

神经病学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000459

Kir 4.1 基因沉默对 U-251 细胞周期的影响

朱淑娟, 甘胜伟, 汪克建, 冉建华, 徐 进, 骆世芳, 孙善全

(重庆医科大学基础医学院人体解剖教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:针对人内向整流性钾离子通道(inwardly rectifying potassium channel protein, Kir)4.1 基因构建 siRNA 干扰载体, 探讨其对 U-251 细胞增殖、生长的影响, 为临床治疗及开发新的抗肿瘤药物提供实验依据。**方法:**采用细胞培养、质粒转染、流式分选、RT-PCR、Western blot 及流式细胞仪对构建的质粒进行鉴定并观察对照组和干扰组细胞周期的变化。**结果:**对 DH5 α 中抽提的重组载体测序验证结果和插入序列一致;成功筛选出一个有效质粒;质粒转染 U-251 细胞后, 细胞周期中的 G2 期细胞数量由 19.39% 降至 1.5%, 明显减少($P=0.018$), S 期细胞数量由 36.32% 升至 51.22%, 明显增多($P=0.027$)。**结论:**成功构建针对人 Kir 4.1 基因的 siRNA 干扰载体;Kir 4.1 干扰载体可能是通过抑制 U-251 细胞周期中的 G2 期, 使 U-251 细胞的生长停滞在 S 期, 从而达到干扰 U-251 细胞的增殖能力。

【关键词】Kir 4.1; 基因沉默; 细胞周期**【中图分类号】**R739.41**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-01-22

Effect of Kir 4.1 gene knockdown on cell cycle of U-251 cells

Zhu Shujuan, Gan Shengwei, Wang Kejian, Ran Jianhua, Xu Jin, Luo Shifang, Sun Shanquan

(Teaching and Research Section of Human Anatomy, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To construct the siRNA expression vector which targeted the human Kir 4.1 gene, to study the impact of the Kir 4.1 on the proliferation of U-251 by RNAi and to explore the new method in astrocytoma treatment. **Methods:** Cell culturing, transforming, flow cytometry screening, RT-PCR and Western blot were used to detect recombinant plasmid and investigate the cell cycle change(G1 phase, S phase and G2 phase) of U-251 cell in control group, negative control group and transformed cells. **Results:** Three interference vectors were constructed successfully. A plasmid which didn't induce Kir 4.1 mRNA production was obtained. Flow cytometry screening showed that the cell number in each phase of negative control group had no apparent difference while in the transformed group the cell number in G2 phase decreased from 19.39% to 1.5% ($P=0.018$), the cell number in S phase increased obviously from 36.32% to 51.22% ($P=0.027$). **Conclusion:** The siRNA expression vector which targeted the human Kir 4.1 is constructed successfully. Kir 4.1 gene is silenced in the transformed U-251 cells by siRNA expression vector. U-251 cell stops at S phase probably by inhibiting the G2 phase, which can decrease cell proliferation.

【Key words】kir 4.1; gene knockdown; cell cycle

星形细胞瘤是一种十分常见的脑肿瘤, 严重危害人类健康, 目前发病机制仍不甚清楚。因此, 研究星形细胞瘤的发生发展、探寻新的治疗手段迫在眉睫。

内向整流性钾离子通道(inwardly rectifying potassium channel protein, Kir)4.1 是 Kir 的一个亚型, 对 K⁺具有强大的内向整流作用, 在中枢神经系统主要表达在星形胶质细胞终足膜^[1-2], 通过调节星形胶质细胞的静息膜电位, 维持细胞内外离子和渗透平衡, 保证正常神经元的活性、兴奋性和突触的功能^[2]。课题组发现, Kir 4.1 的表达变化与星形细胞瘤的恶性程度呈正相关。在胶质瘤细胞增殖生长过程中, 可能随着 Kir 4.1 的表达增强, K⁺内流增多, 激活 Na⁺-K⁺-ATP 酶和 Na⁺/H⁺离子交换泵(Na⁺/H⁺ exchanger-1, NIE-1)的活性, 调节细胞内外 pH 值, 影响细胞增

