

整合蛋白 β_1 shRNA 表达质粒的构建 及其对肝癌细胞 SMMC-7721 增殖的影响

张振中¹, 张炜炜¹, 杨春霞¹, 朱珠¹, 傅奕²

(扬州大学医学院, 1. 07 级临床本科; 2. 生物化学教研室, 江苏 扬州, 225001)

摘要: 目的 应用 RNAi 技术, 构建整合蛋白 β_1 shRNA 表达质粒, 诱导肝癌细胞中整合蛋白 β_1 基因沉默, 并观察其对肝癌细胞 SMMC-7721 增殖的影响。方法 设计整合蛋白 β_1 shRNA 序列, 与载体 pSilencer 2.0 连接, 构建整合蛋白 β_1 shRNA 表达质粒。经测序鉴定后, 转染肝癌细胞 SMMC-7721, Western blot 检测整合蛋白 β_1 及 p27 的蛋白表达, MTT 方法测定转染后细胞的增殖能力。结果 成功构建了整合蛋白 β_1 shRNA 表达质粒, 转染肝癌细胞 SMMC-7721 后, 整合蛋白 β_1 的蛋白表达被明显抑制, p27 的蛋白表达也随之减少。MTT 实验结果发现转染细胞的增殖能力明显提高。结论 应用 RNAi 技术, 可特异性阻断整合蛋白 β_1 的蛋白表达。整合蛋白 β_1 可调节肝癌细胞的增殖, 并可能与 p27 的表达相关。

关键词: 整合蛋白 β_1 ; shRNA; 肝癌细胞; 细胞增殖

中图分类号: R 735.7 文献标识码: A 文章编号: 1672-2353(2010)19-0012-05

Construction of integrin β_1 shRNA expression plasmid and its regulation on proliferation in cell line SMMC-7721

ZHANG Zhen-zhong, ZHANG Wei-wei, YANG Chun-xia, ZHU Zhu, FU Yi

(07 clinical Medicine & Department of Biochemistry, Medical College of Yangzhou
University, Yangzhou, Jiangsu, 225001)

ABSTRACT: Objective To construct integrin β_1 subunit small interfering RNAs expression plasmid and to observe its influence on the proliferation in human cell line SMMC-7721. **Methods** Using RNA interference techniques, a DNA vector-driven shRNAs expression plasmid was constructed with pSilencer2.0 vector containing U6 promotor. After sequencing, this plasmid was transfected into SMMC-7721. Then the transfected cells were harvested, and the expression of integrin β_1 and p27 protein were detected by western blot. Meanwhile, the changes of cell proliferation were analyzed by MTT assay. **Results** The integrin β_1 shRNA expression plasmid was constructed successfully. After plasmid transfection, the protein amount of both integrin β_1 and p27 were reduced. Moreover, MTT assay indicated that the proliferation ability of transfected cells was enhanced compared with the negative control group. **Conclusion** shRNA expression plasmid could specifically inhibit the protein expression of integrin β_1 . Integrin β_1 could regulate the cell growth in SMMC-7721, and p27 may play an important role herein.

KEY WORDS: Integrin β_1 ; shRNA; hepatocarcinoma; cell proliferation

整合蛋白 β_1 (integrin β_1) 是细胞表面一类重要的兼具粘附和信号转导功能的受体, 与 ECM 蛋白质配体, 如纤连蛋白 (Fn) 或层粘连蛋白 (Ln) 结合后, 可将来自 ECM 或其它细胞的信号通过

FAK, ERK 和 PI3K/PKB 等信号通路传入细胞内, 从而参与细胞的增殖分化、凋亡及肿瘤细胞的迁移、浸润等^[1-2]。研究发现, 在某些肝癌细胞中, 整合蛋白的表达水平通常低于正常组织^[3],

收稿日期: 2010-05-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30800182); 江苏省高校自然科学基金资助项目(09KJB310017)

