

• 实验研究 •

RNA 干扰对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞株骨保护素基因表达的抑制作用

张帆 唐振宁 杨新华 徐琰 范林军 张毅 陈莉 周艳 陈庆秋 姜军

【摘要】 目的 构建针对骨保护素(OPG)基因的一个载体编码三条短发夹 RNA (shRNA)的真核表达质粒,观察其对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞株 OPG 表达的抑制作用。**方法** 选择 3 个针对 OPG 基因的 RNA 干扰(RNAi)位点,分别设计合成 3 对编码相应 shRNA 的 DNA 单链,每对单链连接形成双链后分别与线性化载体 pGenesil-1. 1、pGenesil-1. 2、pGenesil-1. 3 连接形成 pGenesil-1. 1-shRNA1、pGenesil-1. 2-shRNA2、pGenesil-1. 3-shRNA3,对以上重组载体反复酶切连接,构建成重组质粒 pGenesil-1. 1-1. 2-1. 3-shRNA1-shRNA2-shRNA3,酶切鉴定和测序无误后,将该质粒转染 MDA-MB-231 细胞,以 G418 加压筛选,对转染细胞行单克隆化,稳定转染细胞行 RT-PCR 和 Western blot 检测,确定其对 OPG 基因表达抑制作用。统计分析采用单因素方差分析和 SLD 分析法。**结果** 成功构建了 pGenesil-1. 1-1. 2-1. 3-shRNA1-shRNA2-shRNA3 重组质粒;以该质粒稳定转染 MDA-MB-231 细胞后其 OPG mRNA 和蛋白表达均较对照差异有统计学意义($P < 0.05$),RNAi 对 OPG mRNA 和蛋白的表达抑制率分别为 91% 和 73%。**结论** 本研究构建了针对 OPG 的一个载体编码 3 条 shRNA 的真核表达质粒,通过 RNAi 抑制了 MDA-MB-231 细胞 OPG 基因表达,为进一步深入探讨肿瘤细胞自身 OPG 表达在乳腺癌骨转移发生发展中的作用提供了相关实验基础。

【关键词】 乳腺肿瘤;骨保护素;RNA 干扰;MDA-MB-231 细胞

【中图法分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Inhibitory effect of RNA interference on osteoprotegerin gene expression in MDA-MB-231 breast cancer cell line ZHANG Fan, TANG Zhen-ning, YANG Xin-hua, XU Yan, FAN Lin-jun, ZHANG Yi, CHENG Li, ZHOU Yan, CHEN Qin-qiu, JIANG Jun. Breast Disease Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Corresponding author: JIANG Jun, E-mail: jcbd@medmail.com.cn

【Abstract】 Objective To construct a eukaryotic expression plasmid that expresses 3 shRNAs (short hairpin RNAs) targeting osteoprotegerin (OPG) gene and to investigate the inhibitory effect of RNA interference (RNAi) on osteoprotegerin gene expression in MDA-

MB-231 breast cancer cell line. **Methods** Three sites targeting osteoprotegerin gene were selected. Accordingly, three pairs of single stranded DNAs were designed, synthesized and annealed to double stranded DNAs. The double stranded DNAs were cloned into pGenesil-1. 1, pGenesil-1. 2 and pGenesil-1. 3, respectively. After repeated enzyme digestion and ligation, the construction of recombinant plasmid pGenesil-1. 1-1. 2-1. 3-shRNA1-shRNA2-shRNA3 was completed. After identification of restriction endonuclease and sequencing, the recombinant plasmid was transfected into the MDA-MB-231 cells. After G418 screening, the stably transfected cells were identified with RT-PCR and Western blot. Statistical analysis was performed using One-way ANOVA and LSD methods. **Results** The eukaryotic expression plasmid pGenesil-1. 1-1. 2-1. 3-shRNA1-shRNA2-shRNA3 was constructed successfully. Compared with the control group, OPG mRNA and protein levels of MDA-MB-231 cells stably transfected with pGenesil-1. 1-1. 2-1. 3-shRNA1-shRNA2-shRNA3 were lower, with a statistically significant difference ($P < 0.05$). The inhibition rates of OPG mRNA and protein were 91% and 73%, respectively. **Conclusion** The eukaryotic expression plasmid that expresses 3 shRNAs targeting osteoprotegerin gene was constructed successfully, and the osteoprotegerin gene expression in MDA-MB-231 cells was inhibited by RNA interference in our study. Our study result may provide a basis for related experimental studies further exploring the role of OPG expression by tumor cell itself in the development and progression of breast cancer bone metastasis.

