

## · 基础研究 ·

NF- $\kappa$ B 基因 RNA 干扰质粒的构建与鉴定\*方淑环<sup>1</sup>, 龚青<sup>2</sup> $\Delta$ 

(1. 广州中医药大学临床药理研究所 DME 中心 510024; 2. 广州医学院基础学院生化教研室 510182)

**摘要:**目的 构建转录因子 NF- $\kappa$ B 的 RNA 干扰(RNAi)质粒,为研究 NF- $\kappa$ B 参与的细胞信号通路及其为靶点的基因治疗提供稳定转染的 RNAi 质粒。方法 设计针对 NF- $\kappa$ B 的 shRNA 特异性序列,应用基因重组技术克隆到 pSilencer 1.0-U6 表达载体,EcoR I 和 Apa I 双酶切及 DNA 测序鉴定重组克隆;脂质体转染 RNAi 重组载体至前列腺癌细胞 PC-3 后,Western blot 分析各组 NF- $\kappa$ B 蛋白表达水平。结果 双酶切和 DNA 测序证实 shRNA 正确插入 pSilencer 1.0-U6 质粒;Western blot 结果显示与空质粒对照组比较 NF- $\kappa$ B 转染组细胞 NF- $\kappa$ B 表达明显下调。结论 成功构建人 NF- $\kappa$ B 基因 RNAi 质粒,为研究 NF- $\kappa$ B 参与的细胞信号通路提供了稳定转染细胞的干扰质粒,为靶向 NF- $\kappa$ B 的基因治疗提供了有力工具。

**关键词:**核因子- $\kappa$ B;RNA 干扰;质粒

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.33.017

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)33-3504-02

Construction and identification of RNA interference vector targeting NF- $\kappa$ B gene\*Fang Shuhuan<sup>1</sup>, Gong Qing<sup>2</sup> $\Delta$ 

(1. DME Center, Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510024, China; 2. Biochemistry Department, Basic School, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510182, China)

**Abstract: Objective** To construct RNA interference plasmid targeting NF- $\kappa$ B, it provided stable RNA interference plasmid for NF- $\kappa$ B study involved in cell signaling pathway and NF- $\kappa$ B-targeting gene therapy. **Methods** NF- $\kappa$ B-targeting shRNA sequences were designed and cloned into the expression vector pSilencer 1.0-U6. The recombinants were identified by using EcoR I + Apa I double digestion and DNA sequencing, then transfected into prostate cancer cells PC-3 with Lipofectamine 2000. NF- $\kappa$ B protein expressions were detected by Western blot. **Results** shRNA was inserted into plasmid pSilencer 1.0-U6 correctly confirmed by double digestion and DNA sequencing. NF- $\kappa$ B expression was decreased in NF- $\kappa$ B transfected group compared to control group by the results of Western blot. **Conclusion** RNA interference plasmid targeting NF- $\kappa$ B is successfully constructed, it provides stable RNA interference plasmid for the research of NF- $\kappa$ B participating in cell signaling pathway, and offers favorable tool for NF- $\kappa$ B-targeting gene therapy.

**Key words:** NF-kappa B; RNA interference; plasmids

核因子- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B) 是近年来发现的转录调控因子,其最常见的形式是由 p50 和 p65 组成的同源二聚体,在绝大多数静止期细胞中以非活性形式存在于 NF- $\kappa$ B 细胞质中。NF- $\kappa$ B 信号通路的激活在许多人类肿瘤,如肝癌、肠癌、宫颈癌等的发生、发展中起重要作用<sup>[1-3]</sup>。RNA 干扰(RNAi)是双链 RNA 介导的特异性基因沉默现象,是目前研究基因功能强有力的工具之一<sup>[4]</sup>。自从 RNAi 现象被发现以来,作为自然界生物中广泛存在的一种保守的自我保护现象, RNAi 不仅在基因治疗研究中应用日渐广泛,也成为重要的分子研究工具。本研究以双链小干扰 RNA (siRNA) 介导 NF- $\kappa$ B 表达沉默,采用脂质体转染,观察 siRNA 导入后对人前列腺癌细胞株 PC-3 内的 NF- $\kappa$ Bp65 表达的抑制作用,为研究 NF- $\kappa$ B 参与的细胞信号通路及以 NF- $\kappa$ B 为靶点的基因治疗提供稳定的转染细胞干扰质粒。

