

RNA 干扰抑制 SiHaB2 细胞中 Bcl-2 基因的表达

林学红¹ 傅更锋^{1,2} 郭丹^{1,2} 刘新卷² 王建军^{1,2} 徐根兴^{1,2*}

(¹南京大学生命科学学院, 南京 210093; ²江苏省基因药物工程技术研究中心, 南京 210049)

摘要 Bcl-2 基因作为细胞凋亡的一个潜在抑制剂调节细胞的死亡, 抑制恶性肿瘤细胞中 Bcl-2 基因的表达可促进肿瘤细胞的凋亡。采用 RNA 干扰技术, 合成了含有 21 个核苷酸的小双链干扰 RNA (siRNA-Bcl-2), 并构建了含有 19 个核苷酸基因的质粒载体(pSilencer2.1-U₆-Bcl-2), 把合成的 siRNA-Bcl-2 和 pSilencer2.1-U₆-Bcl-2 分别转导入 Bcl-2 高表达的细胞株 SiHaB2 中, 通过 Western 印迹检测, 免疫荧光法检测及 DNA 梯(ladder)检测, 可观察到在导入 siRNA-Bcl-2 和 pSilencer2.1-U₆-Bcl-2 的 SiHaB2 细胞被培养 72 h 后, 可以明显抑制 Bcl-2 蛋白的表达。

关键词 Bcl-2 基因; 细胞凋亡; RNA 干扰; 基因沉默; SiHaB2 细胞

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)^[1]技术是近几年发展起来的一种研究基因功能的新方法, 在哺乳动物细胞中建立 RNAi 技术, 可以用于研究某些特定基因的功能, 从而可以研究某些疾病的发病机制。自 Fire 等^[2]首次把长双链 RNA(dsRNA)注射入一种线虫(*Caenorhabditis elegans*)细胞内诱导了目的基因靶向专一性的基因沉默^[1,2]后, 许多研究者先后用 RNA 干扰技术, 在线虫、果蝇、植物、动物卵细胞和哺乳类细胞中进行了大量研究^[3,4]。Elbashir 等^[3]和 Harborth 等^[5]用小的 19~23 个核苷酸(19~23 nts)的小干扰 RNA(siRNA)应用于培养的哺乳动物细胞时, 可使靶向基因表达明显降低。这种 RNAi 技术比基因剔除^[1,5]技术更容易更方便地了解基因的功能。

Bcl-2 基因作为细胞凋亡的一个潜在抑制剂调节细胞的死亡, 它的表达可以抑制或阻断许多因素所导致的细胞凋亡^[6-12]。抑制恶性肿瘤细胞中 Bcl-2 基因的表达, 可促进肿瘤细胞的凋亡, 所以应用 RNAi 技术, 构建和设计能专一性抑制 Bcl-2 基因表达的 siRNA 或 siRNA 质粒载体, 将来有望被应用来抑制 Bcl-2 基因高表达的肿瘤生长。

1 材料和方法

1.1 材料

人 SiHaB2 细胞是导入了 Bcl-2 基因的宫颈癌上皮细胞, 由军事医学科学院细胞研究中心林晨教授惠赠, H22 腹水型小鼠肝癌瘤株从中国科学院上海药物研究所购得, pwo DNA 聚合酶和各种限制性内切酶为 Pharmacia Biotech 公司产品, 小鼠抗人 Bcl-2

单克隆抗体是 Santa Cruz Biotech 公司产品, 山羊抗小鼠 HRP 标记抗体和 DAB 浓缩显色液购自上海华美生物工程公司, FITC-山羊抗小鼠抗体购自 KPL 公司, 细胞培养基 PRMI-1640、小牛血清和胰蛋白酶均为 Gibco BRL 公司产品, 青霉素和链霉素为 Sigma 公司产品, OligofectAMINE、LipofectAMINE 2000 和 Opti-MEM 均为 Invitrogen 公司产品, Bio-Rad DC protein assay kit 是 Bio-Rad 公司产品。pSilencer 2.1-U₆ 载体购自 Ambion 公司, GFP-siRNA/psilencer 2.1-U₆ 质粒和无关基因 luciferase-siRNA 由本实验室提供, siRNA-Bcl-2 由美国 Dharmacon 公司合成, siRNA-Bcl-2 引物由上海 Genebase 基因技术有限公司合成并提供, 其他化学试剂均为 Amresco 公司的产品。

