

PCNA 的 shRNA 的真核表达载体的构建及对子宫颈癌细胞的干预性研究

黄浩¹, 涂欣², 余南才¹, 吴文莉¹, 刘倩¹, 马威¹, 郝建军¹, 易艳东¹

Constructed Eukaryotic Expression Plasmid of Small Hairpin RNA (shRNA) of PCNA and Investigated the Inhibitory Effect on HeLa Cell

Huang Hao¹, TU Xin², YU Nancal¹, WU Wenli¹, LIU Qian¹, MA Wei¹, HAO Jianjun¹, YI Yandong¹

1. Center of Experimental Medicine, Wuhan First Hospital, Wuhan 430022, China; 2. Human Genome Research Center, Huazhong University of Science & Technology

Abstract: **Objective** Constructed eukaryotic expression plasmid of small hairpin RNA (shRNA) of PCNA, then expressed plasmid in HeLa cells and investigated the inhibitory effect of shRNA of PCNA on HeLa cell carcinoma cell proliferation. **Methods** The cDNA shRNA the prime of PCNA was inserted into downstream of the vector pGenesil-1 to obtain the recombinant eukaryotic expression plasmid pGenesil-1-PCNA1-4 which we identified with the methods of enzyme digestion and sequence analysis. The results were consistent with what we expected. And then transfected the recombinant plasmid pGenesil-1-PCNA1-4 into eukaryotic HeLa cells by cationic polymer-mediated transfection. The inhibition of the HeLa cell carcinoma cell proliferation was estimated by immunohistochemistry and western blot method, the cell cycle was analysed by flow cytometric. **Results** shRNA of PCNA inhibited the growth rate of HeLa cell and arrested proliferation of HeLa cell in phase of G₀/G₁-S. **Conclusion** shRNA of PCNA might be effective in the behavior of HeLa cell lines and inhibited the proliferating cell nuclear antigen by inhibiting expression of PCNA. This result laid the foundation for further researching in gene therapy of uterine cervix carcinoma.

Key words: Uterine cervix carcinoma; Proliferating cell nuclear antigen; Small hairpin RNA; HeLa cell

摘要: **目的** 构建 PCNA 的小发夹结构 RNA (shRNA) 的真核表达载体并在 HeLa 细胞表达,同时观察 PCNA 的 shRNA 对人 HeLa 细胞株体外增殖的影响及生物学特性的改变。 **方法** 将 PCNA 的 cDNA 的 shRNA 引物插入真核表达载体 pGenesil-1, 构建真核表达质粒 pGenesil-1-PCNA1-4, 并通过酶切和测序等方法进行鉴定, 将真核表达质粒 pGenesil-1-PCNA1-4 转染子宫颈癌细胞, 运用 Western blot 检测 PCNA 的蛋白表达, 流式细胞仪分析细胞周期变化。 **结果** PCNA 的 shRNA 能显著抑制人 HeLa 细胞的生长, 阻滞细胞 G₀/G₁-S 期, PCNA 的蛋白表达同时受到抑制。 **结论** PCNA 的 shRNA 能显著抑制人 HeLa 细胞的生长, 其抑制作用可能通过阻断 PCNA 蛋白表达实现, 实验结果为进一步研究 PCNA 的 shRNA 对子宫颈癌的基因治疗奠定了基础。

关键词: 子宫颈癌; 增殖细胞核抗原; 小发夹结构 RNA; 子宫颈癌细胞

中图分类号: R737.33 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2006)09-0662-03

0 引言

肿瘤的发生与基因突变及细胞增殖有关。增殖细胞核抗原 (Proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 是在细胞周期 S 期广泛表达的一种核蛋白, 是一种仅在增殖细胞中合成和表达的 36 KD 多肽, 其功能是 DNA 聚合酶的重要辅助蛋白, 在 DNA 合成中是绝对必需的, 在细胞增殖过程中有重要意义, PCNA 阳性表达说明该细胞正处于增殖状态。因

