

doi: 10.3969/j.issn.1000-484X.2015.05.015

• 免疫学技术与方法 •

TNFAIP8 干扰质粒的构建及最佳干扰效率质粒的筛选^①

刘文明 杨晶晶^② 胡如意 邱兴烽 石春燕 齐忠权 刘忠臣 庄国洪
(厦门大学附属中山医院 厦门大学医学院抗癌研究中心 厦门 361005)

中图分类号 R73-35 文献标志码 A 文章编号 1000-484X(2015)05-0650-05

[摘要] 目的: 构建并筛选出干扰效率最佳的 TNFAIP8-shRNA-pSIREN-RetroQ 干扰质粒。方法: 通过生物软件选择 3 个 TNFAIP8 基因干扰位点 构建干扰质粒并测序验证 将干扰质粒及对照质粒分别转染至 A549 细胞 通过 RT-PCR、Western blot 检测干扰效率。结果: 经 RT-PCR 和 Western - Blot 证实 TNFAIP8-shRNA-pSIREN-RetroQ 干扰质粒能有效干扰并抑制细胞内 TNFAIP8 基因的表达 通过流式检测发现降低 TNFAIP8 表达可以提高细胞对 aDR5ScFv 诱导凋亡的敏感性。结论: 成功构建和设计了对 TNFAIP8 基因具有显著干扰效率的干扰质粒 ,为进一步研究 TNFAIP8 基因的功能奠定了基础。

[关键词] TNFAIP8; RNA 干扰; 重组质粒; 筛选

Construction and identification of interference plasmid targeting on TNFAIP8

LIU Wen-Ming ,YANG Jing-Jing ,HU Ru-Yi ,QIU Xing-Feng ,SHI Chun-Yan ,QI Zhong-Quan ,LIU Zhong-Chen ,ZHUANG Guo-Hong. The Department of Digestive Zhongshan Hospital Anti-Cancer Research Center ,Xiamen University ,Xiamen 361005 ,China

[Abstract] **Objective:** To construct and screen the high efficiency interference plasmid of TNFAIP8-shRNA-pSIREN-RetroQ. **Methods:** Selected and synthesized three Target Sequence of TNFAIP8 shRNA1 ,TNFAIP8 shRNA2 ,TNFAIP8 shRNA3 ,and construct the TNFAIP8 interference plasmid. Transfection TNFAIP8-shRNA-pSIREN-RetroQ interference plasmid to A549 cells. Filter out the highest interference efficiency plasmid by detecting the mRNA and protein levels using RT-PCR and Western blot methods. **Results:** We successfully design and built three TNFAIP8-shRNA-pSIREN-RetroQ interference plasmids ,and screen out the highest efficiency interference plasmid. **Conclusion:** Three interference plasmids targeting the TNFAIP8 gene have been constructed successfully and provide a useful tool for studying the function of TNFAIP8.

[Key words] TNFAIP8; RNA interference; Recombinant plasmid; Screen

肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 8 (Tumor necrosis factor alpha-induced protein 8 ,TNFAIP8) 又称为 TIPE ,SCC-S2 ,GG2-1 ,MDC -3. 13 ,是 TNFAIP8 家族四个成员之一^[1] ,最初发现于人头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC) 细胞系 其核酸序列中开放阅读框架包含与调控细胞死亡蛋白 FLIP(Fas-associated death do-

main-like interleukin-1β-convertingenzyme-in-hibitory protein) 中死亡效应结构域 II (Death effector domain II ,DED II) 高度同源的序列 ,与 FLIP 不同的是 TNFAIP8 开放阅读框结构中只包含一个 DED 结构域 ,与促进细胞增殖和抑制细胞凋亡相关 ,是一个凋亡控制因子 ,过表达的 TNFAIP8 能够增加 DNA 合成、细胞增殖和抑制 caspase8 和 caspase3 的活化^[2,3]。近年研究发现 TNFAIP8 在信号转导、肿瘤发生发展及侵袭过程中具有重要的调控作用^[4]。

TNFAIP8 在乳腺癌、肾细胞癌、肺癌和食管鳞状细胞癌中都是高表达 ,且与肿瘤的分期、淋巴结转移及不良预后有明显相关^[5-7] ,但其具体机制尚不明确。目前与 TNFAIP8 基因功能相关的研究在不断继续 ,自从 RNA 干扰(RNA interference ,RNAi) 技术问世以来 ,它已经成为一项非常特异、高效的工具被广泛应用于各种基因功能研究中 利用 RNA 干扰技术特异性剔除或关闭目的基因的表达能深入研究目

