

• 基础实验研究论著 •

人脑胶质瘤 CDK2 干扰 RNA 新靶点的检验

呼格吉乐¹, 张军力¹, 段美庆¹, 王俊瑞¹, 高乃康^{2△}

(内蒙古医学院附属医院: 1. 检验科; 2. 神经外科, 呼和浩特 010050)

摘要:目的 构建 4 个新靶点 CDK2 干扰 RNA 真核表达载体, 转染人脑胶质细胞瘤 SHG44 细胞, 经逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 mRNA 表达, 获得干扰效果最好的真核表达载体, 为 CDK2 成为人脑肿瘤标志物提供有价值的资料。**方法** (1) 构建 4 个新靶点 CDK2 干扰 RNA 真核表达载体并用双酶切和测序鉴定; (2) 用脂质体法瞬时转染上述 4 个载体到 SHG44 细胞株; (3) 通过 RT-PCR 比较转染后 CDK2 mRNA 表达量, 选出干扰效果最好的一个载体。**结果** (1) 成功构建了 4 个新靶点 CDK2 干扰 RNA 真核表达载体即 pGPU6/GFP/Neo-CDK2-1、pGPU6/GFP/Neo-CDK2-2、pGPU6/GFP/Neo-CDK2-3、pGPU6/GFP/Neo-CDK2-4; (2) CDK2 mRNA 表达明显受抑制, 并获得效果最好的 CDK2 干扰 RNA 真核表达载体。**结论** 成功构建并筛选出效果最好的新靶点 CDK2 干扰 RNA 真核表达载体, 使 SHG44 细胞的 CDK2 mRNA 表达明显降低。

关键词: RNA 干扰; 神经胶质瘤; 新靶点; CDK2**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.09.004**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2012)09-1033-02

Identification of new targets of human glioma CDK2 siRNA

Huge Jile¹, Zhang Junli¹, Duan Meiqing¹, Wang Junrei¹, Gao Naikang^{2△}

(1. Department of Laboratory Medicine; 2. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Huhehaote, Neimongu 010050, China)

Abstract: Objective To construct four new eukaryotic expression vectors of small interference RNA (siRNA) specific for CDK2 and confirm the interferential efficiency of siRNA on the expression of CDK2. **Methods** (1) Four new eukaryotic expression vectors of siRNA specific for CDK2 were constructed and identified by double enzymic digestion. (2) SHG44 cell line of human brain gliocytoma was transiently transfected with the four new vectors via oligofectamine. (3) Vector, with the strongest interferential efficiency, was confirmed by detecting the expression level of CDK2 mRNA using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** (1) Four eukaryotic expression vectors of siRNA specific for new targets of CDK2 was constructed and denominated as pGPU6/GFP/Neo-CDK2-1, pGPU6/GFP/Neo-CDK2-2, pGPU6/GFP/Neo-CDK2-3 and pGPU6/GFP/Neo-CDK2-4. (2) The expression of CDK2 mRNA was obviously suppressed and the vector with the strongest interferential efficiency was obtained. **Conclusion** The eukaryotic expression vectors of siRNA, specific for new target of CDK2 and with the strongest interferential efficiency, was successfully constructed and indentified, which could obviously suppress the expression of CDK2 mRNA in SHG44 cell line.

Key words: RNA interference; glioma; new target; CDK2

人脑胶质瘤是中枢神经系统最常见肿瘤, 由于瘤细胞呈弥漫性、侵袭性生长, 预后极差^[1], 但其发病的病理生理、生化机制目前尚不清楚, 同时缺乏有效的肿瘤标志物^[2]。细胞周期失控与肿瘤发生密切相关, 有研究显示, 在绝大多数肿瘤细胞中均存在若干细胞周期调控基因的改变。CDK2 为 CDKs 家族的一员, 在人脑胶质瘤中表达, 是细胞周期正向调节因子, CDK2 与 Cyclin E 或 A 组成激酶复合物, 激活其激酶活性, 在这个复合体中周期蛋白为调节亚基, CDK2 为催化亚基, 通过磷酸基团转移影响细胞周期, 在驱动细胞周期进入 S 期和维持 S 期过程中起决定性作用^[3-4]。干扰 RNA 技术能有效、特异地使基因沉默, 所以该技术已被广泛用于探索基因功能, 以及传染性疾病、恶性肿瘤的基因治疗领域。因此, 本研究在 CDK2 cDNA 上找到 4 个新的干扰靶点, 设计干扰 RNA, 并且构建 CDK2 干扰 RNA 真核表达载体, 并经酶切、测序鉴定; 脂质体法瞬时转染上述 4 个载体到 SHG44 细胞株, 通过逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)比较转染后 CDK2 mRNA 表达量, 选出

