

文章编号:1005-6947(2008)02-0148-05

· 基础研究 ·

体外构建的小片段发夹 RNA 对肿瘤细胞端粒酶基因表达的干扰

张琴, 巢时斌, 付文金, 罗建新, 李登清, 彭剑雄

(中南大学湘雅医学院 检验医学系, 湖南 长沙 410013)

摘要:目的 探讨针对端粒酶 hTERT 基因的小片段发夹 RNA 对人肿瘤细胞 (HeLa) 端粒酶基因的干扰及对肿瘤端粒酶的抑制作用。方法 体外合成制备 shRNA, 并用磷酸钙转染法转染 HeLa 细胞, 分别用 TRAP-银染法和 PCR-EIA 法检测端粒酶活性。结果 将制备的 46 个碱基的小片段发夹 RNA 转染 HeLa 细胞后端粒酶活性明显下降。结论 shRNA 对肿瘤端粒酶 hTERT 基因表达有明显的干扰作用, 可望为临床开展对其他肿瘤端粒酶基因干扰抑制的实验研究奠定基础。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(2):148-152]

关键词: RNA 干扰; 端粒酶; HeLa 细胞; 转染; 基因表达

中图分类号: R 73-3

文献标识码: A

Silencing telomerase gene expression in HeLa by small hairpin RNA in vitro

ZHANG Qin, CHAO Shibin, FU Wenjin, LUO Jianxin, LI Dengqing, PENG Jianxiong

(Faculty of Laboratory Medicine, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: Objective To investigate the interfering effect of the small hairpin RNA (shRNA) targeted to human telomere retrotranscriptase (hTERT) gene and its silence effect on telomerase hTERT gene expression in HeLa cells. **Methods** After preparation of the shRNA in-vitro, the shRNA was transfected to HeLa cells by the calcium phosphate method. Telomerase activity was detected by TRAP-silver stain and PCR-EIA. **Results** The telomerase activity of HeLa cells decreased significantly after transfected with the 46-base small hairpin RNA. **Conclusions** shRNA (targeted to human telomerase hTERT gene) prepared by this method displays a significant silence effect on telomerase gene expression. It could be a new approach of obtaining shRNA for RNAi research in tumor inhibition.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(2):148-152]

Key words: RNA Interference; Telomerase; HeLa Cells; Transfection; Gene Expression

CLC number: R 73-3

Document code: A

RNA 干扰现已逐渐成为一种新的基因功能研究和疾病治疗的简便而有效的工具^[1]。用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 靶向抑制人类端粒酶活性已成为肿瘤治疗的新策略。目前常

用于构建小干扰 RNA (siRNA) 的方法主要为化学合成;用 T7 RNA 聚合酶体外合成法或通过构建载体在细胞内表达的方式来生成所需的干扰 RNA 片段。化学合成法成本较高,而构建表达载体则操作烦琐。经典的 T7 RNA 聚合酶体外合成 siRNA 的方法由于其简便而受到人们的青睐^[2-3]。建立一种简捷的短链 RNA 制备方法将有利于 RNA 干扰研究的广泛开展。Donze 等^[4]应用 T7 RNA 聚合酶体外合成的方法制备 siRNA,成功地诱导出 RNA 干扰现象。本研究用该法合成一种针对人端

基金项目:湖南省科委课题资助项目(98SSY1003)。

收稿日期:2007-10-15; **修订日期:**2007-11-20。

作者简介:张琴,女,中南大学湘雅医学院硕士研究生,主要从事生物化学与分子生物学诊断方面的研究。

通讯作者:彭剑雄 E-mail:jxpeng@xysm.net

粒逆转录酶 (human telomere retrotranscriptase , hTERT) 基因的 shRNA , 并探讨该 shRNA 对人肿瘤细胞 (HeLa) 端粒酶基因表达产生的沉默作用。以期为临床开展其他肿瘤端粒酶基因干扰抑制的实验研究奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 细胞 人宫颈癌细胞 HeLa 由本校细胞中心提供

