

特异小干扰 RNA 敲除 *PLK 1* 基因的表达

陈功星^{1,2}, 董庆华¹, 张佳炜¹, 符芳芳¹, 许则丰¹, 梁巧仪¹, 郑 树¹, 丁佳逸¹

(1. 浙江大学第二附属医院肿瘤研究所, 杭州 310009; 2. 浙江新和成股份有限公司, 新昌 312500)

摘要:为了研究特异小干扰 RNA (siRNA) 作用于大肠癌细胞株 SW480 中 *PLK 1* (Polo-like kinase 1) 基因表达的 mRNA 对该细胞分裂生长的影响, 设计了对应于 *PLK 1* 基因表达 mRNA 不同位点的 10 种特异 siRNA, 经化学合成后, 用脂质体转染 SW480 细胞, 实时定量 PCR 检测 *PLK 1* 基因的表达, 观察不同的 siRNA 作用强度, 并计数细胞了解相应细胞的生长情况, Western-blot 观察 *PLK 1* 表达蛋白的变化和流式细胞计数分析细胞周期改变。发现 10 种 siRNA 均可敲除 *PLK 1* 基因表达的 20% 以上, 其中 P1、P4 和 P9 3 组敲除 mRNA 达 80% 以上, 这 3 种 siRNA 及其混合物对 *PLK 1* 基因 mRNA 的作用具有相应浓度效应, 在 25 nmol/L 时达到最佳作用效果, 而且相同浓度的混合物作用效果更好 (超过 95%), *PLK 1* 表达蛋白质明显降低, 细胞周期在 G₂ 期受到阻碍。72 h 后的各种 siRNA 浓度下细胞生长变化与 *PLK 1* 基因的 mRNA 水平变化相一致。结果表明化学合成的特异 siRNA 对 SW480 细胞中 *PLK 1* 基因表达具有消除作用, 混合物作用更强, 在细胞水平上抑制了 SW480 细胞的分裂生长。

关键词:小干扰 RNA; *PLK 1*; 基因表达

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2006)01-0021-05

Knockdown of *PLK 1* mRNA by Special siRNA

CHEN Gong-Xing^{1,2}, DONG Qing-Hua¹, ZHANG Jia-Wei¹, FU Fang-Fang¹,

XU Ze-Feng¹, LIANG Qiao-Yi¹, ZHENG Shu¹, DING Jia-Yi¹

(1. Cancer Institute, The 2nd Affiliated Hospital, Medical college, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China;

2. Zhejiang NHU Limited Corporation, Xinchang 312500, China)

Abstract: To study knockdown effect of small interfering RNA (siRNA) to *PLK 1* (Polo-like kinase 1) mRNA in colorectal cancer cell line SW480 and its mitosis and growth was changed. Ten special siRNA molecules were designed targeting different sites of *PLK 1* mRNA sequence and chemically synthesized. The siRNA molecules were transfected into SW480 by Oligofectamine. The gene mRNA level was assayed by Real-Time PCR. The changes of *PLK 1* protein, SW480 cell cycle and survival percentage was checked by Western-blot, Flow cytometry and Cell counter assays respectively. All 10 siRNA molecules knocked *PLK 1* mRNA down in different level. Of them P1, P4 and P9 showed over 80% knockdown efficiency and the others had more than 20% knockdown efficiency to *PLK 1* mRNA. The best knockdown effect over 95% of all groups was at 25 nmol/L of a mixture with P1, P4 and P9 siRNA equally. In this situation the protein was very less and the cells were blocked at G₂ phase of cell cycle. After 72 h cell survival percentages were consistent with *PLK 1* mRNA level change by siRNA gradient concentration. The results showed that siRNA targeting *PLK 1* mRNA had effectively knocked *PLK 1* mRNA down in SW480 cell line. And a blended siRNAs held the best knockdown effect. The cell was blocked on the mitosis and growth.

