

基于 Smad 7 基因为靶序列的 RNA 干涉作用研究^{*}

王菊萍¹, 王莹², 霍艳英³, 郭蔼光¹, 徐勤枝³, 张开泰³

(1 西北农林科技大学 生命科学院, 陕西 杨凌 712100; 2 重庆医科大学 基础医学院, 重庆 400016;

3 军事医学科学院 放射医学研究所分子毒理研究室, 北京 100850)

[摘要] 为了探讨小干扰 RNA (siRNA) 对靶基因 *Smad 7* mRNA 表达的阻断作用, 采用体外转录方法制备 *Smad 7* 基因的小干扰 RNAs (siRNAs), 用脂质体介导瞬时转染 BERP35 T-2 肺癌细胞系, 并采用 Northern blot 杂交检测靶基因 mRNA 的表达丰度。结果表明, 根据 *Smad 7* 编码区序列在体外成功地制备了针对 2 个不同靶序列的 siRNAs; Northern blot 杂交显示, 在转染 siRNA 的 BERP35 T-2 细胞中, 不管是内源性的还是外源性的, *Smad 7* mRNA 的表达丰度均明显下降。说明 *Smad 7* 基因编码区中 542563 bp 及 701722 bp 2 个区域均是 siRNA 作用的有效靶序列, 本研究设计并制备的 siRNAs 能有效抑制 *Smad 7* 基因的表达。

[关键词] 小干扰 RNA; *Smad 7* 基因; 体外转录; 瞬时转染; 靶序列

[中图分类号] Q786; R734.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)12-0013-05

RNA 干涉 (RNA interference, RNAi) 是利用一些小的双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 来高效、特异地阻断细胞内特定基因的表达, 从而诱使细胞表现出某种特定基因的缺失表型。以前, 最有效的阻断基因表达策略是基因敲除, 但这一策略不仅技术复杂, 实验环境要求高, 而且投资巨大、耗费时间。反义策略包括反义 RNA 技术和反义寡核苷酸技术, 虽然技术简单, 但效果并不理想。与此相比, RNAi 策略则具有明显的优势。RNAi 技术能够迅速、有效地抑制某个基因的表达, 被认为是能有效代替基因敲除的遗传工具。此外, RNAi 技术较传统的转染实验简单、快速、重复性好, 克服了转染实验中重组蛋白特异性聚集和转染效率不高的缺点。目前, RNAi 技术在功能基因组学、细胞信号转导通路的研究及肿瘤的基因治疗等方面显示了巨大的应用潜力。*Smad 7* 是 Smads 蛋白家族的抑制性 Smads 之一, 可抑制 TGF- β 信号的转导通路。既往的研究发现^[1], 在发生恶性转化的人支气管上皮细胞系 BERP35 T-2 中, *Smad 7* 表达高于人永生化支气管上皮细胞系 BEP2D。过表达的 *Smad 7* 通过负调控 TGF- β 介导的抗增殖基因应答, 降低 TGF- β 对细胞的生长抑制作用, 从而促进细胞的生长增殖, 使细胞进一步向恶性化方向发展。但是这种异常表

达是否可以被小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 有效抑制, 尚有待试验证实。本研究旨在采用 siRNA 技术, 探索其对 *Smad 7* 基因表达的调控以及 *Smad 7* 基因中 siRNA 作用的有效靶序列, 为进一步研究 *Smad 7* 基因在肺癌发生和发展中的作用机制提供信息。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 人永生化支气管上皮细胞 BEP2D 由美国国立卫生研究院 (NIH) Harris C C 教授馈赠; BERP35 T-2 细胞为 1.5 Gy α 粒子照射后发生恶性转化的 35 代 BEP2D 细胞^[2]。

1.1.2 试剂 Silencer™ siRNA Construction Kit (Ambion Inc, USA); PGEM-Teasy 载体连接试剂盒 (Promega, USA); pCI-neo 真核表达载体 (Promega, USA); EcoR I 限制性内切酶 (Takara, 大连); LHC-8 无血清培养液 (Biofluids Inc, USA); Lipofectin 试剂 (Invitrogen, USA); Trizol 试剂 (Gibco, USA); Prime-a-Gene Labeling System (Promega, USA)。

1.2 方法

1.2.1 siRNA 寡核苷酸模板的设计 参考 Elbashir 等^[3]提供的方案进行小干扰 RNAs (small interfering

^{*} [收稿日期] 2004-06-10

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划 973 项目 (G1998051207)

