

抑制 Dicer 基因对 shRNA 功能发挥的影响*

张秉强¹, 陈维贤¹, 黄英¹, 何茂锐¹, 吴莹¹, 张君¹,

Tong-Chuan He², 黄爱龙^{1**}

(1. 重庆医科大学省部共建感染性疾病分子生物学教育部重点实验室 重庆医科大学病毒性肝炎研究所, 重庆, 400016; 2. Molecular Oncology Laboratory, The University of Chicago Medical Center, IL 60637, USA)

Inhibition of Dicer Gene and Its Influence on the Function of shRNA

ZHANG Bing-qiang¹, CHEN Wei-xian¹, HUANG Ying¹, HE Mao-rui¹, WU Ying¹, ZHANG Jun¹,
TONG-Chuang HE², HUANG Ai-long^{1**}

(1. The Key Laboratory of Molecular Biology of Infectious Diseases of Ministry of Education, The Institute for Viral Hepatitis, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China; 2. Molecular Oncology Laboratory, The University of Chicago Medical Center, IL 60637, USA)

Abstract: In order to determine the effect of silencing Dicer on shRNA-mediated RNA interference, we constructed two shRNA expression vectors that targeted the RNase III domain of the Dicer gene. The shRNA vectors were transfected into 2215 cells, colon cancer TC cells and Green Fluorescent Protein (GFP)-tagged HepG2 A9 cells using lipofectamineTM 2000. The level of Dicer mRNA was assessed by RT-PCR. After the knocking-down of the Dicer gene was confirmed in the GFP-tagged HepG2 A9 cells, another shRNA expression vector that targeted the GFP gene was transfected in these cells. The suppression of GFP expression was evaluated by RT-PCR and fluorescence microscopy. We found that anti-Dicer shRNA expression vectors efficiently inhibited the expression of Dicer in the tested cells lines. Moreover, when the Dicer expression was silenced in GFP-tagged HepG2 A9 cells, the GFP-targeting shRNA expression vector was less effective in silencing GFP expression. Thus, our results indicated that the expression of Dicer could be inhibited by anti-Dicer shRNA expression vectors, and that the expression silencing activity of shRNA expression vectors is dependent on the presence of Dicer enzyme.

Key words: RNA interference; Dicer; shRNA(short hairpin RNA)

摘要: 本文将 Dicer 基因的 RNA 酶 III 结构域作为靶区, 设计并构建了两个抗 Dicer 基因的小发夹样 RNA(shRNA) 表达载体, 将其转染 2215、结肠癌 TC 细胞和基因组中整合有绿色荧光蛋白基因(GFP)的 HepG2 A9 细胞, 通过 RT-PCR 评价 RNA 干扰抑制 Dicer 基因表达的效率; 当 HepG2 A9 细胞 Dicer 基因表达被上述 RNA 干扰抑制时, 再转染抗 GFP 的 shRNA 表达载体, 通过 RT-PCR 和荧光显微镜观察 GFP 表达水平。结果显示, 在不同细胞系中, 这两个抗 Dicer 基因 shRNA 表达载体, 均能明显抑制 Dicer 基因的表达; 当 Dicer 基因受抑时, 后续转染抗 GFP 的 shRNA 表达载体不能有效抑制 GFP 的表达。结果表明, 抗 Dicer 基因 shRNA 表达载体, 能够明显抑制 Dicer 基因的表达; shRNA 表达载体的功能发挥需要 Dicer 酶的直接参与。

关键词: RNA 干扰; Dicer; 小发夹样 RNA (shRNA)

中图分类号: Q7

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)06-0604-05

收稿日期: 2005-05-23, 修回日期: 2005-07-11

* 基金项目: 国家杰出青年基金(30228026); 国家青年科学基金(30300298)

