

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白重组 RNAi 慢病毒载体的构建*

郑富霞¹, 苗丽君^{2△}, 朱 涵³, 张善丰⁴

(1. 河南省中医院肺病科, 郑州 450000; 2. 郑州大学第一附属医院呼吸与危重症医学科/河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室, 郑州 450000; 3 郑州大学基础医学院生理学教研室, 郑州 450000; 4. 郑州大学基础医学院分子生物学教研室, 郑州 450000)

摘要:目的 构建哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)重组 RNA 干扰(RNAi)慢病毒表达载体。方法 按照 RNAi 设计规则, 针对 mTOR 基因设计 4 个干扰靶点和阴性对照序列(FAM), 先用人工合成寡核苷酸片段, 通过 PCR 拼接的方法, 即可获得小干扰 RNA(siRNA)有效片段, 采用 Lipofectamine 2000 转染试剂, 对肺腺癌 A549 细胞进行转染, 1 d 后, 通过高倍荧光显微镜观察增强型绿色荧光蛋白在肺腺癌 A549 细胞中的表达情况。采用半定量 RT-PCR 方法, 检测 mTOR 基因在 1 d 后 mRNA 水平的表达, 采用 Western blot 检测 2 d 后蛋白表达水平, 从而筛选出最高效的干扰靶点序列, 将其合成双链 DNA, 通过 pGCL-GFP 载体, 与 pHelper 1.0 和 pHelper 2.0 质粒共同组成载体系统, 进一步转染 293T 细胞, 最终包装后产生慢病毒, 通过 Western blot 方法检测 GFP 蛋白表达水平来检测 293T 细胞中的病毒滴度, 并进行活性鉴定。结果 mTOR 基因的高效 siRNA 干扰靶点被成功筛选出; mTOR siRNA 感染体外培养的人肺腺癌 A549 细胞后, 不管是从 mRNA 水平, 还是蛋白水平, 该基因都明显沉默; 该基因 mTOR siRNA 的慢病毒载体被成功构建, 同时收获病毒上清, 并检测出病毒滴度为 1×10^8 UT/mL。结论 mTOR siRNA 感染体外培养的人肺腺癌 A549 细胞, 能够导致 mTOR 基因明显沉默; 该基因 mTOR siRNA 的慢病毒载体被成功构建。

关键词: 肺肿瘤; 雷帕霉素靶蛋白; RNA 干扰; 慢病毒

中图分类号: R-332

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)21-2762-05

Build of lentiviral mediated RNA interference of mammalian target of rapamycin*Zheng Fuxia¹, Miao Lijun^{2△}, Zhu Han³, Zhang Shanfeng⁴

(1. Department of Pulmonary Disease, Traditional Chinese Medicine of Henan Province, Zhengzhou, Henan 450000, China;

2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, The first Affiliated Hospital of Zhengzhou University/Institute of Clinical Medicine Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450000, China;

3. School of Medicine Department of Physiology, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450000, China;

4. School of Medicine Department of Molecular Biology, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450000, China)

Abstract: Objective To build of lentiviral mediated RNA interference of mammalian target of rapamycin(mTOR), because the mammalian target of rapamycin plays a important role in tumor development and the signal path. **Methods** According to RNA interference (RNAi) design rules Completely, in view of the gene called mTOR was desiged four interference targets and Negative control (FAM) sequence, first of all, synthetic oligonucleotides nucleotide fragments with artificial, and can obtain siRNA fragments effectively by the method of PCR joining together, then undertake transfection on lung adenocarcinoma A549 cell by Lipofectamine transfection reagent 2000. To begin to observe the enhanced green fluouescent protein expression in lung adenocarcinoma A549 cells by fluorescence microscopy at high magnification after 1 days. We can use semi-quantitative RT-PCR method, and detect of mTOR gene expression of mRNA level after 1 days, meanwhile, testing the expression of protein levels by Western Blot after 2 days, in order to select the most efficient interference target sequence, afterwards, synthetic double-stranded DNA, and it can be make up vector system with plasmid pHelper 1.0 and pHelper 2.0 by the pGCL-GFP carrier, further transfect 293 T cells, at last produce lentiviral after packaging, then detection GFP protein expression levels by Western-Blot method, and consequently detect the virus drops degree of 293T cells, at the same time, identify the activity. **Results** The high efficiently target of mTOR gene has been successfully selected; mTOR siRNA infecte of human lung adenocarcinoma A549 cells in vitro culture, and the gene is obviously silence no matter from the mRNA level or protein level; 3 mTOR gene lentivirus siRNA carrier was successfully build, getting virus supernatant also, and virus drops to 1×10^8 UT/mL. **Conclusion** MTOR siRNA infected of human lung adenocarcinoma A549 cells in vitro culture, and could lead to mTOR gene obviously silence; The construction was successfully gene mTOR siRNA lentivirus vectors.

