

Snail miRNA 干扰质粒构建及胃癌细胞系稳定株筛选

郭慧敏 陈 敏 黄淑玲 潘程宇 沈永华 邹晓平[△]

(南京医科大学附属鼓楼临床医学院消化内科 江苏 南京 210008)

摘要 目的:设计并构建针对 Snail 的微小干扰核糖核酸(miRNA),最终鉴定出有效干扰质粒并筛选稳定转染的胃癌细胞株 SGC-7901。方法:设计并构建 4 对 Snail 的 pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR microRNA 及 1 对无效对照 microRNA 干扰质粒。将干扰质粒用罗氏 BD 转染试剂转染胃癌细胞株 SGC-7901,通过倒置荧光显微镜观察绿色荧光确定转染效率。分别用不同浓度 1 的杀稻瘟菌素作用于 SGC-7901 细胞,得到杀稻瘟菌素对 SGC-7901 细胞的筛选浓度。Western blot 检测 4 对干扰质粒、阴性对照质粒对 snail 蛋白水平表达的影响。结果:测序表明,Snail 干扰序列及读码框完全正确,干扰质粒瞬时转染的 SGC-7901 细胞系在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光达 85%以上。杀稻瘟菌素对于 SGC-7901 细胞的筛选浓度为 5 μ g/ml。Western blot 结果显示,干扰序列 Mi-1 对 Snail 有较强的干扰效果。结论:成功构建了 Snail 干扰真核表达载体,同时筛选出有效干扰质粒及稳定转染株,为进一步研究 Snail 在胃癌中的作用奠定了基础。

关键词: Snail;微小干扰核糖核酸

中图分类号:Q78;R735.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2010)02-211-04

Construction of Snail miRNA recombinant eukaryotic expression vectors and screening of stably transfected cell clone

GUO Hui-min, CHEN Min, HUANG Shu-ling, PAN Cheng-yu, SHEN Yong-hua, ZOU Xiao-ping[△]

(Department of Gastroenterology, Drum Tower Clinical Medical College of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu Province, 210008 China)

ABSTRACT **Objective:** To construct recombinant eukaryotic expression vector of micro-RNA for Snail gene, and screen the stably transfected gastric carcinoma cell clone SGC-7901. **Methods:** Microinterference ribonucleic acid (miRNA) nucleotides of Snail were synthesized and inserted into pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR vector, which were confirmed by sequencing, then the recombinant miRNA vectors were transfected into SGC-7901 by Roche BD. The transfection efficiency was observed under inverted fluorescence microscope. According to the fatal dose of blasticidin to SGC-7901, and the selection concentration of blasticidin to SGC-7901 cell. The protein expression of Snail was detected by Western blot. **Results:** Sequencing suggested that miRNA eukaryotic expression vectors targeting Snail possess correct nucleotide sequence and read frame, and the express of the green fluorescent protein was over 85% when the transiently transfected SGC-7901 cell line observed under inverted fluorescence microscope. The screening concentration of blasticidin to SGC-7901 cell was 5 μ g/ml. The results of Western blot showed that the sequence of Mi-1 could more effectively knockdown the expression level of Snail than the others. **Conclusion:** miRNA eukaryotic expression vectors targeting Snail were successfully constructed and the effectively interference miRNA were identified, and the stably transfected cell clone obtained may be useful for understanding the effect of Snail in gastric cancer.

Key Words: Snail; Microinterference ribonucleic acid(miRNA)

Chinese Library Classification (CLC): Q78; R735.2 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2010)02-211-04

前言

细胞间的作用对胚胎的发生发展以及正常组织结构和功能的维持起重要作用。而当这些作用发生改变时,例如恶性肿瘤的发生,即可导致组织细胞去分化、侵袭能力增加以及向远处播散。上皮性肿瘤细胞侵袭特性的获得被认为是胚胎时期的生理过程中上皮向间质转变(epithelial to mesenchymal transition, EMT)的一种病理演变,同时认为其是肿瘤发生远处转移最为关键的一步。Snail 是一种锌指转录蛋白,是 Snail 家族中重要成员之

一,据文献报道,Snail 的高表达是促进肿瘤细胞发生 EMT 的主要影响因子之一^[1-2]。此前的报道多是关于 Snail 在结直肠癌、乳腺癌、前列腺癌及胰腺癌等^[3-6]肿瘤中的作用,但对于其在胃癌中的作用报道很少。本研究既构建了一种特异性作用于 Snail 的 miRNA,同时转染胃癌细胞 SGC-7901,并筛选出稳定转染株,为进一步研究 Snail 在胃癌中的作用奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

