

文章编号:1005-6947(2006)10-0736-05

· 乳腺癌专题研究 ·

siRNA 真核表达载体的构建及其对 CXCR4 基因的沉默效应

何英, 唐利立

(中南大学湘雅医院 乳腺外科, 湖南 长沙 410008)

摘要:目的 构建趋化因子受体(CXCR4)特异性 siRNA (small interfere RNA)真核表达载体,体外观察对 CXCR4 基因的沉默作用。方法 采用基因克隆技术,将合成的特异性 CXCR4 RNA 干扰寡核苷酸序列插入真核表达载体 pSUPER,构建 CXCR4 siRNA 真核表达载体。以脂质体法将 pSUPER 空载体和 2 个(pSUPER/CXCR4-siRNA0 和 pSUPER/CXCR4-siRNA1)重组质粒分别导入具有高转移特性的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞系,检测各组乳腺癌细胞内 CXCR4 mRNA 及蛋白的表达情况。结果 成功构建 CXCR4 siRNA 真核表达载体。转染 CXCR4 RNA 干扰片段的乳腺癌细胞,72 h 后 CXCR4 mRNA 及蛋白表达下调,抑制作用明显。结论 构建的 RNA 干扰真核表达载体能明显下调 CXCR4 mRNA 及蛋白的表达,为应用于乳腺癌的治疗研究提供了一定的实验基础。

关键词:趋化因子受体 4; 干扰 RNA; 真核表达; 乳腺肿瘤, 实验性

中图分类号:R329.24; R737.9

文献标识码:A

Construction of eukaryotic expression vector of siRNA and its silence effects on CXCR4 gene

HE Ying, TANG Li-li

(Department of Breast Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To construct the small interfering RNA (siRNA) eukaryotic expression vector specific for human CXCR4 gene and to observe its silencing effects on CXCR4 gene. **Methods** The expression vectors of pSUPER/CXCR4-siRNA1 and the control group pSUPER/CXCR4-siRNA0 were constructed by gene recombination, and then were transfected by liposome mediated into the MDA-MB-231 breast cancer cells with high metastasis potential. The expression of CXCR4 mRNA and protein was detected. **Results** The eukaryotic expression vectors of pSUPER/CXCR4-siRNA1, which down-regulated mRNA and protein of CXCR4 at 72 h after transfection, were successfully constructed. The inhibitory effects of pSUPER/CXCR4 siRNA1 was obvious stastically. **Conclusions** Eukaryotic expression vector of siRNA specific for CXCR4 is successfully constructed and has inhibitory effects obviously, which can provide the experimental basis for its application in the treatment of breast cancer.

Key words: CXCR4; siRNA; Eukaryotic Expression Vector; Breast Neoplasms, Experimental

CLC number: R329.24; R737.9

Document code: A

趋化因子受体(CXCR4)是一种 G 蛋白偶联的七次跨膜受体,通过结合其专有配体趋化因子 SDF-1(stromal cell-derived factor 1,基质细胞衍生因子-1,

亦即 CXCL12)而发挥作用。胚胎早期几乎所有器官均表达 CXCR4,其对人体脑、脊髓、骨髓的生长发育有重要作用。新近研究^[1-3]表明,许多肿瘤细胞如白血病、肺癌、卵巢癌、乳腺癌等癌细胞均有 CXCR4 表达。目前认为,CXCR4 及其配体 SDF-1 可能成为肿瘤治疗的一个新靶点^[4]。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)已经成为研究基因功能的更为有效的方法,并且 RNAi 技术具有高效性和特异性,