[作者简介] 王菊萍 (1970 -), 女, 陕西渭南人, 硕士, 主要从事生物化学及分子生物学研究。E-mail: zhdwjp1@yahoo.com.cn

[通讯作者] 张开泰 (1963 -), 男, 重庆人, 副研究员, 医学博士, 主要从事肿瘤分子生物学研究。E-mail: zhangkt@vip.sina.com

RNAs, siRNAs) 的设计:在靶 mRNA 中寻找具有 AA 二核苷酸(nucleotide, nt) 的序列。从 AUG 起始密码子开始,扫描靶序列寻找 AA 位点,记录 AA 和下游的 19 个核苷酸,其 GC 含量低于 50%,同源性比较排除与其他基因有显著同源性的任何序列。正义和反义寡核苷酸模板的 3' 末端引入 T7 启动子序列。

1.2.2 siRNA 寡核苷酸模板的合成 所设计的 *Smad 7* 基因的 siRNA 寡核苷酸模板由北京奥科生物技术有限公司合成。542 siRNA (*Smad 7* 基因编码区中 542563 bp 的一段序列为其靶序列) 寡核苷酸模板正义和反义序列分别为:5' AAG GTT GAT CTT CCC GTA AGA CCT GTC TC 3', 5' AAT CTT ACG GGA AGA TCA ACC CCT GTC TC 3'; 701 siRNA (*Smad 7* 基因编码区中 701722 bp 的一段序列为其靶序列) 寡核苷酸模板正义和反义序列分别为:5' AAG ATA ATT CGT TCC CCC TGT CCT GTC TC 3', 5' AAA CAG GGG GAA CGA ATT ATC CCT GTC TC 3'。

1.2.3 siRNA 的体外转录 在 2 个独立反应中,正义与反义 siRNA 寡核苷酸模板与 T7 启动子引物序列杂交。3' 末端通过 Klenow 酶补平;加入 T7 RNA 聚合酶转录生成短片断 RNA (short RNA, sRNA);正义和反义 sRNA 37 °C 下杂交 2 h 形成 dsRNA,产物纯化除去反应中过量的核苷酸、短的寡聚物及蛋白质和盐类。

1.2.4 B4-*Smad 7* 真核表达载体的构建 用限制性内切酶 *EcoR* I 酶切插入有 *Smad 7* 基因的 PGEM-Teasy 载体及 pCI. neo 真核表达载体,回收酶切片段,将含 *Smad 7* 基因的片段同 pCI. neo 真核表达载体片段连接,转化大肠杆菌后挑选阳性克隆,用 *EcoR* I 鉴定是否有片段插入。

1.2.5 细胞培养 人永生化支气管上皮细胞 BEP2D 及恶性转化的 BERP35T-2 细胞,均用 LHC-8 无血清培养液,在 37 °C 体积分数 5% CO₂ 条件下培养。

1.2.6 细胞分组与转染 转染前 1 d,消化 BERP35T-2 细胞,计数,以 $1.5 \times 10^6/\text{孔}^{-1}$ 接种 6 孔板,共接种 2 板,在 37 °C 体积分数 5% CO₂ 条件下培养。细胞分 5 组:第 1 组转染 *Smad 7* 表达质粒和 701 siRNA;第 2 组转染 *Smad 7* 表达质粒和 542

siRNA;第 3 组转染 *Smad 7* 表达质粒;第 4 组转染 701 siRNA;第 5 组转染 542 siRNA。表达质粒和 siRNA 均由 Lipofectin-2000 包裹后导入细胞。添加表达质粒和 siRNA 后,每孔终浓度分别为 *Smad 7* 表达质粒 2 μg/mL;542 siRNA 0.147 μg/mL;701 siRNA 0.137 μg/mL。转染 2 d 后终止培养。

1.2.7 Northern blot 杂交 分别收获各组细胞,用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,取 13 μg 总 RNA,体积分数 1% 甲醛变性胶电泳后转膜,与 α³²P-dCTP 标记的 *Smad 7* 探针杂交,X 光胶片于 -70 °C 放射自显影 23 d,经显影、定影后分析杂交信号,并以同一张膜上看家基因 GAPDH 或 β-actin 探针的杂交信号为对照。

2 结果与分析

2.1 用体外转录的方法制备 siRNA

根据 siRNA 寡核苷酸的正义和反义模板序列,成功地用体外转录的方法制备了 542 siRNA 和 701 siRNA,长度均为 21 bp。其质量浓度分别为:542 siRNA 491 ng/μL;701 siRNA 457 ng/μL (图 1)。