作者简介:郭慧敏(1984-),女,硕士研究生,电话:025-83106666-20602,

E-mail: guohuimin1519@sina.com

[△]通讯作者:邹晓平, E-mail: zouxiaoping795@hotmail.com

(收稿日期:2010-10-08 接受日期:2010-10-31)

1.1.1.试剂 Roche BD 转染试剂购自德国罗氏试剂公司,载体构建试剂盒 BLOCK-iT™ Pol II miRNAi Expression Vector Kit with EmGFP 购自美国 Invitrogen 公司, Taq 酶、dNTP mix 购自

Takara 试剂公司; 兔抗人 Snail 抗体购自美国 Abcam 试剂公司。根据 homo sapiens Snail 基因序列设计并合成 4 对 miRNA 及一对无效 miRNA 干扰序列(即阴性对照), 具体信息见表 1:

Table 1. Sequences of basic pairs of miRNA

Name of mi-RNA	Sequences of Basic Pairs
Mi-1-F	GCTGTGGATTAGAGTCCTGCAGCTCGTTTTGGCCACTGACTGACGAGCTGCAACTCTAATCCA
Mi-1-R	CCTGTGGATTAGAGTTGCAGCTCGTCAGTCAGTGGCCAAAACGAGCTGCAGGACTCTAATCCAC
Mi-2-F	TGCTGAGGACAGAGTCCCAGATGAGCGTTTTGGCCACTGACTGACGCTCATCTGACTCTGTCCT
Mi-2-R	CTGAGGACAGAGTCAGATGAGCGTCAGTCAGTGGCCAAAACGCTCATCTGGGACTCTGTCCTC
Mi-3-F	TGCTGAGAAGGTCCGAGCACACGCCTGTTTTGGCCACTGACTGACAGGCGTGTCGGACCTTCT
Mi-3-R	CCTGAGAAGGTCCGAACACGCCTGTCAGTCAGTGGCCAAAACAGGCGTGCTCGGACCTTCTC
Mi-4-F	TGCTGTGAGCAGCCGGACTCTTGGTGGTTTTGGCCACTGACTGACCACCAAGACCGGCTGCTCA
Mi-4-R	CCTGTGAGCAGCCGGTCTTGGTGGTCAGTCAGTGGCCAAAACACCAAGAGTCCGGCTGCTCAC
Negative-F	TGCTGAAATGTACTGCGCGTGGAGACGTTTTGGCCACTGACTGACGTCTCCACGCAGTACATTT
Negative-F	CCTGAAATGTACTGCGTGGAGACGTCAGTCAGTGGCCAAAACGTCTCCACGCAGTACATTTT

1.1.2 胃癌细胞系 SGC-7901 为本实验室冻存。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建 将 4 对寡聚单链 DNA 退火成双链。然后用载体构建试剂盒 BLOCK-iT™ Pol II miRNAi Expression Vector Kit with EmGFP 进行重组克隆, 将 4 对双链的 miRNA oligo 分别插入到 miRNA 表达载体 pcDNA™6.2-GW/Em-GFPmiR 中, 构建 4 个 miRNA 表达质粒, 并转化至感受态细胞 DH5α。退火和连接的具体方法如下: (1) 寡聚 DNA 退火, 将 4 对合成好的寡聚单链 DNA 用灭菌的 ddH₂O 溶解成 100 μM, 互补单链各取 5 μl 两两混合, 按说明给出体系进行退火。然后将 4 份 oligo 混合物在 95℃ 加热 5 分钟, 然后放置室温自然冷却 20 分钟, 形成双链 DNA; (2) 将退火后形成的双链 DNA 稀释成 10nM, 按说明将双链 DNA 和 pcDNA6.2-GW/EmGFP 载体、ds oligo、T4 DNA ligase 配置在连接体系, 混匀后在室温让反应 30 分钟, 形成完整的质粒; (3) 每个转化平板分别挑取 4 个克隆, 摇菌抽提质粒后进行测序, 以验证重组克隆中插入片段序列是否与设计的寡聚单链 DNA 序列一致。

1.2.2 细胞培养 人胃癌细胞株 SGC-7901 复苏后用含 10% 小牛血清、100U/mL 的青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基, 于 37℃, 5%CO₂ 的温箱中培养。