收稿日期:2006-08-31; 修订日期:2006-09-05。

作者简介:何英,女,湖南常德人,中南大学湘雅医院博士研究生,主要从事乳腺癌的诊断及治疗方面的研究。

通讯作者:唐利立 E-mail:tlili77@medmail.com。

极有可能发展成为特异性治疗手段^[5]。笔者通过构建CXCR4基因特异性siRNA (small interfering RNA)真核表达载体,检测其对高转移性乳腺癌细胞系MDA-MB-231中CXCR4基因的沉默作用,企为进一步应用于乳腺癌的治疗研究提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞系(MDA-MB-231)由Dr Qing Chen博士惠赠,用含10%小牛血清的RPMI-1640 (Gibco BRL产品)培养基于37℃,5%CO₂,饱和湿度的二氧化碳培养箱常规培养。大肠杆菌JM109菌株由我校肿瘤研究所保存并提供。RT试剂盒、限制性DNA内切酶Bgl II, EcorR I, Hind III和T4 DNA连接酶为Fermentas/MBI公司产品;PCR试剂(Taq酶、dNTP等)为TaKaRa公司产品;脂质体Lipofectmine 2000和细胞总RNA提取试剂Trizol为Invitrogen产品;小量质粒提取试剂盒为BBI公司产品;胶回收试剂盒购自北京天为时代公司;抗人CXCR4 Ab购自Neomarker公司。CXCR4特异性PCR引物合成、CXCR4特异性siRNA单链寡核苷酸合成和DNA序列测定,由上海博亚公司完成。RNA干扰真核表达载体pSUPER由丁香园JXZ站友惠赠。其它化学试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 第一组为重组载体实验组(命名为MDA-MB-231/CXCR4-siRNA1):根据国外文献^[6]并依据siRNA表达载体pSUPER的要求合成针对CXCR4的干扰序列,即1对符合上述要求的64nt的单链寡核苷酸CXCR4-siRNA1:5'-GATCCCCTGGATTGGTCATCCTGGTCTTCAAGAGAGACCAGGATGACCAATCCATTTTGGAAA-3';5'-AGCTTTTCCAAAAATGGATTGGTCATCTGGTCTCTCTTGAAGACCAGGATGACCAATCCAGGG-3。

第二组为重组载体对照组(命名为MDA-MB-231/CXCR4-siRNA0):同样根据国外文献^[6]并依据pSUPER载体的酶切位点合成1对作为对照的仅含酶切位点的17nt的单链寡核苷酸CXCR4-siRNA0:5'-GATCCCCTTTTGGAAA-3和5'-AGCTTTTCCAAAAAGGG-3。第三组为空载体对照组(命名为MDA-MB-231/pSUPER);第四组为亲本细胞对照组(MDA-MB-231)。

1.2.2 CXCR4-siRNA表达载体的构建 根据干扰

片段设计时所添加的酶切位点,分别用Bgl II和Hind III双酶切pSUPER载体质粒,用0.8%琼脂糖凝胶电泳检测并用DNA回收试剂盒回收pSUPER(3176bp)的载体片段。将每组2条单链寡核苷酸取等量于退火缓冲液(0.1M NaCl, 10mM tris pH 7.4)中95℃水浴5min,然后自然冷却至室温。以插入片段和载体片段20~40:1的摩尔比,将退火后的双链siRNA模板与已经酶切的载体于16℃中连接过夜。以连接产物转化E. coli JM109感受态细胞,在氨苄青霉素抗性平板上筛选重组载体。扩增白色的抗性菌落并提取质粒,酶切鉴定。收集酶切鉴定正确的重组质粒,进行DNA序列测定。

1.2.3 转染用质粒DNA的制备、纯化及定量 以质粒提取试剂盒,分别提取pSUPER空载体和CXCR4-siRNA重组质粒。所提取质粒经分光光度计和电泳检测,紫外光吸收值比值A_{260nm}/A_{280nm}>1.8且无降解的DNA用于转染。

1.2.4 CXCR4-siRNA重组质粒的细胞转染 采用Invitrogen公司Lipofectamine-2000转染细胞,按其说明书方法进行。将细胞接种于6孔板,待细胞生长融合达90%~95%后进行瞬时转染。每孔分别加入4μL脂质体和对应质粒2μg。瞬时转染后72h收获细胞检测CXCR4的表达水平。

1.2.5 RT-PCR法检测CXCR4 mRNA的表达 选择GenBank中人CXCR4基因CDS区的基因序列作为分析序列。采用Primer 5.0引物设计软件设计引物。CXCR4特异性PCR引物为上游引物(F):5'-ACG TCA GTG AGG CAG ATG-3';下游引物(R):5'-GAT GAC TGT GGT CTT GAG-3'。产物大小为202bp。内参照GAPDH特异性PCR引物为上游引物(F):5'-TCC ATG ACA ACT TTG GTA TCG-3';下游引物(R):5'-GTC GCT GTT GAA GTC AGA GGA-3'(376bp)。以细胞总RNA提取试剂提取细胞的总RNA,用紫外分光光度计和电泳检测其含量和纯度。最后利用CXCR4基因的特异性引物,进行RT-PCR检测(两步法)。RT-PCR先按照AMV逆转录试剂盒操作步骤进行逆转录:取抽提的各细胞总RNA 1mg与7.5mL去RAN酶水混匀,70℃变性10min,冰上置5min,再加入10×逆转录缓冲液2mL,25mmol/L MgCl₂ 4mL,10mmol/L dNTP混合物2mL,RNA酶抑制剂20U,Oligo(dT) 15 1mL(0.5mg/mL),AMV逆转录酶15U,总体积为20mL,

