

慢病毒 siRNA 靶向干扰 YAP 基因胃癌细胞株的建立*

周 洲 朱金水[△] 许志朋

(上海交通大学附属第六人民医院消化科 上海 200233)

摘要 目的:构建并鉴定 YAP 基因短发夹干扰 RNA(shRNA)慢病毒载体,建立稳定干扰 YAP 基因表达的胃癌细胞株 SGC7901。**方法:**荧光定量 PCR 检测 YAP 基因在多种胃癌细胞株中的表达情况。构建重组靶向 YAP 基因的 shRNA 慢病毒表达质粒 PGC-shRNA-YAP,用脂质体转染的方法将载体导入胃癌细胞。经杀稻瘟菌素筛选后,建立稳定表达 siRNA 的细胞株。荧光定量 PCR 检测干扰效率。**结果:**在胃癌细胞株 SGC7901 中,YAP 基因显示高表达。测序验证 PGC-shRNA-YAP 重组质粒构建成功。将重组质粒稳定转染入胃癌细胞株 SGC7901 后能明显抑制 YAPmRNA 表达水平。**结论:**成功构建了 PGC-shRNA-YAP 慢病毒重组质粒,建立了靶向稳定干扰 YAP 基因表达的 siRNA 胃癌细胞株 SGC7901。

关键词:YAP 基因;慢病毒载体;胃癌细胞株 SGC7901; RNA 干扰

中图分类号:Q28,Q75,Q78,R735.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)04-605-06

Establishment of Gastric Cancer Cells with Stable Interference by siRNA Targeting YAP Gene*

ZHOU Zhou, ZHU Jin-Shui[△], XU Zhi-Peng

(Department of Gastroenterology, Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233)

ABSTRACT Objective: To construct siRNA expression vector targeting YAP gene and establish the gastric cancer cells SGC7901 with stable inhibition of YAP gene. **Methods:** Real-time PCR was used to examine the YAP gene expression in several gastric cancer cell lines. The recombinant lentivirus PGC-shRNA-YAP vector was constructed, which was transfected into gastric cancer cells by Lipofectamine 2000. After gastric cancer cells with constant expression of the PGC-shRNA-YAP were established by blasticidin selection, the interference efficiency of YAP mRNA expression level was detected by real-time PCR. **Results:** There was high expression of YAP gene in the gastric cancer cell line SGC-7901. Recombinant lentivirus PGC-shRNA-YAP vector was successfully constructed by the identification of sequencing. The recombinant vector markedly inhibited the expression of YAP gene in gastric cancer cell line SGC-7901. **Conclusion:** Recombinant lentivirus vector PGC-shRNA-YAP was successfully constructed and gastric cancer cell line SGC7901 with stable siRNA expression targeting YAP gene was established.

Key words: YAP gene; Lentivirus vector; Gastric cancer cell line SGC7901; RNA interference

Chinese Library Classification: Q28, Q75, Q78, R735.2 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)04-605-06

前言

胃癌是我国最常见的消化道恶性肿瘤之一,具有发病率高、发病隐匿、易转移和死亡率高等特点。目前主要治疗方法有手术和化疗等,对进展期胃癌患者,由于手术切除率低,放化疗副作用大,常常面临肿瘤多药耐药的问题,且这些治疗方法对患者的免疫系统产生不同程度的打击和损害,疗效不能令人满意^[1]。随着对肿瘤发病机制的研究不断深入,人们发现癌基因的激活是肿瘤发病的根本原因,阻断癌基因的高表达可以防止正常细胞向恶性转化,甚至可使恶性肿瘤向正常方向转化,从而根治肿瘤^[2]。因此,以抑制癌基因表达为重要内容之一的基因治疗成为人们关注的热点。

YAP 于 1994 年发现,最早发现 YAP 通过 "PVKQPP-

PLAP" 序列与 Src 蛋白激酶家族中 Yes 蛋白的 SH3 区域相结合而命名为 Yes-associated protein65 (YAP65),为分子量约 65kDa 的蛋白质^[3]。近来的研究证明 YAP 是一个癌基因,作为 Hippo 通路的下游信号分子,YAP 具有促进细胞增殖,抑制细胞凋亡,导致细胞接触性抑制丧失及促进细胞恶性转化的作用^[4]。小鼠肝癌基因组分析发现染色体 9qA1 处基因扩增,等同于人染色体 11q22,在扩增区发现的两个候选癌基因是 YAP 和 cIAP1。YAP 和 cIAP1 是独立的癌基因,它们在肿瘤发生发展中具有协同作用^[5]。在 Overholtzer 等人的实验中,正常的乳腺上皮细胞因 YAP 高表达而过度增殖,细胞呈上皮-间质转化,培养基中出现锚定非依赖性生长,他们认为 YAP 作为癌基因在人类肿瘤的发生发展中具有重要作用^[6]。通过对大量的人肝癌组织和正常肝组织的检测分析,发现 YAP 的表达和肿瘤

