

软骨肉瘤相关基因 Sox9(siRNA) 表达质粒的构建 鉴定 以及对肿瘤细胞生长和凋亡的影响 *

秦宏敏 韩会峰 沙广钊 刘 林 彭易根 任天成
徐州医学院附属医院骨科 (江苏省徐州市 221002)

摘要 目的: 利用小干扰阻断目的基因的原理将构建的目的基因 Sox9 的 pSIencer3, 1- H1 neo siRNA(small interfering RNA) 表达质粒转染人体软骨肉瘤细胞 HTB- 94, 观察目的基因被阻断后肿瘤细胞目的基因的表达、肿瘤细胞生长和凋亡所受到的影响。方法: 设计并合成 Sox9(siRNA), 鉴定后将其转染 HTB- 94 肿瘤细胞, 观察肿瘤细胞的 Sox9 基因的 mRNA 和蛋白表达的变化, 以及被转染肿瘤细胞的生长曲线和肿瘤细胞凋亡的情况。结果: Sox9 (siRNA) 的插入片段测序结果与合成的 siRNA 结果一致, 被转染的 HTB- 94 Sox9 基因的 mRNA 的表达量下降了 35.4%, 蛋白的表达量下降了 31.3%; Sox9(siRNA) 转染 HTB- 94 细胞 24h 和 96h 的光吸收值分别为 0.146 ±0.037 和 0.412 ±0.036, 而正常对照细胞组两个同样时间段的光吸收值分别为 0.152 ±0.0367 和 0.607 ±0.029。其中细胞生长增殖速度的差异为 32.0%, 肿瘤细胞的生长明显受到抑制; Sox9 (siRNA) 转染 HTB- 94 细胞的干扰组细胞凋亡率为 39.2%; 而未经干扰的 HTB- 94 肿瘤细胞的细胞凋亡率为 0.1%。结论: 经过设计合成的 Sox9(siRNA) 表达质粒可以稳定转染人体软骨肉瘤细胞 HTB- 94 肿瘤细胞, 被 Sox9(siRNA) 表达质粒转染的人体软骨肉瘤细胞 HTB- 94 肿瘤细胞 Sox9 基因的 mRNA 和蛋白的表达都受到抑制, 同时肿瘤细胞的生长繁殖也受到明显抑制, 肿瘤细胞的凋亡明显增加。

关键词 siRNA(Sox9) RNA 干扰 Sox9 蛋白和 mRNA 表达 细胞生长曲线 细胞凋亡

Construction and Identification of a siRNA Expression Plasmid Targeting Sox9 and Its Effect on the Growth and Apoptosis of Human Chondrosarcoma Cells

QIN Hongmin¹, HAN Huifeng¹, SHA Guangzhao², LIU Lin¹, PENG Yigen¹, REN Tiancheng¹

Corresponding author: QIN Hongmin, E- mail: qinhongmin07@yahoo.com.cn

¹Department of Orthopedics, The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China

²The First People's Hospital of Pizhou, Pizhou 221300, China

Grant support: Natural Science Foundation of Jiangsu Province (05KJB320135)

Abstract Objective: To construct a siRNA expression plasmid targeting Sox9 and to investigate its effect on the growth and apoptosis of human chondrosarcoma cells. Methods: After designing and synthesizing the siRNA expression plasmid, it was transfected into HTB- 94 human chondrosarcoma cells and confirmed by enzyme digestion analysis and DNA sequencing. The expression of Sox9 mRNA and protein was assessed and cell growth and apoptosis were observed. Results: Compared with that of untransfected cells, the expression of Sox9 mRNA in transfected HTB- 94 cells was reduced by 35.4%, and the protein expression was reduced by 31.3%. The light absorbance values in transfected cells after 24h and 96h were 0.146 ±0.037 and 0.412 ±0.036, but were 0.152 ±0.0367 and 0.607 ±0.029 in untransfected cells. The cell growth in transfected cells was 32% lower than that in untransfected cells. The apoptosis rate was 39.2% in transfected cells and 0.1% in untransfected cells. Conclusion: After transfection into HTB- 94 human chondrosarcoma cells, a siRNA expression plasmid targeting Sox9 reduced mRNA and protein expression, inhibiting growth and causing apoptosis of the tumor cells.