作者介绍: 朱淑娟, Email: zhushujuan75@126.com,

研究方向: 胶质瘤, 阿尔茨海默病。

通信作者: 孙善全, Email: sunsq2151@sohu.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 30771109); 重庆市科委基础与前沿资助项目(编号: cstc2014jcyjA10028); 重庆医科大学基础医学院资助项目(编号: 2013-5)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150112.1717.024.html>

(2015-01-12)

殖;另一方面,细胞的增殖、凋亡、分化和衰老与细胞周期依赖性密切相关,细胞周期调控过程中的多种调节因子有序激活和灭活,启动细胞周期循环过程。大量研究表明,选择以调控细胞周期为策略,将是抗肿瘤治疗的新途径之一^[3-5],但是 Kir 4.1 在胶质瘤中的高表达与细胞周期是否具有相关性,目前尚未见报道。

为此,本实验针对人 Kir 4.1 基因构建 siRNA 干扰载体,并将其转染至人 U-251 细胞系,采用流式分选技术、RT-PCR 技术、Western blot 及流式细胞仪对构建的质粒进行鉴定,观察对照组和干扰组 U-251 细胞的周期变化,探讨 siRNA 靶向 Kir 4.1 基因沉默对 U-251 细胞增殖、生长的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验所用 U-251 细胞株购自上海卓诺生物有限公司。DH5 α 感受态细胞购自天根生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 siRNA 干扰载体的构建

1.2.1.1 siRNA oligos 序列的设计与重组 针对 GenBank 中人 Kir 4.1 基因设计干扰序列并合成 3 个 siRNA oligos(表1)。退火后序列的亚克隆到 pcDNA6.2TM-GW/EmGFP-miR 载体中。

1.2.1.2 双链 DNA 的退火和装载 将 3 对寡聚单链 DNA 退火成双链。然后用载体构建试剂盒 BLOCK-iTTM Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP(invitrogen, Catalog no. K4936-00)进行重组克隆,将 3 对双链的 siRNA oligo 分别插入到 siRNA 表达载体 pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR 中(invitrogen, Catalog no. K4936-00),构建 3 个 siRNA 表达质粒(分别编号为 12、23、31;NC 即为阴性对照),并转化至感受态细胞 DH5 α 。

1.2.1.3 质粒的抽提与质检 常规倒板、划菌后,37℃隔水恒温培养箱内培养,12 h 后挑取单菌落置于含壮观霉素的 LB 培养基内 37℃,230 r/min 恒温培养振荡器内孵育,16 h 左右进行质粒抽提,按照去内毒素质粒小抽试剂盒说明操作。上海英俊生物技术有限公司(invitrogen)进行测序验证。按照 1:35 比例稀释 2 μ l 质粒后,酶标仪测定浓度,选择 A_{260 nm}/A_{280 nm} 比值在 1.8~2.0 之间的质粒。

1.2.2 细胞培养、转染及后续分组情况 U-251 细胞常规培养,待培养瓶中的细胞长至 80%时,接种在 6 孔板内,每孔 2 ml,密度达到(4~5) $\times 10^5$ 个/ml。培养 24 h 后,按照 Lipo-fectamine2000 转染说明书操作,48 h 后进行流式分选及各项指标检测。后续试验分组:RT-PCR 实验设置了空白对照组、阴性对照组和 3 个质粒转染后的干扰组;Western blot 实验设置了空白对照组、阴性对照组和一个有效干扰组;流式细胞仪实验设置了空白对照组、阴性对照组和一个有效干扰组。

