

siRNA 对生长抑素基因表达的抑制效应

朱晓燕¹, 岳保红², 张钦宪¹

Inhibition Effects of siRNA on Expression of Somatostatin Gene

ZHU Xiao-yan¹, YUE Bao-hong², ZHANG Qin-xian¹

1. Department of Histology & Embryology, Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Department of Clinical Laboratories of The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University

Corresponding Author: ZHANG Qin-xian, E-mail: qxz53@zzu.edu.cn

Abstract: Objective To study the somatostatin (SOM) gene expression inhibition of siRNA. **Methods** According to the gene sequence of SOM in the Genbank, we designed the targeted siRNA templates. The siRNA was synthesized by T7RiboMAX™ Expression RNAi system in vitro and was transfected into gastric cancer cell line BGC-823. The inhibitory effects were detected by RT-PCR and Immunohistochemical techniques. **Results** siRNA inhibited SOM gene expression. **Conclusion** siRNA was generated in vitro and it inhibited SOM gene expression specifically. Our research provides basic research for selecting efficient sequence of suppressing SOM gene expression.

Key words: RNA interference; Small interfering RNA; Somatostatin; Inhibit

摘要:目的 研究 siRNA 对生长抑素(SOM)基因表达的抑制作用。方法 根据 SOM 全长 cDNA 序列设计和合成 RNA 干扰的靶序列,应用 T7RiboMAX™ 体外转录合成 siRNA 并转染胃癌细胞系 BGC-823,经 RT-PCR,免疫组化法检测 SOM mRNA 和蛋白的表达水平。结果 siRNA 可以特异性抑制 SOM 基因的表达。结论 通过体外合成 siRNA 可以特异性抑制 SOM 基因的表达,为筛选抑制 SOM 基因表达的有效序列研究奠定了基础。

关键词: RNA 干扰; siRNA; SOM; 抑制

中图分类号: R735.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2006)06-0414-03

0 引言

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是双链 RNA(dsRNA)介导的序列特异性转录后同源靶基因沉默效应。由于小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)在哺乳动物细胞中可以诱导 RNAi 效应,它已经成为基因功能研究的重要工具。胃癌的发病机制十分复杂,其病因目前尚未阐明,胃肠激素在胃癌发生、发展的过程中所起的作用正日益受到关注。本研究设计并体外合成了短双链 RNA,通过转染胃癌细胞系 BGC-823,研究其干扰生长抑素(somatostatin, SOM)基因表达的效应,为筛选抑制 SOM 基因表达的有效序列,进一步研究其功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料 胃癌细胞系 BGC-823,由本教研室保

存,胎牛血清,胰蛋白酶购自 Takara, T7RiboMAX™ Express RNAi System 购自 Promega 公司, Code-Breaker™ siRNA Transfection Reagent 购自 Promega 公司。TRIZOL Reagent RNA 提取试剂盒,购自 invitrogen。RT-PCR 两步法试剂盒购自上海生物工程有限公司。PUC19DNA Marker 购自上海生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 靶向 SOM 的 siRNA 设计 在 GenBank 中取得 SOM 基因全长 mRNA 序列,用 Sira mode of Sfd software(<http://sfdd.ward.worch.org/sirna.pl>),进行 siRNA 的设计及 RNA 二级结构的预测。SOM 基因全长 cDNA 共 633 个碱基,根据分析结果选择 220~240bp 为靶序列, TGATGCCCTGGAACCTGAA。

1.2.2 siRNA 模板寡核苷酸的设计 依据所设计的靶向 siRNA 序列,根据试剂盒的要求设计 siRNA 模板寡核苷酸,由上海生物工程有限公司合成,序列为: P1: 5'GGA TCCTAA TACGACTCACTA TAT GA TGCCCTGGAACCTGAA; P2: 5'AA TTCA G GTTCCA GGGCA TCA TA TA GTGA GTCGTA T-TA GGA TCC; P3: 5'GGA TCCTAA TACGACTC