提示这种整合蛋白表达的下调可能与肿瘤细胞的快速增殖有关。作者在先前的研究中构建了整合蛋白 β_1 亚基过表达质粒, 转染肝癌细胞 SMMC-7721 后, 发现可以抑制细胞的增殖^[4]。为了更好地阐明整合蛋白 β_1 亚基在肝癌细胞中的作用机制, 在本研究中, 作者构建了 U6 启动子驱动整合蛋白 β_1 的 shRNA 表达质粒, 以抑制细胞中整合蛋白 β_1 的表达, 同时观察转染了整合蛋白 β_1 shRNA 的细胞增殖能力, 并探讨初步机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人肝癌细胞株 SMMC-7721 为本室保存。大肠杆菌 DH5 α 由扬州大学医学院预防医学教研室李湘鸣博士惠赠。pSilencer 2.0-U6 质粒及阴性对照质粒 pSilencer2.0-U6-nonsense 购自 Ambion 公司。限制性内切酶 BamH I、Hind III、DNA 胶回收纯化试剂盒均购自 TaKaRa 公司。T4 连接酶为 Progenia 公司产品。DNA marker(DL5000) 和质粒抽提试剂盒购自北京百泰克公司。脂质体转染试剂(LipofectamineTM2000) 购自 Invitrogen 公司。兔抗人整合蛋白 β_1 亚基一抗为 Epitomics 公司产品, 小鼠抗人 p27 单克隆抗体(F-8)为 Santa Cruz 产品, 辣根过氧化物标记的羊抗兔及羊抗小鼠二抗购自北京博士德公司。高糖 DMEM 干粉剂为 GIBCO 公司产品, 小牛血清购自山东银香伟业公司。

1.2 设计、合成 shRNA 靶序列

根据 GenBank (Accession number NM-002211) 中整合蛋白 β_1 亚基的序列, 利用 siRNA Target Finder 网上设计工具找到一靶序列位于整合蛋白 β_1 mRNA 序列的 318~336 之间。针对这个序列, 设计了可与之互补的寡核苷酸片段, 命名为 Int-318。其序列如下: 正义链: 5'-GATCCATCATGTGGAGAATGTATA TTCAAGAGA TATACATTCTCCACATGATTT TTTT GGAAA-3'; 反义链: 5'-AGCTTTTCC AAAA AAATCATGTGGAGAATGTATA TCTCTTGAA TATACATTCTCCACATGAT G-3'。该序列由南通百奥公司合成, 划线处分别为 BamH I 和 Hind III 的酶切位点。该序列在细胞内可以转录并形成一种“茎-环”二级结构的 shRNA(图 1)。

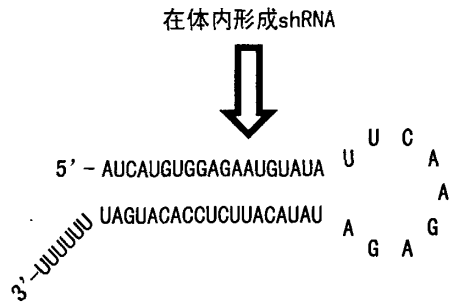


图 1 整合蛋白 β_1 shRNA 茎-环”二级结构示意图

1.3 构建整合蛋白 β_1 shRNA 重组质粒

将目的基因片段溶解于退火缓冲液中, 浓度为 75 μ mol/L。取等量的正链、负链混合并稀释至 15 μ mol/L, 置于 90 $^{\circ}$ C 恒温下反应 5 min, 自然冷却至室温, 获得 shRNA 模板, -20 $^{\circ}$ C 冻存储备用。空白质粒 pSilencer 2.0 用限制性内切酶 BamH I、Hind III, 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴中酶切过夜。然后用 1% 琼脂糖凝胶回收酶切产物, -20 $^{\circ}$ C 冻存储备用。再将线性化的 pSilencer2.0 质粒与 shRNA 模板按摩尔比 1:3 混合, 加入 T4 连接酶, 4 $^{\circ}$ C 恒温下连接 24 h。取 10 μ L 连接产物转化感受态细胞 DH5 α , 涂布于 Amp^r 抗性的 LB 平板上培养 18 h。从培养皿上挑取单克隆菌落接种于 5 mL Amp^r 抗性的 LB 培养液中培养 12 h。从菌液中抽提质粒, 用限制性内切酶 BamH I、Hind III 进行酶切鉴定。观察到所插入的小片段后, 取新鲜菌液送 Invitrogen 公司测序。证实序列正确后, 命名为 pSi-Int β_1 -318。大量扩增菌株, 抽提质粒, -20 $^{\circ}$ C 冻存储备用。

