

· 论 著 ·

体外合成特异 siRNA 及其对 HeLa 细胞端粒酶基因表达抑制的研究

樊冰, 胡素云, 袁梅菊

(广东省深圳市光明新区光明医院检验科 518106)

摘要:目的 针对端粒酶蛋白催化亚单位(hTERT)基因不同片断合成 2 条 siRNA,比较其对 HeLa 细胞端粒酶基因表达干扰作用的强弱,从而选择出更好的干扰靶位点。方法 用 T7RNA 聚合酶在体外转录合成 siRNA,将合成的 2 段 siRNA 转染 HeLa 细胞,对其干扰作用进行分析、鉴定。结果 用 2 段合成的特异 siRNA 转染 HeLa 细胞后,其端粒酶活性均受到抑制,提示靶位点 2653~2673 序列干扰效果较靶位点 1766~1786 序列更为明显。结论 以 T7RNA 聚合酶体外合成 siRNA 是一种简便、高效、低成本的提高 siRNA 产量的方法。针对 hTERT 基因 2653~2673 序列合成的 siRNA 能更明显地抑制端粒酶的活性。

关键词:RNA,小分子干扰; 端粒酶; HeLa 细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.14.014

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)14-1561-02

In vitro synthesis of specific siRNA and its interfering effect on telomerase gene expression in HeLa cells

Fan Bing, Hu Suyun, Yuan Meiju

(Department of Clinical Laboratory, Gongming Hospital of Guangming New District, Shenzhen, Guangdong 518106, China)

Abstract: Objective To compare the interfering effect of two different siRNA specific for human telomerase hTERT gene.

Methods Two different siRNA were in vitro synthesized by using T7 RNA polymerase and transfected into HeLa cells. Then, the interfering effect on the telomerase activity of the cell was detected. **Results** The siRNA synthesized from the hTERT template-2653-2673 was more effective than that from hTERT template 1766-1786 on the interfering of telomerase activity in HeLa cells.

Conclusion It is a convenient effective low-cost method for the synthesis of siRNA by using T7 RNA polymerase. The siRNA based on telomerase hTERT gene 2653-2673 sequence can silence HeLa cell telomerase gene expression more evidently.

Key words:RNA, small interfering; telomerase; HeLa cells

RNA 干扰(RNAi),就是外源或内源性双链 RNA 可触发同源 mRNA 的特异性降解,进而使该基因表达沉默^[1-2]。近年来研究表明,端粒酶主要存在于恶性肿瘤而在大多数正常组织中没有活性或活性极低,这表明端粒酶的激活可能是肿瘤发生过程中的关键因素^[3-4]。端粒酶催化亚单位(hTERT)是 1 个单拷贝基因^[5],其逆转录酶催化域的编码序列具有高度保守性。现已证明 hTERT mRNA 只在恶性肿瘤组织或肿瘤细胞株,以及某些有高度再生能力的自我更新组织(如子宫内膜)中表达,其表达水平与端粒酶活性表达一致,被认为是端粒酶活性的限速决定因素^[6]。因此,hTERT mRNA 是一个抑制肿瘤的潜在靶点。本实验以端粒酶 hTERT 基因逆转录酶催化域的编码序列为模板,体外转录合成小干扰 RNA(siRNA),转染入 HeLa 细胞,达到抑制肿瘤端粒酶活性的目的,期望通过对端粒酶表达的 RNAi 能有效地抑制大多数肿瘤的生长,而对体细胞没有影响,从而为肿瘤治疗提供一种新途径。

