

恒河猴 *P21* 基因在 COS-7 细胞中沉默位点的验证

李雨函¹, 苏静芬¹, 张晨², 石亮¹, 刘云波¹

(1. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京 100021; 2. 北京大学生命科学学院, 北京 100871)

【摘要】 目的 在细胞水平筛选恒河猴 *P21* 基因的有效沉默靶点。方法 检测 COS-7 中 *P21* 基因的表达水平;设计 shRNA 并构建 *P21*-RNA 干扰慢病毒载体 FUGW-TDT-*P21*shRNA 转染 COS-7 细胞,通过 real-time PCR 检测沉默效率,并以 Western blot 在蛋白水平进行验证。结果 筛选到四个有效的靶位,分别位于 *P21* mRNA 的 541-561、542-562、215-239、624-648 bp。四个靶位点在 mRNA 水平的沉默效率分别为 $(91.82 \pm 3.21)\%$ 、 $(82.47 \pm 2.48)\%$ 、 $(81.31 \pm 2.69)\%$ 和 $(87.35 \pm 4.59)\%$ 。相应的蛋白表达量为 $(11.97 \pm 0.70)\%$ 、 $(20.22 \pm 0.65)\%$ 、 $(23.21 \pm 0.63)\%$ 和 $(14.42 \pm 0.86)\%$ 。结论 在细胞水平筛选得到四个有效的 *P21* 基因沉默靶点,可用于恒河猴基因沉默研究。

【关键词】 基因沉默; *P21* 基因;恒河猴

【中图分类号】 R743.31; Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 03-0297-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.014

Validation of the silencing site of rhesus monkey *P21* gene in COS-7 cells

LI Yu-han¹, SU Jing-fen¹, ZHANG Chen², SHI Liang¹, LIU Yun-bo¹

(1. Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China;
2. College of Life Science, Peking University, Beijing 100871)

【Abstract】 **Objective** To screen the effective silencing targets of *P21* gene at the cellular level in rhesus monkey. **Methods** To detect the expression of *P21* gene in COS-7 cells (derived from the kidney of African green monkey, *Cercopithecus aethiops*). Four small hairpin RNA (shRNA) sequences targeting rhesus monkey *P21* gene were designed and inserted into lentivirus-based gene silencing constructs FUGW-TDT. The vectors were transfected into COS-7 cells respectively. The suppression of *P21* mRNA was detected by real-time PCR, and the expression of *P21* protein was detected by Western blot assay. **Results** Four gene-silencing sequences were screened that lied in 541-561 bp, 542-562 bp, 215-239 bp, and 624-648 bp of the rhesus monkey *P21* mRNA. Their silencing rate was $(91.82 \pm 3.21)\%$, $(82.47 \pm 2.48)\%$, $(81.31 \pm 2.69)\%$ and $(87.35 \pm 4.59)\%$, and the protein expression was $(11.97 \pm 0.70)\%$, $(20.22 \pm 0.65)\%$, $(23.21 \pm 0.63)\%$ and $(14.42 \pm 0.86)\%$, respectively. **Conclusions** Four effective silencing target sequences are screened at cellular level, which can be used in gene silencing research of rhesus monkeys.

【Key words】 Gene silencing; *P21* gene; Rhesus monkey

与目前广泛使用的啮齿动物相比,非人灵长类动物在生理、发育、行为、免疫以及基因背景与人类更加相近。在药物研发和安全性评价中,为减少啮齿动物与人类基因背景差距所带来的不稳定性

局限性,非人灵长类已成为重要的肿瘤研究和药物评价的实验动物^[1]。

虽然一直有非人灵长类自发神经、消化道等肿瘤的报道,但因发生率较低难以用其自发肿瘤作为

【基金项目】 国家科技支撑计划(No. 2014BAI03B01)。

【作者简介】 李雨函(1986-),女,研究方向:实验动物质量控制。E-mail: liyuhangz@sina.com

苏静芬(1987-),女,硕士研究生,研究方向:实验动物学。E-mail: jingfensu@126.com

李雨函和苏静芬为本文共同第一作者

【通讯作者】 刘云波, E-mail: yunbolu@126.com

研究模型^[2]。此外,在研究中由于非人灵长类动物个体间基因背景差异明显,对统计的分析要求较复杂,明显的个体基因差异也影响研究结果的解释。因此,利用癌症相关基因和基因工程技术建立和发展非人灵长类肿瘤模型动物为癌症机制的研究和抗癌药物研发以及临床前实验服务具有重要意义^[3]。