Key words: lung neoplasms; mTOR; RNA interference; lentiviral mediated肺癌是世界上病死率最高的肿瘤^[1], 其大多患者早期较难发现, 发现时已处于晚期^[2], 目前临床常应用内科保守、外科、

* 基金项目: 河南省卫生厅科技创新型人才工程项目(4088); 河南省医学科技攻关项目(200803048); 2010 郑州大学研究生科学研究项目(10Y13203)。 作者简介: 郑富霞(1974—), 主治医师, 硕士, 主要从事呼吸系统疑难疾病的基础和临床研究。 △ 通讯作者, E-mail: 695244523@qq.com。

生物细胞及中西医结合治疗,但疗效都较差。因此,探索肺癌治疗的新技术很有必要。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是一种非典型的丝氨酸/苏氨酸激酶,该基因定位于 1p36.2,相对分子质量为 289×10^3 ,编码的蛋白质含有 2 549 个氨基酸,在该基因的信号传导通路中举足轻重^[3]。

RNA 干扰(RNAi)一般是指由短双链 RNA(shRNA)或双链 RNA(dsRNA)在 mRNA 水平上关闭相应序列基因的表达,或使其沉默的一系列过程,慢病毒载体可感染绝大多数细胞,包括分裂期及非分裂期细胞,尤其适合多种细胞的 RNAi 实验。

本研究是采用 RNAi 技术应用化学合成有效片段在肺腺癌 A549 细胞中筛选出高效片段,进行重组 RNAi 慢病毒载体的构建,以求深入研究该基因在肺癌发展中的作用及机制,同时为以后肺癌的研究奠定坚实基础。

1 材料与与方法

1.1 实验材料

1.1.1 病毒载体、菌株及细胞株 慢病毒载体克隆购自上海吉码制药技术有限公司。感受态大肠埃希菌、肺腺癌 A549 细胞株均为郑州大学第一附属医院重点实验室培养。人胚肾细胞 293T 购自上海生命科学院细胞库。

1.1.2 主要试剂 RPMI-1640 培养液购自美国 HyClone 公司;RT-PCR 试剂盒购自加拿大 Fermentas 公司;鼠抗人 mTOR 多克隆抗体购自美国 Invitroge 公司;Agarose Gel DNA Fragment Recovery Kit Ver. 2.0 胶回收试剂盒购自大连宝生物工程股份有限公司(TaKaRa)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 A549 及 293T 细胞用 RPMI-1640 培养液(含 10% 胎牛血清,100 U/mL 青霉素,100 μ g/mL 链霉素),在 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 细胞培养箱中培养,2~3 d 更换培养液 1 次,观察细胞贴壁铺满培养瓶底 80%~90% 时即可进行传代。

1.2.2 siRNA 的体外合成、鉴定及筛选 从 NCBI 上 Genebank 中查询针对 mTOR 基因序列(登录号 NM-004958.3),按照 RNAi 设计原则设计 4 对干扰靶点,并设计 NC(FAM)(由上海吉码制药技术有限公司设计合成)。干扰序列 1:正向引物 5'-CCC GGA AAU UGA CAC UUA U-3',反向引物 5'-AUA AGU GUC AAU UUC CGG G-3'。干扰序列 2:正向引物 5'-GCC GCA UUG UCU CUA UCA A-3',反向引物 5'-UUG AUA GAG ACA AUG CGG C-3'。干扰序列 3:正向引物 5'-GCC GCA UUG UCU CUA UCA A-3',反向引物 5'-UUG AUA GAG ACA AUG CGG C-3'。干扰序列 4:正向引物 5'-GGC CUA UGG UCG AGA UUU A-3',反向引物 5'-UAA AUC UCG ACC AUA GGC C-3'。阴性:正向引物 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG U-3',反向引物 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA A-3'。