Key words: small interfering RNA; Polo-like kinase 1; gene expression

收稿日期: 2005-02-22; 修回日期: 2005-06-24

基金项目: 国家自然科学基金资助 (编号: 30471943) [Supported by grant of National Natural Science Foundation of China (No. 30471943)]

作者简介: 陈功星 (1966—), 男, 博士后, 研究方向: 肿瘤学。Tel: 0571-87027427; E-mail: chgxing@zju.edu.cn

通讯作者: 丁佳逸 (1963—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 肿瘤学。Tel: 0571-87783509; E-mail: DJY@zju.edu.cn

从基因到蛋白的生物信息传递途径中,存在着多种调控方式,其中转录后的 mRNA 丰度调节,是基因调控的一个重要环节。RNA 干扰(RNAi)是近年来发现的一种普遍存在于生物界细胞中调节 mRNA 的生物学现象,已被用来人为的干预基因的表达,成为抵御病毒或者其他遗传物质侵袭的重要手段。随着人类基因组工程的完成和蛋白组工程的发展,基因的功能意义逐渐明确,其中与生长有关的基因过表达,可以导致象肿瘤一类严重疾病的产生,通过负调控这类基因的表达,能够起到相应的治疗作用。由于 RNAi 作用的高效、特异和持久性,它已成为当今基因功能研究中不可缺少的一个工具,同时也为治疗病毒感染、肿瘤带来了新的希望^[1~3]。PLK1(Polo-like kinase 1)基因表达产物是细胞周期核蛋白,在许多的人类恶性肿瘤(例如肺癌、乳腺癌、结肠癌等)的表达中明显增加,提示其在某些恶性肿

瘤的发生发展中起重要作用^[4,5]。本文将从 PLK1 基因 mRNA 序列的不同位点设计合成 siRNA,在大肠癌细胞株 SW480 中探讨 siRNA 分子对该基因表达的敲除作用,以及由此引起的肿瘤细胞分裂生长方面的改变。

1 材料和方法

1.1 siRNA 设计合成

10 种 siRNA 根据 Tuschl 博士的原则而设计,特异的与 PLK1 基因 mRNA 碱基序列配对,而与其他核苷酸链同源性低于 80%,G/C 含量在 30%~70% 之间,并在每条单链的 3' 端外挂两个 T 碱基,再与编码链形成双链(<http://www.rockefeller.edu/lab-heads/tuschl/siRNA.html>),然后由 Dharmacon 公司合成(表 1),用 0.1% 的 DEPC 水稀释至浓度 20 $\mu\text{mol/L}$, -20°C 保存。

表 1 小干扰 RNA 双链

Table 1 small interfering double-strand RNA

组别 Group	编码链 Sense strand (5'→3')	配对链 Antisense strand(5'→3')	mRNA 位置* mRNA site*
P1	GAUUGUGCCUAAGUCUCUGTT	CAGAGACUUAGGCACAAUCTT	306~326
P2	AGCCUCGACUGAGCCUGAGTT	CUCAGGCUCAGUCAGGGCUTT	499~519
P3	AUUGUGCUUJGGCUGCCAGUTT	ACUGGCAGCCAAGCACAAUTT	539~559
P4	UGAAGAUCUGGAGGUGAAATT	UUUCACCUCCAGAUCUUCATT	617~637
P5	AGAGCACAGUUJCGAGGUGTT	CACCUCGAAACUGUGCUCUTT	739~759
P6	AAGAGACCUACCUCCGGAUTT	AUCCGGAGGUAGGUCUCUUTT	830~850
P7	GGUUUCGUAUJGCUCCAGTT	CUGGGAGCAAUCGAAAACCTT	1031~1051
P8	GAGGAGGCUGAGGAUCCUGTT	CAGGAUCCUCAGCCUCCUCTT	1253~1273
P9	GAUCACCCUCCUAAAUAUTT	AUAUUUAAGGAGGGUGAUCTT	1506~1526
P10	CGGCAGCGUGCAGAUCAACTT	GUUGAUCUGCACGUCGCCGTT	1642~1662

* :表示 siRNA 的 5' 端距离蛋白质翻译起始密码子 AUG 位点。

* : means a distance from 5'-frank of siRNA to the origin of protein translation starting code AUG.

