



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.04.011
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.04.011
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(4):529-534.

· 基础研究 ·

尾型同源盒转录因子 2 shRNA 慢病毒表达载体的构建及其转染对结肠癌细胞生长的影响

王训凯, 郑见宝, 孙学军, 王孝琰, 余钧辉, 李孝斌

(西安交通大学第一附属医院 普通外科, 陕西 西安 710061)

摘要

目的: 构建尾型同源盒转录因子 2 (CDX2) shRNA 慢病毒表达载体, 并观察下调 CDX2 基因其对结肠癌细胞生长的影响。

方法: 根据 CDX2 mRNA 序列设计 shRNA, 并合成 shRNA 的互补序列, 通过连接酶链接到 GV248 载体上, 用测序方法鉴定阳性克隆后, 将构建好的慢病毒表达载体与慢病毒包装载体用 Lpofectamine 2000 共转染 293T 细胞, 产生慢病毒颗粒并用稀释法进行滴度测定。将 CDX2 shRNA 慢病毒表达载体转染人结肠癌细胞 SW480、HT29 后, 分别用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 CDX2 mRNA 及蛋白水平, CCK8 实验及克隆形成实验检测细胞增殖能力。

结果: DNA 测序鉴定证实, CDX2 shRNA 表达片段正确插入 GV248 载体中, 包装后的病毒滴度为 1×10^9 TU/mL; SW480、HT29 细胞转染 CDX2-shRNA 慢病毒表达载体后, CDX2 mRNA 及蛋白表达水平均明显降低 (均 $P < 0.05$), 但细胞的增殖与克隆形成能力无明显改变 (均 $P > 0.05$)。

结论: 成功构建 shRNA 慢病毒表达载体, 其转染结肠癌细胞后能有效地抑制 CDX2 基因的表达; 下调 CDX2 基因对人结肠癌细胞的增殖无明显影响。

关键词

结肠肿瘤; 基因, 同源盒; RNA 干扰
中图分类号: R735.3

Construction of lentiviral vectors expressing shRNA against caudal-related homeobox 2 gene and effect of their transfection on growth of colon cancer cells

WANG Xunkai, ZHENG Jianbao, SUN Xuejun, WANG Xiaolong, YU Junhui, LI Xiaobin

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract

Objective: To construct recombinant lentiviral vectors expressing the shRNA against caudal-related homeobox 2 (CDX2) gene, and observe the effect of down-regulation of CDX2 gene expression on growth ability of colon cancer cells.

Methods: According to CDX2 mRNA sequence, the shRNA sequences were designed and their complementary

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81101874; 81172362); 陕西省科学技术研究发展计划资助项目 (2011-K12-19); 陕西省科技统筹创新工程计划资助项目 (2013KTCQ03-08)。

收稿日期: 2016-01-25; **修订日期:** 2016-03-18。

作者简介: 王训凯, 西安交通大学第一附属医院住院医师, 主要从事消化系统肿瘤基础与临床方面的研究。

通信作者: 孙学军, Email: sunxy@mail.xjtu.edu.cn

sequences were synthesized, which were then inserted into the GV248 vectors by using ligase. Positive clones were verified by DNA sequencing. Lentiviral particles were produced by cotransfection of lentiviral expression vectors with lentiviral packaging plasmids into 293T cells by lipofectamine2000, and then the viral titer was determined by serial dilution. Human colon cancer SW480 and HT29 cells were transfected with the CDX2-shRNA expressing lentiviral vectors, and then the CDX2 mRNA and protein expression were determined by qRT-PCR and Western blot analysis, and the proliferative ability was examined by CCK 8 assay and colony formation assay, respectively.

Results: The results of DNA sequencing showed that CDX2-shRNA expression segments were correctly inserted into GV248 vectors, and viral titer was 1×10^9 TU/mL after packaging. In both SW480 and HT29 cells after transfection of CDX2-shRNA expressing lentiviral vectors, the mRNA and protein expression levels of CDX2 mRNA and protein were significantly down-regulated (all $P < 0.05$), but no significant change was found in cell proliferation and colony forming ability (all $P > 0.05$).

