

·论 著·

利用载体介导的 RNA 干扰技术抑制人骨肉瘤细胞 HOS-8603 内维生素 D₃ 受体的表达及功能

张 晔¹,朱晓燕²,刘宇健^{1*},卢 建¹

(1. 第二军医大学基础医学部病理生理学教研室,上海 200433;2. 基础医学部生理学教研室)

[摘要] 目的:构建由载体介导的抑制人维生素 D₃ 受体(VDR)表达的 RNA 干扰载体,并在人骨肉瘤细胞中初步研究其对 VDR 表达及功能的影响。方法:通过在线筛选设计了两段针对人 VDR 的 RNAi 序列,并与载体 pSilencer-2.1-U6 连接,获得了表达载体 pSilencer-2.1-U6-VDR1 与 pSilencer-2.1-U6-VDR2。利用脂质体转染法分别转入人骨肉瘤细胞系 HOS-8603 细胞中,通过 Western 印迹法检测其对内源性 VDR 蛋白表达、对 1,25-二羟维生素 D₃[1,25(OH)₂D₃]激活 PKC 作用的影响,利用细胞计数和 MTT 的方法检测其对 1,25(OH)₂D₃ 抑制 HOS-8603 细胞增殖作用的影响。结果:在分别转染 pSilencer-2.1-U6-VDR1/2 的 HOS-8603 细胞中,与对照细胞比较,内源性 VDR 蛋白的表达、1,25(OH)₂D₃ 对细胞的增殖抑制作用以及 1,25(OH)₂D₃ 快速诱导 PKC 磷酸化的作用均有显著降低。结论:构建的表达载体 pSilencer 2.1-U6-VDR1 与 pSilencer 2.1-U6-VDR2 均能在细胞水平显著抑制内源性 VDR 基因的表达,并能有效阻断一些由 VDR 介导的 1,25(OH)₂D₃ 生物学作用,为进一步研究 VDR 与维生素 D₃ 的功能提供了一个有用工具。

[关键词] RNA 干扰;骨肉瘤;受体;维生素 D₃

[中图分类号] R 738.1 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2006)10-1076-05

Inhibitory effect of vector-mediated RNAi technique on expression and function of vitamin D₃ receptor in human osteosarcoma cell line HOS-8603

ZHANG Ye¹, ZHU Xiao-yan², LIU Yu-jian^{1*}, LU Jian¹ (1. Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;2. Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University)

[ABSTRACT] **Objective:** To construct an expression vector containing RNA interfering (RNAi) sequence targeting human vitamin D₃ receptor (VDR) protein gene, and to investigate its inhibitory effect on the expression and function of VDR in a human osteosarcoma cell line. **Methods:** Two small interfering RNA sequences targeting VDR were designed by online screening and were cloned into the expression vector (pSilencer-2.1-U6). Then the products, pSilencer-2.1-U6-VDR1 and pSilencer-2.1-U6-VDR2, were separately transfected into a human osteosarcoma cell line (HOS-8603) by liposome. Western blot was employed to determine their effect on VDR protein expression and 1,25(OH)₂D₃-induced phosphorylation of PKC. Cell counting and MTT were used to evaluate their influence on the inhibitory effects of 1,25(OH)₂D₃ on HOS-8603 cells proliferation. **Results:** Compared to HOS-8603 cells transfected with control vectors, those transfected with pSilencer2.1-U6-VDR1 or pSilencer2.1-U6-VDR2 had significant decreases in the expression of VDR protein, in the inhibitory effects of 1,25(OH)₂D₃ on the cell proliferation, and in quick phosphorylation of PKC induced by 1,25(OH)₂D₃. **Conclusion:** The vectors constructed in the present study (pSilencer2.1-U6-VDR1 and pSilencer2.1-U6-VDR2) can significantly suppress the VDR expression in HOS-8603 cells, and block some biological activities of 1,25(OH)₂D₃ mediated by VDR, which paves a way for further study on the biological functions of VDR and vitamin D₃.

