

新靶点 CyclinE 干扰 RNA 真核表达载体的构建^{*}

渠志臻¹, 刘 珊¹, 王艳艳¹, 高乃康², 呼格吉乐^{1△} (内蒙古医科大学附属医院: 1. 检验科; 2. 神经外科, 呼和浩特 010050)

【摘要】 目的 构建 4 个新靶点的人 CyclinE 干扰 RNA 真核表达载体, 转染人脑胶质细胞瘤 U251 细胞, 经反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 mRNA 表达, 获得干扰效果最好的真核表达载体, 为 CyclinE 成为人脑肿瘤标志物提供有价值的资料。**方法** (1)构建 4 个新靶点 CyclinE 干扰 RNA 的真核表达载体后, 用双酶切和碱基序列测定的方法鉴定载体构建成功与否; (2)用 Lipofectamine 2000 转染 4 个成功构建的载体到胶质瘤 U251 细胞株; (3)通过 RT-PCR 的结果检测转染后 CyclinEmRNA 表达量, 选出干扰效果最好的 1 个。**结果** (1)成功构建了 4 个新靶点的 CyclinE 干扰 RNA 真核表达载体即 P^{CyclinE-1}、P^{CyclinE-2}、P^{CyclinE-3}、P^{CyclinE-4}。(2)CyclinEmRNA 表达明显受到抑制, 并获得效果最好的 CyclinE 干扰 RNA 真核表达载体。**结论** 成功构建并筛选出效果最好的新靶点 CyclinE 干扰 RNA 真核表达载体, 使 U251 细胞的 CyclinE mRNA 表达明显降低。

【关键词】 干扰 RNA; 新靶点; 细胞周期蛋白 E; 胶质瘤

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2014. 21. 006 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)21-2958-02

Construction of new target eukaryotic expression vectors of CyclinE siRNA^{*} QU Zhi-zhen¹, LIU Shan¹, WANG Yan-yan¹, GAO Nai-kang², HU Geji-le¹ (1. Department of Laboratory Medicine; 2. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Neimenggu Medical University, Huhehaote, Neimenggu 010050, China)

【Abstract】 Objective To construct the 4 new targets eukaryotic expression vectors of human CyclinE interference specific RNA to transfect into glioma U251 cells, the mRNA expression was detected by RT-PCR, for obtaining the ukaryotic expression vectors with the best interference effect to provide the valuable data for Cyclin E becoming the human tumor marker. **Methods** (1)Four new targets eukaryotic expression vectors of RNA interference specific CyclinE were constructed, named as P^{CyclinE-1}, P^{CyclinE-2}, P^{CyclinE-3} and P^{CyclinE-4}. The double digestion method and the base sequence measuring were adopted to detect whether the vectors were successfully constructed. (2)The four newly constructed vectors were transfected into U251 cell line by Lipofectamine 2000. (3)The RT-PCR results was adopted to detect the expression quantity of CyclinE mRNA for selecting a vector with best interference. **Results** (1)4 new targets eukaryotic expression vectors of RNA interference specific for CyclinE were constructed. (2)CyclinEmRNA was obviously suppressed, the eukaryotic expression vector with best interference effect for human CyclinE interference specific RNA was obtained. **Conclusion** The new eukaryotic expression vector of CyclinE siRNA with best effect is successfully constructed, which significantly suppress the CyclinE mRNA expression of U251 cells.

【Key words】 interference RNA; new target; CyclinE; glioma

人脑胶质细胞瘤是人类中枢神经系统中最为常见的肿瘤之一, 其侵袭能力强, 增值速率快, 导致预后极差^[1]。尤其是胶质母细胞瘤, 恶性程度最高, 其发病的机制目前仍尚未明确, 而且不能像甲胎蛋白、前列腺特异抗原(PSA)、人附睾蛋白 4 (HE4)等作为常用、有效的肿瘤标志物^[2-3]。许多细胞周期调控的基因发生改变是正常的人脑胶质细胞和胶质瘤细胞的最大区别, 细胞周期蛋白 E(CyclinE)便是其中的一种。CyclinE 在人脑胶质瘤中表达, 与细胞周期蛋白质依赖激酶结合促进 pRB 的磷酸化, 并且和细胞周期蛋白依赖激酶抑制因子家族的基因结合在一起形成复合物, 促进细胞周期从 G1 到 S 进程继续下去。CyclinE 过量表达会使 G1 期缩短, 导致细胞提前进入 S 期, 干扰细胞核酸的复制和分裂, 促进肿瘤的形成

