

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00790

· 短篇论著 ·

稳定沉默 *GLI1* 基因的人胰腺癌细胞株的建立

郭杰芳, 高 军, 李兆申*, 龚燕芳, 金 晶, 吴红玉, 满晓华

第二军医大学长海医院消化内科, 上海 200433

[摘要] **目的** 建立稳定转染 *GLI1*siRNA 表达质粒的人胰腺癌细胞株, 并鉴定其干扰效率。**方法** 采用荧光定量 PCR 法(qRT-PCR)检测 5 株人胰腺癌细胞中 *GLI1* 基因的表达, 筛选出 *GLI1* 基因表达量最高的细胞作为目标转染细胞。脂质体转染法将构建好的 3 个干扰质粒 pGCsi-U6-*GLI1*siRNA-1、pGCsi-U6-*GLI1*siRNA-2、pGCsi-U6-*GLI1*siRNA-3 分别转染入目标细胞, G418 抗性筛选阳性克隆, 荧光显微镜下观察转染效率。采用 qRT-PCR 法和蛋白质印迹法检测各组稳定转染细胞中 *GLI1* mRNA 及蛋白的表达水平, 鉴定干扰效率。**结果** 筛选出 *GLI1* 基因表达量最高的 Panc-1 细胞株作为目标转染细胞; 3 个干扰质粒均成功转染 Panc-1 细胞, G418 筛选后获得稳定转染细胞 Panc-1/*GLI1*siRNA-1、Panc-1/*GLI1*siRNA-2、Panc-1/*GLI1*siRNA-3, 荧光显微镜下可见 3 个质粒的转染效率均在 80% 以上; qRT-PCR 及蛋白质印迹检测证实 Panc-1/*GLI1*siRNA-1、Panc-1/*GLI1*siRNA-2、Panc-1/*GLI1*siRNA-3 细胞中 *GLI1* mRNA 和蛋白的表达水平均显著低于阴性对照质粒 (Panc-1/siControl) 转染细胞及空白对照细胞 ($P < 0.05$), 其中 Panc-1/*GLI1*siRNA-1 细胞表达量最低。**结论** 成功构建了稳定沉默 *GLI1* 基因表达的胰腺癌细胞株 Panc-1/*GLI1*siRNA-1, 为后续研究奠定了基础。

[关键词] 胰腺肿瘤; *GLI1*; 小分子干扰 RNA**[中图分类号]** R 735.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)07-0790-04

Establishment of human pancreatic cancer cell line with stable knockdown of *GLI1* gene

GUO Jie-fang, GAO Jun, LI Zhao-shen*, GONG Yan-fang, JIN Jing, WU Hong-yu, MAN Xiao-hua

Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To establish a human pancreatic cancer cell line stably transfected with siRNA expression vector targeting *GLI1* gene and examine the interference efficiency. **Methods** The expression of *GLI1* gene in five human pancreatic cancer cell lines was detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR); the one with the highest expression level of *GLI1* was selected as the target cell line and was transfected with three recombinant plasmids pGCsi-U6-*GLI1*siRNA-1, -2, and -3. The positive clones were screened by G418, and the transfection rate was observed by fluorescence microscope. The expression of *GLI1* mRNA and protein was analyzed by qRT-PCR and Western blotting analysis, respectively. **Results** Panc-1 cell line was found to have the highest *GLI1* expression and was selected as the target cell line for transfection. Plasmids pGCsi-U6-*GLI1*siRNA-1, -2, and -3 were successfully transfected into Panc-1 cells separately. After 4 weeks of G418 screening, three stably transfected cell lines named Panc-1/*GLI1*siRNA-1, -2, and -3 were obtained, with the transfection rates all higher than 80%. qRT-PCR and Western blotting analysis showed that the expression levels of *GLI1* in Panc-1/*GLI1*siRNA-1, -2, and -3 cells were all significantly lower than those in Panc-1/siControl cells and the blank control cells ($P < 0.05$), with the lowest expression found in Panc-1/*GLI1*siRNA-1 cells. **Conclusion** We have successfully constructed a cell line Panc-1/*GLI1*siRNA-1 with *GLI1* gene stably silenced, which paving a way for future research.

