

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.06.010

膜-细胞骨架联接分子 ezrin shRNA 真核表达载体的构建

王羽¹, 李娟娟², 王耕³, 王卫星³, 孙圣荣³

Construction of Eukaryotic Expression Vector of Short Hairpin RNA for ezrin

WANG Yu¹, LI Juan-juan², WANG Geng³, WANG Wei-xing³, SUN Sheng-rong³

1. Department of General Surgery, The Railway central Hospital of Xiangfan, Xiangfan 441003, China; 2. Department of Breast and Thyroid Surgery of Taihe Hospital; 3. Department of Breast and Thyroid Surgery of Renmin Hospital

Corresponding Author: SUN Sheng-rong, E-mail: sun137@sina.com

Abstract: Objective To construct the short hairpin RNA (shRNA) expression vector specific for ezrin. **Methods** Oligonucleotides were designed specific for ezrin gene. After annealing, the formed double-stranded DNAs were ligated with pSUPER. The expression vectors of pSUPER-shRNA were identified by enzyme digestion and sequence analysis and transfected into MCF-7 cells. The expression of ezrin was analyzed by RT-PCR and Western blot. **Results** The vector was identified by restriction enzyme digestion and sequence analysis. The expression vectors of pSUPER-shRNA was successfully constructed and transfected into MCF-7 cells. The ezrin expression was significantly suppressed after transfection with ezrin shRNA vector. **Conclusion** The pSUPER-shRNA specific for ezrin is successfully constructed and it will be helpful for further study on the significance of ezrin on the metastasis of breast cancer.

Key words: ezrin; Short hairpin RNA; Eukaryotic expression vector; Human breast cancer

摘要:目的 构建膜-细胞骨架联接分子(ezrin)特异的 RNA 干扰质粒载体。**方法** 设计转录短双链 RNA (short hairpin RNAs, shRNA) 的 DNA 序列,与 pSUPER 质粒载体连接;将构建成功的特异性表达载体(pSUPER-ezrin)转染至人乳腺癌 MCF-7 细胞系,并应用 RT-PCR 和 Western blot 检测 ezrin 的表达。**结果** 与 MCF-7 细胞和转染空白质粒 pSUPER 细胞相比,转染 pSUPER-ezrin 表达载体的 MCF-7 细胞 ezrin mRNA 和蛋白的表达明显降低。**结论** 构建的 ezrin 特异性 shRNA 表达载体可有效地沉默 ezrin 基因,为进一步研究 ezrin 表达对乳腺癌转移的影响奠定了基础。

关键词: ezrin; 短发夹状 RNA; 真核表达载体; 乳腺癌

中图分类号: R73-76⁺ 2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2010)06-0644-03

0 引言

肿瘤转移是恶性肿瘤的特征性生物学行为之一,也是影响患者疗效和预后的重要因素。膜-细胞骨架联接蛋白 ezrin 是 ERM (ezrin/radixin/moesin) 家族成员之一,其将胞外信号传至细胞内的骨架蛋白,从而引起胞内肌动蛋白表达及分布的改变,调控细胞的极性和运动,最终导致肿瘤的转移^[1]。大量研究提示在多种肿瘤细胞中,ezrin 高表达与肿瘤的发生、发展及浸润、转移有关^[2-6]。本研究采用

基因克隆技术成功构建人 ezrin RNA 干扰表达载体,并稳定转染人乳腺癌细胞系 MCF-7,检测其对 ezrin 表达的沉默作用,为深入研究 ezrin 在肿瘤转移中的作用以及 ezrin shRNA 表达载体的基因治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人乳腺癌细胞系 MCF-7(购自中国科学院上海细胞生物研究所),于 10% 胎牛血清,50 u/ml 青霉素及 50 μg/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液中,37℃、5% CO₂ 环境培养。