收稿日期: 2005-12-27; 修回日期: 2006-03-09

作者单位: 1. 450052 郑州大学医学院组胚教研室; 2. 郑州大学第一附属医院检验科

通讯作者: 张钦宪, E-mail: qxz53@zzu.edu.cn

作者简介: 朱晓燕(1976-),女,在读博士,讲师,主要从事消化道肿瘤分子生物学研究

ACTATA TTCA GGT TCCA GGGCA TCA ; P 4 : 5 ' AA TGA TGCCT GGAACCT GAA TA TA GTGAG TCGTATTA GGA TCC

1.2.3 β -actin 基因内参照引物的设计与合成 根据 GenBank 上发表的家基因 β -actin 的序列,利用 Primer premier 5.0 软件设计了 β -actin 的序列,扩增长度为 198bp。

上游引物: 5' TTCTGACCCA TGCCACCA T-3' (sense); 下游引物: 5' ATGGA TGA T-GA TA TCGCCGCGCTC-3' (antisense)

1.2.4 SOM 基因 RT-PCR 扩增引物的设计 根据 GeneBank 上发表 SOM 基因的序列 (accession no. BC032625) 利用 Primer premier 5.0 软件设计了 RT-PCR 的序列,扩增长度为 356bp。

上游引物: 5' GATGCTGTCTGCGCCTC-CAG-3' (sense); 下游引物: 5' ACA GGA TGT-GAA GTCTTCCA-3' (antisense)

1.2.5 合成 siRNA 用 T7RiboMAXTM Express RNAi System 试剂,按照试剂盒说明书以合成的寡核苷酸为模板,体外合成 siRNA。

1.2.6 转染 37^o, 5% CO₂, 10% 胎牛血清常规培养胃癌细胞系 BGC-823, CodeBreakerTM siRNA Transfection Reagent 转染 BGC-823。转染前 6 孔板接种 3 孔, 24 孔板接种 3 孔, 分别设对照组和转染实验组, 待细胞长到 50% ~ 70%, 进行转染。24 孔板转染时, 准备 2 个 500 μ l 离心管, 每管加入 2 μ l 转染试剂与 125 μ l 无血清培养基充分涡旋混合, 室温孵育 20min, 空转染对照组不加 siRNA, 实验组加入双链 siRNA 0.1 μ l 到稀释的转染试剂, 使 siRNA 转染浓度达到 10nM, 轻轻用手指弹匀, 室温孵育 20min, 分别加入 6 孔板中的两个孔中, 加 10% 胎牛血清培养基 2.5ml、37^o、5% CO₂, 培养 24h 后收集细胞。6 孔板转染时, 准备两个 1.5ml 离心管, 每管加入 10 μ l 转染试剂与 625 μ l 无血清培养基充分涡旋混合, 室温孵育 20min, 空转染对照组不加 siRNA, 实验组加入双链 siRNA 0.5 μ l 到稀释的转染试剂, 使 siRNA 转染浓度达到 10nM, 轻轻用手指弹匀, 室温孵育 20min, 加入 6 孔板中的两个孔中, 加 10% 胎牛血清培养基 2.5ml、37^o、5% CO₂, 培养 24h 后收集细胞。

1.2.7 免疫组化检测抑制效应 转染后 24h, 收集 24 孔板培养的两组细胞, 做细胞涂片, 4% 多聚甲醛固定, 按照试剂盒要求做免疫组化, DAB 显色。