* 基金项目:上海市科委动物实验基金重点项目(10140902500)

作者简介:周洲(1983-),女,博士研究生,主要从事消化道肿瘤的基础与临床研究,

电话:13916622040,Email:doublezhou2006@163.com

[△]通讯作者:朱金水,Email:zhujs1803@hotmail.com.

(收稿日期:2010-11-20 接受日期:2010-12-13)

细胞的低分化,高血清 AFP 表达,再发肿瘤的血管渗透呈强烈正相关^[7]。

但是 YAP 在胃癌中的作用还未进行深入研究,在前期的实验中,我们采用 RT-PCR 和 Western-Blot 方法对 YAP 在胃癌组织中的表达水平进行了检测,证实了 YAP 在胃癌中高表达并与胃癌的发生、发展密切相关。因此,本实验设计了针对 YAP 基因的短发夹 RNA(shRNA)序列,构建针对 YAP 基因特异的慢病毒载体,为进一步研究 YAP 基因在肿瘤细胞中的作用机制和基因治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

PCR 引物、dsDNA Oligo (上海吉凯基因技术有限公司合成),DMEM 培养基,胎牛血清(Gibco 公司)、胰蛋白酶(Invitrogen 公司)。慢病毒载体系统(上海吉凯基因技术有限公司),该病毒包装系统由 pGCL-GFP 载体,pHelper 1.0 载体,Helper2.0 载体三种质粒组成,其中 pGCL-GFP 载体含有能持续表达 RNA 的元件,同时含有能表达绿色荧光蛋白(GFP)的基因,pHelper1.0 和 pHelper2.0 含有病毒包装所需的元件。限制性内切酶、T4DNA 连接酶(New England Biolabs 公司),大量质粒提取试剂盒(Qiagen 公司),Lipofectamine2000(Invitrogen 公司),慢病毒的包装细胞 293T 细胞株(中国科学院上海生物所细胞库),胃癌细胞株 SGC7901(笔者科室保留)。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取和 RT-PCR 检测各胃癌细胞株 YAPmRNA 的表达 按照 Trizol 试剂盒说明提取 4 种胃癌细胞株(SGC7901, SW480,panc-1,H1299)总 RNA 用于 RT-PCR 的检测。采用 Primer 5.0 软件设计目的,内参基因引物送上海英骏生物技术有限公司合成^[8]。YAP 上游引物:5'CCTGATGGATGGGAA-

CAAGC3',下游引物:5' GCACTCTGACTGATTCTCTGG3',扩增长度 134bp;GAPDH 上游引物:5'TGACTTCAACAGCGACAC-CCA3',下游引物:5'CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA3',扩增长度 121bp。RT-PCR 循环参数:95℃预变性 15s、95℃变性 5s、60℃退火 30s、72℃延伸 30s,共进行 45 个循环。每次在延伸阶段读取吸光值,结果采用 2-Δ Δ Ct 进行分析。同一实验重复 3 次,取其平均值。

1.2.2 YAPshRNA 慢病毒表达载体的构建 根据 GenBank 中 YAP(NM_001130145)基因信息,从目标基因开放阅读框起始密码子"ATG"下游 75 至 100 碱基位置开始,寻找"AA"二连序列后的 21 个碱基序列作为潜在的 siRNA 靶位点。设计 siRNA 时不针对 5' 和 3' 端的非编码区,分析获得的序列,选择 GC 含量在 40%-55%之间的靶基因序列作为潜在优选,并在 Gen-Bank 表达序列标签数据库中用 BLAST 检索,将选定的序列和相应的基因组数据库进行比较,排除与其他编码序列同源的序列,以确定其为特异性序列。设计 4 对小干扰 RNA 序列(见表 1)。每一单链内 21nt 的寡核苷酸以正反向组合,中间添加 loop 结构,使寡核苷酸可以形成发夹结构。为便于克隆与鉴定,在 shRNA5' 端和 3' 端分别引入 Age I 和 EcoRI 酶切位点,反义片段后接上终止信号 TTTTTT 以终止转录。将等摩尔量的寡核苷酸干扰片段正负链溶于退火缓冲液中,95℃持续 5min,缓慢降至室温,获得具有 AgeI 和 EcoRI 酶切位点的退火双链 DNA。将退火产物和 pGCSIL-GFP 载体进行连接,成为 PGC-shRNA-YAP 慢病毒载体,分别命名为 YAP1、YAP2、YAP3、YAP4。将构建好的载体转化到 DH5α 大肠杆菌感受态细胞中。摇菌后接种到含 Amp 抗性(100μg/mL)的 LB 琼脂培养基上于 37℃培养 16h,挑取转化后生长的单菌落进行 PCR 检测并进行基因序列测定。