1.2 细胞培养和转染

大肠癌细胞株 SW480 培养于含 10% 小牛血清的 RPMI1640 (100 U/mL 青霉素, 100 U/mL 链霉素) 中,生长呈对数期状态备用。细胞 5×10^4 接种于 24 孔细胞培养板中。培养 24 h 后,用 Oligofectamine 转染剂将 siRNA 导入细胞。在 1.5 mL 的 eppendorf 管中将 7.5 μL 的 oligofectamine 加入 10.5 μL 的 RPMI1640 中,混匀室温放置 5~10 min,

分别将一定量的 10 种 siRNA 加入到 RPMI1640 至体积 102 μL ,再混合两种溶液,室温放置 20~30 min;弃尽细胞孔的培养基,加入 480 μL 含 10% 小牛血清的 RPMI1640,然后加入制备好的上述转染试剂,空白组仅用转染试剂,一式 3 份,混匀,置细胞培养箱中。

1.3 RNA 提取

用 Trizol 试剂提取总 RNA。弃尽培养液后,每

孔加入 0.5 mL 的 Trizol 试剂,反复吹打,转移至 1.5 mL 的 eppendorf 管中,加入 0.2 倍体积的氯仿,振荡混匀 15 s,室温放置 5 min 后,4℃ 条件下 15 000 g 离心 15 min,吸上清至另一 eppendorf 管中,加入等体积的异丙醇,混匀后室温放置 10 min,4℃ 条件下 15 000 g 离心 10 min,弃上清,沉淀加 75% 乙醇,7 500 g 离心 5 min 洗涤 2 次,室温放置 10 min 左右,加入 10 μ L 的 0.1% DEPC 水溶解,260 nm 测光密度,用 40 μ g/mL/OD 计算 RNA 浓度,然后用 0.1% DEPC 水调节浓度至 200 ng/ μ L, -20℃ 保存备用。

1.4 逆转录合成 cDNA 和实时定量 PCR

cDNA 合成用 Invitrogen 公司所提供的 Superscript™ 逆转录试剂盒进行,其过程简述如下:取 10 μ L 上述 RNA,加入 1 μ L 的 50 mmol/L ligodT,70℃ 变性 10 min,立即置冰上 2 min,离心。然后加入 9 μ L 混合试剂:4 μ L 5 \times 1 Strand buffer、2 μ L 0.1 mol/L DTT、1 μ L dNTP、1 μ L RNase inhibitor、0.5 μ L SSTR2、0.5 μ L 1% DEPC 水,在 42℃ 水浴 52 min,然后 70℃ 水浴 15 min 终止反应,再加入水 80 μ L,置冰箱保存。实时定量 PCR 按照文献方法,50 μ L 反应体系中含有 *PLK1* 基因上游引物(5'-CAAGCT-CATCTTGTGCCCACT-3')和下游引物(5'-AGGCGG-TATGTGCGGAAGT-3')各 0.3 μ mol/L, FAM 标记探针(5'-CCGCTTCTCGTCGATGTAGGTCAAG-3') 0.2 μ mol/L; 2.5 μ L 20 \times Human GAPDH; 25 μ L 2 \times PCR master mix(PE 公司); 10 μ L 上述 cDNA; 加水补足体积。然后在定量 PCR 反应仪 7700(PE 公司)进行,反应条件为:50℃ 预变性 2 min; 95℃ 变性 10 min; 95℃ 变性 30 s; 60℃ 退火 1 min,扩增 40 个循环。然后以内参照 GAPDH 基因相对定量 *PLK1* 基因表达。

