

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00598

· 论 著 ·

Id2 shRNA 慢病毒载体的构建及其转染后对胶质瘤细胞增殖和凋亡的影响

赵振宇^{1,2}, 贺 华¹, 卢亦成^{1*}, 陈菊祥¹, 侯立军¹, 胡国汉¹, 骆 纯¹

1. 第二军医大学长征医院神经外科, 上海 200003

2. 解放军 163 医院神经外科, 长沙 410003

[摘要] **目的** 构建能高效敲减分化抑制因子 2 (Id2) 基因的短发夹状小干扰 RNA (shRNA) 慢病毒载体, 并观察敲减 Id2 对胶质瘤细胞株 U251 增殖和凋亡的影响。**方法** 设计并合成特异性针对 Id2 基因的 shRNA 序列, 将其构建到慢病毒载体 pGCSIL-GFP 中。以含有 Id2 基因的质粒为模板, 扩增 Id2 基因 cDNA 序列的特异性片段, 插入真核表达载体 pEGFP-N1-3FLAG。构建含 Id2 基因质粒和不同靶点的 RNAi 慢病毒载体, 共转染入工具细胞 293T, 筛选出适合浓度慢病毒感染 U251 细胞株。MTT 法检测敲减 Id2 后胶质瘤细胞增殖的改变, RT-PCR 检测 Id2 敲减后 U251 细胞 caspase 3 的表达。**结果** 构建后载体的 PCR 鉴定及 DNA 测序结果与预期一致。与对照组相比, 转染 Id2 shRNA 的 U251 细胞增殖降低, 凋亡率升高, caspase 3 表达升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 成功构建的针对 Id2 基因的 RNA 干扰慢病毒载体体外转染可抑制胶质瘤细胞增殖并促进其凋亡。

[关键词] 分化抑制蛋白 2; RNA 干扰; 神经胶质瘤; 细胞增殖; 细胞凋亡**[中图分类号]** R 730.264 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)06-0598-05

Construction of lentiviral vector for RNA interference of Id2 gene and its effect on proliferation and apoptosis of gliomas cell line *in vitro*

ZHAO Zhen-yu^{1,2}, HE Hua¹, LU Yi-cheng^{1*}, CHEN Ju-xiang¹, HOU Li-jun¹, HU Guo-han¹, LUO Chun¹

1. Department of Neurosurgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2. Department of Neurosurgery, No. 163 Hospital of PLA, Changsha 410003, Hunan, China

[Abstract] **Objective** To construct a lentiviral vector carrying short hairpin RNA (shRNA) of human Id2 gene and to investigate its effect on the proliferation and apoptosis in glioma cell line U251. **Methods** Four shRNA sequences targeting human Id2 gene were designed and synthesized. The shRNAs were inserted into the pGCSIL-GFP lentiviral vector. Id2 sequence was amplified from the plasmid which contained Id2 gene as verified by PCR, and was inserted into the pEGFP-N1-3FLAG vector. Lentiviral vector for RNAi of Id2 was constructed and was used to infect 293T cells. The infection efficiency was evaluated and then the lentiviral vector was used to infect U251 cell line. Western blotting analysis was employed to assess the gene silencing efficiency. Cell proliferation was tested by MTT. Cell apoptosis was observed by RT-PCR analysis of caspase 3 expression in U251 cells after infection. **Results** The results of PCR analysis and DNA sequencing agreed to each other. Compared with the control group, the transfected U251 cells had significantly decreased cell proliferation, and increased apoptosis rate and caspase 3 expression ($P < 0.05$). **Conclusion** We have successfully constructed lentivirus RNAi vector of Id2, which can inhibit the proliferation and promote the apoptosis of glioma cells *in vitro*.

[Key words] inhibitor of differentiation protein 2; RNA interference; glioma; cell proliferation; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(6): 598-602]

分化抑制因子 2 (inhibitor of differentiation 2, Id2) 属于 Id 家族, 通过负性调控螺旋-环-螺旋 (helix-loop-helix, HLH) 蛋白抑制细胞分化, 同时也是

参与肿瘤形成的重要基因之一^[1]。近年来, RNAi 技术已成为研究基因功能的重要工具。因此, 本研究通过设计、构建和鉴定表达 Id2 shRNA 的慢病毒载

[收稿日期] 2010-12-20**[接受日期]** 2011-05-05**[基金项目]** 国家自然科学基金 (30930094)。Supported by the National Natural Science Foundation of China (30930094)。**[作者简介]** 赵振宇, 博士, 主治医师。E-mail: joyraino@126.com

* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 021-81885671, E-mail: luyicheng305@126.com