1.1.2 主要试剂 (1) siRNA 合成材料: T7RNA 聚合酶 (Fermentas life sciences , 美国) , DNase I (RNase free) (Worthington Biochemical Corp. 美国) , RNase inhibitor (BBI , 美国) , DEPC (上海生工生物工程有限公司) 以及 NTP (ATP GTP CTP UTP) (Amresco , 美国) 。 (2) TRAP - 银染法材料: 10mmol/L dNTP (上海生工生物工程有限公司) , Taq DNA 聚合酶 (上海生工生物工程有限公司) , 引物 TS 为 5' AAT CCG TCG AGC AGA GTT 3' ; CX 为 5' CCC TTA CCC TTA CCC TTA CCC TTA 3' 。 以

上引物均由上海生工生物工程有限公司合成。所有引物用双蒸馏水 (DDW) 溶解为 10 mmol/L 。 端粒酶检测试剂盒 (宝灵曼公司 , 德国) , 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺 (BBI , 美国) 。

1.2 实验方法

1.2.1 shRNA 的 DNA 模板 模板设计根据 hTERT 基因 1 631 ~ 1 649 位的碱基序列。 (1) 特异性 shRNA 的 DNA 模板结构: 上链为 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG TTG GCT GTG TTC CGG TTC GCC 3' ; 下链为 5' AAA AGG GGT TGG CTG TGT TCC GGC GAA CCG GAA CAC AGC CAA CCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA 3' 。 (2) 非特异性 shRNA 的 DNA 模板结构: 上链为 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG TTG GTT GTG TTC CGG TTC GCC 3' ; 下链为 5' AAA AGG GGT TGG TTG TGT TCC GGC GAA CCG GAA CAC AAC CAA CCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA 3' (下划线的碱基是两者的不同之处) 。 以上引物由上海生工生物工程有限公司合成。

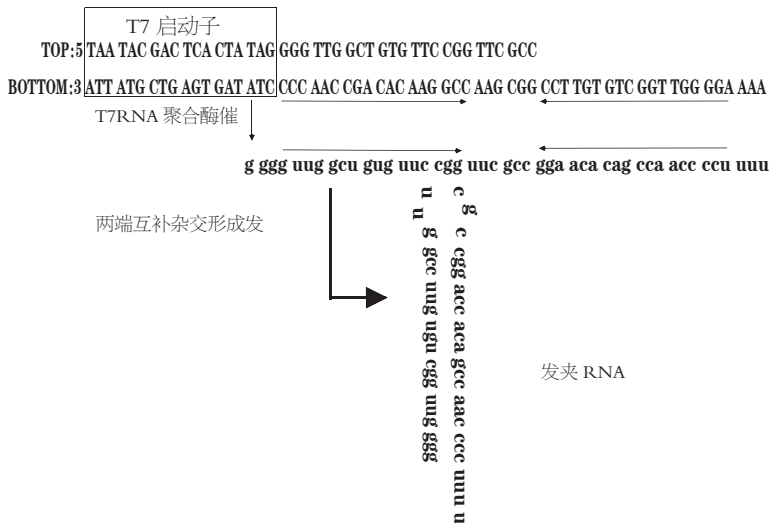


图1 shRNA 模板的构建表达示意图 (以特异链为例)

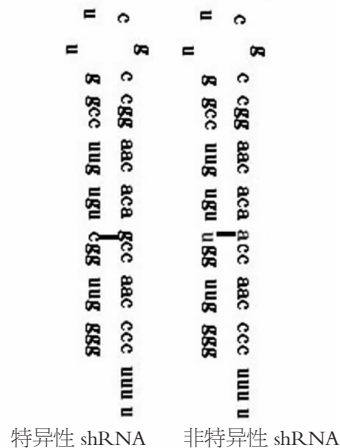


图2 特异性 shRNA 与非特异性 shRNA 的结构图比较 中间打一横杠处为两者的序列区别, 仅为其中的一个碱基对

1.2.2 shRNA 的制备 分别将特异序列和非特异序列合成所需的 2 条 DNA 模板链 (PAGE 纯化) 用双蒸馏水溶解为 10 μmol/L 。 取相同体积的上链和下链混匀。 95 °C 变性 5 min 后自然冷却退火, 两条链即形成了部分双链的 DNA 模板。 按如下程序建立 20 μL 反应体系合成 shRNA : 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水 5.5 μL , DNA 模板 (10 μmol/L) 6 μL , PEG8 000 (60 mg/mL) 1 μL ,