此, PCNA 作为一项评估细胞增殖状态的指标不仅用于病理学研究, 而且近年来在肿瘤研究中的应用日渐增多^[1]。

RNA 干预 (RNA interference, RNAi) 本质是一种双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 分子在 mRNA 水平上关闭相应序列基因的表达或使其沉默的过程, 也就是序列特异性的转录后基因沉默^[2] (post-transcriptional gene silencing, PTGS)。shRNA 是 45 - 50-mer 的小发夹结构 RNA (small hairpin RNA, shRNA), 通过将其转染到细胞。shRNA 在细胞内会自动被加工成为 siRNA, 从而引发基因沉默或者表达抑制^[3]。

收稿日期: 2005-08-24; 修回日期: 2005-11-09

作者单位: 1. 430022 武汉市第一医院实验中心; 2. 华中科技大学人类基因组研究中心

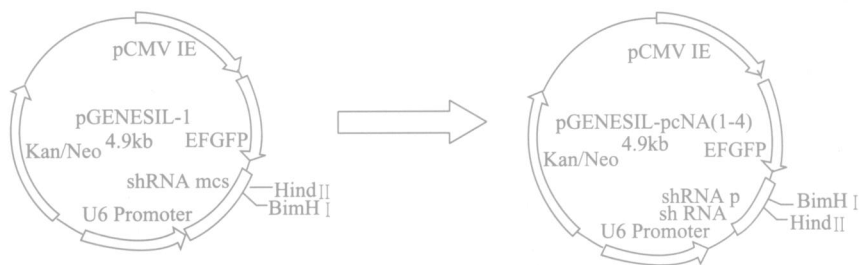


图 1 真核表达载体 pGenesil-PCNA-1-4 的构建

我们根据 PCNA 的 cDNA 的序列设计 shRNA 的引物,插入真核表达载体 p Genesil-1,构建正确的真核表达质粒,见图 1,导入 HeLa 细胞中并研究其产生 siRNA 对 HeLa 细胞干预的影响。为 RNAi 干预技术对肿瘤的基因治疗提供了实验理论和基础。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

HeLa 细胞引自武汉大学生命科学院,培养于含 10%小牛血清的 DMEM 的培养液中,37℃ 5%的 CO₂ 条件下培养,0.3%的胰酶消化和传代。

1.2 shRNA 设计和合成

根据 PCNA 基因序列(NM_182649), shRNA 设计规则及 blast 同源搜索选取、设计四对引物及一对对照引物,每一对引物上游含 BamH I 切点之后 GA TCC 的粘性末端,引物下游互补端含 Hind III 切点的互补的 TTCGA 粘性末端,武汉市晶赛生物技术有限公司合成。

1.3 PCNA 的 shRNA 的真核表达载体的构建

将真核表达载体 p Genesil-1 和经 BamH I, Hind III 双酶切后与纯化的含相应粘性末端的 PCNA 基因的 shRNA 四对引物片段和一对对照引物片段,进行线性连接,连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5,经小量提取质粒测序鉴定。构建的表达质粒称 p Genesil-PCNA-1、p Genesil-PCNA-2、p Genesil-PCNA-3、p Genesil-PCNA-4、p Genesil-PCNA-HK。

1.4 阳离子聚合物(梭华 - Sofast™/DNA 试剂盒)介导的细胞转染

细胞培养至 40%~60%汇合,配制不同浓度的 p Genesil-PCNA-1-4 (浓度 5μg/ml、7.5μg/ml、10μg/ml、12.5μg/ml、15μg/ml)梭华 - Sofast™/DNA 复合物,进行转染,具体操作步骤见试剂盒说明书。

1.5 流式细胞仪(FCM)检测

收集 1.0 × 10⁶ 细胞,用 70%冷乙醇固定,加 rNaseA (终浓度 50μg/ml),用 37℃ 水浴 1h,加碘化丙啶(PI,终浓度 20μg/ml),暗处冰浴染色 1h。用流式细胞仪检测细胞周期分布,用通过 ModF-

itL T3.1 软件分析。

1.6 Western-blot 定量检测 PCNA 蛋白

转染细胞如 1.4,收集转染及正常的细胞,裂解液裂解,取 20μl 裂解样品液,进行 SDS-PAGE 蛋白电泳,表达产物电转移至硝酸纤维素膜上,进行 Western-blot 反应,通过 BandScan 5.0 软件对杂交图进行分析,以 β -actin 做为定量 Marker,20pmol 为定量单位。

