

要污染物主要为可吸入颗粒物,其总检出天数高达 97%,其次为 SO₂。为此,武汉市政府采取关停市区污染项目和从市区搬出污染企业等措施,已使武汉市区工矿企业的烟尘排放量明显减少,可吸入颗粒物浓度逐年降低。应注意的是:虽然实施了节能减排、使用新能源和改进生产工艺等措施,但机动车保有量却逐年明显增加,因此,控制武汉市可吸入颗粒物和 SO₂ 的排放量仍是今后治理武汉市空气污染的重点。

2001—2010 年武汉市空气质量变化呈“冬重夏轻”格局。可能与气候因素有关^[7]。武汉属于北亚热带季风性湿润气候,由热带海洋气团和极地大陆气团交替控制。夏季武汉常受中纬度西风带和副热带高压影响,雨量较其它季节明显增多,且此时天气炎热,光照强烈,容易形成空气对流,这些都有利于降低污染物浓度。但是,冬季武汉常受极地大陆气

团控制,寒冷干燥,气层稳定且容易形成逆温层,不利于污染物扩散和清除,导致空气污染加重^[8]。

参考文献

- [1] 湖北省环保局. 2010 年湖北省环境质量状况[R]. 武汉, 2011.
- [2] 中国国家环境保护局. GB 3095-1996 环境空气质量标准[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 1996.
- [3] 王海鹏, 张斌, 刘祖涵, 等. 基于小波变换的兰州市近十年空气污染指数变化[J]. 环境科学报, 2006, 31(5): 1070-1076.
- [4] Gurjar BR, Butler TM, Lawrence MG, et al. Evaluation of emissions and air quality in megacities[J]. Atmospheric Environment, 2008, 42(7): 1593-1606.
- [5] 严俊, 王振全, 连素琴, 等. 兰州大气污染对循环系统疾病日住院人数影响[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(12): 1514-1516.
- [6] Sicard P, Lesne O, Alexandre N, et al. Air quality trends and potential health effects-development of an aggregate risk index[J]. Atmospheric Environment, 2011, 45(5): 1145-1153.
- [7] Chen ZH, Cheng SY, Li JB, et al. Relationship between atmospheric pollution processes and synoptic pressure patterns in northern China[J]. Atmospheric Environment, 2008, 42(24): 6078-6087.
- [8] 纪颖, 范惠洁, 王秋芳, 等. 颗粒物浓度与气象因素[J]. 环境与健康杂志, 2008, 25(6): 554-555.

收稿日期: 2012-02-27

(解学魁编辑 周欣琳校对)

· 实验研究 ·

新靶点 CDK2 干扰 RNA 对人脑胶质瘤增殖影响*

呼格吉乐¹, 张军力¹, 段美庆¹, 王俊瑞¹, 高乃康²

摘要:目的 构建 4 个新靶点的人细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (CDK2) 干扰 RNA 真核表达载体, 转染人脑胶质瘤细胞后, 检测出干扰效果最好的载体及细胞增殖能力的变化。方法 构建 4 个新靶点 CDK2 干扰 RNA 真核表达载体并用双酶切和测序鉴定; 分别转染上述 4 个载体到人脑胶质瘤细胞株 SHG44; 通过逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 比较转染后 CDK2 mRNA 的表达量, 选出干扰效果最好的一个, 检测细胞增殖能力的变化。结果 成功构建 4 个新靶点的 CDK2 干扰 RNA 真核表达载体 P^{CDK2-1}、P^{CDK2-2}、P^{CDK2-3}、P^{CDK2-4}; CDK2 mRNA 表达和细胞增殖明显受到抑制, P^{CDK2-1} 的干扰效果为 56%; P^{CDK2-1}-SHG44 细胞与对照组相比增殖能力减弱。结论 成功构建并筛选出效果最好的新靶点 CDK2 干扰 RNA 真核表达载体, 并使 SHG44 细胞的增殖水平降低。

关键词: 干扰 RNA; 新靶点; 细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (CDK2); 胶质瘤; 增殖

中图分类号: R 739.41

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2013)06-0855-03

Effects of new targets of CDK2 RNA interference on proliferation of SHG44 cells

Hugejile*, ZHANG Jun-li, DUAN Mei-qing, et al (* Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Huhehaote, Inner Mongolia Autonomous Region 010050, China)