1.2.8 RT-PCR 检测抑制效应 转染后 24h, 收集 6 孔板培养的两组细胞, 每孔加 1ml TRIZOL 试剂, 按试剂盒操作说明, 分别提取总 RNA, 电泳鉴

定, 按照 RT-PCR 试剂盒两步法说明书操作, 分别用 SOM 基因和 β -actin 基因引物, 进行 RT-PCR。

2 结果

2.1 总 RNA 的提取 RNA 结构完整, 符合实验要求, 见图 1。

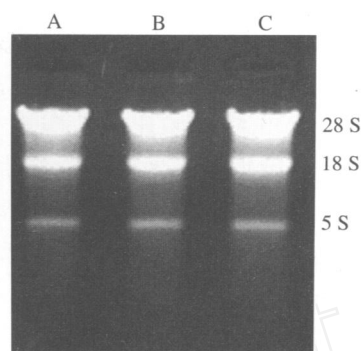


图 1 完整的 RNA

2.2 合成的 siRNA 见图 2。

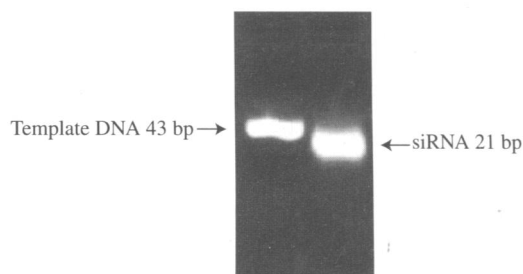
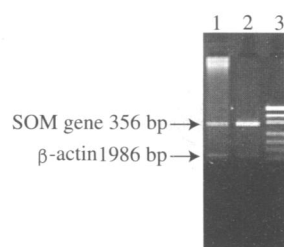


图 2 合成的 siRNA

2.3 免疫组化结果 见图 3、4。

2.4 siRNA 对 SOM 基因的抑制作用 取 RT-PCR 产物 5 μ l, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 结果可以看出两组样品在 198bp 处均可见到 β -actin, 转染组在 356bp 处条带较弱, 说明 SOM 基因表达受到抑制, 而正常对照组在 356bp 处条带较亮, 说明扩增出了靶基因, 见图 5。



1. 转染组; 2. 对照组; 3. marker

图 5 RT-PCR 结果

3 讨论

肿瘤的发生是多基因参与的过程。以往对肿瘤的研究多仅限于探讨某几种癌基因或抑癌基因在肿

瘤中的表达,无法深入提示肿瘤发生的内在机制。寻求一种新的有效方法深入对该基因进行功能研究是了解肿瘤发生发展过程的重要策略。目前对基因功能的研究最有效的方法有两种:一是观察该基因突变的表型改变,这类改变可通过同源重组的方式直接诱导产生,也可经研究某随机突变生物体中该基因损害而得到认识;另一种是利用反义核酸技术特异性抑制该基因的表达^[1],从而研究该基因的功能,但反义技术存在特异性不强、效率不高等缺点。自 1998 年以来,RNAi 技术已成功应用于线虫、果蝇、斑马鱼、真菌、植物以及哺乳动物等生物的基因功能研究,并且应用范围不断拓宽,它的出现为基因功能研究提供了一种新的具有高效性和高度特异性的功能基因组研究策略^[2]。

SOM 是 1973 年 Brazeau 等从羊下丘脑中分离并提纯的一种调节肽,对机体几乎所有的生理性内分泌反应均起抑制作用,其对肿瘤的作用目前尚无定论^[3]。SOM 的作用是通过膜上生长抑素受体 (SSTR) 结合起作用^[4]。SSTR 具有识别不同化学信使的能力,并能通过一些直接或间接的偶联系统启动生物反应,但具体的信号转导途径不详^[5]。尽管大量文献报道 SOM 抗肿瘤作用机制,但看法不尽一致。Lahlou 等^[6]认为通过 Ras-, Rap1-, and B-Raf-ERK2 激活有丝分裂原激活的蛋白激酶 (MAPK) 抑制细胞的增殖。Liang 等^[7]、Charlands 等^[8]等报道 SOM 可以抑制肿瘤细胞 Akt 磷酸化和细胞周期启动。Hu 等^[9]研究发现 SOM 类似物可诱导抑制瘤细胞凋亡,同时伴随着肿瘤内增高的去磷酸化状态。因此,采用 RNA 干扰技术研究 SOM 的功能,探讨其与肿瘤发生的关系具有重要意义。RNA 干扰成功的关键是 siRNA 作用靶序列的选择。本实验设计并体外合成针对第 220~240 靶序列的 siRNA 能有效抑制 SOM 的表达。Tuschl 等^[10]研究发现应避免选择 5' 和 3' URT,避免选择启动子起始部位下游 50~100nt 内的区域或终止子上游 50~100nt 内的区域。选择以两个 AA 开始的序列,这将使合成 siRNA 更加容易、更加经济和创建一个对核酸酶更有抵抗力的 siRNA。选择 GC 含量在 35%~50% 之间的 mRNA 区域。本实验选用的靶序列 GC 含量为 47.6%。避免超过 3 个 G 或 3 个 C 重叠。多聚 G 或多聚 C 序列能产生堆积形成