1.7 统计学分析应用

t 检验进行差异分析,以 P < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 PCNA shRNA 对细胞增殖的影响

2.1.1 细胞光镜观察见图 2、3。

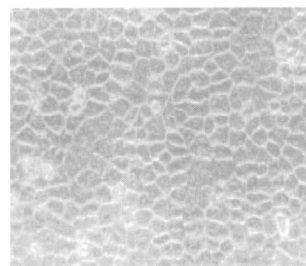


图 2 未转染的 HeLa 细胞 24h 后细胞形态(×200)

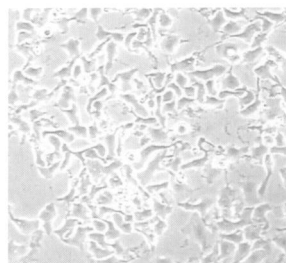


图 3 转染了 pGenesil-PCNA-1-4 HeLa 细胞 24h 后细胞形态(×200)

由上图可知正常细胞呈致密的上皮,在转染了四种引物的真核表达载体 24h 后,细胞都发生显著变化,周边细胞脱落死亡,细胞形态呈梭形,中间细胞聚集成团,类似于孤岛状。

2.2 流式细胞仪(FCM)检测细胞周期 见图 4A、B。

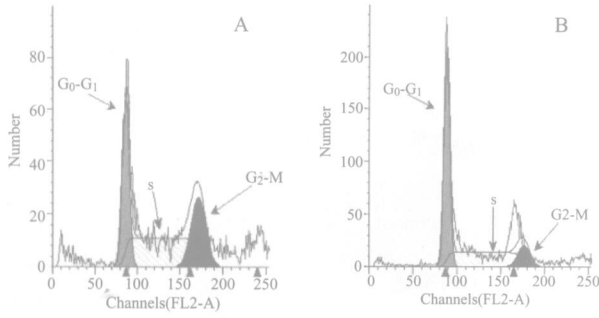


图 4 A:未转染的 HeLa 细胞 24h 后细胞周期分析; B:转染 pGenesil-PCNA-4, 12.5 μg/ml, 24h 后细胞周期分析

通过 ModFitL T3.1 软件分析以上细胞周期图, 正常 HeLa 细胞 24h 后, G₀ ~ G₁ 期占 37.46%, S 期 39.23%, G₂-M 期 23.31%, 转染 12.5 μg/ml p Genesil-PCNA-4 24h 后 G₀ ~ G₁ 期占 57.23%, S 期 29.12%, G₂-M 期 13.65%。

在分析 p Genesil-PCNA-1-4 各组转染的肿瘤细胞中, 我们发现 G₁ 期细胞数明显增多, S 期细胞数明显减少, 在转染 p Genesil-PCNA-4 时 G₂ 期细胞数明显减少。

2.3 Western-blot 检测 PCNA 蛋白

各种质粒转染 12.5 μg/ml 时 Western-blot 杂交图, 见图 6。

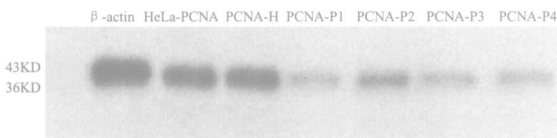


图 6 Western-blot 杂交图

由图 6 可知, 没有转染的正常 HeLa 细胞和转染了 p Genesil-PCNA-HK、p Genesil-PCNA-1-4 质粒的 HeLa 细胞均可见在 43 KD 的 β -actin Marker 略下方可见清晰杂交带, 我们将没有转染的正常 HeLa 细胞与转染 12.5 μg/ml 时的 p Genesil-PCNA-HK、p Genesil-PCNA-1-4 的 24h 后 western-blot 杂交图进行 BandScan 5.0 软件分析, 以 β -actin 为内参定量 Marker, 得出结果分别为 11.84、11.32、1.14、4.43、1.14、0.51, 转染了四种真核表达的质粒细胞表达 PCNA 的蛋白量均显著降低, 其中转染 p Genesil-PCNA-4 最显著。