1.2 siRNA-Bcl-2 的设计和合成

根据 Bcl-2 的 mRNA 基因序列(gi: 179370), 按 siRNA 选择规则从中选取 97~115、459~478、519~538、547~565、577~595 以及 607~625 这 6 段序列(已申请专利)进行合成 siRNA 的体外细胞实验筛选, 发现 519~538 这一段基因序列效果较好。选择的 siRNA-Bcl-2(519~538)的两条 RNA 链设计为: 5'-CCG GGA GAU GUC GCC CCU G dT dT -3', 5'-CAGG GGC GAC AUC UCC CGG dT dT -3'。

然后把设计好的 siRNA 序列送美国 Dharmacon 公司合成, 其合成后所提供的 siRNA 溶液的浓度为

收稿日期: 2005-01-24 接受日期: 2005-04-25

* 通讯作者。Tel: 025-83592714, Fax: 025-83592714, E-mail: genxingx@yahoo.com.cn

20 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.3 SiHaB2 细胞的培养和合成 siRNA-Bcl-2 的转染

SiHaB2 细胞在 24 孔细胞板上用 PRMI-1640 培养基, 含 10% 的小牛血清和青霉素、链霉素在 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 细胞培养箱中培养至 30%~50% 的细胞覆盖率。然后, 吸去培养液, 用不含青霉素、链霉素和小牛血清的 PRMI-1640 培养基洗 1 次。在转染 siRNA-Bcl-2 前, 加入无血清和双抗生素的 PRMI-1640 培养基 197 μl /孔。取 3 μl 20 $\mu\text{mol/L}$ siRNA-Bcl-2(终浓度为 60 pmol/L), 加入 40 μl Opti-MEM 混合稀释; 另一试管加入 2 μl OligofectAMINE, 用 8 μl Opti-MEM 混合稀释。两试管在室温无菌条件下分别放置 10 min, 两试管合并混合后室温无菌条件下放置 30 min, 待溶液稍微变稠后移入 24 孔细胞板中, 每孔加入 53 μl OligofectAMINE-RNA 复合物, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 下培养 4 h, 然后每孔再加入含 2 倍小牛血清和 2 倍青霉素、链霉素的 PRMI-1640 培养液 250 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 下分别培养 72 h。

1.3.1 Western 印迹 siRNA-Bcl-2 对 SiHaB2 细胞中 Bcl-2 基因表达的抑制 转染 siRNA-Bcl-2 后, 细胞培养 72 h, 吸去培养介质, 用 Hank's 液洗一次, 每孔加入 50 μl 1% SDS, 取出细胞后, 轻微超声粉碎细胞 10 s, -70 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。同时从中取出 3 μl 用 Bio-Rad DC protein assay kit 测蛋白质浓度, A_{750} 测吸光度, 从标准曲线查出蛋白质浓度。调节蛋白质浓度使每个样品的蛋白质质量为 100 μg , 12% SDS-PAGE 电泳, 并转印到硝酸纤维素膜上, 进行 Western 印迹。含有样品的硝酸纤维素膜用 10 g/L 脱脂奶粉配制的 PBS(0.1 mol/L, pH 7.0)洗 30 min, 用按 1:250 稀释的小鼠抗人 Bcl-2 单克隆抗体 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡反应 2 h, 用 10 g/L 脱脂奶粉-PBS 洗 30 min。然后用按 1:50 稀释的 HRP-山羊抗小鼠二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, PBS 洗 30 min, 50 mmol/L pH 7.4 Tris-HCl 洗 1 次, DAB 法显色。

1.3.2 免疫荧光法检测 siRNA-Bcl-2 对 SiHaB2 细胞中 Bcl-2 基因表达的抑制 在 60 mm 细胞培养皿中置入 2 mm \times 2 mm 的盖玻片, 按照 1.3 中的方法进行培养和转染, 转染 siRNA-Bcl-2 后, 细胞培养 72 h 后, 取出盖玻片, 用 0.1 mol/L pH 7.0 的 PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 30 min, 0.1 mol/L pH 7.0 的 PBS 洗 1 次, 用含 0.2% Triton X-100 的 10 g/L 脱脂奶粉液(0.1 mol/L pH 7.0 的 PBS 配制)作用 10 min, 10 g/L 脱脂奶粉液(0.1 mol/L pH 7.0 的 PBS 配

制)洗 3 次, 每次 5 min, 用按 1:250 稀释的小鼠抗人 Bcl-2 单克隆抗体 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡反应 2 h, 10 g/L 脱脂奶粉液(0.1 mol/L pH 7.0 的 PBS 配制)洗 3 次, 每次 10 min, 用按 1:100 稀释的 FITC-山羊抗小鼠二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, 10g/L 脱脂奶粉液(0.1 mol/L pH 7.0 的 PBS 配制)洗 3 次, 每次 5 min, 0.1 mol/L pH 7.0 的 PBS 洗 1 次, 双重蒸馏水洗后, 用 Citifluor 封片。封片后在 Leica 倒置荧光显微镜下观察荧光。