P21 (*Waf1/Cip1/Sdi1*) (文中简称 *P21*) 是细胞周期素依赖性激酶抑制因子,属于 CIP 家族。*P21* 具有广泛的 CDK 抑制活性,因其作用于细胞周期减少受损 DNA 的复制和积累,发挥抑癌作用,长期以来被认为具有抑制肿瘤的功能。近些年对 *P21* 的研究发现在 *Trp53*^{-/-} 和 *Atm*^{-/-} 小鼠自发性淋巴瘤中 *P21* 并没有抑制肿瘤的发生,因此有提出在特定的细胞环境和条件下 *P21* 有可能是致癌基因^[4,5]。*P21* 在癌症发生和发展中的功能非常重要,而其作用并不完全清楚。为利于以后建立相应基因沉默动物模型、深入研究 *P21* 在肿瘤发生及发展中的作用和功能,本研究从细胞水平筛选并确定了恒河猴 *P21* 基因的沉默靶点,为进一步探讨 *P21* 的功能作用奠定细胞水平的基础研究。

1 材料和方法

1.1 材料

COS-7 购自中国医学科学院基础研究所细胞中心, Vero, Vero-E6 购自 ATCC 细胞库。含有 ubiquitin promoter (Ubi promoter) 调控的红色荧光蛋白 tandem dimer tomato (tdt) 报告基因的 FUGW-TDT 慢病毒载体由北京大学实验室保存。胎牛血清 (FBS)、胰蛋白酶为 Invitrogen-Gibco 公司产品。细胞培养基 DMEM 购自 Hyclone; 质粒提取试剂盒购自 Promega; 逆转录试剂盒购自 Invitrogen; PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司; *E. coli* DH5 α 感受态细胞购自全式金公司; 鼠抗猴 *P21* 单克隆抗体, 购自 Santa Cruz 公司; HRP 标记的羊抗鼠-HRP 购自 Sigma; PCR 检测引合成及测序均由 Invitrogen 公司提供; β -actin 抗体购自上海康成生物; Xho I 和 Xba I 购自 NEB。

1.2 shRNA 的设计

Life technology 在线 shRNA 设计工具, 根据 NCBI 数据库中恒河猴 *P21* 基因的序列 (NM_00194722.2), 依照 shRNA 设计原则, 选择五个靶点设计 shRNA 序列 (序列见表 1)。靶点均与非洲绿猴 *P21* 基因同源。设计网址为 (<http://rnaidesigner.lifetechnologies.com/rnaiexpress/setOption.do?designOption=shrna&pid=261946071111563135>)。

lifetechnologies.com/rnaiexpress/setOption.do?designOption=shrna&pid=261946071111563135)。

1.3 P21-RNA 干扰慢病毒载体的构建和鉴定

载体构建参考文献^[6]。用 Xho I 和 Xba I 对 FUGW-TDT 载体进行酶切消化, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 胶回收、纯化后备用。载体与需要导入的 shRNA 按比例混合 16 $^{\circ}$ C 过夜连接后转化至 *E. coli* DH5 α 中, 37 $^{\circ}$ C 培养后挑取单菌落培养后进行菌液鉴定及测序 (引物均为 F: 5'-AGGAAGATGGCTGTGAGG-3'; R: 5'-GCCTTGATCGTATAAGC-3', 提取阳性克隆菌液质粒, 命名为 FUGW-TDT-P21shRNA。本实验的阴性对照为未导入 shRNA 的空载 FUGW-TDT 空质粒。

1.4 细胞培养与慢病毒质粒转染

用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中常规培养上述细胞。在六孔板中按每孔 (6~8) $\times 10^5$ 细胞种细胞, 24 h 内细胞密度达 70%~80% 时进行转染。实验分空载质粒组 (阴性对照) 和 FUGW-TDT-shP21 质粒组。其中质粒组分别为四个针对不同靶点设计的质粒。转染按照 Polyethylenimine (PEI) 试剂说明操作, 48 h 后观察荧光。