1.2.3 质粒的扩增和制备 (1) 将转染质粒的 DH5α 涂布于含壮观霉素抗性的 LB 平板上(含 50mg/mL 的壮观霉素), 37℃ 恒温培养过夜。从培养皿上挑选 5 个单克隆菌落接种于 100ml 含壮观霉素抗性的 LB 培养基中, 37℃, 180rpm/min 条件下恒温摇床培养过夜; (2) 按 TIANGEN 去内毒素质粒抽提试剂盒说明, 抽提质粒; 并利用紫外分光光度计测量质粒 DNA 浓度; 质粒 DNA 保存于 -20℃ 条件下备用。

1.2.4 胃癌细胞 SGC-7901 筛选浓度、维持浓度的确定 将胃癌细胞 SGC-7901 按 1*10⁵ 接种于 6 孔板, 待细胞贴壁后, 将杀稻瘟菌素按终浓度为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 μg/ml 11 个浓度加至各孔, 于 37℃, 5%CO₂ 的培养箱中培养, 每 2 天换一次培养基并加药, 培养 10 天后导致细胞全部死亡的最低浓度为基准, 筛选时比该浓度高一个级别, 维持浓度为筛选浓度的一

半。

1.2.5 转染 按 Roche BD 转染试剂说明操作, 具体步骤: (1) 将状态良好、处于对数生长期的胃癌细胞系 SGC-7901 用含 EDTA 0.25% 的胰酶消化, 用完全培养基重悬后计数, 按 5×10⁴/孔接种于 6 孔板; (2) 待细胞融合度达到 60% 时换无血清培养基饥饿培养 2 小时后转染; (3) 用 500μl Opti-men 培养基稀释 4μl BD 转染试剂, 再分别加入 2μg Mi-1、Mi-2、Mi-3、Mi-4 和无效干扰质粒, 轻轻混匀后, 室温下孵育 5min; (4) 将 6 孔板中无血清培养基换成完全培养基并将 500μl 含转染试剂及质粒 DNA 的 Opti-men 培养基分别加至各孔; (5) 轻轻混匀后至于 37℃, 5%CO₂ 的温箱中培养; (6) 分别于转染 24h、48h 时置于倒置荧光显微镜下观察荧光表达情况, 估计转染率。

1.2.6 Western blot 于转染 48h 后收集细胞(留取少许转染细胞继续培养), 采用 RIPA 细胞裂解液提取 SGC-7901 细胞总蛋白, 酶标仪测量蛋白浓度。利用 12% SDS-PAGE 凝胶电泳 1h 30min; 200mA 恒流、1h30min 将蛋白转至硝酸纤维素膜(NC 膜)上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 NC 膜 1h, 兔抗人 Snail 多克隆抗体孵育, 4℃, 过夜, TBST 洗脱液洗脱 15min/次, 4 次, HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗孵育 2h, TBST 洗脱液洗脱 15min/次, 4 次; ECL 发光液显影。

1.2.7 稳定株筛选 根据步骤 6 western blot 结果及步骤 4 所得的最佳筛选浓度筛选最有效干扰序列转染的细胞株, 筛选 28 天后利用有限稀释法得单克隆稳定转染株, 同时用含维持浓度药物的培养基培养。

2 结果

2.1 miRNA 真核表达载体的测序

通过上海 Invitrogen 生物技术有限公司的测序验证, 所获得的重组干扰质粒中的目的片段与设计的寡聚单链 DNA 序列一致, 表明退火形成的双链 DNA 干扰序列成功连接入 pcDNA™6.2-GW/Em-GFPmiR 载体(如图 1)。

2.2 筛选及维持浓度的测定

胃癌细胞株 SGC-7901 经含不同浓度杀稻瘟菌素培养基

培养 10 天,在杀稻瘟菌素浓度 $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ 时细胞全部死亡,则转染后 SGC-7901 细胞的筛选浓度为 $5 \mu\text{g/ml}$,维持浓度为 $2.5 \mu\text{g/ml}$ 。

