

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)23-2116-03

CEA siRNA 载体的构建和转染人食管癌 EC9706 细胞的沉默作用

郑红¹, 赵国强², 杨洪艳¹, 刘康栋¹, 冯龙², 董子明¹(郑州大学基础医学院¹; 病理生理学教研室²; 微生物免疫学教研室, 河南 郑州 450052)

Construction of CEA siRNA expression vector and its inhibitory effects on the expression of CEA in EC9706 cells

ZHENG Hong¹, ZHAO Guo-Qiang², YANG Hong-Yan¹, LIU Kang-Dong¹, FENG Long², DONG Zi-Ming¹¹Department of Pathophysiology, ²Department of Microbiology and Immunology, School of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

【Abstract】 AIM: To construct the siRNA expression vector of CEA by RNA interference technique and inhibit the expression of CEA in EC9706 cells. **METHODS:** According to the encoding sequence of mRNA of CEA, two pairs of oligonucleotide sequences were designed and synthesized. The annealed oligonucleotide fragments were cloned into pRNAT-U6.2 expression vector and identified by sequencing. The recombinant plasmids pRNAT-U6.2-CEA were transfected into EC9706 cells. The expression of CEA in the stable transfected cells was assayed by Real Time PCR and Western Blot. **RESULTS:** DNA sequencing showed that the oligonucleotide fragments were correctly inserted into pRNAT-U6.2 vector, and CEA expression in the transfected cells was down-regulated significantly by pRNAT-U6.2-CEA at both the mRNA and protein levels. **CONCLUSION:** The siRNA expression vector of CEA is successfully constructed and it inhibits CEA expression in EC9706 cells. This facilitates further studies of the function of CEA at molecular level.

【Keywords】 EC9706; siRNA; CEA

【摘要】目的:应用 RNA 干扰技术,构建针对 CEA 的 siRNA 载体,抑制人食管癌 EC9706 细胞 CEA 基因的表达。方法:依据设计 siRNA 的原则,针对人 CEA 的 mRNA 序列,设计并合成编码 siRNA 的两对寡核苷酸序列,经退火成互补双链,克隆入载体 pRNAT-U6.2 中构建重组体 pRNAT-U6.2-CEA,筛选、鉴定。然后转染重组体至人食管癌 EC9706 细胞中,经 G418 筛选,获得阳性克隆,并以空质粒转染和未进行转染的

收稿日期 2007-05-23; 接受日期 2007-10-19

基金项目 教育部科技创新工程重点项目(207150)

通讯作者 董子明。Tel (0371) 67781956 Email zdongzm@zzu.edu.cn

作者简介:郑红,博士生(导师董子明),副教授。Tel (0371)

66549463 Email zhhong@henu.edu.cn

EC9706 作对照,运用 PCR 和 Western Blot 检测 CEA 的表达。结果:测序鉴定证实目的寡核苷酸片段已被克隆到 pRNAT-U6.2 载体中,pRNAT-U6.2-CEA 转染人食管癌 EC9706 细胞后,CEA 基因表达在 mRNA 和蛋白质水平都受到显著抑制。结论:成功构建了针对人食管癌 EC9706 细胞的 siRNA 载体,可有效抑制 CEA 的表达,为进一步从分子水平探讨 CEA 的功能奠定了基础。