成^[4-5]。因此 CyclinE 表达下调的研究对临床工作就有十分重要的意义, 每个基因都不是单独存在的、并且发挥作用的, CyclinE 表达的下调会对哪些基因的表达和功能造成影响还需要去研究。干扰 RNA 技术能够特异的使基因沉默, 近年来作为一个常规试验已在研究肿瘤基因的多个领域被应用。本研究利用 RNA 干扰技术设计并构建了新的 CyclinE 干扰 RNA 真核表达载体, 用双酶切和碱基序列测定的方法鉴定, 用 Lipofectamine 2000 转染 4 个成功构建的载体到胶质瘤细胞, 通过检测转染后的 CyclinE mRNA 表达量, 筛选出干扰效果最好的 1 个载体, 为后续在 CyclinE 沉默后用双向电泳技术研究蛋白质组学的变化以及用基因芯片技术研究转录水平变化奠定试验基础。

^{*} 基金项目: 内蒙古自然科学基金资助项目(2012MS147)。

作者简介: 渠志臻, 男, 硕士, 检验师, 主要从事分子检验工作。 △ 通讯作者, E-mail: hujile07@163. com。

1 材料与方法

1.1 材料来源 人脑胶质瘤 U251 细胞株购自中国科学院上海细胞库; DNA 内切酶、DNA 连接酶购自 MBI 公司; Lipofectamine 2000 转染试剂盒购自上海英骏公司; DNA 凝胶回收试剂盒、琼脂糖等购自天根生化科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 新靶点 CyclinE 干扰 RNA 的构建

1.2.1.1 干扰载体的靶序列 根据 siRNA 设计原则和 Gene-Bank 中搜索的 CyclinEcDNA 序列, 设计并合成 4 对 siRNA, 靶序列即干扰部位如下, P^{CyclinE-1}: 5'-GGA TGG TTC CAT TTG CCA TGG -3'; P^{CyclinE-2}: 5'-GCT TCG GCC TTG TAT CAT TTC-3'; P^{CyclinE-3}: 5'-GCC AGC CTT GGG ACA ATA ATG-3'; P^{CyclinE-4}: 5'-GCC CTT AAG TGG CGT TTA AGT-3'。同时设立阴性对照(NC)。siRNA 正义链模板的 5'端添加了 CACC, 与 Bbs I 酶切后形成的黏端互补; 反义链模板的 5'端添加了 GATC, 与 BamHI 酶切后形成的黏端互补。将载体模板退火后, 转到 JM109 感受态细胞中。

1.2.1.2 干扰载体的检验 把所提取的质粒用 BamH I、Pst I 进行双酶切鉴定。正确的重组载体不会被 Pst I 切开但是会被 BamH I 切开。酶切结果正确的质粒用碱基序列测定的方法鉴定载体构建成功与否。

1.2.2 干扰质粒对 U251 细胞的稳定转染 按照 Lipofectamine 2000 转染试剂说明书, 把经过鉴定正确的质粒和脂质体混合后分别加入 U251 细胞中混合培养, 48 h 后在荧光倒置显微镜下观察试验结果。

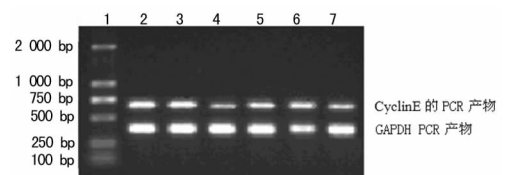
1.2.3 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR) 检测各组 CyclinE-mRNA 的含量提取细胞总 RNA, 进行 RT-PCR 反应, CyclinE 上游引物为 5'-ACC AGT TTG CGT ATG TGA C-3', 下游引物为 5'-CTG CTC TGC TTC TTA CCG-3', 扩增产物为 583 bp。GAPDH 上游引物为 5'-CGG GAA ACT GTG GCG TGA T-3', 下游引物为 5'-GAG TGG GTG TCG CTG TTG A-3' 扩增产物为 300 bp。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 酶切和测序结果 双酶切检测和碱基序列测定结果表明, 所有的 CyclinE 真核表达载体以及阴性对照载体均与所设计的序列完全相同, 并且没有发现任何异常存在。