干扰效果最好的一个载体, 为 CDK2 成为人脑肿瘤标志物提供有价值的资料及实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 人脑恶性胶质瘤 SHG44 细胞株购自中科院上海细胞库, LipofectamineTM 2000 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司, RT-PCR 等相关试剂购自大连宝生物工程公司, Transwell 小室, Matrigel, MTT 等相关试剂购自 Sigma 公司。

1.2 方法**1.2.1 寡核苷酸的设计与合成**

1.2.1.1 CDK2 小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 设计和构建 siRNA 模板中的 loop 结构选用了 TTCAA-GAGA 以避免形成终止信号, siRNA 的转录终止序列采用 T6 结构。正义链模板的 5' 端添加了 CACC, 与 Bbs I 酶切后形成粘端互补; 反义链模板的 5' 端添加了 GATC, 与 BamH I 酶切后形成粘端互补; 如果 siRNA 的第一个碱基不是 G, 则在 CACC 后补加一个 G。以 CDK2-1 (对应 cDNA 序列上 457~

△ 通讯作者, Tel: 18004713399; E-mail: hujile07@163.com。

477 bp) 为例, 见图 1、2。



图 1 CDK2-1 的 siDNA 模板序列

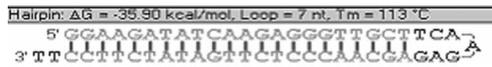


图 2 转录后产物序列的结构

1.2.1.2 siRNA 模板的退火。

1.2.1.3 pGPU6/GFP/Neo 载体的线性化 取 2 μg pGPU6/GFP/Neo 载体, 37 °C 酶切 1 h, 琼脂糖电泳, 使用 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver2.0 (TaKaRa) 回收, 电泳检测估算浓度, 稀释浓度至 50 ng/μL。

1.2.1.4 pGPU6/GFP/Neo-shRNA 载体的构建 (1) 载体连接反应为 22 °C 1 h, 转到 JM109 感受态细胞中。(2) 每个连接反应挑取 5 个菌落, 接种到含 50 μg/mL Kanamycin 的 LB 培养基中, 37 °C 孵育过夜。挑取过夜培养平板上单个菌落置于 5 mL 含卡那霉素 (30 μg/mL) 的 LB 培养基中, 37 °C、250 × g, 振荡培养 12 h。(3) 质粒提取。(4) 所得质粒用 BamH I、Pst I 分别酶切鉴定, 并测序鉴定。

1.2.2 干扰质粒载体对 SHG44 细胞的瞬时转染 按照 Lipofectamine™2000 转染试剂说明书, 将高纯度的上述 4 条质粒及阴性对照质粒分别转入 SHG44 细胞中。荧光显微镜下观察转染结果。

1.2.3 RT-PCR 检测转染组 CDK2 mRNA 表达 使用 TaKaRa RNAiso Reagent 提取试剂盒提取细胞总 RNA, 用 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver3.0 试剂盒进行 RT-PCR 反应, CDK2 上游引物为 5'-CAAAGCCAGAAACAAGTTGACGGGAGA-3', 下游引物为 5'-GGCTTGGTCACATCCTGGAAGAAAGG-3', 扩增产物为 898 bp。GAPDH 上游引物为 5'-CGGGAAGACTGTGGCGTGAT-3', 下游引物为 5'-GAGTGGGTGTCGCTGTTGA-3', 扩增产物为 300 bp。产物在 2% 琼脂糖胶上分离, 用凝胶分析软件分析条带光密度。