[Key words] pancreatic neoplasms; *GLI1*; small interfering RNA

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(7):790-793]

胰腺癌组织中存在 Hedgehog/*GLI1* 信号通路子, 直接调控着靶基因的转录^[1-2]。目前有关的异常激活, *GLI1* 是位于该通路末端的转录激活因子 Hedgehog/*GLI1* 通路在胰腺癌发生发展过程中的

[收稿日期] 2013-01-18 **[接受日期]** 2013-05-08**[基金项目]** 国家自然科学基金(81101575), 上海市科委科技发展基金(114119a6700). Supported by National Natural Science Foundation of China (81101575) and Fund from Shanghai Committee of Science and Technology (114119a6700).**[作者简介]** 郭杰芳, 博士, 主治医师. E-mail: jefennyst@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31161372, E-mail: zhshli@81890.net

具体机制尚未完全阐明,为此,本研究先筛选出一株 *GLI1* 表达量最高的胰腺癌细胞作为干扰质粒转染的目标细胞,再用该株细胞建立稳定抑制 *GLI1* 基因表达的胰腺癌细胞株,为进一步探讨 *GLI1* 基因的功能及其在胰腺癌发病机制中的作用提供了一个可操作的细胞模型,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 Panc-1、CFPAC、BxPC3、PaTu8988、SW1990 胰腺癌细胞系及感受态细胞 DH5 α 为本实验室保存。细胞培养试剂购自 Gibco BRL 公司。靶向 *GLI1* 基因的 RNAi 质粒 pGCsi-U6-*GLI1*siRNA-1、pGCsi-U6-*GLI1*siRNA-2、pGCsi-U6-*GLI1*siRNA-3 由本实验室构建^[3], siRNA-1 的序列为:CTC CAC AGG CAT ACA GGA T, siRNA-2 的序列为:CCT CTG TCT ACT CAC CAC A, siRNA-3 的序列为:GGC TCA GCT TGT GTG TAA T。阴性对照质粒 pGCsi-U6-siControl 购自上海吉凯基因技术公司。质粒 pTA2、T₄ DNA 连接酶及 SYBR Green PCR Master Mix 购于 ToYoBo 公司, LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司, TRIzol 总 RNA 抽提试剂盒、反转录试剂盒购自深圳晶美公司。兔抗人 *GLI1* 一抗购自 Santa Cruz 公司, 兔抗人 β -actin 一抗购自 Sigma 公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自北京中山生物公司。ECL 显色液购自上海普飞公司。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司协助合成。荧光实时定量 PCR 仪(LightCycler 2.0 system)为 Roche Diagnostics 公司产品。蛋白电泳及转膜系统为 BD 公司产品。

1.2 细胞培养 胰腺癌细胞株培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,在 37℃ 5% CO₂ 孵箱里培养。当融合度达 80%~90% 时进行消化传代。收集细胞,荧光定量 PCR(qRT-PCR)筛选出表达量最高的细胞为转染目标细胞,具体方法见荧光定量 PCR 检测部分。

1.3 质粒 pGCsi-U6-*GLI1*siRNA 的稳定转染 实验分 5 组:空白对照组(未转染任何质粒)、阴性对照组(转染 pGCsi-U6-siControl)、pGCsi-U6-*GLI1*siRNA-1 组、pGCsi-U6-*GLI1*siRNA-2 组、pGCsi-U6-*GLI1*siRNA-3 组。转染前 1 d 收集对数生长期目标细胞,调节细胞悬液密度为 10⁵/mL,铺 6

孔板,次日待细胞融合至 70%~80% 时采用脂质体转染法进行转染。48 h 后加入含最佳筛选浓度(500 μ g/mL) G418 的选择性培养液进行筛选。保持 G418 筛选浓度,4 周后于倒置荧光显微镜下观察绿色荧光表达情况,计算转染效率,转染效率(%) = 荧光视野下发绿色荧光的细胞数/明视野下总细胞数 \times 100%。挑取阳性克隆在选择性培养液中扩大培养。

1.4 荧光定量 PCR TRIzol 法提取细胞总 RNA,测定其浓度,反转录成 cDNA,以 β -actin 为内参,SYBR Green 法检测 *GLI1* mRNA 的表达。*GLI1* 上游引物 5'-TGT GTA TGA AAC TGA CTG CCG -3',下游引物 5'-CCC AGT GGC ACA CGA ACT C -3',产物 125 bp; β -actin 上游引物 5'-GCC ATC CTG CGT CTG -3',下游引物 5'-TGG GCA CCG GAA CCG CT -3',产物 254 bp。先取待测样品 cDNA 分别扩增出 *GLI1* 及 β -actin,胶回收扩增片段,与质粒 pTA2 连接,转化 DH5 α 感受态细胞制备标准品质粒,Sal I、Not I 双酶切鉴定及测序鉴定。将鉴定正确的标准品质粒梯度稀释作为标准品模板,与待测样品 cDNA 同时在 LightCycler 上扩增。按试剂盒说明配制反应体系:标准品模板或待测样品 cDNA 2 μ L,上、下游引物各 0.2 μ L,2 \times SYBR Green PCR Master Mix 10 μ L,无菌水 7.6 μ L。扩增条件:95℃ 30 s 预变性;95℃ 5 s,55℃ 5 s,72℃ 20 s,扩增 45 个循环;95℃ 0 s,65℃ 15 s,95℃ 20 s 溶解曲线分析。每个样品设 3 个复孔。根据公式“目的基因相对表达量 = 2^{- $\Delta\Delta$ CT}”计算各组细胞 *GLI1* mRNA 的表达量。