1.5 Western blot 分析

参照试剂盒说明,用蛋白提取试剂盒(PERCE 公司)分别提取空白组与处理组中蛋白, SDS-PAGE 上样电泳,转膜(Millipore 公司),脱脂奶粉封闭,兔抗 *PLK1* 抗体(BETHYL 公司)和山羊抗 Actin(Santa Cruz 公司)分别结合,再结合相应的辣根过氧化物酶标记的二抗,然后显色(PERCE 公司),X 光片曝光。

1.6 细胞流式分析

按照流式细胞仪(FACSCan, BD 公司)使用说明,48 h 后胰酶消化处理细胞, PBS 洗涤,细胞经 70% 酒精固定过夜,离心沉淀,加入 PBS 缓冲液 490

μ L, Annexin-V 5 μ L 和 PI 5 μ L, 暗处冰上反应 10 min, 上机检测不同周期分布细胞, CellQuest 软件分析。72 h 后的细胞同样经胰酶消化, 经台盼兰试剂染色计数活细胞。

2 结果

2.1 10 种 siRNA 敲除 *PLK1* 基因表达的效果

相应的 10 种 siRNA 处理 SW480 细胞后, *PLK1* 基因表达 mRNA 的量相对空白对照, P1、P4 和 P9 号 siRNA 分子对 *PLK1* 的抑制作用最为明显, 分别达到 91%、94% 和 89%。另外, P2、P3、P5、P7 和 P8 对 *PLK1* mRNA 的抑制作用也大于 50%, 而 P6 和 P10 对 *PLK1* mRNA 的也有相当的抑制作用(图 1)。

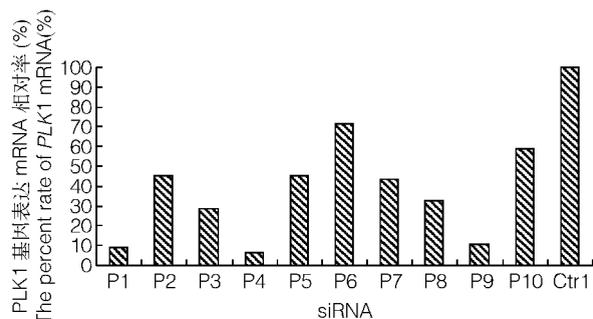


图 1 10 种 siRNA 对 SW480 细胞 *PLK1* 表达 mRNA 水平的作用

Fig.1 The knockdown effect of *PLK1* mRNA by ten siRNAs in SW480

2.2 浓度梯度作用效果

为了观察以上对 *PLK1* mRNA 具有最佳抑制效果的 P1、P4 和 P9 号 siRNA 对 *PLK1* 作用的浓度效应,我们选择了浓度从 0.1 nmol/L 到 50 nmol/L siRNA 以及这 3 种混合物 siRNAs(总浓度与上述浓度相等,每种 siRNA 各占 1/3)。48 h 后发现 3 种 siRNA 对 *PLK1* 的 mRNA 抑制作用具有明显的浓度效应,随着浓度的增加敲除 *PLK1* 基因 mRNA 效果逐渐加强,3 种混合物 siRNAs 在 25 nmol/L 时作用效果达到最好(超过 95%),而且比单独使用相同浓度一种 siRNA 的抑制作用更强(图 2)。而 72 h 后细胞数表现与 *PLK1* 基因的 mRNA 水平一致,也就是说,细胞的生长繁殖也体现了针对 *PLK1* 基因的 siRNA 浓度效应(图 3)。

