

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00965

• 短篇论著 •

针对人 β -catenin 基因 shRNA 真核表达载体的构建与鉴定

Construction and identification of shRNA eukaryotic vector targeting human β -catenin

姜永光^{1*}, 赵佳晖¹, 吴春婷², 罗勇¹, 贺大林³

1. 首都医科大学附属北京安贞医院泌尿外科, 北京 100029

2. 首都医科大学附属北京安贞医院呼吸科, 北京 100029

3. 西安交通大学医学院第一附属医院泌尿外科, 西安 710061

[摘要] **目的:** 构建针对人 β -catenin 基因 mRNA 的 shRNA 真核表达载体, 并转染 HEK-293 细胞, 观察其对 β -catenin 的抑制效应。 **方法:** 化学合成用于产生针对 β -catenin shRNA 的对应 DNA 片段, 将合成的寡核苷酸链退火形成双链, 克隆入 pSUPER 真核表达载体, 对重组质粒进行酶切分析和测序鉴定, 筛选阳性克隆。 通过脂质体介导, 把重组质粒转染 HEK-293 细胞, RT-PCR、蛋白质印迹法检测其对 β -catenin mRNA 和蛋白的干涉效果, MTT 比色法检测 β -catenin 基因表达抑制的细胞和对照组细胞的增殖。 **结果:** RT-PCR 和蛋白质印迹法检测结果显示转染组 β -catenin 基因的表达水平下调, MTT 检测显示 β -catenin 表达抑制的细胞光密度值下降, 细胞增殖受到了抑制 ($P < 0.01$)。 **结论:** 成功构建了针对人 β -catenin 基因的 shRNA 载体, 转染 HEK-293 细胞后可抑制 β -catenin 基因的表达。

[关键词] β -连环素; RNA 干扰; shRNA; HEK-293 细胞; 上皮细胞间质转化态

[中图分类号] R 73-36 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2009)08-0965-03

Wnt/ β -catenin 信号通路在调控胚胎发育、调节肿瘤的发生进展和转移方面起着重要作用, Wnt/ β -catenin 信号通路激活的靶基因包括编码多种细胞信号转导蛋白基因和转录因子基因, 这些基因的改变对肿瘤生物学行为具有巨大的影响^[1-2]。许多实验揭示了 Wnt/ β -catenin 信号通路在参与肿瘤早期的 EMT(上皮细胞-间质转化态)现象中可能起着不可忽视的作用, 但是该信号是否直接决定 EMT 现象的发生, EMT 的多种诱发因子是否直接受 Wnt/ β -catenin 信号通路的调控, 目前尚无确切的证据。RNA 干扰(RNAi), 是由双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA) 引发的转录后基因沉默现象, 目前已成功用于基因功能研究^[3]。本研究旨在通过分子克隆技术构建靶向 β -catenin 的 shRNA 表达载体, 抑制 β -catenin 基因的表达, 降低 Wnt 信号通路功能活性, 为进一步研究 Wnt 信号通路在前列腺癌细胞的侵袭、进展以及在肿瘤早期 EMT 现象中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 RNAi 的真核表达载体 pSUPER 购自 OligoEngine 公司, 人胚肾细胞 HEK-293 细胞系由西安交通大学第一附属医院泌尿外科研究所保存。限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、*Bgl* II、*T₄* DNA 连接酶购自 MBI 公司。*Taq* DNA 聚合酶为 Promega 公司产品。反转录试剂盒、TRIzolTM RNA 分离试剂、LipofectamineTM 2000 为 Invitrogen 公

司产品。RPMI 1640 购自 Gibco 公司。鼠抗人 β -catenin 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司, ECL 显色液购自 Sigma 公司。