体,并观察其转染胶质瘤细胞后对细胞增殖和凋亡的影响,为后期研究 Id2 基因在胶质瘤中的生物学作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 U251 细胞、293T 细胞(中国科学院上海细胞库);pEGFP-N1-3FLAG 载体、慢病毒载体系统(上海吉凯基因技术有限公司);大肠杆菌菌株 DH5 α 、Lipofectamine 2000、TRIzol 试剂盒(Invitrogen 公司);反转录 RNA 试剂盒、dNTP (Promega 公司);*Xho* I、*Kpn* I、*Age* I、*Eco*RI 内切酶(New England Biolabs 公司);DMEM、胎牛血清、胰蛋白酶(上海捷倍思基因技术有限公司);大量

质粒 DNA 提取试剂盒(Qiagen 公司)。鼠抗 Id2 单克隆抗体(美国 CalBioReagents 公司);兔抗鼠 IgG-HRP 抗体(福建迈新生物技术有限公司)。

1.2 Id2 shRNA 慢病毒载体的构建及鉴定

1.2.1 shRNA 慢病毒载体的设计 通过 GenBank 等公用数据库检索 Id2 (mRNA, NM_002166) 基因的相关信息,根据 RNA 干扰序列设计原则,用 Ambion 公司的设计软件,设计、合成 4 组针对 Id2 基因 shRNA 的寡核苷酸序列,并同时按照公认标准设计合成无意义序列作为阴性对照;5'-TTC TCC GAA CGT GTC ACG T-3'。每组序列均按发卡结构模式设计合成,并在其两端设计酶切位点黏端,可直接联入酶切后的载体上(表 1)。

表 1 设计合成的靶向 Id2 的 shRNA 序列
Tab 1 Design and synthesis of Id2 shRNA sequence

No.	5'	STEMP	Loop	STEMP	3'
PGCL1-1	CCGG	AAGCACTGTGTGGCTGAATAA	TTCAAGAGA	TTATTCAGCCACACAGTGCTT	TTTTTG
PGCL1-2	AATTCAAAAA	AAGCACTGTGTGGCTGAATAA	TCTCTGAA	TTATTCAGCCACACAGTGCTT	
PGCL2-1	CCGG	AACCATTTTACAAGGAGGACA	TTCAAGAGA	TGTCCTCCTTGTGAAAATGGTT	TTTTTG
PGCL2-2	AATTCAAAAA	AACCATTTTACAAGGAGGACA	TCTCTGAA	TGTCCTCCTTGTGAAAATGGTT	
PGCL3-1	CCGG	CAGAGGACCAGTGCTTTGATT	TTCAAGAGA	AATCAAAGCACTGGTCTCTCTG	TTTTTG
PGCL3-2	AATTCAAAAA	CAGAGGACCAGTGCTTTGATT	TCTCTGAA	AATCAAAGCACTGGTCTCTCTG	
PGCL4-1	CCGG	GAGCCTGCTATACAACATGAA	TTCAAGAGA	TTCATGTTGTATAGCAGGCTC	TTTTTG
PGCL4-2	AATTCAAAAA	GAGCCTGCTATACAACATGAA	TCTCTGAA	TTCATGTTGTATAGCAGGCTC	

1.2.2 构建表达 shRNA 慢病毒载体 *Age*I 和 *Eco*RI 内切酶酶切 pGCL-GFP 载体以使其线性化,经退火形成双链 DNA 与双酶切后的 pGCL-GFP 载体连接。连接反应体系:酶切回收的载体 DNA (100 ng/ μ l) 1 μ l, 退火的双链 DNA (100 ng/ μ l) 1 μ l, 10 \times T4 噬菌体 DNA 连接酶缓冲液 1 μ l, T4 噬菌体 DNA 连接酶 1 μ l, ddH₂O 7 μ l, 于 4 $^{\circ}$ C 连接 12 h, 37 $^{\circ}$ C 振荡 16 h 转化到新鲜制备的 DH5 α 感受态细胞。

1.2.3 PCR 鉴定及 DNA 测序 挑取重组阳性克隆行 PCR 及 DNA 测序鉴定。PCR 鉴定阳性克隆的上游引物:5'-CCT ATT TCC CAT GAT TCC TTC ATA-3', 下游引物:5'-GTA ATA CGG TTA TCC ACG CG-3'。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 变性 30 s; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 循环 30 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 6 min。挑选阳性克隆菌液测序。