Abstract: Objective To construct four new eukaryotic expression vectors of RNA interference specific for cyclin-dependent kinase-2 (CDK2) and transfect the vectors into SHG44 cells for the detection of vectors with strong interferential effect. **Methods** Four new eukaryotic expression vectors of RNA interference specific for CDK2 were constructed. The human glioma SHG44 cell line was transfected with the four new vectors. The mRNA contents of CDK2 were detected using reverse transcriptase-PCR (RT-PCR). The change in proliferation of SHG44 cells was assayed. **Results** The new vectors with new targets of eukaryotic expression of RNA interference specific for CDK2 were constructed (P^{CDK2-1}, P^{CDK2-2}, P^{CDK2-3}, P^{CDK2-4}). CDK2 small interfering RNA (siRNA) could suppress expression of mRNA and P^{CDK2-1}. siRNA could inhibit the proliferation of SHG44 cell line. **Conclusion** The proliferation of human SHG44 cell line could be significantly inhibited after the transfection with new eukaryotic expression vectors of CDK2 siRNA.

Key words: interference RNA; new target; CDK2; glioma; proliferation

* 基金项目: 内蒙古医科大学青年创新基金 (YKD2012QNCX009)

作者单位: 1. 内蒙古医科大学附属医院检验科, 内蒙古 呼和浩特 010050; 2. 内蒙古医科大学附属医院神经外科

作者简介: 呼格吉乐 (1984-), 男, 蒙古族, 内蒙古呼和浩特人, 检验师, 硕士, 研究方向: 生化与分子生物学。

通讯作者: 高乃康, E-mail: gaonaikang@163.com

人脑胶质瘤是中枢神经系统常见的肿瘤,但是由于该细胞增值能力强,且发病机制尚不清楚,所以预后较差^[1-2]。细胞周期失控与肿瘤发生密切相关,细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (cyclin-dependent kinase, CDK2) 在人脑胶质瘤中表达,是细胞周期中重要的调控因子,通过磷酸基团的转移影响细胞周期,在驱动细胞周期进入 S 期和维持 S 期的过程中起决定性作用^[3-4]。干扰 RNA 技术现在已被广泛用于恶性肿瘤的基因治疗领域。因此本实验构建高效的 CDK2 新靶点干扰 RNA 真核表达载体,转染 SHG44 细胞系后,比较 CDK2 表达抑制前后 SHG44 细胞增殖能力的变化,为 CDK2 的作用机制、胶质瘤发病机理的研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人脑恶性胶质瘤 SHG44 细胞株(中科院上海细胞库);脂质体 2000 转染试剂盒(上海 Invitrogen 公司);RT-PCR 等相关试剂(大连宝生物工程公司);噻唑蓝等相关试剂(美国 Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 新靶点 CDK2 干扰 RNA 的构建 根据干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 设计原则和 GeneBank 中搜索的 CDK2 cDNA 序列,设计并合成 4 对 siRNA,同时设立阴性对照(negative control, NC)序列为不与任何人类基因序列同源。以下序列为 CDK2 部分 cDNA 序列,斜体部分为靶序列即干扰部位。

1 atggagaact tccaaaaggt ggaaaagatc ggagagggca cg-tacggagt tgtgtacaaa

121 actgagggtg tgcccagtag tgccatccga gagatctctc tgccttaagga gcttaaccat

421 atcaagctag cagactttgg actagccaga gcttttgag tc-cctgttcg tacttacacc

761 ccctggatga agatggacgg agcttggtat cgcaaatgct gcactacgac cctaacaagc

siRNA 模板中的正义链模板的 5' 端添加了 CACC,与 BbsI 酶切后形成的粘端互补;反义链模板的 5' 端添加了 GATC,与 BamH I 酶切后形成的粘端互补。将载体模板的退火后,37 °C 酶切 1 h,琼脂糖电泳。估算浓度,转到 JM109 感受态细胞中。每个连接反应挑取 5 个菌落,37 °C,250 r/min 振荡培养 12 h。提取质粒后用 BamH I, Pst I 分别酶切鉴定,并测序鉴定。

1.2.2 干扰质粒载体对 SHG44 细胞的瞬时转染 按照脂质体 2000 转染试剂说明书,将高纯度的上述 4 条质粒及阴性对照质粒分别转入 SHG44 细胞中。荧光显微镜下观察转染结果。

1.2.3 RT-PCR 检测转染组 CDK2-mRNA 表达 提取细胞总 RNA,用 TaKaRa RNA PCR Kit Ver. 3.0 试剂盒进行 RT-PCR 反应,CDK2 上游引物为 5' CAAAGCCAGAAACAAGTTGACGGGAGA-3',下游引物为 5' GGCTTGTCACATCCTGGAAGAAAGG -3',扩增产物为 898 bp。内参为甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)上游引物为 5'-CGGGAAACTGTGGCGTGAT-3',下游引物为 5'-GAGTGGGTGTCGCTGTTGA -3' 扩增产物为 300 bp。产物在 2% 琼脂糖胶上分离,用凝胶分析软件分析条带光密度。