42℃反应60min,95℃灭活5min,冰上骤冷。再取RT产物3mL,加入10'PCR缓冲液(含 Mg^{2+})3mL、10mmol/L dNTP混合物3mL、CXCR4基因引物各1mL(20pmol)、内参照引物各1mL(20pmol)、Taq酶1mL,加入无菌双蒸水补足至30mL反应体系。在PCR仪(eppendorf公司产品)中扩增,条件为:94℃预变性5min,随后按以下条件进行PCR:95℃变性20s,64℃退火30s(内参为60℃),72℃延伸30s,共40个循环。最后72℃延伸10min。用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.2.6 Western blotting法检测CXCR4蛋白的表达

细胞在RPMI1640培养液中常规培养。(1)提取细胞总蛋白,BredFord法测定蛋白浓度。(2)取蛋白样品30 μ g进行SDS-PAGE电泳,转膜、封闭、加入CXCR4兔抗人单克隆抗体(1:500)孵育。(3)洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的二抗,孵育,充分洗涤后与ECL化学发光试剂反应,在底片上曝光,洗片保存。

1.3 统计学处理

采用SPSS10.0统计软件进行数据处理,差异的显著性用 t 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 CXCR4-siRNA片段的鉴定

合成的CXCR4-siRNA寡核苷酸片段退火后得到CXCR4-siRNA1实验组的64bpDNA片段,而CXCR4-siRNA0对照组为17bpDNA片段,提示退火成功。每对寡核苷酸两端分别带有Bgl II和Hind III酶切位点。实验组正向单链寡核苷酸内,19nt的寡核苷酸以正反向组合,中间以TTCAAGAGAG间隔,使寡核苷酸内部形成发夹结构,且双链寡核苷酸的核心序列反向互补。而对照组仅有酶切位点,没有能形成siRNA结构的核心序列。

2.2 pSUPER/CXCR4-siRNA重组质粒的构建及鉴定

将CXCR4-siRNA片段和对照片段连入含有H1启动子的载体pSUPER,分别随机挑选10个克隆,实验组进行Hind III和EcoRI双酶切鉴定。2号克隆和7号克隆重组载体释放出约281bp片段,命名为pSUPER/CXCR4-siRNA1;而对照组利用pSUPER插入失活的特性以BglII单酶切鉴定,即连接反应成功则BglII单酶切不能切割,3号重组载体不发生酶切

反应,命名为pSUPER/CXCR4-siRNA0,酶切鉴定结果见图1。测序结果显示,合成的寡核苷酸片段已正确连入pSUPER载体,载体构建成功。

M: DNA2000 Ladder; 1~3: pSUPER/CXCR4-siRNA1(质粒; Hind III单酶切; Hind III和EcoRI双酶切); 4~6: pSUPER/CXCR4-siRNA0(质粒; Hind III单酶切; BglII单酶切)

图1 重组pSUPER/CXCR4-siRNA真核表达载体的酶切鉴定

2.3 CXCR4-siRNA转染细胞的RT-PCR鉴定

将构建好的CXCR4 RNA干扰真核表达载体pSUPER/CXCR4-siRNA1和对照组pSUPER/CXCR4-siRNA0以脂质体法分别转入MDA-MB-231高转移性乳腺癌细胞(分别命名为MDA-MB-231/CXCR4-siRNA1和MDA-MB-231/CXCR4-siRNA0)。收集转染72h的细胞,提取总RNA。以GAPDH为内对照,琼脂糖凝胶电泳结果显示(图2),通过RT-PCR方法检测CXCR4 mRNA的表达水平,MDA-MB-231亲本细胞高表达CXCR4 mRNA(1.21 ± 0.20),转染空载体和不含RNA干扰核心序列的对照载体的MDA-MB-231细胞与亲本细胞比较CXCR4 mRNA表达量(分别为 1.18 ± 0.12 和 1.23 ± 0.15)无明显差异;而转染含RNA干扰核心序列载体的实验组MDA-MB-231细胞CXCR4 mRNA表达量(0.67 ± 0.11)较亲本细胞明显下降,有统计学差异($P < 0.05$),说明其抑制CXCR4 mRNA表达的作用明显。

