

FAK siRNA 质粒表达载体的构建及其对肺巨细胞癌细胞 FAK 基因表达的抑制

王佳曦 孟祥宁 刘改云 赵育桢 王哲 白静 傅松滨

【摘要】 目的 应用 RNA 干扰技术 构建针对 FAK 的 siRNA 表达载体 抑制肺巨细胞癌细胞 BE-1 中 FAK 的表达。方法 依据设计 siRNA 的原则 针对人 FAK 的 mRNA 序列 设计并合成编码 siRNA 的两条寡核苷酸序列 经退火成互补双链 再克隆到 pSilencerTM 2.1-U6 真核表达载体中构建重组体 pSilencer-FAK 进行测序鉴定。然后转染重组体至 BE-1 细胞中 经 G418 筛选 以空质粒转染为对照 获得稳定转染克隆 运用 Western 印迹检测 FAK 基因的表达。结果 测序证实目的寡核苷酸片段已被克隆到 pSilencerTM 2.1-U6 载体中 pSilencer-FAK 转染细胞后 FAK 基因在蛋白水平的表达量受到明显抑制。结论 成功构建了针对人 FAK 的 siRNA 表达载体 通过转染 BE-1 细胞 可有效抑制细胞中 FAK 的表达 为后续研究以及肺癌的基因治疗奠定了基础。

【关键词】 siRNA ; RNAi ; FAK ; 基因表达抑制

Construction of FAK siRNA Expressing Vector and the Inhibitory Effects on the Expression of FAK in Lung Cancer Cell WANG Jia-xi¹, MENG Xiang-ning¹, LIU Gai-yun¹, ZHAO Yu-zhen¹, WANG Zhe¹, BAI Jing¹, FU Song-bin^{1,2}. (¹Laboratory of Medical Genetics, Harbin Medical University, Harbin 150081; ²Bio-pharmaceutical Key Laboratory of Heilongjiang Province, Harbin 150081, P. R. China)

Corresponding author: FU Song-bin. E-mail: fusb@ems.hrbmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To construct the siRNA expression vector of FAK and inhibit the expression of FAK through RNA interference in lung cancer cell line BE-1. **Methods** According to the encoding sequence of mRNA of FAK, two pieces of oligonucleotide sequences were designed and synthesized. The annealed oligonucleotide fragments were subcloned into pSilencerTM 2.1-U6 siRNA expression vector. After being identified by sequencing, the recombinant plasmids pSilencer-FAK were transfected into BE-1 cells. The treated cells were selected by G418. FAK expression in the stable transfected cells was assayed by Western blot. **Results** DNA sequencing showed that the oligonucleotide fragments were correctly inserted into pSilencerTM 2.1-U6 vector, and FAK expression in the transfected cells was down-regulated significantly by pSilencer-FAK at the protein level. **Conclusion** The siRNA expression vector of FAK was successfully constructed and could inhibit FAK expression in BE-1 cells. This result will facilitate further studies of gene therapy for tumors such as lung cancer.

【Key words】 siRNA ; RNAi ; FAK ; Inhibition of gene expression

黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK), 是 1992 年 Hanks 及 Schaller 等分别在 v-Src 转染的鸡胚细胞及正常细胞中发现的一种胞浆内非受体酪氨酸

蛋白激酶(NRPTK)^{1,2,1} 在很多类型的组织细胞当中都有表达, 参与细胞的铺展、黏附、生长、迁移等生物学功能; 在多种肿瘤中高表达或活性增强, 对肿瘤的发生、发展、侵袭转移等起重要的调节作用, 因此受到越来越多学者的关注。RNA 干扰(RNA interference, RNAi) 是近年发现的一种重要基因沉默技术, 又称转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)^{3,1}。其中最关键的效应分子是具有 21 ~ 23nt 个碱基的小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA), 它可以序列特异性地结合靶 mRNA 序列, 导致特异 mRNA 的降解。siRNA 表达载体可以转录产生

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)项目(No. 2001CB510300); 国家高技术研究发展计划(863)计划(No. 2002BA711A08); 国家自然科学基金资助项目(No. 30471949); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(No. 20040226001); 黑龙江省教育厅科技指导性项目(No. 10543022)

作者单位: 150081 哈尔滨医科大学医学遗传学研究室(王佳曦、孟祥宁、刘改云、赵育桢、王哲、白静、傅松滨); 150081 哈尔滨 黑龙江省生物医药工程重点实验室(傅松滨)