[KEY WORDS] RNA interference; osteosarcoma; receptors; vitamin D₃

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(10):1076-1080]

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指具有同源性的双链 RNA 诱导产生的序列特异性的转录后基因沉默的现象,目前为止已在植物、果蝇、线虫、小鼠等多种不同种属的生物体中观察到了 RNAi 作用的存在^[1]。由于 RNAi 作用的序列特异性、抑制基因表达的高效性以及方法学上的相对快速简便,近年来对于这项技术的研究成了一个新的

热点,目前已经用不同方法在多种细胞中成功地诱导出了 RNAi 效应^[2]。

[基金项目] 国家自然科学基金(30270522)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30270522)。

[作者简介] 张 晔,硕士,讲师。

E-mail:zhangyeen2004@yahoo.com.cn

*Corresponding author. E-mail:liuyujianz@yahoo.com.cn

1, 25-二羟维生素 D₃ [1, 25(OH)₂ D₃] 是维生素 D₃ 的活性形式, 具有非常广泛的生物学效应。与其他经典的甾体激素相似, 1, 25(OH)₂ D₃ 发挥其生物学效应主要有两种作用途径。一是通过与其特异的核受体 (vitamin D₃ nuclear receptor, VDR, 一种激素依赖性转录调节因子) 结合, 进而与维甲类 X 受体 (RXR) 结合形成异二聚体 (heterodimers) 形式, 与靶基因启动子附近的维生素 D₃ 反应元件 (VDRE) 相互作用, 并在多种转录相关因子的参与下, 调节靶基因的表达^[3]。这一作用途径被称为激素的基因组作用; 另一途径则是通过跨膜的信号转导机制引起一些快速的生物学效应。这些效应主要是通过 1, 25(OH)₂ D₃ 诱导细胞内的一些信号转导分子磷酸化实现的^[4-6], 也被称为激素的非基因组作用。

我们以往的工作^[7-9]表明, 1, 25(OH)₂ D₃ 及其 3 种新型类似物对人骨肉瘤细胞系 (HOS-8603) 和人原始巨核白血病细胞系 (HIMeg) 的增殖过程有非常明显的抑制作用, 并诱导其向更成熟方向分化; 1, 25(OH)₂ D₃ 可以诱导 HOS-8603 细胞中 p21 的表达; 利用反义核酸技术阻断 VDR 后, 1, 25(OH)₂ D₃ 对 HOS-8603 细胞的增殖抑制作用、对 p21 的诱导作用均有减弱, 表明 VDR 参与了 1, 25(OH)₂ D₃ 对 HOS-8603 细胞的增殖抑制以及 1, 25(OH)₂ D₃ 对 p21 的诱导^[10, 11]。因此在我们所用的细胞模型系统中, 1, 25(OH)₂ D₃ 通过 VDR 介导诱导 p21 基因的表达可能是 1, 25(OH)₂ D₃ 调节细胞增殖分化的机制之一。但是, 1, 25(OH)₂ D₃ 对细胞增殖分化的调节是一个非常复杂的生物学过程, 涉及的因素有很多, 我们的实验结果也表明利用反义核酸技术阻断内源性 VDR 并不能完全阻断 1, 25(OH)₂ D₃ 对细胞增殖分化的调节作用。那么, 这种阻断的不完全是由于反义核酸技术本身对 VDR 阻断的不完全, 还是 1, 25(OH)₂ D₃ 对细胞增殖分化的调节作用存在受体外的途径呢? 为此本研究建立载体介导的 VDR-RNAi 表达载体, 观察 VDR 阻断后对 1, 25(OH)₂ D₃ 抑制细胞增殖抑制作用的影响, 以及 VDR 在 1, 25(OH)₂ D₃ 快速诱导细胞内一些信号转导分子磷酸化过程中的作用, 为进一步研究维生素 D₃ 生物学功能及其作用机制打下基础。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株及细胞 感受态大肠杆菌 HB101 购自 TaKaRa 公司。siRNA 表达载体 pSilencer

2.1-U6(潮霉素抗性)和内参照质粒购自 Ambion 公司。人骨肉瘤细胞系 HOS-8603 来自长海医院病理科, 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基常规培养。

1.2 试剂 QIA GEN Plasmid Midi Kit 购自 QIA-GEN 公司。T₄ 连接酶购自 TaKaRa 公司。插入片段序列由上海申能博彩公司合成。BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自 Bio-Rad 公司。潮霉素 B 购自生工公司。大鼠抗 VDR 单克隆抗体购自 NeoMarker 公司, 小鼠抗 α -actin 单克隆抗体购自 Sigma 公司, 兔抗磷酸化 PKC(p-PKC) 多克隆抗体购自 Cell Signaling 公司。FuGene6 购自 Roche 公司。