1 材料与方 法

1.1 材料 宫颈癌 HeLa 细胞。

1.2 试剂 (1)合成 RNA 的 DNA 的模板序列:T7 启动子上链 5'-TAA TAC GAC TCA CAT TAG-3';针对 hTERT (GeneBank gi 2347128)1766~1786 序列 3'-ATT ATG CTG AGT GTA ATC TTG TCC GAG AAA AAG ATG TT-5'(上链),3'-ATT ATC CTG AGT GTA ATC ATC TTT TTC TCG GAC AAG TT-5'(下链);针对 hTERT (GeneBank gi 2347128)2653~2673 序列 3'-ATT ATG CTG AGT GTA ATC CGG AAG TTC TCG GTG CAG TT-5'(上链),3'-ATT ATG CTG AGT GTA ATC TGC ACC GAG AAC TTC CGG TT-5'(下链)。(2)T7RNA 聚合酶 20 U/μL(由 MBI 公司提供)。(3)dNTP、Taq DNA 聚合酶(上海生工生物工程技术有限公司)。(4)PBR322 DNA/Hae III 标记片段,依次为 505、458、434、267、234、213、192、184、124、109、89、80、64、57、51 bp。(5)端粒重复片段扩增(TRAP)PCR-ELISA 试剂盒(德国宝灵曼公司)。

1.3 方法

1.3.1 正义 RNA 的制备 正义 RNA 链模板分别取自端粒酶 hTERT 1766~1786 序列和 2653~2673 序列。将合成的 DNA 模板用蒸馏水溶解为 20 μmol/L,取相同体积的 DNA 模板链分别与 T7 启动子链混匀,95 °C 变性 5 min 后自然冷却复性杂交。2 条链就形成了部分双链的 DNA 模板。

1.3.2 反义 RNA 链制备 除模板不同外,制备程序同正义 RNA 链。

1.3.3 合成的单链 RNA 的纯化 (1)DNA 模板的消化:合成的 RNA 反应液中加入 DNA 酶 I 2 U,混匀后,37 °C 温育 40 min。(2)酚/氯仿抽提,乙醇沉淀。

1.3.4 siRNA 的制备 将上述合成、纯化好的正义 RNA 链和反义 RNA 链等体积混合均匀,95 °C 水浴 5 min 变性处理,使 RNA 短链充分变性后自然冷却至室温,即形成 siRNA。

1.3.5 单链 RNA 的定性分析 采用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。

1.3.6 单链 RNA 的定量分析 采用紫外分光光度法测定 RNA 的产量,10 μL 单链 RNA 产物加入 3 mL 双蒸水,在 280、260 nm 波长下分别读数,计算出 RNA 的产量和纯度。

1.3.7 细胞培养转染 采用磷酸钙共沉淀法。

1.3.8 端粒酶活性的定性检测 采用 TRAP-银染法。

1.3.9 端粒酶活性的定量检测 采用 TRAP-PCR-ELISA 法。

2 结 果

2.1 单链 RNA 的定量分析结果 将得到的单链 RNA 经紫

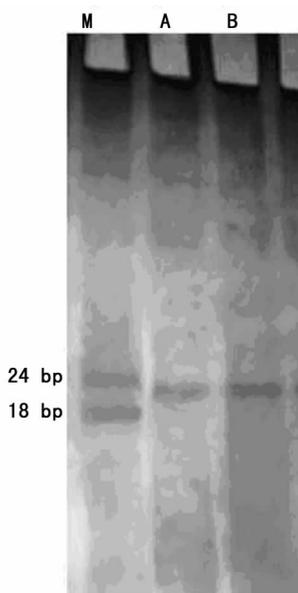
外分光光度法定量分析,结果见表 1。

表 1 siRNA 的定量分析结果

项目	A	B	C	D
A ₂₆₀	0.034	0.033	0.035	0.034
A ₂₈₀	0.017	0.017	0.018	0.018
A ₂₆₀ /A ₂₈₀	2.000	1.941	1.944	1.889
绝对含量(50 μL)	22.440	21.780	23.100	22.440

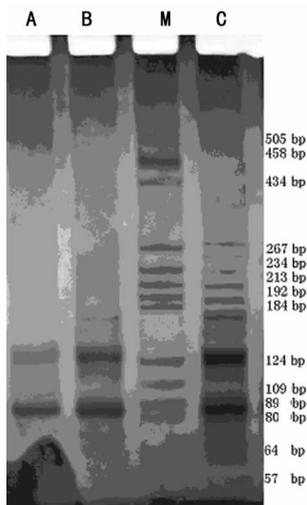
A: 针对 hTERT 1766~1786 序列的正义链; B: 针对 hTERT 1766~1786 序列的反义链; C: 针对 hTERT 2653~2673 序列的正义链; D: 针对 hTERT 2653~2673 序列的反义链。