1.2.3 干扰载体的鉴定

1.2.3.1 RT-PCR 收集流式分选后的细胞,在 4℃低温离心机 2 000 r/min 离心 3 min 后,弃上清,加入适量 TRIZOL 裂解液(按照说明比例加入),其余步骤和提取组织 RNA 相同。上海 invitrogen 公司合成引物。Kir 4.1 引物序列如下:正向引物:5'-gcgctacaagcttctgctct-3',反向引物:5'-gaggaaggctccag-tgagt-3',扩增片段长 169 bp;2%琼脂糖凝胶电泳后,紫外分光光度仪观察,凝胶成像仪照相。

1.2.3.2 Western blot 提取细胞总蛋白后(按照碧云天 Western 及 IP 组织与细胞裂解液说明书操作),SDS-PAGE 凝胶分离蛋白,通过湿转方式将蛋白转至硝酸纤维膜上,封闭液室温封闭 2 h,分别加入羊抗人 Kir 4.1(1:1 000)和小鼠抗人 β -actin(1:3 000),4℃过夜孵育,PBST 洗膜后,滴加兔抗羊 IgG 和兔抗小鼠 IgG(1:5 000),室温孵育 2 h,PBST 洗膜后 DAB 试剂盒显色,用 Quantity one 软件转换后测定灰度值。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期 用 PBS 将细胞洗 2 遍之后,加入适量 0.25%胰蛋白酶消化细胞,1 000 r/min 低速离心 5 min,弃去上清;加入 PBS,1 000 r/min 低速离心 5 min,弃去上清;缓慢加入 70%酒精,边加边振荡,制成单细胞悬液,4℃冰箱放置 1 h,流式细胞仪分选转染细胞和转染细胞细胞周期的检测。此部分实验重复 6 次。

表 1 miRNA 寡聚单链 DNA 序列

Tab.1 Sequence of miRNA oligomerization single-stranded DNA

oligo	寡聚单链 DNA 序列(5' to 3')
1F	TGCTGAGGAGAGGCCACTTTTACAAACGTTTTGGCCACTGACTGACGTTGTGAATGGCCTCTCCT
1R	CCTGAGGAGAGGCCATTTCACAAACGTCAGTCAGTGGCCAAAACGTTGTGAAAAGTGGCCTCTCCTC
2F	TGCTGACAGCTACCAGATACCACACCGTTTTGGCCACTGACTGACGCTGTGCTGTGCTAGCTGT
2R	CCTGACAGCTACCAGACCACACCGTCAGTCAGTGGCCAAAACGCTGTGCTATCTGCTAGCTGTC
3F	TGCTGAGAAGAGGAAGGCTCCAGTGAAGTTTTGGCCACTGACTGACTCACTGGAAGTTCCTCTTCT
3R	CCTGAGAAGAGGAAGTCCAGTGAAGTCAGTCAGTGGCCAAAACCTCACTGGAAGCTTCCTCTTCTC
	阴性对照
Negative-F	TGCTGAAATGTAAGTCCGCTGGAGACGTTTTGGCCACTGACTGACGTTCTCCACGCAGTACATTT
Negative-R	CCTGAAATGTAAGTCCGCTGGAGACGTCAGTCAGTGGCCAAAACCTCTCCACGCAGTACATTTc

1.3 统计学分析

实验数据均用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 13.0 软件对所有数据进行统计学分析,采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 单菌落形成及测序结果

经过 37 °C 培养后,菌板上单一菌落生长态势较好(图略),经单菌落大量培养后,提取质粒,测定的质粒浓度均在 300~450 $\mu\text{g/ml}$ 之间, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 在 1.8~2.0 之间,提取质粒浓度较高,纯度好,满足后续转染实验。编号为 12、23、31 的重组载体经测序后,结果表明插入序列完全正确,测序彩图截图如图 1。