1.4 细胞培养及转染

肝癌细胞 SMMC-7721 在含有 10% 新生牛血清的 DMEM 中常规培养(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂), 取对数生长期细胞用于实验。按 Invitrogen 公司 LipofectamineTM2000 转染说明书转染细胞。转染分 3 组进行, 分别为 4 μ g 重组质粒组、6 μ g 重组质粒组以及对 照质粒 (pSilencer2.0-U6-nonsense, NC) 组。具体方法如下: 将 5 \times 10⁵ 个细胞加入无菌 6 孔培养板中, 培养 24 h 至细胞融合 90% 以上。平行配制转染试剂 Lipofectamine 的无血清 DMEM 稀释液(10 μ L 脂质体 + 250 μ L) 无血清 DMEM) 以及质粒的无血清稀释液(质粒 + 250 μ L 无血清 DMEM)。混合上述两管液体, 轻轻混匀, 室温静置 20 min 以形成 DNA-Lipofec-

tamine 复合物。与此同时弃去细胞旧培养液,换以无抗无血清的 DMEM 1.5 mL。将上述配制的 500 μ L DNA-Lipofectamine 复合物加入细胞中混合均匀,置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 细胞培养箱中孵育。孵育 6 h 后,换用含 10% 新生牛血清的完全培养液,继续培养 24 或 48 h 后,收集细胞,以备进一步检测。

1.5 Western blot

取转染后 48 h 的细胞,弃去培养液,以预冷的 PBS 洗涤 2 次,吸尽液体。加入相应体积的 1 \times SDS 蛋白裂解液,冰上放置 30 min。然后以刮棒刮下细胞,收集到 1.5 mL 离心管中。沸水浴 10 min,然后 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 10 min。吸出上清,用改良 Lowry 法进行蛋白定量。调整样品蛋白质浓度使其相等,保证每个样品孔蛋白上样量一致。蛋白质经 SDS-PAGE 后,转移至 PVDF 膜上。PVDF 膜以 5% 脱脂奶粉封闭 4 h 后,加入兔抗人整合蛋白 β_1 亚基一抗或小鼠抗人 p27 一抗过夜。经洗涤后,再加入辣根过氧化物标记的羊抗兔或羊抗鼠二抗,室温下反应 3~4 h。每步反应结束均用 PBST 洗涤 3 次,每次 10 min。最后用 ECL 化学发光,经曝光、显影、定影后,胶片晾干保存,以备分析处理。在检测目的蛋白的同时检测每个泳道中细胞骨架蛋白 α -Tubulin 的表达。 α -Tubulin 的基因是一种管家基因,在细胞中的表达量稳定,作为检测蛋白表达变化的内参。

1.6 MTT 法检测细胞增殖能力

取转染后 24 h 的细胞,用含 10% 血清的 DMEM 培养液配成单细胞悬液,以 1×10^4 个细胞/孔接种于 96 孔板。接种后 48 h,每孔加入 20 μ L MTT(5 mg/mL),继续孵育 4 h。然后弃去培养液,每孔加入 150 μ L DMSO,37 $^{\circ}$ C 振荡 10 min,使结晶充分溶解,选择波长 490 nm,用酶联免疫检测仪测定各孔吸光度值。

2 结果

2.1 连接产物的酶切鉴定

质粒 pSilencer 2.0 载体经限制性内切酶 BamH I、Hind III 双酶切后与 shRNA 模板连接,然后转化感受态细胞。获得单克隆菌落后,扩增菌株、抽提质粒,并以 BamH I、Hind III 进行酶切鉴定。2% 琼脂糖凝胶电泳可见一约 4.5 kb 及 60 bp 条带,分别与载体 pSilencer2.0 及目的片段长度一致(图 2)。测序结果表明,插入序列与设计