表 1 4 对干扰序列
Table1 four RNA interference sequences

NO.	5'	STEMP	Loop	STEMP	3'
YAP-1 antisense strand	Ccgg ca	GGTCCTCTTCCT-GATGGAT	TTCAAGAGA	ATCCATCAGGAA-GAGGACctg	TTTTTg
YAP-1 sense strand	aattcaaaaa	caGGTCCTCTTCCT-GATGGAT	TCTCTTGAA	ATCCATCAGGAA-GAGGACctg	
YAP-2 antisense strand	Ccgg	gaCTCAGGATGGA-GAAATTTA	TTCAAGAGA	TAAATTTCTC-CATCCTGAGtc	TTTTTg
YAP-2 sense strand	aattcaaaaa	gaCTCAGGATGGA-GAAATTTA	TCTCTTGAA	TAAATTTCTC-CATCCTGAGtc	
YAP-3 antisense strand	Ccgg	CAGGTGATACTAT-CAACCAAA	TTCAAGAGA	TTTGGTTGATAG-TATCACCTG	TTTTTg
YAP-3 sense strand	aattcaaaaa	CAGGTGATACTAT-CAACCAAA	TCTCTTGAA	TTTGGTTGATAG-TATCACCTG	
YAP-4 antisense strand	Ccgg	GACCAATAGCTCA-GATCCTTT	TTCAAGAGA	AAAGGATCTGAGC-TATTGGTC	TTTTTg
YAP-4 sense strand	aattcaaaaa	GACCAATAGCTCA-GATCCTTT	TCTCTTGAA	AAAGGATCTGAGC-TATTGGTC	

1.2.3 YAP 基因过表达载体的构建 在 cDNA 文库中, 利用 PCR 方法钓取目的基因, 将 PCR 产物与 pEGFP-YAP-3FLAG 过表达质粒载体分别进行 XhoI、kpnI 双酶切, 酶切产物电泳回收后进行定向交换, 其产物转化细菌感受态细胞。测序验证正确后行 Western-blot 检测过表达质粒在 293T 细胞中的表达强度。

1.2.4 YAP-RNAi 干扰有效靶点的筛选 YAP 的过表达质粒分别与含有针对 YAP 的不同干扰靶点的 RNAi 病毒载体质粒混合, 记为 YAP1, YAP2, YAP3, YAP4 组; 与 RNAi 空载体质粒混合, 记为空质粒组。取生长良好融合度在 80%-90% 的 293T 细胞, 将各组混合物共转染至 93T 细胞。转染 24h 荧光显微镜下观察病毒 RNAi 质粒上报告基因 GFP 的表达(绿色荧光), 可见感染效率达 80% 以上, 否则重新感染。Western-blot 筛选干扰最明显的质粒进行后续试验。

1.2.5 慢病毒颗粒的包装和滴度测定 将干扰最明显序列的 shRNA 进行慢病毒颗粒的包装, 将重组慢病毒载体 PGC-shRNA-YAP 及其两种辅助包装原件载体质粒 pHelper1.0 及 pHelper2.0 共转染 293T 细胞, 转染后 8h 更换为完全培养基, 培养 48h 后, 收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液。293T 细胞中测定病毒滴度。病毒滴度测定使用逐孔稀释滴度测定法, 293T 细胞铺 96 孔板, 每个孔加 4×10^4 个细胞, 体积为 100 μ L。根据病毒的预期滴度, 准备 7-10 个无菌的 Ep 管。在每个管中加入 90 μ L 的无血清培养基。取待测定的病毒原液 10 μ L 加入到第一个管中混合后, 取 10 μ L 加入到第二个管中。继续相同的操作直到最后一管。选取所需的细胞孔, 吸去 90 μ L 培养基, 丢弃。加入 90 μ L 稀释好的病毒溶液, 放入培养箱培养。24 小时后, 加入完全培养基 100 μ L, 数出荧光细胞比例在 10% 左右的孔中的荧光细胞数。滴度计算公式: 荧光细胞数 \times 相应稀释倍数, 即为病毒原液的滴度值(TU)/mL^[9]。