作者简介: 张秉强(1969-), 男, 主治医师, 博士, 现在重庆医科大学附属第一医院消化内科工作。

E-mail: zhbinqiang@163.com. Tel: 023-68485230

** 通讯作者: 黄爱龙(1964-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为病毒和肿瘤的发病机理。

Corresponding author. Tel: 023-68486135. E-mail: ahuang@public.cta.cq.cn

RNA 干扰技术是目前研究的热点, 在经典的 RNA 干扰机制模型中, Dicer 酶被认为起关键的作用, 它可以将外源的长 dsRNA 切割成 21-23nt 左右的双链 RNA(被命名为小干扰 RNA, small interference RNA, siRNA), 后者与 Dicer 酶结合形成 RNA 诱导的沉默复合物(RISC, RNA-induced Silencing Complex), 当与同源的 mRNA 特异性结合后, RISC 中的核酸酶将靶基因 mRNA 剪切断, 从而实现转录后基因沉默^[1,2]。由于 Dicer 酶是 RNA 干扰作用中的一个重要环节, 故已有研究对其功能进行了阐述, 包括基因工程表达 Dicer 酶、对其晶体结构进行 X 线晶体衍射测定和体外验证 Dicer 酶的切割功能等^[3-4], 都取得了良好的效果, 为 Dicer 酶的功能确定奠定了基础。

基因敲除技术能较好的研究基因功能, 但由于 Dicer 基因是细胞内重要的基因, 与细胞存活及胚胎发育有关, 故完全敲除 Dicer 基因后, 细胞及胚胎存活困难, 不利于对 Dicer 基因的功能做更广泛的研究^[5-8]; 最近有研究通过条件性失活的方式来研究 Dicer 基因功能, 取得了良好的效果^[9], 但这些技术操作相对复杂, 成本较高, 而通过 shRNA 表达载体抑制 Dicer 表达的研究尚未见报导, 因此, 我们设计了本实验, 拟通过 RNA 干扰作用抑制 Dicer 基因的表达, 再进一步验证 Dicer 基因受抑制时, 后续 shRNA 的功能是否受到影响, 以明确 Dicer 基因在 RNA 干扰产生机制中的功能, 为下一步探讨 RNA 干扰在机体抗病毒和肿瘤方面作用的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

质粒 pTZU6+1, 内含人 U6 启动子 III, 由美国 University of Michigan Dr. David Engelke 惠赠; 整合 HBV 基因组的 2215 细胞、整合 GFP 基因的 A9 细胞和结肠癌 TC 细胞均由本实验室提供; 细胞培养用血清为国产四季青新生牛血清, 1640 培养基为本室提供; 寡核苷酸 DNA 片段及引物合成由上海英俊公司完成, 测序由本研究所完成。T4 DNA 连接酶、内切酶和 Marker 为 Takara 公司产品; 质粒提取采用 Qiagen 公司的去内毒素大量提取试剂盒, 细胞总 RNA 提取用 Qiagen 公司的 Mini RNAeasy 试剂盒, RT-PCR 检测用 Qiagen 公司的一步法试剂盒。PCR 仪为德国的 Eppendorf PCR 仪。转染试剂为美国 Invitrogen 公司的脂质体 LipofectaminTM

2000, 其稀释液为 Opti-MEM[®]。琼脂糖购于上海百威科技公司, 电泳仪采用北京六一公司的产品。核酸定量采用美国 Beckman 公司 DU Series 600 分光光度仪进行, 凝胶成像和图像分析采用英国剑桥 Synoptics 有限公司生物影像系统中的 geneGenius 和 GeneTools 软件(版本 3.05)进行。荧光显微镜为日本 Olympus 公司的 CK-40 倒置荧光显微镜产品, 图像分析软件为美国 Media Cybernetics 公司 Image-Pro Plus v5.1。

1.2 抗 Dicer 基因 shRNA 表达载体的构建

抗 Dicer 的 RNA 干扰靶区选择参照 E-RNAi 网上提供的服务完成 (<http://e-rnai.dkfz.de/>), 将 Dicer 酶的 RNA 酶 III 结构域作为靶点, 选出两个得分较高且不含连续三个以上 A 的序列, 它们分别是: D1: CCAATGCCTTGTCCTAATAAC, D2: GAAGCTCGATGAAGATTTAGA, 将其设计成能在体内转录成反向互补且以 TTCG 为环的小发夹样 RNA。先人工合成寡核苷酸 DNA 片段, 在含 200mM NaCl 的退火缓冲液中进行退火, 连接到 pTZU6+1 载体上, 构建成抗 Dicer 基因的 pShRNA-D1 和 pShRNA-D2, 经酶切鉴定后, 再测序证实。抗 GFP 的 shRNA (pShRNA-GFP) 靶区为 GCTGACCCTGAAGTTCATC。