1.2.4 噻唑蓝(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)法检测细胞的增殖能力 每组设 4 个复孔,共 3 组,并设 1 组空白对照孔。取各组细胞,用细胞计数器计数,以 4×10^3 的浓度接种于 96 孔板,分别于第 1、2、3、4、5 d 每孔加入 20 μ L 5 mg/mL 的 MTT 液,继续培养 4 h 后,弃去旧培养基,加入 200 μ L 二甲基亚砷,振荡 10 min,用酶标仪于 490 nm 读取各组细胞的吸光度(A)值。

2 结果

2.1 酶切结果 每个连接反应挑取 5 个菌落,培养后使用碱裂解法抽提质粒,所得质粒用 BamH I、Pst I 分别酶切鉴定阳性重组载体应该可以被 BamH I 切开,而不能被 Pst I 切开。酶切结果表明,所有质粒均为阳性重组载体。

2.2 克隆测序鉴定(图 1) 构建的干扰载体序列与设计序列完全相同,并且未发现突变、缺失、插入等异常存在,以 P^{CDK2-1} 测序图为例,图 1 显示的是针对靶基因干扰部位的测序结果。

2.3 倒置荧光显微镜观察 CDK2 干扰 RNA 真核表达载体瞬时转染结果 于转染 24 h 后,在倒置荧光显微镜下观察各组细胞,除未转染的组别外都有绿色荧光蛋白表达。

2.4 RT-PCR 检测瞬时转染干扰 RNA 真核表达载体后 CDK2 mRNA 水平(图 2) 结果显示,与未转染的 SHG44 细胞比较,转染阴性对照质粒的细胞 CDK2 mRNA 表达量未见明显改变,而 4 个转染细胞的 CDK2 mRNA 表达水平都有降低,其中 P^{CDK2-1}-SHG44 细胞组的 CDK2 mRNA 表达水平最低。

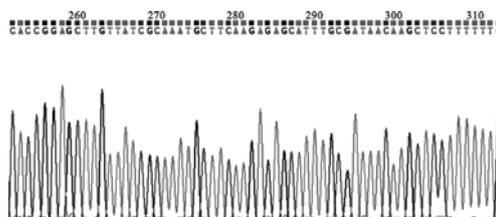
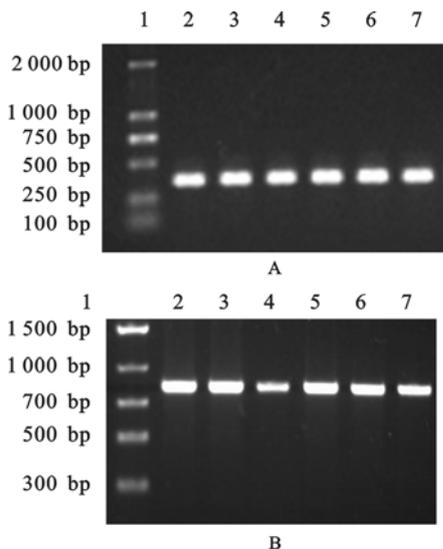


图 1 P^{CDK2-1} 干扰表达载体部分测序图



注:2 图 1 泳道都是 Marker;A 图在 2、3、4、5、6、7 泳道加入的分别是 SHG44、瞬时转染 p^{NC}-siRNA-SHG44、P^{CDK2-1}-SHG44、P^{CDK2-2}-SHG44、P^{CDK2-3}-SHG44、P^{CDK2-4}-SHG44 细胞的 GAPDH PCR 产物;B 图各泳道加入的分别是对应细胞的 CDK2 PCR 产物。

图 2 RT-PCR 检测转染干扰 RNA 真核表达载体后 CDK2 mRNA 水平

2.5 转染 CDK2 干扰 RNA 对 SHG44 细胞生长的影响(图 3) 转染组的细胞从第 3 d 开始,细胞生长变慢,明显低于阴性对照组以及未转染组细胞。而阴性对照组和未转染组细胞的生长速度差异不明显。