2 结 果

2.1 酶切结果 每个连接反应挑取 5 个菌落, 培养后使用碱裂解法抽提质粒, 所得质粒用 BamH I、Pst I 分别酶切鉴定阳性重组载体应该可以被 BamH I 切开, 而不能被 Pst I 切开。酶切结果表明所有质粒均为阳性重组载体。

2.2 测序鉴定 每组选择两个克隆测序鉴定, 构建的干扰载体序列与设计序列完全相同, 并且未发现有突变、缺失、插入等异常存在, 以 pGPU6/GFP/Neo-CDK2-1 测序图为例, 见图 3。

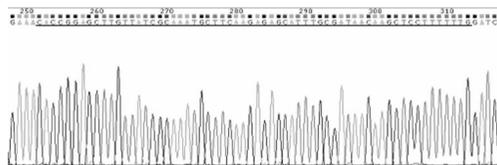


图 3 pGPU6/GFP/Neo-CDK2-1 干扰表达载体部分测序图 (黑线部分为干扰序列)

2.3 RT-PCR 检测瞬时转染干扰 RNA 真核表达载体后 CDK2 mRNA 水平 与未转染 SHG44 细胞比较, 转染阴性对照质粒细胞 CDK2 mRNA 表达量未见明显改变, 而 4 个转染

细胞 CDK2 mRNA 表达水平均降低, 其中 pGPU6/GFP/Neo-CDK2-1-SHG44 细胞组 CDK2 mRNA 表达水平最低。

3 讨 论

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 现象是存在于真核生物体内的一种阻断外源基因表达的自我防御体系, 其原理是将双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 裂解为 21~25 个核苷酸组成的 siRNA 作为介分子, 引起同源序列特异性 mRNA 降解^[5-6]。使用 RNAi 技术可以特异性剔除或关闭特定基因的表达, 随着近年 RNAi 机制的阐明以及相关实验技术的改进, 该技术已被广泛应用于肿瘤研究的众多领域如 RNAi 在研究肿瘤的多药耐药性^[7], 抑制肿瘤的侵袭、转移^[8-9], 调控肿瘤细胞的周期^[10], 肿瘤的早期发现^[11], 以及肿瘤标志物等相关研究中都有广泛的应用。之前有学者对 CDK2 进行过 RNAi 的研究, 所干扰的序列是 CDK2 cDNA 上的 127~145 bp: 5'-GGTGTACCCAGTACTGCCA-3', 作者也对该干扰载体及实验进行过改进, 但由于靶点的选择和质粒结构等问题基因沉默效果始终无法达到 30%, 因此, 对 CDK2 在细胞中的增殖、凋亡、侵袭、转移等功能的研究受到极大影响, 而下一步实验要对胶质瘤细胞的亚细胞蛋白组学进行研究, 尤其是对细胞核的研究要求非常精细, 所以必须找到新的干扰靶点。

本研究从 CDK2 cDNA 上找到 4 个新的可能高效干扰 CDK2 mRNA 的靶点, 分别是 CDK2-1: 457~467 bp, CDK2-2: 38~58 bp, CDK2-3: 149~169 bp, CDK2-4: 779~791 bp, 人工合成后与表达载体连接, 转到 JM109 感受态细胞中, 每个连接反应挑取 5 个菌落, 培养后抽提质粒, 经 BamH I、Pst I 分别酶切鉴定, 所有载体均为阳性重组载体, 测序结果表明构建的干扰载体序列与设计序列完全相同。提取质粒后结合 Lipofectamine™2000 进行转染, Lipofectamine™2000 是帮助质粒介导干扰 RNA 载体最有力的工具, 其利用脂质体-质粒 DNA 形成复合物, 通过阳离子脂质体与细胞膜结合后, 以内吞方式进入细胞, 通过细胞内作用或与质膜直接融合将质粒 DNA 释放到细胞内, 实现基因转染, 常被用于人脑胶质瘤相关的临床试验^[12]。转染后暂时不加入筛选物质称作瞬时转染, 在瞬时转染中虽然质粒不整合进宿主染色体, 但却可以在胶质瘤细胞中暂时并高水平表达, 正适合干扰效果的测定。

