

特异性抑制环氧合酶-2 表达的 siRNA 筛选

沈雁^a, 李瑞珺^a, 范达^a, 李谦^b, 涂家生^{a*} (中国药科大学, a.药剂学教研室; b.生命科学院, 南京 210009)

摘要: 目的 筛选有效抑制环氧合酶-2(COX-2)表达的小干扰 RNA(siRNA)序列, 并观察其对细胞中 COX-2 表达的抑制作用。方法 设计针对 COX-2 的 3 对(siRNA₂₄, siRNA₉₅₄, siRNA₁₅₅₃)及一条 FAM 荧光标记的阴性对照 siRNA(称为 HK)。在 Lipofectamine2000 介导下转染人胃癌细胞系 SGC-7901。同时采用 RT-PCR 法和 Western blot 方法检测细胞中 COX-2 含量, 以 β -actin 蛋白做内参照。结果 当 Lipofectamine2000 浓度在 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时能实现最大转染效果。与其他各组相比, 转染了 siRNA₉₅₄ 的人胃癌细胞中, 编码 COX-2 mRNA 的含量明显减少($P<0.01$)。结论 成功设计了针对 COX-2 的 siRNA, 并从中筛选出 siRNA₉₅₄, 能够有效抑制人胃癌细胞 COX-2 表达, 为肿瘤治疗及其临床应用奠定了基础。

关键词: 环氧合酶-2; siRNA; RT-PCR; 转染

中图分类号: R963

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)05-0377-04

Selection of Specific siRNA Inhibiting the Expression of COX-2

SHEN Yan^a, LI Ruijun^a, FAN Da^a, LI Qian^b, TU Jiasheng^{a*} (China Pharmaceutical University, a.Department of Pharmaceutics; b.School of Life Science and Technology, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To select the siRNA which could most effectively inhibit the expression of COX-2, and to observe the change of COX-2 expression in cells. **METHODS** Three siRNAs were designed(siRNA₂₄, siRNA₉₅₄, siRNA₁₅₅₃) and one FAM fluorescence-labeled siRNA was used as a negative control(HK). Detect the effect of inhibition by RT-PCR and Western blot after transfecting human gastric cancer cell line SGC-7901. **RESULTS** The $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Lipofectamine2000 had highest transfection efficiency. The expression of human COX-2 gene was suppressed specific and effectively by siRNA₉₅₄, compared with other groups($P<0.01$). **CONCLUSION** siRNA₉₅₄ can inhibit COX-2 expression effectively. It plays an important role in the treatment of tumor.

KEY WORDS: COX-2; siRNA; RT-PCR; transfection

肿瘤发病率及死亡率在我国均很高, 就诊时大多已为晚期, 且目前临床治疗肿瘤的常规方法主要是手术切除, 同时结合化疗及生物治疗的手段, 这些治疗方法虽然在一定程度上有一定的疗效, 但是总体收效甚微。随着人们对肿瘤发生、发展以及发病机制的不断研究和认识, 越来越多的研究表明, 肿瘤发生、发展与癌基因激活、抑癌基因失活以及由此引起细胞内多种酶的过度表达密切相关。因此, 寻找有效的基因治疗已日益成为抗肿瘤研究的热点和方向。

环氧合酶(COX)是花生四烯酸合成前列腺素(PG)的关键限速酶, COX 有两种异构体, 即结构型 COX-1 和诱生型 COX-2。COX-1 在组织细胞中表达, 催化生理性前列腺素合成而参与机体生理

功能的调节, COX-2 在大多数组织中表达较低或者难以检测, 但是较容易在激素、炎性细胞因子、生长因子和肿瘤启动子下引起细胞激活后诱导产生。大量研究表明 COX-2 在多种肿瘤如胃癌、肝癌、肺癌、乳腺癌、胆囊癌、结肠腺癌、食管腺癌、宫颈癌、脑星形细胞瘤等中呈高表达状态^[1-2], 这种高表达状态开始于肿瘤形成的早期阶段, 且 COX-2 通过促血管生成、加速肿瘤细胞增殖、抑制细胞凋亡等在肿瘤的发生发展过程中起到了关键的作用。

近年来, RNA 干扰(RNA interference, RNAi)成为基因治疗的重要技术。siRNA 是两端各有两个碱基的 21 个碱基对的双链 RNA^[3-4]。siRNA 是 RNAi 的最主要作用因子, 在植物、无脊椎动物个体及小

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项基金资助项目(JKQ2011018); 国家自然科学基金资助项目(81072588)

