,5],其终止信号为 5 个 T,转录出末端为聚 U 的小 RNA 并于第 2、3 个 U 之间进行切割。在启动子下游插入一段反向互补序列,其转录产物经折叠、剪切,形成 3′端突出两个 U 的功能性 siRNA。将构建的质粒转染细胞后,siRNA 将持续产生,并通过识别、降解具有同源序列的 mRNA,最终干扰某基因的表达。作者在构建载体时选用了 H1 启动子,主要是因为该启动子具有更高的灵活性[6]。在载体的 *Bgl* Ⅱ酶切位点中加入一段 1 172 bp 的辅助序列(图 1),是为了插入 64 nt 寡核苷酸时确保酶切的效果。实验结果显示,利用该载体在转染 24 h 后即能有效地干扰目的基因的表达,并一直持续至转染后 72 h。本研究在设计 H1 启动子下游的 64 nt 寡核苷酸时主要参照了 Elbashir[7] 及 Zhang[8] 等的经验,对其中反向互补的 19 nt 目的基因序列的选择按照以下原则:在目的基因的 ORF 中选择结构为 5′-AA(N19)-3′的片段,选择靶基因特异性序列。另外,对该序列在 ORF 中的定位,及其 G%+C%对干扰效果的影响进行了探讨。Elbashir 等认为,19 nt 片段最好定位于起始密码子(AUG)下游 100 bp 之后,G%+C%应为 35%~55%,并且应避免选择富含 G 的序列。本室的研究显示,pOligo51 和 pOligo429 都能有效地干扰靶基因的表达,抑制率超过 80%,其 19 nt 序列的 G%+C%分别为 36.8%和 68.4%,前者距 AUG 只有 51 个碱基,后者的 G 含量为 52.1%;pOligo654 的设计遵循 Elbashir 等的

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

原则, 但它的抑制率只有 45%。因此, 作者认为 19 nt 片段在靶基因序列中的定位可能不是干扰效果的决定性因素, 但应避免选择基因的功能调节区域; 过高的 G%+C%会带来操作上的困难, 如退火、测序鉴定等, 并且由于其在 64 nt 插入片段中呈反向互补排列, 可能会影响其在细胞内转录, 但 G%+C%的范围亟待优化; G 含量过高容易形成复杂的空间结构, 但其上限为何尚待进一步研究。

bcl-2 基因编码分子量为 26×10^3 的蛋白, 该蛋白定位于线粒体膜、内质网膜及核膜上, 具有离子通道和停靠蛋白的双重功能, 通过维持线粒体的完整性阻止细胞凋亡。研究表明, 高表达 Bcl-2 蛋白不仅与许多肿瘤的发生有关, 而且在肿瘤化疗耐药的形成中起主要作用[9~12]。由于 Bcl-2 蛋白的生物功能在正常细胞中并不是绝对需要的, 抑制 Bcl-2 蛋白表达可能不会对机体产生较大的影响[13], 因此, 将 Bcl-2 作为抗肿瘤药物的新靶点, 发展其小分子抑制物无疑是肿瘤治疗的一个极具前景的切入点[14]。反义核酸技术及化学合成法的 RNAi 都曾用于抑制细胞内 Bcl-2 的表达, 但存在结果不稳定、成本高、导入的 siRNA 易降解等缺点, 而载体介导的 RNAi 因能在细胞内持续产生 siRNA, 其高效性、特异性及稳定性均优于上述方法。本研究构建了能在细胞内转录出 Bcl-2 特异性 siRNA 的载体, 并证明该载体可介导干扰 Bcl-2 在人肿瘤细胞系的表达, 目前, 作者正通过稳定转染, 试图建立 Bcl-2 功能缺陷的细胞系, 为 *bcl*-2 基因功能的研究以及相关疾病的基因治疗等提供细胞模型。

参考文献:

[1] Hannon G L. RNA interference[J]. Nature, 2002, 418(6894): 244—251.

[2] Jiang M, Milner J. Bcl-2 constitutively suppresses p53-dependent apoptosis in colorectal cancer cells[J]. Genes & Development, 2003, 17(7): 832—837.

[3] Cioca D P, Aoki Y, Kiyosawa K. RNA interference is a functional pathway with therapeutic potential in human myeloid leukemia cell lines[J]. Cancer Gene Therapy, 2003, 10(2): 125—133.

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

[5] 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.

[6] Tuschl T. Expanding small RNA interference[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(5): 446—448.

[7] Elbashir S M, Harborth J, Weber K, *et al*. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs[J]. Methods, 2002, 26(2): 199—213.

[8] Zhang L, Yang N, Mohamed-Hadley A, *et al*. Vector-based RNAi, a novel tool for isoform-specific knock-down of VEGF and anti-angiogenesis gene therapy of cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 303(4): 1169—1178.

[9] Cory S, Vaux D L, Strasser A, *et al*. Insights from Bcl-2 and Myc: malignancy involves abrogation of apoptosis as well as sustained proliferation[J]. Cancer Res, 1999, 59(7 Suppl): 1685s—1692s.

[10] Schmitt C A, Rosenthal C T, Lowe S W. Genetic analysis of chemoresistance in primary murine lymphomas[J]. Nat Med, 2000, 6(9): 1029—1035.

[11] Strasser A, Harris A W, Cory S. E mu-*bcl*-2 transgene facilitates spontaneous transformation of early pre-B and immunoglobulin-secreting cells but not T cells[J]. Oncogene, 1993, 8(1): 1—9.

[12] Strasser A, Harris A W, Bath M L, *et al*. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between Myc and Bcl-2[J]. Nature, 1990, 348(6299): 331—333.

[13] Veis D J, Sorenson C M, Shutter J R, *et al*. Bcl-2 deficient mice demostrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair[J]. Cell, 1993, 75(2): 229—240.

[14] Nicholson D W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents[J]. Nature, 2000, 407(6805): 810—816.

（编辑　张　宁）

参考文献中英文作者名的著录方法

医学期刊的论文中, 引用英文文献的比例很高, 但有不少作者将英、美人的姓名搞错, 以至用光盘核对时出现错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是: 名-名-姓, "名"可以有 1 个、2 个或 3 个; 但"姓"只有 1 个。因此, 从书籍或期刊中的姓名转录到文献时, 要将次序调整为姓-名-名。姓是不可以简写的; "名"可以缩写, 用第一个字母大写, 不用缩写点。数据库在著录作者姓名时, 已经调整为姓-名-名, 可照录。

例如: John Quincy Public 写为 Public J Q。

本刊编辑部

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