1.3.3 DNA 梯(ladder)检测 siRNA-Bcl-2 抑制 SiHaB2 细胞中 Bcl-2 基因的抗凋亡作用 按 1.3 方法处理的细胞收集后, 1200 g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min, 0.1 mol/L pH 7.0 的 PBS 洗 1 次, 4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 15 min (250 μl 预冷的裂解液: 0.4% Triton X-100, 20 mmol/L Tris, 20.4 mmol/L EDTA), 4 $^{\circ}\text{C}$, 13 000 g, 离心 5 min, 用等体积(250 μl)的异丙醇沉淀核小体片段, 调整至 NaCl 的终浓度为 0.5 mol/L, 过夜, 4 $^{\circ}\text{C}$, 13 000 g, 离心 10 min, 沉淀用 70% 乙醇洗两次, 每次 4 $^{\circ}\text{C}$, 7600 g, 离心 5 min, 用 40 μl TE (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA)溶解, RNA 酶消化, 1.8% 琼脂糖凝胶电泳。

1.4 pSilencer2.1-U₆-Bcl-2 的构建

1.4.1 Bcl-2 发夹状基因序列的合成 两条单链 DNA 的序列为: 5'-GATCCCCGGAGGCTGGGATG-CCTTTTCAAGAGAAAAGCCATCCCAGCCTCCG-TTTTTGGAAA-3', 5'-AGCTTTTCCAAAAACG-GAGGCTGGGATGCCTTTTCTCTTGAAAAAGGCCA-CCCAGCCTCCGGG-3'。

按照下列方法把分别合成的两条单链 DNA 合成双链, 以 50 μl 双重蒸馏水分别溶解合成的两条单链 DNA, 分别取 2 μl 溶解的单链 DNA, 然后加入 46 μl 1 \times DNA 配对缓冲液[100 mmol/L KAC, 30 mmol/L pH 7.4 Hepes, 2 mmol/L Mg(AC)₂], 90 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 冷却至 37 $^{\circ}\text{C}$ 并保温 1 h, 逐步冷却至室温, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。合成的 Bcl-2 发夹状基因序列的两端分别引入了 BamHI 和 HindIII 的酶切位点。

1.4.2 pSilencer2.1-U₆-Bcl-2 质粒的构建 购买的 pSilencer2.1-U₆ 是已经含有 BamHI 和 HindIII 酶切位点的线型载体, 故可以用以下方法连接已经合成双链的 Bcl-2 发夹状基因, 1 μl 合成双链的 Bcl-2 发夹状 RNA 的基因, 6 μl ddH₂O, 1 μl 10 \times T4 DNA 连接缓冲液, 1 μl pSilencer2.1-U₆, 1 μl T4 DNA 连接酶 (5 U/ μl)。22 $^{\circ}\text{C}$ 5 h 后, 加入感受态大肠杆菌 DH5 α 转化, 然后涂布在 100 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上培养, 随机挑取菌落于含 100 $\mu\text{g/ml}$ 氨

苜青霉素的液体 LB 培养基中扩增, 抽提质粒, 分别用限制性内切酶 *EcoRI* 和 *HindIII* 酶切鉴定。

1.4.3 SiHaB2 细胞的培养和构建 pSilencer2.1-U₆-Bcl-2 质粒的转染 SiHaB2 细胞培养方法同 1.3。分别取构建的 2 μl (0.8 μg) 质粒, 加入 50 μl Opti-MEM 混合稀释; 另一试管加入 2 μl LipofectAMINE 2000, 用 50 μl Opti-MEM 混合稀释。两试管在室温无菌条件下放置 5 min, 再合并混合, 在室温无菌条件下放置 30 min 后移入 24 孔板中, 37 °C, 5% CO₂ 下培养 4 h, 然后每孔再加入 400 μl 含 2 倍小牛血清和 2 倍青霉素、链霉素的 PRMI-1640 培养液, 37 °C, 5% CO₂ 下培养 72 h。将 pSilencer2.1-U₆-Bcl-2 质粒转染 SiHaB2 后, Western 印迹, 免疫荧光法, DNA 梯检测 pSilencer2.1-U₆-Bcl-2 质粒对 SiHaB2 细胞中 Bcl-2 基因表达的抑制的方法分别同上 1.3.1、1.3.2 和 1.3.3。