作者简介: 沈雁, 女, 博士, 讲师 Tel: (025)83271305 E-mail: shenyan19820801@126.com *通信作者: 涂家生, 男, 博士, 教授 Tel: (025)83271305 E-mail: jiashengtu@yahoo.com.cn

鼠早期胚胎中能引发特异性目的基因封闭^[5]。siRNA 能作用于哺乳动物的主要机制是因为蛋白激酶(PKR)的激活是长度依赖性的,最大激活需 80 bp,而 siRNAs 小于 30 bp,不能激活 PKR,从而保持了细胞的活性,因此它的应用得到越来越广泛的关注^[6-7]。

本实验通过构建干扰 COX-2 表达的 siRNA 来抑制编码 COX-2 的 mRNA 表达,进而抑制 COX-2 蛋白的表达,促使肿瘤细胞的凋亡,为后续实验奠定基础。

1 材料

人胃腺癌细胞系 SGC7901(南通百奥生物技术公司惠赠);三条 siRNA(序号为 24, 954, 1553)(南通百奥生物技术公司设计并合成);胎牛血清(北京中山生物技术有限公司);琼脂糖(Amresco 公司);羊抗人多克隆一抗、兔抗羊二抗(Santa Cruz 公司);吐温-20、十二烷基磺酸钠(SDS)、PVDF 膜(Sigma 公司);Lipofectamine 2000 脂质体转染试剂(南通百奥生物技术公司);T-PER 动物组织总蛋白抽提试剂(南通百奥生物技术公司);其他试剂均为市售分析纯。

2 方法

2.1 siRNA 设计^[2]

从人 COX-2 mRNA(基因序列号 NM-000963)编码区的起始密码(AUG)开始寻找 3 条以“AA”二连序列开始,长度为 21 个核苷,GC 含量在 45%~55%左右的碱基序列作为潜在的干扰靶点。序列为 5'-AAGAACGTTCTGACTGAACTGT-3', 5'-AAGTGCATTGTACCCGGACA-3'和 5'-AAGTGTACGACGACACTGTA-3'。分别记为 siRNA₂₄, siRNA₉₅₄, siRNA₁₅₅₃。同时设计一条经 BLAST 与现有基因文库中所有人源基因均无同源性的非特异性序列 5'-GACTTCATAAGGCGCATGC-3',构建非特异性对照 siRNA,称为 HK。参考 siRNA 修饰方法,其中 3'末端的 dUdU 用 dTdT 替代。为方便荧光显微观察,5'末端用荧光素 FAM 标记。

2.2 细胞培养及传代

胃腺癌细胞系 SGC-7901,以含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,在 37 °C、体积分数为 5%CO₂、相对湿度为 90%的培养箱中培养。待细胞汇片基本铺满瓶底时传代。

2.3 细胞转染考察

将 FAM 标记的 siRNA 和 Lipofectamine2000

阳离子脂质体按照每 1 μg FAM-siRNA 加入 5 μL 脂质体的比例混合于无血清 RPMI1640 培养基中,室温静置 15 min,然后均匀滴入 6 孔板中,每孔 200 μL。3 h 后更换为含血清培养基。2 h 后在荧光显微镜下观察转染情况。并改变加入转染试剂的量,选择合适的转染试剂加入比例以保证实现 Lipofectamine2000 最大效率转染。

2.4 COX-2 mRNA 的测定

用常规 RT-PCR 法扩增各组细胞中的 COX-2 mRNA,β-actin 作为内参照。COX-2 上游引物为 5'-TCAAGTCCCTGAGCATCTAC-3',下游引物为 5'-CATTCCTACCACCAGCAACC-3',产物为 488 bp。β-actin 上游引物为 5'-GAAACTACCTTCACTCCATC-3';下游引物为 5'-CGAGGCCAGGATGGAGCCGCC-3',产物 219 bp。

2.4.1 细胞总 RNA 的提取 用 TRIzol 试剂裂解细胞并提取细胞总 RNA(按 TRIzol 说明书操作)。

2.4.2 RT-PCR 反应 取总 RNA 1 μg,置于 50 μL 反应体系。反应程序如下: 50 °C 30 min→94 °C 2 min(RTase 失活)→94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min, 35 个循环→72 °C 10 min。

2.4.3 琼脂糖凝胶电泳分析 取 5 μL PCR 产物,进行 2.0%琼脂糖凝胶电泳检测。以 β-actin 蛋白做内参。计算机扫描电泳图像,测出各条带的灰度值,以各组 COX-2 与自身 β-actin 灰度值的比作为各组细胞中 COX-2 mRNA 的相对含量。比较各组间的差别。以未转染细胞中 COX-2 的 mRNA 水平作为参照计算抑制率。