①本文受国家自然科学基金项目(81272720) 、福建省卫计委医学创新课题(2014-CXB-43) 和厦门市科技计划项目(3502Z2083008) 资助。

②共同第一作者。

作者简介: 刘文明(1980 年 -) 男 在读博士 主治医师 主要从事消化系统肿瘤的研究 ,E-mail: civilise2008@ 163. com。

通讯作者及指导教师: 庄国洪(1969 年 -) 女 博士 副教授 主要从事自身免疫及肿瘤免疫的研究 ,E-mail: zhgh@ xmu. edu. cn。

刘忠臣(1965 年 -) 男 博士 教授 主要从事胃肠道肿瘤的基础研究 ,E-mail: lzc @ xm. zsh. com。

的基因的功能和特性^[8]。

本文旨在构建针对 TNFAIP8 基因的高效干扰质粒,从而实现 TNFAIP8 基因在细胞水平和整体动物水平的表达抑制,为深入研究 TNFAIP8 功能及在信号转导通路中的作用,进一步揭示 TNFAIP8 在肿瘤发生发展中的可能机制提供有效帮助。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 T4 DNA Ligase、BamH I 限制性内切酶、EcoR I 限制性内切酶、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time) 购自宝生生物工程(大连)有限公司; PCR 产物胶回收试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司; DNA Ladder 购自 Fermentas; Lipfectamine 2000 购自 Invitrogen; PI 和 Annexin V-FITC 购于凯基生物科技有限公司; PCR 引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成; 质粒测序由上海英骏公司完成。其他试剂由本实验室提供。

1.1.2 载体和菌种 shRNA 载体 pSIREN-RetroQ 由厦门大学医学院金光辉老师馈赠, E. coli DH5 α 菌株由本实验室保存, 引物及干扰片段由高淑彬老师设计, 上海 Sangon 合成, 人肺腺癌细胞系 A549 细胞株由厦门大学医学院抗癌研究中心保存。

1.2 方法

1.2.1 TNFAIP8 干扰质粒的构建

1.2.1.1 RNA 干扰片段的设计与合成 取 pSIREN-RetroQ 为 shRNA 载体。转化提取质粒 pSIREN-RetroQ 后, 用限制性内切酶 BamHI 和 EcoRI 对质粒 pSIREN-RetroQ 进行双酶切, 双酶切后采用 TIANGEN Universal DNA 纯化回收试剂盒纯化回收 DNA 溶液。

登陆 GeneBank 查找并获取人源性 TNFAIP8 基因序列, 从 TNFAIP8 的 ORF 中选择评分最高的靶序列位点三处, 分别命名为 TNFAIP8 shRNA1; TNFAIP8 shRNA2; TNFAIP8 shRNA3 (CGTTCAGGCCAAAAGAAG; GAGGCAGAGAAGATCATCA; GAGC TAGCATTGATGGAGA)。利用 SiRNA Construct Builder 软件构建 TNFAIP8 干扰片段序列(含黏性末端)。将该序列送至上海 sangon 合成 DNA 单链: TNFAIP8-shRNA-F、TNFAIP8-shRNA-R 和 TNFAIP8-shRNA-F: TNFAIP8-shRNA-R(1:1), 退火形成互补片段。酶切后的胶回收的质粒和退火片段用 T4 连接酶连接。

1.2.1.2 TNFAIP8-shRNA-pSIREN-RetroQ 重组质粒的转化、鉴定及测序 制备 E. coli DH5 α 超级感受

态连接产物转化至感受态中。经培养后挑取饱满单克隆菌落进行培育。并进行初筛、复筛以排除假阳性克隆的出现。重组质粒的初筛鉴定引物具体序列如下(设计的引物送上海 Songon 合成): Forward Primer = GGGCAGGAAGAGGGCCTAT; TNFAIP8-shRNA1 Reverse Primer = ACGCGTAAAAAACG TTCA; TNFAIP8-shRNA2 Reverse Primer = ACGCGTAAAAAAGAGGCA; TNFAIP8-shRNA3 Reverse Primer = ACGCGTAAAAAAGAGCTA; 复筛采用质粒手册中的通用引物 MSCV_primer 和 MSCV_rev_primer。