Keywords siRNA; Sox9; RNA interference; Tumor cell growth; Tumor cell apoptosis

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是一种序列特异性的, 与靶基因同源的双链 RNA 所诱导的转录后基因沉默现象, 近年来被大量应用于肿瘤的病

因、机制以及治疗的研究。Sox9(SRY- related high mobility group- box gene9 高泳动家族性别决定基因 9) 是人体早期胚胎发育重要的相关基因, 定位于 17

* 本文课题受江苏省自然科学基金和江苏省高校自然科学研究基金资助(编号: 05KJB320135; BK2005015)

江苏省邳州市第一人民医院

通讯作者: 秦宏敏 qinhongmin07@yahoo.com.cn

号染色体的长臂上,属于高泳动类转录因子超家族,近年来认为是软骨细胞分化和软骨形成的关键调节因子^[1-4]。Schaefer等^[5-7]在不同的实验中证明 Sox9在人体软骨肉瘤细胞中的表达。在将 Sox9(siRNA)表达质粒稳定转染人体软骨肉瘤细胞 HTB-94 后,我们观察 Sox9(siRNA)表达质粒对 HTB-94 细胞中 Sox9 蛋白、mRNA、细胞生长曲线以及肿瘤细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

HTB-94 人体软骨肉瘤细胞株由维也纳大学医学院馈赠;含有人 H1 启动子的 pSilencer 3,1-H1 hygro 质粒购自美国 Ambion 公司;Wizard[®] Plus-Mini-preps DNA Purification System (Promega 公司), Pure Yield Plasmid Midiprep System (Promega 公司), siPORT[™] XP-1 Transfection Agent (Ambion 公司), RNAagents[®] Total RNA Isolation System (Promega), MTT 试剂盒 (KeyGEN), BamH_I, Hind_{III} 限制性内切酶, T4DNA 连接酶, DNA 酶, Taq 酶购自 Invitrogen 生物技术有限公司, Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (ACT Gene), Access RT-PCR System (Promega), Sox9 一抗 (SANTA CRUZ 公司), Sox9 二抗、DAB 显色试剂盒、PV-9000 二步法免疫组化检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 siRNA 转录模板 DNA 链的设计与合成 模板 DNA 合成采用 Schaefer 等^[5]发表的 Sox9 靶序列 5'-AACTC-CAGCTCCTACTACAGC-3', 按照 Ambion 公司的网上设计软件设计一对编码短发夹 RNA 序列的 DNA 单链。其序列为 P1: 5'-GATCCGCTC-CAGCTCCTACTACAGCTTCAAGAGAGCTGTAGTAGGAGCTGGAGTTTTTTGGAAA-3', P2: 55'-AGCTTTTCCAAAAA ACTCCAGCTCCTACTACAGCTCTCTTGAAGC-TGTAGTAGGAGCTGGAGCG-3'。其顺序为 BamH_I 酶切位点、19nt 正义序列、9nt loop 接头序列、19nt 反义序列、RNA 聚合酶 终止子 (6 个 T)、Hind_{III} 酶切位点。由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.2 pSilencer Sox9 表达载体的构建 分别为寡核苷酸的退火、噬菌体 DNA 连接酶连接和重组质粒的转化和单克隆扩增三个主要步骤,按照 pSilencer 3.1 H1 hygro 质粒试剂盒(Ambion 公司)和 Wizard[®] Plus-Mini-preps DNA Purification System 质粒小量抽提试剂盒 (Promega 公司) 的实验步骤,构建 pSilencer Sox9 表达载体。