【关键词】 EC9706 细胞系;小干扰 RNA;癌胚抗原

【中图分类号】 R735.1 **【文献标识码】** A

0 引言

CEA(carcinoembryonic antigen)属于非器官特异性肿瘤相关抗原,它不仅作为一种单纯的肿瘤标志物存在,而且是与肿瘤恶性化有关的一种复杂的分子。但目前对于 CEA 分子水平的研究主要集中在肿瘤治疗前、治疗中、治疗后 CEA 表达的变化及其与肿瘤诊断、治疗、预后的关系^[1-3]。CEA 与肿瘤的发生发展及转移有无内在联系,对治疗过程有什么影响,文献中未见深入报道。本研究利用 RNA 干扰技术,构建针对 CEA 的小分子干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)表达载体,并转染 EC9706 细胞,旨在实现对 CEA 表达的抑制,为进一步从分子水平探讨 CEA 功能及对治疗的影响打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料 人食管癌 EC9706 细胞系由中国医学科学院肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室惠赠。大肠杆菌 Top10, pRNAT-U6.2 质粒由郑州大学免疫与微生物教研室提供。限制性内切酶、逆转录酶、Real Time PCR 扩增试剂盒均为 TaKaRa 产品。鼠抗人 CEA 及 β -actin mAb 和酶标羊抗鼠 IgG 为 Sigma 公司产品。CEA 基因 RNAi 寡核苷酸,CEA 基因和 β -actin 基因 PCR 引物均由上海生物工程公司合成测序。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 在 GenBank 中查找人 CEA 的 mRNA 全序列,通过 Blast 软件确定与其它非相关基因无同源性,按照 pRNAT-U6.2 载体的要求设计编码 siRNA 的寡核苷酸链。设计的 siRNA 两对寡核苷酸

序列如下 SCEA1 上游引物为 5'-TGATGGCAACCGT-CAAATTATTC AAGAGATAATTTGACGGTTGCCATCT-TTTTTTC-3', 下游引物为 5'-TCGAGAAAAAAGATGG-CAACCGTCAAATT ATCTCTTGAATAATTTGACGGTT-GCCATCA-3'; SCEA2 上游引物为 5'-TGATGTAGG-ACCCTATGAGTTTCAAG AGAACTCATAGGGTCCTA-CATCTTTTTTC-3', 下游引物为 5'-TCGAGAAAAA-GATGTAGGACCCTATGAGTTC TCTTGAAGACTCATA-GGGTCCTACATCA-3'。Real Time PCR 一对引物 5'-ACCACAGTCACGACGATCAC-3', 5'-CGCTGTGGTC-AACACTTAAT-3'。

1.2.2 siRNA 表达载体的构建 将合成的寡核苷酸单链稀释后退火成双链, 连接到 siRNA 载体 pRNAT-U6.2, 将重组载体转入感受态细菌 (Top10), 筛选, PCR 验证后提取质粒, 并做双酶切和测序鉴定。

1.2.3 细胞转染 取 pRNAT-U6.2-SCEA1, SCEA2 重组体及空载体分别转染对数生长期的 EC9706 细胞, 转染方法参照 Lipofectamine™ 2000 转染试剂操作说明进行, 转染 24 h 后用 G418 (浓度 400 mg/L) 筛选, 待细胞稳定后收集, 同时收集同批未进行转染的 EC9706 作为阴性对照, 分别命名为干扰 1 组、干扰 2 组、空载体组及对照组。

1.2.4 Real Time PCR 分析 Trizol 法提取转染细胞和对照细胞的总 RNA (方法按试剂盒说明), 逆转录合成 cDNA 第一链 (Gibco 公司反转录试剂盒及说明)。标准曲线的建立 将 β -actin 质粒标准品原液按梯度稀释成 0.1 μ g, 0.05 μ g, 0.025 μ g, 0.0125 μ g, 0.00625 μ g 拷贝/L。使用 Real Time PCR 扩增仪进行荧光定量 PCR 检测, 反应条件中加入溶解曲线的制备。

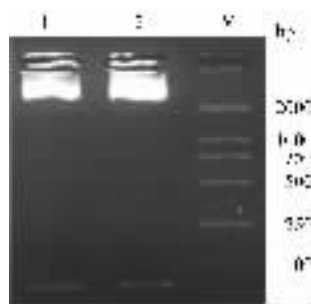
1.2.5 Western Blot 检验 CEA 蛋白的表达 培养细胞蛋白质样品的制备: 收集各组细胞, 用细胞裂解液和蛋白保护液裂解细胞, 经涡旋离心后取上清, 紫外分光光度计测定蛋白浓度备用; 制备 SDS-PAGE 凝胶, 并做预电泳, 每孔加样品 40 μ g, Marker 加 10 μ L, 电泳, 染色和脱色, 切胶, 电转; 封闭, 加 1 抗孵育, TBST 洗后加酶标 2 抗; TBST 洗后, 显影, 定影; 用 β -actin 作内参照验证蛋白的含量。