【Key words】 breast neoplasms; osteoprotegerin; RNA interference; MDA-MB-231 cell

骨保护素(Osteoprotegerin, OPG)是近年发现的肿瘤坏死因子受体超家族成员^[1],是调控破骨细胞活化维持骨稳定的重要因素。在乳腺癌骨转移中,骨组织中的成骨细胞 OPG 表达下降对其发生发展起重要作用,是转移灶发生溶骨性骨破坏的关键因素。已证实部分乳腺癌细胞株表达 OPG^[2],但肿瘤细胞自身 OPG 表达对乳腺癌骨转移的影响目前还不清楚。本研究利用 RNA 干扰(RNAi)技术,通过构建针对 OPG 的 1 个载体编码 3 条短发夹 RNA(shRNA)的真核表达质粒,以其转染乳腺癌细胞株 MDA-MB-231, G418 筛选稳定转染细胞,检测 OPG 表达抑制效果,为进一步深入探讨肿瘤细胞自身 OPG 表达在乳腺癌骨转移发生发展中的作用提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料

人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 购自上海细胞生物研究所, pGenesil-1. 1、pGenesil-1. 2、pGenesil-1. 3 质粒和大肠杆菌 DH5 α 自晶赛公司获得,以上质粒

多克隆位点(MCS)分别为:-MluI-hU6 promoter-Insert DNA-HindIII-BamHI-EcoRI-SalI-; -MluI-HindIII-Insert DNA-mU6 promoter-BamHI-EcoRI-SalI-; -MluI-HindIII-BamHI-h7SK promoter-Insert DNA-EcoRI-SalI。实验中所用的 T4 连接酶和各种限制型内切酶均为 NEB 公司产品,兔抗人 OPG 多克隆抗体购于博士得公司,DMEM-F12 培养基、0.25% 胰蛋白酶和胎牛血清均为 Hyclone 公司产品,脂质体转染试剂盒 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司,RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司,蛋白质提取试剂盒为申能博彩公司产品,DNA 胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒来自中鼎公司,G418 为 Gibico 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 shRNA 设计:根据 GenBank 上 OPG mRNA 序列(ACCESSION:NM_002546),按照 RNAi 基本原则,对选择的靶序列进行同源分析,排除非特异性抑制其他基因片断可能,设计 3 个长度为 19 nt 的干扰序列,OPG1: CCTTCATTATG ACG AAGAA, OPG2: GCTGTTGTGTGACAAATGT, OPG3: GACCACTACTACACAGACA,分别靶向 OPG 基因编码区的 407 ~ 425、437 ~ 455 和 522 ~ 540 位碱基。根据干扰序列设计并合成编码 shRNA 的 DNA 单链,3' 端引入 SacI 酶切位点,形成 -shRNA 正义链-loop 环-shRNA 反义链-终止信号-SacI 结构(表 1)。通用阴性对照质粒 pGenesil-1.1-HK 为晶赛公司产品,其编码的小干扰 RNA(siRNA)为 GACTTCATAAGGCGCATGC,该序列经过 BLAST(核苷酸序列比对),与人、鼠基因库无明显同源。

表 1 shRNA 转录模版 DNA 序列

名称	序列
shRNA1	A 5'-CACC CCTTCATTATGACGAAGAA TTCAAGACG TTCTTCGTCATAATGAAGG TTTTTT G -3'
	B 5'- AGCTCAAAAAA CCTTCATTATGACGAAGAA CGTCTTGAA TTCTTCGTCATAATGAAGG -3'
shRNA2	A 5'-TTTG GCTGTTGTGTGACAAATGT TTCAAGACG ACATTTGTACACAACAGC TTTTTT G -3'
	B 5'- AGCTCAAAAAA GCTGTTGTGTGACAAATGT CGTCTTGAA ACATTTGTACACAACAGC -3'
shRNA3	A 5'-CCTC GACCACTACTACACAGACA TTCAAGACG TGTCTGTGTAGTAGTGGTC TTTTTT G -3'
	B 5'- AGCTCAAAAAA GACCACTACTACACAGACA CGTCTTGAA TGTCTGTGTAGTAGTGGTC -3'