1.2.3 阳性克隆鉴定 1) 酶切鉴定 用限制性内切酶 BamH_I 和 Hind_{III} 将重组质粒 pSilencer/Sox9 (siRNA) 切成 2 条片段,电泳观察插入子及载体片段分子量。2) 测序鉴定:将 BamH_I 和 Hind_{III} 酶切后电泳大约 64bp 阳性重组质粒送北京三博远志生物有限责任公司测序。

1.2.4 基因转染 将 HTB-94 细胞接种于 6 孔板,调整细胞数目为每孔 0.6×10^5 , 24h 后有 30%~60% 的融合率将 siPORT-1 复温,取 3 μ l 用 MEM 稀释至每孔 100 μ l, 5~20min 后加入质粒终浓度为每孔 1 μ g, 轻摇,室温下放置 5~20min 吸弃孔中培养基,将混合物加到孔中,用培养基补至 2ml/孔。在此后的实验过程中,间断地取出部分细胞在含 500 μ g/ml 的 G418 的条件培养基中筛选,未能稳定转染的细胞在 6~8d 左右全部死亡,转基因 HTB-94 细胞却能持续存活并生长传代,4 周后检测被转染 HTB-94 细胞中 Sox9 mRNA 和蛋白表达。

1.2.5 半定量 RT-PCR 检测转染细胞 HTB-94 中 Sox9 mRNA 表达的变化 采用总 RNA 提取试剂盒,按操作说明,提取转染细胞的总 RNA。Sox9 引物:正义链 5'-ATCTGAAGAAGGAGAGCGAG-3', 反义链 5'-TCAGA-AGTCTCCAGAGCTTG-3'。产物电泳后,经凝胶分析软件分析其灰度值,结果以产物与内参照的比值表示。

1.2.6 Western blot 检测 Sox9 蛋白表达 快速制备法提取核蛋白。经电泳分别取 3 组转染细胞裂解液样品(每个均取 100 μ g 细胞蛋白)加样后电泳,湿式电转移,封闭,第 1 抗体结合,第 2 抗体结合,ECL 法显影。以图象处理仪(Gene Company)分析处理,测定吸光度并计算与空白对照组比值。

1.2.7 MTT 微量酶反应比色法检测细胞生长曲线 按 200 μ l/孔 (1×10^4 个细胞)接种于 96 孔培养板内,每组细胞接种 5 个孔,取平均值,切记各孔的接种密度一致。酶联免疫检测仪检测各孔 OD 值,检测波长 570nm,以时间为横坐标,平均 OD 值为纵坐标,记录并绘制细胞生长曲线。

1.2.8 Annexin V-FITC 流式细胞仪检测细胞凋亡 Sox9(siRNA)表达质粒转染 HTB-94 细胞 48h 后调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml,取 1ml 细胞,1 000rpm,4 离心 10min,弃上清;加入 1ml 冷的 PBS,轻轻震荡使细胞悬浮;1 000rpm,4 离心 10min,弃上清;重复步骤 3、4 两次。

1.3 统计学方法

采用方差分析 SPSS 统计软件处理。

2 结果

2.1 Sox9 siRNA 表达质粒的鉴定

2.1.1 重组质粒 pSilencer/Sox9 siRNA 酶切鉴定结果 图 1 中条带 1 为环状质粒 pSilencer/Sox9(siRNA) 所以电泳速度比条带 2 中线性质粒快。条带 2 为 BamH I 和 Hind III 双酶切后切出大小约 64bp 的片段。

2.1.2 重组质粒 pSilencer/Sox9(siRNA) 测序结果 测序结果与设计的 siRNA 转录模板序列完全相同, 表明 pSilencer Sox9 中已含有 siRNA 模板 DNA 片段(图 2)。

2.2 Sox9 siRNA 表达质粒对 HTB-94 转染细胞中 Sox9 mRNA 表达水平的影响

检测结果表明, 稳定转染 pSilencer Sox9 的 HTB-94 细胞内, Sox9 mRNA 表达量为 $(0.46 \pm 0.027)\%$, 而转染空载体的 HTB-94 细胞为 $(1.00 \pm$