1.5 RT-PCR 检测各组细胞中 mRNA 的表达

收集各组细胞按照 Invitrogen Trizol Reagent 说明书分别提取细胞总 RNA, 测量其浓度后按试剂盒说明进行逆转录和 PCR。*P21* 基因引物为 F: 5'-CGAAGTCAGTTCCTTGTGGG-3', R: 5'-CATTAGCGCATCACAGTCGC-3' 预计扩增出 188 bp 左右的目的片段。内参 GAPDH, 其引物序列参考文献^[7], F: 5'-ACATCATCCCTGCCTCTACTG-3', R: 5'-AGTGGGTGTCGCTTTGAAGTC-3', 预计扩增出 261 bp 左右的目的片段。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.6 Western blot 检测各组细胞中 P21 蛋白的表达

转染细胞 48 h 后弃掉细胞培养液、吸净残液, 加入预冷的 1 \times PBS 冲洗两次后加入 1 \times SDS 裂解液, 均匀吹打细胞后收集裂解产物, 高速离心后收取上清测定总蛋白浓度。SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳用 8% 的分离胶以及 4% 的积层胶, 总蛋白上样量为 20 μ g。转膜后加鼠抗猴 *P21* 单克隆抗体 (1:1000) 封闭液 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 1 \times PBS 充分洗膜后加

入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1: 5000) 封闭液孵育 3 h, 曝光、显影后用 Image J 软件进行灰度扫描分析。

1.7 统计分析

进行方差齐性检验后采用 Fisher 检验, $P < 0.05$ 认为差异有显著性。

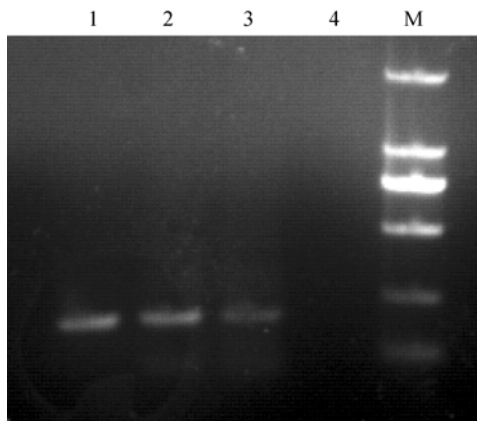
表 1 恒河猴 P21 基因沉默靶点

Tab. 1 The sites of P21 gene silencing in the rhesus monkeys

质粒名称 Plasmids	靶点 Sites	序列 Sequences	位置 Positions
FUGW-TDT-P21shRNA-1	1	GGCTGATCTTCTCCAAGAGGA	541 ~ 561
FUGW-TDT-P21shRNA-2	2	GCTGATCTTCTCCAAGAGGAA	542 ~ 562
FUGW-TDT-P21shRNA-3	3	GCGATGGAACCTCGACTTTGTCACC	215 ~ 239
FUGW-TDT-P21shRNA-4	4	CTACATCTTCTGCCTTAGCTTTAA	624 ~ 648

2.2 细胞中 P21 丰度的检测

选取 Vero、Vero-E6、COS-7 三种细胞提取 RNA 后逆转录为 cDNA, 普通 PCR 后电泳检测 P21 丰度 (图 1)。结果显示三种细胞 P21 的丰度均较高, 但实验中 COS-7 比 Vero、Vero-E6 更易转染, 因此本研究室优先选取 COS-7 用于基因抑制效率检测。



注: 图示为 P21 在三种细胞中的丰度, 1. COS-7; 2. Vero; 3. Vero-E6; 4. H₂O 为阴性对照。M: marker。

图 1 P21 细胞丰度检测

Note. This is the abundance of three types of cells, 1. COS-7, 2. Vero cells, 3. Vero-E6 cells, 4. H₂O as the negative control, M; marker.