1.2.2 重组质粒 pGenesil-1.1-1.2-1.3-shRNA1-shRNA2-shRNA3 构建及鉴定:用 BsaI 完全酶切 pGenesil-1.1、pGenesil-1.2、pGenesil-1.3 质粒,琼脂糖凝胶电泳回收大片段,即为线性化载体。将 shRNA1、shRNA2、shRNA3 正义、反义单链分别进行退火连接。将 shRNA1 退火连接片段与 pGenesil-1.1 线性化载体的连接为 pGenesil-1.1-shRNA1;将 shRNA2 退火连接片段与 pGenesil-1.2

线性化载体的连接为 pGenesil-1. 2-shRNA2; 将 shRNA3 退火连接片段与 pGenesil-1. 3 线性化载体的连接为 pGenesil-1. 3-shRNA3。各取 5 μ l 连接产物转化感受态细胞 DH5 α , 卡那霉素抗性筛选阳性克隆, 提取质粒, 分别用 SacI 酶切, 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 挑取克隆正确的质粒转化菌液测序。对质粒 pGenesil-1. 1-shRNA1 以 HindIII 和 BamHI 双酶切后回收大片段, 对质粒 pGenesil-1. 2-shRNA2 以 HindIII 和 BamHI 双酶切后回收小片段, 将回收的大、小片段的连接为 pGenesil-1. 1-1. 2-shRNA1-shRNA2, 取 5 μ l 连接产物转化感受态细胞 DH5 α , 卡那霉素抗性筛选阳性克隆, 提取质粒, 对质粒 pGenesil-1. 1-1. 2-shRNA1-shRNA2 用 MluI 和 BamHI 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳鉴定。将质粒 pGenesil-1. 1-1. 2-shRNA1-shRNA2 以 BamHI 和 EcoRI 双酶切后回收大片段; 对质粒 pGenesil-1. 3-shRNA3 以 BamHI 和 EcoRI 双酶切后回收小片段; 将回收大片段、小片段的连接为 pGenesil-1. 1-1. 2-1. 3-shRNA1-shRNA2-shRNA3。取 5 μ l 连接产物转化感受态细胞 DH5 α , 卡那霉素抗性筛选阳性克隆, 提取质粒, 用 MluI 和 EcoRI 行双酶切, 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.3 重组质粒转染及稳定克隆筛选: MDA-MB-231 细胞于 DMEM-F12 完全培养液(含 10% 胎牛血清)在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养, 以 1×10^4 个 MDA-MB-231 细胞于转染前 1 d 接种于 24 孔板, 在转染当天细胞融合度接近 80%, 按 LipofectamineTM 2000 说明书分别将重组质粒 pGenesil-1. 1-1. 2-1. 3-shRNA1-shRNA2-shRNA3 和 pGenesil-1. 1-HK 转染细胞, 24 h 后以 1:10 比例传代, 48 h 后以浓度为 1000 μ g/ml 的 G418 加压筛选, 每 3 d 换液, 2~3 周后未转染细胞死亡, 转染细胞形成细胞集落, 荧光显微镜下观察细胞集落, 如细胞有绿色荧光, 以有限稀释法在 96 孔板内行单克隆化, 以 500 μ g/ml 的 G418 维持, 扩大培养获得的单克隆至 6 孔板, 行相关检测。

1.2.4 半定量 RT-PCR 检测: 用于 OPG RT-PCR 的引物为, 上游引物 P1: 5'-CTCGTGTTTCT GGA CATCTC-3', 下游引物 P2: 5'-GCCTAATGCAC GCA CTAAAG-3', 扩增片断 1026 bp。内参照 GAPDH RT-PCR 的引物为, 上游引物 P3: 5'-GGAGTCCACTGGCGTCTT-3', 下游引物 P4: 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTT-3', 扩增片断 505 bp。引物由生工生物公司合成。

分别提取稳定转染 pGenesil-1. 1-1. 2-1. 3-shRNA1-shRNA2-shRNA3 (A 组)、pGenesil-1. 1-HK 质粒(B 组)和对照 MDA-MB-231 细胞(C 组)总 RNA, 紫外分光光度计定量。将样品 RNA 1 μ g 逆转录成相应的 cDNA, 以 2 μ l cDNA 产物分别用引物 P1/P2 和引物 P3/P4 行 PCR 扩增, 反应参数: 94 $^{\circ}$ C 预