1.3 VDR-siRNA 表达载体 pSilencer 2.1-U6-VDR 的构建 如图 1 所示, 我们针对小鼠、大鼠和人 VDR 的 cDNA 序列的同源部分选择了两段靶序列, 通过 BLAST 搜索显示与其他基因没有明显同源性, 并根据 pSilencer 2.1-U6 质粒的特点设计了两段 siRNA 模板。合成的 DNA 序列如下: (1) pSilence 2.1-U6-VDR1. target: GGC TGC AAA GGC TTC TTC A (~ 242 bp); design sense: 5-GAT CCC GGC TGC AAA GGC TTC TTC ATT CAA GAG ATG AAG AAG CCT TTG CAG CCT TTT TTG GAA A-3; antisense: 3-GGC CGA CGT TTC CGA AGA AGT AAG TTC TCT ACT TCT TCG GAA ACG TCG GAA AAA ACC TT TTC GA-5。(2) pSilence 2.1-U6-VDR2. target: GTC AAG TGC CAT TGA GG TC (~ 907 bp); design sense: 5-GAT CCC GTC AAG TGC CAT TGA GGT CTT CAA GAG A GA CCT CAA TGG CAC TTG ACT TTT TTG GAA A-3, antisense: 3-GGC AGT TCA CGG TAA CTC CAG AAG TTC TCT CTG GAG TTA CCG TGA ACT GAA AAA ACC TTT TCG A-5。上述序列经退火成双链后, 连接入线性的 siRNA 表达载体 pSilence 2.1-U6。经 DNA 序列分析验证后, 常规大量扩增并按 QIA GEN 试剂盒说明书操作抽提质粒用于实验。

1.4 转染 按 FuGene6 说明书操作。以 1 μ g 质粒 DNA : 3 μ l FuGene6 的比例将质粒与 FuGene6 混合后加入无血清无酚红培养基培养的细胞上清中, 8 h 后加入小牛血清使血清浓度为 10%。48 h 后收集细胞。

1.5 稳定转染细胞的筛选 将转染细胞消化(同时以未转染的细胞作为对照), 接种于 24 孔板 (2 \times 10⁴/孔)。加潮霉素溶液 (50 μ g/ μ l), 终浓度为 100~400 μ g/ml, 37 培养约 2 周后, 出现抗潮霉素克隆。将稳定转染细胞克隆传代, 并用含有 200 μ g/

ml 潮霉素的培养液维持培养。

1.6 $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ 快速诱导 PKC 磷酸化实验
取对数生长期细胞种植于 6 孔板培养,细胞初始数目为 3×10^6 /孔。待细胞基本长满后以 $1 \times \text{PBS}$ 清洗 3 次/孔(去除残留血清),更换新鲜培养液(无血清),继续培养 12 h 后加入 $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ 使终浓度为 10^{-7}mol/L ,对照组细胞加等体积异丙醇(终浓度为 0.1%),30 min 后去除培养液,裂解细胞(100 μl /孔加入裂解液)并收集裂解液,用 Western 印迹分析法检测 p-PKC 及 β -actin 的改变。

1.7 Western 印迹分析 将收集的裂解液于 12 000 r/min,4 $^\circ\text{C}$ 离心 15 min 去除细胞碎片,吸取上清液即为细胞总蛋白,用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度。取 15 μg 蛋白质经 5% 积层胶、12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离,电转移至硝酸纤维素膜(所需条带具体位置由预染的蛋白质分子量标志确定)。印迹膜在含 5 g/L 脱脂奶粉、0.1% Tween 20 的 TBS 缓冲液中封闭 1 h。膜清洗后分别用 VDR (1:1 000 稀释)、 β -actin(1:5 000 稀释)和 p-PKC (1:1 000 稀释)抗体 4 $^\circ\text{C}$ 孵育 16 h,TBS 缓冲液漂洗后分别用 HRP 标记的羊抗兔、羊抗小鼠及羊抗大鼠二抗溶液(1:1 000 稀释)中室温孵育 2 h,洗膜后用 ECL 检测试剂盒显色、X 线片曝光、显影和定影。结果以 ScnImage 软件扫描灰度并分析,对 p-PKC 的诱导实验分别计算诱导率,计算公式为:诱导率 = |处理组细胞的灰度 - 对照组细胞的灰度| / 对照组细胞的灰度 $\times 100\%$ 。

