

构建survivin shRNA重组载体及靶向下调PC3细胞survivin mRNA的表达***☆◆

徐建华¹, 陈丹娜¹, 何敏¹, 黄宪章¹, 庄俊华¹, 黎美贤¹, 金小宝², 卢雪梅², 朱家勇²

Construction of survivin shRNA recombinant expression vector and downregulation of survivin mRNA expression in PC3 cells

Xu Jian-hua¹, Chen Dan-na¹, He Min¹, Huang Xian-zhang¹, Zhuang Jun-hua¹, Li Mei-xian¹, Jin Xiao-bao², Lu Xue-mei², Zhu Jia-yong²

¹Department of Clinical Laboratory, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China;
²Institute of Pharmaceutical Bioactive Substances of Guangdong University of Pharmacy, Guangdong Key Laboratory of Pharmaceutical Bioactive Substances, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

Xu Jian-hua☆, Studying for doctorate, Master's supervisor, Associate chief technician, Department of Clinical Laboratory, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China
jhxu1976@126.com

Correspondence to: Zhu Jia-yong, Professor, Doctoral supervisor, Institute of Pharmaceutical Bioactive Substances of Guangdong University of Pharmacy, Guangdong Key Laboratory of Pharmaceutical Bioactive Substances, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China
zhujy@gdpu.edu.cn

Abstract

BACKGROUND: survivin mRNA is specifically expressed in tumor and embryonic tissue and is closely related to differentiation, proliferation, infiltration and metastasis of tumor cells as well as multidrug resistance.

OBJECTIVE: To construct the expression vector of small hairpin RNA (shRNA) targeting human survivin gene and detect the effectiveness of gene silencing in PC3 cells (human prostate cancer cell line).

METHODS: Two single-stranded DNA oligonucleotides for shRNA expression targeted survivin gene were chemically synthesized. The top and bottom strand oligos were annealed to generate a double-stranded oligonucleotide (ds oligo). The oligo was cloned into pENTR/U6 expression vector (pENTR/U6-SUR), and then PCR and sequencing analyses were conducted to verify the constructs. After transfecting the verified plasmids into PC3 cells, RT-PCR was performed to determine the mRNA level of survivin gene.

RESULTS AND CONCLUSION: PCR and sequencing analyses demonstrated that shRNA template targeting survivin gene had been inserted at the expected site and the insertion sequence was perfectly corrected. The RT-PCR results showed that survivin expression in PC3 was downregulated at mRNA level. The recombinant plasmid had a better effect at 24 hours than 48 hours. The shRNA expression vector targeting survivin gene has been constructed successfully, and it would be a useful method to develop specific survivin-silencing therapeutics in further gene therapy study.

Xu JH, Chen DN, He M, Huang XZ, Zhuang JH, Li MX, Jin XB, Lu XM, Zhu JY. Construction of survivin shRNA recombinant expression vector and downregulation of survivin mRNA expression in PC3 cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Lincunang Kangfu. 2011;15(41): 7738-7741. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: survivin 基因特异性表达于肿瘤和胚胎组织, 与肿瘤细胞的分化增殖、浸润转移以及多药耐药密切相关。

目的: 构建靶向 survivin 基因的 shRNA 重组质粒表达载体, 转染前列腺癌细胞 PC3, 验证该载体能否下调细胞 survivin 基因 mRNA 水平。

方法: 以 survivin 基因为靶点设计具有短发夹结构的 shRNA 序列, 经退火成互补双链后克隆入 pENTR/U6 建立重组表达载体 pENTR/U6-SUR; 转化 *E.coli* TOP10 菌株, 挑取阳性菌落进行菌落 PCR 和测序鉴定; 将重组质粒转染前列腺癌细胞株 PC3 细胞, RT-PCR 检测重组质粒对细胞 survivin 基因 mRNA 水平的抑制效果。