2.2 B4-*Smad 7* 真核表达载体的构建

EcoR I 酶切克隆载体后,回收的含 *Smad 7* 基因的片段同 pCI. neo 真核表达载体相应的酶切片段连接,克隆后 *EcoR* I 酶切鉴定质量分数 1% 琼脂糖凝胶电泳结果见图 2。图 2 显示,1 号和 4 号克隆为插入阳性克隆,表明已成功构建并克隆了 B4-*Smad 7* 真核表达载体。

2.3 靶基因 *Smad 7* mRNA 的 Northern blot 分析

由图 3 可知,在无外源性因素影响的情况下,与永生化人支气管上皮细胞 BEP2D 相比,恶性化的 BERP35T-2 细胞中内源性 *Smad 7* mRNA 呈高表达,转录本长度约为 4.3 kb。由图 4 可知,在无 siRNA 干扰的情况下,BERP35T-2 细胞中内源性 *Smad 7* mRNA 呈高表达;同时外源性 *Smad 7* 基因(转染的 *Smad 7* 基因) mRNA 也呈高表达,转录本长度约为 1.3 kb。加入 siRNA 后,所有内源性 *Smad 7* mRNA 几乎完全被降解,外源性 *Smad 7* mRNA 的表达也受到了很大程度的抑制。542 siRNA 与 701 siRNA 对靶 mRNA 的降解作用没有明显差别。细胞内 GAPDH 或 β-actin 表达处于高水平,且相对稳定。

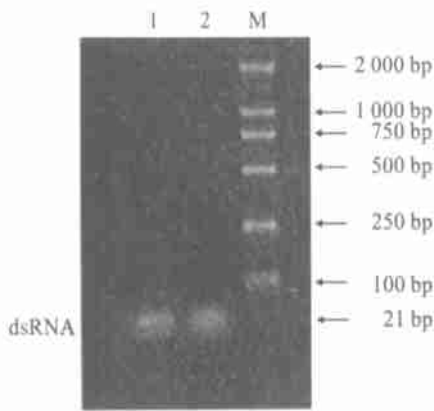


图 1 体外合成的 dsRNA 质量分数 2 %琼脂糖凝胶电泳图
1. 701 dsRNA ;2. 542 dsRNA ;M. DL2000 Marker
Fig. 1 2 percent agarose gel electrophoresis pattern of dsRNA synthesized *in vitro*
1. 701 dsRNA ;2. 542 dsRNA ;M. DL2000 Marker

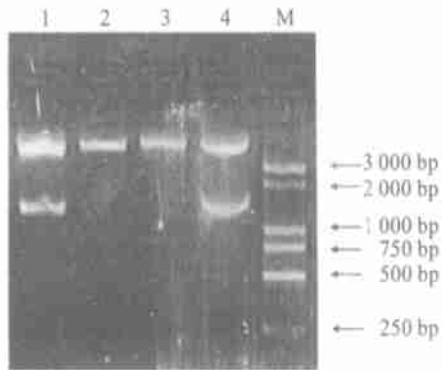


图 2 克隆 B4- *Smad 7* 表达载体的 *EcoR* I 酶切鉴定质量分数 1 %琼脂糖凝胶电泳图
1 ,4. 阳性克隆 ;2 ,3. 阴性克隆 ;M. BD2000 Marker
Fig. 2 1 percent agarose gel electrophoresis pattern of cloned B4- *Smad 7* expression vector which is cleaved by *EcoR* I
1 ,4. Positive clone ;2 ,3. Negative clone ;M. BD2000 Marker

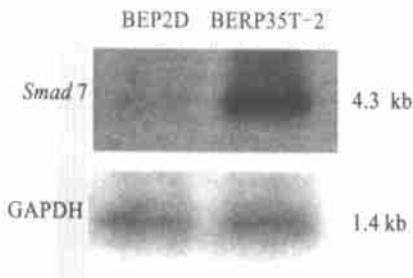


图 3 无外源性因素影响时 BEP2D 及 BERP35T-2 细胞 *Smad 7* mRNA 表达丰度的 Northern blot 分析
Fig. 3 Northern blot analysis of *Smad 7* mRNA expression abundance in BEP2D and BERP35T-2 cells without the influence of exogenous factor