1.2.4 Id2 基因过表达融合蛋白载体构建 从含有 Id2 的质粒克隆模板中,利用 PCR 方法扩增 Id2 (Id2 基因融合蛋白 PCR 引物序列见表 2), P1 含有 *Xho*I 酶切位点,保护碱基,以及 Id2 基因的 5'端序列;P2 含有 *Kpn*I 酶切位点,保护碱基,以及 Id2 基因的 3'端序列;P3 为引物位于 CMV promoter 中,用于菌落 PCR 鉴定转化子及测序;P4 为引物位于载体上 EGFP 的 N

端,用于菌落 PCR 鉴定转化子及测序。以 P1 和 P2 进行 PCR,回收产物片段用内切酶 *Xho*I 和 *Kpn*I 进行酶切消化,纯化,回收。用内切酶 *Xho*I 和 *Kpn*I 对 pEGFP-N1-3FLAG 载体进行酶切,1%琼脂糖凝胶电泳,切胶、纯化。将回收线性化载体片段 100 ng 和酶切基因 PCR 产物 100 ng 置于反应体系中连接,其产物转化细菌感受态细胞。

表 2 Id2 基因融合蛋白 PCR 引物序列
Tab 2 Id2 primer sequence

No.	Primer sequence
P1	5'-CCG CTC GAG ATG AAA GCC TTC AGT CCC GTG-3'
P2	5'-GGG GTA CCG TGC CAC ACA GTG CTT TGC TG-3'
P3	5'-CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG-3'
P4	5'-CGT CGC CGT CCA GCT CGA CCA G-3'

对长出的克隆进行 PCR,以 P3 和 P4 为上下游引物分别设计在载体和 Id2 基因上,PCR 鉴定的阳性克隆,证明 Id2 已经定向连入目的载体。以有确定插入片段的载体和空载体为阳性及阴性对照。PCR 鉴定阳性的克隆进行测序同上。将前期实验构建的 4 种慢病毒质粒,分别转染到过表达 Id2 蛋

白 U251 细胞,据其对 Id2 的抑制率,确定有效靶序列为序列 4。设计并合成其 shRNA 的 DNA Oligo: 5'-CCG GGA GCC TGC TAT ACA ACA TGA ATT CAA GAG ATT CAT GTT GTA TAG CAG GCT CTT TTT G-3'; 5'-AAT TCA AAA AGA GCC TGC TAT ACA ACA TGA ATC TCT TGA ATT CAT GTT GTA TAG CAG GCT C-3'。经退火形成双链 DNA。退火反应体系: DNA Oligo (sense) (1 μg/μl) 5 μl, DNA Oligo (antisense) (1 μg/μl) 5 μl, 5× Universal buffer 20 μl, ddH₂O 70 μl。混匀, 90℃ 4 min, 70℃ 10 min, 冷却至室温。

1.2.5 重组慢病毒颗粒的包装、制备 制备编码慢病毒颗粒的重组病毒质粒及 2 种辅助包装元件载体质粒均购自上海吉凯基因化学公司,由 pGC-LV 质粒载体、pHelper 1.0 载体、pHelper 2.0 载体组成,其中 pGC-GFP 载体含有能持续表达 siRNA 的元件,同时能表达荧光蛋白 GFP,用于病毒包装时转染效率及感染宿主细胞感染效率的检测。pHelper 1.0 和 pHelper 2.0 含有病毒包装所必须的元件。胰蛋白酶消化对数生长期的 293T 细胞,调整细胞密度为 0.6×10⁹/L,接种于 15 ml 的细胞培养瓶中,37℃、5% CO₂ 培养箱内培养,细胞密度达 70%~80% 时进行转染。3 种质粒载体分别进行高纯度无内毒素抽提,采用脂质体法共转染 293T 细胞。感染 48 h 后收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液,4℃、12 000×g 离心浓缩后得到高滴度的慢病毒浓缩液。利用倍比稀释法在 293T 细胞中测定慢病毒滴度,置 -80℃ 冰箱保存备用。

1.3 Western 印迹法检测转染后 U251 细胞的 Id2 敲减效率 取制备病毒感染 U251 细胞,空白对照加入同体积 ddH₂O,自连对照为空载体。按分子克隆方法提取细胞总蛋白,经 BCA 分析方法定量,各组取 50 μg 总蛋白进行 100 g/L SDS-聚丙烯酰胺电泳,并转印到 PVDF 膜上,用 100 mg/ml 牛血清白蛋白和 0.05% Tween 20 封闭非特异性抗原,加一抗 (1:2 000) 于 4℃ 过夜,次日 TBST 洗膜,加辣根过氧化物酶标记兔抗鼠二抗 (1:5 000),37℃ 温育 1 h,实验重复 3 次,放射自显影后凝胶成像分析系统分析。