$0.031)\%$, 其 Sox9 mRNA 的表达下降了 $35.4\%(P < 0.01, \text{图 } 3)$ 。

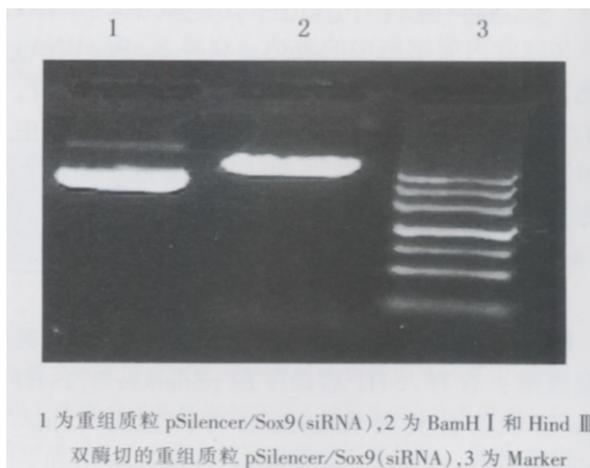


图 1 重组质粒 pSilencer/Sox9 siRNA 的酶切分析

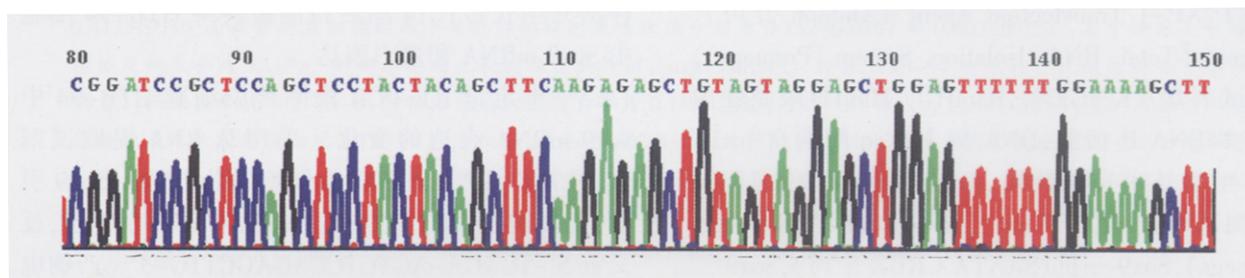


图 2 重组质粒 pSilencer/Sox9 siRNA 测序结果与设计的 siRNA 转录模板序列完全相同

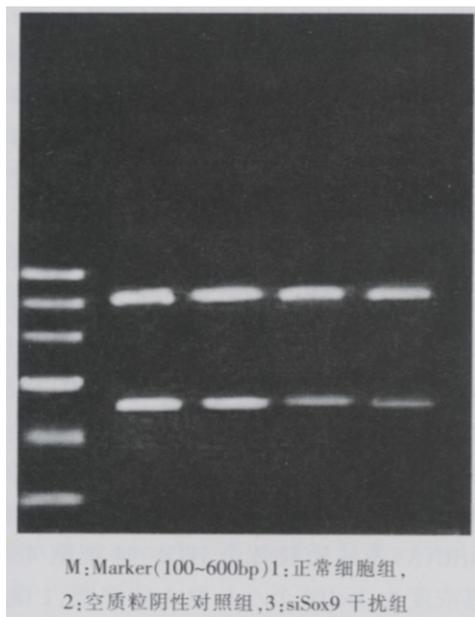


图 3 RT-PCR 检测转染细胞 HTB-94 中 Sox9 mRNA 表达的结果

2.3 Sox9 (siRNA) 表达质粒对 HTB-94 转染细胞中 Sox9 蛋白水平表达的影响

从图 3 我们可以看出, 稳定转染 pSilencer Sox9 的 HTB-94 细胞内, Sox9 的蛋白水平表达量为 $(0.68 \pm 0.032)\%$, 而转染空载体的 HTB-94 细胞为 $(0.99 \pm 0.027)\%$, 其 Sox9 的蛋白水平表达量下降了 31.3%

