

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)03-0202-04

# Osteopontin 特异性 siRNA 真核表达载体的构建及其在 GC9811 胃癌细胞中沉默效应的鉴定

唐红卫<sup>1,2</sup> 潘阳林<sup>1</sup> 聂勇战<sup>1</sup> 孟凡平<sup>1</sup> 谢华红<sup>1</sup> 王均<sup>1</sup> 吴开春<sup>1</sup>( <sup>1</sup> 第四军医大学西京医院消化病研究所 陕西 西安 710033, <sup>2</sup> 中国人民武装警察部队总医院消化内科 北京 100039 )

## Construction of eukaryotic expression vector of siRNA specific for osteopontin and characterization of its efficiency in GC9811 gastric carcinoma cell line

TANG Hong-Wei<sup>1,2</sup>, PAN Yang-Lin<sup>1</sup>, NIE Yong-Zhan<sup>1</sup>, MENG Fan-Ping<sup>1</sup>, XIE Hua-Hong<sup>1</sup>, WANG Jun<sup>1</sup>, WU Kai-Chun<sup>1</sup><sup>1</sup>Institute of Gastrointestinal Diseases Research, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, <sup>2</sup>Department of Gastroenterology, General Hospital, Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China

**【Abstract】** AIM: To construct the small interfering RNA (siRNA) eukaryotic expression vector specific for human OPN gene and to observe its silencing effect on OPN gene. **METHODS:** The expression vectors of mU6pro/OPN-siRNA1 and mU6pro/OPN-siRNA2 were constructed by gene recombination and then were transfected by liposome-mediated transfection into the GC9811 gastric carcinoma cell line with high metastasis potential recently established in our laboratory. At 72 h after transfection, the expression of OPN in the levels of mRNA and protein was detected by RT-PCR and Western-blotting. **RESULTS:** The eukaryotic expression vectors of mU6pro/OPN-siRNA1 and mU6pro/OPN-siRNA2, which down-regulated mRNA and protein of OPN at 72 h after transfection, were successfully constructed. mU6pro/OPN-siRNA1 was more effective than the other one. **CONCLUSION:** Eukaryotic expression vector of siRNA specific for OPN is successfully constructed, which lays the basis for its application in the treatment of gastric carcinoma.

**【Keywords】** osteopontin; siRNA; eukaryotic expression vector

**【摘要】**目的 构建骨桥蛋白(OPN)特异性 siRNA(small interfering RNA)真核表达载体,体外观察对 OPN 基因的沉默作用。方法 采用基因克隆技术,将合成的特异性 OPN RNA 干扰寡核苷酸序列插入真核表达载体 mU6pro,构建 OPN siRNA 真核表达载体。以脂质体法将 mU6pro 空载体和 2 个(mU6pro/OPN-siRNA1 和 mU6pro/OPN-siRNA2)重组质粒分别导入具有高转移特性的 GC9811 胃癌细胞系。72 h 后用 RT-PCR 和 Western blotting 技术检测各实验组胃癌细胞内 OPN mRNA 及蛋白水平的表达情况。结果 成功构建 OPN siRNA 真核表达载体。转染 OPN-siRNA 的胃癌细胞,72 h 后 OPN mRNA 及蛋白表达下调,而以 mU6pro/OPN-siRNA1 的抑制效果更为明显。结论 构建的 RNA 干扰真核表达载体能明显干扰 OPN mRNA 及蛋白的表达,为将其进一步应用于胃癌的治疗研究奠定了基础。