的整合蛋白 β_1 的 shRNA 模板完全一致。

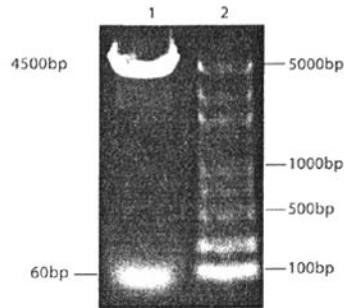


图 2 重组质粒的酶切鉴定

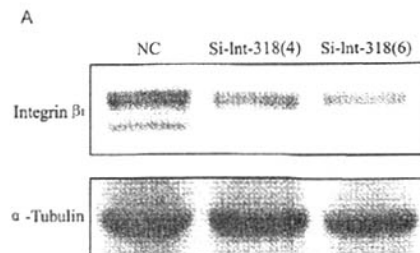
1. BamH I、Hind III 双酶切 pSi-Int β_1 -318
2. DL5000 DNA marker

2.2 Western blot 检测整合蛋白 β_1 的表达

肝癌细胞 SMMC-7721 分别转染 pSi-Int β_1 -318 4 μ g、6 μ g 质粒以及阴性对照 NC, 转染后 48 h 收集细胞蛋白,Western blot 测定整合蛋白 β_1 亚基的表达。在 western blot 结果中,整合蛋白 β_1 亚基出现 2 条带,其分子量分别为 130 kD、115 kD。迁移较快的条带(115 kD)为未成熟型或低糖基化型,一般位于内质网或高尔基体中;而迁移较慢的条带(130 kD)则属于高糖基化型,代表它的成熟形式,多数定位在细胞膜上。本组结果显示, pSi-Int β_1 -318 可显著抑制细胞内整合蛋白 β_1 的表达,尤其是低糖基化型的蛋白条带(图 3A)。转染质粒 6 μ g 时,可使蛋白表达减少 68% (图 3B)。

2.3 MTT 法测定转染 shRNA 质粒后细胞增殖能力

由上述结果得知,转染 pSi-Int-318 质粒 6 μ g 时对整合蛋白 β_1 亚基表达的抑制效率更高。故在转染 pSi-Int-318 质粒 6 μ g 24 h 后,经细胞计数,将细胞转移至 96 孔板,48 h 后进行 MTT 测定。结果发现,转染整合蛋白 β_1 shRNA 可使细



B

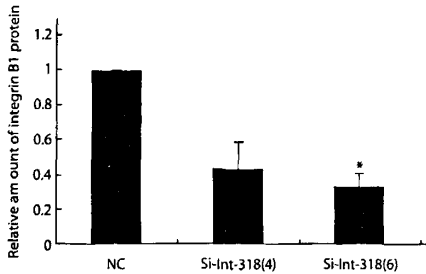


图 3 shRNA 抑制整合蛋白 β_1 亚基的蛋白表达

Si-Int-318 (4): 转染 pSi-Int β_1 -318 质粒 4 μ g;

Si-Int-318 (6): 转染 pSi-Int β_1 -318 质粒 6 μ g;

转染 pSilencer2.0-U6-NC 质粒(与 NC 相比, * $P < 0.01$)。

胞的增殖能力增加 48% (图 4), 表明抑制整合蛋白 β_1 亚基表达可促进细胞增殖, 此结果与作者先前发现的整合蛋白 β_1 亚基过表达可抑制肝癌细胞 SMMC-7721 增殖相对应。