5 × 缓冲液 4 μL , RNase 抑制物 0.5 μL , NTP (50 mmol/L) 1 μL , T7RNA 聚合酶 (20 U/μL) 2 μL 。 混匀后 37 °C 水浴反应 4 h 。 加入 DNase I (5 U/μL) 0.5 μL 37 °C 水浴 15 分钟以消化 DNA 模板终止反应。 取出反应管, 每管加入 3 mol/L 的乙酸钠 3 μL ; 混匀后加入 3 倍体积的无水乙醇, 12 000 r/min 离心 10 min 。 去上清液, 沉淀用 70 % 乙醇清洗 1 次, 12 000 r/min 离心 5 min ; 去

上清液,倒置干燥;沉淀用 20 μL 10 mmol/L Tris-Cl (pH 7.6) EDTA (0.08 mmol/L) 溶液溶解;于 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min 后自然冷却退火。

1.2.3 shRNA 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 鉴定 变性聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 中含有饱和浓度的尿素,在高压电泳 (600V) 过程中产热使 RNA 链变性保持单链状态。不同浓度的 PAG 有不同的分辨率。46 nt 的 shRNA 进行 14% 变性 PAGE 电泳。以银染定性判断电泳结果^[5],用紫外分光光度计定量。RNA 产量按 20 $\mu\text{g}/\text{OD}$ 计算。

1.2.4 细胞培养、转染 用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养 HeLa 细胞,用胰蛋白酶消化洗脱,离心对数生长期细胞,细胞用 Hank's 液漂洗 2 次。按 10^5 细胞/孔加入 6 孔板中继续于 5% CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养。在其长到培养板面积的 60% ~ 70% 时进行转染。转染方法采用磷酸钙共沉淀法。

1.2.5 端粒酶活性检测

1.2.5.1 细胞裂解液制备 按 Kim 法^[6] 制备:用胰蛋白酶消化 HeLa 细胞,用冰冷的 0.1 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 2 次后,按 1 $\mu\text{L}/3\ 000$ 个细胞加入预冷的裂解液;吹打细胞悬液,冰浴 30 min 后,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 30 min,取上清液。酚试剂法测定蛋白浓度,用 1 \times TRAP 缓冲液稀释裂解液蛋白浓度至 0.3 g/L。

1.2.5.2 端粒重复扩增法 (telomeric repeat amplification protocol, TRAP) - 银染法 反应体系为 30 μL , 包含 10 \times TRAP 缓冲液, 3 μL , dNTPs (0.5 mmol/L), 3 μL , TS (10 mmol/L), 1.5 μL , MgCl_2 (15 mmol/L), 3 μL , 标本裂解液 (空白以 DDW 代替), 4 μL , DDW 13.6 μL , 其上覆盖石蜡油 25 μL ; 12 000 r/min 离心 5 s, 25 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min。Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μL), 0.4 μL ; CX (10 mmol/L) 1.5 μL ; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 进行 33 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 后保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.5.3 多聚酶链反应 - 酶免疫测定法 (PCR-EIA) 检测定量端粒酶活性 按试剂说明书进行。

2 结果

2.1 合成 shRNA 的 PAGE 鉴定

T7RNA 聚合酶体外合成的 shRNA 进行变性 PAGE, 可见一明显的区带, 大小约 46 bp, 同时可见有流产型 RNA (图 3)。

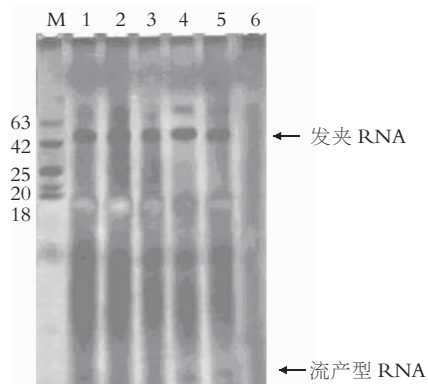


图 3 shRNA 产物 14% 变性 PAGE 银染结果
1 ~ 5: 不同反应条件的 shRNA 产物图; 6: 反应条件 1 的 RNA 产物用 RNaseA 处理 30 min;
M: Marker

2.2 合成 shRNA 的紫外分光光度法测定结果

T7RNA 聚合酶 5 次体外合成的 shRNA 紫外分光光度法测定结果显示 5 次合成的 shRNA OD_{260/280} 介于 1.8 ~ 2.0 之间, 提示纯度较好。且 5 次体外合成 shRNA 产量平均值为 7.14 μg , 产量较高 (表 1)。