Fig. 1 Detection of the P21 abundance

2.3 检测转染细胞中 P21 基因 mRNA 的表达

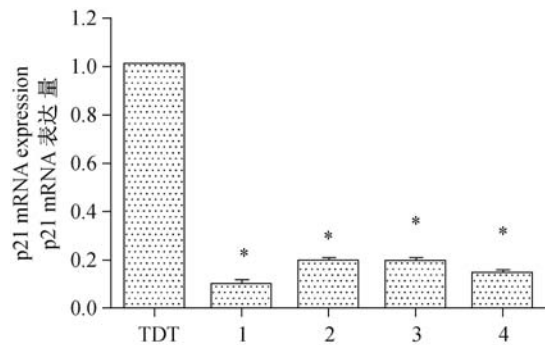
转染 48 h 后提取 RNA, RT-PCR 检测 P21 mRNA 在 COS-7 细胞中的表达, trizol 法提取 RNA, 逆转录后进行 real-time PCR, 按 2^{-ΔΔCt} 法进行计算。与空载 FUGW-TDT 质粒相比, 四个靶位点在 P21 mRNA 水平的沉默效率均明显 ($P < 0.05$), 其中 FUGW-TDT-P21shRNA-1 的沉默效率为 (91.82 ± 3.21)%, FUGW-TDT-P21shRNA-2 的沉默效率为

2 结果

2.1 恒河猴 P21 基因沉默靶点和 shRNA

Life technology 在线设计 shRNA 序列, 在恒河猴 P21 mRNA 中的位置见表 1。

(82.47 ± 2.48)%, FUGW-TDT-P21shRNA-3 的沉默效率为 (81.31 ± 2.69)%, FUGW-TDT-P21shRNA-4 的沉默效率为 (87.35 ± 4.59)% (图 2)。



注: 对照组 FUGW-TDT; 1. FUGW-TDT-P21shRNA-1; 2. FUGW-TDT-P21shRNA-2; 3. FUGW-TDT-P21shRNA-1; 4. FUGW-TDT-P21shRNA-4. $n = 4$, * 代表与对照组 FUGW-TDT 比较 $P < 0.05$ 。

图 2 SYBR-Green 法 real-time PCR 检测 P21 基因 mRNA 的表达

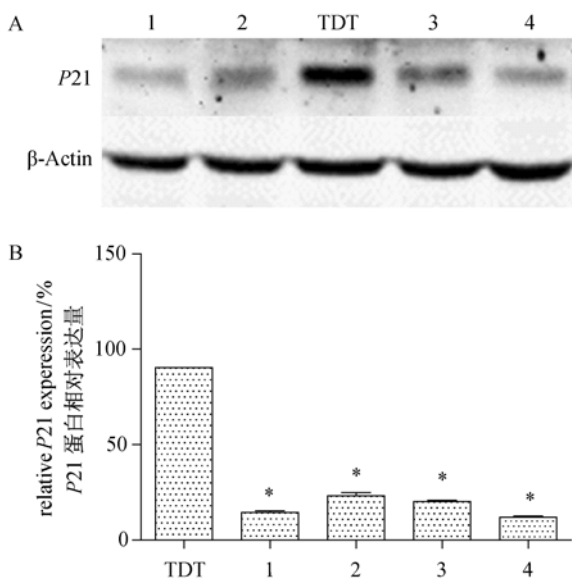
Note. Control group FUGW-TDT; 1: FUGW-TDT-P21shRNA-1; 2: FUGW-TDT-P21shRNA-2; 3: FUGW-TDT-P21shRNA-1; 4: FUGW-TDT-P21shRNA-4. $n = 4$, * means $P < 0.05$, compared with the control group FUGW-TDT.

Fig. 2 Detection of P21 mRNA by real-time PCR

2.4 FUGW-TDT shRNA 对 cos-7 细胞中 P21 蛋白表达的抑制作用

Western blot 检测 COS-7 细胞中 P21 的表达量, 结果显示 P21 shRNA 转染的细胞 P21 蛋白的表达量较对照组明显减少。经图像软件进行灰度分析, 其中 FUGW-TDT-P21shRNA-1 转染后细胞 P21 表达量为 (11.97 ± 0.70)%, FUGW-TDT-P21shRNA-2 转染后细胞 P21 表达量为 (20.22 ± 0.65)%, FUGW-TDT-P21shRNA-3 转染后细胞 P21 表达量为 (23.21 ± 0.63)%, FUGW-TDT-P21shRNA-4 转染后细胞