1.8 细胞增殖实验 取对数生长期细胞分别置于 6 孔及 24 孔板培养,细胞初始数目分别为 3×10^5 /孔(6 孔板)和 2×10^4 /孔(24 孔板),12 h 后更换新鲜的培养液(5% FBS 的 DMEM 培养液),并加入 $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ 使终浓度为 10^{-7}mol/L ,对照组细胞加等体积异丙醇(终浓度为 0.1%)。细胞继续培养 96 h 后,去除培养液。6 孔板培养的细胞每孔加 0.3 ml 0.125% 胰酶消化后,直接以细胞计数板手工计数;24 孔培养的细胞加入 0.3 ml/孔 MTT 染料(5 mg/ml),4 h 后去除多余染料,加入 DMSO 200 ml/孔溶解,混匀后于 ELISA 酶联检测仪 570 nm 波长测光密度值,分别计算增殖抑制率。计算公式为:增殖抑制率 = (对照组的细胞数目 - 处理组的细胞数目) / 对照组的细胞数目 $\times 100\%$ 。MTT 法计算则将细胞数目改为光密度值。

1.9 统计学处理 以 SPSS 统计软件分析。

2 结果

2.1 pSilencer 2.1-U6-VDR 质粒的鉴定 经测序

结果证实:pSilencer 2.1-U6-VDR1 与 pSilencer 2.1-U6-VDR1 两种质粒均构建成功。

2.2 pSilencer 2.1-U6-VDR 转染对 HOS-8603 细胞中 VDR 蛋白表达的影响

2.2.1 pSilencer 2.1-U6-VDR1/2 瞬时转染对 HOS-8603 细胞中 VDR 蛋白表达的影响 6 孔板培养的 HOS-8603 细胞每孔分别转染 3.0 μg pSilencer 2.1-U6-VDR1/2 质粒,对照采用等量阴性质粒转染。48 h 后提取蛋白用 Western 印迹分析 VDR 蛋白表达水平,同时检测 β -actin 蛋白表达作为内参照。结果可见(图 1A),与转染阴性质粒的细胞相比,pSilencer 2.1-U6-VDR1 与 pSilencer 2.1-U6-VDR2 转染细胞后 VDR 蛋白表达均有降低($P < 0.05$)。

2.2.2 pSilencer 2.1-U6-VDR 稳定转染对 HOS-8603 细胞中 VDR 蛋白表达的影响 6 孔板分别培养稳定转染 pSilencer 2.1-U6-VDR1、pSilencer 2.1-U6-VDR2 及阴性质粒的 HOS-8603 细胞,经提取蛋白后用 Western 印迹分析 VDR 蛋白表达水平,同时检测 β -actin 蛋白表达作为内参照。结果可见(图 1B),与稳定转染阴性质粒的细胞相比,pSilencer 2.1-U6-VDR1、pSilencer 2.1-U6-VDR2 稳定转染细胞后,VDR 蛋白表达均有明显降低($P < 0.01$)。

2.3 VDR 阻断后对 $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ 调节 HOS-8603 细胞增殖抑制的影响 用 10^{-7}mol/L $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ 处理稳定转染 pSilencer 2.1-U6-VDR1、pSilencer 2.1-U6-VDR2 及阴性质粒的 HOS-8603 细胞,96 h 后用细胞计数及 MTT 方法检测细胞数目的变化,结果显示:与对稳定转染阴性质粒细胞的增殖抑制作用相比, $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ 对稳定转染 pSilencer 2.1-U6-VDR1、pSilencer 2.1-U6-VDR2 细胞的增殖抑制作用均出现显著的降低(细胞计数结果:抑制率分别为 $(12.8 \pm 1.5)\%$ 和 $(4.9 \pm 0.5)\%$,对照载体 $(38.6 \pm 2.1)\%$, $P < 0.01$;MTT 结果:抑制率分别为 $(7.9 \pm 2.4)\%$ 和 $(2.2 \pm 1.6)\%$,对照载体为 $(22.1 \pm 3.2)\%$ ($P < 0.01$)。