2.2 RT-PCR 检测稳定转染干扰 RNA 真核表达载体后 CyclinE mRNA 水平 各基因目的片段平均 IDV 与 GAPDH 基因 IDV 比值 (IDV CyclinE/IDV GAPDH) 即为目的基因的相对 DNA 水平: 各组依次分别为 0.590 ± 0.013 , 0.530 ± 0.008 , 0.130 ± 0.004 , 0.390 ± 0.011 , 0.580 ± 0.007 , 0.280 ± 0.013 。对各组数据进行 *t* 检验得到 P^{NC}-U251、P^{CyclinE-1}-U251、P^{CyclinE-2}-U251、P^{CyclinE-3}-U251、P^{CyclinE-4}-U251 标本中, P^{CyclinE-1}-U251、P^{CyclinE-2}-U251、P^{CyclinE-3}-U251、P^{CyclinE-4}-U251 与对照相比, mRNA 水平 (以灰度计算) 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 且 P^{CyclinE-1}-U251 与 P^{CyclinE-2}-U251、P^{CyclinE-3}-U251 之间 mRNA 水平 (以灰度计算) 的差异亦有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 1。



注: 1 泳道为 Marker, 2、3、4、5、6、7 泳道分别加入 U251、瞬时转染 P^{NC}-U251、P^{CyclinE-1}-U251、P^{CyclinE-2}-U251、P^{CyclinE-3}-U251、P^{CyclinE-4}-U251 细胞的 GAPDH PCR 产物和 CyclinE 的 PCR 产物。

图 1 RT-PCR 检测

2.3 倒置荧光显微镜观察 CyclinE 干扰 RNA 真核表达载体瞬时转染结果 转染 24 h 后, 在倒置荧光显微镜下观察各组细胞, 除未转染的组别外都有绿色荧光蛋白表达。

3 讨论

RNA 干扰的原理是 21~25 bp 的小干扰 RNA (siRNA) 通过和 Dicer 酶等复合物的一系列作用使得同源序列 mRNA 发生降解^[6]。干扰 RNA 技术能够特异的使基因沉默, 近年来作为一个常规试验已在研究肿瘤基因的多个领域被应用。如肿瘤细胞中基因的改变引起侵袭能力、生长速率、细胞凋亡水平变化的研究^[7-8]; 在新抗肿瘤药中的研究^[9]; 以及肿瘤在早期发生、发展时异常变化等研究^[10]。

CyclinE 在人脑胶质瘤中表达, 而且 CyclinE 过量表达会使使得 G1 期缩短, 导致细胞提前进入 S 期, 干扰细胞核核酸的复制和分裂, 造成肿瘤的形成。肿瘤的形成并非是某个基因的作用, 因此 CyclinE 不是单独存在并且发挥作用的, CyclinE 表达下调会影响许多基因的表达和细胞的功能。很有可能这些基因在胶质瘤的形成和发展中起着非常重要的作用。所以本研究利用 RNA 干扰技术使 CyclinE 沉默, 并且沉默效果明显, 为后续在 CyclinE 沉默后用基因芯片技术研究转录水平变化以及用双向电泳技术研究蛋白质组学的变化奠定一定基础。

蛋白质组学是在蛋白质整体水平上对肿瘤等疾病发生、发展等多方面进行探索的学科。利用质谱技术和双向电泳来研究蛋白质组学, 可以发现不同因素影响下的多种有意义的蛋白质差异表达, 为寻找直接或间接参与肿瘤侵袭、转移等过程的关键蛋白质分子开拓思路。目前在分析细胞蛋白质的过程中常以亚细胞蛋白质组为切入点, 即把细胞核与细胞质的蛋白质分开单独研究, 减少了全细胞分析的复杂性, 低丰度的蛋白质能够很大富集, 提高了其检出的数量, 使研究结果具体化。基因芯片技术是通过与一些已知的荧光染料标记核酸探针进行杂交从而得出样品核酸分子相关信息的方法, 具有高通量、高效率等优点。因此基因芯片技术在肿瘤基因差异性表达, 诊断和筛选有意义的新基因等多方面研究中也得到了广泛的应用^[11]。因此, 当用干扰 RNA 的技术使得 CyclinE 沉默后, 再用基因芯片技术及双向电泳来做相应的研究就可能发现更多有意义的、相关的差异表达基因和蛋白质, 为胶质瘤的研究提供有价值的资料。

参考文献

- [1] Mizoguchi M, Kuga D, Guan YL, et al. Loss of heterozygosity analysis in malignant gliomas[J]. (下转第 2962 页)

有神经元,由此也可部分解释精神分裂症的发病与发病前智商有关^[11]。基因型与生化指标的差异是否真的存在因果关系,如果有关系其机制又是什么,这一系列问题有待进一步的研究来揭示。

总之,本研究结果表明中国人群 IL-1 β 基因 rs146219183 位点的单核苷酸多态性与精神分裂症存在关联性,其基因型频率和等位基因频率在患者组和对照组之间差异明显,AA 和 TT 型的人均易感精神分裂症。且发现 3 种不同基因型的精神分裂症患者之间其生化指标 CA、ALKP 和 GGT 差异明显。

参考文献

[1] 阴永彬,何静,杨虎权. 首发精神分裂症患者细胞因子水平对照研究[J]. 临床心身疾病杂志,2011,17(1):4-6.