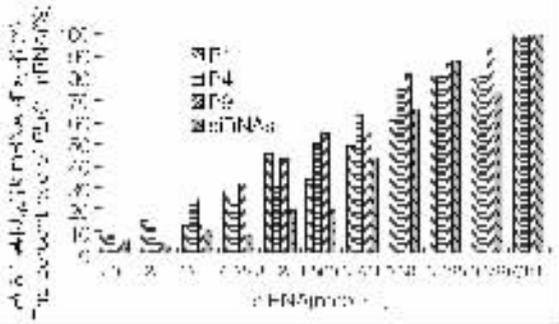


图2 不同的 siRNA 对 SW480 细胞 PLK1 mRNA 水平作用的浓度效应

Fig.2 The knockdown effect of PLK1 mRNA by siRNA on concentration grade in SW480

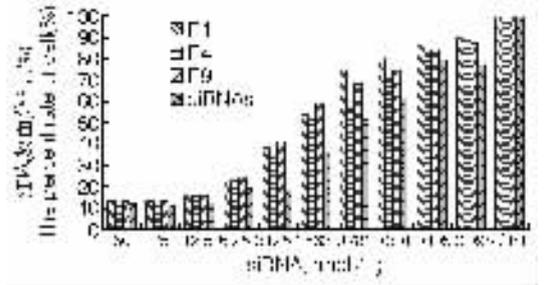


图3 梯度浓度的 siRNA 对 SW480 细胞中 PLK1 mRNA 作用后细胞生长效应

注:图中纵坐标表示活细胞相对百分率,图中的每一个数据表示3个平行管均值对比空白组的百分率,作用时间为72 h。

Fig.3 The cell growth effect after PLK1 mRNA was knocked down by siRNA on grade concentration in SW480

The y-axis means a relative expression of live cell. The column is a related percentage of the triplicate average to a control. The treatment time was 72 h.

2.3 PLK1 蛋白和细胞周期变化

3 种混合物 siRNAs(P1, P4 和 P9)在 25 nmol/L 浓度 48 h 内,敲除了 95% 以上的 PLK1 基因表达的 mRNA,PLK1 表达的蛋白质也出现相应的改变,siRNAs 组 PLK1 几乎没有检测到(图 4),对该组细胞进行流式细胞分析,发现处理组细胞发生了细胞分布周期右移现象,G₁ 期下降(从 71.38% ~ 55.54%),G₂ 期升高(从 9.15% ~ 25.9%),S 期看不出变化,整个细胞与空白对照比较有显著性统计学差异(P = 0.007 < 0.01, χ^2 检验)(图 5)。

