

SIRT1 基因 shRNA 慢病毒载体的构建及其对乳腺癌细胞增殖的影响

陶颖, 陈可, 宋春丽, 任吉华, 陈娟

(重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨慢病毒介导沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1, SIRT1)基因的 shRNA 对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖和凋亡的影响。**方法:**设计、合成 2 对针对 SIRT1 基因 shRNA 的寡核苷酸序列, 与 pLentilox3.7-GFP 载体连接产生重组慢病毒质粒 pshSIRT1-1、pshSIRT1-2, 同时构建不针对任何基因的 shRNA 阴性对照 pshCont。将表达 shRNA 的载体 plentilox3.7 与 pLP1、pLP2 和 pLP/VSVG 3 种质粒共转染 293FT 细胞, 包装产生慢病毒并测定病毒滴度。将慢病毒感染人乳腺癌细胞 MCF-7, 行 real time-PCR 和 Western blot 验证 SIRT1 基因的沉默效果, 台盼蓝排斥实验和流式细胞仪分别检测其对 MCF-7 细胞增殖和凋亡的影响。**结果:**成功构建靶向 SIRT1 基因 shRNA 慢病毒载体并获得了相应的慢病毒。2 个靶向 SIRT1 的 shRNA 均能有效抑制 SIRT1 基因的表达($P=0.000\ 2$), 并使 MCF-7 细胞增殖明显减慢, 凋亡明显增加($P=0.006\ 0$)。**结论:**靶向 SIRT1 基因 RNA 干扰能显著抑制 MCF-7 细胞的生长并促进其凋亡。

【关键词】慢病毒; 沉默信息调节因子 1(SIRT1); 乳腺癌细胞; RNA 干扰

【中国图书分类法分类号】R322.66; R394-33

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-10-17

Construction of recombinant lentiviral vector of shRNA targeting SIRT1 gene and its effects on the proliferation of breast cancer cell

TAO Ying, CHEN Ke, SONG Chunli, REN Jihua, CHEN Juan

(Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To construct the lentiviral vector expressing shRNA targeting silent information regulator 1(SIRT1) gene and to investigate its effects on proliferation and apoptosis of breast cancer cell MCF-7. **Methods:** Two shRNA sequences targeting SIRT1 gene were designed and synthesized and were connected to pLentilox3.7-green fluorescent protein(GFP) vector to reconstruct lentiviral plasmids pshSIRT1-1 and pshSIRT1-2. Meanwhile, shRNA negative control pshCont targeting no gene was constructed. Recombinant lentiviral vector expressing shRNA together with pLP1, pLP2 and pLP/VSVG were co-transfected into 293FT cells and lentivirus was produced. The titer of virus was tested according to the expression level of GFP in 293FT cells. MCF-7 cells were infected with recombinant lentivirus and the silence efficiency was measured by real-time PCR and Western blot. Proliferation and apoptosis of MCF-7 cells were determined by trypan blue exclusive assay and flow cytometry respectively. **Results:** Lentiviral vectors containing shRNAs targeting SIRT1 gene were successfully established and corresponding lentiviruses were acquired. Real-time PCR and Western blot analysis showed that these two shRNA targeting SIRT1 gene significantly decreased SIRT1 mRNA($P=0.000\ 2$) and protein levels. SIRT1 silencing resulted in marked decrease of proliferation and increase of apoptosis in MCF-7 cells($P=0.006\ 0$). **Conclusions:** Lentivirus-mediated RNA interference of SIRT1 can significantly inhibit MCF-7 cell proliferation and induce its apoptosis.