**1 材料与方**

**1.1 材料** 载体质粒为 pSilencer 1.0-U6; PC-3 细胞株购自美国 ATCC; 大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  为本实验室保存; 限制性内切酶 EcoR I 和 Apa I, T4DNA 连接酶购自美国 Invitrogen 公

司; DNA 胶回收试剂盒购自美国 Qiagen 公司; DNA Maker 购自广州东盛生物科技有限公司; 1640、脂质体 Lipofectamine 2000、Gibco 胎牛血清购自美国 Invitrogen 公司; 质粒抽提试剂盒为 NucleoBond Xtra MiDi EF (美国)。

**1.2 方法**

**1.2.1 RNAi 质粒的设计、构建和鉴定** 按照 siRNA 靶序列设计原则,设计针对 NF- $\kappa$ B 的 shRNA 互补序列,插入 pSilencer 1.0-U6, pSilencer 1.0-U6 Vector 含有 mouseU6 promoter, 进入哺乳细胞后能转录产生发夹状的 siRNA, 有特定的转录起始位点(U6 启动子决定)和特定转录终止位点(转录模板链为下链,转录终止位点在 antisense strand 后“TT $\downarrow$ TTTT”中),转录产物为茎环结构;3'端有 UU 突出。Dicer 酶水解产生 siRNA(反义链)。

**1.2.1.1 RNAi 序列的设计** 确定靶基因的 CDS, 进入广州锐博 siRNA 在线设计软件: <http://www.sirna.cn> 设计 RNAi 序列,根据上述软件得到多个软件认为可行的 19 bp 的序列,要根据下列条件进行进一步筛选:(1)GC 含量 36%~52%; (2)sense 链的第 3 碱基为 A; (3)sense 链的第 6 碱基为 A; (4)

\* 基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(311101003);广东省医学科学技术研究基金资助项目(B2011134);广州医学院博士基金资助项目(2010C01)。  $\Delta$  通讯作者, Tel: 13570372052; E-mail: gongqing1983@163.com。

sense 链的第 10 碱基为 U；(5)sense 链的第 13 碱基不是 G；(6)sense 链的第 18、19 碱基不是 G/C；(7)不含有反向重复序列；(8)不能形成环；(9)sense 链的 5'端第 1 个碱基为 G/C。

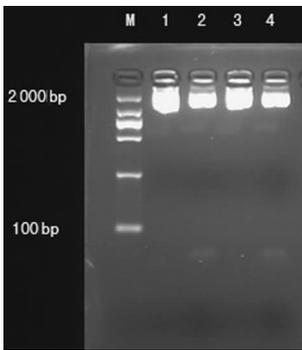
此外,sense 链的 15~19 碱基中至少含有 3 个 A/U。上述条件中可以有 2 个以内不相符。找出符合条件的序列后,用 T 置换其中的 U(本设计中是以 U6 为载体构建,先构建重组 DNA)。一般选择 2 条,结合载体的结构特征,形成需要合成的序列 (ApaI + Sense 19nt + Loop (TTCAAGAGA) + Anti-sense 19nt+TTTTT + EcoRI)交由公司合成,本研究构建了 NF-κB 干扰序列如下。NF-κB RNAi A : (+) 5'-CGC TGC AGT TTG ATG ATG AAT TCA AGA GAT TCA TCA TCA AAC TGC AGC TTT TTT G-3'; (-) 5'-AAT TCA AAA AAG CTG CAG TTT GAT GAT GAA TCT CTT GAA TTC ATC ATC AAA CTG CAG CGG GCC-3'; NF-κB RNAi B: (+) 5'-CCT TCC AAG TTC CTA TAG AAT TCA AGA GAT TCT ATA GGA ACT TGG AAG TTT TTT G-3'; (-) 5'-AAT TCA AAA AAC TTC CAA GTT CCT ATA GAA TCT CTT GAA TTC TAT AGG AAC TTG GAA GGG GCC-3'。