2.4 CXCR4-siRNA转染细胞的Western blotting鉴定

Western blotting方法检测MDA-MB-231、MDA-MB-231/CXCR4-siRNA1和MDA-MB-231/CXCR4-siRNA0各组CXCR4蛋白表达水平。结果显示MDA-MB-231亲本细胞、转染空载体和对照载体的MDA-MB-231细胞均高表达CXCR4蛋白(分别为 0.91 ± 0.14 , 0.79 ± 0.17 和 0.83 ± 0.09),各組间无显著差异;而转染实验组载体的MDA-MB-231细胞CXCR4蛋白表达量(0.29 ± 0.07)较亲本细胞明显下降,结果有统计学差异($P < 0.05$),抑制CXCR4蛋白表达的作用明显。

M: DNA2000 Ladder; 1: MDA-MB-231; 2: MDA-MB-231 / pSUPER; 3: MDA-MB-231 / CXCR4-siRNA0; 4: MDA-MB-231 / CXCR4-siRNA1

图2 CXCR4表达的RT-PCR鉴定

图3 CXCR4表达的Western blotting鉴定

3 讨论

自Kuratsu与Yoshimura 1989年首次成功地从人恶性胶质瘤细胞株中分离提纯MCP-1(monocyte Chemoattractant protein-1),并克隆鉴定了MCP-1 cDNA之后,趋化因子家族与肿瘤的关系逐渐成为肿瘤生物学的热点领域,尤其是趋化因子受体CXCR4及其配体SDF-1相互作用构成的反应轴引人注目^[7-9]。SDF-1属于CXC趋化因子之一,包括SDF-1 α 和SDF-1 β 。SDF-1与CXCR4的结合是一一对应关系。CXCR4基因定位于人染色体2q21,编码产物为一种G蛋白偶联的七次跨膜受体,2001年Muller等首先报告。人乳腺癌细胞系高表达趋化因子受体CXCR4,乳腺癌原发灶及转移灶也高表达CXCR4;而在乳腺癌的最常见转移部位,如淋巴结、肺、肝脏和骨髓则高水平表达其配体SDF-1^[10]。Li等^[6]证实CXCR4是HER2介导的乳腺癌转移中的关键分子。随后Helbig等^[11]在体内实验亦证明CXCR4可诱导并促进乳腺癌细胞增殖,而CXCR4抑制剂可提高原发及转移性乳腺癌患者的治疗效果。国内亦有作者尝试使用CXCR4拮抗剂抗乳腺癌转移^[12]。虽然SDF-1/CXCR4促进乳腺癌转移的确切机制尚未完全明确,但现有资料已充分表明,SDF-1/CXCR4相互作用构成的反应轴可作为乳腺癌治疗中新的靶点。封闭CXCR4在肿瘤细胞的表达或阻止SDF-1在基质微环境中的分泌,均可作为治疗靶标。采用相应的抗体或抑制剂均为有效的治疗方法。

动物实验表明尾静脉注射MDA-MB-231细胞可出现肺转移^[13]。而采用MDA-MB-231细胞左心室注射法建立乳腺癌骨转移模型目前使用较广泛^[14]。既往研究^[10]结果显示,高转移特性乳腺癌细胞MDA-MB-231中CXCR4表达上调,与本研究结果一致。本研究成功构建了针对人CXCR4分子的特异性RNA干扰真核表达载体,转染MDA-MB-231乳腺癌细胞72h后其CXCR4 mRNA及蛋白表达均下调,抑制效果明显;而转染空白载体组及转染不含RNA干扰核心序列的对照载体的MDA-MB-231乳腺癌细胞则没有表现出这种变化,说明只有存在RNA干扰核心序列,在细胞内形成发夹状RNA结构后才能发挥RNA干扰的抑制作用。构建RNA干扰真核表达载体能够成功发挥对CXCR4分子沉默效应,为进一步研究CXCR4分子的功能以及应用于乳腺癌的治疗研究提供了一定的实验基础。

参考文献:

- [1] Bertolini F, Dell'Agnola C, Mancuso P, *et al.* CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(11): 3106-3112.
- [2] Kijima T, Maulik G, Ma PC, *et al.* Regulation of cellular proliferation, cytoskeletal function, and signal transduction through CXCR4 and c-Kit in small cell lung cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(21): 6304-6311.
- [3] Shibuta K, Mori M, Shimoda K, *et al.* Regional expression of CXCL12/CXCR4 in liver and hepatocellular carcinoma and cell-cycle variation during *in vitro* differentiation [J]. *Jpn J Cancer Res*, 2002, 93(7): 789-797.