1.2 质粒构建

选择 2 个 ezrin 干扰靶点: ezrin(553-571) 及 ezrin(995-1013),将特异性沉默 ezrin 基因序列插入

收稿日期:2008-12-31;修回日期:2009-11-03

作者单位:1. 441003 湖北襄樊,襄樊市铁路中心医院普外科;2. 十堰市太和医院乳腺甲状腺外科;3. 武汉大学人民医院乳腺甲状腺外科

通信作者:孙圣荣, E-mail: sun137@sina.com

作者简介:王羽(1963-),男,学士,副主任医师,主要从事肝胆外科和乳腺甲状腺外科工作

pSUPER 载体中,构建特异性 ezrin shRNA-pSUPER 表达载体。化学合成 4 段编码短发夹 RNA 序列靶向沉默 ezrin 的寡核苷酸, ezrin553-F1: 5'-GATCCCCGATAATGCTATGTTGGAATTTCAAGAGAATTCCAACATAGCATTATCTTTTTTA-3', ezrin553-R1: 5'-AGCTTAAAAAGATAATGCTATGTTGGAATTCTCTTGAAATTTCCAACATAGCATTATCGGG-3'; ezrin995-F1: 5'-GATCCCCCGTGGAGAGAGAGAAAGATTCAAGA GATCTTTCTCTCTCTCCACGGTTTTTA-3', ezrin995-R1: 5'-AGCTTAAAAACCGTGGAGAGAGAGAAAGATCTCTTGAATCTTTCTCTCTCTCCACGGGGG-3',退火,克隆经 *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切及小牛肠碱性磷酸酶处理后的 pSUPER 载体中,构建含有 ezrin shRNA 的表达载体,经初步限制酶切鉴定后,由上海生物工程有限公司测序。

1.3 基因转染

人乳腺癌细胞系 MCF-7 以每孔 1×10^6 密度接种于 6 孔培养板,待细胞长满底面约 80% 转染细胞。分为 4 组: (1) 对照组: 未转染; (2) 空载体组: 转染 pSUPER 质粒; (3) 实验 1 组: 转染 ezrin(553) shRNA-pSUPER 质粒; (4) 实验 2 组: 转染 ezrin(995) shRNA-pSUPER 质粒。按脂质体 Lipofectamine 2000™ (Invitrogen, 美国) 说明书进行。于转染 48 h 后收获细胞用于检测。

1.4 RT-PCR

参照 Trizol 试剂说明书提取细胞总 RNA。RT-PCR 按照 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis kit 使用说明书反转录合成 cDNA, 以人 Gapdh 为内对照进行 PCR 反应。反应体系: cDNA 各 1 μ l, ezrin 和 Gapdh 的上游引物和下游引物各 1 μ l, MasterMix 12.5 μ l, DEPC 处理水补足反应体积 25 μ l。反应条件: 95℃ 预变性 1 min; 94℃ 40 s, 45℃ 40 s, 72℃ 40 s, 共 27 个循环; 72℃ 延伸 10 min 后 4℃ 冷却, 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析。引物由上海生工生物技术有限公司合成, 序列如下:

ezrin: 正义: 5'-GAATACACAGCCAAGATTGC-3', 反义: 5'-CTCATGTTCTCGTTGTGGAT-3', 产物长度 400bp;

Gapdh: 正义: 5'-GAATACACAGCCAAGATTGC-3', 反义: 5'-CTCATGTTCTCGTTGTGGAT-3', 产物长度 251bp。

1.5 Western blot 检测

细胞裂解液处理细胞, 离心后取上清, 以考马斯亮蓝法 (Protein assay, Bio-Rad, 美国) 进行蛋白质定量。蛋白变性后, 以含有 10 μ g 总蛋白的样本进

行 10 % SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将凝胶上的蛋白质电转移到硝酸纤维素膜上, 封闭液封闭后, 分别以特异性 ezrin、 β -actin 单抗孵育, 4℃ 过夜, 然后与辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h, 以增强化学发光法 (ECL, Amer sham Life Science, 英国) 显色。 β -actin 作为对照。蛋白条带扫描后以 Smart View2001 软件获取光密度 OD 值。ezrin 水平以其蛋白条带的 OD 值/ β -actin 蛋白条带 OD 值表示。将转染空载体的对照组 ezrin 水平设为 100 %, 实验组 ezrin 蛋白水平/对照组 ezrin 蛋白水平 \times 100 (%) 来表示 ezrin 相对水平。