行菌液 PCR 鉴定阳性克隆, 所得产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 在 BIO-RAD 凝胶成像仪上鉴定。将阳性菌落送上海英俊公司测序。

1.2.2 重组干扰质粒的干扰效率检测及最佳干扰效率质粒的筛选

1.2.2.1 人肺腺癌细胞系 A549 细胞转染及检测

采用 Lipfectamine 2000 转染试剂将 TNFAIP8-shRNA-pSIREN-RetroQ 重组质粒转染至 A549 细胞。选择细胞状态好且处于生长对数期的 A549 细胞作为转染对象。将 Lipfectamine 2000 加入分别含 pSIREN-RetroQ、GFP-pSIREN-RetroQ、TNFAIP8-shRNA1-pSIREN-RetroQ 和 TNFAIP8-shRNA-pSIREN-RetroQ 等质粒的不完全培养基中制备成转染复合物。转染复合物与 A549 细胞混匀后将之置于恒温培养箱中进行转染。48h 后利用荧光显微镜观察 GFP-pSIREN-RetroQ 转染效率, 并利用 Western blot, RT-PCR 及流式分析检测 TNFAIP8 表达变化。

1.2.2.2 检测转染 TNFAIP8-shRNA-pSIREN-RetroQ 重组质粒的 A549 细胞 TNFAIP8 干扰效率 取各组转染细胞制备 RNA 样品, 并逆转录为 cDNA, 行 PCR 分别对 β -actin 和 TNFAIP8 的表达进行验证和分析。PCR 反应条件为: (1) 94 $^{\circ}$ C、5 min; (2) 94 $^{\circ}$ C、1 min; (3) 56 $^{\circ}$ C、0.5 min; (4) 72 $^{\circ}$ C、1.0 min; (5) 72 $^{\circ}$ C、5 min; 其中(2)~(4)循环 30 次。产物存于 4 $^{\circ}$ C。所得产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 在 Bio-Rad 凝胶成像仪上鉴定。行 Western blot 检测转染 TNFAIP8-shRNA-pSIREN-RetroQ 重组质粒的 A549 细胞 TNFAIP8 干扰效率及 TNFAIP8 蛋白的表达。行流式检测 aDR5ScFv 诱导转染细胞后凋亡情况。

2 结果

2.1 pSIREN-RetroQ 质粒图谱和酶切位点 见图 1。

2.2 TNFAIP8-shRNA-pSIREN-RetroQ 重组质粒阳性克隆初筛、复筛鉴定 从连接转化后所得菌落制

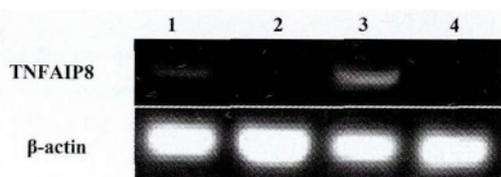


图 7 应用 RT-PCR 检测构建质粒的干扰效果
Fig. 7 Detect the interference of the recommend plasmid by RT-PCR

Note: 1. A549 cell after transfection pSIREN-RetroQ plasmid; 2. A549 cell after transfection TNFAIP8-shRNA 1 plasmid; 3. A549 cell after transfection TNFAIP8-shRNA plasmid; 4. A549 cell after transfection TNFAIP8-shRNA3 plasmid.



图 8 TNFAIP8-shRNA 质粒转染 A549 细胞蛋白水平表达的检测
Fig. 8 Detect protein expression of TNFAIP8-shRNA plasmid transfected A549 cells

Note: A. A549 cell after transfection pSIREN-RetroQ transfection; B. A549 cell after transfection TNFAIP8-shRNA plasmid.

