

hERG shRNA 表达载体构建及其稳定转染骨肉瘤细胞系 MG-63、SOSP-9607 的建立

负 喆¹ 马云雷¹ 张 涛¹ 蔡承魁¹ 韩 康¹ 杨彤涛¹ 庞 炜² 周 勇^{1△}

(1 第四军医大学附属唐都医院骨科暨全军骨肿瘤研究所 陕西 西安 710038 2 解放军 323 医院骨科 陕西 西安 710054)

摘要 目的 构建 hERG 钾离子通道蛋白(human ether-a-go-go-related gene potassium channel)shRNA 表达载体质粒,获得稳定转染干扰质粒的人骨肉瘤细胞系 MG-63、SOSP-9607。方法 将 4 对合成的寡核苷酸链退火形成双链,接入 pGPU6/GFP/Neo 表达载体,并测序鉴定。使用脂质体法将重组的质粒转染至 MG-63、SOSP-9607,通过 G418 筛选建立稳定转染的两种细胞系,采用免疫印迹(Western blot)技术检测 hERG 蛋白的表达。结果 测序结果证实 shRNA 与载体连接正确,免疫印迹实验证实 hERG 蛋白表达显著降低。结论:成功构建了 hERG shRNA 真核表达载体,获得了稳定表达 hERG shRNA 的人骨肉瘤细胞系 MG-63 和 SOSP-9607。

关键词 hERG ;钾离子通道 ;骨肉瘤 ;shRNA ;载体构建

中图分类号 :Q75 ,Q78 ,R738.1 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2012)11-2031-04

Construction of hERG shRNA Expression Vectors and Establishment of its Stably Transfected Osteosarcoma Cell lines MG-63 and SOSP-9607

YUN Zhe¹, MA Yun-lei¹, ZHANG Tao¹, CAI Cheng-kui¹, HAN Kang¹, YANG Tong-tao¹, PANG Wei², ZHOU Yong^{1△}

(1 Department of Orthopedic Surgery and Orthopedic Oncology Institute of PLA, Tangdu hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710038, China; 2 323 Hospital of PLA, Xi'an 710054, Shaanxi, China)

ABSTRACT Objective: To construct and screen the human ether-a-go-go-related gene potassium channel (hERG) shRNA expression vectors and to obtain the stably transfected osteosarcoma cell lines MG-63 and SOSP-9607. **Methods:** Four target gene segments were synthesized and cloned respectively into pGPU6/GFP/Neo expression vector to construct four recombinant eukaryotic vectors which were identified by DNA sequencing. The recombinant plasmids were transfected into MG-63 and SOSP-9607 cells by lipofectanite. The resistant MG-63 and SOSP-9607 cells were selected by G418. The expression of hERG was detected by western blot. **Results:** The shRNAs and vectors were linked corrected. The expression of hERG protein in both cell lines decreased significantly. **Conclusions:** The hERG shRNA recombinant plasmids vectors were constructed successfully and the recombinant plasmids significantly knocked down hERG protein in MG-63 and SOSP-9607 cells.

Key words: hERG; Potassium channel; Osteosarcoma; shRNA; Vector construction

Chinese Library Classification(CLC): Q75, Q78, R738.1 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)11-2031-04

前言

hERG 钾离子通道(human ether-a-go-go-related gene potassium channel hERG hERG1 ERG1 KCNH2 Kv11.1)是进化保守的电压门控外向整流钾离子通道的 ether-a-go-go(eag)家族成员之一,其编码的 hERG1 钾通道是一种特殊类型的钾通道,具有内向整流特性^[1,2]。最初因其在心肌细胞复极化中的重要作用及其与心律失常和心源性猝死的关系而引起人们的强烈关注,其与 Q-T 间期延长综合症有着密切的关系^[3-6]。最近的研究显示, hERG 基因差异性的高表达于多种组织来源的肿瘤细胞,并与肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭等多种生物学特性密切相关^[7-9]。

吴进等研究证实 hERG 表达于 MG-63、Saos-2 和 SOSP-9607 等多种骨肉瘤细胞^[10]。本文研究构建小发夹 RNA(small hairpin RNA shRNA) 表达载体,稳定转染人骨肉瘤细胞系 MG-63、SOSP-9607,建立持续低表达 hERG 的稳定细胞株,为进一步探讨 hERG 下调后对骨肉瘤细胞生物学特性的影响奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

shRNA 表达载体 pGPU6/GFP/Neo(上海吉玛公司);人骨肉瘤细胞系 MG-63、SOSP-9607 以及大肠杆菌 E.coli DH5α 由第四军医大学唐都医院骨肿瘤研究所保种。质粒抽提试剂盒(美国 promega 公司),LipofectamineTM2000(美国 Invitrogen 公司),T4 连接酶、限制性内切酶 BamH I、Bbs I、Pst I(日本 TaKaRa 公司),hERG 抗体(美国 Abcam 公司),β-actin 抗体(美国 Santa Cruz 公司),G418(美国 Ameresco 公司),MEM 培养基、RPMI-1640 培养基(美国 Hyclone 公司),胎牛血清(杭州四季青公司)。