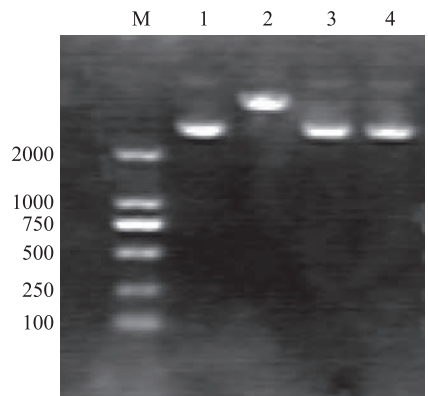
1.6 统计学方法

实验中除基因测序外每种处理均重复 3 次, Western blot 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计学处理均采用 SPSS12.0 统计软件包进行方差分析。

2 结果

2.1 ezrin shRNA-pSUPER 表达载体的酶切鉴定

以 pSUPER, ezrin(995) shRNA-pSUPER 及 ezrin(553) shRNA-pSUPER 重组体克隆采用 *Bgl* II 和 *Hind* III 进行双酶切, 可见含有重组体的阳性克隆均不切开, 而空载体克隆则出现线性化片段, 见图 1。



M: DNA marker DL 2000; 1: MCF-7 cells transfected with empty vector pSUPER; 2: MCF-7 cells with empty vector pSUPER digested with *Bgl* II 和 *Hind* III; 3: MCF-7 cells with shRNA(553) digested; 4: MCF-7 cells with shRNA(995) digested

图 1 pSUPER-ezrin 质粒的酶切鉴定
Figure 1 AGE analysis of recombinant plasmid pSUPER-ezrin digested with *Bgl* II 和 *Hind* III

2.2 RT-PCR 结果

PCR 结果可见 2 条光亮条带, 一条大小约 400 bp, 为 ezrin, 另一条大小约 251 bp, 为 Gapdh。内参对照物 Gapdh 的条带均无明显差别, 而实验组 ezrin 条带的亮度明显低于空载体组, 表明 ezrin mRNA 在实验组细胞中的表达明显降低, 见图 2。

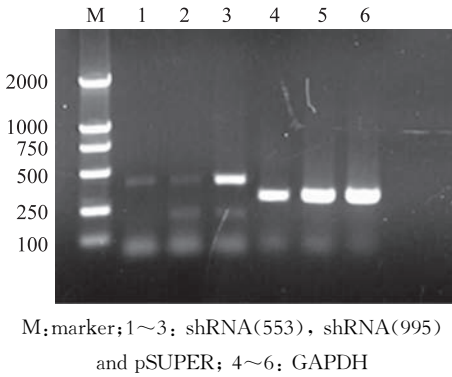


图 2 ezrin shRNA-pSUPER 转染抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞的 ezrin 表达 (RT-PCR)

Figure 2 RT-PCR result of MCF-7 cells stably transfected with pSUPER-ezrin

2.3 Western blot 结果

以 0.5 μg、2 μg ezrin shRNA-pSUPER 转染 MCF-7 细胞, 48 h 后检测 ezrin 蛋白的表达, 可见 ezrin 水平呈剂量依赖性显著降低分别为 1.32 ± 0.09 和 0.83 ± 0.08 , 而转染空载体 pSUPER 的对照组 ezrin 水平为 1.57 ± 0.06 , 见图 3。以对照组 ezrin 表达水平为 100%, 以 0.5 μg、2 μg ezrin shRNA-pSUPER(995) 转染 MCF-7 细胞后, ezrin 相对水平则分别降低至 $84.01\% \pm 2.52\%$, $52.79\% \pm 3.09\%$ ($P < 0.01$)。表明转染 ezrin shRNA-pSUPER 表达载体, 有力地抑制了 ezrin 蛋白的表达。

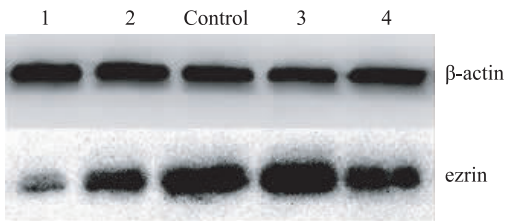


图 3 ezrin shRNA-pSUPER 转染抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞的 ezrin 表达 (Western blot)