2.4 VDR 阻断后对 $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ 快速诱导 PKC 磷酸化的影响 用 10^{-7}mol/L $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ 分别处理稳定转染 pSilencer 2.1-U6-VDR1、pSilencer 2.1-U6-VDR2 及阴性质粒的 HOS-8603 细胞,30 min 后用 Western 印迹法检测磷酸化 PKC 的改变,同时检测 β -actin 蛋白表达作为内参照,结果显示(图 2):与稳定转染阴性质粒的 HOS-8603 细胞相比,在分别稳定转染 pSilencer 2.1-U6-VDR1、pSilencer 2.1-U6-VDR2 的 HOS-8603 细胞中,

1,25(OH)₂D₃ 快速诱导 PKC 的作用均出现不同程度减弱,诱导率分别为(117.6 ±13.3)%和(109.2 ±

15.5)%,而对照载体为(204.2 ±5.1)%(*P* < 0.01)。

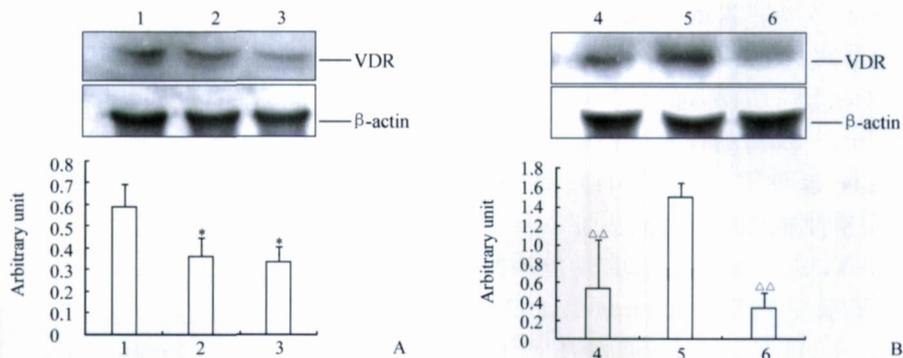


图 1 RNAi 载体瞬时转染(A)和稳定转染(B)对 VDR 蛋白表达的干扰作用

Fig 1 Identification of interfering efficiency on VDR after transient transfection (A) and stable transfection (B)

1: Transfected with 3.0 μg control vector. 2: Transfected with 3.0 μg pSilencer2. 1-U6-VDR1. 3: Transfected with 3.0 μg pSilencer2. 1-U6-VDR2; * *P* < 0.05 vs transfected with 3.0 μg control vector group, *n* = 3. 4: Stably transfected with pSilencer2. 1-U6-VDR1. 5: Stably transfected with control vector. 6: Stably transfected with pSilencer2. 1-U6-VDR2; *P* < 0.01 vs stably transfected with control vector group, *n* = 3

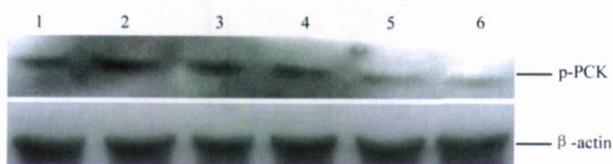


图 2 VDR 阻断对 1,25(OH)₂D₃ 快速诱导 PKC 磷酸化的影响

Fig 2 Effect of 1,25(OH)₂D₃ on phosphorylation of PKC in HOS-8603 cells stably transfected with small interfering RNA

Cells transfected with vacant vectors, pSilencer2. 1-U6-VDR1-hygro and pSilencer2. 1-U6-VDR2-hygro were treated with 10⁻⁷ mol/L 1,25(OH)₂D₃ or vehicles for 30 min. Then protein was isolated from cells and was subjected to Western blot analysis. 1: Cells transfected with control vectors and treated with vehicle; 2: Cells transfected with control vectors and treated with 1,25(OH)₂D₃; 3: Cells transfected with pSilencer2. 1-U6-VDR1 and treated with vehicle; 4: Cells transfected with pSilencer2. 1-U6-VDR1 and treated with 1,25(OH)₂D₃; 5: Cells transfected with pSilencer2. 1-U6-VDR2 and treated with vehicle; 6: Cells transfected with pSilencer2. 1-U6-VDR2 and treated with 1,25(OH)₂D₃