**1.2.1.2 RNAi 质粒的构建及提取** 利用分子克隆的方法将目的序列接入 pSilencer 1.0-U6 载体,获得 siRNA 重组质粒 U6- NF-κB-shRNA,转化感受态细胞获得重组菌,挑选阳性克隆,培养并制备质粒,用 EcoRI和 ApaI双酶切鉴定。酶切鉴定正确的克隆送测序。成功构建的重组菌大规模扩增后用去内毒素的质粒 DNA 制备试剂盒按说明书步骤提取质粒,-80 °C 保存。

**1.2.2 RNAi 质粒转染细胞** 分为 4 组:无干扰组、空质粒对照组、NF-κB 干扰质粒 A 组和 NF-κB 干扰质粒 B 组。采用脂质体转染细胞,质粒 DNA(μg)与脂质体 Lipofectamine 2 000 (μL)的比例为 1.0 : 2.5。转染细胞 6 h 后,吸出无血清培养液,换成含 10% FBS 的培养液过夜,复性 48 h 后收细胞进行 Western blot 检测。

**2 结 果**

**2.1 U6-NF-κB-shRNA 重组体的酶切鉴定和测序结果** 挑取阳性克隆进行扩增抽提质粒,使用限制性内切酶 EcoR I / Apa I 双酶切过夜,琼脂糖电泳,酶切结果表明序列插入正确(图 1);DNA 测序结果证实插入序列正确。

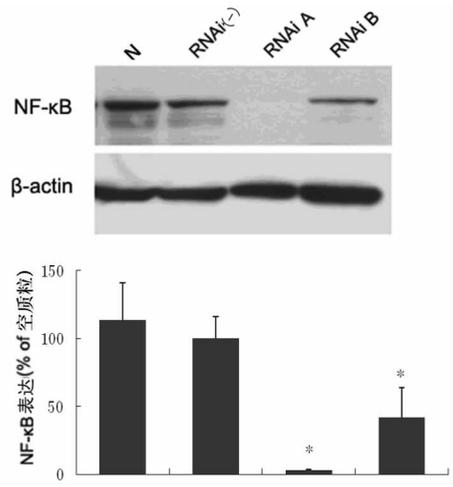


M:DNA marker;1:NF-κB 干扰质粒 A;2:NF-κB 干扰质粒 A 双酶切后;3:NF-κB 干扰质粒 B;4:NF-κB 干扰质粒 B 双酶切后。

**图 1 U6-NF-κB-shRNA 的酶切鉴定**

**2.2 RNAi 效果鉴定** NF-κB 基因 RNAi 重组质粒转染前列腺癌细胞 PC-3;收集细胞裂解液,Western blot 分析无干扰组与 NF-κB 干扰质粒 A、B 组 NF-κB 蛋白的表达水平,结果显示与空质粒对照组比较,细胞 NF-κB 表达下调,其中干扰质粒 A

效果明显,见图 2。



N:无干扰;RNAi(-):空质粒对照;RNAi A:NF-κB 干扰质粒 A;RNAi B:NF-κB 干扰质粒 B;#: P<0.05,与 RNAi(-)比较。

**图 2 NF-κB 的 RNAi 效果图**

**3 讨 论**

NF-κB 通常和抑制蛋白 IκB 组成无活性的 NF-κB/ IκB 三聚体形式,在一些因素刺激下 IκB 发生磷酸化后降解,NF-κB 被激活,其活化物 NF-κBp65 可调控一系列基因的表达<sup>[5-6]</sup>。NF-κB 参与了多种疾病不同阶段的细胞因子、生长因子、细胞黏附因子的基因调控<sup>[7]</sup>,近年来发现 NF-κB 与肿瘤的发生关系密切<sup>[8]</sup>。在多种人类肿瘤中 NF-κB 出现基因扩增和转位,使其转录活性增加,促进肿瘤的发生,NF-κB 促进肿瘤的恶性化是多方面的,其调控的靶基因参与肿瘤的浸润、转移、血管生成和肿瘤的抗凋亡<sup>[9-10]</sup>。目前已经证实在不同种类的恶性肿瘤中,均存在 NF-κB 的持续激活,NF-κB 的持续活化可作为多种实体肿瘤的标志。