1.2.6 慢病毒感染并筛选稳定表达 PGC-shRNA-YAP 的胃癌细胞株 SGC7901 病毒感染前 1d, 生长状态良好的 SGC7901 细胞分入 6 孔培养板中培养, 实验组为 PGC-shRNA-YAP, 同时设空载体组和空白对照组。条件如下: 将 50 μ L OPTI-DMEM+2 μ L Lipofectamine2000 和 50 μ L OPTI-DMEM +1 μ g PGC-shRNA-YAP 两液混合后室温放置 20min, 将液体均匀滴加在细胞表面, 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 环境下培养箱中培养 6h, 弃去转染液, 换不含抗生素的完全培养基。感染 48h 后采用荧光显微镜下观察慢病毒 RNAi 质粒上报告基因 GFP 的表达(绿色荧光), 可见感染效率达 80% 以上, 否则重新感染。然后加入含杀稻瘟菌素(1.25 μ g / mL)的选择性培养基进行筛选, 2 周后可见抗性克隆长出。挑取单细胞克隆转入 24 孔板继续扩大 1 月左右可获得稳定转染的克隆细胞。

1.2.7 荧光定量 PCR 检测稳定干扰后 YAP 的表达 将 PGC-shRNA-YAP 慢病毒稳定转染细胞, 转染空质粒的细胞和未转染的细胞, 分别提取 RNA, 紫外分光光度仪定量后, 各取 2 μ g RNA, 常規逆转录成 cDNA, 利用荧光实时定量 PCR 检测 YAP 在细胞中的表达情况。YAP 上游引物: 5' CCTGATG-GATGGGAACAAGC3', 下游引物: 5' GCACTCTGACT-GATTCTCTGG3', 扩增长度 134bp; GAPDH 上游引物: 5'TGACTTCAACAGCGACACCCA3', 下游引物: 5'CACCCT-

GTTGCTGTAGCCAAA3^[10], 扩增长度 121bp。RT-PCR 循环参数: 95 $^{\circ}$ C 预变性 15s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 共进行 45 个循环。每次在延伸阶段读取吸光值, 结果采用 2- $\Delta\Delta$ Ct 进行分析。同一实验重复 3 次, 取其平均值。

1.3 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS11.5 软件对数据进行统计学分析。多组均数比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结果

2.1 YAP mRNA 在多种胃癌细胞中的表达

荧光定量 PCR 结果显示, 各胃癌细胞株中, SGC7901 的 YAP mRNA 水平在 4 株胃癌细胞中表达最高, 选择 SGC7901 细胞进行后续实验(见图 1)。

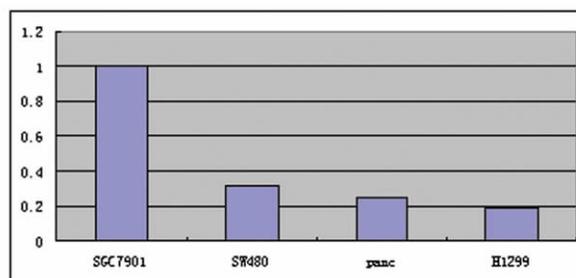


图 1 RT-PCR 检测 YAP mRNA 在 4 株胃癌细胞中的表达。

Fig.1 Expression of YAP mRNA in four gastric cancer cell lines by RT-PCR

2.2 PGC-shRNA-YAP 慢病毒载体的 PCR 及测序鉴定

表达 YAP 基因的 shRNA 片段与载体连接后进行 PCR 电泳(图 2), 连接入 shRNA 片段的阳性克隆 PCR 片段大小为 343bp, 空载体克隆 PCR 片段大小为 306bp, 与理论值相符。将重组阳性克隆送上海生工测序, 测序结果证实 4 组重组的 RNA 干扰慢病毒载体均与设计合成的靶向链一致。说明已将合成的 DNA oligo 插入到载体中, 成功构建了 RNAi 慢病毒干扰载体。

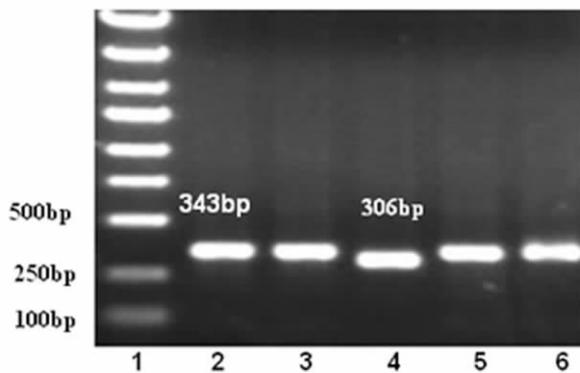


图 2 重组慢病毒载体 PGC-shRNA-YAP PCR 图谱。1: Marker; 2: YAP1; 3: YAP2; 4: 空载体; 5: YAP3; 6: YAP4。

Fig.2 Recombinant virus vector PGC-shRNA-YAP by PCR. 1: Marker; 2: YAP1; 3: YAP2; 4: empty vector control; 5: YAP3; 6: YAP4.