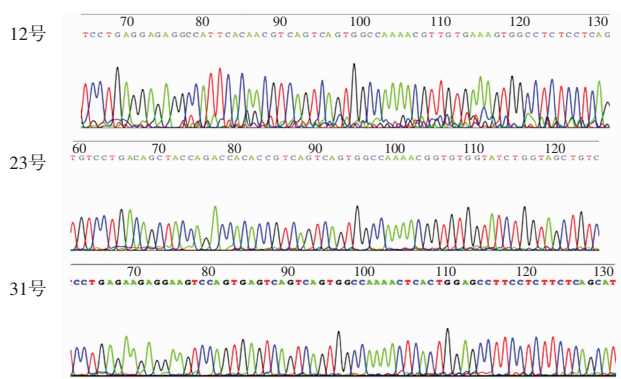
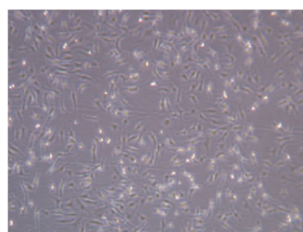


图 1 重组载体测序截图

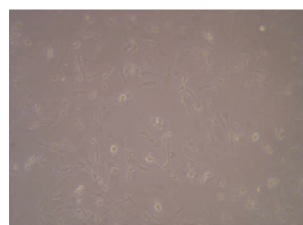
Fig.1 Part of sequencing graph of plasmid

2.2 流式分选

经流式分选后转染的细胞达到 100%,收集用于后续 Western blot、RT-PCR、细胞周期观察等实验。培养的正常对照 U-251 细胞和转染后的 U-251 细胞形态见图 2。



A. 正常对照组 U-251 细胞



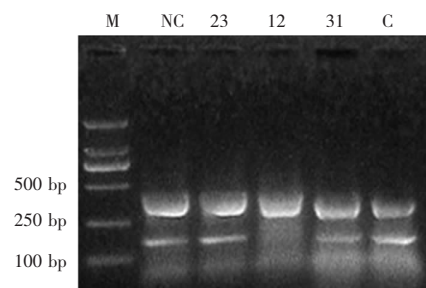
B. 转染 48 h 后 U-251 细胞

图 2 细胞图片

Fig.2 Pictures of cultured cells

2.3 RT-PCR 和 Western blot 初筛结果

RT-PCR 和 Western blot 二者实验结果一致显示:在设计 3 个干扰载体转染细胞组中,标记为 12 号的干扰组转染细胞内未见目的基因和蛋白表达。因此,选用标记为 12 号的 siRNA 表达载体进行后续实验。本实验成功筛选出具有干扰能力的干扰载体(图 3、4)。

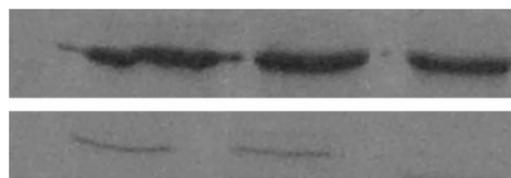


M: Marker; NC: 阴性对照组; C: 空白对照组;

12、23、31 分别是 3 个干扰组

图 3 RT-PCR 显示阴性对照组和各干扰组的 Kir 4.1 mRNA 表达情况

Fig.3 Expression of Kir 4.1 mRNA between negative control and interfering group



A. 空白对照组 B. 阴性对照组 C. 干扰组

图 4 Western blot 显示 Kir 4.1 蛋白表达

Fig.4 Expression of Kir 4.1 protein detected by Western blot

2.4 流式细胞仪检测细胞周期结果

和空白对照组相比较(表 2,图 5),阴性对照组细胞周期中各个期细胞数量没有明显变化,而干扰组 G2 期细胞数量由 19.39%降至 1.5%,明显减少,S 期细胞数量由 36.32%升至 51.22%,明显增多,提示干扰载体使细胞的生长停滞在了细胞周期中的 S 期。

表 2 Kir 4.1 干扰载体对 U-251 细胞周期的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab.2 Effect of kir 4.1 interference vector on cell cycle in U-251 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