1.2 针对 β -catenin 基因的寡核苷酸的设计和制备 根据 GenBank 中 β -catenin 基因的序列(NM_001904.2) 应用 OligoEngine 公司的 RNAi 设计软件, 在编码区内选择 2 段 19 nt 为不同的干扰区域, 进行 BLAST 比较, 以避免与其他基因同源, 并设计一对 Scramble 序列作为阴性对照。按照 RNA 干扰载体 pSUPER 的要求, 每段各设计一对各长 60 个碱基的序列, 由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。序列如下:

pSUPER-shRNA1: 5'-GAT CCC CGC AAC AGT CTT ACC TGG ACT TCA AGA GAG TCC AGG TAA GAC TGT TGC TTT TTA-3', 3'-GGG CGT TGT CAG AAT GGA CCT GAA GTT CTC TCA GGT CCA TTC TGA CAA CGA AAA ATT CGA-5'; pSUPER-shRNA2: 5'-GAT CCC CAC AGT CTT ACC TGG ACT CTT TCA AGA GAA GAG TCC AGG TAA GAC TGT TTT TTA-3', 3'-GGG TGT CAG AAT GGA CCT GAG AAA GTT CTC TTC TCA GGT CCA TTC TGA CAA AAA ATT CGA-5'; pSUPER-Scr: 5'-GAT CCC CAA CGA GTG TGC CTA CAT CCT TCA AGA GAG GAT GTA GGC ACA CTC GTT TTT TTA-3', 3'-GGG TTG CTC ACA CGG ATG TAG GAA GTT CTC TCC TAC ATC CGT GTG AGC AAA AAA ATT CGA-5'。两端分别包含 *Hind* III 和 *Bgl* III 的识别位点。

[收稿日期] 2009-01-10 **[接受日期]** 2009-05-04

[基金项目] 国家自然科学基金(30872934), 北京市自然科学基金(5072019)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30872934) and Beijing Municipal Science Foundation(5072019)。

[作者简介] 姜永光, 教授, 博士生导师。

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 010-64456491, E-mail: yongguangjiang2008@yahoo.com.cn

1.3 载体构建 将合成好的寡聚核苷酸链用超纯水稀释成 3 mg/ml 后,正义链、反义链各取 1 μl,溶于 48 μl 退火缓冲液中 (100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L HEPES pH 7.4), 94℃ 孵育 4 min, 80℃ 孵育 4 min, 75℃ 孵育 4 min, 70℃ 孵育 4 min, 然后冷却至室温,退火形成双链。用 *Bgl* II、*Hind* III 对质粒 pSUPER 进行双酶切反应,得到粘性末端线性 pSUPER 载体。将退火产物和线性载体加入连接反应体系, 22℃ 过夜,将重组载体转化感受态细胞 DH5α,挑取阳性克隆,质粒提取试剂盒提取质粒 DNA,经 *Hind* III 和 *Eco* R I 双酶切,用琼脂糖凝胶电泳分析酶切产物,将酶切鉴定后初步正确的转化克隆送北京三博远志生物技术有限责任公司测序。将测序正确的克隆分别命名为 pSUPER-shRNA1、pSUPER-shRNA2 和 pSUPER-Scr。

1.4 细胞培养和质粒转染 用含 10% 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司) 的 DMEM 培养液 (Gibco 公司) 在 37℃、5% CO₂ 的孵箱内培养 HEK-293,以 1.25 g/L 胰酶和 0.2 g/L EDTA 的混合液消化传代。转染前 1 d 按不同实验要求将所需密度的细胞传代于相应规格的培养皿或培养板,24 h 后待细胞达到所需汇合率时在无血清 DMEM 中培养。转染操作按 Lipofectamine™ 2000 试剂盒说明书进行,4 h 后,换完全 DMEM 培养。