1.4 MTT 法检测转染 Id2 shRNA 后 U251 细胞的生长增殖 将 U251 细胞、感染空载体 U251 细胞和敲减 Id2 的 U251 细胞接种于 96 孔培养板中,细胞终密度约为 3.5×10⁴/L,接种后 24 h 进行转染。分别培养 0、24、48、72 h 后每孔加入 100 μl MTT 液 (5 g/L),继续培养 4 h 后,小心弃去上清液,加入 100 μl DMSO 液,震荡,待蓝紫色溶解后,在全自动酶标仪上

测定光密度 (D) 值,计算各孔 D₄₉₀ 抑制率 (%) = (1 - 实验 D 值平均值/对照 D 值平均值) × 100%。

1.5 RT-PCR 测定转染 Id2 shRNA 后 U251 细胞 caspase 3 mRNA 的表达 收集细胞,按 TRIzol 试剂说明提取总 RNA,按 Promega 公司试剂盒说明反转录 cDNA。Caspase 3 上游引物: 5'-GGA AGC GAA TCA ATG GAC TC-3', 下游引物: 5'-CTC AGA AGC ACA CAA ACA AAA C-3'; 内参照 Actin 上游引物: 5'-GGC GGC ACC ACC ATG TAC CCT-3', 下游引物: 5'-AGG GGC CGG ACT CGT CAT ACT-3'。反应体系、反应条件同前。应用 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因相对表达量。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 个样本均数的比较采用 *t* 检验,2 个以上样本均数的比较采用 *F* 检验。检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 阳性克隆的 PCR 及 DNA 测序鉴定 PCR 条带大小: 连接入 vshRNA 片段的阳性克隆 PCR 片段大小为 343 bp; 没有连接入 vshRNA 片段的空载体克隆 PCR 片段大小为 306 bp,琼脂糖凝胶电泳见图 1。DNA 测序鉴定结果与实验要求的 DNA 序列基本一致 (图 2)。

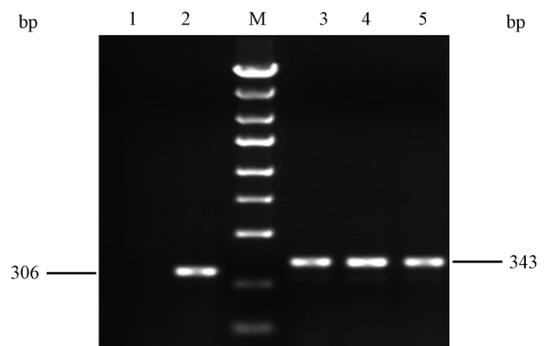


图 1 PCR 阳性克隆筛选

Fig 1 Screening of PCR positive clone

M: DNA marker; 1: ddH₂O; 2: Control; 3-5: Colone 1-3, respectively

2.2 细胞转染及基因沉默效率检测结果 转染 48 h 后采用荧光显微镜下观察慢病毒 RNAi 质粒上报告基因 GFP 的表达 (绿色荧光), 见转染效率可达 70% 以上, 否则重新转染 (图 3)。实验转染组、未转染组、阴性 (通用阴性对照和序列打乱阴性对照) 对照组, 收集各组转染后细胞蛋白, 进行蛋白质印迹实验, 检测 Id2 表达效果, 结果发现 Id2 shRNA 均可抑制 Id2 蛋白的表达, 未转染组、转染空质粒组 Id2 表达无明显影响 (图 4)。

3 讨论

siRNA (small interfering RNA) 是 RNA 干扰中重要的效应分子,与 RNA 诱导沉默复合体——RISC (RNA induced silencing complex) 共同干扰基因表达^[2]。应用微量 siRNA 即可使编码基因产物表达量下降 90% 以上,甚至达到完全敲除^[3]。多种肿瘤细胞系的实验也证实 RNAi 现象存在于肿瘤细胞中^[4]。由于其具有级联式放大效应和高穿透性,因此是研究恶性肿瘤的理想工具^[5]。慢病毒载体是一种复制缺陷型反转录病毒载体,基于 HIV1 演变而来,具有感染分裂期和非分裂细胞的能力^[6],是目前研究目的基因常用的感染载体。