Conclusion: CDX2-shRNA expressing lentiviral vectors are successfully constructed and their transfection can effectively inhibit CDX2 gene expression. Down-regulation of CDX2 gene expression exerts no obvious effect on growth of colon cancer cells.

Key words Colonic Neoplasms; Genes, Homeobox; RNA Interference

CLC number: R735.3

结肠癌是常见的消化道恶性肿瘤之一，其发病率和病死率在全球范围内均处于恶性肿瘤的第3位^[1-2]，近年来随着我国经济增长及饮食结构的变化，结肠癌发病率呈上升趋势，已经成为结肠癌高发病率国家^[3]，但其具体发病机制尚不完全清楚。尾型同源盒转录因子2 (caudal-related homeobox 2, CDX2) 作为肠道上皮的特异性基因对肠上皮细胞的增殖、分化、黏附、凋亡以及肿瘤形成起到重要调控作用^[4-7]。且CDX2作为结直肠癌的高度特异性指标对结直肠癌的发生发展及预后起到重要的作用^[8-12]。但其具体机制仍然缺乏完整的研究。本实验通过构建CDX2 RNAi (RNA interference) 慢病毒载体并进行鉴定，为研究CDX2对结肠癌生物学的影响的机制打下基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

Primer (R&F)、dsDNA oligo (上海吉凯基因技术有限公司), Taq polymerase (Takara), QIAGEN Plasmid大量抽提试剂盒 (QIAGEN), BSA (上海捷倍思基因技术有限公司), LB (ATCC), CaCl₂ (上海越俊生化有限公司), T₄ DNA ligase、T₄ DNA ligase buffer (NEB), MgSO₄ (上海吴化化工有限公司), Age I、EcoR I、Hpa I、Xho I (NEB), 结晶紫粉剂, Cell

Counting Kit 8试剂盒 (日本同仁化学研究所), 细胞培养箱 (美国Forma Scientific公司), 聚合酶链反应仪 (PCR) (Applied Biosystems公司), 稳压电泳仪 (上海西巴斯生物技术开发有限公司), 凝胶成像仪 (天能公司), 离心机 (日立公司), 细菌摇床 (华利达实验设备公司), 细菌培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司), 移液器 (吉尔森公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 shRNA的设计及其序列的合成 从GenBank资料中获得人CDX2基因mRNA序列 (基因编号: NM-001265), 根据RNA干扰序列设计原则, 运用Promega、Invitrogen、和Dharmacon提供的RNA干扰设计工具, 设计RNAi序列 5'-ACA AAT ATC GAG TGG TGT A-3', 针对此寡核苷酸制备编码shRNA的互补序列: 5'-CCG GAG ACA AAT ATC GAG TGG TGT ACT CGA GTA CAC CAC TCG ATA TTT GTC TTT TTT G-3'; 5'-AAT TCA AAA AAG ACA AAT ATC GAG TGG TGT ACT CGA GTA CAC CAC TCG ATA TTT GTCT-3', 分别在正义链和反义链模板的5'端添加限制性核酸内切酶位点的粘端, 中间添加loop环 (CTCGAG), 3'端酶切位点前添加pol III聚合酶终止信号TTT TT, 送交上海吉凯基因技术有限公司合成。

1.2.2 慢病毒表达载体的构建及鉴定 把合成的正

义链和反义链溶于退火溶液中, 90 °C水浴 15 min 后自然冷却至室温, 通过 T₄ DNA 连接酶将 Age I 和 EcoR I 双酶切线性化的载体和 shRNA 进行连接。连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 37 °C 温育 45 min 后转移至含 20 mmol/L MgSO₄ 和 Amp 抗性 (100 μ g/mL) 的 LB 琼脂培养基上, 37 °C 培养 16 h, 挑选阳性克隆, 进行 DNA 测序。