3 讨论

目前对 RNAi 机制的了解主要来自于对线虫、植物、果蝇的研究,研究表明双链 RNA 进入细胞内后可能被切割成 21 ~ 23 bp 的 RNA 小片段,并诱导细胞内产生一种 RNA 诱导的沉默复合物(RNA induced silencing complex, RISC),并通过序列互补识别继而切割、降解特定的内源性 mRNA,从而抑制内源基因的表达^[12]。因此利用 RNAi 技术研究基因功能最重要的步骤莫过于靶序列的选择,其原则一般有如下几条^[13~15]: (1) 在靶基因的开放阅读

框架内选择(为避开转录起始复合物的干扰,最好选择起始密码子下游 100 个核苷酸以后的片段); (2) GC 比例应在 30% ~ 50% 之间,尽量避免有多个 G 连续出现的区段; (3) 用 BLAST 搜索确定所选序列与其他基因无同源性。同时进一步研究还发现对于大多数哺乳动物, > 30 bp 的双链 RNA 进入细胞内会引发 PKR (interferon induced protein kinase or RNA dependent protein kinase) 反应,导致大范围的 mRNA 转录停止,引起强烈的细胞毒性。因此在研究哺乳动物基因功能时, RNAi 靶序列的长度最好在 19 ~ 23 bp 之间^[14]。最早人们通常是通过化学合成的方法得到小片段的双链 RNA,但由于 RNA 易降解的特点,合成存在一定难度且价格昂贵。此后科学家们又构建出了带有 RNA 聚合酶 启动子的 siRNA 表达载体^[15],转染细胞后在胞内转录出发夹型的 siRNA,从而同样达到了抑制靶基因表达的目的。

本研究采用了带有 RNA 聚合酶 启动子 U6 的 siRNA 表达载体 pSilencer 2. 1-U6。我们首先针对小鼠、大鼠和人 VDR 的 cDNA 序列开放阅读框内的同源部分选择了两段靶序列,通过 BLAST 搜索显示与其他基因没有明显同源性后,根据 pSilencer 2. 1-U6 质粒的特点设计了两段 siRNA 模板。载体构建完成并测序鉴定无误后分别转染细胞。VDR 蛋白在不同状态下的半衰期有所不同,在未与配体结合时的半衰期约为 2 ~ 4 h^[16],因此我们选择转染 48 h 后检测蛋白表达变化。结果显示 pSilencer 2. 1-U6-VDR1 与 pSilencer 2. 1-U6-VDR2 均可显著降低 VDR 蛋白的表达,说明 VDR siRNA 能特

异识别细胞内其同源 mRNA 序列导致其降解,并能通过阻止其转录而降低 HOS-8603 细胞 VDR 蛋白的水平,但对细胞中其他非同源蛋白(如 α -actin)没有明显影响,表明其作用具有序列特异性。

本实验室过去的实验^[7-11]表明,1,25(OH)₂D₃ 对人骨肉瘤细胞系 HOS-8603 的增殖过程有非常明显的抑制作用,VDR 参与了 1,25(OH)₂D₃ 对 HOS-8603 细胞的增殖抑制作用。因此为进一步研究 pSilencer 2.1-U6-VDR 对细胞内 VDR 功能的影响,我们首先建立了稳定转染 pSilencer 2.1-U6-VDR1、pSilencer 2.1-U6-VDR2 及阴性质粒的 HOS-8603 细胞,并经 Western 印迹分析证明稳定表达 pSilencer 2.1-U6-VDR1 和 pSilencer 2.1-U6-VDR2 的细胞内 VDR 蛋白表达明显减少。再用 1,25(OH)₂D₃ 分别处理细胞,结果发现:pSilencer 2.1-U6-VDR1、pSilencer 2.1-U6-VDR2 使 1,25(OH)₂D₃ 诱导的细胞增殖抑制作用明显减弱,说明 pSilencer 2.1-U6-VDR1、pSilencer 2.1-U6-VDR2 通过降低细胞内 VDR 蛋白表达抑制了 VDR 介导的 1,25(OH)₂D₃ 的生物学作用。