1.4.4 pSilencer2.1-U₆-Bcl-2 质粒在体内抑制 H22 肝癌细胞生长 按文献[13]方法制备脂质体及建立动物模型, 给药组的 DNA 使用 pSilencer2.1-U₆-Bcl-2 质粒, 给药组分为高、中、低共 3 个剂量组, 给药剂量分别为 2 mg/kg、1 mg/kg、0.5 mg/kg, 阴性对照组采用的 DNA 是 pSilencer2.1-U₆ 空载体, 剂量为 1 mg/kg, 取含腹水型 H22 肝癌的模型小鼠(江苏省肿瘤研究所提供), 脱颈椎处死, 无菌抽取腹水, 按照腹水: 0.9% 生理盐水 = 1: 3 的比例稀释, 调节细胞浓度至 10⁶ 个/ml, 然后接种于 ICR 小鼠(购买于南京医科大学实验动物中心, 动物合格证号: 54985)右腋下, 0.2 ml/ 只。于接种后的第 3 天尾静脉给药, 连续给药 7 天。于末次给药后的第 3 天脱颈椎处死小鼠, 小心剥取肿瘤, 称重, 按照下列公式计算抑瘤率:

$$\text{抑瘤率} = \frac{\text{阴性对照组瘤重} - \text{实验给药组瘤重}}{\text{阴性对照组瘤重}} \times 100\%$$

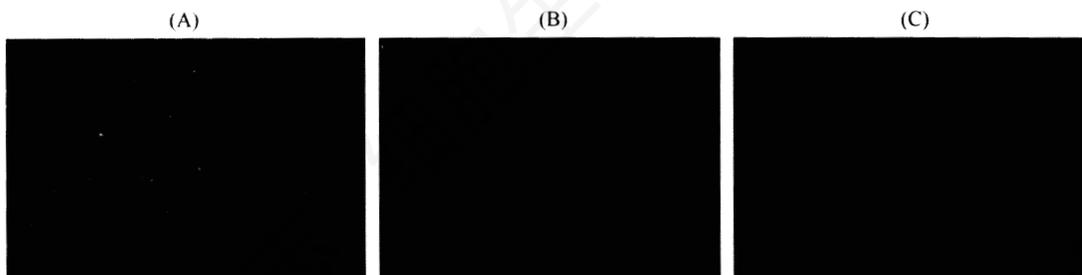


图 2 细胞转染 siRNA-Bcl-2 后免疫荧光法检测 Bcl-2 基因的表达
A: 正常 SiHaB2 对照组; B: 转染 siRNA-Bcl-2 组; C: mock 对照组。

2 结果

2.1 siRNA-Bcl-2 对 SiHaB2 细胞中 Bcl-2 基因表达的抑制作用

2.1.1 Western 印迹检测 siRNA-Bcl-2 对 SiHaB2 细胞中 Bcl-2 基因表达的抑制作用 SiHaB2 细胞被转染 siRNA-Bcl-2 72 h 后, 经 Western 印迹检测, 由图 1 看出, 与正常对照组的 SiHaB2 细胞比较, 转染 siRNA-Bcl-2 组在 26 kDa 处检测不到 Bcl-2 蛋白的表达, 而 mock(转染时不含目的基因)组和无关基因 luciferase-siRNA 对照组与正常对照组基因表达水平相似, 提示转染 siRNA-Bcl-2 后能较强抑制 SiHaB2 细胞中 Bcl-2 基因的表达(图 1)。

2.1.2 免疫荧光法检测 siRNA-Bcl-2 对 SiHaB2 细胞中 Bcl-2 基因表达的抑制作用 SiHaB2 细胞被转染 siRNA 72 h 后, 经一抗和 FITC 标记的二抗处理, 在荧光显微镜下观察, 发现与正常对照组的 SiHaB2 细胞比较, mock 对照组同样有明显的荧光, 而转染 siRNA-Bcl-2 组只有很少的荧光。实验结果表明, 在正常对照组和 mock 对照组的细胞中存在着大量的表达 Bcl-2 的细胞, 而在实验组的细胞中 Bcl-2 的表达却很少, 这说明转染 siRNA-Bcl-2 后能有效抑制 SiHaB2 细胞中 Bcl-2 基因的表达(图 2)。

2.1.3 DNA 梯检测 siRNA-Bcl-2 对 SiHaB2 细胞中

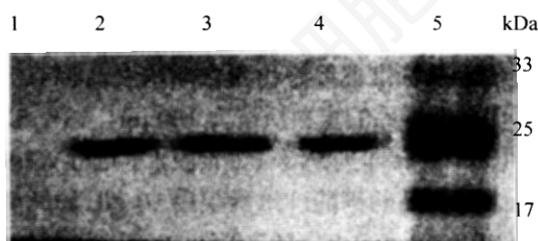


图 1 细胞转染 siRNA-Bcl-2 后 Western 印迹检测 Bcl-2 基因的表达

1: 转染 siRNA-Bcl-2 组; 2: 正常 SiHaB2 对照组; 3: mock 对照组; 4: 无关基因 luciferase-siRNA 对照组; 5: marker。