Figure 3 Western blot result of MCF-7 cells stably transfected with pSUPER-ezrin

3 讨论

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 于 1998 年由 Andrew Fire 和 Craig Melb 首次发现, 在生物体内有双链 RNA (Double-stranded RNA, dsRNA) 分子沉默或降低同源基因表达的现象。近年来, RNAi 作为一种抑制特定基因表达的新技术成为肿瘤治疗研究的新热点。

ezrin 为膜-细胞骨架连接蛋白, 是 ERM (ezrin-radixin-moesin) 家族成员之一, 由定位于人染色体

6q25. 2-q26Vil2 基因编码^[2]。研究发现 ezrin 的高表达与多种恶性肿瘤的发生、发展有关。其通过改变肿瘤细胞运动、调节细胞黏附、参与肿瘤细胞内信号传导、抑制细胞凋亡和调理吞噬细胞的吞噬功能等来影响肿瘤的转移^[2,4-7]。Elliott 等^[8]将高表达野生型 ezrin 的细胞种植到同系基因型的鼠乳腺中, 随后发现在肺中形成转移灶, 而 ezrin N 端功能域被明显负调节的细胞则未见肺转移灶形成, 这些说明在乳腺癌的转移中 ezrin 高表达是必须的。Sarrío 等^[9]通过蛋白印迹和共聚焦显微镜研究发现 ezrin 定位的改变从顶端细胞膜到完全细胞膜或者细胞质着色, 与侵袭性乳腺癌和癌细胞的去分化和不良特征相关联。

本研究以 ezrin 为靶标, 设计 shRNA 序列, 并构建其表达质粒 pSUPER 表达 shRNA-ezrin, 酶切及测序结果显示, 特异性针对 ezrin 的 shRNA 载体构建成功; 转染人乳腺癌细胞系 MCF-7 后, 使得 ezrin mRNA 和蛋白表达显著下调, 从而证实了所构建的人特异性 ezrin shRNA 表达载体可高效、特异地沉默人 ezrin 基因及蛋白的表达, 可用于探讨乳腺癌等肿瘤的侵袭和转移机制, 为有效地抑制肿瘤浸润和转移提供了新的生物治疗靶点。

参考文献:

- [1] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells [J]. Science, 2002, 296(5567): 550-553.
- [2] Hunter KW. Ezrin, a key component in tumor metastasis [J]. Trends Mol Med, 2004, 10(5): 201-204.
- [3] Lozupone F, Lugini L, Matarrese P, et al. Identification and relevance of the CD95-binding domain in the N-terminal region of ezrin [J]. J Biol Chem, 2004, 279(10): 9199-9207.
- [4] Fais S, De Milito A, Lozupone F, et al. The role of FAS to ezrin association in FAS-mediated apoptosis [J]. Apoptosis, 2005, 10(5): 941-947.
- [5] Zhu L, Liu Y, Forte JG. Ezrin oligomers are the membrane-bound dormant form in gastric parietal cells [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2005, 288(6): C1242-1254.
- [6] Yu Y, Khan J, Khanna C, et al. Expression profiling identifies the cytoskeletal organizer ezrin and the developmental homeoprotein Six-1 as key metastatic regulators [J]. Nat Med, 2004, 10(2): 175-181.
- [7] 李琼, 吴明富, 宋安萍, 等. 浸润性乳腺导管癌组织中 Ezrin 和钙粘素 E 的表达与淋巴结转移的关系 [J]. 癌症, 2006, 25(3): 363-366.
- [8] Elliott BE, Meens JA, SenGupta SK, et al. The membrane cytoskeletal crosslinker Ezrin is required for metastasis of breast carcinoma cells [J]. Breast Cancer Res, 2005, 7(3): R365-373.
- [9] Sarrío D, Rodríguez Pinilla SM, Dotor A, et al. Abnormal Ezrin localization is associated with clinicopathological features in invasive breast carcinomas [J]. Breast Cancer Res Treat, 2006, 98(1): 71-79.