统计学处理: 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组体鉴定结果

2.1.1 酶切鉴定 重组质粒经限制性内切酶双酶切后得到大于 2000 bp 的条带和小于 100 bp 的条带, 与质粒和目的条带的大小相符 (图 1)。



1 pRNAT-U6.2-SCEA1 2 pRNAT-U6.2-SCEA2 3 marker.

图 1 重组载体的双酶切鉴定

2.1.2 测序鉴定 经过筛选的重组体 pRNAT-U6.2-SCEA1, SCEA2 测序结果, 与设计靶向 CEA 的寡核苷酸序列比较完全一致 (图 2)。

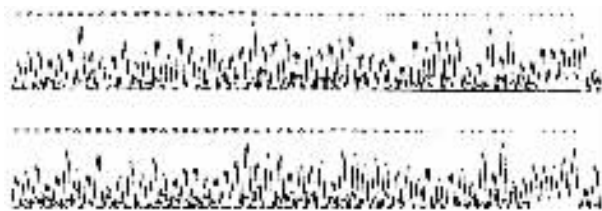


图 2 重组体插入片段 (SCEA1, 2) 的测序结果

2.2 CEA-siRNA 转染 EC9706 细胞的 Real Time PCR 鉴定

2.2.1 标准曲线的建立和回归方程 用 SPSS11.0 软件对 β -actin 质粒稀释浓度的对数和相应的拷贝数进行直线回归分析, 得到的直线回归方程为 $\lg Y = -0.575 - 0.397X$ 。模板的溶解曲线显示为单峰, 且峰值单一, 说明产物特异 (图 3)。

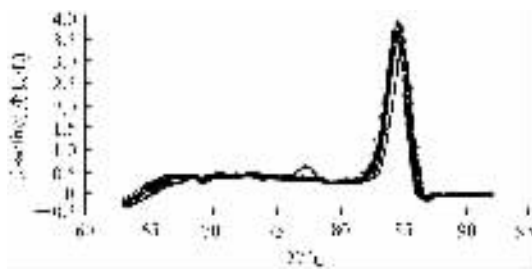
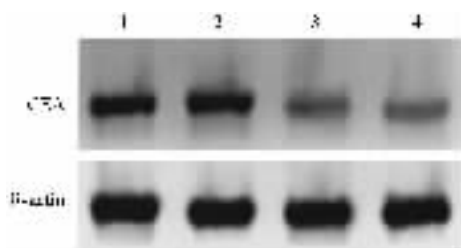


图 3 Real Time PCR 熔解曲线

2.2.2 样品的定量检测 分别以 CEA 和 β -actin 为引物扩增样本, 其 CT 值代入标准曲线方程, 求出相应的 mRNA 含量, 并求出样本中 CEA mRNA 对 β -actin mRNA 的相对含量, 对照、空载体 (pRNAT-U6.2), 干扰 1 (pRNAT-U6.2-SCEA1) 及干扰 2 (pRNAT-U6.2-SCEA2) 分别为 0.18 ± 0.11 , 0.19 ± 0.10 , 0.06 ± 0.02 , 0.05 ± 0.03 。干扰 1 组、干扰 2 组与对照组及空载体组相比, 都有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 CEA-siRNA 转染 EC9706 细胞的 Western Blot 鉴定 干扰 1 组和干扰 2 组与对照组、空载体组相比蛋白条带明显减弱 (图 4)。



1 对照 2 空载体 3 干扰 1 4 干扰 2.