**【关键词】** 骨桥蛋白 小干扰 RNA 真核表达

**【中图分类号】** Q786 **【文献标识码】** A

## 0 引言

骨桥蛋白<sup>[1]</sup>(osteopontin, OPN)是一种磷酸化糖蛋白,首先由骨骼组织中分离而来,它通过 RGD(精氨酸-谷氨酸-天冬氨酸)序列与整合素  $\alpha v\beta 3$  结合参与骨的吸收并和羟基磷灰石结合,有助于骨骼的形成。然而,近年最新研究表明,OPN 是一种和肿瘤有关的细胞外基质蛋白,拥有多种功能域,与肿瘤的发生、发展、肿瘤血管形成<sup>[2]</sup>及播撒转移<sup>[3]</sup>有着极为密切的关系。因此,以 OPN 为靶点,成为肿瘤治疗研究的新方向。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是目前最有效的基因沉默技术,能特异性抑制靶基因的转录,进而下调相应蛋白水平及功能。我们通过构建 OPN 基因特异性 siRNA(small interfering RNA)真核表达载体,检测其对高转移性胃癌细胞系 GC9811 中 OPN 基因的沉默作用,为将其进一步应用于胃癌的治疗研究奠定了基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** RPMI 1640 培养基和 G418(Gibco 公司), RT 试剂盒(Fermentas MBI), 一管便携式 PCR 扩增试剂盒(2 × Taq PCR MasterMix)北京天为时代

收稿日期 2004-11-12; 修回日期 2004-12-30

基金项目 国家自然科学基金(30130260)

通讯作者 吴开春. Tel. (029) 83374229 Email. hongwei@fmmu.edu.cn

作者简介:唐红卫(1966-),男(汉族),北京市人。主治医师,博士生导师吴开春。Tel. (029) 13991314768 Email. thwjp@hotmail.com

公司). *E. coli* DH5 $\alpha$ 、脂质体 Lipofectmine 2000 和细胞总 RNA 提取试剂 Trizol(Invitrogen 公司). 限制性 DNA 内切酶 *Bbs*I, *Xba*I, *Hind* III 和 *T4* DNA 连接酶(Takara 公司). 小量质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒(Omega 公司). 抗人 OPN mAb 购自 Assay designs 公司. 抗人  $\beta$ -actin mAb(Sigma 公司). OPN 特异性 PCR 引物合成、OPN 特异性 siRNA 寡核苷酸链合成和 DNA 序列测定,由上海 Sangon 生物工程技术服务有限公司完成. siRNA 真核表达载体 mU6pro 由美国密歇根大学的 Turner 教授惠赠. GC9811 高转移性胃癌细胞系由本研究所聂勇战博士建立并保存.

## 1.2 方法

1.2.1 OPN 特异性 siRNA 的设计 选择 GenBank 中人 OPN 基因编码区序列(coding sequence, CDS)作为分析序列. 采用 RNAdraw 分析软件对 OPN 序列的二级结构进行预测,然后按照 Elbashir 等<sup>[4]</sup>推荐的 siRNA 设计原则,在 OPN 编码序列中选择 2 段 19 nt 的寡核苷酸,符合以下要求:经 BLAST 数据库分析,与其他分子无同源序列;G + C 含量接近 50%;不含 TTT 或 GGG 序列. 依据 siRNA 表达载体 mU6pro 的要求,合成 2 对符合上述要求的 49 nt 的单链寡核苷酸. 每一正向单链寡核苷酸内,19 nt 的寡核苷酸以正反向组合,中间以 aca 间隔,使寡核苷酸内部可形成发夹结构. 每对寡核苷酸的核心序列反向互补. 每对寡核苷酸两端分别带有 *Bbs* I 和 *Xba* I 酶切位点. OPN-siRNA1 : P1 : 5'-TTTGTCTCGTTCGAGTCAATGGAGACACTCCATTGACTCGAACGACTTTTT-3', P2 : 5'-CTAGAAAAAGTCGTTTCGAGTCAATGGAGTGTCTC-CATTGACTCGAACGA-3'; OPN-siRNA2 : P1 : 5'-TTT-GCCATCATATGTGTCTACTACAAGTAGACACATATG-ATGGCTTTTT-3', P2 : 5'-CTAGAAAAAGCCATCATA-TGTGTCTACTTGTAGTAGACACATATGATGG-3'.

1.2.2 OPN-siRNA 表达载体的构建 合成编码发夹结构 siRNA 的正义链和反义链,分别取 5  $\mu$ L 正义寡核苷酸(终浓度均为 25  $\mu$ mol/ $\mu$ L) 20  $\mu$ L 2  $\times$  退火缓冲液(200 mmol/L NaCl 20 mmol/L Tris, pH 7.6),加入 10  $\mu$ L 去离子水于 95 $^{\circ}$ C 水浴中 5 min,然后自然冷却至室温. 将退火后的双链 siRNA 模板与载体于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜. 以连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,在氨苄青霉素抗性平板上筛选重组载体. 扩增白色的抗性菌落并提取质粒,以 *Bbs* I 和 *Xba* I 酶切鉴定重组质粒. 收集酶切鉴定正确的重组质粒,送上海生工公司进行 DNA 全长自动测序.