图3 细胞转染 siRNA-Bcl-2 后 DNA 梯检测 Bcl-2 基因的表达

1: marker; 2: 正常 SiHaB2 对照组; 3: 转染 siRNA-Bcl-2 组。

Bcl-2 基因抗凋亡作用的抑制作用 SiHaB2 细胞被转染 siRNA-Bcl-2 72 h 后, 收集细胞, 按 1.3.3 节所述的方法处理后, 在 1.8% 琼脂糖凝胶电泳中经 DNA 梯检测, 如图 3 所示, 正常对照组 SiHaB2 细胞没有小片段出现, 而转染 siRNA-Bcl-2 组 SiHaB2 细胞有较多的小片段, 且出现典型的凋亡的梯状条带, 表明转染 siRNA-Bcl-2 后能抑制 SiHaB2 细胞中 Bcl-2 基因的抗凋亡作用。

2.2 构建的含有 U_6 启动子的 pSilencer2.1- U_6 -Bcl-2 质粒对 SiHaB2 细胞中 Bcl-2 基因表达的抑制作用

2.2.1 pSilencer2.1- U_6 -Bcl-2 质粒的构建 构建好的质粒经限制性内切酶 *EcoRI* 和 *HindIII* 酶切鉴定, 2.5% 琼脂糖凝胶电泳于 170 bp 处出现条带, 与所构建的 pSilencer2.1- U_6 -Bcl-2 质粒的目的片段大小一致, 说明所合成的发夹状 siRNA 的基因已经被成功地克隆到了 pSilencer2.1- U_6 载体上(图 4)。

2.2.2 Western 印迹检测 pSilencer2.1- U_6 -Bcl-2 质粒对 SiHaB2 细胞中 Bcl-2 基因表达的抑制作用 SiHaB2 细胞被转染 pSilencer2.1- U_6 -Bcl-2 质粒 72 h 后, 经 Western 印迹检测, 从图 5 看出, 正常对照组、mock 对照组(转导时不含质粒)及无关基因 GFP-siRNA/pSilencer2.1- U_6 对照组 SiHaB2 细胞在 26 kDa 处检测到了 Bcl-2 蛋白的表达, 而转染 pSilencer2.1- U_6 -Bcl-2 质粒组的 SiHaB2 细胞在 26 kDa 处没检测到 Bcl-2 蛋白的表达, 表明转染 pSilencer2.1- U_6 -Bcl-2



图4 pSilencer2.1- U_6 -Bcl-2 质粒的酶切鉴定图

1: marker; 2: GFP-siRNA/pSilencer2.1- U_6 对照组; 3: 转染 pSilencer2.1- U_6 -Bcl-2 质粒组。

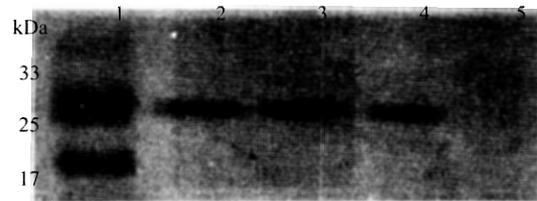


图5 细胞转染 pSilencer2.1- U_6 -Bcl-2 质粒后 Western 印迹检测 Bcl-2 基因的表达

1: marker; 2: 正常 SiHaB2 对照组; 3: mock 对照组; 4: GFP-siRNA/pSilencer2.1- U_6 对照组; 5: 转染 pSilencer2.1- U_6 -Bcl-2 质粒组。

质粒后能较强抑制 SiHaB2 细胞中 Bcl-2 基因的表达(图 5)。

2.2.3 免疫荧光法检测 pSilencer2.1- U_6 -Bcl-2 质粒对 SiHaB2 细胞中 Bcl-2 基因表达的抑制作用 SiHaB2 细胞被转染 pSilencer2.1- U_6 -Bcl-2 质粒 72 h 后, 由一抗和二抗处理后, 在荧光显微镜下观察可看出, 正常对照组和 mock 对照组 SiHaB2 细胞有大量荧光, 而转染 pSilencer2.1- U_6 -Bcl-2 组 SiHaB2 细胞几乎观察不到荧光, 由实验结果可得正常对照组和 mock 对照组的细胞中有大量表达 Bcl-2 的细胞, 而在实验组的细胞中几乎没有表达 Bcl-2 的细胞, 说明转染 pSilencer2.1- U_6 -Bcl-2 质粒后能有效抑制 SiHaB2 细胞中 Bcl-2 基因的表达(图 6)。