1.2.3 慢病毒的包装及滴度的测定 将 $1.2 \times 10^7/20$ mL 的 293T 细胞接种于 15 cm 细胞皿培养皿中, 37 °C、5%CO₂ 培养箱内培养。待细胞密度达 70%~80% 时进行转染。将 pGC-LV、elper1.0、elper2.0 载体用 Lipofectamine2000 进行共转染 293T 细胞。48 h 后弃去含有转染混合物的培养基, 加入 10% 血清的细胞培养基 37%、5%CO₂ 培养 48 h 后收集细胞上清。4 °C, 4 000 g 离心 10 min, 除去细胞碎片, 0.45 μ m 滤器过滤上清, 孔稀释法进行滴度测定后 -80 °C 长期保存。

1.2.4 慢病毒载体转染人结肠癌细胞 SW480、HT29 转染前 1 天按 $5 \times 10^4/$ 孔将 SW480、HT29 细胞接种于 12 孔板, 置于 37%、5%CO₂ 培养箱中, 待细胞密度达 70%~80% 时按照转染复数 (MOI) = 10 进行转染。12 h 后更换为 10% 血清的新鲜培养基, 72 h 后用嘌呤霉素进行筛选。分为 3 组, 未转染组 (空白对照组)、转染 GV248-CDX2 组 (CDX2 shRNA 组)、转染阴性对照病毒组 (阴性对照组)。

1.2.5 Western blot 检测 CDX2 蛋白的表达水平 收集转染后的各组细胞, 常规提取总蛋白, $5 \times$ 上样缓冲液稀释后煮沸 10 min, 离心后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳完毕后将凝胶中的蛋白质分子转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉 TBST 溶液室温封闭 2 h, 随后加入 1:1 000 稀释的 CDX2 兔抗人多克隆抗体, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 10 min \times 3 次, 二抗山羊抗兔 1:5 000 稀释液室温孵育 1 h, TBST 洗膜 8 min \times 4 次, 置入 ECL 显影剂中

1 min, 暗室内曝光显影, 同法以 β -actin 为内参。

1.2.6 qRT-PCR 检测 CDX2 mRNA 的表达水平 用 Fast200 试剂盒提取细胞总 RNA, 并反转录成 cDNA, 制备 25 μ L 反应体系: $2 \times$ SYBR Master Mix: 12.5 μ L, Cdna: 2 μ L, 引物: 0.5 μ L, ddH₂O: 10 μ L。按照反应条件: 94 °C 30 s, 94 °C 5 s, 58.2 °C 15 s, 72 °C 10 s, 循环 45 次。以 β -actin 为内参将所得数据按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 CDX2 的相对表达量。

1.2.7 细胞增殖及克隆形成实验 分别取对数生长期的 3 组细胞饥饿 12 h, 按 3 000/100 μ L 个细胞接种至 96 孔板中, 每组设置 5 个复孔, 分别于 1、2、3、4 d 检测。每孔加入 CCK8 10 μ L, 培养箱中培养 2 h, 用酶联免疫检测仪测量 450 nm 下各孔吸光度。同法按 100/ 皿个细胞接种于 6 cm 皿中, 常规培养 14 d 后弃去培养基, PBS 洗涤后, 4% 多聚甲醛室温固定 20 min, 0.1% 结晶紫染色 20 min, 流水冲洗晾干后照相。

1.3 统计学处理

所有数据均采用均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS 18.0 统计软件进行单因素方差分析, 检验水平 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 构建 CDX2 shRNA 及靶序列测序分析和包装后滴度测定

将化学合成的 shRNA 退火处理后, 与已经酶切的载体链接, 然后进行转化。挑取 CDX2 shRNA 载体克隆进行 DNA 测序。结果表明, shRNA 已经插入到 GV248 载体中, 测序结果与预期一致 (图 1), 证明 shRNA 表达载体构建成功。孔稀释法测定病毒滴度为 1×10^9 TU/mL。