2.3 YAP 基因的过表达载体 pEGFP-N1-3FLAG-YAP 的鉴定

过表达载体 pEGFP-N1-3FLAG-YAP 合成成功后进行 Western-blot 鉴定(见图 3)。其中 1 为 WB 标准品,带 FLAG 标签,融合 GFP 基因,分子大小为 48KD。2 为未转染质粒的 293T 细胞样品,无表达条带。3 为过表达质粒 pEGFP-N1-3Flag-YAP1 转染 293T 后样品,表达克隆中插入目的基因片段大小为 1515bp。通过 Western Blot 检测,可以观察到 100KDa 处有条特征带(加上 GFP 和 flag 的大小)。

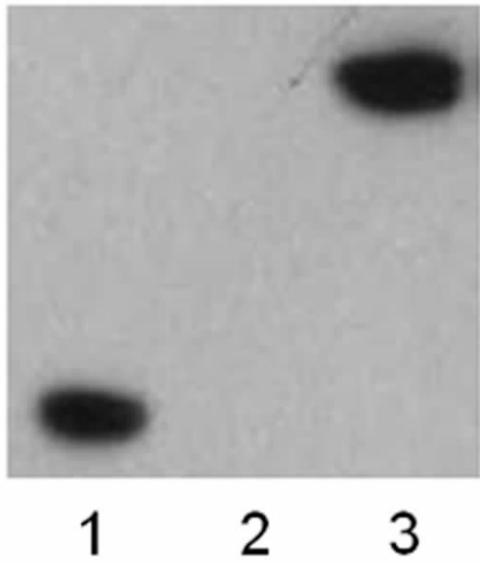


图 3 重组过表达质粒 pEGFP-N1-3FLAG-YAP western-blot 1:标准对照品;2:未转染过表达质粒的 293T 细胞;3:成功转染过表达质粒的 293T 细胞

Fig.3 Recombinant over-expression virus vector pEGFP-N1-3FLAG-YAP by western-blot. 1:standard control; 2:293T cell without transfection of pEGFP-N1-3FLAG-YAP; 3: 293T cell transfection of pEGFP-N1-3FLAG-YAP

2.4 Western-blot 外源筛选靶点

使用凝胶图像处理系统对外源性筛靶 Western-blot 结果进行灰度分析,空质粒 YAP 的表达量为 (95.63± 1.38)%,YAP1 干扰序列组 YAP 的表达量为(81.77± 1.82)%,YAP2 干扰序列组 YAP 的表达量为 (13.53± 1.76)%,YAP3 干扰序列组 YAP 的表达量为(60.43± 0.87)%,YAP4 干扰序列组 YAP 的表达量为 (23.80± 3.06)%,YAP1,YAP2,YAP3,YAP4 干扰序列组与空质粒组比均有显著性差异(P<0.05),其中可见 YAP2 干扰效果最明显,故选择 YAP2 干扰片段进行后续实验(图 4)。

2.5 慢病毒载体的包装及滴度测定

将慢病毒包装系统质粒与 YAP2 干扰序列质粒共转染 293T 细胞(见图 5),在倒置显微镜下观察各孔中 GFP 的表达量,荧光细胞数随稀释倍数的增加而减少。数出荧光细胞比例在 10%左右的孔中的荧光细胞个数。将得到的数值乘以相应的稀释倍数就得到了病毒原液的滴度值,测定滴度为 2.3× 10⁸TU / mL,说明有大量质粒转入 293T 细胞,病毒成功包装。

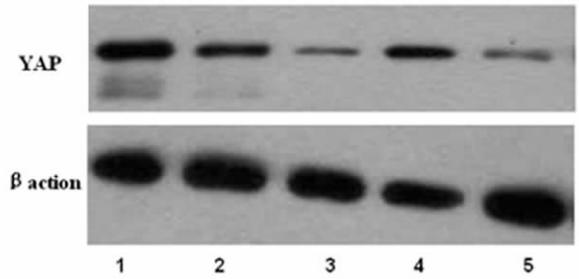


图 4 体外筛靶 western-blot 图谱。1:共转染过表达质粒和空质粒;2:共转染过表达质粒和干扰质粒 YAP1;3:共转染过表达质粒和干扰质粒 YAP2;4:共转染过表达质粒和干扰质粒 YAP3;5:共转染过表达质粒和干扰质粒 YAP4