1.2.3 转染 细胞共分 6 组,正常对照(A549)组、阴性组、干扰 1~4 组。使用 Lipofectamine 2000 将 siRNA 转染 A549 细胞。在 6 孔板上培养,当细胞铺满 70%~90% 单层时,根据说明书操作,准备相应数量的 EP 管,均加入 200 μ L 改良型 RM-BI-1640 培养液(无双抗、无血清),再分为两组,一组均加入 100 pmol siRNA,另一组均加入 4 μ L Lipofectamine 2000 试剂,充分混匀,静置 5 min。将上述两种试剂混合,静放 20 min,再将其加到孔板中,继续培养。1 d 后,通过荧光显微镜开始对肺腺癌 A549 细胞中的荧光表达情况进行定时观察。

1.2.4 RT-PCR 转染 1 d 后收集细胞。用 RT-PCR 试剂盒分别提取 6 组细胞的总 RNA,溶于 30~50 μ L TE 缓冲液。取总 RNA 约 5.0 μ L 加入 Oligo(dT)₁₈ 1.0 μ L,补足 ddH₂O 至 12.0 μ L,65 $^{\circ}$ C 孵育,5 min,放置于冰上冷却,继续加入 5 \times 缓冲液 4.0 μ L,Ribolock™ 1.0 μ L,10 mmol/L dNTP Mix 2.0 μ L,Revert Aid 1.0 μ L,补足 ddH₂O 至 20.0 μ L,42 $^{\circ}$ C 反应 60 min,70 $^{\circ}$ C 5 min,取 1.0~2.0 μ L 用于 PCR,其余保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。25 μ L 反应体系,引物各 1.0 μ L,2 \times Master Mix 12.5 μ L,PCR 引物信息如下,mTOR:正向引物 5'-CTG GCT GGA ATG GCT GAG A-3',反向引物 5'-GCG ATG TCT TGT GAG GTG AG-3'。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 30 s;94 $^{\circ}$ C 30 s,62 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s(均为 30 个循环);72 $^{\circ}$ C 1 min。1%琼脂糖水平板电泳,凝胶自动成像系统上摄像。Quantity One 分析软件测定条带灰度值并对 PCR 电泳图片进行灰度值分析。

1.2.5 Western blot 转染 48 h 后收集细胞。收集细胞约 4×10^6 个,用 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 洗涤、离心,重复 3 次;加入 100 μ L 含苯甲基磺酰氟(PMSF)的裂解液,静置于冰上 30 min,不断摇晃,离心,慢慢的吸取上清液,将其分装到 0.5 mL 的 EP 管中,密封好将其保存在 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中。根据裂解液 RIPA:5 \times SDS=4:1 体积的比例配置好,然后在蛋白样品中加入 5 \times 十二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 水浴 10 min。制作 8% 的分离胶,凝固后再制作 4% 的浓缩胶,取 15 μ L 样本上样,设置 80~100 V,电泳 1~2 h 后,应用于转方法转膜,配置 TBST 溶液(含 5% 脱脂牛奶)作为封闭液,在室温条件下,置于摇床上,将聚偏氟乙烯膜(PVDF)封闭 1 h。将一抗(1:200),内参 GADPH(无 HRP 标记)(1:5 000)稀释后分别封闭 PVDF 膜 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;TBST 洗膜 3 次,每次 5 min;二抗(1:1 000)室温下孵育 1 h。按 1 mL/cm² 的量封闭 PVDF 膜,在摇床上室温反应 1 h;TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。显影液孵育 3 min,采用 Bio-Rad 曝光 5 s 至 10 min。应用 Quantity one 分析软件进行条带灰度值测定,同时对 Western blot 图片进行灰度值的分析。

1.3 重组慢病毒载体的构建

1.3.1 pGCL-shmTOR-GFP 载体的构建 为了构建 LV1-shRNA 模板中的 loop 环结构,首先应设计 LV1-shRNA 模板中的 loop 环。为避免形成终止信号,可将 siRNA 的正义链与反义链之间加上 TTC AAG AGA loop 环结构,在转录的终止密码子 TTT TTT C 尾部加上酶切位点,正义链模板的 5' 端加个 T,就可以与 Hpa I 酶切后形成平末端;在反义链模板的 5' 端加个 AGCT,可以与 Xho I 酶切后形成的粘端互补。这样寡核苷酸序列就可以克隆到载体上,loop 环结构即构建成功,见表 1。