分组	G1(%)	S(%)	G2(%)
空白对照组	49.15 $\pm$ 1.82	36.63 $\pm$ 1.12	15.09 $\pm$ 0.78
阴性对照组	48.67 $\pm$ 1.79 ^a	37.08 $\pm$ 1.08 ^a	14.89 $\pm$ 0.83 ^a
干扰组	47.98 $\pm$ 1.89 ^{bc}	51.45 $\pm$ 1.20 ^{bc}	1.19 $\pm$ 1.85 ^{bc}
F 值	11.105	0.103	804.07
P 值	0.887	0.027	0.018

注:①本表仅公布干扰组与空白对照组数据比较后 *P* 值的结果(b);
②a,与空白对照组比较, $P>0.05$;③c,代表与阴性对照组数据比较, G1 期, $P=0.895$; S 期, $P=0.025$; G2 期, $P=0.017$

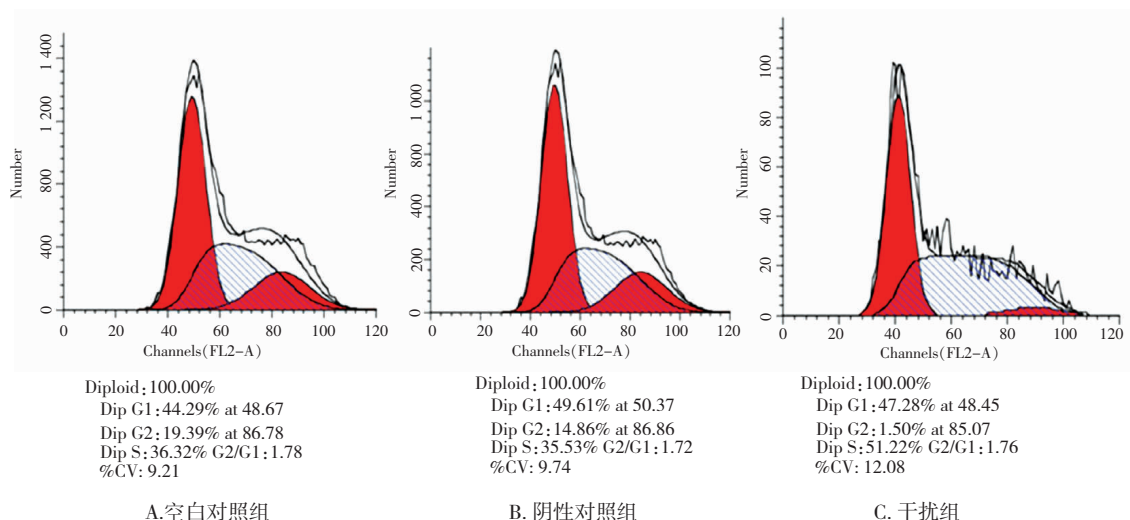


图 5 流式细胞仪检测对照组和干扰组 U-251 细胞周期各个期的细胞数量

Fig.5 Cell numbers of each stage in cell cycle of U-251 demonstrated by flow cytometry

3 讨论

据报道^[6-7],脑肿瘤细胞在其恶性增殖的过程中,伴随着细胞含水量的增加,细胞容积增大,细胞内环境碱化。大量实验已表明,人星形细胞瘤不同病理级别组织中,水通道蛋白家族(aquaporins, AQP)s部分成员及 Kir 4.1 的表达与胶质瘤恶性程度密切相关^[8-13],水通道蛋白表达含量增加,肿瘤细胞膜内外水渗透性增强,细胞所需营养因子转运增多;Kir 4.1 的大量开放,将 K^+ 从细胞外转向细胞内^[14],影响肿瘤细胞内环境的酸碱度,促使其增殖^[15]。由此可见,细胞内 pH 值(pHi)变化在肿瘤细胞的增殖、生长过程中具有十分重要的意义。实验证明肿瘤细胞 pHi 值高于细胞外^[16]。因此,本实验尝试设计了针对人 Kir 4.1 基因的 siRNA 干扰载体,并将其转染至 U-251 细胞系,探讨星形细胞瘤增殖、生长的可能机制。结果展示:①本研究成功筛选出了抑制 Kir 4.1 基因表达的 siRNA 片段;②初步鉴定了其诱导 U-251 细胞周期的改变:与对照组相比,干扰组 G2 期的细胞数量显著下降,而 S 期细胞数量显著增多,提示该 siRNA 片段具有明显干扰作用,它使细胞生长停滞在细胞周期中的 S 期,阻止细胞增殖。