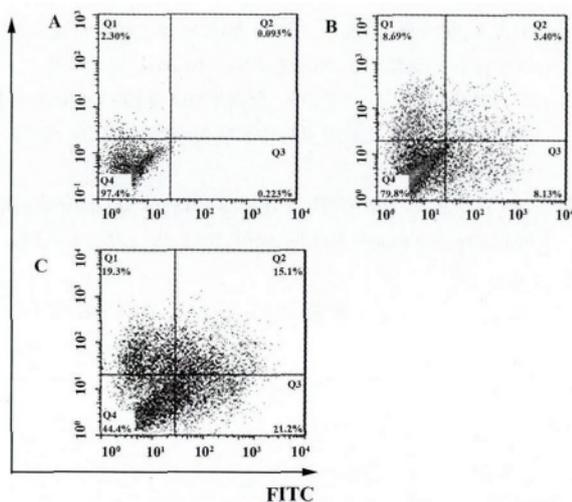


图 9 流式检测 aDR5ScFv 诱导 A549 细胞的凋亡
Fig. 9 Flow cytometry detect aDR5ScFv induced A549 cells apoptosis

Note: A. A549 cell; B. A549 cell transfection pSIREN-RetroQ plasmid; C. A549 cell after transfection TNFAIP8-shRNA1-pSIREN-RetroQ plasmid.

2.5 流式检测 TNFAIP8-shRNA-pSIREN-RetroQ 干扰质粒活性 如图 9 所示,流式细胞术检测结果表明终浓度 100 μg/ml 的 aDR5ScFv 作用转染 pSI-

REN-RetroQ 空载质粒的 A549 细胞后细胞 16 h 后凋亡为 11.53% ,终浓度 100 μg/ml 的 aDR5ScFv 作用转染 TNFAIP8-shRNA1-pSIREN-RetroQ 干扰质粒后的 A549 细胞 16 h 后凋亡为 36.3% ,且后者相对于前者而言早晚期凋亡均有明显的增加。本实验室之前的实验结果已证明 aDR5ScF 在体外具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用^[9,10] ,说明构建的 TNFAIP8 干扰质粒具有促进肿瘤细胞凋亡的作用,这与文献[3]报道 TNFAIP8 在肿瘤细胞凋亡中起负向调控作用相符。

3 讨论

RNA 干扰作为最近发展起来的一项革命性技术,是一种重要的转录后基因沉默机制,是指由双链 RNA 介导的可高效特异性降解对应序列 mRNA,从而特异性地抑制相应基因表达的技术,它具有高度的序列专一性,能够特异地使目的基因沉默,获得功能丧失,同时不影响其他基因^[11]。RNA 干扰具有效果强、持续时间长,在细胞内表达的稳定性、低细胞毒性、可传递性等优点^[12,13],成为目前研究基因功能的重要技术,为肿瘤的治疗带来了新希望。

TNFAIP8 是调节及控制细胞凋亡过程的重要分子之一,其表达可诱导肿瘤坏死因子 α 和转录激活 NF-κB^[14] ,在细胞凋亡、细胞老化、信号转导、细胞恶性变、肿瘤细胞增生、侵袭及转移等细胞生命过程具有重要的调节作用,在大多数的实体肿瘤中倾向于致癌作用,与肿瘤的发展和不良预后有明显的相关性^[4] ,但 TNFAIP8 通过何种途径调控这些事件的发生仍不明确。RNA 干扰技术正是通过对 TNFAIP8 表达的负性调节来观察其变化对肿瘤细胞生物学特性的影响及下游分子活动,从而发现可能存在的信号转导通路,以更深层的探明 TNFAIP8 基因的功能及机制。为此我们设计并构建了 TNFAIP8 基因干扰质粒。

本研究根据 TNFAIP8 基因结构特点,通过评分方法选择得分较高的三段靶点序列,设计并合成针对人 TNFAIP8 基因的 RNA 干扰序列,将其连接到 pSIREN-RetroQ 载体,构建 TNFAIP8 基因的 shRNA 重组质粒。基因测序证实成功构建了质粒 TNFAIP8-shRNA1-pSIREN-RetroQ、TNFAIP8-shRNA 2-pSIREN-RetroQ 和 TNFAIP8-shRNA3-pSIREN-RetroQ。经脂质体法转染 TNFAIP8-shRNA-pSIREN-RetroQ 干扰质粒、载体 pSIREN-RetroQ 质粒和 GFP-pSIREN-RetroQ 质粒至人肺腺癌细胞系 A549 细胞,48 h 后荧光显微镜下观察到大量绿色荧光蛋白的