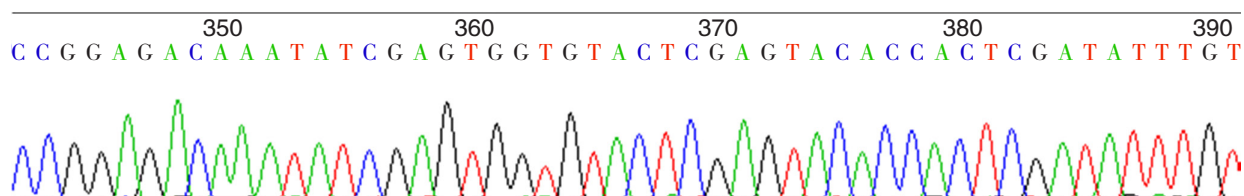


图 1 CDX2 shRNA 慢病毒载体的测序结果
Figure 1 Sequencing of the recombinant vector

2.2 筛选 CDX2 shRNA 稳定细胞株

用构建的慢病毒载体转染 SW480、HT29 细胞, 72 h 后荧光显微镜下观察到 90% 以上细胞表达

绿色荧光蛋白。进一步用嘌呤霉素筛选 2 周, 荧光显微镜下观察视野中几乎每个细胞中均达绿色荧光蛋白 (图 2)。

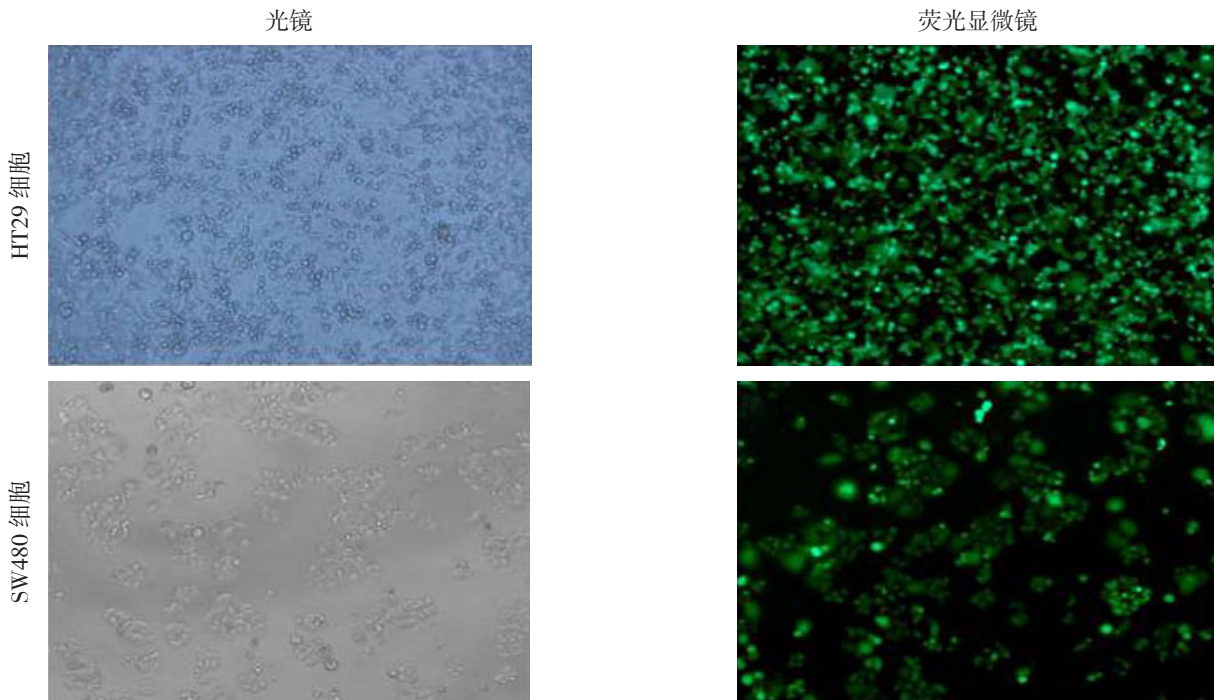


图 2 CDX2-shRNA 慢病毒表达载体后结肠癌细胞镜下观察 (× 200)

Figure 2 Microscopic observation of the colon cancer cells after CDX2-shRNA expressing lentiviral vectors (×200)