将合成的 DNA Oligo 退火形成 dsDNA Oligo,退火体系 50.0 μ L:10 \times shDNA Annealing 缓冲液 5.0 μ L,正义链(100 μ mol/L)5.0 μ L,反义链(100 μ mol/L)5.0 μ L,ddH₂O 35 μ L;按照以下程序在 PCR 仪上进行退火处理:95 $^{\circ}$ C 5 min,85 $^{\circ}$ C 5 min,75 $^{\circ}$ C 5 min,70 $^{\circ}$ C 5 min,在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。退火处理后将得到 shRNA 模板,其浓度为 10 μ mol/L,将其稀释 50 倍,终浓度就是 200 nmol/L,可用来进行连接反应。将其与经 Hpa I 和 Xho I 双酶切后的 pGC-GFP 载体相互连接。在 16 $^{\circ}$ C 条件下连接过夜,将干扰序列插入 pGCL-GFP 质粒之后,来转化感受态细胞。挑取重组阳性克隆同时用双酶切鉴定及 PCR 方法进行鉴定,鉴定阳性克隆测序结果见,PCR 反应体系

表 1 mTOR 基因 shRNA oligo RNA 化学合成片段信息

| 名称 | 5' | 正义链 | 发夹结构 | 反义链 | 3' |
|----------------|----------------|---------------------------|-------------|---------------------------|-----------|
| mTOR(6 335 正向) | T | GGC CTA TGG TCG AGA TTT A | TTC AAG AGA | UAA AUC UCG ACC AUA GGC C | TTT TTT C |
| mTOR(反向) | TCG AGA AAA AA | GGC CTA TGG TCG AGA TTT A | TCT CTT GAA | UAA AUC UCG ACC AUA GGC C | A |
| 阴性(正向) | T | TTC TCC GAA CGT GTC ACG T | TTC AAG AGA | ACG TGA VAC GTT CGG AGA A | TTT TTT C |
| 阴性(反向) | TCG AGA AAA AA | TTC TCC GAA CGT GTC ACG T | TTC AAG AGA | ACG TGA VAC GTT CGG AGA A | A |

20 μ L:2.5 mmol/L dNTP 0.8 μ L,正向引物 0.4 μ L,反向引物 0.4 μ L,5 U/L Taq 酶 0.2 μ L,样本 1 μ L,ddH₂O 15.2 μ L;94 $^{\circ}$ C 30 s;94 $^{\circ}$ C 30 s,62 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s(30 个循环),72 $^{\circ}$ C 6 min 延伸,将重组质粒连同 pHelper1.0 和 pHelper2.0 共 3 种质粒载体分别进行高纯度无内毒素抽提。

仍利用 Lipofectemin2000 作为转染试剂,来介导细胞转染 293T 细胞,在转染 6 h 之后,更换为完全培养液继续培养,在 48 h 之后,开始收集细胞上清液,其中富含了慢病毒颗粒;然后,在培养板中重新加入新鲜的培养液 10 mL,放在细胞培养箱中继续培养,在 72 h 之后,继续收集细胞上清液,并进行浓缩、离心,以便提纯。

为足够沉淀病毒颗粒,分别在每个离心管内置 20 mL 滤液,4 $^{\circ}$ C,50 000 r/min,离心 90 min,弃上清,剩余沉淀就是病毒浓缩液,分别为 LV-GFP-sh mTOR、LV-GFP-sh(阴性组病毒)。分别用 200 μ L 培养液重悬每个离心管中的病毒沉淀,再分别用 2 个 0.5 mL EP 管分装,则每管为 100 μ L,最后保存在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中。