图 4 Western Blot 鉴定结果

3 讨论

CEA 是一种胚胎性致癌抗原,主要存在于胎儿消化道上皮组织、胰腺和肝脏中,成人消化道可产生少量 CEA,在胆道、羊水、肺、乳腺等组织中也可见少量 CEA。约 95% 的结直肠癌、胃癌、胰腺癌、大多数非小细胞型肺癌、头颈鳞癌及约 50% 的乳腺癌有 CEA 表达^[4]。Nakashima 等^[5]用 RT-PCR 方法对 54 例食管癌外周血 CEA mRNA 进行检测,发现阳性率为 57.4%,且阳性患者的肿瘤复发率明显高于阴性患者。我们在研究复制选择性溶瘤腺病毒时发现 CEA 在对溶瘤病毒敏感和不敏感肿瘤细胞中的表达有较大差异,同时检测到 CEA 在人食管癌 EC9706 细胞中高表达,而且食管癌对溶瘤腺病毒敏感性不高。因此,希望通过 RNA 干扰技术构建 CEA siRNA 载体来降低 EC9706 细胞中 CEA 的表达,以进一步探讨 CEA 的内在功能及对溶瘤腺病毒抗食管癌的效果有无改善。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是近年发现的一种重要基因沉默技术,又称转录后基因沉默 (posttranscriptional gene silencing, PTGS)^[6]。RNAi 技术近年来发展迅速,已成为分子生物学研究的主要技术手段之一,在功能基因组研究、信号转导研究及基因治疗方面显示出巨大的前景。研究表明,利用质粒或病毒载体体内合成的 siRNA,体内抑制目的基因的效果与合成 siRNA 相似,但却花费低、成本小,还

可克服合成 siRNA 可能造成的 RNase 的污染^[7]。

本研究利用 pRNAT-U6.2 载体,构建的重组体转染细胞后,siRNA 将持续产生,并通过识别、降解具有同源序列的 mRNA,最终干扰目的基因的表达,同时载体上带有免疫荧光标记利于观察重组质粒的转染效率。本实验构建的针对 CEA 的 siRNA 表达载体成功的转染 EC9706 细胞,用 Real Time PCR 及 Western Blot 方法从 mRNA 和蛋白质水平检测表明转染特异的 siRNA 能够抑制人食管癌 EC9706 细胞中 CEA 的表达,基因沉默的效果显著。这证实我们可以通过 RNAi 技术调控 CEA 表达,为进一步探讨 CEA 的功能及对溶瘤腺病毒的杀伤效果有无影响及作用机制奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Sunuchi K, Machinami R, Mori M, et al. Clinical impact of carcinoembryonic antigen messenger ribonucleic acid expression in tumor-draining vein blood on postoperative liver metastasis in patients with colorectal carcinoma: A prospective, cohort study [J]. *Dis Colon Rectum*, 2003, 46(4): 467-473.
- [2] 徐秀云. CEA 与 CA50 联合检测鉴别消化系统恶性肿瘤 [J]. *第四军医大学学报*, 2002, 3(14): 1314.
- [3] 张建华, 钟怀印, 薛承岩. CEA mRNA 2CEAp 系统在良恶性腹水中表达差别的临床意义 [J]. *第四军医大学学报*, 2005, 26(24): 2277-2279.
- [4] Guadagni F, Kantor J, Aloe S, et al. Detection of blood-borne cells in colorectal cancer patients by nested reverse transcription-polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen messenger RNA: Longitudinal analyses and demonstration of its potential importance as an adjunct to multiple serum markers [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(6): 2523-2532.
- [5] Nakashima S, Natsugoe S, Matsumoto M, et al. Clinical significance of circulating tumor cells in blood by molecular detection and tumor markers in esophageal cancer [J]. *Surgery*, 2003, 133(2): 162-169.
- [6] Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, et al. RNA interference: Biology mechanism and applications [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67(4): 657-685.
- [7] Sui G, Soohoo C, Affarelli B, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(8): 5515-5520.

编辑 井晓梅