1.5 RT-PCR 反应 分别转染 24、48、72 h 后用 TRIzol 试剂抽提细胞总 RNA,取少量 RNA 行 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳,检测抽提的 RNA 质量。测各组细胞的 RNA 浓度后按照浓度取 1 μg RNA,用 AMV 试剂盒 (MBI 公司) 进行反转录反应。以 RT 产物为模板,分别用 β-catenin 上游引物 F: 5'-ACT AAA CAG GAA GGG ATG GAA GG-3',下游引物 R: 5'-AGA TGA CGA AGA GCA CAG ATG G-3',扩增片段 236 bp; β-actin 上游引物 F: 5'-AGC ATG TTT GAG ACC TTC AAC A-3',下游引物 R: 5'-CAT CTC TTG CTC GAA GTC CA-3',扩增片段 316 bp。扩增条件: 95℃ 5 min; 94℃ 变性 30 s, 57℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 50 s, 26 个循环,最后 72℃ 总延伸 10 min, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.6 蛋白印迹分析 分别于转染 24、48、72 h 后提取总蛋白,按每孔 30 μg 上样, 12% SDS-PAGE 120 V 电压下分离,再用 30 V 电压将凝胶上的蛋白湿转至硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上。5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后,加入一抗 (鼠抗人 β-catenin 单抗, 1: 500; 鼠抗人 GAPDH 单抗, 1: 10 000), 4℃ 孵育过夜, TBST 充分漂洗后加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (羊抗小鼠 IgG, 1: 5 000) 孵育 1 h, 最后用 ECL 法显色。

1.7 MTT 比色法检测 将处于对数生长期的 HEK-293 细胞用 0.25% 胰酶消化,进行细胞计数,调整密度为 5 × 10⁴ / ml。取 200 μl 细胞悬液铺于 96 孔板中,共设 4 组: (1) 转染 pSUPER-shRNA1 组; (2) 转染 pSUPER-shRNA2 组; (3) 转染 pSUPER-Scr 组; (4) 未转染组。24 h 后转染细胞,再分别于转染 24、48、72、96 h 加入 5 mg/ml MTT 20 μl, 37℃ 继续孵育 4 h, 终止培养,小心吸弃培养上清,每孔加入 100 μl 二甲基亚砷 (DMSO),振荡 10 min,在酶标仪上测定波长为 570 nm 的光密度值,实验重复 3 次。

2 结果

2.1 β-catenin shRNA 干扰载体的双酶切鉴定 将筛选到的 pSUPER-shRNA1、pSUPER-shRNA2 和 pSUPER-Scr 重组载体小量快速提取后,用 *Eco* R I / *Hind* III 双酶切鉴定,切成 2 889 bp 的大片段和 287 bp 的小片段 (图 1)。测序结果完全正确,证实载体构建成功。

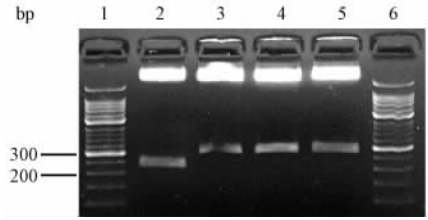


图 1 重组质粒 pSUPER-shRNA1, pSUPER-shRNA2, pSUPER-Scr 的 *Eco* R I / *Hind* III 双酶切鉴定

1: 50 bp 标记物; 2: pSUPER; 3: pSUPER-shRNA1; 4: pSUPER-shRNA2; 5: pSUPER-Scr; 6: 650 bp 标记物

2.2 shRNA 抑制 β-catenin mRNA 的表达 用 pSUPER-shRNA1、pSUPER-shRNA2 和 pSUPER-Scr 重组载体分别转染人 HEK-293 细胞,经 RT-PCR 产物电泳显示,转染 pSUPER-shRNA1、pSUPER-shRNA2 细胞中 β-catenin 基因的 mRNA 水平降低,转染 pSUPER-Scr 不受影响 (图 2)。