本研究不足与展望:

目前有关基因转染的方法有多种,如:磷酸钙法、电穿孔法和脂质体法。脂质体转染法效率一般较高,对细胞毒性小,安全;电穿孔法次之;磷酸钙

法转染效率最低。3 种方法各有其优缺点。本实验中选用 invitrogen 公司的 Lipofectamine2000 脂质体转染试剂,该试剂在多种细胞系中均具有较高的转染效率和较高的重组蛋白表达,在有血清的条件下也可保证转染效率。然而,本实验中转染效率低下一直是困扰本实验的主要问题。在本实验中,最常用的脂质体与质粒 DNA 的比例不能完全达到转染的要求,经过摸索脂质体与质粒 DNA 优化比例的条件之后,转染率最高仅达到 19%,依然难以找到达到或超过 70%转染率比例的最佳条件。为获得更多转染细胞,本实验最终采用了大量培养细胞,转染后再经流式细胞仪分选的技术,用以进行后续实验。分析转染率偏低的原因可能有以下 2 条:①U-251 细胞不适合脂质体转染方式;②构建的质粒本身不容易被转入细胞内。在一般情况下,利用慢病毒作为载体转染细胞,其转染率可达到 90%以上,因此,寻找新的转染途径至关重要,采用慢病毒包装方式可能会取得较好的干扰效果。

其次, Na^+-K^+-ATP 酶是维持细胞内外 Na^+-K^+ 浓度梯度的关键酶,不仅参与离子转运、蛋白转运、维持离子平衡,而且在脊椎动物胚胎发育、神经元导向、中枢神经系统发育、细胞形态维持、细胞黏附等方面发挥重要作用。据报道, Na^+-K^+-ATP 酶的 α 亚基特异表达在多种恶性肿瘤组织中^[17-22],包括胶质瘤^[23]。NIE-1 也参与了肿瘤细胞内的氢离子浓度调节。但是由于转染效率低下,本实验所涉及的细胞内外 pH 值的检测、 Na^+-K^+-ATP 和 NIE-1 等相关

