

文章编号:1005-6947(2008)02-0130-04

· 基础研究 ·

E2F1 的 siRNA 真核表达载体转染对胆管癌细胞的作用

汪昕¹, 唐滔², 陈波¹, 苏璜¹, 邹声泉¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 胆胰外科, 湖北 武汉 430030; 2. 广东省深圳市龙岗中心医院 普通外科, 广东 深圳 518116)

摘要:目的 探讨 E2F1 蛋白信号的转导通路对胆管癌细胞凋亡的影响中的作用。方法 根据 E2F1 基因 cDNA 序列, 设计针对目的基因的 4 个 siRNA 靶序列, 将其插入 U6 启动子下游, 克隆到真核表达载体 pGensil 中, 通过酶切鉴定和 DNA 测序鉴定。采用脂质体介导法将构建好的 4 个 siRNA 表达载体分别转染于 QBC939 细胞中; 以 RT-PCR 检测 E2F1 基因在转染前后的表达, 流式细胞术检测转染后对细胞凋亡率的影响。结果 重组质粒酶切后呈线性化, 酶切鉴定及 DNA 测序结果显示插入片段正确。转染 48h 后, 4 个 siRNA 表达载体均抑制了 E2F1 mRNA 的表达, 沉默 E2F1 基因后细胞的凋亡率显著增加。结论 E2F1 的 siRNA 真核表达载体转染 QBC939 细胞后, 该表达载体具有抑制 E2F1 基因表达、促进细胞凋亡的功能, 可以用于后续胆管癌的实验研究。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(2): 130-133]

关键词: 胆管肿瘤; 转录因子; E2F1; siRNA; 真核表达载体

中图分类号: R 735.8 **文献标识码:** A

The effect of siRNA eukaryotic expression vector transfection of E2F1 on cholangiocarcinoma cells

WANG Xin¹, TANG Tao², CHEN Bo¹, SU Ying¹, ZOU Shengquan¹

(1. Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Department of General Surgery, Longgang Central Hospital, Shenzhen, Guangdong 518116, China)

Abstract: **Objective** To study the action of E2F1 protein signal transmission pathway to influence the apoptosis of cholangiocarcinoma QBC939 cells. **Methods** Four siRNAs were designed according to the coding sequence of E2F1 gene, and cloned into the downstream of U6 promoter of pGenesil. The constructed recombinant was analyzed and identified by Ase I endonuclease digestion and DNA sequencing. The siRNA constructs were transfected into QBC939 cells via lipofectamine 2000. RT-PCR was used to measure the E2F1 mRNA expression in QBC939, and the rate of apoptosis of QBC939 was detected by the method of flow cytometry after transfection. **Results** The constructed psiRNA plasmid digested with Ase I was linearized. The sequencing result confirmed that the sequence of inserted fragment was correct. The expression of E2F1 mRNA was greatly inhibited at 48h after transfection, and the rate of apoptosis of QBC939 increased significantly after transfection. **Conclusions** Eukaryotic expression vector of siRNA targeting E2F1 gene can specifically inhibit E2F1 expression and promote the apoptosis of QBC939 cell. It can be used for

基金项目: 国家高技术研究发展计划资助项目[863 计划项目(2002AA214061)]。

收稿日期: 2007-09-17; **修订日期:** 2007-12-04。

作者简介: 汪昕, 男, 华中科技大学同济医学院附属同济医院硕士研究生, 主要从事胆管癌的基础和临床方面的研究。

通讯作者: 邹声泉 E-mail: sqzou@yahoo.com.cn

later experimental research in cholangiocarcinoma.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(2): 130 - 133]

Key words: Bile Duct Neoplasms; Transcription Factors; E2F1; siRNA; Eukaryotic Expression Vector