1.2.3 转染用质粒 DNA 的制备、纯化及定量 以质粒提取试剂盒,分别提取 mU6pro 空载体和 OPN-siR-

NA 重组质粒. 经分光光度计和电泳检测,  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} > 1.8$ ,且无任何降解的 DNA 用于转染.

1.2.4 OPN-siRNA 质粒的细胞转染 采用 Invitrogen 公司 LipofectAMINE 2000 并按其说明书方法进行. 将细胞接种于 6 孔板,待细胞生长融合达 90% ~ 95% 后进行瞬时转染. 每孔分别加入 4  $\mu$ L 脂质体和对应质粒 2  $\mu$ g. 瞬时转染后 72 h 收获细胞检测 OPN 的表达水平.

1.2.5 OPN-siRNA 转染细胞 OPN mRNA 表达的 RT-PCR 检测 选择 GenBank 中人 OPN 基因 CDS 区的基因序列作为分析序列. 采用 Primer premier 5.0 引物设计软件设计引物. OPN 特异性 PCR 引物为:上游引物(F): 5'-GTTATGAAACGAGTCAGCTG-3';下游引物(R): 5'-TTAATTGACCTCAGAAGATG-3'. 以细胞总 RNA 提取试剂提取细胞的总 RNA,用紫外分光光度计和电泳检测其含量和纯度. 最后用 OPN 基因的特异性引物 F 和 R,进行 RT-PCR 检测(两步法). PCR 反应体系为: cDNA 模板 1  $\mu$ L, 10 mmol/L 上游引物 1  $\mu$ L, 10 mmol/L 下游引物 1  $\mu$ L, 2  $\times$  Taq PCR MasterMix 12.5  $\mu$ L, 去离子水补至 25  $\mu$ L. 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,随后按以下条件进行 PCR: 94 $^{\circ}$ C 变性, 40 $^{\circ}$ C 退火, 72 $^{\circ}$ C 延伸, 各 30 s, 共 30 个循环(OPN). 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 另外,为排除 DNA 污染的可能性,设置阴性对照实验,该管中的 RNA 在反应前,用 1  $\mu$ L Rnase (1  $\mu$ g/ $\mu$ L)于 37 $^{\circ}$ C 处理 20 min. PCR 产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测. 以  $\beta$ -actin 作为内对照,设计特异性 PCR 引物为: 5'-AGCGGGAAATCGTGCGTG-3';下游引物(R): 5'-CAGGGTACATGTGCGTGCC-3'. 产物 309 bp. PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;然后 94 $^{\circ}$ C 变性, 54 $^{\circ}$ C 退火, 72 $^{\circ}$ C 延伸, 各 30 s, 共 25 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min.

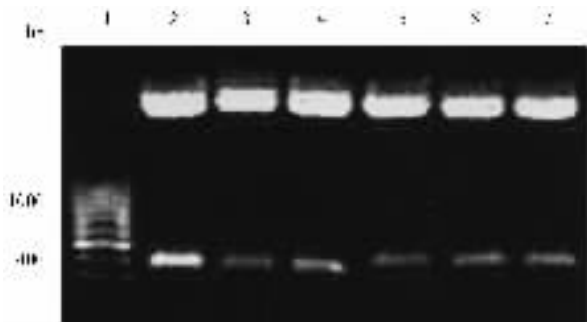
1.2.6 OPN-siRNA 转染细胞 OPN 蛋白表达的 Western blotting 检测 细胞在含 100 mL/L FBS, 青霉素(100 mg/L)和链霉素(100 mg/L)的 RPMI 1640 培养液, 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 和 950 mL/L 空气中常规培养. 收获对数生长期的细胞,制备细胞总蛋白. 按常规进行 120 g/L SDS-PAGE. 电泳后电转移至硝酸纤维素膜上,用丽春红染料对滤膜进行染色,标记笔标记蛋白分子量标准各条带所在位置,再用去离子水洗去丽春红. 加 80 g/L 脱脂奶粉于室温封闭 2 h. 与稀释于 40 g/L 脱脂奶粉抗体(抗 OPN 1:50, 抗  $\beta$ -actin 1:5000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST(10 mmol/L Tris base, 150 mmol/L NaCl, 0.5 mL/L Tween 20, pH 8.0)摇洗 4 次  $\times$  15 min, 然后与稀释于 40 g/L 脱脂奶粉的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 于室温孵育 2 h, TBST 摇洗 4