MDA-MB-231乳腺癌细胞系具有高转移特性,

- [4] Hall JM , Korach KS . Stromal cell - derived factor 1 , a novel target of estrogen receptor action , mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells [J] . *Mol Endocrinol* , 2003 , 17 (5) : 792 - 803 .
- [5] Hannon GJ . RNA interference [J] . *Nature* , 2002 , 418 (6894) : 244 - 251 .
- [6] Li YM , Pan Y , Wei YK , *et al* . Upregulation of CXCR4 is essential for HER2 - mediated tumor metastasis [J] . *Cancer cell* , 2004 , 6 (5) : 459 - 469 .
- [7] Lihura J , Drukala J , Majka M , *et al* . CXCR4 - SDF - 1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion , chemotaxis , and adhesion [J] . *Blood* , 2002 , 100 (7) : 2597 - 2606 .
- [8] Payne AS , Cornelius LA . The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis [J] . *J Invest Dermatol* , 2002 , 118 (6) : 915 - 922 .
- [9] Schrader AJ , Lechner O , Templin M , *et al* . CXCR4 / CXCL12 expression and signalling in kidney cancer [J] . *Br J Cancer* , 2002 , 86 (8) : 1250 - 1256 .
- [10] Muller A , Homey B , Soto H , *et al* . Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis [J] . *Nature* , 2001 , 410 (6824) : 50 - 56 .
- [11] Helbig G , Christopherson KW 2nd , Bhat - Nakshatri P , *et al* . NF - kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4 [J] . *J Biol Chem* , 2003 , 278 (24) : 21631 - 21638 .
- [12] Liu FJ , Sun HX . Inhibitory effect of viral macrophage inflammatory protein - II on metastasis of breast cancer cell line MCF - 7 through antagonising CXCR4 [J] . *Ai Zheng* , 2004 , 23 (11) : 1283 - 1287 .
- [13] Richert MM , Phadke PA , Matters G , *et al* . Metastasis of hormone - independent breast cancer to lung and bone is decreased by 2 - difluoromethylornithine treatment [J] . *Breast Cancer Research* , 2005 , 7 (5) : 819 - 827 .
- [14] Moromy S , Capparell C , Sarosi I , *et al* . Osteoprotegerin inhibits osteolysis and decreases skeletal tumor burden in syngeneic and nude mouse models of experimental bone metastasis [J] . *Cancer Research* , 2001 , 61 (11) : 4432 - 4436 .

2007 年《实用骨科杂志》征订启事

《实用骨科杂志》由山西医科大学第二医院承办，月刊，每月 25 日出版。本刊设有论著、实验研究、临床经验、短篇、骨科手术技术、个案、基层园地、护理、骨科史萃等栏目，宗旨是以实用和普及为主，兼顾提高。本刊大 16 开版，64 页，铜版纸印刷，每册 8.00 元，全年 12 册，共 96.00 元。现已被中文科技期刊数据库、中国核心期刊(遴选)数据库、中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊全文数据库、中文生物医学期刊文献数据库 - CMCC 等国内大型数据库收录。全国各地邮局(所)均可订阅，欢迎向编辑部直接邮购，通过编辑部直接邮购者可享受优惠价。2007 年向本刊投稿时附上当年订阅本刊发票复印件，可免交一次审稿费。

中国标准连续出版物号：ISSN 1008 - 5572 / CN 14 - 1223 / R，国内邮发代号：22 - 174，国外代号：BM 1499，邮编：030001

汇款地址：山西省太原市五一路 382 号山西医科大学第二医院内《实用骨科杂志》编辑部

E - mail : sygkzz@163.com , 电话 : (0351) 3072133 ; 3365705 , 传真 : (0351) 3072133

http : //SGKZ.Chinajournal.net.cn , www.sxwxc.cn , www.sydey.com。

实用骨科杂志编辑部