CLC number: R 735.8

Document code: A

1986年 Kmiec 等^[1]研究腺病毒的 E2 启动子时发现转录因子 E2F1 (transcription factor E2F1), 它是细胞周期最重要的转录调控因子之一, 调控许多编码 DNA 复制和细胞生长所需蛋白的基因, 在细胞 G₁ ~ S 期生长调控中起着关键性的作用^[2]。本研究通过构建针对 E2F1 的 siRNA 真核表达载体, 转染胆管癌细胞株 QBC939 后抑制 E2F1 基因在其中的表达, 并促进胆管癌细胞的凋亡, 为以后研究 E2F1 的 siRNA 真核表达载体与化疗药联合作用人胆管癌细胞的实验打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

质粒 pGenesil 购自中国晶赛公司, 受体菌 E. coli DH-5 α 由本实验室保存, 人胆管癌细胞株 QBC939 由第三军医大学王曙光教授惠赠。限制性内切酶 BamHI 和 HindIII 及 T4DNA 连接酶购自美国 NEB 公司, M-MLV 逆转录酶、RNA 酶抑制剂 Rnasin 和 Taq 聚合酶为美国 Promega 公司产品。TRIZOL、opti-MEM 和转染试剂 lipofectamine 2 000 购自美国 Invitrogen 公司。高纯质粒提取试剂盒购自杭州 V-gene 公司, DNA 凝胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司。DNA 由上海生工生物工程公司合成。胎牛血清购自美国 HyClone 公司; DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司。

1.2 实 验 方 法

1.2.1 siRNA 靶序列的设计和筛选 利用 NCBI Genebank 检索 E2F1 mRNA 的全长序列 (gi: 12669910), 应用 RNA 结构软件筛选出 4 个 21 个核苷酸的序列, 分别命名为 psiRNA1 (TATAACAACGG-TAGTGGATCC), psiRNA2 (GGCAACAATATCCACGGATCC), psiRNA3 (GGTATCTGGATCCCGCTCCT) 和 psiRNA4 (TCCGCCACGGATCCCGC TCC)。两端引入 BamHI + HindIII 双酶切位点。

1.2.2 靶向 E2F1 的 siRNA 真核表达载体的构建

1.2.2.1 siRNA 表达模板与酶切后 pGenesil 载体的连接及转化 将化学合成的正义链和反义链退火, 形成 siRNA 表达模板, 表达模板由正义链 + loop (UUCAAGACG) + 反义链组成, 两端为酶切位

点。pGenesil 质粒 U6 启动子下游有 2 个 BamHI + HindIII 双酶切位点, 酶切反应后, 用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 凝胶回收 2 640 bp 片断。回收后通过紫外分光光度计定量。按 4:1 的比例混合将 siRNA 表达模板和 pGenesil 酶切产物, T4DNA 连接酶 27 $^{\circ}$ C 连接过夜, 转化于感受态 DH-5 α 大肠杆菌中, 取振荡后的转化菌, 均匀涂抹在含 χ -gal 和 IPTG 的卡那琼脂平板上, 倒置培养过夜。观察菌落生长情况, 蓝白斑筛选, 挑取白色单克隆。

1.2.2.2 质粒的扩增、提取和鉴定 将挑取的菌落分别接种于含卡那霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 250 r/min 振荡 12 ~ 14 h。取 3 mL 转化菌液, 按照超纯质粒抽提试剂盒说明步骤提取质粒。取 1 μ L 在 1% 的琼脂糖电泳。将提取的重组质粒和 pGenesil 空质粒, 用限制性内切酶 Pst-I 和 Sal-I 进行酶切鉴定。

1.2.2.3 细胞培养和转染 人胆管癌细胞株 QBC939 细胞在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% 的 CO₂, 饱和湿度培养箱中培养。根据是否进行质粒转染和转染质粒的不同分为 5 组。正常培养的 QBC939 细胞作为空白对照; 将 4 个重组质粒依次转染到 psiRNA1 组, psiRNA2 组, psiRNA3 组和 psiRNA4 组中; 将 pGenesil 空质粒转染到空载体组中备用。将对数生长期的 QBC939 细胞以 2 \times 10⁵/孔接种于 6 孔板, 细胞铺板在 2 mL 含 10% 胎牛血清不含抗生素的 DMEM 中, 细胞融合达 40% ~ 60% 时转染。转染方法按照脂质体 lipofectamine 2 000 说明书进行。