作者简介: 负喆(1984-) 男,硕士研究生,主要从事骨肿瘤的基础研究。电话:15191917156 E-mail:yunjiji@163.com

△通讯作者: 周勇(1962-) 男,主任医师,教授,硕士生导师,主要从事骨肿瘤外科治疗、骨缺损修复的研究。

E-mail:gukezy@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2011-12-15 接受日期:2012-01-10)

1.2 hERG 基因 shRNA 片段的设计与合成

采用 genepharm siRNA 设计软件, 根据人 hERG 基因 (KCNH2 NM_000238.3) 序列, 共选择 4 个位点设计 shRNA, 分别为 KCNH2-84 (S 5-CACCGCCAGAGCCGTAAGTTCATCATTCAAGAGATGATGAACCTACGGCTCTGGCTTTTTTG-3 A 5-GATCCAAAAAAGCCAGAGCCGTAAGTTCATCATCTCTTGAA TGATGAACCTACGGCTCTGGC-3) KCNH2-288 (S 5-CACCGCAAAGTGGAATCGCTTCTTCAAGAGAAG-AAGGCGATTTCCACTTTGCTTTTTTG-3 A 5-GATCCAAA-AAAGCAAAGTGGAATCGCCTTC TTCTCTTGAAAGAAG-GCGATTTCCACTTTGC-3) KCNH2-317 (S 5-CACCGATGG-GAGCTGCTTCCTATGTTTCAAGAGAACATAGGAAG CAG-CTCCCATCTTTTTTG-3 A 5-GATCCAAAAAAGATGGGAG-CTGCTTCCTATGT TCTCTTGAAACATAGGAAGCAGC TC-CCATC-3) KCNH2-990 (S 5-CACCGCTACCGCACCATTAG-CAAGATTCAAGAGATCTTGCTAATGGTGCGGTAGCTTTT-TTG-3 A 5-GATCCAAAAAAGCTACCGCACCATTAGCAA-GAT CTCTTGAATCTTGCTAATGGTG CGGTAGC-3); 设计合成一对随机阴性对照质粒的 shRNA 序列 (Negative Control (S 5-CACCGTTCTCCGAACGTGTCACGTCAAGAGATTAC-GTGACACGTTCCGAGAATTTTTTG-3 A 5-GATCCAAAAA-ATTCTCCGAACGTGTCACGTAATCTCTTGACGTGACACG-TTCGAGAAC-3))。

1.3 hERG shRNA 载体的构建和鉴定

pGPU6/GFP/Neo 载体线性化后进行 pGPU6/GFP/Neo-shRNA 构建, 每个连接反应挑取 5 个菌落, 接种到含 50 μ g/ml Kanamycin 的 LB 培养集中。使用碱裂解法抽提质粒, 所得质粒用 BamHI PstI 分别酶切鉴定。将酶切正确的质粒每组选择两个克隆进行测序鉴定(上海英骏生物)。经测序鉴定正确后, 大量培养并抽提高纯度载体用于细胞转染。

1.4 MG-63、SOSP-9607 细胞的培养和质粒的转染

MG-63、SOSP-9607 细胞常规培养, 转染前按 2.5×10^5 细胞 / 孔接种至 24 孔板中, 待细胞融合率达 70 %-80 % 时, 按说明书分别将 4 组干扰质粒、1 组阴性对照质粒与 Lipofectamine™2000 混匀, 转染细胞, 并设空白对照组细胞共 6 组。转染后 24 h 将细胞按 1:10 稀释, 种植于另一培养板中, 再经 24 h 后加入 400 μ g/ml 的 G418 进行抗性筛选, 14 d 后未转染对照组细胞全部死亡, 抗性细胞克隆已形成。4 周后挑取阳性克隆细胞株, 筛选出阳性克隆细胞继续在 400 μ g/ml G418 选择压力下扩大培养, 分别建立表达 KCNH2-shRNA-84、KCNH2-shRNA-288、KCNH2-shRNA-317、KCNH2-shRNA-990 以及 pGPU6/GFP/Neo 阴性对照 KCNH2-shRNA-NC 载体的单克隆细胞株 MG-63、SOSP-9607 共 10 株。