2.5 细胞中 COX-2 含量的检测

2.5.1 肿瘤细胞系总蛋白抽提 将 60 mm 培养皿中的细胞用冰冷的 PBS 洗涤两次,然后加入 200 μL T-PER 蛋白抽提液抽提细胞蛋白质,置冰上 30 min,10 000 r·min⁻¹ 4 °C 离心 10 min,弃细胞碎片沉淀,收集蛋白上清。

2.5.2 细胞胞浆蛋白的裂解 用 PBS 洗 2 次,将细胞刮下,收集于适当体积于离心管。4 °C 离心 5 min,使细胞沉淀。弃上清,将沉淀的细胞用 PBS 悬起再离心,重复 2 次。加入 100 μL(1×10⁷ 个细胞·mL⁻¹)去污裂解缓冲液,用吸管反复吹打使细胞彻底分开。冰上孵育 10~30 min,超声破碎细胞,10 000~12 000 r·min⁻¹ 4 °C 离心 10~20 min。测蛋白浓度,每 20 μg 上清分装于 0.5 mL 离心管,然后深低温-80 °C 保存。

2.5.3 Western blot 分析 用细胞裂解液提取到以上各组细胞的总蛋白,加热变性后 10% SDS-PAGE 电泳分离,电转移至 PVDF 膜上,用含 5%脱脂奶粉的 Tris 盐溶液封闭 2 h,加入 COX-2 羊抗人多克隆一抗(1:200),4℃孵育过夜。用含吐温-20 的 Tris 盐溶液洗膜(3次,每次 10 min)后加入辣根过氧化物酶标记的兔抗羊二抗(1:2000),室温下孵育 1 h。化学发光法(ECL)检测条带。 β -actin 作为内参照。采用 SPSS 11.0 统计软件,运用 One way-ANOVA 方法进行单因素各组间的显著性检验, $P<0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 不同浓度的 siRNA 对细胞转染的影响

考察 Lipofectamine2000 与不同浓度的 siRNA 形成复合物的转染效果,荧光显微镜观察结果见图 1。当 Lipofectamine2000 浓度在 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时能实现最大转染效果,浓度过低可能会有部分游离的 siRNA 未与 Lipofectamine2000 完全结合,而 Lipofectamine2000 浓度过高可能会对细胞毒性过大从而导致转染效率下降。

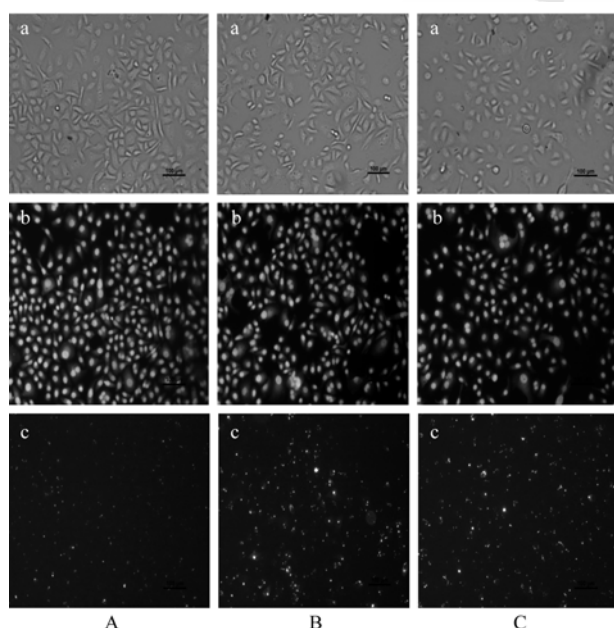


图 1 转染 2 h 后 siRNA 在 SGC-7901 细胞的摄取情况
siRNA 与 Lipofectamine 2000 质量体积比: A-1:2; B-1:5; C-1:10;
Bar=100 μm ; a-白光下的细胞形态图; b-经 DAPI 核染后的荧光图;
c-FAM-siRNA 摄取荧光图

Fig 1 The fluorescence images of FAM-siRNA in SGC-7901 taken 2 h post-transfection the Lipofectamine2000
The different ratio of siRNA/lipo2000: A-1:2; B-1:5; C-1:10;
Bar=100 μm ; a-images of SGC-7901 cell with bars of 100 μm ;
b-fluorescent images of the nuclei which are stained with DAPI (blue);
c-fluorescent images of the internalized FAM-siRNA (green)