1.2.2.4 逆转录 - 聚合酶链反应检测 E2F1 mRNA 在 QBC939 中的表达 转染 48 h 后, 用 Trizol 抽提各组细胞的总 RNA, 以 Oligo (dT) 为引物合成 cDNA, 然后以 cDNA 为模板进行 PCR, 上游引物为 5' CCCCAACTCCCTCTACCCT 3'; 下游引物为 5' CTC-CCATCTCATATCCATCCTG 3'; 扩增产物为 217 bp。以 β -actin 为内参, 上游引物为 5' CCTGTACGCCAACACAGTGC 3', 下游引物为 5' ATACTCTGCTTGCTGATCC 3', 扩增产物 521bp。电泳结果经 GeneSnap 成像后, 进行半定量分析。用目的基因与 β -actin mRNA 积分值之比表达目的基因的表达水平。

1.2.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率 空白对照组、转染空载体组、转染组 (psiRNA1 组) 细胞培养 48 h 后分别收集细胞 1×10^6 个, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 2 次, 70 % 预冷的乙醇固定 24 h, PBS 清洗 2 次; 分别加入碘化丙啶 (PI) 染液和 RNA 酶, 4 °C 避光反应 30 min, 上机检测各组细胞凋亡率。

1.3 统计处理

数据统计采用 SPSS 13.0 软件。多组别样本均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 重组载体酶切的鉴定

用 Pst-I 和 Sal-I 分别酶切重组载体和空载体 (图 1), 重组质粒酶切后呈线性化, 电泳出 1 条带; 空质粒组得到 752 bp 和 2 227 bp 2 条带。以上结果均与预期相符。

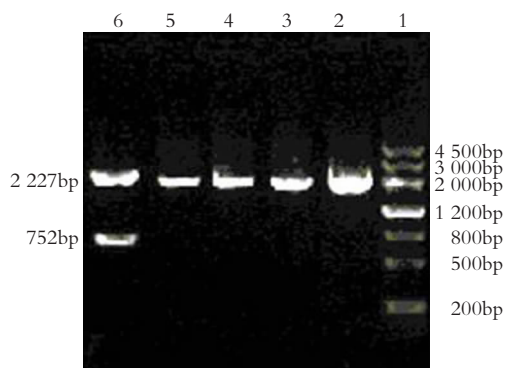


图 1 重组质粒酶切鉴定结果 1: Marker; 2: psiRNA1; 3: psiRNA2; 4: psiRNA3; 5: psiRNA4; 6: pGenesil

2.2 测序结果

将 DNA 测序结果通过 DNAssist 2.2 软件进行比对, 与预先设计结果完全相符。说明已将 4 个不同序列的 siRNA 分别成功克隆至载体 psiRNA 上, 均可以用于后续研究。

2.3 E2F1 mRNA 的表达

RT-PCR 产物各取 3 μ L 在 1 % 的琼脂糖凝胶进行电泳。结果显示, 转染 4 个靶向 E2F1 的 siRNA 真核表达载体 48 h 后, QBC939 细胞中 E2F1 的表达受到明显抑制, 以 psiRNA1 抑制作用最强, 空白对照组 QBC939 的表达无明显差别 (表 1) (图 2)。

表 1 各组 E2F1 mRNA 表达的变化 (E2F1/ β -actin 灰度比值, $\bar{x} \pm s$)