Fig.4 Select the target chain in vitro by western-blot. 1:contransfection of over-expression vector and empty vector control; 2: contransfection of over-expression vector and YAP1; 3: contransfection of over-expression vector and YAP2; 4: contransfection of over-expression vector and YAP3; 5: contransfection of over-expression vector and YAP4.

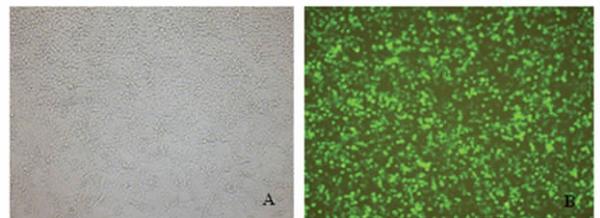


图 5 重组慢病毒转染后荧光图。A:白光图谱× 100; B:荧光图谱× 100

2.6 YAP 基因 mRNA 的表达变化

采用 2- $\Delta\Delta$ Ct 法分析比较 YAP 基因干扰后 RT-PCR 结果的相对表达丰度。结果表明,与亲本对照组相比,空质粒相对 YAPmRNA 表达水平为 87%,干扰组相对 YAPmRNA 表达量为 11%,可见 YAP-siRNA 可明显抑制 YAP 基因在胃癌 SGC7901 细胞中的表达(图 6)。

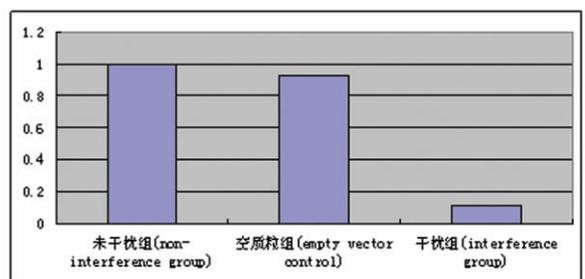


图 6 RT-PCR 检测 YAPmRNA 在 3 组细胞中的表达

Fig.6 Expression of YAPmRNA in shree groups by RT-PCR

3 讨论

Hippo-Yap 通路是近年在果蝇体内发现的细胞信号传导通路,可通过抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡对器官体积进行调

控。在果蝇体内, 通路由 Hpo, Sav, Wts 及 Yorkie 构成, Hpo 与 Sav 形成复合物后, 磷酸化并活化 Wts, 活化的 Wts 磷酸化 Yorkie, 并使之失活^[10]。Hippo-Yap 通路高度保守, 在哺乳动物体内, 也存在类似的通路。在哺乳动物体内, 通路由 Mst1/2, WW45, Lats1/2 及 YAP 构成, 其信号传导过程: Mst1/2 通过衔接蛋白 WW45 与 Lats1/2 结合, 并激活 Lats1/2, 活化的 Lats1/2 磷酸化 YAP, 磷酸化的 YAP 蛋白与胞浆内 14-3-3 蛋白相结合后无法进入细胞核内, 于胞浆内积聚, 失去转录辅激活活性^[11]。Hippo-Yap 通路中的 YAP 蛋白为 Hippo 通路下游信号分子, 受 Hippo 通路的负调节, 并作为转录辅激活因子促进细胞生长增殖, 抑制细胞凋亡, 调控组织器官发育的 Hippo 通路, 参与细胞增殖与凋亡, 细胞接触性的调节, 组织器官体积的精细调控, 该通路的失活参与了肿瘤的发生与发展^[14, 12-13]。

近年来研究发现, YAP 的过表达和消化道肿瘤的发生密切相关。在对 98 例胃癌中 YAP 和 Survivin 表达发现, YAP 的阳性率为 48.0% 并与 Survivin 表达呈正相关, 说明 YAP 可能诱导了 Survivin 表达, 是胃癌的一个重要致癌因子, 同时检测这两个靶点对早期胃癌的诊断有帮助^[14]。和正常结肠组织比较, 结肠腺癌组织细胞质及细胞核中 YAP 表达增强。在正常结肠上皮中, YAP 核染率为 44%, 与结肠癌上皮 YAP 核染色 79% 相比, 差异有显著性^[15]。而细胞质中 YAP 阳性率在正常结肠上皮和结肠癌上皮中分别是 33%, 86%, 有显著差异。在胰腺癌组织中, YAP mRNA 表达水平较正常胰腺组织和慢性胰腺炎组织分别高 2.5 倍和 1.3 倍^[16]。