通讯作者: 傅松滨 E-mail: fusb@ems.hrbmu.edu.cn

短发卡状 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 在体内进一步被切割形成 siRNA 发挥干扰作用, 能够稳定持续地维持较长时间的基因沉默^[4]。本研究利用 RNA 干扰技术, 以 *FAK* 为靶基因、pSilencer™ 2.1-U6 真核表达载体为基础, 构建针对 *FAK* 的 siRNA 表达载体, 并转染肺巨细胞癌 BE-1, 旨在实现对 *FAK* 表达的抑制, 并为进一步研究和将此技术应用于肿瘤治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料:

1.1.1 细胞株、菌株及质粒 肺巨细胞癌细胞系 BE-1 购自北京大学医学院病理教研室; 大肠杆菌 Top10 菌株 (Invitrogen); pSilencer™ 2.1-U6 真核表达载体 (Ambion)。

1.1.2 主要试剂 RPMI 1640 培养基 (GIBCO), 胎牛血清 (Hyclone), G418 (GIBCO BRL), FuGENETM6 转染试剂 (Roche), T4 DNA 连接酶 (Invitrogen), 质粒 DNA 提取纯化试剂盒 (Promega), 羊抗人 β -actin 单克隆抗体 (Santa Cruz), 鼠抗人 *FAK* 抗体 (Upstate), HRP 标 IgG 二抗 (北京中山)。

1.2 方法:

1.2.1 siRNA 序列设计 在 NCBI 数据库中查找 *FAK* 的 mRNA 全序列, 从 *FAK* 编码区中寻找符合设计原则的靶序列, 通过 BLAST 软件确定与其他非相关基因无同源性, 按照 pSilencer™ 2.1-U6 载体的要求设计能编码 siRNA 的寡核苷酸链。寡核苷酸序列两端包含酶切位点, 能直接与经相同酶切的 pSilencer™ 2.1-U6 载体连接。设计的 siRNA 寡核苷酸序列如下:

正义链 5'-GATCCGCATGTGGCCTGCTATGGATTCAA
GAGATCCATAGCAGGCCACATGCTTTTTTGGAAA-3';

反义链 3'-CGCTACACCGGACGATACCTAAGTTCTCT
AGGTATCGTCCGGTGTACGAAAAACCTTTTCGA-5'。

寡核苷酸单链由上海英骏公司合成。

1.2.2 siRNA 表达载体的构建 ①将合成的每条 Hairpin siRNA 寡核苷酸单链稀释至 $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$; ②Hairpin siRNA 寡核苷酸单链退火成双链: 取正义 Hairpin siRNA 寡核苷酸单链与反义 Hairpin siRNA 寡核苷酸单链各 $2\mu\text{L}$, 加入 $46\mu\text{L}$ $1\times$ DNA 退火缓冲液, 混匀、离心后 90°C 加热 3min, 37°C 孵育 60 min; ③连接反应以及阳性克隆的鉴定: 取退火的寡核苷酸 $1\mu\text{L}$, pSilencer™ 2.1-U6 载体 $1\mu\text{L}$, $1\mu\text{L}$ T4 DNA 连接酶缓冲液, $6\mu\text{L}$ H_2O 在 $1\mu\text{L}$ T4 DNA 连接酶的作用下于 16°C 连接 8~16h。将重组载体转入大肠杆菌 TOP10 中

进行扩增。提取质粒, PCR 验证后测序。

1.2.3 细胞转染及单克隆细胞株的筛选 BE-1 细胞用 RPMI 1640 (含 10% 新生牛血清), 在 37°C 5% CO_2 条件下培养。将对数生长期细胞于转染前 24h 接种于 6 孔板, 取 pSilencer™ 2.1-U6 空载体和 pSilencer-*FAK* 重组体质粒 DNA 分别转染 BE-1 细胞, 转染方法参照 FuGENETM6 转染试剂操作说明进行, 转染 72h 后用 G418 (浓度 $60\mu\text{g}/\text{mL}$) 晒选, 3w 后挑取阳性克隆细胞株, 扩大培养, 分别建立表达 pSilencer™ 2.1-U6 空载体和表达 shRNA 的单克隆 BE-1 细胞株, 分别命名为 pSilencer-control、pSilencer-*FAK*-1、pSilencer-*FAK*-2、pSilencer-*FAK*-3。