1.5 蛋白质印迹分析 收集各组细胞,裂解细胞提取蛋白质,BCA 试剂盒检测总蛋白浓度。SDS-PAGE 后转至 PVDF 膜,封闭后加入兔抗人 *GLI1* 一抗(1:1 000),4℃ 过夜。TBST 液洗膜后加入羊抗兔二抗(1:1 000),室温 1 h, TBST 液洗膜。加入 ECL 显色液显影,暗室曝光,应用 ImageJ 软件扫描条带光密度,以 β -actin 为内参,以 *GLI1* 与 β -actin 条带的光密度比值代表 *GLI1* 蛋白的相对表达量。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 11.0 统计软件分析,所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 标准品质粒的构建及鉴定 *GLI1* 及 β *actin* 的扩增片段经胶回收后分别与质粒 pTA2 连接,连接产物分别转化感受态细胞 DH5 α ,各挑 1 个阳性克隆小量制备质粒, *Sal* I、*Not* I 双酶切,结果两个克隆均出现预期大小的片段(分别为 208 bp 及 337 bp),证实克隆成功(图 1)。送测序证实插入片段分别与 *GLI1*、 β *actin* 的基因序列完全一致,证实标准品质粒构建成功。

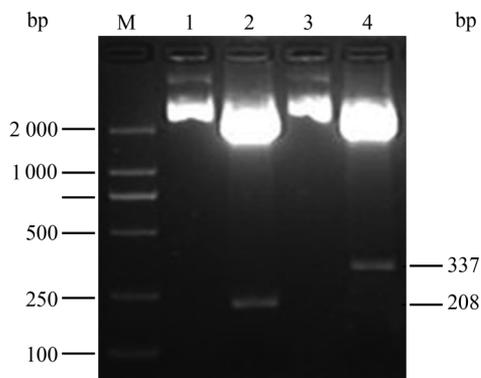


图 1 标准品质粒酶切鉴定

M: Marker; 1: pTA2/*GLI1* 质粒; 2: pTA2/*GLI1* 双酶切; 3: pTA2/ β *actin* 质粒; 4: pTA2/ β *actin* 双酶切

2.2 筛选出 *GLI1* 表达量最高的胰腺癌细胞株 Panc-1 荧光定量 PCR 检测 5 株胰腺癌细胞 *GLI1* mRNA 的表达。设 PaTu8988 细胞 *GLI1* mRNA 相对表达量为 1,则 Panc-1、CFPAC、BxPC3、SW1990 细胞 *GLI1* mRNA 的相对表达量分别为 2.34 ± 0.12 、 2.09 ± 0.09 、 2.13 ± 0.14 、 1.04 ± 0.08 。以 Panc-1 细胞 *GLI1* mRNA 表达量最高,选其作为目标转染细胞。

2.3 建立稳定转染 *GLI1*siRNA 质粒的 Panc-1 细胞株 Panc-1 细胞转染后经 G418 筛选,4 周后在荧光显微镜下可见稳定转染的细胞均匀表达绿色荧光(图 2),各组的转染效率均在 80% 以上。各组分别挑单克隆细胞扩大培养,分别命名为 Panc-1/*GLI1*siRNA-1、Panc-1/*GLI1*siRNA-2、Panc-1/*GLI1*siRNA-3 及 Panc-1/siControl。

2.4 稳定转染细胞株 *GLI1* mRNA 和蛋白的表达 荧光定量 PCR 检测结果显示, Panc-1/*GLI1*siRNA-1、Panc-1/*GLI1*siRNA-2、Panc-1/*GLI1*siRNA-3 细胞中 *GLI1* mRNA 的相对表达量