RNA 干扰(RNAi)是近年来发展起来的一项新技术, 能特异而有效地阻断靶基因的表达, 在细胞内导致与其序列同源的 mRNA 分子发生特异性降解, 从而干扰相应基因的表达。RNAi 具有普遍、高效、特异、操作简单等突出优点, 目前该技术已被广泛用于探索基因功能和传染性疾病及恶性肿瘤的基因治疗领域。RNA 干扰技术的出现, 成了一种新的反向遗传学手段被广泛地应用于基因功能分析、信号转导通路研究和基因治疗^[17]。RNAi 的效率依赖于转染效率的提高及载体系统的优化。质粒介导 RNAi 有一定的局限性, 转染率低, 基因抑制表达作用弱, 持续时间短^[18]。目前常用的病毒载体有腺病毒、逆转录病毒及慢病毒载体系统, 前两种载体系统均存在一定的局限性: 腺病毒载体在体内不能实现目的基因的长期稳定表达, 反复使用可引起免疫反应^[19]; 逆转录病毒载体虽然具有长期表达的特点, 但是主要用于转染处于分裂期的细胞, 不适合应用于主要处于静止期的细胞^[20]。近 10 年来, 在基础和应用研究领域, 慢病毒载体已被作为一个有效而多用途的基因转移工具得以运用。以慢病毒为载体的细胞感染方式具有较高的转染效率, 且目的基因在导入靶细胞后在细胞内进行病毒包装扩增, 有利于进行基因的功能学研究^[21]。本组采用的慢病毒载体来源于人类免疫缺陷病毒-1(HIV-1), 可以通过整合到宿主细胞的基因组, 并能实现目的基因的的稳定表达, 另外还具有感染效率高、容纳外源性目的基因片段大、免疫反应低等特点, 是携带干扰 RNA 的理想载体^[22]。

本研究根据 PubMed Home 的 YAP 基因的基因信息, 设计 4 对干扰靶序列, 与 pGCIL-GFP 载体连接, 将连接产物转化到 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞, 经 PCR 筛选阳性克隆、测序鉴定,

测序结果与设计的序列一致, 成功构建四对 siRNA-YAP 慢病毒载体。本实验又构建了目的基因过表达载体 pEGFP-YAP1-3FLAG, 阳性克隆测序序列与标准序列完全一致, 说明目的基因插入到真核表达载体中。siRNA-YAP 慢病毒载体与目的基因的表达克隆质粒共转染 293T 细胞, 从 Western-Blot 结果可以看出, 四个靶点中, YAP2 对目的基因的表达有较为显著的敲减作用, 共转染缩短了后续的实验时间, 增加了实验的严谨性。经包装产生高滴度的病毒颗粒, 慢病毒载体感染人高侵袭胃癌细胞株 SGC7901 细胞后, YAP 基因的 mRNA 的表达量显著降低。此结果说明, 本研究构建的慢病毒表达载体在 SGC7901 细胞内能持续、高效、特异地抑制 YAP 基因表达, 为后续应用 RNAi 进一步阐明 YAP 在胃癌发生发展中的分子机制提供实验基础。

参考文献(References)

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2005, 55(2): 74-76
- [2] Carneiro F, Oliveira C, Leite M, et al. Molecular targets and biological modifiers in gastric cancer [J]. Semin Diagn Pathol, 2008, 25(4): 274-287
- [3] Dong J, Feldmann G, Huang J, et al. Elucidation of a universal size-control mechanism in Drosophila and mammals [J]. Cell, 2007, 130(6): 1120-1133
- [4] Zhao B, Wei X, Li W, et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control [J]. Genes Dev, 2007, 21(21): 2747-2761
- [5] Zender L, Spector MS, Xue W, et al. Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach [J]. Cell, 2006, 125(7): 1253-1267
- [6] Overholtzer M, Zhang J, Smolen GA, et al. Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(33): 12405-12410
- [7] Xu MZ, Yao TJ, Lee NP, et al. Yes-associated protein is an independent prognostic marker in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer, 2009, 115(19): 4576-4585
- [8] Qiu Z, Huang C, Sun J, et al. RNA interference-mediated signal transducers and activators of transcription 3 gene silencing inhibits invasion and metastasis of human pancreatic cancer cells [J]. Cancer Sci, 2007, 98(7): 1099-1106
- [9] Suh YH, Kim MK, Shin YK, et al. Mutations of the immunoglobulin heavy chain variable region gene in CD99-deficient BJAB cells line [J]. Mol Cells, 2002, 13(2): 237-244
- [10] Edgar BA. From cell structure to transcription: Hippo forges a new path [J]. Cell, 2006, 124(2): 267-273
- [11] Zhao B, Lei QY, Guan KL, et al. The Hippo-YAP pathway: new connections between regulation of organ size and cancer [J]. Curr Opin Cell Biol, 2008, 20(6): 638-646
- [12] Huang J, Wu S, Barrera J, et al. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP [J]. Cell, 2005, 122(3): 421-434
- [13] Pan D. Hippo signaling in organ size control [J]. Genes Dev, 2007, 21(8): 886-897