1.3.2 病毒滴度测定 (1)以 293T 细胞为目的细胞,应用 96 孔板铺板,每孔加入(0.5~1.0) $\times 10^4$ /mL,采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,终体积 100 μ L,置入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵育箱中培养 24 h,使细胞贴壁。(2)测定病毒滴度的方法可以采用逐孔稀释法,倍比稀释病毒原液来感染 293T 细胞,在孵育箱中培养 4 d 后,利用荧光显微镜来观察细胞的荧光表达情况,并估计病毒的滴度,分别将病毒稀释为 10⁻¹~10⁻⁴ 4 个梯度进行培养。(3)利用荧光显微镜计数荧光细胞,从而可以检测绿色荧光蛋白(GFP)表达量,并结合稀释倍数来计算病毒滴度。病毒滴度(BT = TU/mL, transducing units)计算公式: TU/ μ L = (P \times N/100 \times V) \times 1/DF, P = %GFP+细胞数, N 为转染时的细胞数, V 为每孔加入病毒稀释液体积(μ L), DF 为稀释因子(dilution factor)。

1.4 统计学处理 采用统计学软件 SPSS12.0 进行数据分析,数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用配对资料 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。结果筛选出高效片段后进入慢病毒载体构建。

2 结 果

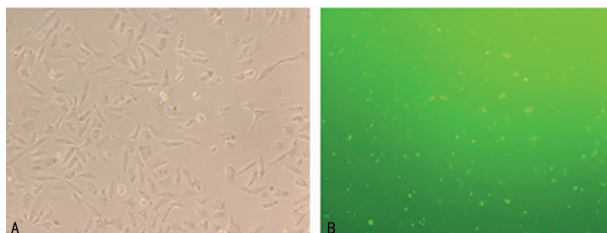
2.1 mTOR 基因干扰效果的验证

2.1.1 转染细胞 24 h 后荧光表达情况(10 \times 10 倍) 见图 1。

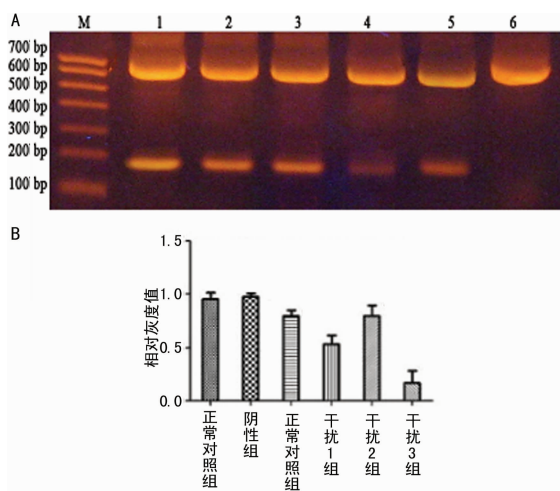
2.1.2 RT-PCR 检测肺腺癌 A549 细胞中 mTOR mRNA 的表达水平 干扰 2 组、干扰 4 组较正常细胞、阴性组、干扰 1、3 组沉默效果更好,mRNA 表达水平差异有统计学意义(*P* < 0.05),见图 2。

2.1.3 Western blot 检测人肺腺癌 A549 细胞中 mTOR 蛋白的表达情况 见图 3。干扰 2、4 组较正常对照组、阴性组、干扰 1、3 组沉默效果更好,蛋白表达量差异有统计学意义(*P* < 0.05)。这与 mTOR mRNA 表达情况相一致,同时也表明了化学合成的干扰片段能够特异、显著地下调 mTOR。综合上

述两项实验结果,样本 3 和样本 4 干扰效果相比最高效,最终选择样本 4 进入慢病毒构建实验。

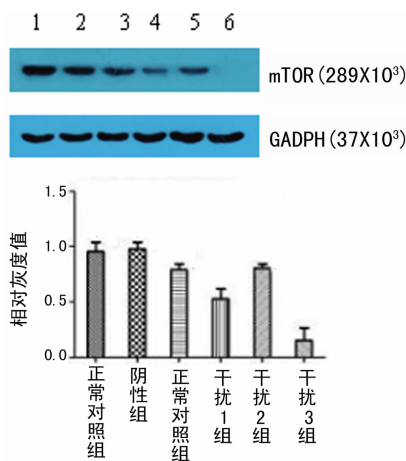


A:普通显微镜;B:荧光显微镜。

图 1 转染细胞 24 h 后荧光表达情况($\times 100$)