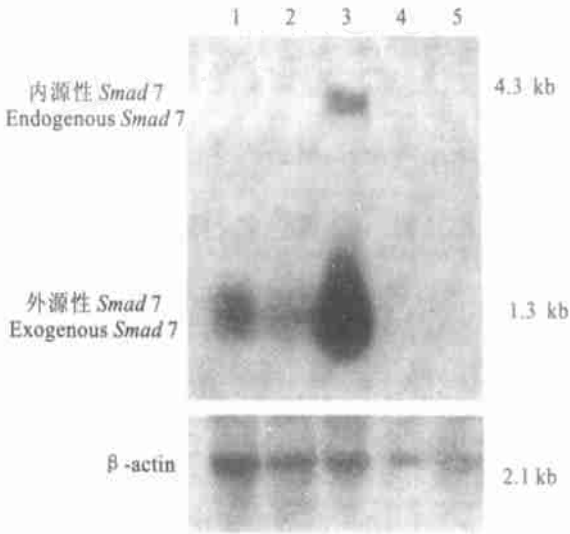


图 4 瞬时转染 BERP35T-2 细胞后 *Smad 7* mRNA 表达丰度的 Northern blot 分析
1. 转染 *Smad 7* 表达质粒和 701 siRNA ;2. 转染 *Smad 7* 表达质粒和 542 siRNA ;3. 转染 *Smad 7* 表达质粒 ;4. 转染 701 siRNA ;5. 转染 542 siRNA

Fig. 4 Northern blot analysis of *Smad 7* mRNA expression abundance in BERP35T-2 cells after transient transfection

1. Transfection of *Smad 7* expression plasmid and 701 siRNA ;2. Transfection of *Smad 7* expression plasmid and 542 siRNA ;3. Transfection of *Smad 7* expression plasmid ;4. Transfection of 701 siRNA ;5. Transfection of 542 siRNA

3 讨 论

早在 1990 年,在牵牛花的研究^[4,5]中就发现了基因的“共抑制”现象,但直至 1998 年,“RNA 干扰”这一术语才正式提出^[48]。在随后的短短几年中,

RNA 干扰现象广泛地发现于真菌、拟南芥、水螅、涡虫、锥虫、斑马鱼等大多数真核生物中,此后对 RNAi 的研究步入了快速发展阶段。

本研究参考 Elbashir 等^[3]提供的方案,进行了 siRNA 寡核苷酸模板的设计。Elbashir 经过大量试

验^[3]后认为, siRNA 的设计并非无规律可寻, 最有效的 siRNA 是具有 3' 突出的 UU 二聚体的 21nt dsRNA, 至于其中的机制目前尚不清楚。此外, GC 含量不能太高也是较为重要的环节, 因为高 GC 含量会影响 dsRNA 在细胞内的解链, 从而影响对靶 mRNA 的降解效果。本研究首次用体外转录的方法, 成功地制备了分别以 *Smad 7* 基因编码区 542-563 bp 及 701722 bp 两段不同序列为靶序列的 siRNAs, 即 542 siRNA 和 701 siRNA, 其长度均为 21 bp。用 *EcoR* I 酶切插入有 *Smad 7* 基因的 PGEM-Teasy 载体及 pCI. neo 真核表达载体, 将含 *Smad 7* 基因的片段同 pCI. neo 真核表达载体片段连接, 转化大肠杆菌后挑选阳性克隆, *EcoR* I 酶切鉴定结果表明, 本试验成功地构建了 B4-*Smad 7* 真核表达载体。Northern blot 杂交结果表明, 在无外源性因素影响的情况下, 恶性化 BERP35 T-2 细胞中内源性 *Smad 7* mRNA 的表达水平较高。在无 siRNA 干扰的情况下, BERP35 T-2 细胞中内源性 & 外源性 *Smad 7* mRNA 均呈高表达; 但在加入 siRNA 后, 内源性 *Smad 7* mRNA 几乎完全被降解, 外源性 *Smad 7* mRNA 的表达也在很大程度上受到抑制。542 siRNA 与 701 siRNA 对靶 mRNA 的降解作用没有明显差别。由此可以得出以下结论: *Smad 7* 基因编码区中 542563 bp 及 701722 bp 两段序列, 分别为所制备的 542 siRNA 和 701 siRNA 作用的有效靶序列。利用 542 siRNA 和 701 siRNA 均可有效阻断恶性化 BERP35 T-2 细胞中 *Smad 7* 基因的表达。同时, 本试验结果也再次证明, Elbashir 等^[3]所提出的 siRNA 寡核苷酸模板设计原则的正确性。