3.2 编码 COX-2 的 mRNA 的检测

PCR 产物经 2%的琼脂糖电泳检测后的结果见图 2。与其他各组相比,转染了 siRNA₉₅₄ 的人胃癌细胞中,编码 COX-2 mRNA 的含量明显减少($P<0.01$),使用 ISIS 图象分析系统计算条带亮度计算出抑制率为 55.84%。转染了 siRNA₂₄ 的人胃癌细胞中,编码 COX-2 的 mRNA 的含量也减少,抑制率为 37.85%($P<0.05$)。未转染 siRNA 的胃癌细胞(control),转染了 HK 和 siRNA₁₅₅₃ 胃癌细胞 3 组间,编码 COX-2 的 mRNA 的含量没有统计学差别($P>0.05$),见图 3。而在这几种 siRNA 的作用下,内参 β -actin mRNA 的表达未受影响,因此选择抑制效果较好特异性强的 siRNA₉₅₄ 作为目的基因。

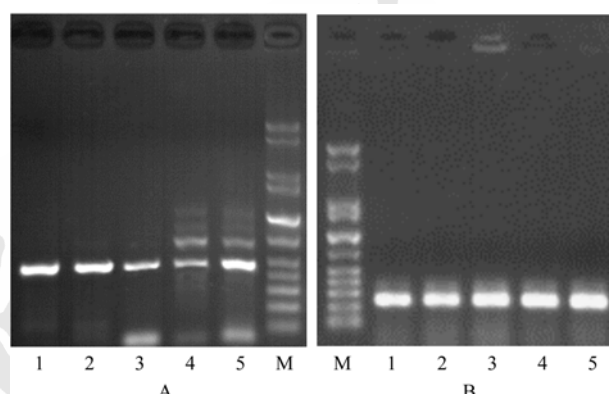


图 2 RT-PCR 法检测 siRNA 干扰 COX-2 表达的凝胶电泳图
A-COX-2; B- β -actin; M-1 kb plus 标准参照物; 1-对照组; 2-非特异组; 3-siRNA₂₄; 4-siRNA₉₅₄; 5-siRNA₁₅₅₃

Fig 2 Agarose gel electrophoresis of the efficiency of siRNA interfering in the expression of COX-2 and β -actin by RT-PCR method

A-COX-2; B- β -actin; Lane M-1 kb plus marker; Lane 1-Control; Lane 2-HK group; Lane 3-siRNA₂₄; Lane 4-siRNA₉₅₄; Lane 5-siRNA₁₅₅₃

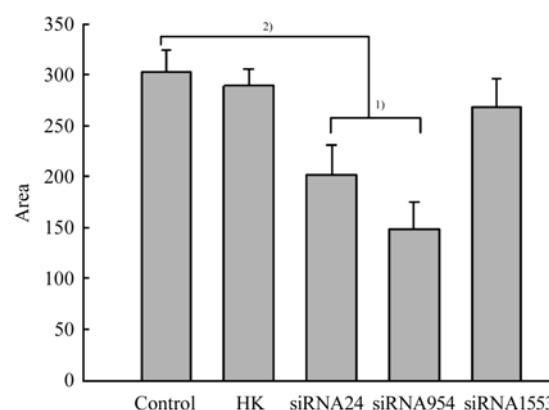


图 3 不同 siRNA 作用后编码 COX-2 表达的 mRNA 含量图($n=5, \bar{x} \pm s$)

¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

Fig 3 Plots of the COX-2 mRNA content with different siRNAs($n=5, \bar{x} \pm s$)

¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

3.3 细胞中 COX-2 蛋白质含量

转染了 siRNA₉₅₄ 的人胃癌细胞中 COX-2 蛋白的表达明显受到抑制, 而内参 β -actin 蛋白的表达未受影响, 见图 4。不同 siRNA 作用后细胞中 β -actin 和 COX-2 蛋白的含量见图 5, 该结果与 RT-PCR 结果一致。

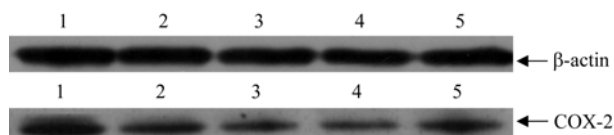


图 4 Western blot 法检测不同 siRNA 作用后 COX-2 蛋白的表达

1-对照组; 2-非特异组; 3-siRNA₂₄; 4-siRNA₉₅₄; 5-siRNA₁₅₅₃

Fig 4 Efficiency of siRNA interfering in the expression of COX-2 and β -actin by Western blot method