【Key words】lentivirus; silent information regulator 1(SIRT1); breast cancer cell; RNA interference

沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1, SIRT1)是 NAD⁺依赖的蛋白去乙酰化酶, 在体

内通过对组蛋白及多种非组蛋白赖氨酸残基进行去乙酰化修饰来调节基因表达, 参与细胞衰老、凋亡、分化等生理活动, 可能是所有生物共同的寿命调节基因之一^[1]。近年来研究发现许多肿瘤细胞系和人类肿瘤组织中 SIRT1 表达增高^[2]。本文通过研究慢病毒载体构建靶向 SIRT1 shRNA, 了解其对乳腺癌

作者介绍: 陶颖, Email: yingzi.1113@163.com,

研究方向: HBV 相关研究。

通信作者: 陈娟, Email: yixin_xinyuan@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81201282)。

细胞株 MCF-7 增殖能力的影响,初步探讨 SIRT1 在肿瘤形成中的重要作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Xho I、*Hpa* I 酶(NEB,美国),质粒载体 pLentilox3.7 由香港中文大学柯子斌教授惠赠,慢病毒包装质粒及包装细胞 293FT(Invitrogen,美国),质粒大抽试剂盒(QIAGEN,德国),T4 DNA 连接酶(NEB,美国),Trizol 试剂(Invitrogen,美国),逆转录试剂盒(Promega,美国),SIRT1 抗体(Abcam,英国) β -Actin 抗体(Sigma-Aldrich,美国),辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的驴抗兔 IgG 抗体(GE healthcare 公司,美国),凋亡检测试剂盒(Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit,Abcam 公司)。

1.2 方法

1.2.1 SIRT1 的 shRNA 载体构建 根据 GenBank 中 SIRT1 基因的核苷酸序列(NM_001142498.1)和 shRNA 的设计原则,结合网上在线设计软件,对它们的共同序列筛选出 2 条干扰靶点序列和 1 条非特异性靶序列,DNA 序列由华大基因公司合成。将化学合成的正义链和反义链退火,形成 shRNA 表达模板,与经 *Xho* I、*Hpa* I 酶切后的含有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)的载体 pLentilox3.7 连接,经筛选、酶切鉴定后再测序鉴定。所得质粒命名为 pshSIRT1-1、pshSIRT1-2、pshControl。

1.2.2 慢病毒空载体的包装与病毒滴度测定 将含有 GFP 的空载体 pLentilox3.7 与慢病毒包装质粒 pLP1、pLP2 和 pLP/VSVG 共转染 293FT 细胞。转染 24 h 后更换培养基,培养 48 h 后,收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液,对其浓缩 20 倍后得到高滴度的慢病毒浓缩液。病毒浓缩液感染 293FT 细胞,荧光显微镜下观察 GFP 表达情况,评价病毒感染效率。

1.2.3 SIRT1 shRNA 慢病毒感染 MCF-7 细胞 MCF-7 细胞采用含 10%胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的 MEM 培养基培养,常规换液传代。将细胞接种于 6 孔板中,每孔接种 2×10^5 个细胞。第 2 天细胞生长密度达 50%左右,用含有 4 μ g/ml 聚凝胺和 10%FBS 的细胞培养液稀释到相应滴度的病毒液进行感染。

1.2.4 SIRT1 shRNA 慢病毒对 MCF-7 细胞中 SIRT1 mRNA 和蛋白水平沉默效率 将表达 pshSIRT1-1、pshSIRT1-2、pshControl 的慢病毒分别感染 MCF-7 细胞。感染后 3 d 收集细胞,Trizol 法抽提总 RNA,逆转录后进行荧光定量 PCR,具体操作按试剂盒说明书。同样感染 3 d 后收集细胞,提取各细胞总蛋白后 BCA 法测蛋白浓度。30 μ g 蛋白样品变性后经 8%SDS-PAGE 电泳后,将蛋白转移至硝酸纤维素膜。5%脱脂奶粉封闭 1 h,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育摇床过夜(SIRT1 抗体 1:3 000 稀释),TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,二抗室温孵育 2 h(二抗为 HRP 标记的驴抗兔 IgG 1:3 000 稀释),用 TBST 洗膜后,电化学发光(electrochemiluminescence,ECL)法显影。以 β -actin