- [14] Da CL, Xin Y, Zhao J, et al. Significance and relationship between Yes-associated protein and survivin expression in gastric carcinoma and precancerous lesions [J]. World J Gastroenterol, 2009,15 (32): 4055-4061
- [15] Steinhart AA, Gayyed MF, Klein AP, et al. Expression of Yes-associated protein in common solid tumors [J]. Hum Pathol, 2008,39(11): 1582-1589
- [16] Guo J, Kleeff J, Zhao Y, et al. Yes-associated protein (YAP65) in relation to Smad7 expression in human pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Int J Mol Med, 2006,17(5):761-767
- [17] Anthony RV, Cantlon JD. RNA interference: a new approach to the in vivo study of gene function[J]. J Anim Sci, 2007,85(13):E18-19
- [18] Jazag A, Ijichi H, Kanai F, et al. Smad4 silencing in colon cancer cell lines using stable RNA interference and gene expression profiles induced by transforming growth factor β [J]. Oncogene, 2005,24 (4): 662-671
- [19] Kawabata K, Sakurai F, Koizumin N, et al. Adenovirus vector mediated gene transfer into stem cells[J]. Mol Pharm, 2006,3(2): 95-103
- [20] Liu CM, Liu DP, Done WJ, et al. Retrovirus vector2 mediated stable gene silencing in human cell [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004,313(3): 716-720
- [21] Tomanin R, Scarpa M. Why do we need new gene therapy viral vectors? Characteristics, limitations and future perspectives of viral vector transduction[J]. Curr Gene Ther, 2004,4(4): 357-372
- [22] Cockrell AS, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors [J]. Mol Biotechnol, 2007,36(3): 184-204

·重要信息·

《分子影像学》第二版已正式出版发行

卜丽红¹ 戴薇薇²

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院医学影像科 150001; 2 人民卫生出版社医药教育出版中心第四编辑室)

由哈尔滨医科大学附属第四医院申宝忠教授主编的《分子影像学》第二版(ISBN:978-7-117-13344-9/R·13345)一书已于2010年9月14日由人民卫生出版社出版发行。《分子影像学》是国内第一分子影像学大型专著。对于分子影像学的基本概念、基本原理、基本方法和应用概况都有精彩而详细的论述,充分体现了国际分子影像学的最新进展。

《分子影像学》第二版由著名医学影像学家、中国工程院院士刘玉清教授和美国分子影像学专家、美国医学科学院院士 Sanjiv Sam Gamhbir 教授亲自作序。编委会包括美国哈佛大学、斯坦福大学等国外知名院校7名专家作为国外编委,国内多家知名大学、研究中心学术带头人13名作为国内编委,还包括国内外共40名专家参与编写。

全书共计130余万字,收录图片378幅,共分基础篇和应用篇。

基础篇共分10章,主要介绍了分子影像学的发展简史,分子成像的相关概念、基本原理、基本技术和设备等,内容较第一版更为精准、完善,覆盖面更加宽泛。着重针对探针合成这一当前分子成像研究的技术瓶颈,纳入了材料学、生物学和化学等相关技术内容。

应用篇共分7章,着重介绍了分子影像学技术的最新进展和应用情况,并详细介绍了分子成像在肿瘤、中枢神经系统和心血管系统疾病诊断中的应用情况,重点阐述了分子成像在监测基因治疗、活体细胞示踪以及新药研发等方面的最新研究进展,并就分子影像学向临床转化所面临的问题进行了深入剖析。

本书内容系统详实,深入浅出,图文并茂,可读性强。可供医学影像学专业、临床专业学生使用,并可为临床各学科研究生、临床医师及其他相关生命科学的研究人员提供参考。

《分子影像学》精装本定价260元,全国各大书店有售。