指标的检测、以及 Kir 4.1 对 U-251 细胞周期的调节机制研究等均未完成,期待探索转染成功后做进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Li L, Head V, Timpe LC. Identification of an inward rectifier potassium channel gene expressed in mouse cortical astrocytes[J]. *Glia*, 2001 (33): 57-71.
- [2] Sicca F, Imbricci P, D'Adamo MC, et al. Autism with seizures and intellectual disability: possible causative role of gain-of-function of the inwardly-rectifying K⁺ channel Kir4.1[J]. *Neurobiology of Disease*, 2011, 43(1): 239-247.
- [3] Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, et al. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF[J]. *Cell*, 1997(91): 649-659.
- [4] Piva R, Cavalla P, Bortolotto S, et al. p27/kip1 expression in human astrocytic gliomas[J]. *Neurosci Lett*, 1997(234): 127-130.
- [5] Harper JW, Adami GR, Wei N, et al. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases[J]. *Cell*, 1993(75): 805-816.
- [6] Del Sole A, Falini A, Ravasi L, et al. Anatomical and biochemical investigation of primary brain tumors[J]. *Eur J Nucl Med*, 2001 (28): 1851-1872.
- [7] Pappas CA, Ullrich N, Sontheimer M. Reduction of glial proliferation by K⁺ channel blockers is mediated by changes in Φ [J]. *Neuroreport*, 1994(6): 193-196.
- [8] Tan G, Sun SQ, Yuan DL. Expression of Kir4.1 in human astrocytic tumours: correlation with pathological grade[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 367(4): 743-747.
- [9] Tan G, Sun SQ, Yuan DL. Expression of the water channel protein aquaporin-9 in human astrocytic tumours: correlation with pathological grade[J]. *J Int Med Res*, 2008, 36(4): 127-130.
- [10] 朱淑娟, 孙善全, 张兴业, 等. 水通道蛋白 1、5 在星形细胞瘤中的表达变化[J]. *解剖学杂志*, 2012, 35(3): 277-281.
- [11] 朱淑娟, 孙善全, 汪克建, 等. 水通道 4 和内向整流性钾通道 4.1 在星形细胞瘤组织中的共定位及表达差异[J]. *重庆医科大学学报*, 2013, 38(9): 974-978.
- [12] 张巍, 焦宇飞, 迟大鹏. 人脑胶质瘤组织中 VCAM-1 与水通道蛋白 4 的表达及意义[J]. *临床神经外科杂志*, 2013, 10(3): 189-191.
- [13] Zhu SJ, Wang KJ, Gan SW, et al. Expression of aquaporin8 in human astrocytomas: correlation with pathologic grade[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 440(1): 168-172.
- [14] Butt AM, Kalsi A. Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir 4.1 in glial functions[J]. *J cell Mol Med*, 2006, 10(1): 33-44.
- [15] Lang F, Busch GL, Ritter M, et al. Functional significance of cell volume regulatory mechanism[J]. *Physiol Rev*, 1998(78): 247-306.
- [16] Kraus M, Wolf B. Implications of acidic tumor microenvironment1 for neoplastic growth and cancer treatment: a computer analysis[J]. *Tumor Biol*, 1996(17): 133-154.
- [17] Espineda C, Seligson DB, Ball JW, et al. Analysis of the Na/K-ATPase α - and β -subunit expression profiles of bladder cancer using tissue microarrays[J]. *Cancer*, 2003(97): 1859-1868.
- [18] Sakai H, Suzuki T, Maeda M, et al. Up-regulation of Na⁺-K⁺-ATPase α 3-isoform and down-regulation of the α -isoform in human colorectal cancer[J]. *FEBS Lett*, 2004(563): 151-154.
- [19] Mijatovic T, Roland I, Van Quaquebeke E, et al. The α 1 subunit of the sodium pump could represent a novel target to combat non-small cell lung cancers[J]. *Pathol*, 2007(212): 170-179.
- [20] Boukerche H, Su ZZ, Kang DC, et al. Identification and cloning of genes displaying elevated expression as a consequence of metastatic progression in human melanoma cells by rapid subtraction hybridization[J]. *Gene*, 2004(343): 191-201.
- [21] Shibuya K, Fukuoka J, Fujii T, et al. Increase in ouabain-sensitive K⁺-ATPase activity in hepatocellular carcinoma by overexpression of Na⁺-K⁺-ATPase α 3-isoform[J]. *European J Pharmacology*, 2010(638): 42-46.
- [22] 张贵海, 文坤明, 张先平, 等. Na⁺-K⁺-ATP 酶表达对结直肠癌细胞增殖及侵袭力的影响[J]. *中国肿瘤临床*, 2012, 39(3): 121-125.
- [23] Senner V, Schmidpeter S, Braune S, et al. AMOG/ β 2 and glioma invasion: Dose loss of AMOG make tumor cells run amok? [J]. *Neuropathol, Appl Neurobiol*, 2003, 29(4): 370-377.

(责任编辑: 冉明会)

欢迎订阅, 敬请赐稿!