2.3 qRT-PCR 及 Western blot 检测 CDX2 shRNA 对 CDX2 表达的影响

常规提取转染后细胞总蛋白及RNA，通过qRT-PCR及Western blot检测CDX2表达情况。结果

表明，与空白对照组及阴性对照组比较，CDX2-shRNA组细胞CDX2蛋白表达水平（图3A-B）及mRNA水平（图3C）明显下降（均 $P < 0.05$ ）。

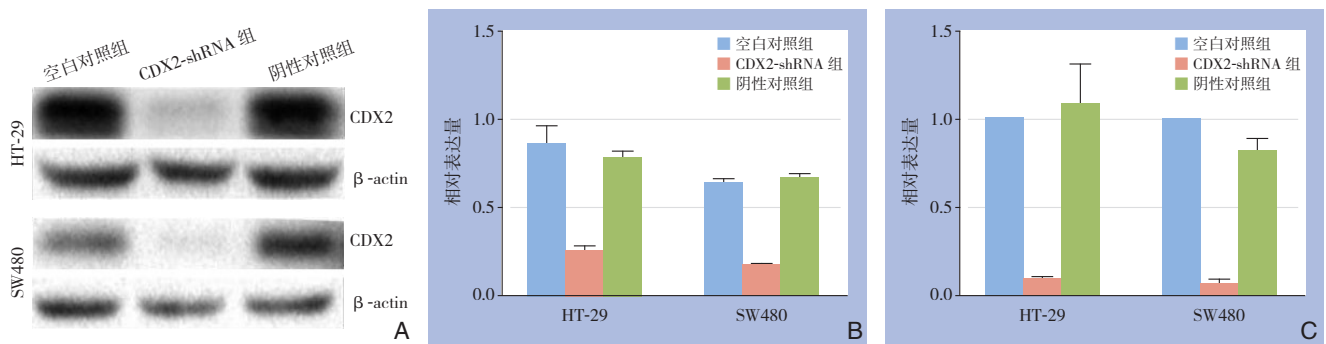


图 3 Western blot 与 qRT-PCR 检测干扰效率 A、B: CDX2 蛋白表达; C: CDX2 mRNA 表达

Figure 3 Determination of the interference efficiency by Western blot and qRT-PCR A, B: CDX2 protein expression levels; C: CDX2 mRNA expression levels