[2] 张伟,宋学勤,吕路线,等. 精神分裂症 IL-1 β TNF- α 基因多态性研究[J]. 临床心身疾病杂志,2013,19(1):1-4.

[3] Rosa A, Peralta V, Papiol S, et al. Interleukin-1beta (IL-1beta) gene and increased risk for the depressive symptom-dimension in schizophrenia spectrum disorders [J]. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2004, 124B (1):10-14.

[4] Song XQ, Chen XM, Zhang W, et al. Study of adiponectin, IL-1 β , IL-6 and TNF- α in first episode drug naive schizophrenia [J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2013, 93(41): 3256-3260.

[5] Anna M, Fineberg, Lauren M, et al. Inflammatory Cyto-

kines and Neurological and Neurocognitive Alterations in the Course of Schizophrenia, biochemical psychiatry [J]. 2013, 73(10):951-966.

[6] Shibuya M, Watanabe Y, Nunokawa A, et al. Interleukin 1 beta gene and risk of schizophrenia: detailed case-control and family-based studies and an updated meta-analysis [J]. Hum Psychopharmacol, 2014, 29(1):31-37.

[7] 宋学勤,陈旭梅,张伟,等. 脂联素及白细胞介素-1 β 等细胞因子在首发未用药精神分裂症患者中的作用[J]. 中华医学杂志, 2013, 93(41):3256-3260.

[8] 李立青,田亚平,董矜,等. ACTN3 基因单核苷酸多态性与运动能力的关系及与生化指标的关系[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(2):191-194.

[9] 王秋颖. 碱性磷酸酶特性及其应用的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(1):157-161.

[10] 温盛霖,程敏锋,王厚亮,等. 精神分裂症患者血清白蛋白、尿酸、胆红素和谷酰转肽酶水平的研究[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版, 2012, 6(19):5922-5925.

[11] Khandaker GM, Barnett JH, White IR, et al. A quantitative meta-analysis of population-based studies of premorbid intelligence and schizophrenia [J]. Schizophr Res, 2011, 132(2/3):220-227.

(收稿日期:2014-03-16 修回日期:2014-05-20)

(上接第 2959 页)

Brain Tumor Pathol, 2011, 28(3):191-196.

[2] Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults [J]. N Engl J Med, 2008, 359(5):492-507.

[3] Piccolo SR, Frey LJ. Clinical and molecular models of glioblastoma multiforme survival [J]. Int J Data Min Bioinform, 2013, 7(3):245-265.

[4] 秦优优,杨学伟,崔武,等. siRNA-Smad3 对乳腺癌 MCF-7 细胞株 CyclinE 表达影响的研究[J]. 黑龙江医药科学, 2011, 34(4):67-68.

[5] Flores O, Wang Z, Knudsen KE, et al. Nuclear targeting of cyclin-dependent kinase 2 reveals essential roles of cyclin-dependent kinase 2 localization and cyclin E in vitamin D-mediated growth inhibition [J]. Endocrinology, 2010, 151(3):896-908.

[6] 王明玉,王文静,宋现让. RNA 干扰在乳腺肿瘤治疗中的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(2):272-275.

[7] Dong X, Liu A, Zer C, et al. siRNA inhibition of telomerase enhances the anti-cancer effect of doxorubicin in breast cancer cells [J]. BMC Cancer, 2009, 9:133.

[8] 呼格吉乐,张军力,段美庆,等. 新靶点 CDK2 干扰 RNA 对人脑胶质瘤增殖影响 [J]. 中国公共卫生杂志, 2013, 6 (29):855-857.

[9] 李白翎,杜大海,张冠鑫,等. 小干扰 RNA 抑制 Δ Np63 α 表达对人食管鳞癌细胞生物学特性的影响 [J]. 第二军医大学学报, 2013, 34(8):813-818.

[10] Quon K, Kassner PD. RNA interference screening for the discovery of oncology targets [J]. Expert Opin Ther Targets, 2009, 13(9):1027-1035.

[11] Galia A, Calogero AE, Condorelli R, et al. PARP-1 protein expression in glioblastoma multiforme [J]. Eur J Histochem, 2012, 56(1):e9.

(收稿日期:2014-01-15 修回日期:2014-03-10)

欢迎投稿

欢迎订阅