1.2.4 蛋白质提取和 Western 印迹 将对数生长期的细胞用 PBS 冲洗, 以细胞刮收集细胞并转移至离心管中, $5000\text{r}/\text{min}$ 离心 10 min 后弃上清, 根据细胞量加入适量的 RIPA Buffer (RIPA buffer, 含 50mmol/L Tris-HCl, pH7.5; 2.0mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride; 5.0mmol/L EDTA; 0.1% SDS, 150mmol/L NaCl; 1% NP-40, 0.5% DOC)。临用前加入适量的蛋白酶抑制剂, 混匀后冰上放置 30min, 4°C , $15000\text{r}/\text{min}$ 离心 20min, 吸取上清至新管中, DU640 核酸/蛋白分析仪 (BECKMAN) 测定蛋白质浓度。取 $60\mu\text{g}$ 左右的总蛋白样品与等体积上样缓冲液混合, 沸水浴 5min, 待完全冷却后, 上样, 进行 SDS-PAGE (5% 积层胶、10% 分离胶) 电泳。300mA 恒流转移 2h, 将凝胶中的蛋白质转移至 PVDF 膜上。用 TBS-T 液洗膜 3 次, 5min/次, 加入特异性一抗, 室温下杂交 1~2 h; TBS-T 液洗膜 3 次, 5min/次; 加入相应的特异性 HRP-二抗, 室温下杂交 1h, TBS-T 液洗膜 4 次, 5min/次。按照 ECL 试剂盒 (Amersham) 检测说明书提供的方法将 1:1 比例混好的 A、B 液混合物滴加到蛋白面的 PVDF 膜上, 室温避光显色 1min, 用保鲜膜包好 PVDF 膜, 将蛋白面向上固定于暗盒中, 在暗室中压片、化学发光自显影、洗片。鼠抗人 *FAK* 一抗 (Upstate) 工作浓度为 1:2000, 羊抗人 β -actin 单克隆抗体 (Santa Cruz) 工作浓度为 1:200, 羊抗鼠 IgG 二抗 (北京中山) 工作浓度为 1:2000, 兔抗羊 IgG 二抗 (北京中山) 工作浓度为 1:2000。

2 结果

2.1 重组质粒测序鉴定: 将重组质粒 pSilencer-*FAK* 送上海英骏公司测序 [测序号为: H10-B070 2106.MENC(2).M13F] 结果表明针对人 *FAK* 的 siRNA 表达模板成功构建于 pSilencer™ 2.1-U6 载体上, 序列 (阴影部分) 完全正确, 与目的序列相同 (见图 1)。

```

1 CGCACCACGTGACGGAGCGTGACCGCGCGCCGAGCGCGGCCAAGGTGCGGCAGGAAGAGGGCCTATTTTC
71 CCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGT
141 AAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTA
211 AAATTATGTTTTAAATGGACTATCATATGCTTACCCTAACCTTGAAAGTATTTCCGATTTCTTGGGTTTAT
281 ATATCTTGTGGAAGGACCGCG GATCCGCATGTGGCCTGCTATGGATTCAAGAGATCCATAGCAGGCCAC
351 ATGCTTTTTTTGGAAA AGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAAATTGTTATCCGCTCA
421 CAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACT
491 CACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGA
561 ATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGCTATTTGGGCGCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGC
631 TCGCTCGGTTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGA
701 ATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCC
771 GCGTTGTGCGGTTTTTCCATAGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAG
841 GTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGCGCTTTCCCTGAAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCT
911 GTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATA
981 GCTCACGCTGAAGTATCTCAGTTCCGGTGTAAAGTCCGTCGCTCCAGCTGGCTGGGTGCACGAACCCCGC
1051 TCAGCCCACGCTGGCGCTTATCCGTACTATCGTCTTGAGTCAACCTGTAAGACCGACTATCGCCACTGC
1121 AGCAGCCACTGTTAACAGGATTAGCGAAGCGAAGTATGCAACCGGTCTACAGATTCTGGAGGGCTACTAC
1191 GCTACTAAAAACATATTTGAATTCGTGC