RNAi 技术因其特异性和高效性,近年来已成为研究基因功能的重要工具。RNAi 是通过将 19nt-23nt 的 siRNA 导入细胞,降解与其同源的 mRNA,特异、高效的阻断目的基因表达<sup>[4]</sup>。质粒载体可在细胞内持续产生 siRNA 抑制靶基因的表达,适于长期实验研究<sup>[4,11-12]</sup>。本实验使用的为质粒载体 pSilencer 1.0-U6,该质粒以 U6 作为启动子,其优点在于转录起始点、终止点明确。此外,该载体中含有氨苄耐药基因,利于筛选阳性重组质粒和阳性克隆。

本研究将针对人 NF-κBp65 设计构建的 RNAi 转染人前列腺癌细胞株 PC-3 中,通过 Western blot 法检测 siRNA 的干扰效率,结果显示目标细胞中 NF-κBp65 的表达受到明显抑制 (P<0.05),表明所设计的 siRNA 起到了明显沉默目的基因表达的作用。成功构建人 NF-κB 基因 RNAi 质粒,为研究 NF-κB 参与的细胞信号通路提供了稳定转染细胞的干扰质粒,同时为以 NF-κB 为靶向的基因治疗提供了有利工具,为进一步应用 RNAi 技术探明 NF-κB 在肿瘤增殖中的作用打下基础。

**参考文献:**

[1] Wang JH, Huang QK, Chen MX. The role of NF-κB in hepatocellular carcinoma cell[J]. Chin Med J, 2003, 116 (5): 747-752.  
 [2] Yu HG, Yu LL, Yang Y, et al. Increased expression of RelA / nuclear factor-kappa B protein (下转第 3508 页)

条凋亡信号途径的共同通道,凋亡通路一旦激活则引起 caspase-3 级联反应并使其活化引起细胞凋亡。Crnkovic-Mertens 等<sup>[8]</sup>应用 siRNA 抑制 HeLa 细胞中 livin 基因的表达,激活 caspase-3,促进 HeLa 细胞凋亡,同样增加了 HeLa 细胞对化疗药物(如:阿霉素)及紫外线照射的敏感性,并发现该效应只作用于 livin 基因表达阳性的 HeLa 细胞,对无 livin 基因表达的 H1299 细胞不起作用。Wang 等<sup>[9]</sup>沉默恶性黑色素瘤 LiBr 细胞中 livin 基因表达,发现 procaspase 表达增加, caspase-3 活化,诱导凋亡的发生。因此,可以认为胶质瘤中高表达的 livin $\beta$  通过下调凋亡效应蛋白酶 caspase-3 表达,而达到抑制凋亡的作用。但也有学者发现 livin 通过非 caspase 途径抑制细胞凋亡,主要是通过激活核因子- $\kappa$ B 及丝裂原激活蛋白激酶之一的 c-Jun 氨基末端激酶 1(c-jun-NH2-kinase 1, JNK1)来抑制细胞凋亡<sup>[10]</sup>。因此, livin 抑制凋亡的机制与其他 IAPs 既有相同点也有不同点, livin 可能通过多种途径来抑制细胞凋亡。

本研究初步证实了采用 RNAi 技术靶向胶质瘤细胞中 livin $\beta$ ,可解除对凋亡效应蛋白酶 caspase-3 的抑制作用,激活细胞凋亡蛋白酶级联反应,可诱导细胞凋亡、引起细胞周期阻滞和抑制细胞增殖。阻断胶质瘤细胞中 livin $\beta$  基因表达,可解除对凋亡效应蛋白酶 caspase-3 的抑制作用,激活细胞凋亡蛋白酶级联反应,凋亡增加,细胞增殖减少。进一步表明 livin $\beta$  有拮抗凋亡的作用,在胶质瘤的发生、发展中起着重要作用。

#### 参考文献:

- [1] Ashhab Y, Alian A, Polliack A, et al. Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern [J]. FEBS Lett, 2007, 495(1/2): 56-60.
- [2] Lin JH, Deng G, Huang Q, et al. KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 279(3): 820-831.
- [3] Gazzaniga P, Gradilone A, Giuliani L, et al. Expression

and prognostic significance of livin, sueivin and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer [J]. Ann Oncol, 2003, 14(1): 85-90.