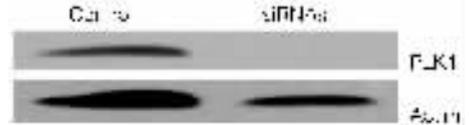


图4 siRNAs 处理 48 小时后 SW480 细胞蛋白印迹分析

Fig.4 The western blot of the SW480 protein treated for 48 h

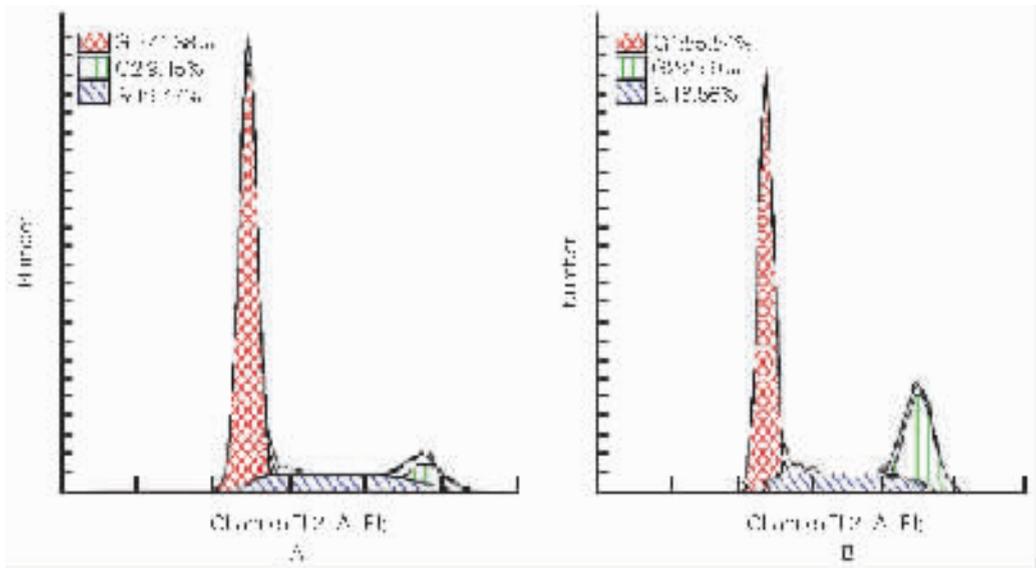


图5 siRNAs 处理细胞 48 h 后细胞周期变化

A: 空白对照;B: siRNAs 处理组。

Fig.5 The change of cell cycle after siRNAs treated for 48 h

A: Blank control;B: siRNAs treatment.

3 讨论

最近由 RNA 直接参与的基因表达调控受到了

重视,其中短双链小 RNA(dsRNA)干扰是目前最热门的科研课题之一[7],dsRNA 的作用原理,已有的研究推测:首先进入细胞的 dsRNA 与一种 RNase III 家

族 Dicer 酶结合,并被分解为更小的约 22 个核苷酸的 siRNA, siRNA 与多种酶形成 RNA 诱导沉默复合物(RISC),然后 ATP 活化,由 siRNA 指导选择 mRNA 进行剪切,降解 mRNA 导致该基因表达的下调^[1,3]。根据这个原理,人为的直接化学合成或者间接的转录产生约 22 个核苷酸 siRNA,实行对转录后 mRNA 的降解,成为了基因表达调控的新技术^[2]。已经了解到一些基因的异常表达,是许多重大疾病发生发展的根本原因^[8]。肿瘤发生发展中的多种影响因素,导致肿瘤相关基因的表达异常,通过对肿瘤正相关基因表达的抑制,可以起到抑制肿瘤的发生和发展^[9]。*PLK1* 基因编码产物是一种新型的丝氨酸/苏氨酸的蛋白激酶,和细胞周期密切相关,尤其是在肿瘤细胞的迅速分离和增殖中至关重要^[10],在许多人类恶性肿瘤的发生发展中起重要作用^[4,5]。Liu 等^[11]用质粒 pBS/U6 重组 *PLK1* 基因 mRNA 片段 DNA 序列,以及 Spankuch-Schmitt 等^[12]用化学合成一定部位的 siRNA 双链的方法,成功的抑制了肿瘤细胞中 *PLK1* 基因的表达,并导致了肿瘤细胞的凋亡。本研究设计和化学合成了 *PLK1* 的 mRNA 序列不同部位 10 种 siRNA 双链,碱基序列完全不同于已有的报道,从中筛选了 3 种作用强度最大的 siRNA,发现混合物 siRNAs 在敲除目的基因表达和相应细胞存活方面的效果,要好于相同浓度的单一 siRNA (图 2,图 3),提示针对某一基因 mRNA 序列的 siRNA,攻击不同部位作用是不一样的,因此设计时需要多个部位并进一步实验筛选,以确保得到高效的 siRNA。文献也报道两种以上针对 HIV-1 共受体 CXCR4 或者 Fas 配体基因 mRNA 不同位点的 siRNA 混合物,沉默目的基因表达的作用要强于单一使用^[13]。本研究还发现 siRNA 通过降解 *PLK1* 基因的 mRNA,导致 *PLK1* 基因蛋白水平下调,阻碍了 SW480 细胞的分裂,使细胞的繁殖生长受到抑制,导致了存活细胞百分率的明显下降(图 3~5),体现了 siRNA 在转录后对目的基因表达的负调控作用,并出现相应细胞生物学特征的变化。但异常表达的基因产物往往也是机体正常活动需要的,只是过表达而已,转录后负调控并没有彻底清除目的基因(图 1,图 2),而且机体中外源性 siRNA 数天后会消失,说明 siRNA 作用的可调控性。RNAi 是真核生物中抵抗病毒复制表达、抑制转座子转座及调控基因表达的监控,siRNA 介导的 RNAi 在进化上是高度保守的,是真核生物普遍存在的体内天然的抗外源基因侵入的防御系统,具有高度特异性^[14,15],推测 siRNA 的毒副作用不会太大,下一步的研究将在体内进行 siRNA 的基因表达干扰作用。