表 1 合成的 shRNA 紫外分光光度法测定结果

	1	2	3	4	5
OD _{260/280}	1.862	1.941	1.797	1.764	1.951
OD ₂₆₀	0.351	0.325	0.360	0.361	0.394
RNA 产量 μg	7.02	6.50	7.20	7.12	7.88

2.3 shRNA 的特异性对 HeLa 细胞端粒酶活性的影响

分别转染 200 ng 的特异性 shRNA 和非特异性 shRNA 于 HeLa 细胞后, 用 TRAP-银染法和 PCR-EIA 法检测相应端粒酶活性, 均可观察到只有特异性的 shRNA 引起明显端粒酶活性抑制, 而非特异性 shRNA 则否 (图 4-5)。

2.4 shRNA 的剂量与干扰效应的关系

分别转染 10, 20, 50, 100, 200, 400 ng shRNA 48 h 后显示 10 ng 和 20 ng shRNA 对端粒酶活性抑制不显著, 而 50, 100, 200, 400 ng shRNA 均可明显抑制端粒酶活性 (图 6-7)。

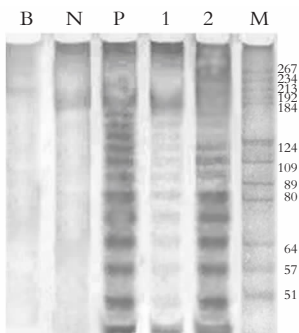


图4 shRNA 的特异性对 HeLa 细胞端粒酶活性的作用
 B:以 DDW 进行 PCR 端粒酶空白对照; N:用 RNaseA 处理 30 min HeLa 细胞裂解液的端粒酶阴性对照;P:无 shRNA 转染的阳性对照; 1:转染特异性 shRNA 后 48h; 2:转染200 ng非特异性 shRNA 后 48 h 的 HeLa 细胞端粒酶活性; M:PBR322DNA/Hae III marker

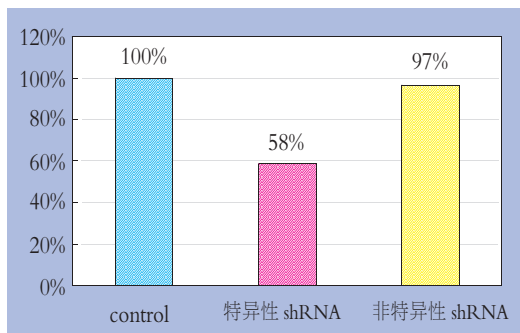


图5 shRNA 的特异性对 HeLa 细胞端粒酶活性的影响
 以阳性对照端粒酶活性的 TRAP-EIA 法测定的吸光度 A 值为 100%, 转染特异性 shRNA 和非特异性 shRNA 各 200 ng 后 48 h 端粒酶活性的吸光度及其百分比

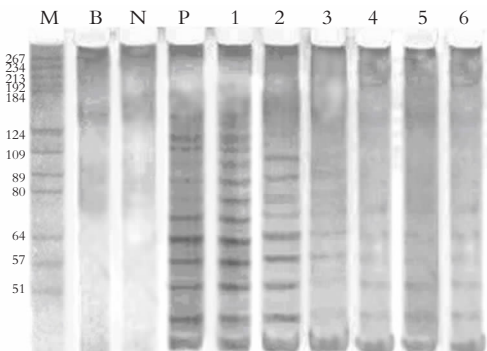


图6 shRNA 的剂量与干扰效应的关系
 B :以 DDW 进行 PCR 端粒酶空白对照; N:用 RNaseA 处理 30 min HeLa 细胞裂解液的端粒酶阴性对照; P:无 shRNA 转染的阳性对照; 1 ~ 6:转染 10 ng, 20 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng 及 400 ng shRNA 48 h 后 TRAP - 银染法检测 HeLa 细胞端粒酶活性的 PAGE 电泳图