2.2 单链 RNA 的定性分析结果 合成的单链 RNA 纯度较高,经 SDS-PAGE 分析,未见较多流产型的 RNA,见图 1。



M: 标记物; A: 针对 hTERT 1766~1786 序列的单链 RNA; B: 针对 hTERT 2653~2673 序列的单链 RNA。

图 1 单链 RNA SDS-PAGE 图



A: 加入针对 hTERT 2653~2673 序列的 siRNA 的 HeLa 细胞裂解液; B: 加入针对 hTERT 1766~1786 序列的 siRNA 的 HeLa 细胞裂解液; C: 未加入 siRNA 的 HeLa 细胞裂解液; M: 标记物。

图 2 针对 hTERT 2 段不同序列的 siRNA 对 HeLa 细胞端粒酶活性影响的比较

2.3 siRNA 对 HeLa 细胞端粒酶活性的影响 端粒酶活性的定性检测结果见图 2。端粒酶活性的定量检测结果见表 1~2。

表 1 TRAP-PCR-ELISA 法检测结果

组别	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9
1 组	0.420	0.411	0.416	0.412	0.413	0.413	0.417	0.418	0.415
2 组	0.208	0.206	0.205	0.201	0.211	0.210	0.214	0.206	0.211

1 组: 加入针对 hTERT 1766~1786 序列的 siRNA; 2 组: 加入针对 hTERT 2653~2673 序列的 siRNA。

表 2 TRAP-PCR-ELISA 法检测 2 组对端粒酶抑制率的比较

组别	A 均值	ΔA	抑制率(%)
阴性对照组	0.015	0.000	0
阳性对照组	0.785	0.770	0
1 组	0.415	0.400	48
2 组	0.208	0.193	75*

1 组: 针对 hTERT 1766~1786 序列的 siRNA 的 HeLa 细胞裂解液; 2 组: 针对 hTERT 2653~2673 序列的 siRNA 的 HeLa 细胞裂解液; 阳性对照组: 未加入 siRNA 的 HeLa 细胞裂解液; 阴性对照组: 加入 siRNA 的 HeLa 细胞裂解液。*: P<0.01, 与 1 组比较。

3 讨 论

近年来, RNAi 作为一种新兴的沉默特异基因序列的方法, 以其高特异性、高效、快速、可靠、操作简单等独特优势吸引了广大研究者的关注^[7-8]。因为针对基因不同位置所设计的 siRNA 在诱导 RNA 干扰中的作用效力是不同的。本研究针对 hTERT 基因设计了 2 条 siRNA, 比较两者干扰的作用。结果发现, 将 2 条 siRNA 转染进入 HeLa 细胞中, 利用 TRAP-银染法和 PCR-ELISA 法检测端粒酶的活性, 两者都可以对 HeLa 细胞端粒酶活性进行抑制, 就是将 hTERT 基因进行封闭, 说明本研究设计的 2 个靶位点都是有效的靶位点。

在对合成的 RNA 进行定性、定量前, 由于反应混合物中既含有蛋白(T7RNA 聚合酶)又含有核苷三磷酸(NTP)、磷酸鸟苷(GMP)和 DNA 模板, 必须对它们进行处理后才能进行紫外分光光度测量。本研究采用 DNA 酶 I 处理本来去除 DNA 模板, 用酚/氯仿抽提出蛋白组分, 加入乙酸钠来进行乙醇沉淀, 避免 NTP、dNTP 和 RNA 同时沉淀下来。发现合成的 RNA 纯度较高, 未见较多流产型 RNA, 考虑这和 RNA 设计、合成的改进有很大关系。