次 × 15 min. 最后, 等量混合 ECL 显色系统中 A 液和 B 液, 滴加至硝酸纤维素膜上, X-ray 胶片感光.

### 2 结果

**2.1 OPN-siRNA 片段的获得** 合成的 OPN-siRNA 寡核苷酸片段退火后得到约 50 bp 的 DNA 片段, 提示退火成功.

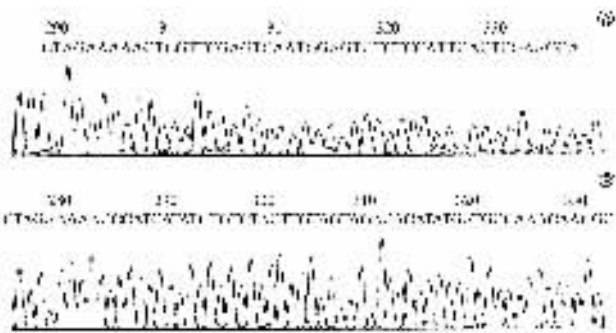
**2.2 mU6pro/OPN-siRNA 重组质粒的构建及鉴定** 将 OPN-siRNA 片段连入含有 RNA U6 启动子的载体 mU6pro, 分别随机挑选 3 个克隆, 进行 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切鉴定. 重组载体释放出约 400 bp 片段, 分别命名为 mU6pro/OPN-siRNA1 和 mU6pro/OPN-siRNA2 (Fig 1). 测序结果显示, OPN-siRNA 片段已正确连入 mU6pro 载体, 载体构建成功 (Fig 2).



1 : 100 bp DNA Ladder ( MBI ); 2 - 4 : mU6pro/OPN-siRNA1 ; 5 - 7 : mU6pro/OPN-siRNA2.

Fig 1 Restrictive enzyme digestion analysis of recombinant plasmid

图 1 重组 mU6pro/OPN-siRNA 真核表达载体的双酶切鉴定



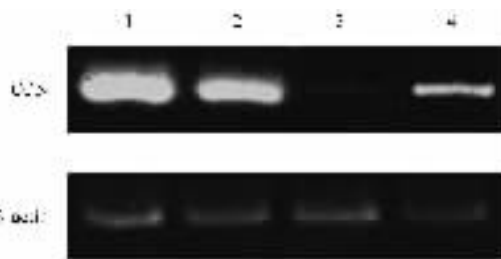
A : mU6pro/OPN-siRNA1 ; B : mU6pro/OPN-siRNA2.

Fig 2 Sequencing results of the inserted DNA sequence in mU6pro/OPN-siRNA

图 2 重组 mU6pro/OPN-siRNA 真核表达载体插入片段的测序结果

**2.3 OPN-siRNA 转染细胞的 RT-PCR 鉴定** 将构建好的 OPN 的 RNAi 载体 mU6pro/OPN-siRNA1 和 mU6pro/OPN-siRNA2 以及 mU6pro 空载体以脂质体

法分别转入 GC9811 高转移性胃癌细胞, 分别命名为 GC9811/OPN-siRNA1, GC9811/OPN-siRNA2 和 GC9811/mU6pro. 提取各组细胞总 RNA, 经 RT-PCR 扩增 OPN 片段, 琼脂糖凝胶电泳结果显示 (Fig 3), GC9811/OPN-siRNA1 和 GC9811/OPN-siRNA2 较亲本细胞和空载体转染细胞 OPN mRNA 水平降低.