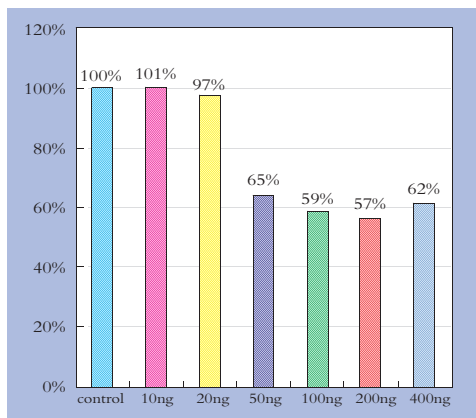


图7 不同剂量的 shRNA 对端粒酶活性的抑制效率
 以阳性对照的端粒酶活性的 TRAP-EIA 法测定的吸光度 A 值为 100%, 转染不同 shRNA 量后端粒酶活性的吸光度与其比较的百分比

3 讨论

研究表明端粒酶与肿瘤的关系密切;端粒酶在 95% 的人类肿瘤细胞系及 85% ~ 95% 的恶性肿瘤组织呈阳性,其中包括大部分常见的普通外科肿瘤如肝癌、胃癌、结直肠癌、胰腺癌、前列腺癌等^[6]。而正常体细胞端粒酶一般为阴性。因此端粒酶在肿瘤的诊断和辅助治疗中具有潜在的应用价值^[7], hTERT 是端粒酶活性的主要限速因子,其表达主要限于肿瘤细胞,已成为肿瘤治疗的一个新的理想靶点^[8]。靶向 hTERT 的药物如核苷类似物、非核苷类催化抑制剂以及靶向 hTERT mRNA 的反义核苷酸和纺锤状核酶均在各自研究中显示出对肿瘤端粒酶活性的抑制^[9],表明靶向

hTERT 基因表达的策略系一有潜力的肿瘤治疗新途径。

RNA 干扰是生物体在进化中获得的抵御外源核酸侵入基因组及调控基因表达的一种方式。其机制为不同类型的双链 RNA,如 dsRNA 或 miRNA 前体,在胞质内 RNase III 样酶 Dicer 的作用下,迅速加工成 21 至 28 个核苷酸的短双链 RNA,即 siRNA 或 miRNA 等。短双链 RNA 解链后其中一条单链与胞质内其他蛋白质形成效应复合物,如 RNA 诱导的沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC)、RNA 诱导的翻译沉默复合物 (RNA-induced transcriptional silencing, RITS) 及 miRNP 等。RISC 引导与其中单链序列完全互补的 mRNA 发生特异性降解;miRNP 可导致靶 mRNA

发生翻译抑制;而 RITS 复合物则可引起异染色质浓缩,从而可分别在转录水平、翻译水平和染色体水平调节基因表达,最终引起目的基因表达下调,是迄今为止发现的较简便且有效的基因沉默工具^[10]。目前采用 siRNA 阻断肿瘤的 hTERT 基因表达已在胃癌、肝癌和宫颈癌的部分细胞进行了初步尝试^[11-13],端粒酶活性明显降低并使肿瘤细胞增殖受到显著抑制。其实现 RNA 干扰所使用的载体为体外构建质粒或逆转录病毒表达载体的方法。新近研究显示细胞内 shRNA 较相应序列的 siRNA 具有更高的干扰效率^[14]。该 RNA 链除中间几个碱基序列之外其余的碱基序列均互补。因在自然状态下互补结合形成 U 字形,状似发夹故称为发夹状 RNA。目前国内外合成 shRNA 的方法主要基于构建表达载体使其模板 DNA 线性化,尔后用转染细胞并在转染细胞内表达的方法。用表达载体进行 RNAi 的一个问题是其载体的构建操作程序烦琐,且表达载体在细胞内的转录易受多种因素的影响。Milligan 等^[15]改进的部分双链 DNA 模板, T7RNA 聚合酶体外合成的方法为体外制备 RNA 提供了一便捷的方法。该方法的特点在于 DNA 模板为部分双链:上链为仅仅 17 个 T7 启动子碱基,下链为 17 个 T7 启动子碱基加上目的 RNA 的 DNA 模板。利用 T7RNA 聚合酶特异性的识别,结合 T7 启动子后即可沿着下链的 DNA 模板前移转录生成 RNA 链。Donze 等^[4]应用这种方法合成两条互补的 21 nt 的 RNA 链变性退火形成 siRNA。笔者用该法合成的 shRNA 经 PAGE 鉴定及 RNA 酶消化实验证实为期望的 46 bp 的小片段发夹 RNA。将上述合成的 shRNA 转染 HeLa 细胞后,用银染及 EIA 检测显示端粒酶活性明显下降。表明体外制备的 shRNA 对 HeLa 细胞的端粒酶基因表达产生了沉默作用。