1.5 Western blot 分析

每种细胞样本加入 400 μ l 细胞裂解液, 使细胞完全裂解。经 BCA 蛋白定量试剂盒定量后加入 $5 \times$ 上样缓冲液, 沸水浴 5 min, 冰上冷却。按照蛋白定量结果换算的体积进行 SDS-PAGE 电泳, 湿转法恒压 100 V 转移 2.5 h (β -actin 100 V 70 min) 至 NC 膜上, 5 % 脱脂奶粉封闭, 加入兔抗人 hERG (1:

100)、小鼠抗人 β -actin (1:100) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。分别加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG、羊抗小鼠 IgG, 室温孵育 2 h, ECL 化学发光, 冷光 CCD 成像系统拍照。

1.6 图像分析及统计学处理

Western blot 结果采用 Quantity One 软件分析处理, 实验数据以 SPSS13.0 for Windows 统计软件分析处理, 组间比较采用 One-way ANOVA 检验, 以 $P \leq 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒的测序鉴定

每个连接反应挑取 5 个菌落, 接种到含 50 μ g/ml Kanamycin 的 LB 培养集中。使用碱裂解法抽提质粒, 所得质粒用 BamHI PstI 分别酶切鉴定, 阳性重组载体可以被 BamHI 切开, 而不能被 PstI 切开。(图 1) 4 组重组质粒经测序鉴定, 针对人 hERG 的 shRNA 表达模板成功构建于 pGPU6/GFP/Neo 载体上。

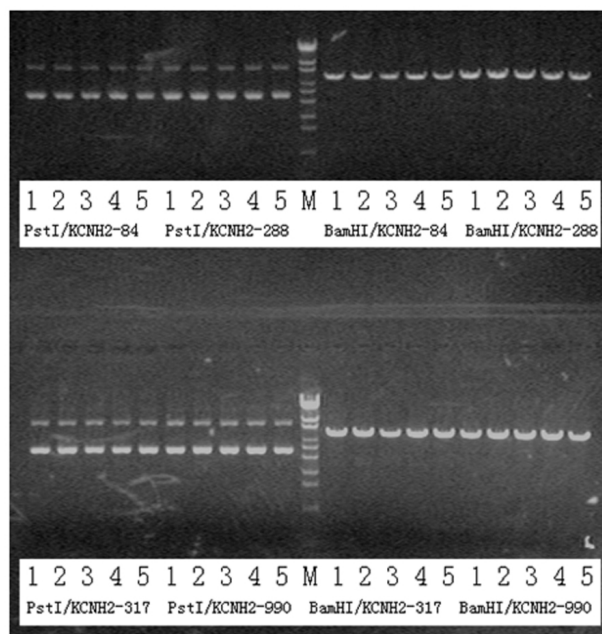


图 1 重组载体的酶切鉴定 M: lamda/Eco130I

Fig.1 Recombinant plasmid was identified by restriction endonuclease analysis

2.2 干扰效率检测

转染后 24h 荧光倒置显微镜下观察, 各组细胞转染后均有绿色荧光蛋白(GFP)表达(图 2)。Western blot 检测各组细胞 hERG 蛋白表达, SOSP-9607 细胞中 KCNH2-shRNA-288 组的抑制效果较好, MG-63 细胞中 KCNH2-shRNA-990 组抑制效果较好。NC 组与未转染细胞(BC)组未见明显差异(图 3)。

3 讨论

越来越多的研究表明 hERG 基因选择性表达于多种组织来源的肿瘤细胞^[11-14], 对肿瘤的生物行为产生广泛的影响, 与肿瘤细胞增殖、凋亡及侵袭密切相关, 而在相应来源的正常细胞中不表达或是低表达^[7,15,16]。这种选择性的表达提示以上这种通道的基因对于肿瘤的发生和发展的重要性, 提示其有可能成