变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 65 s, 30 个循环, 72 °C 终延伸 5 min。各取 4 μl PCR 产物于琼脂糖凝胶电泳检测, 用图像分析软件分析每条基因条带的光密度值。以 OPG 与 GAPDH 的光密度值比值表示 OPG mRNA 的表达量, OPG mRNA 表达抑制率为: $(1 - \text{A 组 OPG mRNA 表达量} / \text{C 组 OPG mRNA 表达量}) \times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.2.5 Western blot 检测: 分别提取前述 3 组 MDA-MB-231 细胞蛋白, 行考马斯亮蓝法定量, SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳), 转膜, 脱脂奶粉封闭, 兔抗 OPG 多抗和小鼠抗 β -actin 单抗分别结合, 再结合相应的辣根过氧化物酶标记的二抗, 化学发光试剂盒显色, X 光片曝光, 显影, 定影, 按前述方法行半定量分析并计算 OPG 蛋白表达抑制率。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 16.0 统计软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经 Shapiro-Wilk 与 Levene 法检验, 满足正态性与方差齐性[3 组细胞 OPG mRNA 表达量均服从正态分布(A 组 $P = 0.921$; B 组 $P = 0.487$; C 组 $P = 0.199$). 3 组细胞 OPG 蛋白表达量均服从正态分布(A 组 $P = 0.980$; B 组 $P = 0.651$; C 组 $P = 0.589$)。统计分析采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 组间样本均数间的多重比较使用 LSD 法检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

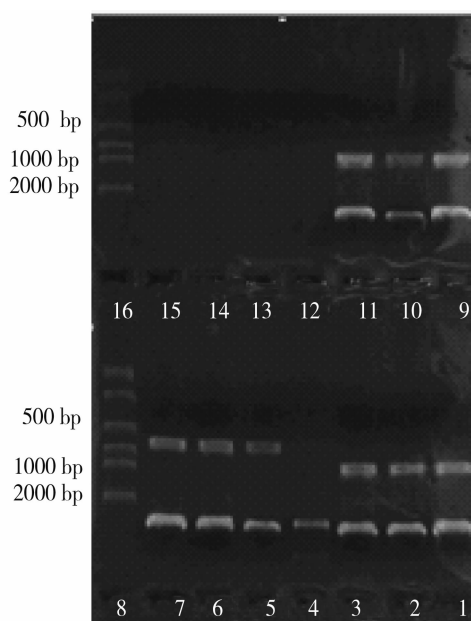
2 结果

2.1 重组质粒 pGenesil-1.1-1.2-1.3-shRNA1-shRNA2-shRNA3 构建

分别对 pGenesil-1.1-shRNA1、pGenesil-1.2-shRNA2、pGenesil-1.3-shRNA3 用 SacI 酶切后琼脂糖凝胶电泳鉴定, 均能见到 1 条约 600 ~ 900 bp 不等的 DNA 条带(图 1), 显示 shRNA1、shRNA2 和 shRNA3 目的基因片段已经分别插入到质粒 pGenesil1.1、pGenesil1.2 和 pGenesil1.3 中。测序结果证实均为插入正确序列的质粒。

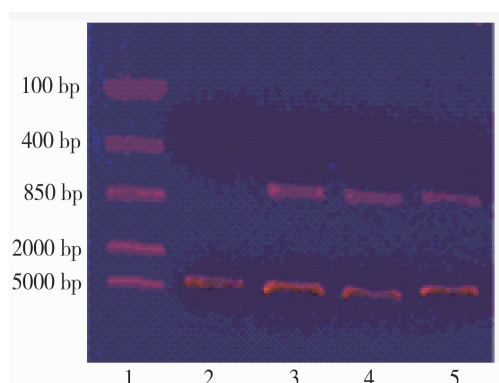
对质粒 pGenesil-1.1-1.2-shRNA1-shRNA2 用 MluI 和 BamHI 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 约在 700 bp 处见到 DNA 条带(图 2)。结合质粒 pGenesil-1.1-1.2-shRNA1-shRNA2 的 MCS(多克隆位点)应为: -MluI-hU6 promoter-siRNA1-HindIII-siRNA2-mU6 promoter-BamHI-EcoRI-SalI-, 提示恰好符合设计要求, 为插入正确序列的质粒。

对质粒 pGenesil-1.1-1.2-1.3-shRNA1-shRNA2-shRNA3 行 MluI 和 EcoRI 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 约在 999 bp 处见到 DNA 条带(图 3)。结合该质粒的 MCS 应为: -MluI-hU6 promoter-siRNA1-HindIII-siRNA2-mU6 promoter-



1、2、3:pGenesil-1. 1-shRNA1;4:未酶切的 pGenesil-1. 2-shRNA2;5、6、7: pGenesil-1. 2-shRNA2;9、10、11: pGenesil-1. 3-shRNA3;8、16:标准