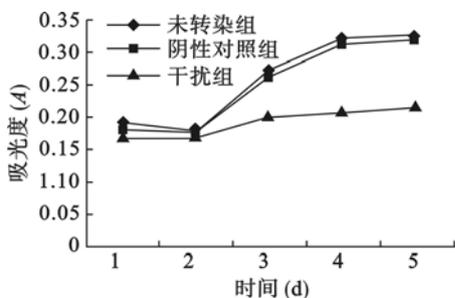


图 3 CDK2 干扰 RNA 对 SHG44 细胞增殖能力影响

3 讨论

RNA 干扰技术可以特异地剔除或关闭特定基因的表达,随着近年 RNA 干扰机制的阐明以及相关实验技术的改进,这项技术已被广泛应用于肿瘤研究的众多领域:如 RNA 干扰在研究肿瘤的多药耐药性^[6];抑制肿瘤的侵袭、转移^[7-8];调控肿瘤细胞的周期^[9];肿瘤的早期发现^[10]等相关的研究中都有广泛的应用。之前有学者对 CDK2 进行过干扰 RNA 的研究,所干扰的序列是 CDK2 的 cDNA 上的 127 bp-145 bp:5'-GGTGTACCCAGTACTGCCA-3',也对该干扰载体及实验做过改进,但是沉默效果都无法达到 30%^[11],因此进一步寻找到了新的靶点,分别是 CDK2-1:457 bp-467 bp,CDK2-2:38 bp-58 bp,CDK2-3:

149 bp-169 bp,CDK2-4:779 bp-791 bp,经过 RT-PCR 检测,靶点 CDK2-1 的干扰效果最好,接近 60%,具体序列为 5'-GGAGTCCCTGTTTCG TACTTAC-3'。

经过 MTT 法检测,当 CDK2 沉默后,细胞增殖能力降低。这不仅因为 CDK2 是细胞周期正向调节因子,在驱动细胞周期进入 S 期过程中起决定性作用,还可能和它的一系列下游蛋白共同起作用。根据进一步的实验表明,当 CDK2 沉默后波形蛋白(vimentin, VIM)也同时不表达,波形蛋白是一种 III 型中间丝纤维蛋白^[12],Bannikova 等^[13]研究发现,VIM 表达被抑制的小鼠成纤维细胞的生长速率变慢,其可能是因为 VIM 表达受抑制后,不能和相关的细胞核 DNA 分子结合,使得细胞永生能力降低,而对细胞线粒体 DNA 的调控能力也较低,导致线粒体 DNA 容易发生改变、缺失,提供分裂的能量降低,使得增殖减慢。

参考文献

- [1] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways[J]. Nature,2008,455(7216):1061-1068.
- [2] Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults[J]. N Engl J Med,2008,359(5):492-507.
- [3] Flores O, Wang Z, Knudsen KE, et al. Nuclear targeting of cyclin-dependent kinase 2 reveals essential roles of cyclin-dependent kinase 2 localization and cyclin E in vitamin D-mediated growth inhibition[J]. Endocrinology,2010,151(3):896-908.
- [4] 李均,岳瑞华,沈钧乐,等. CDK2 促进 K562 细胞早期红系分化[J]. 基础医学与临床,2011,31(5):561-564.
- [5] 王明玉,王文静,宋现让, RNA 干扰在乳腺肿瘤治疗中的研究进展[J]. 中国老年学杂志,2010,2(30):272-275.
- [6] Xue JD, Anding L, Zhuan Z, et al. siRNA inhibition of telomerase enhances the anti-cancer effect of doxorubicin in breast cancer cells[J]. BMC Cancer,2009,9:133.
- [7] Xin T, Kai L, Ya JG, et al. Decreased TIP30 expression promotes tumor metastasis in lung cancer[J]. American Journal of Pathology,2009,174(5):1931-1939.
- [8] 林伟,罗小楠,章翔,等. RNA 干涉脑胶质瘤 MSP58 基因后肿瘤转移相关基因的表达变化[J]. 中华神经外科疾病研究杂志,2010,9(1):4-9.
- [9] Adam D, Judge MR, Iran T, et al. Confirming the RNAi-mediated mechanism of action of siRNA-based cancer therapeutics in mice[J]. The Journal of Clinical Investigation,2009,119(3):661-674.
- [10] 施立海,李健,赵继宗. 人脑胶质瘤高表达 Snail 促进肿瘤细胞的侵袭[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2011,18(1):83-86.
- [11] 呼格吉乐,苏仁娜,高乃康. 稳定转染 CDK2 干扰 RNA 真核表达载体的人脑胶质细胞瘤 SHG44 细胞系的建立[J]. 内蒙古医学院学报,2011,6(33):469-472.
- [12] Helfand BT, Mendez MG. Vimentin organization modulates the formation of lamellipodia[J]. Mol Biol Cell,2011,22(8):1274-1289.
- [13] Bannikova S, Zorov DB, Shoeman RL, et al. Stability and association with the cytomatrix of mitochondrial DNA in spontaneously immortalized mouse embryo fibroblasts containing or lacking the intermediate filament protein vimentin[J]. DNA Cell Bio,2005,24(11):710-735.