A:PCR 图;BM:DNA 分子标记物;1:正常对照组;2:阴性组;3~6:干扰 1~4 组;B:PCR 完成分析图。

图 2 不同干扰片段样本干扰肺腺癌 A549 细胞 mRNA 表达

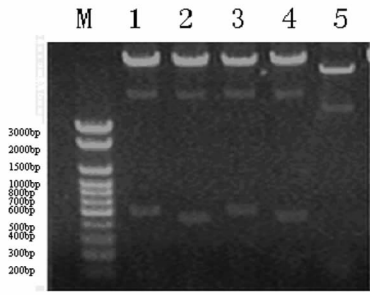


1:正常处理组;2:阴性组干扰 1 组;3~6:干扰 1~4 组。

图 3 不同干扰片段样本干扰人肺腺癌 A549 细胞 mTOR 蛋白表达

2.2 重组慢病毒载体的构建

2.2.1 使用碱裂解法抽提质粒,用双酶切鉴定方法分别对所得质粒用 *Xba* I 和 *Not* I 进行鉴定,见图 4。



M:DNA 分子标记物;1~5:酶切质粒。

图 4 重组载体的酶切电泳图

TTT TTT C-3'与前面设计的针对 mTOR 基因的 shRNA 完全相符。充分证明慢病毒 pGCL-GFP 载体中已经被 mTOR 序列成功克隆,见图 5。

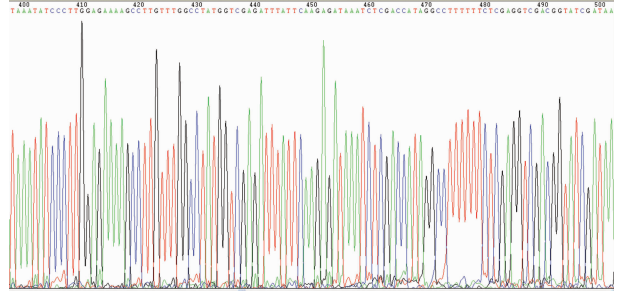
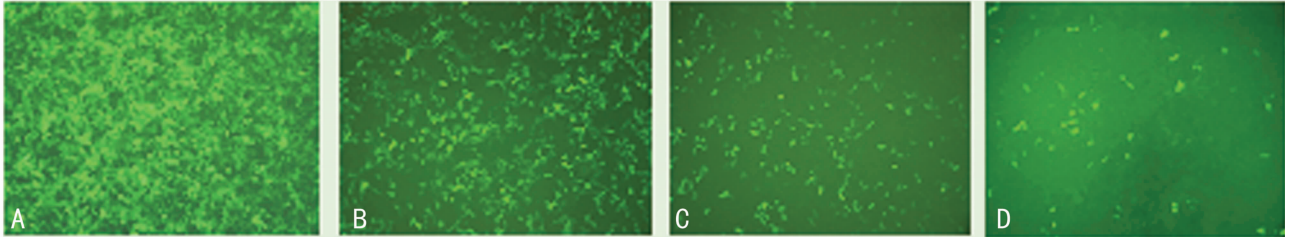
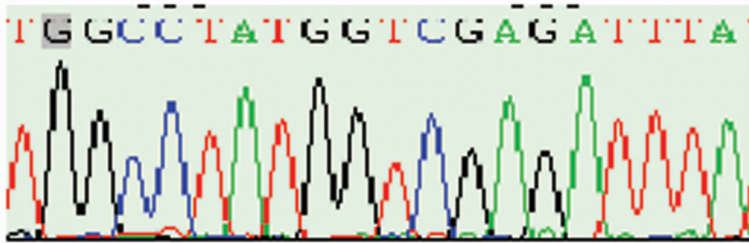