显著低于 Panc-1/siControl 细胞及空白对照组细胞(均 $P < 0.05$),以 Panc-1/*GLI1*siRNA-1 细胞的表达量最低(图 3),证明 3 种质粒均对 Panc-1 细胞 *GLI1* mRNA 的表达有一定抑制作用,以 pGCsi-U6-*GLI1*siRNA-1 的抑制作用最强。蛋白质印迹结果与此相符(图 3)。

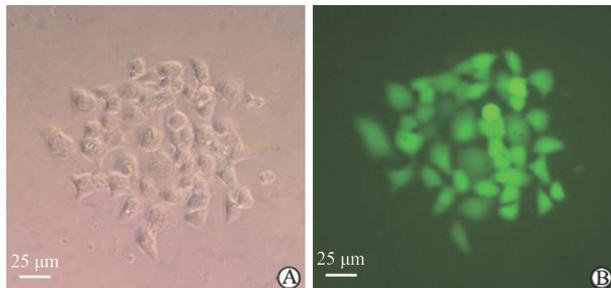


图 2 稳定转染 pGCsi-U6-*GLI1*siRNA 质粒的 Panc-1 细胞 A: 普通光镜下; B: 荧光显微镜下. Original magnification: $\times 200$

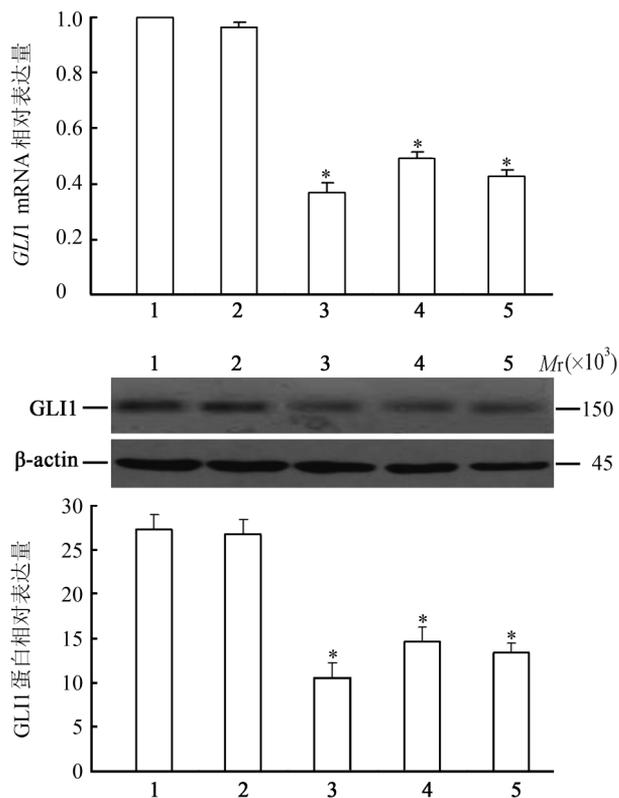


图 3 各组细胞 *GLI1* mRNA 和蛋白的表达

1: 空白对照组; 2: Panc-1/siControl 组; 3: Panc-1/*GLI1*siRNA-1 组; 4: Panc-1/*GLI1*siRNA-2 组; 5: Panc-1/*GLI1*siRNA-3 组. * $P < 0.05$ 与 Panc-1/siControl 组和空白对照组比较. $n=3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

Hedgehog 信号通路的异常活化与胰腺癌发生

发展密切相关^[1-2]。有研究对不同时期胰腺上皮内瘤变及胰腺癌进行分析,结果发现随着病变从上皮内瘤变向胰腺癌逐步发展,病变组织中 Hedgehog 信号通路成员的表达水平也急剧上升^[4]。本实验室前期研究也发现,胰腺癌组织中 Hedgehog 通路的重要成员 *PTCH*、*SMO* 及 *GLI1* 的表达水平及表达阳性率均显著高于相应癌旁正常组织^[5-6],且 *GLI1* mRNA 的表达量与胰腺癌的分化程度、淋巴结转移显著相关^[7]。这些结果均提示胰腺癌细胞恶性生物学特性的维持依赖于 Hedgehog 通路的激活。*GLI1* 是 Hedgehog 信号通路下游的核转录因子,具有激活下游目的基因转录的功能。作为 Hedgehog 通路活化程度的标志性基因,*GLI1* 在该通路中扮演着重要角色。因此,对 *GLI1* 基因的功能研究尤为重要。

RNAi 技术是高通量基因功能研究的得力工具,可以特异性沉默目的基因的表达,从而使目的基因功能缺失^[8-9]。如何高效、稳定地将 siRNA 导入细胞是 RNAi 技术的难点之一^[10]。siRNA 的产生有化学合成、体外转录和通过表达载体直接在细胞内表达 siRNA 等几种方式,其中 siRNA 表达载体可相对长期、高效地表达 siRNA,具有干扰效果稳定、重复性好等优点^[11-12]。