参 考 文 献(References):

- [1] Hannon G J. RNA interference. *Nature*, 2002, 418: 244~251.
- [2] Agami R. RNAi and related mechanisms and their potential use for therapy. *Curr Opin Chem Biol*, 2002, 6:829~834.
- [3] MA Zhong-Liang, YANG Huai-Yi, TIAN Po. Progress of miRNA and its functions in eukaryotes. *Acta Genetica Sinica*, 2003,30(7):693~696.
马中良,杨怀义,田波.真核生物中的微小 RNA 及其功能研究进展. *遗传学报*, 2003,30(7):693~696.
- [4] Elez R, Piiper A, Giannini C D, Brendel M, Zeuzem S. Polo-like kinase 1, a new target for antisense tumor therapy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 269(2): 352~356.
- [5] Takahashi T, Sano B, Nagata T, Kato H, Sugiyama Y, Kunieda K, Kimura M, Okano Y, Saji S. Polo-like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers. *Cancer Sci*, 2003, 94(2): 148~152.
- [6] CHEN Gong - Xing , ZHANG Jia - Wei , DONG Qin - Hua , ZHENG Shu. Analysis of gene expression of ST13 in tumor cell lines by real-time quantitative PCR. *Sect Clin Biochem & Lab Med Foreign Med Sci*, 2004,25(4): 301~305.
陈功星,张佳伟,董庆华,郑树.实时定量 PCR 分析 ST13 基因在肿瘤细胞株中的表达. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 2004,25(4): 301~305.
- [7] Couzin J . Breakthrough of the year : Small RNAs make big splash. *Science*, 2002,298(5602): 2296~2297.
- [8] Emery D W, Nishino T, Murata K, Fragkos M, Stamatoyannopoulos G. Hematopoietic stem cell gene therapy. *Int J Hematol*, 2002, 75(3): 228~236.
- [9] Martinez L A, Naguibneva I, Lehmann H, Vervisch A, Tchenio T, Lozano G, Harel-Bellan A. Synthetic small inhibiting RNAs; efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(23): 14849~14854.
- [10] Smits V A, Klompmaaker R, Arnaud L, Rijksen G, Nigg E A, Medema R H. Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(9): 672~676.
- [11] Liu X, Erikson R L. Polo-like kinase (Plk) 1 depletion induces apoptosis in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(10): 5789~5794.
- [12] Spankuch-Schmitt B, Bereiter-Hahn J, Kaufmann M, Strebhardt K. Effect of RNA silencing of polo-like kinase-1 (PLK1) on apoptosis and spindle formation in human cancer cells. *J Natl Cancer Inst*, 2002, 94(24): 1863~1877.
- [13] Ji J, Wernli M, Klimkait T, Erb P. Enhanced gene silencing by the application of multiple specific small interfering RNAs. *FEBS Lett*, 2003, 552: 247~252.
- [14] YAN Fei , CHENG Zhuo - Min . Progress of RNA Interference Mechanism. *Hereditas* (Beijing), 2005,27(1): 167~172.
燕飞,成卓敏. RNA 干扰机制研究进展. *遗传*, 2005,27(1): 167~172.
- [15] ZHAO Qing-Zhen, ZHAO Shuang-Yi, XIA Guang-Min. Research Advances on the Mechanism of RNA Silencing in Plants. *Acta Genetica Sinica*, 2005,32(1):104~110.
赵庆臻,赵双宜,夏光敏.植物 RNA 沉默机制的研究进展. *遗传学报*, 2005,32(1):104~110.