本研究用 shRNA 的设计系依据冷泉港实验室的干扰 RNA 软件设计^[16],选用端粒酶 hTERT 基因 1 631 ~ 1 649 的一段序列为制备 shRNA 的模板。非特异性 shRNA 与特异性 shRNA 差异仅是其中的一个碱基对(图 2)。结果显示只有特异性的 shRNA 对 hTERT 基因有沉默作用。

文献报告 RNA 干扰在线虫体内仅需几个分子的 dsRNA 即可启动 RNA 干扰,在哺乳动物实验中,多数实验采用 RNA 剂量为 150 ~ 250 ng^[4,16]。笔者分别以 10 ~ 400 ng 的 shRNA 转染 HeLa 细胞,在 48 h 后收集细胞测定端粒酶活性。显示 10 ~ 20 ng 的 shRNA 不能启动 RNA 干扰,50 ng 以上时, RNA 干扰作用明显,端粒酶活性降低。但在 100 ~ 200 ng 时已达到最大的抑制效率。说明

RNA 干扰和转染的 shRNA 量并不呈剂量依赖性。

综上所述:本研究体外构建的 shRNA 对端粒酶 hTERT 基因的表达进行沉默干扰, HeLa 细胞的端粒酶活性明显抑制;表明该 shRNA 对肿瘤细胞的端粒酶基因表达产生了有效的沉默作用,为端粒酶阳性肿瘤的实验性治疗研究提供了新的途径。

参考文献:

- [1] Horn T, Arziman Z, Berger J, *et al.* GenomeRNAi: a database for cell-based RNAi phenotypes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35 (Database issue): D492 - D497.
- [2] Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, *et al.* RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals [J]. *Cell*, 2000, 101 (1): 25 - 33.
- [3] Bernard MP, Norbert P. Do-it-yourself RNAi made easy [J]. *Nature Methods*, 2007, 4 (4): 308 - 309.
- [4] Donze O, Picard D. RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30 (10): e46.
- [5] Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [J]. *Anal Biochem*, 1991, 196 (1): 80 - 83.
- [6] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer [J]. *Science*, 1994, 266 (5193): 2011 - 2015.
- [7] 陈波, 邹声泉. 端粒酶在肿瘤诊断与辅助治疗中的潜在应用价值 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14 (10): 780 - 782.
- [8] 李宁. hTERT 基因与端粒酶活性调节 [J]. *中国普通外科杂志*, 2001, 10 (5): 455 - 457.
- [9] Zimmermann S, Martens UM. Telomeres and telomerase as targets for cancer therapy [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64 (7 - 8): 906 - 921.
- [10] Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA [J]. *Nature*, 2004, 431 (7006): 343 - 349.
- [11] 蒋明东, 彭志平, 尹晓玲, 等. RNA 干扰靶向抑制胃癌细胞株 SGC7901 hTERT 基因表达 [J]. *中国癌症杂志*, 2006, 10 (16): 805 - 808.
- [12] 周唏, 张鹏辉. SiRNA 稳定抑制肝癌细胞 hTERT 基因的表达 [J]. *第四军医大学学报*, 2005, 26 (24): 2233 - 2236.
- [13] Nakamura M, Masutomi K, Kyo S. Efficient inhibition of human telomerase reverse transcriptase expression by RNA interference sensitizes cancer cells to ionizing radiation and chemotherapy [J]. *Hum Gene Ther*, 2005, 16 (7): 859 - 868.
- [14] Hayafune M, Miyano-Kurosaki N, Park W S, *et al.* Silencing of HIV-1 gene expression by two types of siRNA expression systems [J]. *Antivir Chem Chemother*, 2006, 17 (5): 241 - 249.
- [15] Milligan JF, Groebe DR, Witherell GW, *et al.* Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res* [J]. 1987, 15 (21): 8783 - 8798.
- [16] Karagiannis TC, El-Osta A. RNA interference and potential therapeutic applications of short interfering RNAs [J]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12 (10): 787 - 795.