Lane 1-Control; Lane 2-HK group; Lane 3-siRNA₂₄; Lane 4-siRNA₉₅₄; Lane 5-siRNA₁₅₅₃

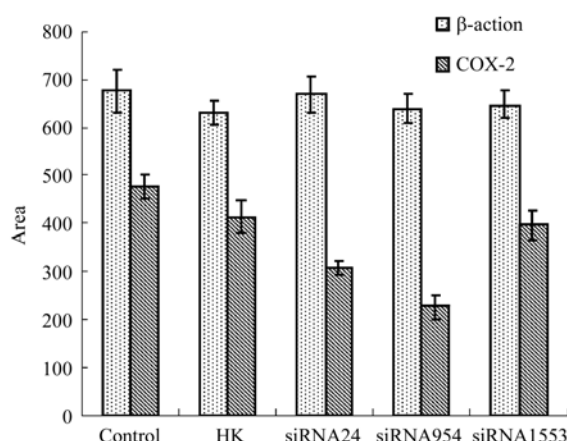


图 5 不同 siRNA 作用后 β -actin 和 COX-2 蛋白的含量图 ($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

Fig 5 Plots of the different siRNA interfering in the expression of COX-2 and β -actin COX-2 content($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

4 讨论

与传统的基因抑制工具相比, siRNA 具有更强大、更持久的抑制基因表达的能力, 如其效能是反义寡核苷酸的 100~10 000 倍^[8]; 具有高度的序列特异性, 若与目的 mRNA 的序列不完全匹配, 将会大大削弱 siRNA 基因沉默的效应, 从而大大提高了其作用的安全性; 无免疫原性, 因而不会引起机体的免疫反应; 不易被核糖核酸酶(RNase)降解, 因此具有更强的稳定性; 由于其无需同基

因组整合发挥作用, 因而无需进入细胞核内, 也就不需要复杂的转移系统; 另外, 由于其体积小, 可以使用一个转移系统同时转移多个 siRNA 分子靶向于不同 mRNA, 这就为治疗诸如癌症这类由于多基因表达失调导致的疾病提供了可能^[9]。与传统的小分子药物相比, 首先 siRNA 易于设计合成, 研发周期短。其次 siRNA 的作用具有高度特异性, 这就减少了毒副作用发生的可能性。再者 siRNA 可以成为对抗耐药性的更加有效的方法。

本实验筛选出具有特异性沉默 COX-2 表达的 siRNA₉₅₄, 抑制效果检测结果表明所构建的 siRNA 能使编码 COX-2 的 mRNA 表达明显降低, 抑制率为 55.84%, 存在显著性差异。而内参 β -actin mRNA 的表达未受影响。Western blot 方法检测到细胞中 COX-2 蛋白含量也明显降低, 而内参 β -actin 蛋白的表达未受影响。为进一步肿瘤治疗的研究奠定了基础。

REFERENCES

- [1] FOSTER J, BLACK J, LEVEA C, et al. COX-2 expression in hepatocellular carcinoma is an initiation event; while EGF receptor expression with down-stream pathway activation is a prognostic predictor of survival [J]. *Ann Surg Oncol*, 2007, 14(2): 752-758.
- [2] WU W K, SUNG J J, LEE C W, et al. Cyclooxygenase-2 in tumorigenesis of gastrointestinal cancers: an update on the molecular mechanisms [J]. *Cancer Lett*, 2010, 295(1): 7-16.
- [3] TEMSAMANI J, GUINOT P. Antisense oligonucleotides: a new therapeutic approach [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 1997, 26 (2): 65-71.
- [4] ZAMORE P D, TUSCHL T, SHARP P A, et al. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals [J]. *Cell*, 2000, 101(1): 25-33.
- [5] ELBASHIR S M, HARORTH J, LENDECKEL W, et al. Duplexes of 21nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cell [J]. *Nature*, 2001, 411(6836): 494-498.
- [6] PADDISON P J, CAUDY A A, HANNON G J, et al. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cell [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(3): 1443-1448.
- [7] KARAGIANNIS T C, EL-OSTA A. RNA interference and potential therapeutic applications of short interfering RNAs [J]. *Cancer Gen Therapy*, 2005, 12(10): 787-795.
- [8] DORSETT Y, TUSCHL T. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3(4): 318-329.
- [9] SIDDHESH D, DAVID G, DIANE J. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: A comprehensive review [J]. *AAPS J*, 2005, 7(1): E61-E77.

收稿日期: 2011-09-06