结果与结论: 将设计合成的 shRNA 序列经退火后克隆至 pENTR/U6 载体中, 菌落 PCR 可扩增出目的条带, 测序结果证实插入片段为所需序列; pENTR/U6-SUR 重组质粒转染后 PC3 细胞 survivin 基因 mRNA 表达水平显著下降, 且 24 h 比 48 h 作用更明显。成功构建了靶向 survivin 基因的 shRNA 质粒表达载体, 并证实该载体显著下调了 PC3 细胞中 survivin 基因 mRNA 水平。

关键词: 短发夹 RNA; survivin 基因; 前列腺癌细胞; 载体; 凋亡; 组织构建

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.41.034

徐建华, 陈丹娜, 何敏, 黄宪章, 庄俊华, 黎美贤, 金小宝, 卢雪梅, 朱家勇. 构建 survivin shRNA 重组载体及靶向下调 PC3 细胞 survivin mRNA 的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(41):7738-7741.

[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

survivin 基因是凋亡蛋白抑制因子 IAP 家族中的一个新成员, 特异性表达于肿瘤和胚胎组织, 且与肿瘤细胞分化增殖、浸润转移以及多药耐药密切相关^[1-3]。研究表明 Survivin 蛋白在前列腺癌中异常表达, 并与前列腺癌的发生发展有关, 可能是前列腺癌发病机制之一^[4]。此外, 以 survivin 为靶向的基因治疗可以降低肿瘤内

survivin 的表达, 促进肿瘤血管形成过程中内皮细胞的凋亡, 并能逆转肿瘤耐药性等^[5-6]。RNA 干扰是一种双链 RNA(dsRNA) 分子在 mRNA 水平诱发的转录后基因沉默机制, 具有快速、高效和特异性强等特点^[7]。目前多采用针对某一特定基因 mRNA 的某一位点设计 RNA 干扰的短发状 RNA(shorthairpin RNA, shRNA), 观察基因抑制效果。实验在此基础上, 设计合成针对 survivin mRNA 的 shRNA, 克隆至质粒, 构建载体, 并将其转染至 PC3 细胞, 观察其对 PC3

细胞survivin表达及细胞凋亡的影响。

1 材料和方法

设计: 随机对照细胞学体外观察性实验。

时间及地点: 于2010-01/09在广东省中医院检验中心和广东药学院药用生物活性物质研究所, 广东省生物活性药物研究重点实验室完成。

材料: 前列腺癌细胞株(上海细胞库PC3); Trizol、Lipofactamine 2000、*E.coli* Top10菌株、引物合成、DNA测序、pENTR/U6试剂盒(Invitrogen公司)。

实验方法:

引物设计和合成: 在NCBI查找survivin基因的序列信息, 利用Invitrogen的网上在线设计软件BLOCK-iT™ RNAi Designer设计了一对针对survivin某序列的shRNA。设计的shRNA序列: si-sur-top5'-CAC CGC AAA GGA AACCAA CAA TAC GAA TAT TGT TGG TTT CCT TTG C-3', si-sur-bot5'-AAA AGC AAAGGA AAC CAA CAA TAT TCG TAT TGT TGG TTT CCT TTG C-3'。阴性对照Top strand5'-CAC CGT CAC AAC CTC CTA GAAA GAG TAG ACG AAT CTA CTC TTT CTA GGA GGT TGTG A-3', Bottom strand5'-AAA ATC ACA ACC TCC TAG AAA GAGTAG ATT CGT CTA CTC TTT CTA GGA GGT TGT GAC-3'。设计的Survivin上游引物: 5'-GAC CAC CGC ATC TCT ACA TTC-3', 下游引物: 5'-TGC TTT TTA TGT TCC TCTATG GG -3', 扩增产物长194 bp; 内参GAPDH上游引物: 5'-GGG GCC ATC CAC AGT CTT C-3', 下游引物: 5'-CAC CAT CTT CCA GGA GCG AG -3', 扩增产物长352 bp。设计好的shRNA、阴性对照和RT-PCR引物交由Invitrogen公司合成。