2.4 CDX2 shRNA 对结肠癌细胞 SW480、HT29 增殖的影响

用CCK8试剂盒分别检测空白对照组、阴性对照组、CDX2-shRNA组细胞增殖能力，发现3组

细胞增殖能力无明显差异 ($P > 0.05$) (图4)。克隆形成实验结果与CCK8实验结果相似 ($P > 0.05$) (图5)。

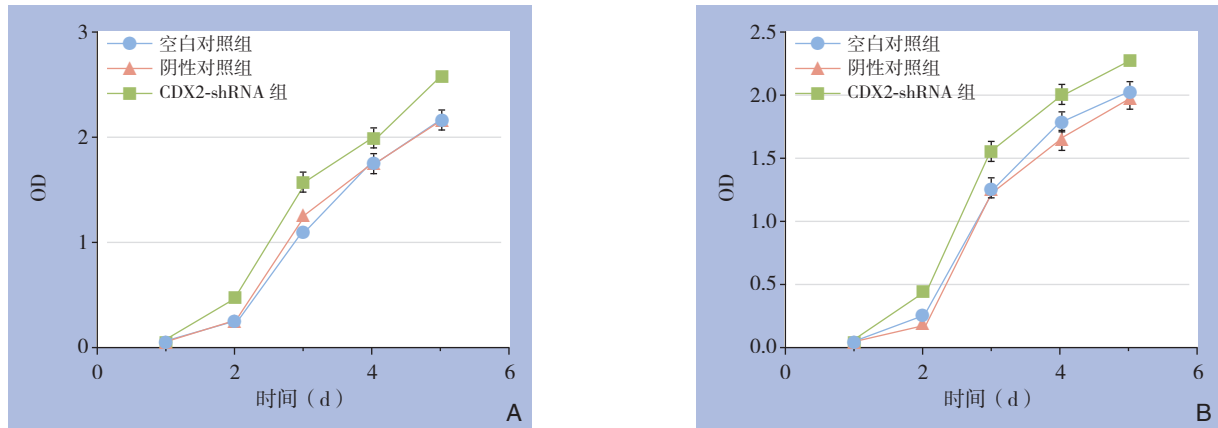


图4 CCK8 检测 CDX2 对结肠癌细胞增殖能力的影响 A: HT29 细胞; B: SW480 细胞
 Figure 4 Effect of CDX2 on the growth of colon cancer cells by CCK8 assay A: HT29 cells; B: SW480 cells