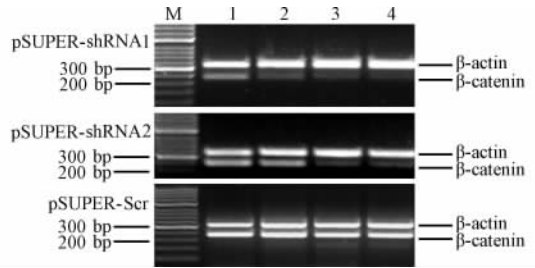


图 2 β-catenin shRNA 对 HEK-293 细胞 β-catenin mRNA 表达的影响

M: 标记物; 1: 转染 0 h (对照); 2: 转染 24 h; 3: 转染 48 h; 4: 转染 72 h

2.3 shRNA 抑制 β-catenin 蛋白的表达 将 pSUPER-shRNA1、pSUPER-shRNA2 和 pSUPER-Scr 重组载体分别转染 HEK-293 细胞,经蛋白印迹分析显示,转染 pSUPER-shRNA1、pSUPER-shRNA2 组细胞中 β-catenin 蛋白水平降低 (图 3A、3B),转染 pSUPER-Scr 组 β-catenin 蛋白水平不受影响 (图 3C)。

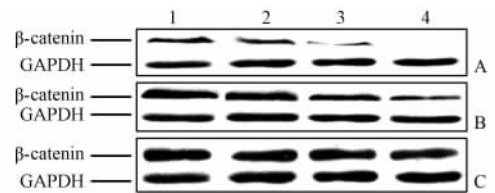


图 3 pSUPER-shRNA1 (A), pSUPER-shRNA2 (B) 和 pSUPER-Scr (C) 对 HEK-293 细胞 β-catenin 蛋白表达的影响

1: 转染 0 h (对照); 2: 转染 24 h; 3: 转染 48 h; 4: 转染 72 h

2.4 细胞增殖 pSUPER-shRNA1、pSUPER-shRNA2 组细胞的光密度值与 pSUPER-Scr 和正常细胞组相比明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 表明细胞内 β -catenin 基因表达受干扰后, 细胞增殖受到抑制(图 4)。

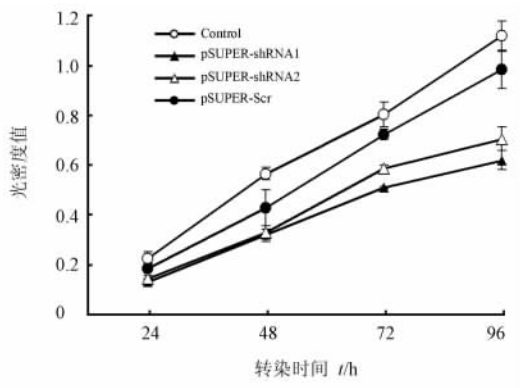


图 4 转染 β -catenin shRNA 对 HEK-293 细胞生长曲线的影响

$n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

Wnt/ β -catenin 信号通路是近年来研究的热点。典型的 Wnt/ β -catenin 信号通路由细胞外的 Wnt 蛋白、膜受体 Frizzled、胞质内的 β -catenin 以及下游的靶基因组成。其中 β -catenin 是 Wnt/ β -catenin 信号通路的关键蛋白。一方面, 胞质中 β -catenin 的水平直接决定着 Wnt 信号通路的功能活性, 胞质中的 β -catenin 增多时, β -catenin 进入核内, 与转录因子 TCF/LEF 形成转录复合物, 引起 c-Myc、Cyclin D1、survivin 等靶基因的转录。c-Myc、Cyclin D1 等均为原癌基因, 被激活后可以转化为癌基因, 刺激细胞增殖, 引起肿瘤发生, 促进肿瘤进展、侵袭^[1-2]。另一方面 β -catenin 和黏附分子 E-cadherin 胞内区相连, 形成 E-cadherin/ β -catenin 复合体, 该复合体对维持上皮细胞间黏附, 调控 Wnt 信号通路功能活性具有重要的作用。E-cadherin 表达缺失的肿瘤细胞常伴有 β -catenin 胞膜表达缺失, 过表达 E-cadherin 可以使 E-cadherin 和 β -catenin 结合并使其重新分布在胞膜上, 从而降低 Wnt 信号通路功能活性^[4-5]。

