

·研究原著·

文章编号: 1000-2790 (2007) 11-1014-04

Galectin-3 shRNA 载体的构建表达及其对大肠癌细胞 lovo 增殖率的影响

程变巧¹, 姜泊¹, 包杰² (南方医科大学南方医院: ¹消化病研究所, ²检验医学中心, 广东广州 510515)

Construction and expression of galectin-3 shRNA recombinant vector and its effect on proliferation rate of colorectal cancer lovo cells

CHENG Bian-Qiao¹, JIANG Bo¹, BAO Jie²¹ Institute of Digestive Diseases, ² Center of Laboratory Medicine, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

【Abstract】 **AM:** To construct the eukaryotic vector expressing shRNA of galectin-3 and study its effect on the proliferation rate in lovo cells **METHODS:** Lovo cells transfected with empty PRNAT-U6 1 or nothing were regarded as negative or positive control groups, respectively. Two different 140 bp shRNA targeting the coding sequence of galectin-3 were designed, and inserted to the plasmid vector PRNAT-U6 1 for getting PRNAT-U6 1/galectin-3 shRNA. The human colorectal cancer lovo cells were transfected by two PRNAT-U6 1/galectin-3 shRNA. The transfection efficiency was detected by immunofluorescence; the expression levels of galectin-3 mRNA and protein were detected by RT-PCR and Western Blot, respectively; the proliferation rate was assayed by MTT assay. **RESULTS:** It was verified by restriction endonuclease digestion that the constructed vector expressing galectin-3 shRNA was correct. The transfection efficiency was 62% at 72 h. The expression of galectin-3 was significantly suppressed in lovo cells transfected by two PRNAT-U6 1/galectin-3 shRNA compared with positive and negative groups on the levels of mRNA and protein; there were significant differences on two levels ($F = 2.214, 148.566, P = 0.000, 0.000$), but no difference between positive and negative groups ($P = 0.448, 0.263$). The lovo cells transfected with PRNAT-U6 1/galectin-3 shRNA had lower cell proliferation rate ($F = 20.830, P = 0.000$ vs before transfection; $F = 149.710, P = 0.000$). There was significant difference as compared with positive and negative groups ($P = 0.000, 0.000$), but there was no difference between the latter two groups ($P > 0.05$). **CONCLUSION:** The galectin-3 shRNA vector has been successfully constructed. The expression levels of galectin-3

mRNA and protein are significantly depressed. The depressed expression of galectin-3 might decrease the proliferation rate of lovo cells.

【Keywords】 galectin-3; shRNA; cell proliferation

【摘要】 **目的:** 构建 galectin-3 shRNA 真核表达载体, 观察该基因的抑制对大肠癌细胞系 lovo 细胞增殖率的影响. **方法:** 以未转染 lovo 细胞作为阳性对照组, 转染空质粒的 lovo 细胞作为阴性对照组, 将针对人 galectin-3 基因的不同部位设计的长度约 140 bp 的 shRNA 插入到真核表达载体 PRNAT-U6 1 并转染人大肠癌细胞 lovo, 双酶切鉴定重组载体, 免疫荧光检测转染效果, RT-PCR 和 Western Blot 检测其对该基因 mRNA 和蛋白水平的抑制, MTT 测定干扰后对 lovo 细胞增殖率的影响. **结果:** 双酶切出一条约 120 bp 的 DNA 片段, 与插入片段长度相符. PRNAT-U6 1/Galectin-3 shRNA 表达载体顺势转染 lovo 细胞 72 h 后检测转染效率及 Galectin-3 在 mRNA 和蛋白水平的表达情况, 免疫荧光检测转染效率为 62%. 转染 PRNAT-U6 1/Galectin-3 shRNA 的 lovo 细胞 Galectin-3 的表达在 mRNA 和蛋白水平均明显下降, 各组间比较 $F = 2.214, 148.566, P = 0.000, 0.000$, 阴性组和阳性对照组相比, $P = 0.448, 0.263$. 干扰后细胞继续生长, 与干扰前相比, 生长明显减慢, $F = 20.830, P = 0.000$, 组间比较 $F = 149.710, P = 0.000$, shRNA 干扰组与阴性组和阳性组比较, $P = 0.000, 0.000$. **结论:** 成功构建 Galectin-3 shRNA 表达载体, 干扰后 Galectin-3 在 mRNA 和蛋白水平的表达明显降低, Galectin-3 表达的抑制可能会导致大肠癌细胞 lovo 增殖率的降低.