转染后经 RT-PCR 检测, 本研究发现的新靶点干扰质粒转染组 pCDK2-1-SHG44 细胞中其 mRNA 相对含量低于其他转染组, 而且显著低于空质粒转染组 pNC-siRNA-SHG44 细胞和未转染质粒组 SHG44 细胞, 干扰效果接近 56%, 而空质粒转染组和未转染质粒组无明显差异, 表明本研究所设计的新靶点 pGPU6/GFP/Neo-CDK2-1 表达载体, 将导致该细胞中 CDK2 基因在转录水平明显降低, 具有特异性基因沉默效果, 与以往他人设计的载体比较有很大的提高, 为继续探讨 CDK2 成为人脑肿瘤标志物的研究提供了有价值的资料及实验基础。

参考文献:

[1] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways[J]. Nature. 2008, 455(7216): 1061-1068.

[2] Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults[J]. N Engl J Med. 2008, 359(5): 492-507.

放疗中 VCA-IgA 抗体阳性率比放疗后高, 差异有统计学意义 ($\chi^2=4.0519, P=0.0441$)。

2.2 EA-IgA 抗体检测结果 鼻咽癌患者放疗前、中、后 EA-IgA 抗体阳性率分别为 69.2% (27/39)、35.9% (14/39)、15.4% (6/39)。放疗前血清 EA-IgA 抗体阳性率比放疗中、后高, 差异有统计学意义(放疗前与放疗中比较, $\chi^2=8.6895, P=0.0032$; 放疗前与放疗后比较, $\chi^2=23.1636, P=0.0001$), 放疗中血清 EA-IgA 抗体阳性率比放疗后高, 差异有统计学意义 ($\chi^2=4.3034, P=0.0380$)。

3 讨论

鼻咽癌是中国南方(广东和广西)常见恶性肿瘤^[4], 目前研究认为遗传、环境因素, 以及 EB 病毒感染是鼻咽癌发生的原因^[5]。EB 病毒与鼻咽癌存在密切关系^[6], 鼻咽癌组织中往往可以检测到 EB 病毒的存在。EB 病毒作为抗原感染机体后可产生多种抗体, 对这些抗体的检测对鼻咽癌的诊断有重要意义。有文献报道血清 VCA-IgA 抗体可以在鼻咽癌发生前 10~61 个月出现, 提示其可能作为鼻咽癌早期诊断的标志物^[7]。VCA-IgA 抗体的检测阳性率可达 81.5%, 特别是未经治疗的患者。随着病情的发展, 患者 VCA-IgA 抗体的几何滴度可逐渐上升, 经治疗后逐渐下降。EA-IgA 抗体在鼻咽癌患者中特异性较高, 健康者罕见。VCA-IgA、EA-IgA 抗体联合检测, 可提高诊断阳性率^[1]。

国内对广东、广西、海南等地大样本普查结果显示, 鼻咽癌患者 VCA-IgA 抗体阳性率为 60.0%~80.0%^[8-10]。本研究 39 例鼻咽癌患者放疗前 VCA-IgA 抗体阳性率为 64.1%, 与文献报道一致, EA-IgA 抗体阳性率为 69.2%; 放疗 29 d 后 VCA-IgA 抗体阳性患者从 25 例降至 15 例, 阳性率降至 38.5%, 转阴率为 40.0%, 差异有统计学意义 ($P=0.0235$); EA-IgA 抗体阳性患者从 27 例降至 14 例, 阳性率降至 35.9%, 转阴率为 48.2%, 差异有统计学意义 ($P=0.0032$)。随着放疗的进行, VCA-IgA、EA-IgA 抗体阳性患者数、阳性率呈明显下

降趋势, 转阴率逐渐升高。放疗 29、50 d 阳性率与放疗前比较, 差异越来越显著, 转阴率亦明显升高; 虽然放疗 50 d 后仍有 7 例阳性患者, 但其抗体水平已显著降低, 并且大部分阳性患者转为阴性, 说明鼻咽癌患者 EA-IgA、VCA-IgA 抗体水平与放疗效果明显相关, 可将检测患者 EA-IgA、VCA-IgA 抗体水平作为鼻咽癌放疗效果判断、监测复发和评价预后的有效指标之一。