```

图 1 siDNA 重组质粒测序结果

Fig. 1 Sequencing of siRNA recombinant plasmids

阴影标示的部分为插入序列

Shadow shows insertion

2.2 Western 印迹：各组间 β -actin 的蛋白水平表达无明显差异，说明各组蛋白总的点样量基本一致。转染 pSilencer-FAK 组 FAK 蛋白条带较阴性对照质粒组明显减弱（见图 2）。

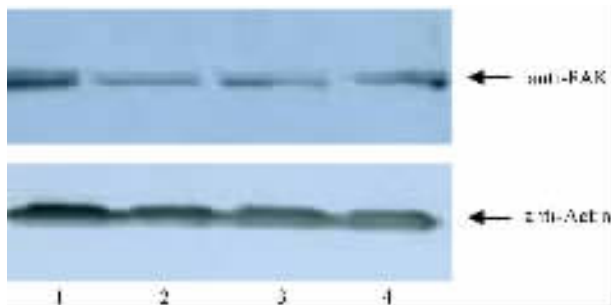


图 2 siRNA 对 FAK 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of siRNA transfection of FAK protein levels

1~4: pSilencer-control, pSilencer-FAK-1, pSilencer-FAK-2, pSilencer-FAK-3

3 讨论

1998 年，华盛顿卡耐基研究院的 Fire 等^[5]将正义链和反义链混合而成的双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 纯化后注射给线虫，发现这种 dsRNA 比单独的正义 RNA 或反义 RNA 具有更高效的特异性基因沉默效应。并且证实，注射 dsRNA 后，不但会引起线虫本身的基因沉默，还会在其子代中也引起相应基因的沉默。他们将这种现象命名为 RNAi。

自从 2001 年 Elbashir 等^[6]用 siRNA 在哺乳动物细胞中成功引发特异基因的沉默后，RNAi 技术以其高度的序列特异性、抑制基因表达的高效性、基因沉默的放大效应以及维持效应的长久性等优势特征，广泛地应用于基因功能的研究领域。

RNAi 的作用机制目前还不是十分清楚，包括起始阶段和效应阶段 (initiation and effector steps)。首先是进入细胞内的长片段 dsRNAs 被核酶 Dicer 切割成 21~25 个核苷酸的 siRNA。这些 siRNA 随后和相关蛋白组合成为 RNA 诱导沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC)，RISC 以同源 mRNA 为靶目标摧毁 mRNA，对 mRNA 的表达具有高效干扰作用。RNAi 能够非常特异地降解与之序列相应单个内源基因 mRNA，且抑制基因表达效率很高，相对少量的 dsRNA 就可以使表型达到缺失突变体程度。RNAi 能高效特异的阻断基因的表达，为基因功能的研究提供了经济、快捷、高效的技术手段，是研究基因功能的重要工具，并且逐步成为对病毒性疾病、遗传性疾病以及肿瘤等进行基因治疗研究的一种手段^[7]。

RNAi 的关键效应分子是 siRNA，目前较为常用制备 siRNA 的方法包括下列 5 种：化学合成 siRNA、体外转录合成 siRNA、用 RNase III 消化长片段 dsRNA 得到 siRNA、PCR 方法制备 siRNA 表达框架、利用质粒或病毒载体表达 siRNA。其中利用质粒或病毒表

达 siRNA 的方法是通过转染含有 RNA 聚合酶 III 启动子 U6 或 H1 及其下游一小段特殊结构的质粒或病毒载体到宿主细胞体内, 转录出 shRNA, shRNA 在胞内被 Dicer 酶剪切成 siRNA 而发挥作用。该方法的优点是转染筛选后可以稳定表达, 因此适用于长时间的干扰研究。本研究利用 U6 RNA 聚合酶 III 启动子, 指导转录出 3' 端突出包括一茎环的发夹结构, 此发夹状 RNA 将被 Dicer 酶处理为 siRNA, 构建的质粒转染细胞后, siRNA 将持续产生, 并通过识别、降解具有同源序列的 mRNA 最终干扰目的基因的表达^[8], 同时载体上引入新霉素 (neo) 抗性标记利于筛选含有 siRNA 的克隆, 进而对阳性细胞扩大培养可获得稳定表达 siRNA 的细胞株。