图 1 SacI 酶切凝胶电泳鉴定



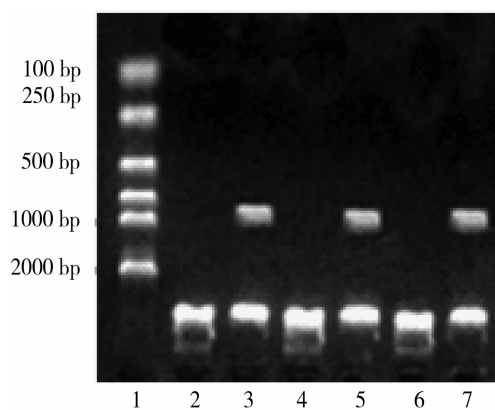
1:标准;2:未酶切 pGenesil-1. 1-1. 2-shRNA1-shRNA2;3、4、5:酶切 pGenesil-1. 1-1. 2-shRNA1-shRNA2

图 2 MluI 和 BamHI 双酶切凝胶电泳鉴定

BamHI-h7SK promoter-siRNA3-EcoRI-SalI-,提示恰好符合设计要求,为插入正确序列的质粒。重组质粒 pGenesil-1. 1-1. 2-1. 3-shRNA1-shRNA2-shRNA3 构建成功。

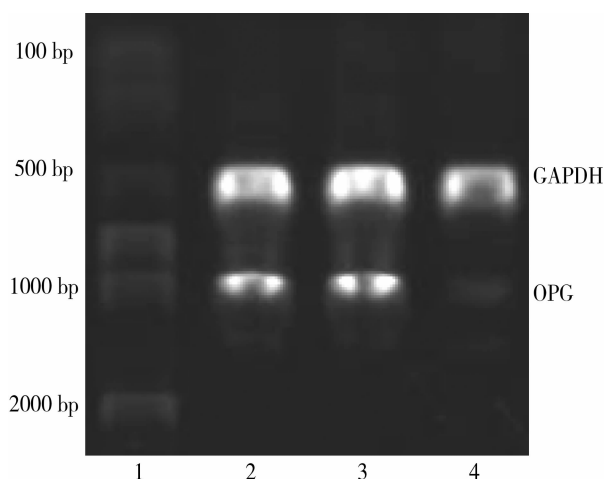
2.2 RT-PCR 检测 OPG mRNA 表达抑制效果

A、B、C 3 组细胞 OPG mRNA 表达量分别为: 0.05 ± 0.02 、 0.56 ± 0.11 、 0.58 ± 0.11 (图 4)。3 组比较差异有统计学意义($F = 31.814, P = 0.001$),两两比较显示 A 组与 B 组之间和与 C 组之间差异均有统计学意义(P 值均为



1:标准;2、4、6:未酶切 pGenesil-1.1-1.2-1.3-shRNA1-shRNA2-shRNA3;3、5、7:酶切 pGenesil-1.1-1.2-1.3-shRNA1-shRNA2-shRNA3

图3 MluI 和 EcoRI 双酶切凝胶电泳鉴定



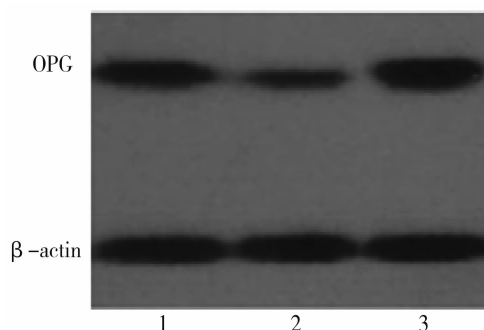
1:标准;2:C组(对照 MDA-MB-231 细胞);3:B组(pGenesil-1.1-HK 质粒);4:A组(pGenesil-1.1-1.2-1.3-shRNA1-shRNA2-shRNA3);OPG:骨保护素;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶

图4 RT-PCR 检测 OPG mRNA 表达

0.000), B 组与 C 组之间差异无统计学意义 ($P = 0.886$)。RNAi 对 OPG mRNA 的表达抑制率为 91%。

2.3 Western blot 检测 OPG 蛋白表达抑制效果

A、B、C 3 组细胞 OPG 蛋白表达量分别为: 0.29 ± 0.02 、 0.97 ± 0.08 、 1.08 ± 0.14 (图 5)。3 组比较差异具有统计学意义 ($F = 59.014$, $P < 0.001$), 两两比较显示 A 组与 B 组之间和与 C 组之间差异均有统计学意义 (P 值均为 0.000), B 组与 C 组之间差异无统计学意义 ($P = 0.208$)。RNAi 对 OPG 蛋白的表达抑制率为 73%。