本研究就是利用 RNAi 特有的优势, 针对 hTERT 基因外显子设计了 2 段 siRNA, 一段是针对 hTERT 1766~1786 序列, 另一段是针对 hTERT 2653~2673 序列, 看在不同的靶位点抑制的效果是否不同, 选择出抑制效果较好的靶位点。本实验利用 0.2% 台盼蓝染色法检测出 200 ng siRNA 转染对细胞生存能力几乎没什么影响。接着就采用磷酸钙共沉淀的方法将 200 ng siRNA 转染到 HeLa 细胞中, 用 TRAP-银染和 TRAP-PCR-ELISA 的方法对端粒酶的活性进行定性和定量的检测。结果发现, 2 段 siRNA 都对端粒酶有抑制作用, 针对 hTERT 1766~1786 序列抑制率在 48%, 而针对 hTERT 2653~2673 序列的抑制率在 75%, 可见后者的抑制效果明显好于前者, 证明后者是较好的靶位点。同时证明针对靶基因不同的位点设计的 siRNA 在诱导 RNAi 的作用效力是不同的。这与 Elbashir 等^[9]的报道相一致。 (下转第 1564 页)

4.21)mg/L,明显高于健康体检组的(1.62±0.33)mg/L,差异有统计学意义($P<0.05$)。有文献研究认为,MM 患者血清 β_2 -MG 升高的机制可能为:(1)肿瘤细胞本身合成和分泌 β_2 -MG 加速;(2)大量的正常细胞被破坏,使 β_2 -MG 释放增加;(3)肿瘤细胞直接浸润肾组织,导致肾脏损伤,肾小管重吸收功能受损, β_2 -MG 排泄减少,血 β_2 -MG 水平升高更显著^[8-10]。此外,相关资料表明, β_2 -MG 是所有参数中与肿瘤负荷最相关的参数,直接反映了 MM 患者的体内肿瘤负荷^[11-12]。

本文还针对 β_2 -MG 对 MM 的诊断价值进行了 ROC 曲线分析,发现如果按照血清 β_2 -MG 的生物参考区间作为 MM 诊断临界值的话,其敏感度较高,但特异度则相当一般,诊断价值不高。笔者所在实验室血清 β_2 -MG 的生物参考区间为 0.70~1.80 mg/L,如果以 1.80 mg/L 作为 MM 诊断临界值的话,虽然其敏感度可达 98.8%,但其特异度才 28.1%,诸如高血压、淋巴瘤、肾脏疾病等均可引起血清 β_2 -MG 水平高于生物参考区间。当血清 β_2 -MG 水平为 2.87 mg/L 时,其诊断敏感度和特异度均较高,分别为 79.8% 和 74.7%,可作为 MM 的最佳诊断临界值。因此,笔者认为区分生物参考区间与最佳诊断临界值的概念是相当重要的。当血清 β_2 -MG 水平在生物参考区间内,由于其诊断敏感度较高,可基本排除 MM 的可能性;当血清 β_2 -MG 水平介于生物参考值与最佳诊断临界值之间,由于其诊断特异度较一般,只能提示患者可能有 MM、非霍奇金淋巴瘤、肾脏疾病等疾病;当 β_2 -MG 水平大于最佳诊断临界值时,其诊断特异度及敏感度均较高,诊断 MM 的可能性较大。

综上所述,由于 β_2 -MG 是由人体的组织细胞分泌,其血清水平受人体组织及器官病变的影响较大,其诊断特异度较一般。因此,确定 MM 血清 β_2 -MG 的最佳诊断临界值显得尤其重要,在保证敏感度的同时,可进一步提高其诊断的特异度。需要说明的是,不同试剂的检测原理及试剂组成不同。因此,本文得到的最佳诊断临界值不一定适合于使用其他品牌的仪器和试剂的实验室。

参考文献

[1] 关向宏,王家银,周萍. IL-6 和 β_2 -微球蛋白检测在多发性骨髓瘤

(上接第 1562 页)

随着对 hTERT 的研究逐渐深入,其与端粒酶间关系的阐明,将会推动对端粒酶在肿瘤发病机制中作用的研究,而针对 hTERT 的基因治疗和药物研究也将展开,尤其是 RNAi 技术^[10-12],以其特有的优势,必将会推动肿瘤的治疗,使肿瘤在基因治疗方面拥有美好的前景。