本研究针对 Id2 基因,遵循设计原则^[7],设计 4 条长度为 19 nt 的寡核苷酸序列,并对所设计的 siRNA 在空间可接触性和序列特异性方面进行分析,保证敲减的高效性,同时尽可能地避免偏靶效应。siRNA 表达序列从起始密码子下游第 50 个核苷酸开始;核苷酸序列为 AAG(N18)TT 或 AAG(N18)NN(N 代表任意碱基);序列中 GC 含量为 30%~70%,不含 4 个 A 或 4 个 T 的终止序列(terminator sequence),同源性比对中与其他基因不具有同源性,并且序列不会自身环化。同时以慢病毒作为载体,构建出 Id2 RNAi 的慢病毒载体。选用的慢病毒载体系统由 pGC-LV 载体、pHelper 1.0 载体和 pHelper 2.0 载体 3 质粒组成。

Id2 定位于 2p25 号染色体上,是一种 HLH 蛋白的负性调节蛋白。HLH 蛋白可形成二聚体结构,主要参与调节细胞周期,促进造血细胞、肌源性细胞、神经细胞、胰腺细胞等多种细胞分化^[8]。Id2 可与 bHLH 形成异二聚体,因 Id 蛋白缺少 DNA 结合部位,从而抑制细胞分化等作用^[9]。Id2 除了参与调控细胞周期和细胞定向分化,还参与胚胎和器官形成,与神经母细胞瘤、鳞癌、前列腺癌、胰腺癌、精原细胞癌等肿瘤发生、发展密切相关。正常细胞中 Rb 可与 Id2 结合,抑制了 Id2 的活性,细胞进入细胞 S、M 期分化为成熟细胞。当某种致癌因子激活 N-myc 后,N-myc 和 Id2 结合激活转录,Id2 大量表达并结合未磷酸化的 Rb,抑制细胞分化,促进细胞增殖,导致肿瘤发生^[10]。Meng 等^[11]实验表明 Id2 可促进增强 MCF-7 细胞和 SKOV3 细胞的侵袭性。Coppe 等^[12]发现 Id2 在前列腺肿瘤组织及前列腺癌 LN-CaP 和 PC3 细胞系中都高表达,敲减 Id2 后,PC3 细

胞株的增殖和侵袭力减弱。Lasorella 等^[13]研究表明 Id2 与原发神经母细胞瘤的预后负相关。

综上所述,本研究经 PCR 筛选阳性克隆测序鉴定表明,成功构建了含有 GFP 的 Id2 基因 shRNA 慢病毒载体,敲减胶质瘤细胞 Id2 表达后,肿瘤细胞增殖受到抑制,凋亡水平增高,为进一步研究 Id2 基因在胶质瘤中的生物学功能奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Coma S, Amin D N, Shimizu A, Lasorella A, Iavarone A, Klagsbrun M. Id2 promotes tumor cell migration and invasion through transcriptional repression of semaphorin 3F[J]. *Cancer Res*, 2010, 70:3823-3832.
- [2] Bernstein E, Caudy A A, Hammond S M, Hannon G J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference[J]. *Nature*, 2001, 409:363-366.
- [3] Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, Haraguchi T, Ohki-Hamazaki H, Juni A, et al. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32:936-948.
- [4] Gartel A L, Kandel E S. RNA interference in cancer[J]. *Biomol Eng*, 2006, 23:17-34.
- [5] Micklem D R, Lorens J B. RNAi screening for therapeutic targets in human malignancies[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2007, 8:337-343.
- [6] Wiznerowicz M, Trono D. Conditional suppression of cellular genes; lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference[J]. *J Virol*, 2003, 77:8957-8961.
- [7] Tuschl T. Expanding small RNA interference[J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20:446-448.
- [8] Massari M E, Murre C. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20:429-440.
- [9] Norton J D, Deed R W, Craggs G, Sablitzky F. Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation[J]. *Trends Cell Biol*, 1998, 8:58-65.
- [10] Lasorella A, Rothschild G, Yokota Y, Russell R G, Iavarone A. Id2 mediates tumor initiation, proliferation, and angiogenesis in Rb mutant mice[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25:3563-3574.
- [11] Meng Y, Gu C, Wu Z, Zhao Y, Si Y, Fu X, et al. Id2 promotes the invasive growth of MCF-7 and SKOV-3 cells by a novel mechanism independent of dimerization to basic helix-loop-helix factors[J]. *BMC Cancer*, 2009, 4:75.
- [12] Coppe J P, Itahana Y, Moore D H, Bennington J L, Desprez P Y. Id1 and Id2 proteins as molecular markers for human prostate cancer progression[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10:2044-2051.
- [13] Lasorella A, Boldrini R, Dominicci C, Donfrancesco A, Yokota Y, Inserra A. Id2 is critical for cellular proliferation and is the oncogenic effector of N-myc in human neuroblastoma[J]. *Cancer Res*, 2002, 62:301-306.