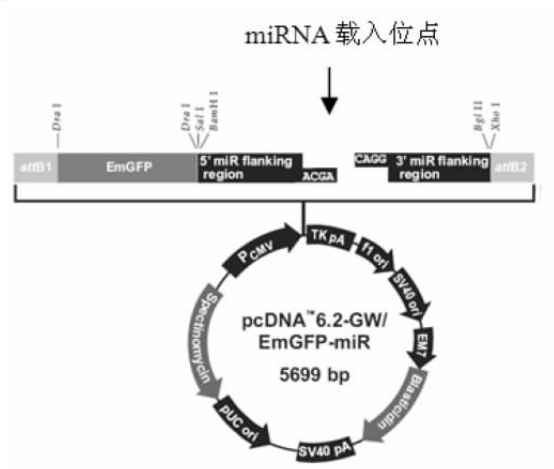


图 1 pcDNA6.2-GW/EmGFP-miRNA 图谱及 miRNA 载入位点

Fig.1 pcDNA6.2-GW/EmGFP-miRNA and the transfected position

2.3 转染细胞株的倒置荧光显微镜观察

由于 pcDNATM6.2-GW/Em-GFPmiR 载体带有绿色荧光报告基因,成功转染的细胞株在荧光显微镜下观察既有绿色荧光

蛋白表达(如图 2),同时载体携带的外源 miRNA 基因得到表达。

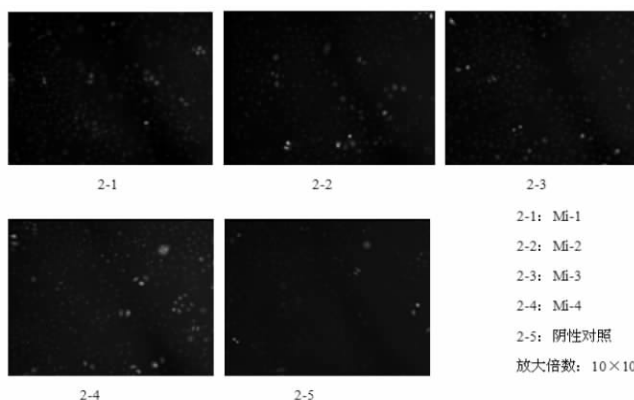
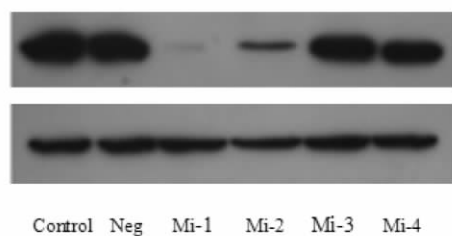


图 2:转染细胞的荧光图片

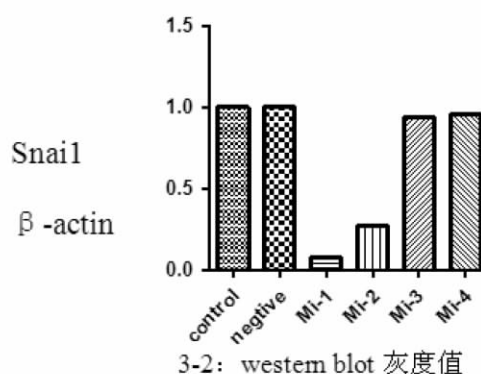
Fig.2 fluorescence image of transfected cells

2.4 miRNA 抑制 Snail 基因的表达

采用 Western blot 技术验证干扰序列 Mi-1、Mi-2、Mi-3、Mi-4 及无效干扰 miRNA 对目的基因 Snail 蛋白水平表达的抑制作用,结果表明 Mi-1 干扰序列对 Snail 有较强的抑制作用,干扰作用达到了 92%,阴性对照组无抑制作用(如图 3)。



3-1: western blot 结果



3-2: western blot 灰度值

图 3 3-1,western blot 检测胃癌细胞 SGC-7901 中 Snail 表达水平,结果显示 Mi-1 的干扰作用最明显,阴性对照组无干扰作用;

3-2,western blot 灰度值扫描,显示 Mi-1 的干扰最用达到了 92%。

Fig.3 3-1 Snail expression in SGC-7901 with Western Blot; 3-2 Scanning results of Western Blot in 3-1

3 讨论

局部浸润被认为是肿瘤发生致命的远处转移的最为关键的一步,而肿瘤发生远处转移受一系列细胞的和分子的机制所调控,使肿瘤细胞的极性和细胞间的粘附性发生改变,促使肿瘤细胞从原发病灶向远处扩散和转移^[7]。而肿瘤发生局部浸润及远处转移即 EMT 是导致肿瘤病人高死亡率的重要因素,也是目前肿瘤治疗的难点^[8]。

随着对 miRNA 研究的深入,发现 miRNA 是一类存在于生物体内源性长度约为 21 个核苷酸的非编码小 RNA,通过与靶 mRNA 的互补配对在转录后水平上对基因的表达进行调控^[9-11]。在哺乳动物中,预计 miRNA 调控着大约 50%的蛋白的编码,功能研究显示 miRNA 几乎参与了迄今为止所有的细胞间调控,此外其表达的改变与人类很多病理过程的发生有着密