P21 表达量为 $(14.42 \pm 0.86)\%$ (图 3)。Western blot 显示的结果和 real-time PCR 保持一致,四个靶位点在 *P21* 蛋白水平的沉默效率明显。



注: A. Western Blot 结果; B. 灰度扫描图像分析结果。1. FUGW-TDT-shp53-1; 2. FUGW-TDT-shp53-2; 3. FUGW-TDT-shp53-3; 4. FUGW-TDT; $n=4$, * 表示 $P < 0.05$ vs 对照组 FUGW-TDT。

图 3 Western Blot 检测 COS-7 细胞中 *P21* 蛋白的表达量

Note. A. The results of Western blot; B. The result of Image J scan. 1. FUGW-TDT-P21shRNA-1; 2. FUGW-TDT-P21shRNA-2; 3. FUGW-TDT-P21shRNA-1; 4. FUGW-TDT-P21shRNA-4. $n=4$, * means $P < 0.05$ vs. control group FUGW-TDT.

Fig. 3 Detection of *P21* protein by Western blot.

3 讨论

在 *CDKN1A*^{-/-} 小鼠发生自发性肿瘤是 *P21* 首次从基因学证明其具有抑癌作用,虽然人类的直肠癌、宫颈癌、脑颈部癌症、肺癌等大多数癌症的发展都与 *P21* 的表达相关,但并没有证明 *CDKN1A* 的变异使 *P21* 的功能完全丧失,但可以说明 *P21* 在抑癌作用中发挥着重要作用,和其他一些抑癌因子共同调节抑制肿瘤发生和恶化^[8]。*P21* 与肿瘤的分化、浸润深度、增生和转移有关,具有判断预后的价值。

现有研究发现在特定条件下 *P21* 的错误调控和表达也会致癌。在人类前列腺癌、乳腺癌、鳞状细胞癌都有 *P21* 过量表达,虽然没有直接证据证明 *P21* 过量表达与癌症直接相关,或是此类发现有可能是受到化疗和放疗的影响,但 *P21* 是致癌基因的理论在少量基因小鼠的研究中已被发现^[4,9]。

本研究中 real time PCR 和 Western blot 分析 RNA 干扰的 COS-7 细胞中 *P21* mRNA 水平和蛋白表达量均比对照组显著降低,且二者结果一致,有助于建立 *P21* 沉默的恒河猴模型。

参 考 文 献

- [1] Eastmond DA, Vulimiri SV, French JE, et al. The use of genetically modified mice in cancer risk assessment: challenges and limitations [J]. Crit Rev Toxicol, 2013, 43(8): 611-31.
- [2] Cianciolo RE, Butler SD, Eggers JS, et al. Spontaneous neoplasia in the baboon [J]. Med Primatol, 2007, 36(2): 61-79.
- [3] Eric JV, Gregory MM. Nonhuman primate models in the genomic era: a paradigm shift [J]. ILAR J, 2013, 54: 154-165.
- [4] De la Cueva E, García-Cao I, Herranz M, et al. Tumorigenic activity of *P21*Waf1/Cip1 in thymic lymphoma [J]. Oncogene, 2006, 25: 4128-4132.
- [5] Wang YA, Elson A, Leder P. Loss of *P21* increases sensitivity to ionizing radiation and delays the onset of lymphoma in atm-deficient mice [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(26): 14590-14595.
- [6] 苏静芬, 张晨, 李雨函, 等. 恒河猴 p53 基因沉默靶点在细胞水平的验证 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 8(24): 7-10.
- [7] Zhou HW, Lou SQ, Zhang K. Recovery of function in osteoarthritic chondrocytes induced by 16INK4a-specific siRNA in vitro [J]. Rheumatology, 2004, 43: 555-568.
- [8] McKenzie KE, Siva A, Maier S, et al. Altered WAF1 genes do not play a role in abnormal cell cycle regulation in breast cancers lacking p53 mutations [J]. Clin Cancer Res, 1997, 3(9): 1669-1673.
- [9] Roninson IB. Oncogenic functions of tumour suppressor *P21*Waf1/Cip1/Sdi1: association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts [J]. Cancer Lett, 2002, 179: 1-14.

[收稿日期] 2014-06-09