1: B 组(pGenesil-1.1-HK 质粒); 2: A 组(pGenesil-1.1-1.2-1.3-shRNA1-shRNA2-shRNA3); 3: C 组(对照 MDA-MB-231 细胞); OPG: 骨保护素; β -actin: β -肌动蛋白

图 5 Western blot 检测 OPG 蛋白表达

3 讨论

1997 年 Simonet^[1] 等克隆出一种新的肿瘤坏死因子受体超家族成员, 具有抑制破骨细胞分化和增加骨密度的功能, 命名为 OPG。OPG 与 RANKL (Receptor activator of NF-kappaB ligand) 和 RANK (Receptor activator of NF-kappaB) 组成的细胞信号通路在破骨细胞活化中起关键作用^[3]。已证实在乳腺癌骨转移过程中, 骨微环境 OPG 表达下降是骨破坏发生的关键因素^[4]。同时 OPG 作为 TRAIL (肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体, Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand) 的诱饵受体, 与其竞争结合后阻止了 TRAIL 与死亡受体的结合, 阻止 TRAIL 对肿瘤细胞凋亡的诱导, 对肿瘤细胞起保护作用^[5]。因此, 通过对 TRAIL 诱导肿瘤细胞凋亡的抑制, OPG 在肿瘤细胞中的表达可能影响乳腺癌骨转移发生发展。

随着 RNAi 实验经验积累, 通常能做到设计的每 3 个 shRNA 中, 有 1 个针对目标基因的抑制效率达到 70% 或更高^[6]。本研究采用分子克隆技术, 将 3 个不同哺乳动物启动子 (hU6、mU6 和 h7SK) 分别操纵的 shRNA 转录结构单元构建到一个 RNAi 载体中, 实现了 1 个载体编码 3 条 shRNA。不同启动子转录各自相应的 shRNA 结构单元, 有效避免意外重组, 而且每条 shRNA 都能够有效转录, 免除了 siRNA 有效序列筛选实验, 为研究者节约大量精力和经费, 提高了工作效率。

本实验经酶切鉴定及 DNA 测序证实成功构建了针对 OPG 的 1 个载体编码 3 条 shRNA 的真核表达质粒 pGenesil-1.1-1.2-1.3-shRNA1-shRNA2-shRNA3, 以此质粒转染 MDA-MB-231 细胞, 并行稳定克隆筛选, 获得的单克隆

细胞经检测证实:OPG mRNA 表达较对照 MDA-MB-231 有显著差异, RNAi 对 OPG mRNA 的表达抑制率为 91%;OPG 蛋白表达较对照 MDA-MB-231 有显著差异, RNAi 对 OPG 蛋白的表达抑制率为 73%, 成功抑制了 MDA-MB-231 细胞 OPG 基因表达。目前尚未见应用 RNAi 技术抑制乳腺癌细胞 OPG 表达的相关报道, 本研究结果为进一步深入探讨肿瘤细胞自身 OPG 表达在乳腺癌骨转移发生发展中的作用提供了相关实验基础。

参考文献

- [1] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density[J]. Cell, 1997, 89(2):309-319.
- [2] Thomas RJ, Guise TA, Yin JJ, et al. Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation[J]. Endocrinology, 1999, 140(10): 4451 - 4458.
- [3] Reid P, Holen I. Pathophysiological roles of osteoprotegerin (OPG)[J]. Eur J Cell Biol, 2009, 88(1):1-17.
- [4] Kozlow W, Guise TA. Breast cancer metastasis to bone: mechanisms of osteolysis and implications for therapy[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2005, 10(2): 169-180.
- [5] Holen I, Cross SS, Neville-Webbe HL, et al. Osteoprotegerin (OPG) expression by breast cancer cells in vitro and breast tumours in vivo--a role in tumour cell survival? [J]. Breast Cancer Res Treat, 2005, 92(3): 207-215.
- [6] 李银鹏, 朱惠明, 侯晓华. 靶向 mcl-1 基因的 shRNA 真核表达质粒的构建与筛选[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(26): 2490-2495.

(收稿日期:2010-05-11)

(本文编辑:赵彬)

张帆, 唐振宁, 杨新华, 等. RNA 干扰对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞株骨保护素基因表达的抑制作用 [J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2011, 5(2):189-197.