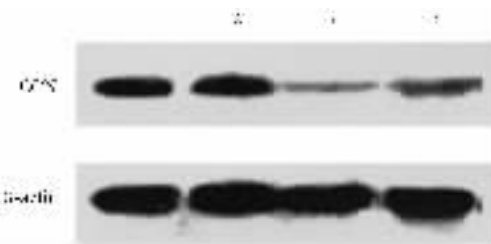


1 : GC9811 ; 2 : GC9811/mU6pro ; 3 : GC9811/OPN-siRNA1 ; 4 : GC9811/OPN-siRNA2.

Fig 3 RT-PCR analysis of the expression of OPN  
图 3 OPN 表达的 RT-PCR 鉴定

### 2.4 OPN-siRNA 转染细胞的 Western blotting 鉴定

提取 GC9811, GC9811/mU6pro, GC9811/OPN-siRNA1 和 GC9811/OPN-siRNA2 各组细胞总蛋白, 行 Western blotting 检测. 鉴定结果见 Fig 4. 由 Fig 4 可见, 与亲本细胞及空载体转染细胞相比, 两 siRNA 均可部分抑制 OPN 的表达, OPN-siRNA1 的抑制效率较 OPN-siRNA2 明显.



1 : GC9811 ; 2 : GC9811/mU6pro ; 3 : GC9811/OPN-siRNA1 ; 4 : GC9811/OPN-siRNA2.

Fig 4 Western blot analysis of the expression of OPN  
图 4 OPN 表达的 Western blot 鉴定

### 3 讨论

近年来的研究显示, OPN 在许多肿瘤中高表达<sup>[5-7]</sup>, 与肿瘤的发生发展、肿瘤转移<sup>[3]</sup>、肿瘤血管形成<sup>[2]</sup>、抑制凋亡<sup>[8]</sup>等诸多方面关系非常密切. 目前, 针对 OPN 的肿瘤治疗研究成为新热点. 然而, OPN 许多功能域均参与肿瘤的发生发展, 现有的研究进展主要围绕 OPN 相关受体的肿瘤治疗, 而针对 OPN 分子尚缺乏有效手段<sup>[9]</sup>. 我们通过构建 OPN 特异性 siRNA, 探索肿瘤治疗新方法. siRNA 技术是一种新

兴的基因治疗技术,能有效、特异地抑制细胞内基因的表达。它是通过 RNAi 机制在哺乳动物细胞中阻断特定基因的表达从而达到研究基因的功能或基因治疗的目的。与传统的基因治疗药物相比,siRNA 具有两大明显优势:高特异性和高抑制率。siRNA 抑制基因表达的效率高,甚至可完全阻断基因表达,效果接近基因敲除技术<sup>[10]</sup>。

GC9811 胃癌细胞系具有高转移特性,由本研究所聂勇战博士建立,来源于一名已转移的胃低分化腺癌患者。在裸鼠中的动物实验显示,皮下和尾静脉注射 GC9811 可出现肝转移。间接原位接种模型较直接瘤细胞原位接种模型肝脏转移率明显提高,腹腔种植转移见于腹腔脏层及壁层腹膜及网膜,有的动物可见腹腔广泛播散的瘤结节和血性腹水<sup>[11]</sup>。我们进一步的研究显示,GC9811 中 OPN 表达上调,这一结果与国外一些实验室建立的高转移肿瘤细胞系出现 OPN 高表达的结果相一致<sup>[12,13]</sup>。

本研究成功构建了针对人 OPN 的特异性 siRNA 真核表达载体。转染 OPN-siRNA 的 GC9811 胃癌细胞,72 h 后 OPN mRNA 及蛋白表达下调,而以 mU6pro/OPN-siRNA1 的抑制效果更为明显。构建的 RNA 干扰真核表达载体能明显干扰 OPN mRNA 及蛋白的表达,为进一步研究 OPN 的功能以及应用于胃癌的治疗研究奠定了基础。

## 【参考文献】

- [1] Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, et al. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease [J]. *Science*, 2001; 294(5547): 1731-1735.
- [2] Takahashi F, Akutagawa S, Fukumoto H, et al. Osteopontin induces angiogenesis of murine neuroblastoma cells in mice [J]. *Int J Cancer*, 2002; 98(5): 707-712.
- [3] Ye QH, Qin LX, Forgues M, et al. Predicting hepatitis B virus-pos-

itive metastatic hepatocellular carcinomas using gene expression profiling and supervised machine learning [J]. *Nat Med*, 2003; 9(4): 416-423.