FAK 是非受体酪氨酸激酶 FAK 家族成员之一, 在很多类型的组织细胞中都有表达^[9]。在人类肿瘤标本和肿瘤来源的细胞系中, FAK 的表达增加, 这与肿瘤细胞的迁移力、侵袭力和增殖能力的增强有关^[10]。因此, FAK 受到越来越多的研究者的关注。用反义寡核苷酸、siRNA 或过表达 FAK 相关非激酶 (FAK-related nonkinase, FRNK) 抑制 FAK 的功能, 都可以使细胞的迁移、侵袭、生长和增殖能力受到抑制^[11]。Orr 等^[12]将 FAK Y397F 转染入内皮细胞, 由于 FAK 自主磷酸化部位 Y397 突变, 致使 FAK 无法活化, 从而起到阻断作用。Sakurai 等^[13]发现在恶性的星型胶质瘤细胞 T98G 中, Y397 突变的 FAK 可以通过抑制 PI3-K 信号通路、激活 caspase-6 而促进细胞的凋亡。Leyton 等^[14]用蛙皮素处理非小细胞肺癌细胞 H1299, FAK 磷酸化程度增高且细胞的增殖能力增强; 而反义 FAK 寡核苷酸处理后, 细胞的增殖能力降低。Hauck 等^[15]也报道, 针对 FAK 的反义寡核苷酸可以抑制肺腺癌细胞 A549 的侵袭能力。FAK 在肿瘤细胞中是如何调节生长因子和整合素信号的具体机制还不清楚, 但可以肯定的是, 作为多种信号通路的枢纽, FAK 参与细胞多种功能的调节^[16], 其表达量及活性的改变必然引起肿瘤细胞移动性、侵袭性、生长和增殖能力的改变。本研究构建了针对人 FAK 的 siRNA 表达载体 pSilencer-FAK, 该载体转染进肺巨细胞癌 BE-1 细胞内持续表达 siRNA, 用 Wesrem 印迹方法检测表明, FAK 蛋白的表达水平明显降低。实现了对 FAK 表达的抑制, 为进一步研究提供了可靠保障, 并且为 RNAi 技术应用于肿瘤治疗奠定基础。

参 考 文 献

- Hanks SK, Calalb MB, Harper MC, *et al.* Focal adhesion protein tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89: 8487 - 8491.
- Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, *et al.* PP125FAK, a structurally distinctive pro- teintyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 1992, 89: 5192 - 5196.
- Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, *et al.* RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol MolBiol Rev*, 2003, 67: 657.
- Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet*, 2001, 2: 110 - 119.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391: 806 - 811.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 2001, 15: 188 - 200.
- Silva J, Chang K, Hannon GJ, *et al.* RNA-interference-based functional genomics in mammalian cells: reverse genetics coming of age. *Oncogene*, 2004, 23: 8401 - 8409.
- Sui GC, Soohoo C, Shi Y, *et al.* A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99: 5515 - 5520.
- Parsons JT. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Science*, 2003, 116: 1409 - 1416.
- Slack JK, Adams RB, Rovin JD, *et al.* Alterations in the focal adhesion kinase/Src signal transduction pathway correlate with increased migratory capacity of pro- state carcinoma cells. *Oncogene*, 2001, 20: 1152 - 1163.
- Hanks SK, Polte TR. Signalling through focal adhesion kinase. *Bioessays*, 1997, 19: 137 - 145.
- Orr AW, Pallero MA, Xiong WC, *et al.* Thrombospondin Induces RhoA Inactivation through FAK-dependent Signaling to Stimulate Focal Adhesion Disassembly. *J Biol Chem*, 2004, 279: 48983 - 48992.
- Sakurai S, Sonoda Y, Koguchi E, *et al.* Mutated focal adhesion kinase induces apoptosis in a human glioma cell line, T98G. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 293: 174 - 181.
- Leyton J, Garcia-Martin LJ, Tapia JA, *et al.* Bombesin and gastrin releasing peptide increase tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Lett*, 2001, 162: 87 - 95.
- Hauck CR, Hsia DA, Puente XS, *et al.* FRNK blocks v-src-stimulated invasion and experimental metastases without effects on cell motility or growth. *EMBO J*, 2002, 21: 6289 - 6302.
- Ilic D, Damsky CH, Yamamoto T, *et al.* Focal adhesion kinase at the crossroads of signal transduction. *J Cell Sci*, 1997, 110: 401 - 407.

(收稿日期 2006-02-20)

(本文编辑:高巍)