为内参。

1.2.5 台盼蓝排斥实验检测 MCF-7 细胞的增殖 用表达 shSIRT1-1 和 shSIRT1-2 的慢病毒感染 MCF-7 细胞,感染的第 3、4、5 天分别用台盼蓝染色,分别计数细胞数,以表达 scramble shRNA 的慢病毒作为对照。每个实验 1 式 3 份,均独立进行。

1.2.6 流式细胞仪(flow cytometry,FCM)检测 MCF-7 细胞的凋亡 将表达 shSIRT1-1、shSIRT1-2 和 scramble shRNA 的慢病毒分别感染 MCF-7 细胞 4 d 后,PBS 洗涤贴壁细胞 1 次,加入适量胰酶消化细胞,用培养基重悬细胞,避免胰酶的过度消化。取 3×10^5 个重悬的细胞,1 000 g 离心 5 min,弃上清,加入 500 μ l Annexin V-PE 结合液轻轻重悬细胞,加入 5 μ l Annexin V-PE,轻轻混匀,室温(20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C)避光孵育 5 min,随即进行 FCM 检测。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计学处理,数据以($\bar{x} \pm s$)形式表示。多样本均数比较用单因素方差分析,其两两比较采用 LSD-*t* 法。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧),以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SIRT1 的 shRNA 载体构建

合成的 SIRT1 的 shRNA 寡核苷酸链见表 1。序列测序结果表明 SIRT1 的 shRNA 插入序列正确。所得克隆质粒及载体基本结构如图 1。

表 1 合成 shRNA 序列
Tab.1 Sequences of synthesized shRNAs

基因	序列
shSIRT1-1	正义链:5'-TGCGGGAATCCAAAGGATAATTTT - CAAGAGAAATTATCCTTTGGATTCCCGCTTTTTC
	反义链:5'-TCGAGAAAAAGCGGGAATCCAAAGGA - GAAGGTCTCTTGAAATTATCCTTTGGATTCCCGA-3'
shSIRT1-2	正义链:5'-TCCTCGAACAAATCTTAAAGATTTCAA - GAGAATCTTTAAGAATTGTTTCGAGTTTTC-3'
	反义链:5'-TCGAGAAAAACCTCGAACAAATCTTAAA - GGATTCTCTTGAAATCTTTAAGAATTGTTTCGAGGA - 3'
shControl	正义链:5'-TGCAACAAGATGAAGACACCAATTCAA - GAGATGGTGCTCTTCATCTTGTGTTTTTTC-3'
	反义链:5'-TCGAGAAAAAACAACAAGATGAAGAG - CACCAACTCTTGAAATGCTCTTCATCTTGTTCGA - -3'

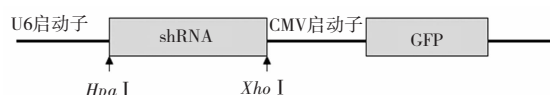
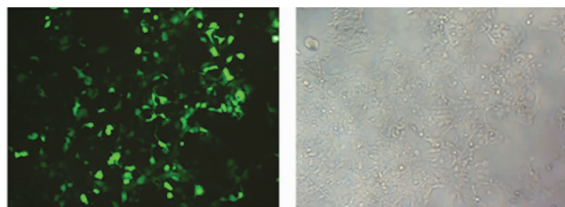


图 1 质粒构建示意图

Fig.1 Diagram of plasmid construction

2.2 慢病毒空载体的包装及病毒滴度测定

以 293FT 细胞能够发出绿色荧光的细胞比例来检测病毒包装效率。因载体带有 GFP, 包被的病毒感染 293FT 细胞 48 h 后, 在荧光显微镜下观察到大于 80% 的细胞均能表达绿色荧光(图 2)。根据公式, 病毒滴度(IU/ml)=荧光细胞占总细胞数的百分比 $\div 5 \times 1.5 \times 10^5 \times 10^3$, 计算出病毒滴度达 $(2.5 \sim 3.0) \times 10^7$ TU/ml, 说明病毒成功包装, 包装效率足以满足后续 RNA 干扰的要求。