shRNA表达载体的构建: ①ds oligo的合成: 建立退火反应体系, 包括“Top strand” DNA oLigo (200 μmol/L) 5 μL, “Bottom strand” DNA oLigo (200 μmol/L) 5 μL, 10* KOD PCR buffer 2 μL, DNase/RNase-Free Water 8 μL, 总体积20 μL。放入PCR仪, 95 °C 4 min, 室温冷却15 min, 微型离心机内离心5 s, 稀释合成的ds oligo并检测ds oligo的完整性: 退火产物于4%的琼脂糖凝胶中电泳, 恒压120 V, 1 h后, Bio-Rad凝胶成像系统成像并分析。②连接

反应: 将ds oligo克隆入入门载体pENTR/U6, 建立连接反应体系, 包括5× Ligation Buffer 4 μL, pENTR/U6 2 μL, ds oLigo(5 nmol/L, 1 : 10 000) 1 μL, DNase/RNase-Free Water 12 μL, T₄ DNA Ligase (1 U/μL) 1 μL, 总体积20 μL。室温孵育30 min, 将反应体系置于冰上。下一步转化*E.coli*。连接反应体系可-20 °C过夜保存。构建重组表达载体 pENTR/U6-SUR。

转化和阳性克隆筛选: ①LB固体培养基制备: 称10 g胰蛋白胨, 5 g酵母提取物, 10 g NaCl, 加入950 mL去离子水, NaOH调节pH值为7.0, 定容至1 L; 按15 g/L加入琼脂; 高压蒸汽灭菌20 min; 冷却至55 °C, 加入终浓度为100 mg/L的氨卞青霉素, 倒入培养皿中; 待凝固后, 加入50 mg/L的BLasticidin, 避光保存。②转化: 把重组好的质粒转化入*E.coli*。向试剂盒中一支One Shot TOP10 Chemically Competent *E.coli*分装管中加入2 μL的连接产物, 轻柔混匀; 冰上孵育30 min; 勿摇动, 42 °C热休克细胞30 s; 然后立即转移分装管到冰上; 加入250 μL室温的S.O.C.培养基; 盖紧管盖, 37 °C, 200 r/min 1 h; 于预热的含50 mg/L kanamycin的LB琼脂糖平板上平铺150 μL的上述转化菌液, 37 °C孵育过夜; 挑取标记的阳性克隆, 做菌落PCR, 初步进行阳性转化菌的鉴定和筛选。③挑取标记的阳性克隆, 做菌落PCR, 本次实验配2个体系, 1个菌落, 1个Negative Control: Taq enzyme 0.1 μL, Forward primer 0.5 μL, Reverse primer 0.4 μL, dNTP 1.6 μL, Buffer 2 μL, 水15.4 μL, 总体积20 μL。94 °C 10 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 72 °C 5 min, 30个循环, 琼脂糖电泳(恒压120 V, 30 min; 产物为389 bp)检测菌落PCR结果。

前列腺癌PC3细胞的传代培养: 复苏阳性前列腺癌PC3细胞, 隔天换液, 将细胞从CO₂培养箱取出, 弃去培养瓶中上清, 用1×PBS洗一二次, 加入含体积分数10% FBS的培养基5 mL, 把细胞放回CO₂培养箱培养; 传代。

将构建的重组表达载体pENTR/U6-SUR载体转染前列腺癌细胞: ①铺板: 此次试验需要铺6个孔, 分别用来做空白对照、阴性质粒对照、阳性质粒。把铺好的培养板放入CO₂培养箱。②转染: 铺板后的第2天, 观察细胞密度80%~90%时, 可以转染; 用吸管吸去孔内上清, 1×PBS洗二三次, 每孔加DMEM培养液

Supported by:
Guangdong
Provincial Science
and Technology
Development
Program, No.
2011B031800207*; a
grant from Medical
Science and
Technology Research
Program of
Guangdong Province,
No. A2008240*;
Research Foundation
for Young Talented
Scholars of
Guangdong
Provincial Hospital of
Chinese Medicine,
No. E206001*