表达,其转染效率为 80%。通过 RT-PCR 检测显示 TNFAIP8-shRNA1-pSIREN-RetroQ 和 TNFAIP8-shRNA3-pSIREN-RetroQ 均表现出比较好的干扰效果,而 TNFAIP8-shRNA1-pSIREN-RetroQ 质粒转染的细胞则表现出最高的干扰效率,Western blot 方法进一步确认其能有效干扰并显著抑制细胞内 TNFAIP8 基因的表达,为下一步的干预实验奠定了基础。

另外功能方面,应用终浓度 100 μg/ml 的 aDR5ScFv 分别作用转染 TNFAIP8-shRNA1 干扰质粒和空载质粒的 A549 细胞 16 h,流式结果显示前者早、晚期凋亡率均有增加,前者凋亡率为 36.3% 高于后者 11.53%,说明构建的 TNFAIP8 干扰质粒具有促进肿瘤细胞凋亡的作用,这与文献 [3] 报道 TNFAIP8 在肿瘤凋亡方面其负向调控作用相符。

本研究设计构建并鉴定了针对 TNFAIP8 基因的特异性 RNA 干扰重组质粒,并在肺腺癌 A549 细胞株中成功阻断 TNFAIP8 基因的表达以达到基因沉默的效果,为以后的实验提供了很好的素材,也为以后进一步探索 TNFAIP8 在肿瘤形成、生存、侵袭和转移的作用奠定基础。

参考文献:

[1] Zhang X, Wang J, Fan C *et al.* Crystal structure of TNFAIP82 provides insights into immune homeostasis [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16(1): 89-90.

[2] Patel S, Wang FH, Whiteside TL *et al.* Identification of seven differentially displayed transcripts in human primary and matched metastatic head and neck squamous cell carcinoma cell lines: implications in metastasis and/or radiation response [J]. *Oral Oncol*, 1997, 33(3): 197-203.

[3] Kumar D, Gokhale P, Broustas C *et al.* Expression of SCC-S2, an antiapoptotic molecule, correlates with enhanced proliferation and tumorigenicity of MDA-MB 435 cells [J]. *Oncogene*, 2004, 23(2):

612-616.

[4] Zhang S, Zhang Y, Wei X *et al.* Expression and regulation of a novel identified TNFAIP8 family is associated with diabetic nephropathy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802(11): 1078-1086.

[5] Liu T, Gao H, Yang M *et al.* Correlation of TNFAIP8 overexpression with the proliferation, metastasis, and disease-free survival in endometrial cancer [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(6): 5805-5814.

[6] Yang M, Zhao Q, Wang X *et al.* TNFAIP8 overexpression is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in intestinal-type gastric adenocarcinoma [J]. *Histopathology*, 2014, 65(4): 517-526.

[7] Liu T, Xia B, Lu Y *et al.* TNFAIP8 overexpression is associated with platinum resistance in epithelial ovarian cancers with optimal cytoreduction [J]. *Hum Pathol*, 2014, 45(6): 1251-1257.

[8] Ju lia Pak, Andrew F. Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans* [J]. *Science*, 2007, 315: 241-244.

[9] 孟庆宇,程小峰,张佳锴,等. 抗人 DR5 单链抗体诱导 HepG2 细胞凋亡的实验研究 [J]. *免疫学杂志*, 2010, (7): 585-588, 593.

[10] 孟庆宇,程晓峰,张佳锴,等. 抗人死亡受体 5 单链抗体 ZF1 对鼠 H22 肝癌细胞的作用分析 [J]. *中国免疫学杂志*, 2010, 26(9): 801-805, 809.

[11] Sijen T, Fleenor J, Simmer F *et al.* On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing [J]. *Cell*, 2001, 107(4): 465-476.

[12] 游言文,徐玉英,张钦宪. CHOP 基因 shRNA 载体构建及沉默效应 [J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(11): 1981-1204.

[13] 卢 绩,陈岐辉,许 宁,等. 靶向 EZH2 基因的 shRNA 真核表达载体的构建及鉴定 [J]. *中国实验诊断学*, 2010, 14(12): 1921-1923.

[14] Liu Y, Liu S. The TIPE(TNFAIP8) family in inflammation, immunity and cancer. *Mol Immunol*, 2011, 49(1/2): 219-226.

[收稿 2015-01-21 修回 2015-02-25]
(编辑 许四平)

本刊承接国内外医药卫生、医疗器械、生物制剂方面的广告业务