1.3 细胞转染

用脂质体将 pShRNA-D1 和 pShRNA-D2 分别转染 2215 和结肠癌 TC 细胞, 以未转染细胞或以不表达 shRNA 的空载体 pTZU6+1 的转染作为未干扰阴性对照, 转染方式按 LipofectaminTM 2000 说明书进行, 即当细胞 90%以上融合时进行转染, 先用稀释液 Opti-MEM[®]将质粒和脂质体稀释, 再将二者混合, 室温孵育 20min 后, 直接加于含血清但不含抗生素的细胞培养基中即可。转染剂量参照我们以前优化的结果进行, 即对 100mL 培养瓶中的细胞进行转染时, pShRNA 表达载体或空载体 pTZU6 用 5 μ g, 脂质体 LipofectaminTM 2000 用 8 μ L。此剂量远小于转染试剂说明书推荐的剂量 (16 μ g DNA 和 40 μ L lipofectamineTM 2000), 转染后细胞生长状态良好, 细胞无明显死亡, 易于进行下游检测, 且可以观察到较明显的 RNA 干扰效果, 在转染后 48-72h 收集细胞进行下游检测。对于 HepG2 A9 细胞, 先用 pShRNA-D1 和空载体 pTZU6+1 分别转染, 3d 后, 再转染 5 μ g pShRNA-GFP, 经 72h 培养后, 收集细胞进行下游检测。

1.4 细胞总 RNA 的提取

胰酶消化收集细胞，细胞沉淀用 10mL PBS 漂洗 1 次，以后的操作按试剂盒说明进行，产物用 50 μ L 无 RNA 酶的水溶解，-80 $^{\circ}$ C 中保存，避免反复冻融。

1.5 Dicer 和 GFP 基因 mRNA 的 RT-PCR 扩增及半定量 RT-PCR 检测

采用 Prime 3 软件进行引物设计，其引物如下：Dicer 的引物为，上游：CTCACCACA ACTTCCCA CCT，下游：TGTCTCGATGCCTGTGTCTC，扩增产物长度为 372bp，退火温度为 55 $^{\circ}$ C，用一步法 RT-PCR 将其扩增出，电泳观察产物的大小与预期相符后，将产物装入 pGEM-T 载体上，再测序证实扩增产物为所需的 Dicer 基因片段。GFP 基因的上游引物为 5'-GCAGCACGACTTCTTCAA-3'，下游引物为 5'-GTCCATGCCGAGAGTGAT-3'，扩增产物为 465bp(240-705bp)。半定量检测时，以 hGAPDH 扩增产物为内参，hGAPDH 的上游引物为 5'-GGCTCTCCAGAACATCAT-3'，下游引物为 5'-CACCTGGTGCTCAGTGTA-3'，扩增产物为 240bp (678bp-918bp)。在一个总体积为 25 μ L 的反应体系中，同时加入 Dicer、GAPDH 或 GFP、GAPDH 两对引物，总 RNA 模板加 1 μ L，逆转录条件为 50 $^{\circ}$ C，30min，PCR 的退火温度为 55 $^{\circ}$ C，循环数为 24，取 5 μ L 产物进行电泳，成像后用 GeneTools 软件进行定量分析。

1.6 荧光显微镜检测 GFP 表达受抑情况

转染抗 GFP 的 shRNA 表达载体 3d 后，用荧光显微镜观察 HepG2 A9 细胞中 GFP 荧光强度的改变，用 Image-Pro Plus 软件计算荧光亮度和细胞总数，以总荧光亮度与细胞总数的比值来反映 GFP 表达水平。

2 结果

2.1 pShRNA 酶切鉴定及测序

重组质粒和空载体经 *Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切，分别产生 2800+395 及 2800+352bp 的片段，可以通过电泳看出二者之间的差别，以此进行重组鉴定。如图 1 所示，为阳性克隆，最后测序证实序列正确。

2.2 Dicer 基因 mRNA 的 RT-PCR 扩增产物检测

扩增产物电泳的位置与预期 372bp 相符(图 2)。将其装入 T 载体上，测序证实为所需的 Dicer 基因片段。

2.3 在不同细胞系中 RNA 干扰抑制 Dicer 基因表达的效率

在结肠癌 TC 细胞中，与未转染细胞或转染

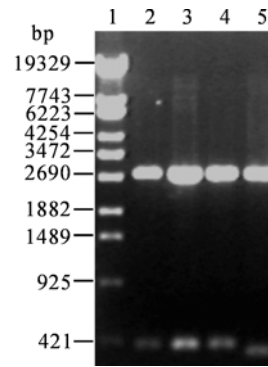


图 1. pShRNA 酶切鉴定电泳结果

Fig. 1 Restriction map of recombinant plasmid pShRNA 1, λ T14 DNA Marker; 2-4, pShRNA digested by *Hind* III and *Eco*R I (2800+395bp); 5, pTZU6+1 digested by *Hind* III and *Eco*R I(2800+352bp)