EMT 学说近年来已引起肿瘤研究领域的广泛关注, 上皮细胞在特定的生理和病理情况下, 向间充质细胞转化, 同时伴随有细胞形态与相关基因的改变, 这个过程称之为 EMT, 肿瘤细胞通过 EMT 获得强大的迁移与运动能力^[6]。近年来多项研究证据表明, Wnt/ β -catenin 信号通路与肿瘤 EMT 现象之间存在着密切的联系, 在 TGF- β 1 诱导 MDCK 细胞发生 EMT 转化过程中, 细胞胞质中的 p-GSK3 β 和 β -catenin 增加, LEF-1 的转录活性增强^[7], 而在前列腺癌细胞中过表达 HIF-1 α , 可以诱导 LNCaP 细胞发生 EMT 改变, 而不能诱导 PC-3 细胞发生 EMT 改变。EMT 阳性细胞 LNCaP/HIF-1 α 中的 Wnt/ β -catenin 信号通路功能活性较 EMT

阴性细胞 PC-3、LNCaP 和 PC-3/HIF-1 α 显著增高, 这提示 EMT 的多种诱导因子在诱导 EMT 过程中, 存在着 Wnt/ β -catenin 信号通路的参与^[8-9]。但是这些研究并没有论证 Wnt/ β -catenin 信号通路的“开闭”能否直接决定 EMT 现象的发生以及 Wnt/ β -catenin 信号通路如何调控 EMT 的发生。

RNAi 是由双链 RNA 引发的转录后基因沉默现象, 具有快速、有效、特异性强等优点, 目前已成功用于基因功能的研究。本实验采用以质粒介导构建 RNAi 重组体的方法, 将 siRNA 对应的靶基因双链 DNA 序列克隆入质粒载体内, 位于 RNA 聚合酶 III 的启动子 (H1 启动子) 之后, 这样当重组体进入细胞后, 能够在哺乳动物细胞中指导合成发夹状双链 RNA 分子, 识别特异的靶基因, 诱导基因特异性沉默。

本实验成功构建了针对人 β -catenin 的真核表达载体, 并在转入人肾胚细胞 HEK-293 中发现, 在 mRNA 水平和蛋白水平可明显抑制 β -catenin 的表达, 并且抑制细胞的生长。这说明实验设计合成的针对人 β -catenin 的 shRNA 表达载体能够有效抑制该基因的表达, 从而为进一步人为干预 Wnt/ β -catenin 信号通路, 寻找 Wnt/ β -catenin 信号通路在介导肿瘤 EMT 现象的直接证据方面奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Hall C L, Kang S, MacDougald O A, Keller E T. Role of Wnts in prostate cancer bone metastases[J]. J Cell Biochem, 2006, 97:661-672.
- [2] Sun P, Xiong H, Kim T H, Ren B, Zhang Z. Positive inter-regulation between beta-catenin/T cell factor-4 signaling and endothelin-1 signaling potentiates proliferation and survival of prostate cancer cells[J]. Mol Pharmacol, 2006, 69:520-531.
- [3] Paddison P J, Caudy A A, Sachidanandam R, Hannon G J. Short hairpin activated gene silencing in mammalian cells[J]. Methods Mol Biol, 2004, 265:85-100.
- [4] Zhang X, Gaspard J P, Chung D C. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia[J]. Cancer Res, 2001, 61:6050-6054.
- [5] Verras M, Sun Z. Roles and regulation of Wnt signaling and β -catenin in prostate cancer[J]. Cancer Lett, 2006, 23:22-32.
- [6] Liu Y H. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention[J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15:1-12.
- [7] Medici D, Hay E D, Goodenough D A. Cooperation between snail and LEF-1 transcription factors is essential for TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition [J]. Mol Biol Cell, 2006, 17:1871-1879.
- [8] Jiang Y G, Luo Y, He D L, Li X, Zhang L L, Peng T, et al. Role of Wnt/ β -catenin signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition of human prostate cancer induced by hypoxia-inducible factor-1 α [J]. Int J Urol, 2007, 14:1034-1039.
- [9] 罗勇, 贺大林, 宁亮. 多种转移潜能不同的人前列腺癌细胞“上皮细胞间质转化态”特性鉴定及其意义[J]. 中华男科学杂志, 2006, 12:696-700.