Received: 2011-04-20
Accepted: 2011-08-04

¹ 广东省中医院检验医学部, 广东省广州市 510120;
² 广东药学院药用生物活性物质研究所, 广东省生物活性药物研究重点实验室, 广东省广州市 510006

徐建华★, 男, 1976年生, 湖南省衡阳市人, 汉族, 南方医科大学2010级在读博士, 硕士生导师, 副主任技师, 主要从事生化与分子生物学研究。
jhxu1976@126.com

通讯作者: 朱家勇, 教授, 博士生导师, 广东药学院药用生物活性物质研究所, 广东省生物活性药物研究重点实验室, 广东省广州市 510006
zhujiy@gdpu.edu.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2011)41-07738-04

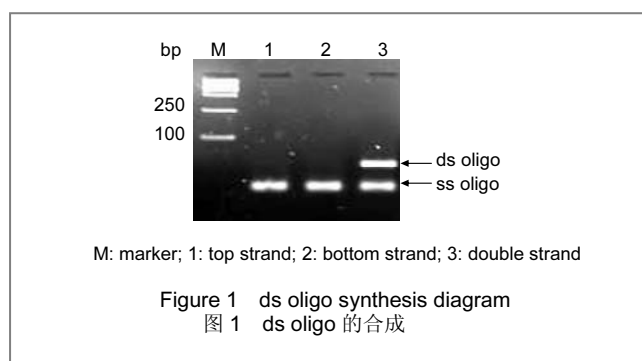
收稿日期: 2011-04-20
修回日期: 2011-08-04
(20110420004/GW·S)

1 mL; 稀释Lipo2000转染试剂, 4 μ L Lipo2000+ 196 μ L Opti-MEM培养液, 轻轻混匀, 室温放置5 min; 分别测取阴性质粒和阳性质粒的A值, 阳性质粒的A₂₆₀为0.045, 阴性质粒的A₂₆₀为0.044, 根据公式DNA浓度=A₂₆₀×50×稀释倍数(mg/L), 计算出需要加入质粒的量, 即4.4 μ L 阳性质粒加95.56 μ L Opti-MEM, 4.45 μ L阴性质粒加95.45 μ L Opti-MEM, 轻轻混匀; 分别向阳性质粒和阴性质粒里加入100 μ L稀释后的转染试剂, 轻轻混匀, 室温放置 20 min。将配好的阳性质粒和阴性质粒分别加入培养孔中, 米字型晃动培养板, 放回CO₂培养箱; 24, 48 h后收集细胞。

检测survivin mRNA水平的表达: ①提取RNA: 用invitrogen公司的Trizol提取RNA, 按说明书进行。提取到RNA后, 电泳检测提取到的产物, 凝胶成像系统观察电泳结果。②RT-PCR: 提取到的总RNA反转录为cDNA: Total RNA 1.5 μ L, 10×DNase I Buffer 1.25 μ L, DNase I 1.25 μ L, Rnasin 0.3 μ L, RNase-free H₂O 8.3 μ L; 37 °C 30 min in PCR instrument, EDTA 1.4 μ L, 65 °C 10 min, OligodT 65 °C, 5 min immediately placed on ice 1.25 μ L, 5×RT Buffer 5 μ L, Rever Tra Ace 1.25 μ L, 10 mmol/L dNTP 2.5 μ L, RNase inhibitor 1.25 μ L。反应条件: 30 °C 10 min; 42 °C 50 min; 85 °C 5 min; 4 °C 5 min。cDNA可直接作为模板使用, 或-70 °C保存。RT-PCR检测survivin的mRNA表达水平, 反应体系: H₂O 12.7 μ L, Takara buffer 2 μ L, dNTP 1.6 μ L, Sur-F 0.8 μ L, Sur-R 0.8 μ L, Taq 0.1 μ L, cDNA 2 μ L, 总体积20 μ L。反应条件94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 30 s, 72 °C 7 min, 30个循环, 琼脂糖凝胶电泳验证PCR结果。