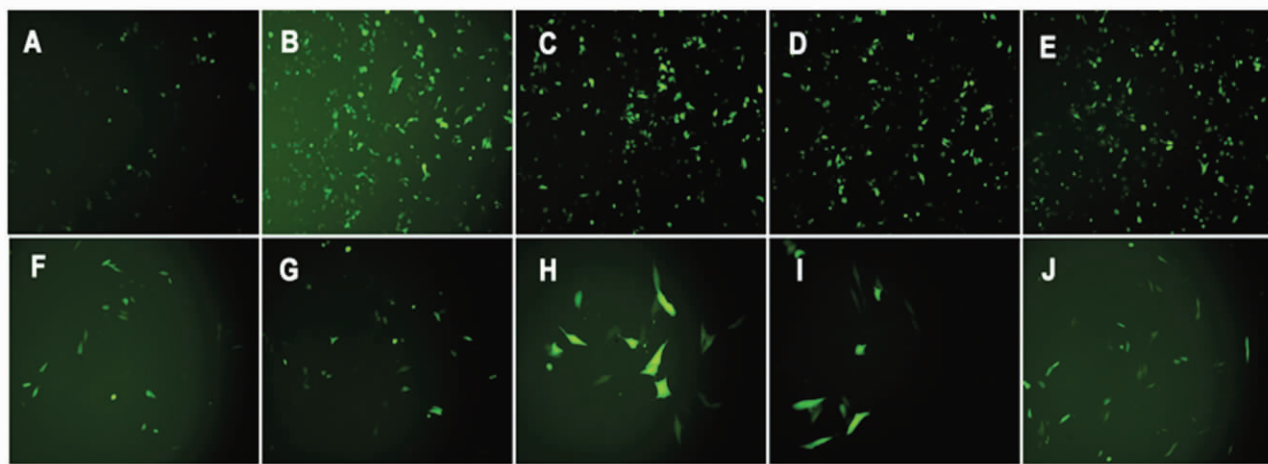


图2 转染后 24 h A-E: SOSP-9607 细胞分别转染 shRNA-84, shRNA-288, shRNA-317, shRNA-990, shRNA-NC ($\times 100$); F-J: MG-63 细胞分别转染 shRNA-84, shRNA-288, shRNA-317, shRNA-990, shRNA-NC ($\times 200$)

Fig.2 24 h after transfection A-E: SOSP-9607 cells respectively transfected by shRNA-84, shRNA-288, shRNA-317, shRNA-990 and shRNA-NC ($\times 100$); F-J: MG-63 cells respectively transfected by shRNA-84, shRNA-288, shRNA-317, shRNA-990 and shRNA-NC ($\times 200$)

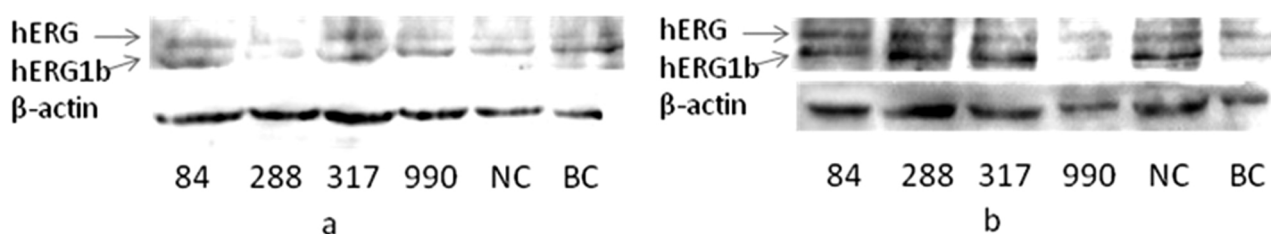


图3 Western blot 检测细胞中 hERG 蛋白表达 a: SOSP-9607 细胞中 shRNA-288 组 hERG 表达最低 b: MG-63 细胞中 shRNA-990 组 hERG 表达最低

Fig.3 Western blot detect the expression of hERG protein a: Group shRNA-288 had the lowest expression of hERG in SOSP-9607 cell line; b: Group shRNA-990 had the lowest expression of hERG in MG-63 cell line

为潜在的肿瘤治疗新靶点。吕清等运用 hERG 钾离子通道特异性阻断剂 E-4031 作用于人胃癌细胞系 SGC-7901 后,胃癌细胞增殖降低, G₀/G₁ 细胞增多, 凋亡增加, 侵袭能力降低^[17]。吴进等将 E-4031 作用于三株骨肉瘤细胞系后, 也发现了其对骨肉瘤细胞增殖的抑制作用。在此基础上, 我们通过 RNA 干涉的方法下调 hERG 在骨肉瘤细胞中的表达, 以此观察 hERG 对骨肉瘤细胞各种生物学活性的影响。