组别	E2F1/ β -actin	与未转染组比较
空白对照组	0.757 \pm 0.164	-
psiRNA1 组	0.194 \pm 0.129	$P < 0.001$
psiRNA2 组	0.434 \pm 0.136	$P < 0.05$
psiRNA3 组	0.498 \pm 0.104	$P < 0.05$
psiRNA4 组	0.542 \pm 0.089	$P < 0.05$

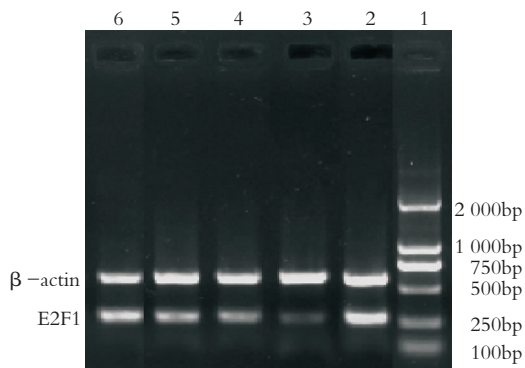


图 2 siRNA 转染 QBC939 细胞对 E2F1 mRNA 水平的影响 1: Marker; 2: 空白对照组; 3: psiRNA1 组; 4: psiRNA2 组; 5: psiRNA3 组; 6: psiRNA4 组

2.4 流式细胞术检测的细胞凋亡率

空白对照组、转染空载体组、转染组细胞培养 48 h 后流式检测凋亡率分别为 (1.41 \pm 0.11) %, (1.56 \pm 0.17) % 和 (9.97 \pm 2.07) %, 空白对照组与转染空载体组差异无显著性 ($P > 0.05$), 但两组均与转染组差异有显著性 ($P < 0.05$) (图 3)。这表明 E2F1 基因沉默后引起细胞周期 G₁/S 期阻滞, 并可见的亚二倍体小凋亡峰 (图 4)。