$(P < 0.01, \text{图 } 4)$ 。

2.4 Sox9 (siRNA) 表达质粒对 HTB-94 转染细胞中细胞生长曲线的影响

如图 3, 4 所示, Sox9 (siRNA) 转染 HTB-94 细胞 24h 和 96h 的光吸收值分别为 0.146 ± 0.037 和 0.412 ± 0.036 , 而正常对照细胞组分别为 0.152 ± 0.0367 和 0.607 ± 0.029 。其中细胞生长增殖速度的差异为 $32.0\%(P < 0.01, \text{图 } 5)$ 。

2.5 Sox9 siRNA 表达质粒对 HTB-94 转染细胞中细胞凋亡的影响

如 Annexin V-FITC 流式细胞仪象限图所示: 左下象限为正常细胞组; 右下象限为早期细胞凋亡组; 右上象限为晚期细胞凋亡组; 左上象限为正常细胞死亡组。Sox9 siRNA 转染 HTB-94 细胞的干扰组细胞凋亡率为 39.20% ; 而未经干扰的 HTB-94 肿瘤细胞的细胞凋亡率为 $0.1\%(P < 0.01, \text{表 } 1, \text{图 } 6)$ 。

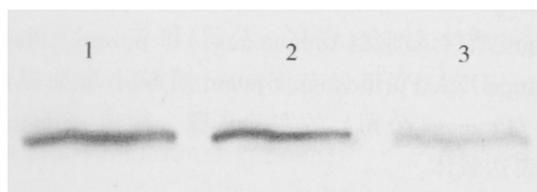


图 4 Western blot 检测转染细胞 HTB-94 中 Sox9 蛋白表达的结果

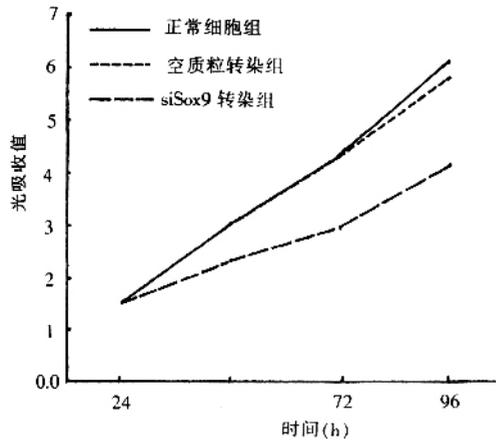


图5 MTT微量酶反应比色法检测细胞生长曲线

表1 MTT微量酶反应比色法检测细胞生长曲线数据

| 组别 | 24h | 48h | 72h | 96h |
|------------|-----------------|-----------------|---------------|---------------|
| 正常细胞组 | 0.152 ± 0.036 7 | 0.303 ± 0.030 1 | 0.436 ± 0.041 | 0.607 ± 0.029 |
| 空质粒转染组 | 0.150 ± 0.039 7 | 0.307 ± 0.027 7 | 0.428 ± 0.021 | 0.578 ± 0.034 |
| siSox9 转染组 | 0.146 ± 0.037 | 0.228 ± 0.030 9 | 0.292 ± 0.036 | 0.412 ± 0.036 |