切的联系^[12]。且对 miRNA 调控作用的研究显示,以 mRNA 为底物的 RISC(RNA-induced silencing complex),miRNA 所起的作用是小于干扰 RNA(siRNA)的 10 倍^[13]。

1984 年锌指转录蛋白 Snail 首先被发现存在于果蝇中^[14],认为其与中胚层的形成密切相关,后陆续发现其在昆虫、线虫甚至人类的胚胎发育中发挥重要作用,近几年发现其与肿瘤细胞发生 EMT^[1-2,4]及肿瘤细胞的抗药性密切相关^[15]。研究还显示 Snail 通过调控 wnt/ β -catenin 信号通路在肿瘤的增殖、分化及远处转移中起重要作用,但此前的研究很少涉及其在胃癌中的作用。本研究通过设计合成特异性作用于锌指转录蛋白 Snail 的 miRNA,接入 pcDNATM6.2-GW/Em-GFPmiR 载体,测序证实重组克隆中插入片段序列与设计序列一致,同时成功转染胃癌细胞 SGC-7901,并筛选出稳定转染株。按说明在转染率 $>80\%$ 的情况下,4 个质粒中至少有 1 个干扰效果达到 70%以上。本

研究通过倒置荧光显微镜观察,在转染率大于 85%以上,通过 western blot 检验 4 个干扰质粒及阴性对照质粒的干扰效果,结果显示 4 个质粒中 Mi-1 的干扰效果最好,Snail 蛋白表达水平下降了 90%以上。同时通过有限稀释法成功筛选出单克隆 pcDNATM6.2-GW/Em-GFPmiR/Snai1 稳定转染株。本研究成功获得了 Snail miRNA 的有效干扰质粒,同时筛选出胃癌细胞的稳定转染株,为进一步研究 Snail 在胃癌中作用奠定基础。

参考文献(References)

- [1] Batlle E, Sancho E, Franci C, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumor cells [J]. Nat Cell Biol, 2000, 2: 84-89
- [2] Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression [J]. Nat Cell Biol, 2000, 2: 76-83
- [3] C Pena, JM Garcia, MJ Larriba, et al. SNAI1 expression in colon cancer related with CDH1 and VDR downregulation in normal adjacent tissue [J]. Oncogene, 2009, 28, 4375-4385
- [4] M Lombaerts I, T van Wezel, K Philippo, et al. E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines [J]. British Journal of Cancer, 2006, 94, 661-671
- [5] Modjtaba Emadi Baygi, Zahra Soheila Soheili, Ingo Schmitz, et al. Snail regulates cell survival and inhibits cellular senescence in human metastatic prostate cancer cell lines [J]. Cell Biol Toxicol, 2010, 26(6): 553-67
- [6] David F, Schaeffer Kiran Assi Katie Chan Andrzej K, Buczkowski Stephen W, et al. Tumor expression of Integrin-linked kinase (ILK) correlates with the expression of the E-cadherin repressor Snail: an immunohistochemical study in ductal pancreatic adenocarcinoma [J]. Virchows Arch, 2010, 456: 261-268
- [7] Boyer B, Valles AM, Edme N. Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions [J]. Biochem Pharmacol, 2000, 60: 1091-1099
- [8] David Quigley, Allan Balmain. Systems genetics analysis of cancer susceptibility: from mouse models to humans [J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(9): 651-657
- [9] Bartel, D, P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. Cell, 2009, 136: 215-233
- [10] Carthew, R. W, Sontheimer, E. J. Origins and mechanisms of miRNAs and iRNAs [J]. Cell, 2009, 136: 642-655
- [11] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2005, 123(4): 631-640
- [12] Jacek Krol, Inga Loedige, Witold Filipowicz, et al. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay [J]. Nat Rev Genet, 2010, 11(9): 597-610
- [13] Richard I. Gregory, Thimmaiah P, et al. Human RISC Couples MicroRNA Biogenesis and Posttranscriptional Gene Silencing [J]. Cell, 2005, 123: 631-640
- [14] Grau Y, Carteret C, Simpson P. Mutations and chromosomal rearrangements affecting the expression of snail, a gene involved in embryonic patterning in Drosophila melanogaster [J]. Genetics, 1984, 108: 347-360
- [15] Hiromitsu Hoshino a, Norikatsu Miyoshi a, Ken-ichi Nagai, et al. Epithelial mesenchymal transition with expression of SNAI1-induced chemoresistance in colorectal cancer [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, 390: 1061-1065