2 结果

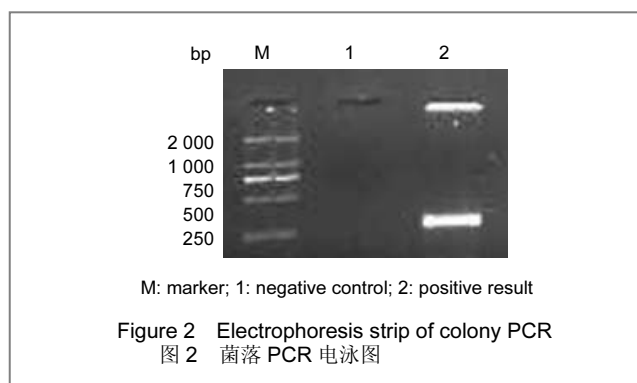
2.1 ds oligo合成结果 见图1。



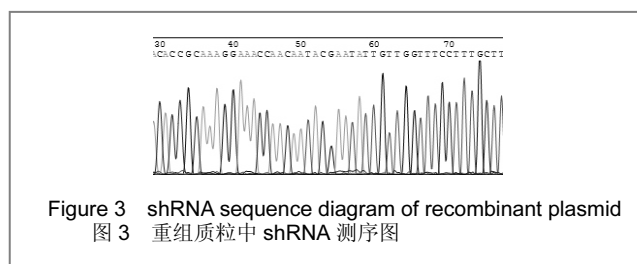
将合成的survivin top链和bottom链进行退火处理, 得到的ds oligo经4%琼脂糖凝胶电泳, 紫外成像系统观察ds oligo, 清晰可见, 分子量约为46 bp。ss oligo由于退火时链内折叠成发卡结构, 电泳时位于ds oligo之前。

2.2 连接和转化结果 将退火的ds oligo热激转化E.coli以后, 于37 °C预热的含50 mg/L kanamycin的LB琼脂糖平板上平铺150 μ L的转化菌液, 37 °C孵育过夜。次日, 可见平板上长出了若干菌落。

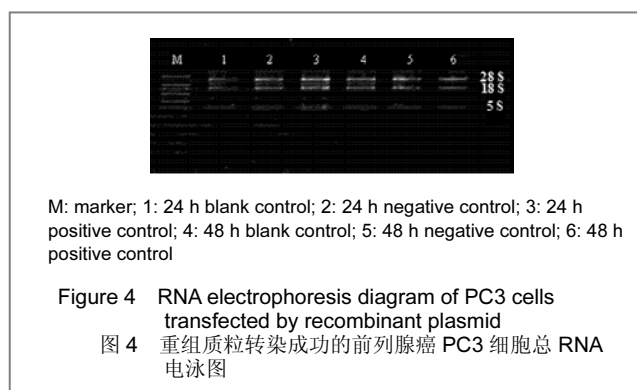
2.3 菌落PCR结果 挑取克隆, 菌落PCR鉴定转化效果, 见图2。阳性菌落中含有重组的质粒(产物大小为389 bp), 故在250~500 bp之间可见一明亮条带; 阴性对照中不含重组的质粒, 故无可见条带。



2.4 测序 挑取阳性菌落, 送Invitrogen(上海)贸易有限公司测序, 结果显示, 重组质粒shRNA与pENTR/U6载体正确连接, 而且其序列与设计序列相符, 见图3(Top链对应第30~75位)。