参考文献

[1] Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811.
 [2] 李力,张令强,贺福初. RNA 干扰应用新进展[J]. *医学分子生物学杂志*, 2004, 1(4): 224-226.
 [3] Xu GX, Hong XZ, Hong LD. An enhanced U6 promoter for synthesis of short hairpin RNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(17): e100.
 [4] 王昌富,周新. 体液中肿瘤细胞的端粒酶活性[J]. *国际检验医学杂志*, 2002, 23(1): 30-31.
 [5] Castanotto D, Li HT, Rossi JJ. Functional siRNA expression from transfected PCR products[J]. *RNA*, 8(11): 1454-1460.

中的临床意义[J]. *国际检验医学杂志*, 2007, 28(8): 746-747.
 [2] Bettini R, Redaelli S, Maino C, et al. Prognostic value of serum beta 2-microglobulin in multiple myeloma[J]. *Recenti Prog Med*, 2005, 96(2): 81-86.
 [3] Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, et al. International staging system for multiple myeloma[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(15): 3412-3420.
 [4] 王中京,赵湜. 多发性骨髓瘤患者血清 β_2 -微球蛋白和 C-反应蛋白水平的测定及其与病程和预后的关系[J]. *临床内科杂志*, 2006, 23(10): 705-706.
 [5] 葛祥花. 多发性骨髓瘤患者血清 β_2 -微球蛋白、C-反应蛋白水平的测定及临床意义[J]. *临床血液学杂志*, 2003, 16(5): 242-243.
 [6] 张之南,沈悌. *血液病诊断及疗效标准*[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1999: 349-351.
 [7] Berggard I, Bearn AG. Isolation and properties of a low molecular weight beta-2-globulin occurring in human biological fluids[J]. *J Biol Chem*, 1968, 243(15): 4095-4103.
 [8] 刘洁,刘敏. β_2 -微球蛋白的临床应用[J]. *华西医学*, 2007, 22(4): 913-914.
 [9] 邓家栋. *临床血液学*[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 1088-1099.
 [10] 王婷婷,徐剑,杨仁池. 多发性骨髓瘤的预后相关因素[J]. *中华血液学杂志*, 2003, 24(10): 555-557.
 [11] Alexandrak MG, Passam FH, Ganotak ES, et al. The clinical and prognostic significance of erythrocyte sedimentation rate (ESR), serum interleukin-6 (IL-6) and acute phase protein levels in multiple myeloma[J]. *Clin Lab Haematol*, 2003, 25(1): 41-46.
 [12] Greipp PR, Lust JA, O'Fallon WM, et al. Plasma cell labeling index and beta 2-microglobulin predict survival independent of thymidine kinase and C-reactive protein in multiple myeloma[J]. *Blood*, 1993, 81(12): 3382-3387.

(收稿日期: 2011-01-06)

[6] Capodici J, Kariko K, Weissman D. Inhibition of HIV-1 infection by small interfering RNA-mediated RNA interference[J]. *Immuno*, 2002, 169(9): 5196-5201.
 [7] 薛晓荣,汤华. RNA 干扰在肿瘤研究中的进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2006, 27(3): 259-261.
 [8] 张雯婷,江忠清. RNA 干扰治疗 HBV 研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2007, 28(3): 222-224.
 [9] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs[J]. *Gene Dev*, 2001, 15(2): 188-200.
 [10] 于晓霞,石英英,董贺,等. 不同肿瘤细胞株人端粒酶逆转录酶及端粒酶活性的检测及其意义[J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2008, 34(4): 573-575.
 [11] 石见,张庆玲,丁彦青. RNAi 技术在呼吸系统肿瘤研究中的应用[J]. *实用医学杂志*, 2010, 26(16): 3058-3060.
 [12] 冯丽华,陈毅德. RNAi 技术沉默 Livin 基因在肿瘤中的研究进展[J]. *福建医药杂志*, 2010, 32(3): 83-85.

(收稿日期: 2011-01-24)