- [4] Crnkovic-Mertens I, Semzow J, Hoppe-Seyler F, et al. Isoform-specific silencing of the Livin gene by RNA interference defines Livin beta as key mediator of apoptosis inhibition in HeLa cells [J]. J Mol Med, 2006, 84(3): 232-240.
- [5] 向心, 黄正松, 石忠松, 等. 脑星形细胞瘤 Livin 基因表达与细胞增殖的关系 [J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(9): 1141.
- [6] Kim DK, Alvarado CS, Abramowsky CR, et al. Expression of inhibitor-of-apoptosis protein(IAP) livin by neuroblastoma cells: correlation with prognostic factors and outcome [J]. Pediatr Dev Pathol, 2005, 8(6): 621-629.
- [7] Pietenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling; Cell cycle arrest versus apoptosis [J]. Toxicology, 2002, 27(181/182): 475-481.
- [8] Crnkovic-Mertens I, Hoppe-Seyler F, Butz K. Induction of apoptosis in tumor cells by siRNA-mediated silencing of the livin/ML-IAP/KIAP gene [J]. Oncogene, 2003, 22(51): 8330-8336.
- [9] Wang H, Tan SS, Wang XY, et al. Silencing livin gene by siRNA leads to apoptosis induction, cell cycle arrest, and proliferation inhibition in malignant melanoma LiBr cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28(12): 1968-7194.
- [10] Sanna MG, da Silva Correia J, Ducrey O, et al. IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: The TAK1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(6): 1754-1766.

(收稿日期: 2012-03-29 修回日期: 2012-06-25)

(上接第 3505 页)

- correlates with colon-rectal tumorigenesis [J]. Oncology, 2003, 65(1): 37-45.
- [3] Nair A, Venkat raman M, Maliekal TT, et al. NF- $\kappa$ B is constitutively activated in high grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix [J]. Oncogene, 2003, 22(1): 50-58.
  - [4] Hannon GJ. RNA interference [J]. Nature, 2002, 418(6894): 244-251.
  - [5] Perkins ND. The diverse and complex roles of NF- $\kappa$ B subunits in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(2): 121-132.
  - [6] Ghosh G, Wang VY, Huang DB, et al. NF- $\kappa$ B regulation: lessons from structures [J]. Immunol Rev, 2012, 246(1): 36-58.
  - [7] Egan LJ, Toruner M. NF- $\kappa$ B signaling pros and cons of altering NF- $\kappa$ B as a therapeutic approach [J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1072: 114-122.

- [8] Tang X, Liu D, Shishodia S, et al. Nuclear factor-kappaB (NF- $\kappa$ B) is frequently expressed in lung cancer and preneoplastic lesions [J]. Cancer, 2006, 107(11): 2637-2646.
- [9] Arkan MC, Greten FR. IKK- and NF- $\kappa$ B-mediated functions in carcinogenesis [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2011, 349: 159-169.
- [10] Carbone C, Melisi D. NF- $\kappa$ B as a target for pancreatic cancer therapy [J]. Expert Opin Ther Targets, 2012, 16 Suppl 2: S1-10.
- [11] Kole R, Krainer AR, Altman S. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides [J]. Nat Rev Drug Discov, 2012, 11(2): 125-140.
- [12] Wang Z, Rao DD, Senzer N, et al. RNA interference and cancer therapy [J]. Pharm Res, 2011, 28(12): 2983-2995.

(收稿日期: 2012-03-08 修回日期: 2012-09-27)