鉴于此,本研究采用前期构建的质粒 pGCsi-U6-*GLI1*siRNA 构建稳定沉默 *GLI1* 表达的胰腺癌细胞株,以期为进一步研究 *GLI1* 基因在胰腺癌发病中的作用奠定基础。pGCsi-U6-*GLI1*siRNA 质粒是一种真核表达载体,其 U6 启动子位于编码序列上游,能精确启动目的 shRNA 转录,且表达量丰富;其 CMV 启动子可启动 GFP(绿色荧光蛋白)转录,便于观察转染效率、优化转染条件;含有新霉素抗性基因(*Neo*),可以用 G418 筛选得到相对长期、稳定的基因沉默细胞株。本研究首先采用荧光定量 PCR 法筛选出 *GLI1* 表达量最高的胰腺癌细胞株 Panc-1 作为转染目标细胞,再采用脂质体转染法将 pGCsi-U6-*GLI1*siRNA-1、pGCsi-U6-*GLI1*siRNA-2、pGCsi-U6-*GLI1*siRNA-3 质粒转染入 Panc-1 细胞,用 G418 筛选阳性克隆,4 周后见稳定转染质粒的细胞均表达绿色荧光,转染效率高达 80% 以上,分别命名为 Panc-1/*GLI1*siRNA-1、Panc-1/*GLI1*siRNA-2、Panc-1/*GLI1*siRNA-3。进一步采用荧光定量 PCR 及蛋白质印迹检测稳定转染后 Panc-1 细胞中 *GLI1*

表达的变化,结果 3 株稳定转染细胞株中 *GLI1* mRNA 与蛋白的表达量均显著降低,证明稳定沉默 *GLI1* 基因表达的 Panc-1 细胞株建立成功,其中以 Panc-1/*GLI1*siRNA-1 细胞株沉默效率最佳,可用于后续研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Di Marco M, Macchini M, Vecchiarelli S, Sina S, Biasco G. Hedgehog signaling: from the cuirass to the heart of pancreatic cancer[J]. *Pancreatology*, 2012, 12: 388-393.
- [2] Rosow D E, Liss A S, Strobel O, Fritz S, Bausch D, Val-sangkar N P, et al. Sonic Hedgehog in pancreatic cancer: from bench to bedside, then back to the bench [J]. *Surgery*, 2012, 152(Suppl 1): S19-S32.
- [3] 郭杰芳, 高 军, 龚燕芳, 金 晶, 吴红玉, 满晓华, 等. 靶向人转录因子 *GLI1* 基因的 RNAi 真核表达载体的构建与鉴定[J]. *中华胰腺病杂志*, 2013, 13: 118-121.
- [4] Bardeesy N, DePinho R A. Pancreatic cancer biology and genetics[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2: 897-909.
- [5] Shao J, Zhang L, Gao J, Li Z, Chen Z. Aberrant expression of *PTCH* (patched gene) and *Smo* (smoothed gene) in human pancreatic cancerous tissues and its association with hyperglycemia[J]. *Pancreas*, 2006, 33: 38-44.
- [6] 郭杰芳, 李兆申, 金震东, 高 军, 龚燕芳, 金 晶, 等. *GLI1* 基因在胰腺癌组织中的表达及其临床意义[J]. *中华医学杂志*, 2007, 12: 826-828.
- [7] 郭杰芳, 高 军, 李兆申, 龚燕芳, 金 晶, 满晓华, 等. 胰腺癌中 *GLI1* 及 *PTCH1* mRNA 的表达及其与临床指标相关性分析[J]. *中华胰腺病杂志*, 2010, 10: 196-198.
- [8] Boudreau R L, Davidson B L. Generation of hairpin-based RNAi vectors for biological and therapeutic application[J]. *Methods Enzymol*, 2012, 507: 275-296.
- [9] Simpson K J, Davis G M, Boag P R. Comparative high-throughput RNAi screening methodologies in *C. elegans* and mammalian cells[J]. *N Biotechnol*, 2012, 29: 459-470.
- [10] Sioud M. Promises and challenges in developing RNAi as a research tool and therapy[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 703: 173-187.
- [11] Ford L P, Toloue M M. Delivery of RNAi mediators [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2010, 1: 341-350.
- [12] Rivera S, Yuan F. Critical issues in delivery of RNAi therapeutics *in vivo* [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2012, 13: 1279-1291.