类聚物而干扰 siRNA 沉默效应。通过 BLAST 查询是否具有同源性,保证靶序列,与其他基因没有同源性,以避免产生同一序列的基因干扰^[11]。本实验设计并合成的 siRNA 能有效抑制 SOM 基因的表达。建立了 SOM 表达抑制的细胞系为下一步深入研究 SOM 基因在胃癌发生、发展中的作用机制奠定了基础。

(本文图 3、4 见封 3)

参考文献:

- [1] Thaler S, Rejda R, Dietrich K, et al. A selective method for transfection of retinal ganglion cells by retrograde transfer of antisense oligonucleotides against kynurenine aminotransferase II[J]. *Mol Vis*, 2006, 22(12):100-107.
- [2] Arias CF, Dector MA, Segovia L, et al. RNA silencing of rotavirus gene expression[J]. *Virus Res*, 2004, 102(1):43-51.
- [3] Lindblad M, Garcia Rodriguez LA, Chandanos E, et al. Hormone replacement therapy and risks of oesophageal and gastric adenocarcinomas[J]. *Br J Cancer*, 2006, 94(1):136-141.
- [4] Volante M, Bozzalla-Cassione F, Papotti M. Somatostatin receptors and their interest in diagnostic pathology[J]. *Endocr Pathol*, 2004, 15(4):275-291.
- [5] Delaroin T, Rubin J, Neczyporenko F, et al. Somatostatin analogues in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors[J]. *Mayo Clin Proc*, 2005, 80(4):502-506.
- [6] Lahlou H, Saint-Laurent N, Esteve JP, et al. sst2 Somatostatin receptor inhibits cell proliferation through Ras-, Rap1-, and B-Raf-dependent ERK2 activation[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(41):39356-39371.
- [7] Liang J, Slingerland JM. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression[J]. *Cell Cycle*, 2003, 2(4):339-345.
- [8] Charland S, Boucher MJ, Houde M, Rivard N. Somatostatin inhibits Akt phosphorylation and cell cycle entry, but not p42/p44 mitogen-activated protein (MAP) kinase activation in normal and tumoral pancreatic acinar cells[J]. *Endocrinology*, 2001, 142(1):121-128.
- [9] Hu C, Yi C, Hao Z, et al. The effect of somatostatin and SSTR3 on proliferation and apoptosis of gastric cancer cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2004, 3(8):726-730.
- [10] Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, et al. Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing[J]. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2003, 13(2):83-105.
- [11] Shabalina SA, Spiridonov AN, Ogurtsov AY. Computational models with thermodynamic and composition features improve siRNA design[J]. *BMC Bioinformatics*, 2006, 7(1):65-68.

[编辑:安 凤]

siRNA 对生长抑素基因表达的抑制效应

(正文见 414 页)

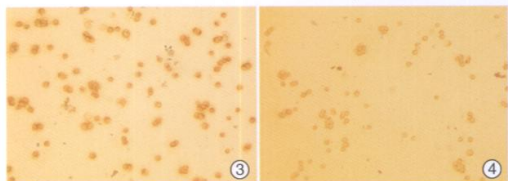


图3 胃癌细胞系 BGC-823 中 SOM 基因的表达呈强阳性

图4 siRNA 作用胃癌细胞系 24h 后 SOM 基因的表达明显受抑制

MK 和 CD105 在大肠癌中的表达及其临床意义

(正文见 425 页)