- [4] Elbashir SM, Harborth J, Weber K, et al. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs [J]. *Methods*, 2002; 26(2): 199-213.
- [5] Schorge JO, Drake RD, Lee H, et al. Osteopontin as an adjunct to CA125 in detecting recurrent ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2004; 10(10): 3474-3478.
- [6] Coppola D, Szabo M, Boulware D, et al. Correlation of osteopontin protein expression and pathological stage across a wide variety of tumor histologies [J]. *Clin Cancer Res*, 2004; 10(1 Pt 1): 184-190.
- [7] Ibrahim T, Leong I, Sanchez-Sweetman O, et al. Expression of bone sialoprotein and osteopontin in breast cancer bone metastases [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2000; 18(3): 253-260.
- [8] Khan SA, Lopez-Chua CA, Zhang J, et al. Soluble osteopontin inhibits apoptosis of adherent endothelial cells deprived of growth factors [J]. *J Cell Biochem*, 2002; 85(4): 728-736.
- [9] Weber GF. The metastasis gene osteopontin: A candidate target for cancer therapy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001; 1552(2): 61-85.
- [10] Agami R. RNAi and related mechanisms and their potential use for therapy [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2002; 6(6): 829-834.
- [11] 白飞虎, 吴开春, 樊代明, 等. 人胃癌裸鼠原位移植转移模型的建立 [J]. 第四军医大学学报, 2003; 24(10): 873-875.  
Bai FH, Wu KC, Fan DM, et al. Establishment of transplantation of in situ human gastric tumor metastasis model in nude mice [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2003; 24(10): 873-875.
- [12] Senger DR, Perruzzi CA, Papadopoulos A. Elevated expression of secreted phosphoprotein I (osteopontin, 2ar) as a consequence of neoplastic transformation [J]. *Anticancer Res*, 1989; 9(5): 1291-1299.
- [13] Senger DR, Asch BB, Smith BD, et al. A secreted phosphoprotein marker for neoplastic transformation of both epithelial and fibroblastic cells [J]. *Nature*, 1983; 302(5910): 714-715.

编辑 何扬举

## · 期刊文摘 · SARS 冠状病毒核衣壳蛋白的重组表达及其单克隆抗体的制备

[王平, 黄庆生, 薛小平, 雷迎峰, 王海涛, 任君萍, 丁天兵, 徐志凯. 细胞与分子免疫学杂志, 2005 21(1) 50-52]

目的:表达 SARS 冠状病毒核衣壳蛋白(N 蛋白),并以表达产物为免疫原制备特异性单克隆抗体(mAb)。方法:采用 RT-PCR 方法,从灭活的病毒抗原标本中扩增编码 N 蛋白的基因。测序确认后,再亚克隆至原核表达载体中。从 SDS-PAGE 凝胶中回收原核表达产物后免疫 BALB/c 小鼠,经融合、筛选制备特异性 mAb。结果:从标本中扩增出 1269 bp 的 DNA,测序结果证实为 N 蛋白基因。将该基因克隆至原核表达载体中后,在大肠杆菌中获得了较好的表达。表达产物经 SDS-PAGE 后,在  $M_r$  约为 43 000 处可见 1 条明显的诱导表达带。Western blot 的结果表明,该电泳带与 SARS 患者的恢复期血清呈特异的免疫反应。从 SDS-PAGE 凝胶中回收表达产物并免疫 BALB/c 小鼠,制备出 3 株抗 N 蛋白的 mAb。这些 mAb 与 SDS-PAGE 凝胶上  $M_r$  约为 43 000 的蛋白带也呈现很强的免疫反应。结论:所获的重组 N 蛋白及特异性 mAb,将为进一步建立 SARS 病毒感染早期诊断的方法奠定了基础。