参考文献:

- [1] 尹伯元, 李龙, 顾文涛, 等. 临床特种检验医学[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 2004: 109-110.
- [2] 曾希, 曾颖, 王承龙, 等. 33 例鼻咽癌患者治疗前后血清 EB 病毒 VCA-IgA 跟踪分析[J]. 南华大学学报(医学版), 2010, 38(1): 62-64.
- [3] 邓兆享. 血清中 EBNA1-IgA 和 EBVCA-IgA 检测对鼻咽癌的诊断价值[J]. 中国热带医学, 2009, 9(9): 1718-1719.
- [4] 伊强. 利用 EB 病毒诊断鼻咽癌的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(2): 148-150.
- [5] 李汉福, 钟建明, 廖建. 检测 EB 病毒 IgA/VCA、IgA/EA、IgG/EA 抗体对诊断鼻咽癌的价值[J]. 广西医学, 2007, 29(40): 500-501.
- [6] 闵华庆. 鼻咽癌研究 [M]. 广州: 广东科技出版社, 1998: 57-59.
- [7] Ho HC, Kwan HC, Ng MH. Serumantibodies to Epstein-Barr virus capsid antigen preceding symptoms of nasopharyngeal carcinoma[J]. Lancet, 1978, 1(8061): 436.
- [8] 张文英. EB 病毒 VCA-IgA 检测对鼻咽癌诊断的意义[J]. 实用医技杂志, 2006, 13(1): 61-62.
- [9] 利显民, 杨成章, 陈佩君, 等. 鼻咽癌患者鼻咽组织和血清中 EBV 检测[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 2000, 14(9): 400-401.
- [10] 唐国全, 周向阳, 阳茂春. EB 病毒 IgA 滴度在鼻咽癌诊断的敏感性和特异性[J]. 广西医学, 2008, 30(6): 831-832.

(收稿日期: 2012-01-08)

(上接第 1034 页)

- [3] Omar Flores, Kerry L. Burnstein. Nuclear Targeting of Cyclin-Dependent Kinase 2 Reveals Essential Roles of Cyclin-Dependent Kinase 2 Localization and Cyclin E in Vitamin D-Mediated Growth Inhibition[J]. Endocrinology, 2010, 151(3): 896-908.
- [4] 李均, 岳瑞华, 沈钧乐, 等. CDK2 促进 K562 细胞早期红系分化[J]. 基础医学与临床, 2011, 31(5): 561-564.
- [5] 王玉玉, 王文静, 宋现让. RNA 干扰在乳腺肿瘤治疗中的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(2): 272-275.
- [6] 李士敏, 吴丽美. RNAi 技术在肿瘤研究中的应用进展[J]. 重庆医学, 2009, 38(5): 602-604.
- [7] Xue JD, Anding L, Zhuan Z, et al. siRNA inhibition of telomerase enhances the anti-cancer effect of doxorubicin in breast cancer cells[J]. BMC Cancer, 2009, 9: 133.
- [8] Xin T, Kai L, Ya JG, et al. Decreased TIP30 expression promotes

tumormetastasis in lung cancer[J]. The American Journal of Pathology, 2009, 174(5): 1931-1939.

- [9] 林伟, 罗小楠, 章翔, 等. RNA 干涉脑胶质瘤 MSP58 基因后肿瘤转移相关基因的表达变化[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2010, 9(1): 4-9.
- [10] Adam D, Judge MR, Iran T, et al. Confirming the RNAi-mediated mechanism of action of siRNA-based cancer therapeutics in mice [J]. The Journal of Clinical Investigation, 2009, 119(3): 661-674.
- [11] Quon K, Kassner PD. RNA interference screening for the discovery of oncology targets[J]. Expert Opin Ther Targets, 2009, 13(9): 1027-1035.
- [12] 施立海, 李健, 赵继宗. 人脑胶质瘤高表达 Snail 促进肿瘤细胞的侵袭[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 18(1): 80-83.

(收稿日期: 2012-01-08)