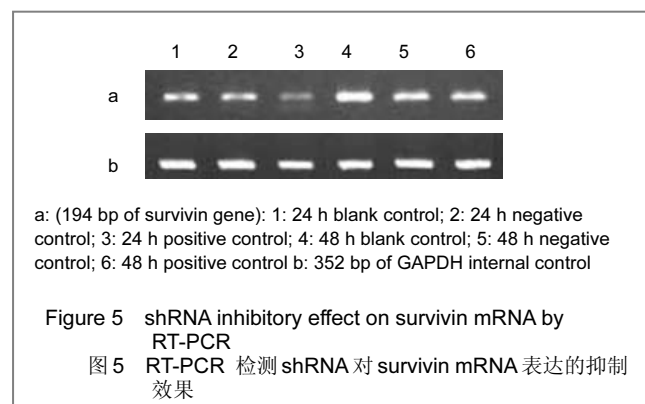


2.5 RNA提取结果 提取质粒, 用Liopfactamine 2000转染PC3细胞, 于24, 48 h收集细胞, 提取RNA后电泳结果见图4。



2.6 RT-PCR结果 用以上提取的RNA进行RT-PCR, 检测shRNA的抑制效果, 见图5。图5a为以反转录合成的cDNA为模板进行PCR扩增。经反转录PCR获得的DNA片段为survivin基因的mRNA中的1个片段, 结果100~250 bp间区域可见一条特异性强荧光带。与设计的

194 bp survivin基因片段大小相符, 由图可见重组质粒 pENTR/U6-SUR能显著下调 survivin 基因 mRNA 的水平, 且24 h作用比48 h更明显。图5b为相应反应体系中内参GAPDH DNA为模板进行扩增的产物(352 bp)。



3 讨论

目前, 前列腺癌主要采取手术切除、放射线治疗, 但以上这些传统治疗方法可出现多种毒性作用和不良反应, 因此寻求更有效, 更安全, 更能减少对患者伤害的治疗方案, 从肿瘤的发生发展机制方面来治疗恶性肿瘤成为当前的研究热点。研究结果显示, Survivin蛋白表达异常与前列腺癌的发生、发展有关, Survivin蛋白异常表达可能是前列腺癌的发病机制之一。Survivin在胚胎组织中高表达, 在胸腺细胞等极少数组织存在, 在正常成人组织中表达为静止^[8-10], 在人类肿瘤细胞中广泛表达, 是一种抑制细胞凋亡和调节细胞分裂的双功能蛋白。survivin基因主要可以通过以下几种不同方式促进肿瘤的发生发展: 抑制细胞凋亡^[11], 参与对细胞分裂的调控, 促进血管生成^[12-13], 肿瘤的多药耐药^[14-15]。因此, 以survivin基因作为切入点有可能成为肿瘤特异和高效治疗作用的突破点。

与基因替代、反义核酸等传统的基因治疗方法相比, RNAi技术有着明显优势。RNAi是指生物体内干扰性小RNA引起与其同源mRNA的特异性降解, 因而抑制其相应基因表达的过程。RNAi技术迅速在功能基因组等领域发挥出了强大的作用, 并且随着对哺乳动物细胞内一系列基因表达水平的成功下调以及细胞导入手段的改进, RNAi广泛应用于肿瘤研究, 如肿瘤的发病机制、侵袭与转移、信号转导、细胞周期调控、凋亡和治疗等。目前用于RNAi的中介物主要是siRNA和shRNA, shRNA可更有效地进入RNAi途径, 其效价和特异性高于siRNA。有证据表明使用少于30个碱基对的shRNA可克服长的双链RNA会激发干扰素反应现象, 如同抗病毒反应, 这可避免哺乳动物干扰素反应并开始强效而特异性的基因沉默。

本实验成功构建靶向survivin基因的shRNA重组质粒表达载体, 该载体能显著下调PC3细胞中survivin基因的mRNA水平, 但是, 作者也发现该载体存在相关不足, 如体外实验表明, shRNA质粒瞬时转染后效果不能持久等。因此在后续实验中, 将拟通过gateway技术将该shRNA构建成慢病毒表达载体, 验证其体内功能。由于肿瘤发生是多种基因异常所引起, 下一步将应用RNAi联合抑制多个基因, 进一步探讨前列腺癌基因治疗的新途径。