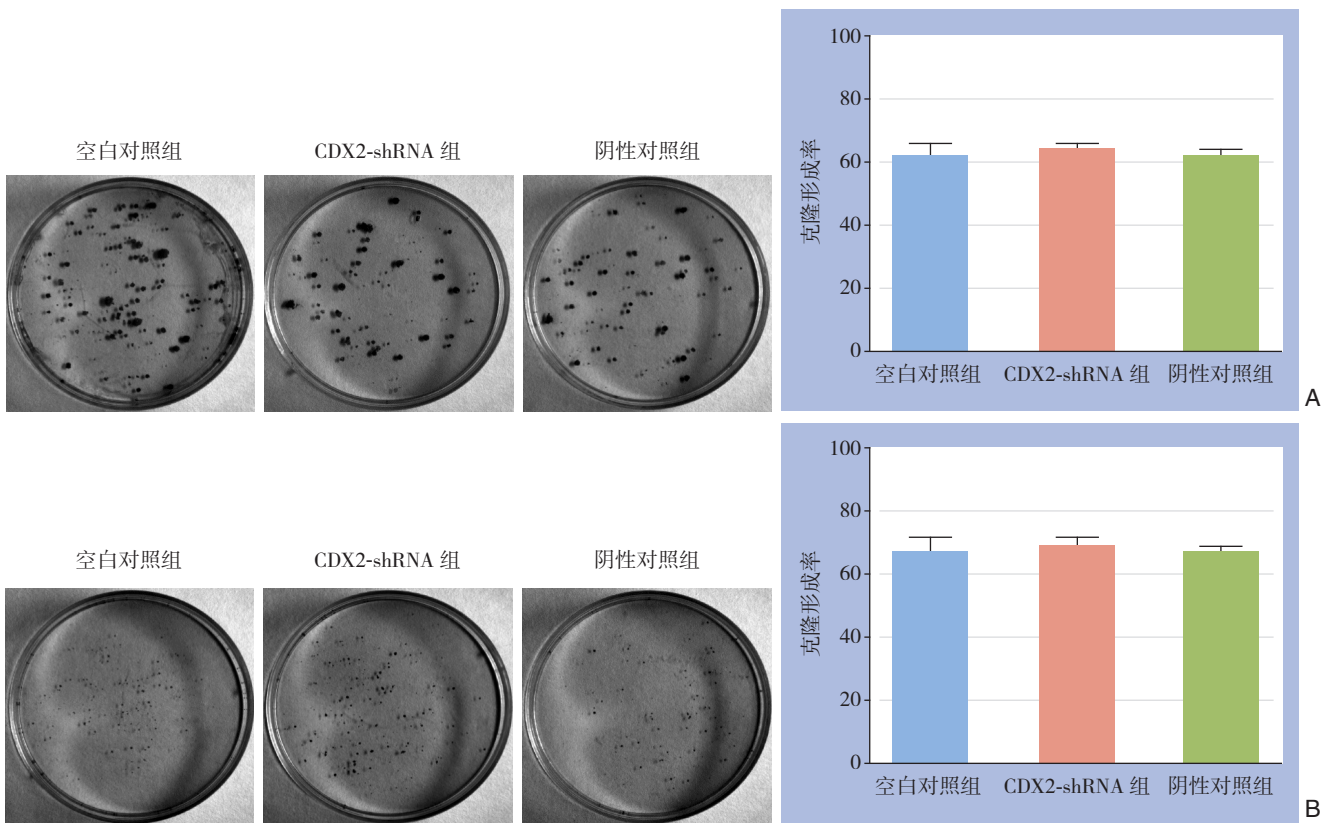


图5 CDX2 对结肠癌细胞克隆形成能力的影响 A: HT29 细胞; B: SW480 细胞
 Figure 5 Effect of CDX2 on the colony forming ability on colon cancer cells A: HT29 cells; B: SW480 cells

3 讨论

CDX2做为肠特异性转录因子,对肠上皮的早期分化、表型维持及增殖起到关键性作用。Mallo等^[13-14]的研究发现CDX2在结肠腺瘤及腺癌中的表达降低,且与肿瘤的恶性程度成负相关性,本课题组前期研究^[15]也发现CDX2在结肠癌中的表达水平显著低于正常结肠组织,并随结肠癌分化程度的降低而降低。另外,本课题组前期体外研究^[16-17]还

发现,上调CDX2表达对结肠癌细胞系增殖能力无明显影响,但能够明显抑制结肠癌细胞的侵袭能力;体内实验^[18]证实上调CDX2表达能够抑制裸鼠移植瘤形成。而下调CDX2表达对结肠癌的影响相关报道较少,Tamai等^[19-20]通过CDX2基因敲除鼠模型,发现CDX2等位基因的缺失可以触发胚胎期肠上皮细胞的异常增殖,最终导致肠道肿瘤的形成。上述研究说明CDX2作为抑癌基因在结直肠癌的发生发展过程中起到重要作用。但Dang等^[21]的