图 5 重组 pGC-shmTOR-GFP 质粒测序图谱

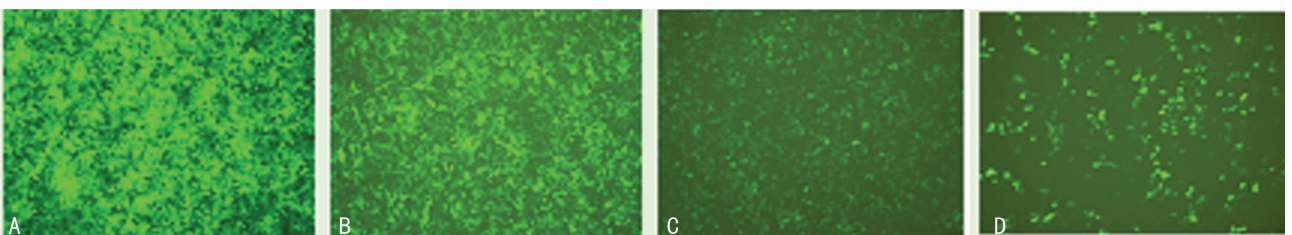
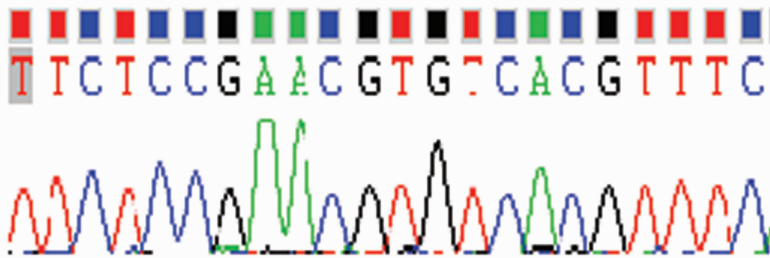
2.2.2 重组质粒的测序鉴定结果 阳性克隆序列内含有干扰 mTOR 的 shRNA 片段序列,5'-TGG CCT ATG GTC GAG ATT TAT TCA AGA GAT AAA TCT CGA CCA TAG GCC

2.2.3 mTOR 慢病毒表达载体的滴度测定 见图 6、7。



A:病毒稀释 10^{-1} 倍($\times 10$);B:病毒稀释 10^{-2} 倍($\times 100$);C:病毒稀释 10^{-3} 倍($\times 1\ 000$);D:病毒稀释 10^{-4} 倍($\times 10\ 000$)。

图 6 干扰 4 组样本测序结果及荧光表达



A:病毒稀释 10^{-1} 倍($\times 10$);B:病毒稀释 10^{-2} 倍($\times 100$);C:病毒稀释 10^{-3} 倍($\times 1\ 000$);D:病毒稀释 10^{-4} 倍($\times 10\ 000$)。

图 7 阴性组测序结果及荧光表达

3 讨 论

mTOR 信号通路结构相当复杂^[4],且 mTOR 位于其通路中心枢纽的关键位置^[5]。在肿瘤研究中以 mTOR 为作用靶点,可阻止或抑制肿瘤细胞增殖,并可以增强肿瘤细胞对化学药物的敏感性,还可以加速肿瘤细胞的凋亡,与此同时,也发现了编码 mTOR 信号通路相关蛋白的基因存在于许多肿瘤中,因而,把 mTOR 作为靶向治疗的研究越来越多。

生物科学家在 1998 年对秀丽新小杆线虫的研究中发现了 RNAi 现象^[6]。随着时间推移及研究的深入,发现此现象在哺乳动物体内也存在,这使得从微生物转向高等生物基因功能研究成为可能。在研究过程中,发现其拥有细胞摄入效率高且相对容易、稳定性高、抑制作用强大等优点,同时也具有高效、经济、快速、操作简便等诸多的特点,在基因功能治疗方面有巨大的开发潜力。因此,随着分子生物学技术研究的发展,RNAi 技术已经被广泛应用在细胞信号通路等方面的研究。

要使基因治疗能够实现最好的效果,寻找最恰当的目的基因是关键因素,同时应用的转基因载体也要最适合,且能达到最终的目的,即基因的可控性表达;要选择适合长期研究,且 siRNA 标记能长期表达的基因传递系统。在实验中常用的载体多有化学合成、真核表达载体、病毒载体、质粒载体等,其中病毒载体治疗类药物已进入临床试验或临床应用阶段,其安全性也日益得到证实^[7-10]。利用慢病毒载体对细胞的感染率较高的特点,可用来研究整合过表达基因、细胞生长可调控性,尤其是感染细胞后不产生病变,因此可建立细胞系,此种细胞系能长期持续表达^[11-12]。

慢病毒感染宿主目的细胞后,不会再利用其宿主条件生成新的病毒颗粒,并且也不会再感染其他细胞。此种特点使慢病毒有“自杀”性病毒的称号,其诸多优点获得了学者们的信赖,在各种分子生物学研究中已经被广泛应用^[13-14]。