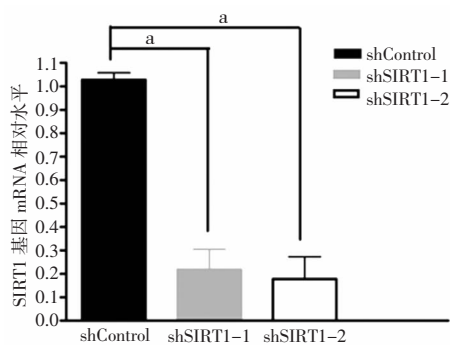
A. 蓝色激发光下的 293FT 细胞 B. 自然光下的 293FT 细胞

图 2 荧光显微镜观察 293FT 细胞中 GFP 的表达 (200 ×)

Fig.2 Expressions of GFP in 293FT under fluorescence microscopy (200 ×)

2.3 慢病毒感染 MCF-7 细胞后 SIRT1 的 mRNA 水平

以 2- $\Delta\Delta C_t$ 分析法比较 SIRT1 mRNA 水平定量检测结果。以 shControl 组细胞中 SIRT1 的 mRNA 水平为对照(即 100%), 图 3 结果显示 shSIRT1-1 和 shSIRT1-2 组细胞中表达量仅为对照组的 21% 和 19%, 即抑制率分别高达 79% 和 81%。说明与对照细胞相比, shSIRT1-1 和 shSIRT1-2 对 MCF7 细胞中 SIRT1 的 mRNA 水平表达具有抑制效果(shControl vs. shSIRT1-1: $P=0.0002$; shControl vs. shSIRT1-2: $P=0.0001$)。



a, 与 shControl 组相比, 差异有统计学意义

图 3 Real-time PCR 检测 SIRT1 mRNA 水平

Fig.3 mRNA level of SIRT1 in MCF-7 determined by real-time PCR

2.4 慢病毒感染 MCF-7 细胞后 SIRT1 的蛋白水平

Western blot 的检测结果显示, 与 shControl 相比, 2 个 shSIRT1 慢病毒感染组 MCF-7 细胞 SIRT1 蛋白的表达量明显下调, 抑制率高达 60%~70% 左右, 见图 4。以上结果说明 2 个独立的 shRNA 均有效抑制了 MCF-7 细胞中 SIRT1 的表达。

2.5 SIRT1 基因沉默对 MCF-7 细胞增殖的影响

表达 shSIRT1-1、shSIRT1-2 和 scramble shRNA 的慢病毒分别感染 MCF-7 细胞后在不同的时间点观察 SIRT1 的基

因沉默对细胞增殖的影响。台盼蓝排斥实验结果显示感染表达 shSIRT1-1、shSIRT1-2 慢病毒的乳腺癌细胞呈现了明显的生长抑制。表达 shSIRT1-1 或 shSIRT1-2 的慢病毒感染细胞 4 d 后抑制作用明显, 并且感染病毒后 6 d 这种生长抑制一直持续存在, 见图 5。