肿瘤发生是多种因素协同作用的结果。转化生

长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 最初是作为一个可诱导正常大鼠肾成纤维细胞锚着独立生长的细胞因子而被分离出来的, 随后研究^[9]发现, 其可作为多种细胞的一个潜在生长抑制因子, 如上皮细胞、血管内皮细胞、造血干细胞、T 和 B 淋巴细胞等。TGF- β 信号转导的基本过程是: 配体同受体结合后, 可使跨膜的 I 型和 II 型丝氨酸、苏氨酸激酶受体 (T β R- I, T β R- II) 形成异源复合物, 并启动 TGF- β 信号。活化的 T β R- I 磷酸化下游 Smads (*Smad 2* 和 *Smad 3*) 分子, 使 *Smad 2* 和 *Smad 3* 活化并同 *Smad 4* 形成异源复合物, 转位到核, 调节靶基因的转录应答, 从而抑制细胞生长, 并诱导其凋亡^[10]。*Smad 7* 是 TGF- β 信号转导通路的抑制元件, 可以抑制 TGF- β 信号在胞浆内的传导^[11]。*Smad 7* 可同活化的 TGF- β 受体复合物特异并稳定地结合, 阻断受体对 *Smad 2* 和 *Smad 3* 的磷酸化, 从而抑制 TGF- β 诱导的靶基因的转录活化。TGF- β 信号转导通路的紊乱可使细胞逃避 TGF- β 介导的生长抑制效应, 从而导致多种肿瘤的发生。*Smad 7* 基因作为 TGF- β 作用的靶基因之一, 可反馈调节 TGF- β 信号转导通路, 维持该通路的平衡。*Smad 7* 表达的紊乱, 可影响细胞对 TGF- β 的应答, 从而促进细胞的恶性化进展。

本试验结果有助于进一步研究 *Smad 7* 基因在肺癌发生发展中的作用机制。本研究利用 RNAi 技术有效地抑制了 *Smad 7* 基因在 BERP35 T-2 细胞中的表达, 在 *Smad 7* 的表达水平降低甚至表达被阻断的情况下, BERP35 T-2 细胞的生长增殖速度是否减慢、恶性化程度是否有所降低等, 还有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 霍艳英, 张开泰, 李邦印, 等. 在 BEP2D 细胞恶性转化过程中 TGF- β 1 对 *Smad 7* 表达的调节[J]. 癌症, 2002, 21(2): 117 - 121.
- [2] 葛世丽, 楼铁柱, 吴德昌, 等. α 粒子照射诱发 BEP2D 细胞恶性转化模型的建立[J]. 癌症, 2001, 20(9): 901 - 905.
- [3] Elbashir S M, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs[J]. Genes Dev, 2001, 15(2): 188 - 200.
- [4] Jorgensen R A, Cluster P D, English J. Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences[J]. Plant Mol Biol, 1996, 31(5): 957 - 973.
- [5] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans[J]. Plant Cell, 1990, 2(4): 279 - 289.
- [6] Cogoni C, Macino G. Post-transcriptional gene silencing across kingdoms[J]. Curr Opin Genet Dev, 2000, 10(6): 638 - 643.
- [7] Hammond S M, Caudy A A, Hannon G J. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA[J]. Nature Rev Gen, 2001, 2(2): 110 - 119.
- [8] Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 1998, 391(6669): 806 - 811.

- [9] Miyazono K. TGF- β /SMAD signaling and its involvement in tumor progression[J]. Biol Pharm Bull, 2000, 23(10): 1125 - 1130.
- [10] Heldin C H, Miyazono K, Dijke P. TGF- β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins[J]. Nature, 1997, 390(6659): 465 - 471.
- [11] Nakao A, Afrakhte M, Moren A, et al. Identification of *Smad 7*, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signaling[J]. Nature, 1997, 389(6651): 631 - 635.

Study of RNA interference based on the target sequencing of *Smad 7* gene

WANG Ju-ping¹, WANG Ying², HUO Yan-ying³, GUO Ai-guang¹, XU Qin-zhi³, ZHANG Kai-tai³

(1 College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Basic Medicine, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China;

3 Department of Molecular Toxicology, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

Abstract : This research intended to investigate the suppression of siRNA to the expression of the mRNA of target gene *Smad 7*. The siRNAs of *Smad 7* gene were prepared by *in vitro* transcription. BERP35 T-2 lung cancer cell line was transiently transfected with siRNAs and *Smad 7* expression plasmid using Lipofectamine 2000 reagent. The expression abundance of target gene mRNA was tested with Northern blot hybridization. According to the coding sequence of *Smad 7* gene, we successfully synthesized the siRNAs for two different target sequences *in vitro*. The result of Northern blot hybridization showed that the expression abundance of both endogenous and exogenous *Smad 7* mRNA decreased evidently in BERP35 T-2 cells transfected with siRNAs. Both regions of 542 - 563 bp and 701 - 722 bp in the coding region of *Smad 7* gene are effective target sequences which can be acted by siRNA. The siRNAs designed and synthesized in our research can suppress the expression of *Smad 7* gene effectively.

Key words : small interfering RNA; *Smad 7* gene; *in vitro* transcription; transient transfection; target sequences