3 讨论

宫颈癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 它严重威胁妇女的生命健康, 但其发病机制尚不清楚。已有很多资料表明: 宫颈癌 PCNA 表达率明显高于非癌性子宫颈上皮, 且在宫颈癌中 PCNA 表达率随分化程度的降低而增高, 表明 PCNA 的表达能作为反映宫颈癌细胞增殖活性的指标^[4]。

利用反义技术特异地阻断某一基因功能已被证实是可行的。应用反义技术封闭 PCNA 的研究, 目前主要集中在研究增殖性血管性疾病, 仅有少数报告研究增殖性肾病和胃癌的治疗^[5]。但至今未见应用 PCNA 的 shRNA 技术封闭 HeLa 细胞增殖的报道。

实验中我们通过流式细胞术分析细胞周期发现 p Genesil-PCNA-1-4 各组转染的肿瘤细胞中, G₁ 期细胞数明显增多, S 期细胞数明显减少, G₂ 期细胞数减少, p Genesil-PCNA-4 组减少最显著。提示 p Genesil-PCNA-1-4 可能延缓了肿瘤细胞由 G₁ 期向 S 期的过渡。证实我们构建的 shRNA 真核表达载体都具有有效性。

我们通过 Western blot 及 BandScan 5.0 软件分析了转染 5 μg/ml、7.5 μg/ml、10 μg/ml、12.5 μg/ml、15 μg/ml 各种浓度的 p Genesil-PCNA-1-4, 将结果与对照组比较, 发现表达 PCNA 蛋白量均有显著性差异。转染 p Genesil-PCNA-4 组的 PCNA 蛋白量降低最为显著, 转染各种浓度质粒的 PCNA 蛋白表达量均明显下降, 进一步证实了我们构建的四种 shRNA 真核表达载体均具有有效性, 其中, p Genesil-PCNA-4 的有效性最好。实验结果表明: 我们设计的四种 PCNA 的 shRNA 不仅抑制了 HeLa 细胞的生长、DNA 和 PCNA 蛋白合成, 而且明显阻滞了 HeLa 细胞由 G₀/G₁ 期进入 S 期。而相同浓度的对照 p Genesil-PCNA-HK 对 HeLa 生长无明显抑制作用, 提示 PCNA 的 shRNA 对 HeLa 细胞抑制作用具有特异性。

应用 PCNA 基因 shRNA 阻断特定的基因表达, 可以明显抑制 HeLa 细胞的增殖, 改变肿瘤细胞的生物学行为, 为合理地利用反义技术改变和逆转致病细胞恶性表型的肿瘤基因治疗提供了一个方向。

参考文献:

- [1] Li L, Da J, Stucki M, et al. Int J Antiproliferative activity and toxicity of 2-methoxyestradiol in cervical cancer xenograft mice[J]. Gynecol Cancer, 2005, 15(2): 301-307.
- [2] Kuninger D, Stauffer D, Eftekhari S, et al. Gene disruption by regulated short interfering RNA expression, using a two-adenovirus system[J]. Hum Gene Ther, 2004, 15(2): 1287-1292.
- [3] Spankuch B, Matthes Y, Knecht R, et al. Cancer inhibition in nude mice after systemic application of U6 promoter-driven short hairpin[J]. J Natl Cancer Inst, 2004, 96(11): 862-872.
- [4] Arrighi JF, Pion M, Wiznerowicz M. Lentivirus-mediated RNA interference of DC-SIGN expression inhibits human immunodeficiency virus transmission from dendritic cells to T cells[J]. J Virol, 2004, 78(20): 10848-10855.
- [5] Hasan S, Stucki M, Hassa PO. Regulation of human flap endonuclease-1 activity by acetylation through the transcriptional coactivator p300[J]. Mol Cell, 2001, 7(6): 1221-1231.

[编辑:周永红]