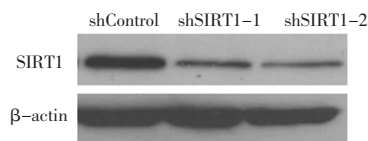


图 4 Western blot 检测 SIRT1 蛋白水平

Fig.4 Protein level of SIRT1 in MCF-7 determined by Western blot

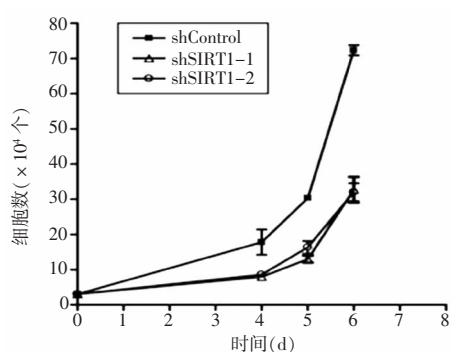


图 5 SIRT1 沉默对 MCF-7 细胞增殖的影响

Fig.5 Effects of SIRT1 silence on MCF-7 cell proliferation

2.6 SIRT1 基因沉默对 MCF-7 细胞凋亡的影响

将表达 shSIRT1-1、shSIRT1-2 和 scramble shRNA 的慢病毒分别感染 MCF-7 细胞 4 d 后, 收集细胞进行 FCM 分析。结果显示感染 shControl 的细胞中约有 $(6.2 \pm 2.1)\%$ 处于凋亡; 而感染 shSIRT1-1 的细胞约有 $(23.0 \pm 2.1)\%$ 处于凋亡状态, 感染 shSIRT1-2 的细胞中约有 $(21.0 \pm 3.2)\%$ 处于凋亡状态, 即感染表达 shSIRT1-1、shSIRT1-2 慢病毒的乳腺癌细胞凋亡明显增加。差异具有统计学意义(shControl vs. shSIRT1-1: $P=0.0040$; shControl vs. shSIRT1-2: $P=0.0050$), 见图 6。

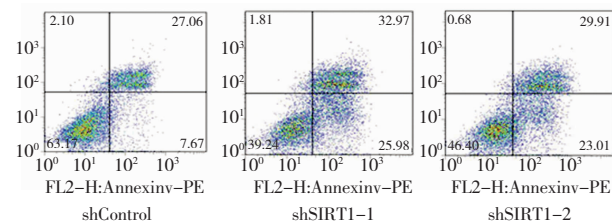


图 6 SIRT1 沉默对 MCF-7 细胞凋亡的影响

Fig.6 Effects of SIRT1 silence on MCF-7 cell apoptosis

3 讨论

慢病毒载体是以人类免疫缺陷型病毒为基础发展起来的基因治疗载体, 对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力, 携带基因容量大, 能够整合到

宿主细胞的基因组,并可以在体内进行长期的表达,不易诱发宿主免疫反应^[3]。慢病毒载体为自杀性病毒,即病毒感染目的细胞后不会再感染其他细胞,也不会利用宿主细胞产生新的病毒颗粒^[4]。因此与腺病毒载体和逆转录载体等方法相比,慢病毒载体不但具有高转导效率,持续表达,同时又具有免疫原性极小,安全性高等多个优点。目前由于 siRNA 半衰期短,某些细胞脂质体转染效率低等特点,因此 siRNA 介导的基因沉默的应用受到较大的限制。慢病毒载体能够产生表达 shRNA 的高滴度的病毒,在多种类型的细胞中实现特异而稳定的基因表达功能性沉默,成为细胞基因沉默、体内转基因甚至基因治疗最为合适的载体工具。目前国内外关于慢病毒载体介导 RNA 干扰的相关研究^[5]已显示了该技术在内源性基因功能研究和基因治疗领域的重大作用。