4 参考文献

- [1] Liu YB, Zhang LP, Chen Y, et al. Xinjiang Yike Daxue Xuebao. 2009; 32(5):555-557.
刘佑斌, 张丽萍, 陈艳, 等. 新疆哈萨克族食管癌中survivin基因真核表达载体的构建[J]. 新疆医科大学学报, 2009, 32 (5) :555-557.
- [2] Luthringer B, Isbert S, Muller WE, et al. Poriferan survivin exhibits a conserved regulatory role in the interconnected pathways of cell cycle and apoptosis. Cell Death Differ. 2011;18(2):201-213.
- [3] Kanwar JR, Kamalapuram SK, Kanwar RK. Targeting survivin in cancer: the cell-signalling perspective. Drug Discov Today. 2011; 16(11-12):485-494.
- [4] Zhu F, Wang ZJ, Yao QS, et al. Shanxi Yiyao Zazhi. 2009;38 (5) : 526-528.
朱芳, 王志娟, 姚启盛, 等. Survivin基因蛋白在前列腺癌组织中的表达及意义[J]. 山西医药杂志, 2009, 38 (5) : 526-528.
- [5] Liu XC, Yu ZX, Gao RJ, et al. Zhongguo Laonianxue Zazhi. 2007; 27(7):641-643.
刘喜春, 于振香, 高瑞娟, 等. survivin-siRNA对裸鼠前列腺癌生长的影响[J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(7):641-643.
- [6] Moriyama M, Kano R, Maruyama H, et al. Small interfering RNA (siRNA) against the survivin gene increases apoptosis in a canine melanoma cell line. J Vet Med Sci. 2010, 72(12):1643-1646.
- [7] Liu YB, Shen WG, Lu LL, et al. Zhongguo Bingli Shengli Zazhi. 2010;26(8):1474-1478.
刘艳波, 沈维高, 卢莉莉, 等. Survivin-siRNA对前列腺癌DU145细胞的促凋亡作用[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(8):1474-1478.
- [8] Leher R, Enomoto T, McGregor JA, et al. Correlation of survivin mRNA detection with histologic diagnosis in normal endometrium and endometrial carcinoma. Acta Obstet Gynecol Scand. 2002; 81(2): L62-L67.
- [9] Bialkowska-Hobrzanska H, Driman DK, Fletcher R, et al. Expression of human telomerase reverse transcriptase, Survivin, DD3 and PCGEM1 messenger RNA in archival prostate carcinoma tissue. Can J Urol. 2006;13(1):2967-2974.
- [10] Becker AL, Oriotti NI, Folini M, et al. Redox-active polymer microcapsules for the delivery of a survivin-specific siRNA in prostate cancer cells. ACS Nano. 2011;5(2):1335-1344.
- [11] Deng K, Wang HL. Chongqing Yixue. 2008;37 (10) : 1111-1113.
邓开, 王洪林. survivin基因在肿瘤中的研究进展[J]. 重庆医学, 2008, 37 (10) : 1111-1113.
- [12] Harfouche R, Hassessian HM, Guo Y, et al. Mechanisms which mediate the antipapillary effects of angiotensin-1 on endothelial cells. Microvasc Res. 2002;64(1):135.
- [13] Ohashi H, Takagi H. Phosphatidylinositol 3-kinase / Akt regulates angiotensin II-induced inhibition of apoptosis in microvascular endothelial cells by covering survivin expression and suppression of caspase-3 activating. Circ Res. 2004;94(6):785.
- [14] Wall NR, Beck FW, Aikati AM, et al. Treatment induced expression of anti apoptotic proteins in WSC Cell. a human chronic Lymphocytic Leukemia cell Line. J Drug Target. 2001;9 : 329-339.
- [15] Koike H, Morikawa Y, Sekine Y, et al. Survivin is associated with cell proliferation and has a role in 1a,25-dihydroxyvitamin D3 induced cell growth inhibition in prostate cancer. J Urol. 2011;185(4): 1497-1503.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 广东省科技计划项目(2011B031800207);
广东省医学科学技术研究基金项目(A2008240); 广东省中医院青年后备人才科研项目(E206001)。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。