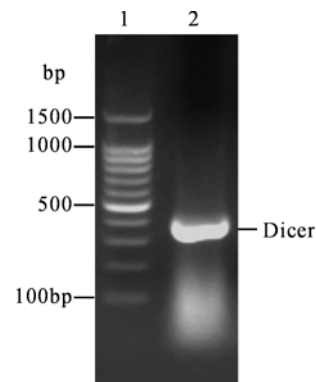


图 2 Dicer 基因 RT-PCR 产物检测

Fig.2 Detection of Dicer got from RT-PCR 1. 100bp Marker; 2. RT-PCR of Dicer (372bp)

pTZU6+1 相比，pShRNA-D1 和 D2 均可以明显抑制 Dicer 基因的表达，抑制率分别为 58%和 52%(图 3)；在 2215 细胞中，抑制率分别为 85%和 67%(图 4)；在 HepG2 A9 细胞中，pShRNA-D1 的抑制率为 52%(图 5)。

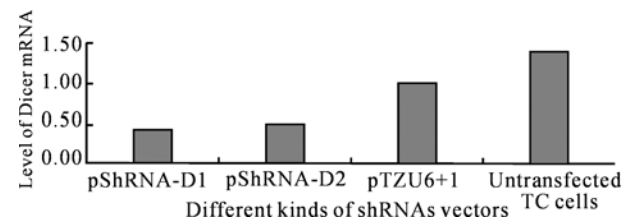


图 3 针对 Dicer 基因的 shRNA 在结肠癌 TC 细胞中的作用直方图

Fig.3 Dicer gene expression inhibited by shRNAs in Colon cancer TC cells

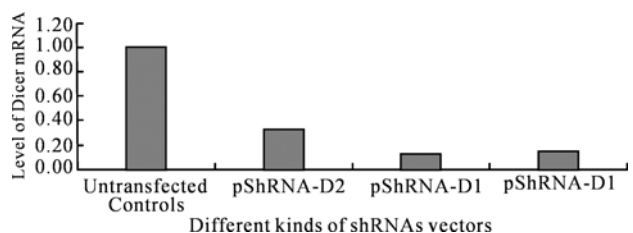


图 4 针对 Dicer 基因的 shRNA 在 2215 细胞中的作用直方图

Fig. 4 Dicer gene expression inhibited by shRNAs in 2.2.15 cells

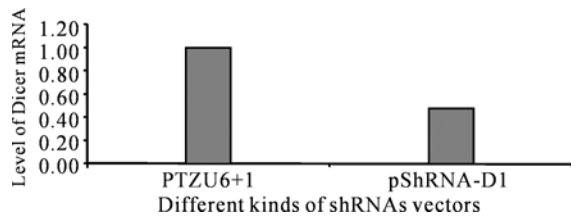


图5 针对 Dicer 基因的 shRNA 在 HepG2 A9 细胞中的作用直方图

Fig. 5 Dicer gene expression inhibited by shRNAs in HepG2 A9 cells

2.4 RT-PCR 检测 Dicer 基因受抑对后续 shRNA 功能发挥的影响

如图 6 所示, 当 Dicer 基因受抑制时, 后续抗 GFP 的 shRNA 功能发挥受到明显影响。通过 GeneTools 软件定量分析后发现, 与未转染 A9 细胞相比, 其抑制率仅为 4%; 而对照组 Dicer 基因未受抑, pTZU6-GFP 的抑制率为 36%。

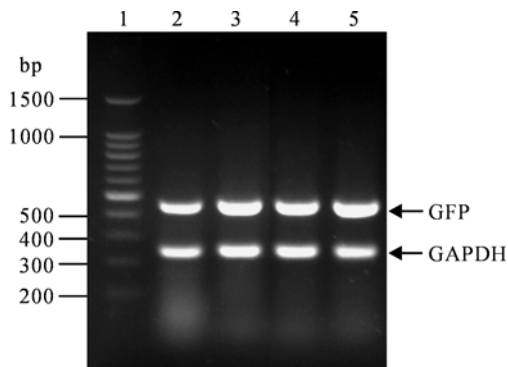


图6 RT-PCR 检测 Dicer 基因受抑对后续抗 GFP 的 shRNA 功能发挥的影响

Fig.6 RT-PCR showed the function of shRNA aimed at GFP after Dicer gene inhibited

1, 100bp Marker; 2, Transfected by pTZU6+1/pShRNA-GFP; 3, Transfected pTZU6-D1/ pShRNA-GFP; 4, Transfected pTZU6+1; 5, Untransfected A9 Cells.