一系列研究表明,SIRT1 在许多肿瘤细胞系和人类肿瘤组织中表达增高^[6],SIRT1 去乙酰化修饰多种非组蛋白底物,包括转录因子 p53、核转录因子- κ B、FOXO、DNA 结合蛋白 Ku70 等^[7]。这些底物与肿瘤细胞凋亡及增殖密切相关。随着与 SIRT1 相互作用的分子不断发现,SIRT1 特异性敲除和转基因深入研究,SIRT1 在肿瘤形成中的重要作用受到了广泛关注。目前关于 SIRT1 在乳腺癌的作用尚存争议。Ota 等^[8]发现 SIRT1 的抑制因子 Sirtinol 可以抑制乳腺癌细胞的生长并显著诱导 MCF-7 细胞的老化。然而 Wang 等^[9]在抑癌基因 BRCA-1 相关性乳腺癌组织中 SIRT1 的表达水平明显降低,并且 SIRT1 的激活可以抑制乳腺癌细胞的增殖。以上研究提示 SIRT1 与乳腺癌的发生发展有着密切关系,但其究竟对肿瘤起促进或抑制作用则需要更深入的研究。本研究发现 SIRT1 沉默能明显抑制乳腺癌细胞的增殖,提示 SIRT1 在乳腺癌中的高表达对于维持肿瘤细胞的恶性增殖起着至关重要的作用。进一步发现 SIRT1 沉默能显著诱导乳腺癌细胞的凋亡,但其抑制乳腺癌细胞增殖并诱导其凋亡的具体分子机制则有待下一步的深入研究。Elangovan 等^[10]人认为 SIRT1 与雌激素受体 α 协同作用共同促进乳腺癌的发生发展,SIRT1 沉默能明显抑制雌激素/雌激素受体介导的乳腺癌细胞的增殖,并促进其凋亡。近年其他研究也表明,SIRT1 去乙酰化修饰多种非组蛋白底物,从而参与了多种与凋亡密切相关的信号通路,这些信号分子包括 p53、FOXO、Ku70 等。因此猜

测 SIRT1 可能通过乙酰化某些关键的凋亡相关信号分子,从而参与了乳腺癌细胞的凋亡过程。

本研究成功利用慢病毒系统构建靶向 SIRT1 shRNA 的载体,并能显著沉默靶细胞 MCF-7 中目的基因 SIRT1 的 mRNA 和蛋白表达,而且 SIRT1 沉默后,MCF-7 的增殖能力受到明显抑制,其凋亡明显增加。以上研究结果提示 SIRT1 参与了乳腺癌的增殖和凋亡过程,为下一步进行乳腺癌中 SIRT1 的功能学实验研究奠定了基础,同时该系统的建立为乳腺癌基因治疗的探索提供新的方向。

参 考 文 献

- [1] Dirks A J, Leeuwenburgh C. Tumor necrosis factor alpha signaling in skeletal muscle: effects of age and caloric restriction[J]. *J Nutr Biochem*, 2006, 17(8): 501-508.
- [2] Kuzmichev A, Margueron R, Vaquero A, et al. Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(6): 1859-1864.
- [3] Jakobsson J, Lundberg C. Lentiviral vectors for use in the central nervous system[J]. *Mol Ther*, 2006, 13(3): 484-493.
- [4] Robinson D A, Dillon C P, Kwiatkowski A V, et al. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference[J]. *Nat Genet*, 2003, 33(3): 401-406.
- [5] Hui E K, Yap E M, An D S, et al. Inhibition of influenza virus matrix(M1) protein expression and virus replication by U6 promoter-driven and lentivirus-mediated delivery of siRNA[J]. *J Gen Virol*, 2004, 85(Pt7): 1877-1884.
- [6] Kuzmichev A, Margueron R, Vaquero A, et al. Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(6): 1859-1864.
- [7] 冯安宁, 樊祥山, 黄勤, 等. 沉默信息调节因子 1 在肿瘤形成中的作用机制[J]. *医学研究生学报*, 2009, 22(7): 767-769.
- [8] Ota H, Tokunaga E, Chang K, et al. Sirt1 inhibitor, Sirtinol, induces senescence-like growth arrest with attenuated Ras-MAPK signaling in human cancer cells[J]. *Oncogene*, 2006, 25(2): 176-185.
- [9] Wang R H, Zheng Y, Kim H S, et al. Interplay among BRCA1, SIRT1, and Survivin during BRCA1-associated tumorigenesis[J]. *Mol Cell*, 2008, 32(1): 11-20.
- [10] Elangovan S, Ramachandran S, Venkatesan N, et al. SIRT1 is essential for oncogenic signaling by estrogen/estrogen receptor α in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(21): 6654-6664.

(责任编辑:冉明会)