在作者的前期试验中,使用人工合成的 siRNA 有其局限性,持续时间相对较短,并且转染效率较低,比较适合用于筛选实验,不宜于体内实验。慢病毒载体是人类免疫缺陷病毒-1 (HIV-1),它是一种逆转录病毒载体,较为复杂,具有复制缺陷。在 mTOR 方面关于 RNAi 技术的研究,尤其在肿瘤方面,已有诸多报道,如结肠癌、卵巢癌等,但目前还没有慢病毒载体技术应用于此方面的文献报道。

根据目的基因 mTOR 的 mRNA 序列,本实验设计了 4 组 siRNA 人工合成干扰载体,在体外培养肺腺癌 A549 细胞中验证其干扰效果。分别在转染后 1 d 采用 RT-PCR 检测 mRNA 水平,在转染后 2 d 采用 Western blot 检测蛋白水平的表达,筛选结果显示 4 组序列都有干扰效果,其中干扰 2 组和干扰 4 组干扰效果最佳。

作者采用干扰 4 组进行下一步实验:重组 RNAi 慢病毒载体的构建。把目的基因 mTOR 合成序列插入慢病毒载体质粒 pGC-mTOR-shRNA 中,采用 PCR 电泳方法鉴定,筛选出阳性克隆,通过测序验证其构建的准确性,再和包装质粒系统混合,共同转染 293T 细胞,最后形成携带 siRNA 的慢病毒,之后进行病毒原液收集,采用高速离心浓缩,最终检测慢病毒原液的

滴度为 1×10^8 TU/mL。

在本试验中,mTOR 基因的高效 siRNA 干扰靶点被成功筛选出。mTOR siRNA 感染体外培养的人肺腺癌 A549 细胞后,不管是从 mRNA 水平,还是蛋白水平,该基因都明显沉默;表明成功构建出了其基因的慢病毒 RNAi 载体,为以后肺癌癌变过程中的 mTOR 信号传导通路的功能及作用研究做了更好的铺垫。

参考文献:

- [1] Youlden DR, Cramb SM, Baade PD. The international epidemiology of lung cancer geographical distribution and secular trends[J]. *J Thorac Oncol*, 2008, 3(8): 819-831.
- [2] Venkateshwar K. 肺癌转移[M]. 宋勇, 沈小昆译. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 1-3.
- [3] Gentzler RD, Altman JK, Platanius LC. An overview of the mTOR pathway as a target in cancer therapy[J]. *Exper Opin Ther Targets*, 2012, 16(5): 481-489.
- [4] 汪斌超. 双通路阻抑 EGFR/mTOR 治疗小细胞肺癌[J]. *循证医学*, 2010, 10(4): 194.
- [5] Gomez-Pinillos A, Ferrari AC. mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer therapy[J]. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2012, 26(3): 483-505.
- [6] Fire A, Xu S, Montgometry MK, et al. Potent and specific interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811.
- [7] Imperiale MJ, Kochanek S. Adenovirus vectors: biology, design, and production[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2003, 273(0): 335-357.
- [8] McCarty DM, Young SM, Samulski RJ. Integration of adeno-associated virus(AAV) and recombinant AAV vectors [J]. *Annual Review of Genetics*, 2004, 38(8): 819-845.
- [9] Couto LB, High KA. Viral vector-mediated RNA interference[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2010, 10(5): 534-542.
- [10] Schirmnacher V, Fournier P. Newcastle disease virus: a promising vector for viral therapy, immune therapy, and gene therapy of cancer[J]. *Meth Molec Biol*, 2009, 542(8): 565-605.
- [11] Lacroix M. Persistent use of “false” cell lines[J]. *Int J Cancer*, 2008, 122(1): 1-4.
- [12] Rosa J, Canovas P, Islam A, et al. Survivin modulates microtubule dynamics and nucleation throughout the cell cycle[J]. *Mol Biol Cell*, 2006, 17(3): 1483-1493.
- [13] Yamamoto T, Tsunetsugu-Yokota Y. Prospects for the therapeutic application of lentivirus-based gene therapy to HIV-1 infection[J]. *Curr Gene Ther*, 2008, 8(1): 1-8.
- [14] Cockrell AS, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors [J]. *Mol Biotechnol*, 2007, 36(3): 184-204.

(收稿日期: 2014-01-14 修回日期: 2014-02-19)