2.5 荧光显微镜观察 Dicer 基因受抑对后续 shRNA 功能发挥的影响

见图 7 所示, 结果与 RT-PCR 检测 GFP mRNA 表达受抑的趋势一致, 即当 Dicer 基因受抑制时, 后续抗 GFP 的 shRNA 功能发挥受到明显影响, 与未转染的 A9 细胞相比, 其抑制率仅为 13%; 而对照组 Dicer 基因未受抑, pShRNA-GFP 的抑制率为 60%。

3 讨论

目前, RNAi 的产生机制尚未完全清楚, 一般认为, 参与 RNAi 产生过程的主要酶和蛋白质包括: 双链 RNA 特异性核酸内切酶 (dsRNA specific

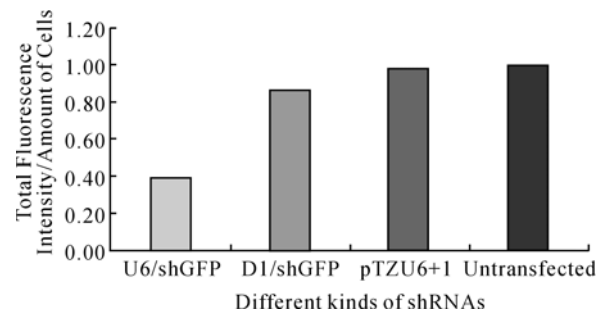
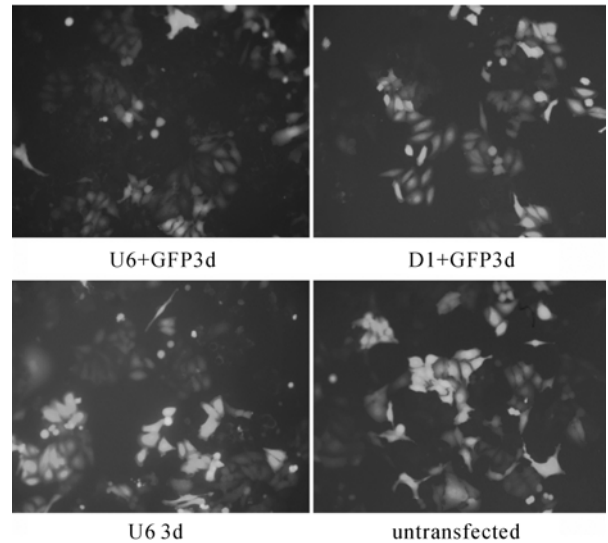


图7 荧光显微镜观察 Dicer 基因受抑对后续抗 GFP 的 shRNA 功能发挥影响的直方图

Fig.7 Fluorescence microscope showed the function of shRNA aimed at GFP after Dicer gene inhibited

endonuclease, 果蝇中称为 Dicer)、RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RNA dependent RNA Polymerase, RdRP)、解旋酶、外切酶以及含有 PAZ 结构域的 Argonaute 等蛋白质。Dicer 是 RNA 酶 III 家族中 dsRNA 特异性核酸内切酶, 它的三维结构中包含 N-端 RNA 解旋结构域, PAZ 结构域, 2 个 RNA 酶 III 结构域和 C 端 dsRNA 结合基序。Dicer 主要通过其 RNA 酶 III 结构域将 dsRNA 切割成 21-23nt siRNA (small interfering RNAs) 片段。RdRP 能以 mRNA 或 dsRNA 为模板延伸 RNA 链。RNAi 产生的基本过程大致如下: 外源性长链 dsRNA 进入细胞后, 被 Dicer 的 C 端识别并与其结合, 在 Dicer 的 RNA 酶 III 作用下, dsRNA 被切割成 21-23nt 的 siRNA 片段, 每个片段的 3' 端都有 2 个核苷酸突出。由于 siRNA 片段的量较少, 故其主要是作为引物, 在 RdRP 的作用下, 以 mRNA 或 dsRNA 为模板在细胞内进行扩增, 生成更多的 dsRNA。新生 dsRNA 再继续被降解成次级 siRNA。Argonaute 等相关蛋白通过 PAZ 结构域与