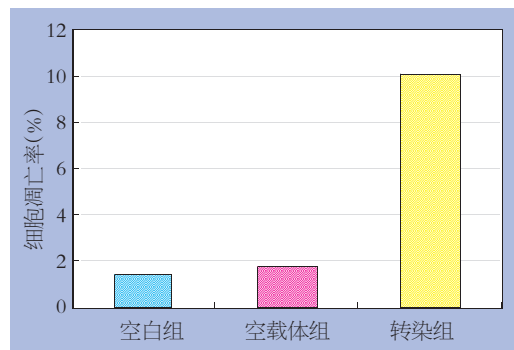


图 3 3 组细胞的凋亡率

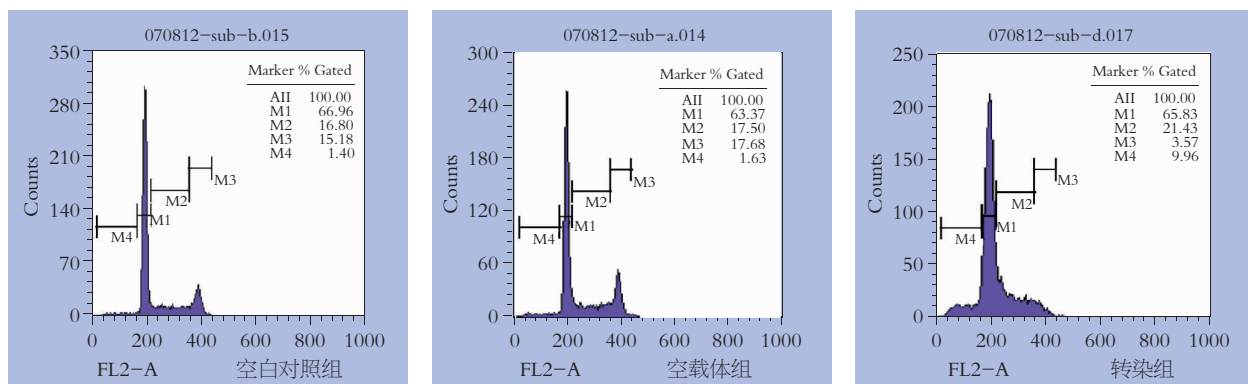


图4 转染后流式细胞术所测3组细胞的凋亡率

3 讨论

E2F蛋白最初是在研究细胞核提取物和腺病毒的E2启动子作用时发现的^[1]。它是一种与SP1等已知胞内转录因子不同的新转录因子,其家族由5种密切相关蛋白组成。人类肿瘤发生几乎都涉及到E2F1上游调节通路的改变,正常细胞中,E2F1蛋白与pRb结合呈pRb/E2F1复合体。而在肿瘤细胞中pRb缺失,游离状态的E2F1转录调节因子过表达,并且,在肿瘤细胞中极少发现E2F1基因的突变与等位基因的缺失,这也增加了E2F1转录因子在肿瘤细胞中的表达量^[3]。RNA干扰(RNA interference, RNAi)是近几年发展起来的一门新兴的在转录水平上的基因阻断技术,siRNA片段能够特异地沉默基因表达,不产生细胞毒作用^[4]。目前已有研究利用RNA干扰治疗人类宫颈癌细胞^[5]和肝癌、前列腺癌^[6]的报道。

胆管癌主要指源于肝外胆管的恶性肿瘤,预后不佳。胆管癌作为少见的消化道恶性肿瘤由于其特殊的解剖关系及生物学特征,虽发病率低,但手术难度大,切除率低,且传统放疗、化疗效果不佳,远期疗效极差^[7]。而胆管癌的发生、发展是一个多基因,多条信号转导通路之间相互作用的结果。因此研究胆管癌中基因、蛋白信号转导通路直接的关系对于研究胆管癌的发生机制和治疗显得尤为重要。

本研究构建了靶向细胞转录活化因子E2F1的siRNA真核表达载体,并在人胆管癌细胞系QBC939细胞中成功地表达了siRNA,RT-PCR结果表明(图2)该真核表达载体有效地抑制了

E2F1 mRNA的表达,其中psiRNA1组的效果最好。流式细胞仪检测QBC939细胞凋亡的结果(图3-4)显示,沉默E2F1后对胆管癌细胞生长有较大的影响,它明显地促进了细胞的凋亡,这说明该真核表达载体是正确有效的,它可以为后续研究利用E2F1的siRNA真核表达载体与化疗药联合作用于人胆管癌细胞打下实验基础,从而为联合应用化疗药物和基因治疗中晚期胆管癌提供实验依据和现实途径。

参考文献:

- [1] Kmiec EB, Razvi F, Worcel A. The role of DNA-mediated transfer of TFIIA in the concerted gyration and differential activation of the *Xenopus* 5S RNA genes [J]. *Cell JT-Cell*, 1986, 45(2): 209-218.
- [2] Putzer BM. E2F1 death pathways as targets for cancer therapy [J]. *J Cell Mol Med JT-Journal of cellular and molecular medicine*, 2007, 11(2): 239-251.
- [3] 张学文,孟子辉,赵吉生,等. E2F-1启动子调控下肿瘤靶向性作用的研究[J]. *中华外科杂志*, 2006, 44(23): 1636-1639.
- [4] 郭大东,高雪芹,韩金祥. RNA干扰的研究进展[J]. *山东医药*, 2006, 46(8): 74-75.
- [5] Uchida H, Tanaka T, Sasaki K, et al. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against survivin induced apoptosis and attenuated tumor cell growth in vitro and in vivo [J]. *Mol Ther*, 2004, 10(1): 162-171.
- [6] Mazor M, Kawano Y, Zhu H, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 represses androgen receptor activity and prostate cancer cell growth [J]. *Oncogene JT-Oncogene*, 2004, 23(47): 7882-7892.
- [7] 刘小方,周先亭,邹声泉. 八所医院胆管癌680例分析[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2004, 10(11): 773-775.