2.2.4 DNA 梯检测 pSilencer2.1- U_6 -Bcl-2 质粒对 SiHaB2 细胞中 Bcl-2 基因抗凋亡作用的抑制作用

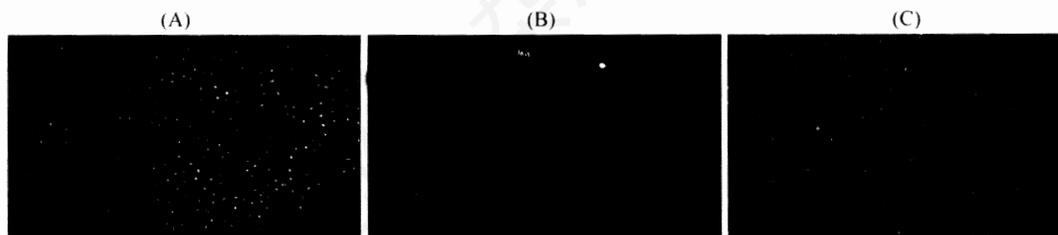


图6 细胞转染 pSilencer2.1-U₆-Bcl-2 质粒后免疫荧光法检测 Bcl-2 基因的表达

A: 正常 SiHaB2 对照组; B: 转染 pSilencer2.1-U₆-Bcl-2 质粒组; C: mock 对照组。



图7 细胞转染 pSilencer2.1-U₆-Bcl-2 质粒后 DNA 梯检测 Bcl-2 基因的表达

1: marker; 2: 正常 SiHaB2 对照组; 3: 转染 pSilencer2.1-U₆-Bcl-2 质粒组。

SiHaB2 细胞被转染 pSilencer2.1-U₆-Bcl-2 质粒 72 h 后, 收集细胞, 按 1.3.3 节所述的方法处理后, 在 1.8% 的琼脂糖凝胶电泳中经 DNA 梯检测, 由图 7 可以看出, 与对照组 SiHaB2 细胞比较, 转染 pSilencer2.1-U₆-Bcl-2 组 SiHaB2 细胞有大量小片段出现, 且出现了凋亡的梯状条带, 提示转染 pSilencer2.1-U₆-Bcl-2 质粒后能明显抑制 SiHaB2 细胞中 Bcl-2 基因的抗凋亡作用(图 7)。

2.3 脂质体包裹的 pSilencer2.1-U₆-Bcl-2 质粒对荷瘤小鼠 H22 肝癌细胞的抑制作用

2.3.1 抑瘤率 经脂质体包裹的 pSilencer2.1-U₆-Bcl-2 质粒通过尾静脉注射到荷瘤小鼠肿瘤后, 肿瘤的大小(图 8)以及重量(图 9)都有明显的抑制, 阴性对照组平均瘤重为(2.190 ± 0.50) g ($\bar{x} \pm s, n=10$), 低剂量组平均瘤重为(1.141 ± 0.28) g ($n=10$), 中剂量组平均瘤重为(1.063 ± 0.50) g ($n=10$), 高剂量组

平均瘤重为(0.735 ± 0.32)g ($n = 10$), 通过同阴性对照组比较可知, 低剂量组的抑瘤率为 47.90%, 而中剂量组的抑瘤率为 51.46%, 高剂量组的抑瘤率为 66.44%, 这表明脂质体包裹的 pSilencer2.1-U₆-Bcl-2 质粒在体内达到一定浓度后能明显抑制荷瘤小鼠 H22 肝癌细胞的生长, 而这可能与抑制 H22 肝癌细胞中 Bcl-2 基因有关。

2.3.2 DNA 梯检测 pSilencer2.1-U₆-Bcl-2 质粒对荷瘤小鼠 H22 肝癌细胞中 Bcl-2 基因抗凋亡作用的抑制作用 于末次尾静脉给药后的第 3 天脱颈椎处死小鼠, 小心剥取肿瘤, 于 PBS 液中剪碎肿瘤组织, 200 目不锈钢网过滤, 下同 1.3.3。在 1.8% 琼脂糖凝胶电泳中经 DNA 梯检测, 由图 10 可以看出, 与阴性对照组比较, 中剂量和高剂量组的肿瘤细胞明显有大量小片段出现, 且出现了凋亡的梯状条带, 而低剂量组的肿瘤细胞没有小片段出现, 提示尾静脉注射脂质体包裹的 pSilencer2.1-U₆-Bcl-2 质粒在体内达到一定浓度后能明显抑制荷瘤小鼠 H22 肝癌细胞的生长, 而这可能与抑制 H22 肝癌细胞中 Bcl-2 基因有关。