Dicer 结合, 在核酸内、外切酶、解旋酶的参与下, 与次级 siRNA 形成具有多个亚单位的核糖核酸和蛋白质复合物, 即 RNA 诱导的沉默复合物 (RISC)。RISC 中的解旋酶在 ATP 的参与下解开 siRNA 的双链, 其反义链通过碱基互补方式特异性地结合到同源 mRNA 上, 随即在 RISC 中核酸酶的作用下使 mRNA 发生降解, 从而产生 RNAi 效应^[1,2]。

关于 Dicer 酶在 dsRNA 切割方面的功能已明确, 但对 Dicer 是否参与 RNA 干扰途径中的其它环节尚未确定, 现存在三种观点, 第一种观点认为, 在哺乳动物细胞中, Dicer 参与 siRNA 的功能发挥, 即 Dicer 不但能将 dsRNA 切割成 siRNA, 还参与 RISC 的形成, 并通过与 siRNA 紧密结合, 使 RISC 的活性增强^[5,6]; 第二种观点认为, Dicer 基因仅参与将 dsRNA 切割成 siRNA 的过程, Dicer 基因的敲除并不影响 siRNA 的功能发挥^[9]。第三种观点认为, Dicer 基因缺失时, 干细胞不能产生 RNA 干扰作用, 但体细胞仍能观察到 RNA 干扰作用^[7], 说明机体内可能还存在除 Dicer 以外的另一条 RNA 干扰途径, 这些研究结果将促使人们对 RNA 干扰进行深入的研究, 最终使我们能够更有效地利用这一新型生物技术为人类服务。

通过载体方式, 在体内转录出的 shRNA, 可以像化学合成的 siRNA 一样发挥高效的干扰作用, 但其作用的机理仍然不清楚。有研究报导, 这种 shRNA 在设计上不需要考虑 siRNA 的特殊结构, 如在 3'端外挂 2 个 U 等, 而且并不需要 Dicer 酶切割成 siRNA, 即可直接参与形成 RISC, 而发挥干扰作用。因此, 对于 shRNA 和 siRNA 来说, Dicer 基因的表达受抑, 主要影响靶 mRNA 的切割过程, 我们观察到 Dicer 基因受抑时, 后续的 shRNA 表达载体不能正常发挥其功能, 说明 Dicer 除了参与 dsRNA 的切割过程外, 还参与靶 mRNA 的切割过程。

RNA 干扰是一种抗病毒和肿瘤的方式, 因此, 本研究将为下一步探讨 RNA 干扰在机体抗病毒和肿瘤方面作用的研究奠定基础。

References

- [1] Bernstein E, Candy A A, Hammond S M, *et al.* Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference [J]. *Nature*, 2001, 18; 409 (6818): 363-366.
- [2] Agami R. RNAi and related mechanisms and their potential use for therapy [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2002, 6: 829-834.
- [3] Kawasaki H, Suyama E, Lyo M, *et al.* siRNAs generated by recombinant human Dicer induce specific and significant by target site-independent gene silencing in human cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31 (3): 981-987.
- [4] Takeshita D, Zenno S, Lee W C, *et al.* Crystallization and preliminary X-ray analysis of the C-terminal RNase III domain of human Dicer [J]. *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2006; 62 (Pt 4): 402-404.
- [5] Doi N, Zenno S, Ueda R, *et al.* Short-interfering-RNA-mediated gene silencing in mammalian cells requires Dicer and eIF2C translation initiation factors [J]. *Curr Biol*, 2003, 13: 41-46.
- [6] Pham J W, Pellino J L, Lee Y S, *et al.* A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila* [J]. *Cell*, 2004; 117 (1): 83-94.
- [7] Knight S W, Bass B L. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Science*, 2001; 293 (5538): 2269-2271.
- [8] Harris K S, Zhang Z, McManus M T, *et al.* Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006; 103 (7): 2208-2211.
- [9] Murchison E P, Partridge J F, Tam O H, *et al.* Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005; 102 (34): 12135-12140.