研究发现CDX2在结肠癌细胞中具有潜在的致癌作用,其具体作用机制还尚不明了。因此CDX2基因在结肠癌发生发展过程中所起到的作用仍未完全统一,尚需要进一步的研究。

本研究成功构建了CDX2 shRNA慢病毒表达载体,病毒滴度达 1×10^9 TU/mL, qRT-PCR及Western blot结果证明构建的CDX2 shRNA能有效抑制CDX2的表达。CCK8及克隆形成实验显示,CDX2-shRNA组HT29、SW480细胞增殖无明显变化,与本课题组前期研究^[16]上调CDX2表达对结肠癌细胞增殖能力影响结果相同,因此CDX2在肿瘤发生发展过程中的具体机制仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1):9-29.
- [2] 马丹, 杨帆, 廖专, 等. 中国早期食管癌筛查及内镜诊治专家共识意见(2014年, 北京)[J]. 中国实用内科杂志, 2015, 35(4):320-337. Ma D, Yang F, Liao Z, et al. Expert consensus for screening and endoscopic diagnosis of early esophageal cancer in China (Beijing, 2014)[J]. Chinese Journal of Practical Internal Medicine, 2015, 35(4):320-337.
- [3] Aarons CB, Mahmoud NN. 现代结直肠癌外科治疗的思考[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(4):459-466. Aarons CB, Mahmoud NN. Current surgical considerations for colorectal cancer[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(4):459-466.
- [4] 胡泽成, 赵华. 结直肠癌肿瘤标志物CDX2的研究现状[J]. 中国普通外科杂志, 2008, 17(4):391-393. Hu ZC, Zhao H. Research progress of colorectal neoplasms markers CDX2[J]. Chinese Journal of General Surgery 2008, 17(4):391-393.
- [5] Freund JN, Duluc I, Reimund JM, et al. Extending the functions of the homeotic transcription factor Cdx2 in the digestive system through nontranscriptional activities[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(5):1436-1443.
- [6] Freund JN. Identity and intestinal pathologies: the Cdx2 homeotic gene[J]. Ann Pathol, 2012, 32(5 Suppl):S24-27.
- [7] Lorentz O, Duluc I, Arcangelis AD, et al. Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation[J]. J Cell Biol, 1997, 139(6):1553-1565.
- [8] Tanaka S, Saito K, Ito T, et al. CDX2 as a useful marker of colorectal adenocarcinoma metastases to lung in pre-operative biopsy specimens[J]. Oncol Rep, 2007, 18(1):87-92.
- [9] Yu J, Ebert MP, Miehlke S, et al. alpha-catenin expression is decreased in human gastric cancers and in the gastric mucosa of first degree relatives[J]. Gut, 2000, 46(5):639-644.
- [10] Fearon ER, Huang EH. CDX2: Linking Cell and Patient Fates in Colon Cancer[J]. Cell Stem Cell, 2016, 18(2):168-169.
- [11] Hinkel I, Duluc I, Martin E, et al. Cdx2 controls expression of the protocadherin Mucdhl, an inhibitor of growth and β -catenin activity in colon cancer cells[J]. Gastroenterology, 2012, 142(4):875-885.
- [12] Gross I, Duluc I, Benameur T, et al. The intestine-specific homeobox gene Cdx2 decreases mobility and antagonizes dissemination of colon cancer cells[J]. Oncogene, 2008, 27(1):107-115.
- [13] Mallo GV, Rechreche H, Frigerio JM, et al. Molecular cloning, sequencing and expression of the mRNA encoding human Cdx1 and Cdx2 homeobox. Down-regulation of Cdx1 and Cdx2 mRNA expression during colorectal carcinogenesis[J]. Int J Cancer, 1997, 74(1):35-44.
- [14] Olsen J, Espersen ML, Jess P, et al. The clinical perspectives of CDX2 expression in colorectal cancer: a qualitative systematic review[J]. Surg Oncol, 2014, 3(3):167-176.
- [15] Zheng JB, Sun XJ, Qi J, et al. Effects of homeodomain protein CDX2 expression on the proliferation and migration of lovo colon cancer cells[J]. Pathol Oncol Res, 2011, 17(3):743-51.
- [16] 李守帅, 孙学军, 郑见宝, 等. 尾型同源盒基因-2过表达对结肠癌细胞生物学性状的影响[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2011, 32(1):114-118. Li SS, Sun XJ, Zheng JB, et al. CDX2 gene overexpression and its inhibition on malignant progress of human colorectal cancer cell line[J]. Journal of Xi'an Jiaotong University: Medical Sciences, 2011, 32(1):114-118.
- [17] Zheng JB, Sun XJ, Qi J, et al. Effects of homeodomain protein CDX2 expression on the proliferation and migration of lovo colon cancer cells[J]. Pathol Oncol Res, 2011, 17(3):743-751.
- [18] 任海亮, 孙学军, 郑见宝, 等. 过表达CDX2抑制裸鼠结肠癌移植瘤的生长[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 18(4):434-436. Ren HL, Sun XJ, Zheng JB, et al. Over-expression CDX2 inhibits growth of colorectal transplanted tumors in nude mice[J]. Chinese Journal of Cancer Biotherapy, 2011, 18(4):434-436.
- [19] Tamai Y, Nakajima R, Ishikawa T, et al. Colonic hamartoma development by anomalous duplication in Cdx2 knockout mice[J]. Cancer Res, 1999, 59(12):2965-2970.
- [20] Chawengsaksophak K, de Graaff W, Rossant J, et al. Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(20):7641-7645.
- [21] Dang LH, Chen F, Ying C, et al. CDX2 has tumorigenic potential in the human colon cancer cell lines LOVO and SW48[J]. Oncogene, 2006, 25(15):2264-2272.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 王训凯, 郑见宝, 孙学军, 等. 尾型同源盒转录因子2 shRNA慢病毒表达载体的构建及其转染对结肠癌细胞生长的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2016, 25(4):529-534. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.04.011

Cite this article as: Wang XK, Zheng JB, Sun XJ, et al. Construction of lentiviral vectors expressing shRNA against caudal-related homeobox 2 gene and effect of their transfection on growth of colon cancer cells[J]. Chin J Gen Surg, 2016, 25(4):529-534. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.04.011