3 讨论

Bcl-2 基因是 Tsujimoto 等^[14]从滤泡性淋巴瘤中分离出来的一种新类型的癌基因, 它不影响细胞的增殖, 而是作为细胞凋亡的一个潜在抑制剂调节细胞的死亡, 其表达可以抑制或阻断许多因素导致的细胞凋亡。国际上已有用反义寡核苷酸技术抑制 Bcl-2 基因的表达, 并用来治疗恶性肿瘤的临床实验报告^[15]。RNA 干扰技术是近几年发展起来的一种抑制基因表达的新方法, 采用不同长度的双链 RNA 可使不同类型细胞的靶向基因表达明显降低, 甚至有时用专一性抗体都检测不到靶向基因所表达的蛋白质或肽类, 因此, 人们形象地称 RNA 干扰技术可使基因剔除降低(knock-down)或基因沉默^[16]。RNA 干扰的靶位识别是一个有着高度序列特

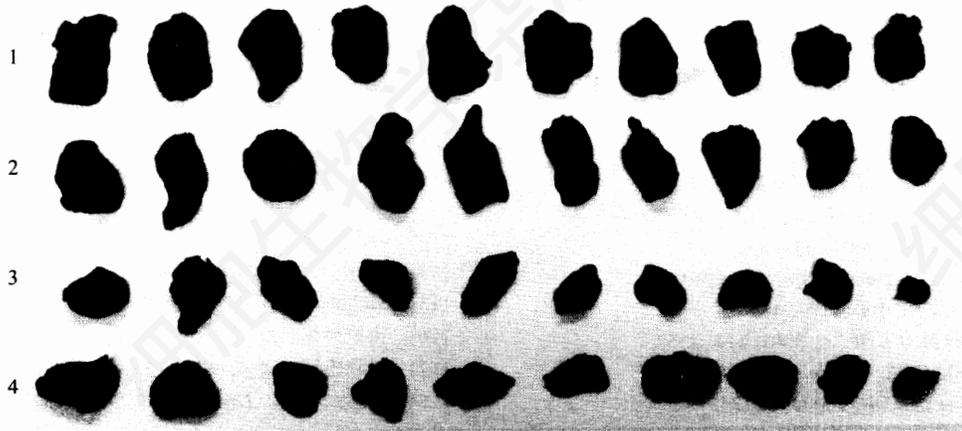


图8 肿瘤的大小图

1: 阴性对照组; 2: 低剂量组; 3: 中剂量组; 4: 高剂量组。

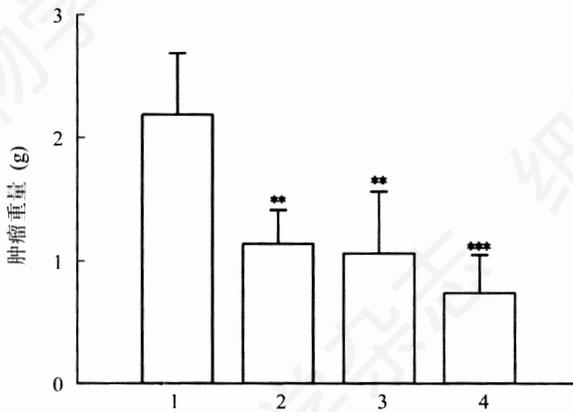
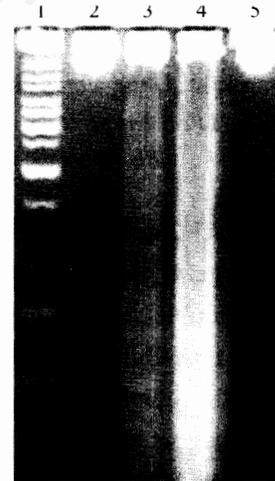


图9 肿瘤的重量图

1: 阴性对照组; 2: 低剂量组; 3: 中剂量组; 4: 高剂量组。*表示有显著差异($P<0.01$), **表示有极显著差异($P<0.001$)。

异性的过程, 即便有一个核苷酸的改变, 实验过程中都检测不到靶向基因的 RNA 干扰现象^[17]。在哺乳动物细胞中建立 RNA 干扰技术, 可以用于研究某些特定基因的功能, 从而可以解决某些疾病的发病机制, 同时对疾病尤其是对肿瘤的治疗也有一定的应用价值, 并且 RNA 干扰技术所使用的剂量比反义寡核苷酸剂量的小得多, 这样它就有可能被用于抑制某些过度表达基因的表达, 而不影响正常基因的表达, 所以在肿瘤的基因治疗方面, RNA 干扰技术具有深远的意义和广阔的应用前景。

众所周知, Bcl-2 基因广泛存在于高等脊椎动物细胞中, 其 RNA 干扰在全身注射时可能会引起动物的全身反应。但是, 在给药剂量比较低或作用时间比较短的情况下, 一般不会引起动物的全身反应^[18]。