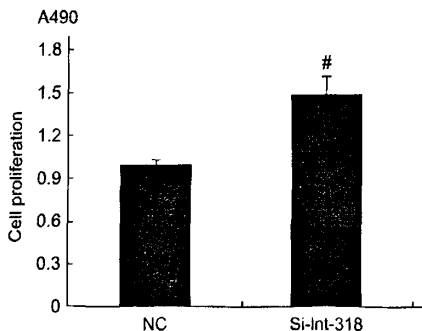


图 4 整合蛋白 β_1 siRNA 对肝癌细胞增殖的影响

NC: 转染 pSilencer2.0-U6-NC 质粒

Si-Int-318: 转染 pSi-Int β_1 -318 质粒 6 μ g

(与 NC 相比, # $P < 0.05$)。

2.4 Western blot 检测 p27 的蛋白表达

由于细胞增殖受细胞周期的精密调控, 而 p27 是一种重要的细胞周期负调控蛋白。因此, 为初步探讨整合蛋白 β_1 亚基 shRNA 促进肝癌细胞增殖的机制, 故用 Western blot 分析转染细胞中 p27 的蛋白表达情况。肝癌细胞 SMMC-7721 分别转染 pSi-Int β_1 -318 4 μ g、6 μ g 质粒, 转染后 48 h 收集细胞蛋白, Western blot 测定 p27 的蛋白表达。结果发现, 整合蛋白 β_1 siRNA 可显著抑制细胞内 p27 的蛋白表达(图 5), 此结果提示, 整合蛋白 β_1 shRNA 促进细胞增殖可能与 p27 蛋白的表达减少有关。

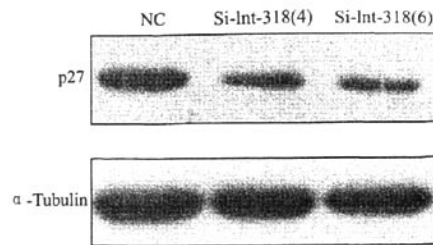


图 5 整合蛋白 β_1 siRNA 对 p27 蛋白表达的影响

NC: 转染 pSilencer2.0-U6-NC 质粒

Si-Int-318 (4): 转染 pSi-Int β_1 -318 质粒 4 μ g;

Si-Int-318 (6): 转染 pSi-Int β_1 -318 质粒 6 μ g。

3 讨论

整合蛋白是细胞表面一类重要的兼具粘附和信号转导功能的受体, 它由 α 和 β 亚基通过非共价键组成异二聚体。每种亚基都具有一个较长的胞外结构域, 一个单次跨膜结构域和一个较短的胞内结构域(除 β_4 外)^[1]。细胞外基质蛋白, 如纤连蛋白、层连蛋白和胶原等是其主要配体, 其次还有一些细胞表面分子, 可溶性蛋白等也可与整合蛋白结合^[5]。整合蛋白通过胞外肽段与 ECM, 胞内肽段与细胞骨架、信号转导分子和其它一些蛋白质相结合, 从而介导细胞内外之间的双向信息传递, 参与调控细胞增殖、分化、凋亡, 以及细胞的铺展与迁移。在细胞增殖控制方面, 整合蛋白可以通过 FAK、PI3K 或 Ras-MAPK 等信号通路调节细胞周期调控蛋白, 影响细胞生长^[2]。

细胞的增殖受到细胞周期的精密控制, 而细胞周期又受到多层次、多因子的调控。在哺乳动物细胞中, 一系列 CDK 和细胞周期素(cyclin)结合, 催化细胞周期进程。而细胞周期素依赖激酶抑制剂(cyclin dependent kinase inhibitor, CKIs)抑制 CDK 的活性或 cyclin 与 CDK 的结合, 是细胞周期的负调控因子。目前所知的 CKIs 分为两个家族: Ink4 和 Cip/Kip 家族。前者包括 p16Ink4a, p15 Ink4b, p18 Ink4c 和 p19 Ink4d, 可特异性抑制 CDK4/6 激酶和 cyclinD 的结合; 后者包括 p21Cip1、p27Kip1 和 p57Kip2, 主要抑制 Cyclin/CDK 复合物^[6]。在体内, p27 可与 cyclinD1/CDK4 及 cyclinE/CDK2 复合物结合, 特异性地抑制 cyclinE/CDK2 的激酶活性, 使细胞不能通过 G₁ 期。许多胞外的抗增殖信号都可诱导

p27 蛋白表达,导致细胞周期阻滞,从而抑制细胞增殖。p27 的蛋白表达量与肿瘤的发生、发展及预后密切相关,被看作是一种潜在的抑癌蛋白^[7]。因此在很多肿瘤增殖的相关研究中, p27 的表达调控倍受关注。