此外,有研究表明 1,25(OH)₂D₃ 可以在小鼠成骨细胞中快速诱导 PKC 的磷酸化^[4],我们的实验结果也表明 1,25(OH)₂D₃ 可以在骨肉瘤细胞 HOS-8603 中快速诱导 PKC 的磷酸化,而在稳定 pSilencer 2.1-U6-VDR1 与 pSilencer 2.1-U6-VDR2 的 HOS-8603 细胞中,1,25(OH)₂D₃ 快速诱导 PKC 磷酸化的作用均出现不同程度减弱,一方面说明 VDR 参与了 1,25(OH)₂D₃ 对 PKC 活性的快速调节,提示 1,25(OH)₂D₃ 生物学作用的基因组机制与其非基因组机制之间存在相互关联,另一方面也说明 pSilencer 2.1-U6-VDR1 与 pSilencer 2.1-U6-VDR2 成功抑制了 VDR 功能。

综上所述,pSilencer 2.1-U6-VDR1 与 pSilencer 2.1-U6-VDR2 转染细胞后使得细胞内 VDR 蛋白水平显著减少,进而阻断了 VitD₃-VDR 诱导细胞增殖抑制及 1,25(OH)₂D₃ 快速诱导 PKC 磷酸化的作用。因此可以认为我们所构建 pSilencer 2.1-U6-VDR1 与 pSilencer 2.1-U6-VDR2 基本达到了在细胞水平上使 VDR 基因沉默的目的。本研究运用 RNAi 技术在细胞水平阻断了 VDR 的表达,为进一步研究维生素 D₃ 与 VDR 的功能打下了良好的基础。

(致谢 实验中得到本教研室陈玉霞博士、王晓慧博士、李宗斌硕士的大力协助,特此致谢)

[参考文献]

[1] Wang QC, Nie QH, Feng ZH. RNA interference: antiviral

weapon and beyond[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9: 1657-1661.

- [2] 张翊,裴德宁,王军志. RNA 干扰研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2003,10:68-70.
- [3] Christakos S, Barletta F, Huening M, et al. Vitamin D target proteins: function and regulation[J]. J Cell Biochem, 2003,88:238-244.
- [4] Boyan BD, Jennings EG, Wang L, et al. Mechanisms regulating differential activation of membrane-mediated signaling by 1,25(OH)₂D₃ and 24R,25(OH)₂D₃[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2004,89-90(1-5):309-315.
- [5] Capiati DA, Vazquez G, Tellez Inon MT, et al. Role of protein kinase C in 1,25(OH)₂-vitamin D₃ modulation of intracellular calcium during development of skeletal muscle cells in culture[J]. J Cell Biochem, 2000,77:200-212.
- [6] Hmama Z, Nandan D, Knutson KL, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-induced myeloid cell differentiation is regulated by a vitamin D receptor-phosphatidylinositol 3-kinase signaling complex[J]. J Exp Med, 1999,190:1583-1594.
- [7] 宋亮年. 骨化三醇及其同类物 calcipotriol 对人骨肉瘤细胞生长分化的影响[J]. 中国药理学报,1993,14:337-339.
- [8] 宋亮年,郭嘉,程涛. 1,25(OH)₂D₃ 及其类似物调节人原始巨核白血病细胞系增殖分化的机制[J]. 第二军医大学学报,1995,16:507-512.
- [9] Song LN. Demonstration of the vitamin D receptor expression in a human megakaryoblastic leukemia cell line: regulation of vitamin D receptor mRNA expression and responsiveness by forskolin[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 1996,57(5-6):265-274.
- [10] 陈玉霞,刘宇健,宋亮年. 稳定转染维生素 D 受体反义 cDNA 的人骨肉瘤细胞系的建立[J]. 第二军医大学学报,2001,22:242-244.
- [11] 陈玉霞,刘宇健,宋亮年. 维生素 D 受体在 1,25(OH)₂D₃ 调节人骨肉瘤细胞系 HOS-8603 增殖中的作用[J]. 中国病理生理杂志,2001,17:979-982.
- [12] 叶亦舟,王以政,郭爱克. RNA 干扰技术及其应用[J]. 生命的化学,2002,22:503-506.
- [13] Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, et al. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate[J]. EMBO J, 2001, 20: 6877-6888.
- [14] Paddison PJ, Caudy AA, Hannon GF. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 1443-1448.
- [15] Sui G, Soohoo C, Affar el B, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 5515-5520.
- [16] van den Bemd GC, Pols HA, Birkenhager JC, et al. Conformational change and enhanced stabilization of the vitamin D receptor by the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ analog KH1060[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 10685-10690.

[收稿日期] 2006-04-21

[修回日期] 2006-09-18

[本文编辑] 尹茶