图10 pSilencer2.1-U₆-Bcl-2 质粒脂质体包裹后 DNA 梯检测荷瘤小鼠 H22 肝癌细胞 Bcl-2 基因的表达

1: marker; 2: 阴性对照组; 3: 高剂量组; 4: 中剂量组; 5: 低剂量组。

本研究采用 RNA 干扰技术, 合成了含有 21 个核苷酸的小双链干扰 RNA (siRNA-Bcl-2), 并构建了含有 19 个核苷酸的 siRNA 质粒载体 (pSilencer2.1-U₆-Bcl-2), 把合成的 siRNA-Bcl-2 和 pSilencer2.1-U₆-Bcl-2 质粒分别转入 Bcl-2 高表达的细胞株 SiHaB2 中, 可观察到在导入 siRNA-Bcl-2 和 pSilencer2.1-U₆-Bcl-2 质粒的 SiHaB2 细胞被培养 72 h 后, 可以明显抑制 Bcl-2 蛋白的表达, 这表明 RNA 干扰技术比基因剔除技术更容易更方便地了解基因的功能, 从而为基因的研究提供了一个更好更有效的方法。在本研究中, 我们每天给小鼠只注射给药一次, 并且仅仅连续给药 7 天, 就能明显抑制荷瘤小鼠 H22 肝癌细胞的生长, 且并没有发现动物的全身反应, 这说明 Bcl-2 基因有应用于临床疾病治疗的可能。可以预测, 与其他

基因治疗技术一样, RNAi 干扰将在不久的将来能应用于病毒性、寄生病原性、突变基因、癌基因和癌相关基因表达引起的疾病的基因治疗之中。

参考文献 (References)

- [1] Mestre B *et al. Biochim Biophys Acta*, 1999, **1445**: 86
- [2] Fire A *et al. Nature*, 1998, **391**: 806
- [3] Elbashir SM *et al. Nature*, 2001, **411**: 494
- [4] Sijen T *et al. Cell*, 2001, **107**: 465
- [5] Harborth J *et al. J Cell Sci*, 2001, **114**: 4557
- [6] Hammond SM *et al. Nature*, 2000, **404**: 293
- [7] Zamore PD *et al. Cell*, 2000, **101**: 25
- [8] Bernstein E *et al. Nature*, 2001, **409**: 363
- [9] Nykänen A *et al. Cell*, 2001, **107**: 309
- [10] Elbashir SM *et al. Genes Dev*, 2001, **15**: 188
- [11] Lipardi C *et al. Cell*, 2001, **107**: 297
- [12] Sambrook J *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed.*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 201
- [13] Li X *et al. World J Gastroenterol*, 2003, **9**: 262
- [14] Tsujimoto Y *et al. Science*, 1984, **226**: 1097
- [15] Mukohara T *et al. Lung Cancer*, 2003, **41**: 123
- [16] 徐根兴等。南京军医学院学报, 2002, **24**: 99
- [17] 张利生等。遗传, 2003, **25**: 341
- [18] Webb A *et al. Lancet*, 1997, **349**: 1137

Suppression of Bcl-2 Gene Expression with RNAi in SiHaB2 Cell

Xue-Hong Lin¹, Geng-Feng Fu^{1,2}, Dan Guo^{1,2}, Xin-Juan Liu², Jian-Jun Wang^{1,2}, Gen-Xing Xu^{1,2*}

(¹School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China; ²Jiangsu Research Center for Gene Pharmaceutical Engineering and Technology, Nanjing 210049, China)

Abstract Bcl-2 gene, a latent inhibitor of the apoptosis, modulates the death of cells. To suppress the expression of Bcl-2 gene in malignant cells can promote the apoptosis of tumor cells. In this study, we have synthesized a small double-strand interference RNA (siRNA-Bcl-2) containing 21 nucleotides and constructed a plasmid (pSilencer2.1-U₆-Bcl-2) containing 19 nucleotides with RNAi. Whereafter, we have transferred both of them separately into the SiHaB2 cells, which highly express Bcl-2 proteins. By the means of Western blot analysis, immunofluorescent analysis and DNA ladder analysis, we have observed that the expression of Bcl-2 proteins in the SiHaB2 cells transferred with siRNA-Bcl-2 or psilencer2.1-U₆-Bcl-2 was notably inhibited.

Key words Bcl-2 gene; apoptosis; RNA interference; gene silencing; SiHaB2 cell

Received: January 24, 2005 Accepted: April 25, 2005

*Corresponding author. Tel: 86-25-83592714, Fax: 86-25-83592714, E-mail: genxingx@yahoo.com.cn