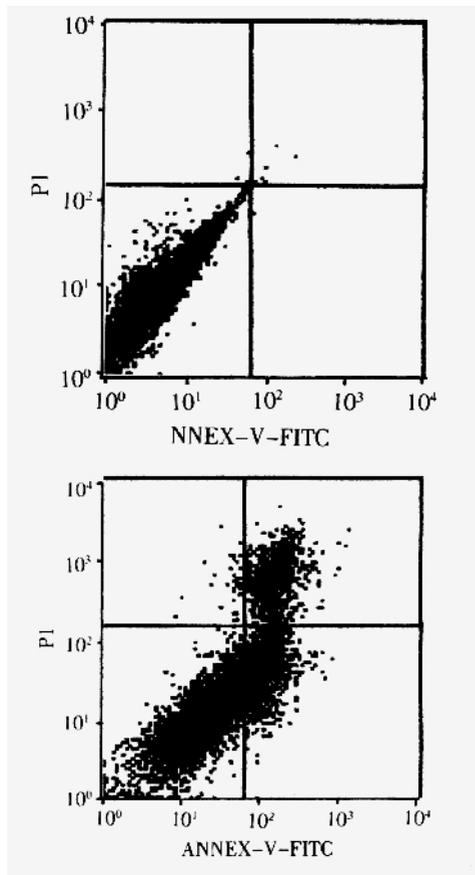


图6 Annexin V-FITC流式细胞仪细胞凋亡象限各组比较

3 讨论

我们在实验所选用的载体为RNA聚合酶H1启动子, 主要是因为该启动子具有更高的灵活性。BamH^I/Hind^{III}为酶切位点, 是因为它能产生非对称互补的粘性末端, 保证了插入片的方向正确,

防止载体的自身粘连。实验中观察到插入序列和载体的连接效率高, 很容易筛选出抗性克隆, 通过酶切和测序检测, 证实了插入片段序列的正确性。在稳定转染HTB-94细胞后48h我们检测了肿瘤细胞的细胞凋亡情况, 结果发现被转染HTB-94细胞的细胞凋亡率为39.20%; 而未经干扰的HTB-94肿瘤细胞的凋亡率为0.1%, 表明Sox9(siRNA)质粒转染的效果在48h后就已显现。

而稳定转染4周后检测转染Sox9(siRNA)的HTB-94细胞中, 其Sox9的mRNA的表达下降了37.0%, Sox9蛋白的表达下降了31.3%, 其稳定转染的结果与Brummelkamp等阐述的shRNAs基因封闭作用长达2个月的理论与实验结果相符^[8-10]。由此可见, 本实验稳定转染的表达质粒pSILcnccr/Sox9(siRNA)在人体软骨肉瘤细胞HTB-94中对靶向基因Sox9的干扰作用准确而显著, 小干扰RNA有望应用于进一步肿瘤基因治疗的研究。

参考文献

- 1 Furusawa T, Lim JH, Catez F, et al. Down-regulation of nucleosomal binding protein HMGN1 expression during embryogenesis modulates Sox9 expression in chondrocytes [J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(2): 592-604
- 2 Shintani N, Kurth T, Hunziker EB. Expression of cartilage-related genes in bovine synovial tissue [J]. J Orthop Res, 2007, 25(6): 813-819
- 3 秦宏敏, 许铁, 姚爱明, 等. Sox9基因与软骨组织的研究进展[J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23(20): 255-256
- 4 Cucchiari M, Thurn T, Weimer A, et al. Restoration of the extracellular matrix in human osteoarthritic articular cartilage by overexpression of the transcription factor SOX9 [J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(1): 158-167
- 5 Schaefer JF, Millham ML, de Crombrughe B, et al. FGF signaling antagonizes cytokine-mediated repression of Sox9 in SW1353 chondrosarcoma cells [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2003, 11(4): 233-241
- 6 Soderstrom M, Bohling T, Ekfors T, et al. Molecular profiling of human chondrosarcomas for matrix production and cancer markers [J]. Int J Cancer, 2002, 100(2): 144-151
- 7 Wehrli BM, Huang W, De Crombrughe B, et al. Sox9, a master regulator of chondrogenesis, distinguishes mesenchymal chondrosarcoma from other small blue round cell tumors [J]. Hum Pathol, 2003, 34(3): 263-269
- 8 Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells [J]. Science, 2002, 296(5567): 550-553
- 9 彭广新, 李大鹏. 肿瘤干细胞与恶性肿瘤的靶向治疗[J]. 中国肿瘤临床, 2006, 33(7): 418-420
- 10 张晓菁, 温泽清, 白爱民, 等. 载体表达小干扰RNA逆转卵巢癌的多药耐药[J]. 中国肿瘤临床, 2006, 33(3): 134-137

(2007-08-06收稿)(2007-10-22修回)

(杨红欣校对)