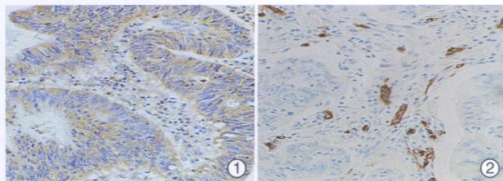


图1 MK 在大肠癌组织中的表达。棕黄色信号主要分布大肠癌组织细胞质内, 细胞核呈阴性 (SP × 400)

图2 CD105 在大肠癌组织中的表达。染成棕黄色的阳性内皮细胞呈条索状或团簇状 (SP × 400)

多西他赛联合放疗对大鼠脊髓损伤的观察

(正文见 447 页)

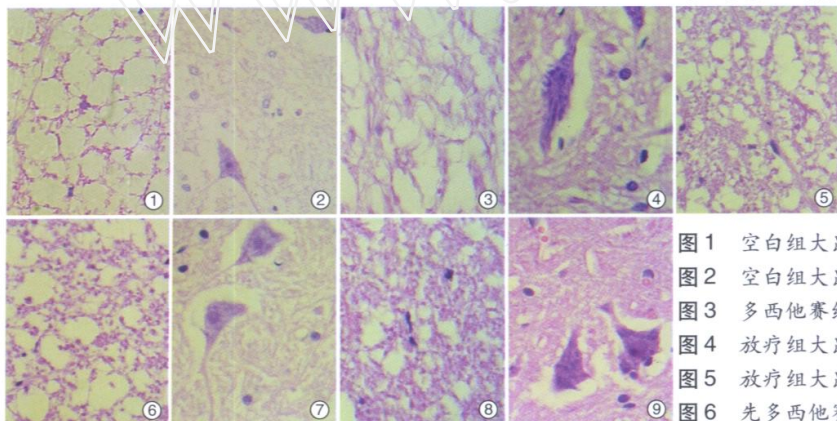


图1 空白组大鼠脊髓白质(HE × 400)

图2 空白组大鼠脊髓灰质(HE × 400)

图3 多西他赛组大鼠脊髓白质(HE × 400)

图4 放疗组大鼠脊髓灰质(HE × 400)

图5 放疗组大鼠脊髓白质(HE × 400)

图6 先多西他赛后放疗组大鼠脊髓白质(HE × 400)

图7 先多西他赛后放疗组大鼠脊髓灰质(HE × 400)

图8 先放疗后多西他赛组大鼠脊髓白质(HE × 400)

图9 先放疗后多西他赛组大鼠脊髓灰质(HE × 400)

直肠癌组织中 TAM 计数与 EMMPRIN、IL-8、MCP-1 表达的相关性

(正文见 436 页)

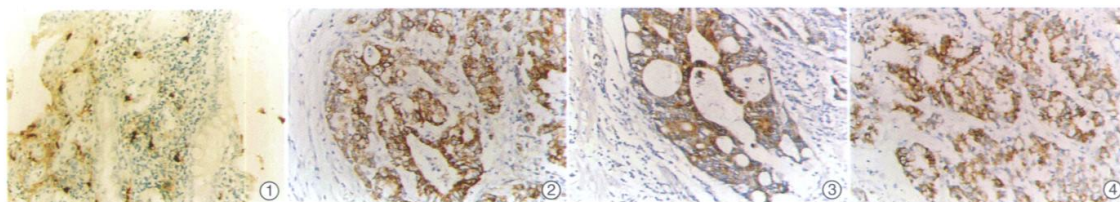


图1 TAM 计数为 23 个/HP, 高分化腺癌 (ABC × 200)

图2 EMMPRIN 阳性表达, 中分化腺癌 (ABC × 200)

图3 IL-8 阳性表达, 中分化腺癌 (ABC × 200)

图4 MCP-1 阳性表达, 中分化腺癌 (ABC × 200)