本实验成功构建 pGPU6/GFP/Neo-hERG shRNA 重组质粒, 用脂质体法将含 hERG shRNA 和无功能 shRNA 的表达载体导入 SOSP-9607、MG-63 两种细胞后, 各组细胞均出现抗性, 表明细胞已成功转染 shRNA 表达载体。shRNA 在细胞内经 Dicer 酶作用后转变为双链 siRNA, 能特异性的降解靶基因, 是基因转录后表达下降。本实验中稳定转染 hERG shRNA 的 SOSP-9607、MG-63 两种细胞, 经 Western blot 检测, 显示在蛋白质水平, hERG 基因的表达被显著下调, 表明已成功可用于研究 hERG 基因功能的稳定转染细胞模型, 为更深入的研究 hERG 钾离子通道蛋白对人骨肉瘤细胞生物学活性的作用奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Trudeau M C, Warmke J W, Ganetzky B, et al. HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family [J]. Science, 1995, 269(5220): 92-95
- [2] Biggin P C, Roosild T, Choe S. Potassium channel structure: domain by domain[J]. Curr Opin Struct Biol, 2000, 10(4):456-461
- [3] Peeters GA, Sanguinetti MC, Eki Y, et al. Method for isolation of human ventricular myocytes from single endocardial and epicardial biopsies[J]. Am J Physiol, 1995, 268(4 Pt 2):H1757-1764
- [4] Curran ME, Splawski I, Timothy KW, et al. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome [J]. Cell, 1995, 10, 80(5):795-803
- [5] Keller SH, Platoshyn O, Yuan JX. Long QT syndrome-associated I593R mutation in HERG potassium channel activates ER stress pathways[J]. Cell Biochem Biophys, 2005, 43(3):365-377
- [6] Eldstrom J, Fedida D. The voltage-gated channel accessory protein KCNE2: multiple ion channel partners, multiple ways to long QT syndrome[J]. Expert Rev Mol Med, 2011, 14, 13:e38
- [7] Bianchi L, Wible B, Arcangeli A, et al. HerG encodes a K⁺ current highly conserved in tumors of different histogenesis: a selective advantage for cancer cells?[J]. Cancer Res, 1998, 15, 58(4):815-822
- [8] Warmke JW, Ganetzky B. A family of potassium channel genes related to eag in Drosophila and mammals [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994, 91(8): 3438-3442
- [9] Camacho J. Ether a go-go potassium channels and cancer [J]. Cancer Lett, 2006, 233(1):1-9
- [10] 吴进, 杨彤涛, 甘璐, 等. 电压门控性钾离子通道对人骨肉瘤细胞

- 增殖的影响[J]. 科学技术与工程, 2009,016:4619-4623
- Wu Jin, Yang Tong-tao, Gao Lu, et al. Effects of Voltage-gated Potassium Channel on the Proliferation of Human Ostersarcoma [J]. Science Technology and Engineering, 2009,9(16):4619-4623
- [11] Cherubini A, Taddei GL, Crociani O, et al. HERG potassium channels are more frequently expressed in human endometrial cancer as compared to non-cancerous endometrium [J]. Br J Cancer, 2000, 83 (12): 1722-1729
- [12] Elena L, Leonardo G, Olivia C, et al. Herg1 gene and HERG1 protein are overexpressed in colorectal cancers and regulate cell invasion of tumor cells[J]. Cancer Res, 2004, 64: 606-611
- [13] Afrasiabi E, Hietamaki M, Viitanen T, et al. Expression and significance of HERG (KCNH2) potassium channels in the regulation of MDA-MB-435S melanoma cell proliferation and migration[J]. Cellular signalling, 2010, 22(1):57-64
- [14] Pillozzi S, Arcangeli A. Physical and functional interaction between integrins and hERG1 channels in cancer cells [J]. Adv Exp Med Biol, 2010,674:55-67
- [15] Wang H, Zhang Y, Cao L, et al. HERG K⁺ channel, a regulator of tumor cell apoptosis and proliferation [J]. Cancer Res, 2002,62 (17): 4843-4848
- [16] Shao XD, Wu KC, Guo XZ, et al. Expression and significance of HERG protein in gastric cancer[J]. Cancer Biol Ther,2008,7(1):45-50
- [17] 吕清, 卢晓明, 舒晓刚, 等. 抗心律失常药 E-4031 对人胃癌细胞系 SGC-7901 的肿瘤生物学行为的调节作用 [J]. 医药导报, 2010,29 (1):5-9
- Lv Qing, Lu Xiao-ming, Shu Xiao-gang, et al. Regulation Effects of Antiarrhythmic Drug E-4031 on Tumor Biologic Behavior of Gastric Cancer Cell Line SGC-7901[J]. Herald of Medicine,2010,29(1):5-9

· 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》是国内第一部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 and 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 Gambhir 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。