作者先前的研究已发现,在肝癌细胞 SMMC-7721 中,整合蛋白 β_1 的表达水平低于正常肝细胞^[8],而整合蛋白 β_1 亚基过表达则可抑制肝癌细胞的增殖^[4]。因此,为了进一步明确整合蛋白 β_1 亚基在肝癌细胞中的作用机制,在本研究中,作者构建了整合蛋白 β_1 shRNA 表达质粒,观察其对肝癌细胞增殖的影响,并探讨初步机制。结果发现,通过 RNAi 抑制整合蛋白 β_1 亚基蛋白表达可促进肝癌细胞增殖,此结果与整合蛋白 β_1 亚基过表达对肝癌细胞增殖的作用正好相反,也证实了整合蛋白 β_1 亚基可影响肝癌细胞的增殖。作者还发现,整合蛋白 β_1 亚基表达沉默时, p27 的蛋白表达也受到抑制,提示整合蛋白 β_1 亚基可能通过细胞周期负调控蛋白 p27 调节肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖。

利用 RNAi 技术,使得细胞中某个特定的基因沉默,深入探讨其功能和分子机制,是近年来肿瘤研究的一个十分重要的方法^[9]。RNAi 可以分为两个阶段——起始阶段和效应阶段。在起始阶段:重组质粒转染细胞后,能转录出一种可形成“茎-环”二级结构的小分子 shRNA。接着细胞内的 Dicer 酶能以一种 ATP 依赖的方式逐步切割所形成的 shRNA,并切割为 21-23 bp 的小分子干扰 RNA(siRNAs)。siRNAs 双链结合一个核酶复合物,形成 RNA 诱导沉默复合物(RISC)。在效应阶段:RISC 经历一个 ATP 依赖的解双链过程而被激活。激活的 RISC 通过碱基配对定位到同源 mRNA 转录本上,并在距离 siRNA 3'端 12 个碱基的位置上切割 mRNA,使 mRNA 发生特异性的降解,导致其相应的基因沉默。本研究中,作

者以 pSilencer2.0 线性化质粒为载体,成功构建了整合蛋白 β_1 shRNA 表达质粒,并可显著抑制肝癌细胞 SMMC-7721 中整合蛋白 β_1 的表达。这种以 DNA 为模板经细胞内转录所形成的 shRNA 具有与化学合成的 siRNA 具有同样的抑制靶基因表达作用,但这种作用更加持久^[10],这为继续深入探讨整合蛋白 β_1 亚基调控肝癌细胞增殖的机制提供了有利条件。

参考文献

- [1] Giancotti FG. A structural view of integrin activation and signaling[J]. *Dev Cell*, 2003, 4(2): 149.
- [2] Harris ES, McIntyre TM, Prescott SM, et al. The leukocyte integrins[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(31): 23409.
- [3] Yao M, Zhou XD, Zha XL, et al. Expression of the integrin alpha5 subunit and its mediated cell adhesion in hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1997, 123(8): 435.
- [4] Liang YL, Lei TW, Wu H, et al. S-phase delay in human hepatocellular carcinoma cells induced by overexpression of integrin beta 1 [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(8): 1689.
- [5] Miranti CK, Brugge JS. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction[J]. *Nat Cell Biol*, 2002, 4(4): E83.
- [6] Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression[J]. *Genes Dev*, 1999, 13(12): 1501.
- [7] Slingerland J, Pagano M. Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2000, 183(1): 10.
- [8] Zhou GF, Ye F, Cao LH, et al. Over expression of integrin alpha 5 beta 1 in human hepatocellular carcinoma cell line suppresses cell proliferation in vitro and tumorigenicity in nude mice[J]. *Mol Cell Biochem*, 2000, 207(1-2): 49.
- [9] Hannon GJ. RNA interference [J]. *Nature*, 2002, 418(6894): 244.
- [10] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells [J]. *Science*, 2002, 296: 550.