【关键词】 半乳糖凝集素 3; 短发夹 RNA; 细胞增殖

【中图分类号】 R329.25

【文献标识码】 A

0 引言

大肠癌是常见的消化道恶性肿瘤之一, 其发病年轻化、瘤体增长快、死亡率高的特点成为学者们关注和研究的切入点. 干扰技术能有效的敲除基因的表达, 目前已被运用到基因的生物学研究中. Galectin-3 是动物血凝素 Lectin 家族成员之一, 是目前认为与大肠癌发展关系比较密切的基因^[1], 在大肠癌中的研究还少有报道. 本试验我们拟构建 Galectin-3 短发夹干扰载体, 从负向角度来研究 Galectin-3 与大肠癌增殖的关系, 以望对今后研究 Galectin-3 在大肠癌中的生物学作用奠定基础.

收稿日期: 2006-12-13; 接受日期: 2007-01-25

通讯作者: 姜泊. Tel: (020) 61641541 Email: drjiang@163.com

作者简介: 程变巧, 博士生 (导师姜泊), 讲师. Tel: (020) 61365653
Email: nyd0129@tom.com

1 材料和方法

1.1 材料 Lovo细胞株来自 ATCC (美国组织培养保藏中心), 由中国科学院上海细胞生物学研究所提供, 病理分期为 Duke's D 期。Lipofectamine 2000™ (Invitrogen, 美国) OptiMEN I (Gibco, 美国)。蛋白裂解液 (碧云天, 中国); 半干电转仪 (Bio-Rad, 美国), PVDF 膜 (Bio-Rad, 美国), ECL 化学发光试剂盒 (Pharmacia, 美国); Galectin-3 人抗大鼠 (Santa, Cruz); 羊抗大鼠 IgG-HRP (博士德, 中国); BCA 试剂盒和预染蛋白质 Marker (碧云天, 中国)。MTT 和 DMSO 溶液 (威佳, 广州), 酶标仪。Trizol 和 RT-PCR 试剂盒 (TAKARA 日本), DNAmaker (天为时代 中国), 20 g/L 琼脂糖 (Sigma, 美国), pRNAT-U6.1 真核干扰载体 (上海吉码生物公司 中国)。T₄ DNA 连接酶 (TAKARA 日本)。各种工具酶 (Takara 公司) 质粒小提试剂盒 (Qiagen 德国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 37 °C, 50 mL/L CO₂ 条件下, 培养于含 10 mL/L 新生牛血清、1 × 10⁵ U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 中, 根据生长情况传代。

1.2.2 构建两条 pRNAT-U6.1 Galectin-3 shRNA 根据 NM-002306 中 Galectin-3 编码区序列, 由上海博亚基因技术有限公司合成两条 Galectin-3 shRNA g 短发夹状结构, sense: 5'-GATCCCGCATGGAGCACCTGGAGCTTATCC TTCAA GAGAGGA TAA GCTCCAGTGCTCCA TGTTTTTTGGAAA-3, anti-sense: 3'-GGCGTACCTCGTGGACCTCGAA TAGGAA GTTCTCTCCT-ATTCGAGGTCACGAGGTAC AAAAAACCTTTTCGA-5. sense: 5'-GATCCCGACCTCACCAAGTGCTTCAT-ATTTCAA GAGAA TAGA GCACTGGTGA GGTTTTTT-TGGAAA-3, anti-sense: 3'-GGCTGGAGTGGTCACG-AAGTATA AAGTTCCTTA TACTTCGTGACCACTCCA AAAAAACCTTTTCGA-5.

1.2.3 重组质粒构建与鉴定过程 BamH I, EcoR I 双酶切 pRNAT-U6.1, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离, 以凝胶纯化试剂盒纯化备用。退火: 分别用 TE 30 μL 溶解寡核苷酸单链, 使其浓度为 100 μmol, 两条单链各取 5 μL 混合, 经 95 °C 30 s, 72 °C 2 min, 37 °C 2 min, 25 °C 2 min 退火后备用。连接: 稀释上述产物至 0.5 μmol, 按以下体系操作: 将纯化的质粒片段 2 μL, 退火产物 1 μL, 10 × T₄ DNA Ligase buffer 1.5 μL, BSA (10 g/L) 0.5 μL, T₄ DNA Ligase 0.5 μL, H₂O 9.5 μL, 总体积 15 μL, 4 °C 过夜连接。转化: 10 μL 连接产物直接加入感受态细胞 50 μL 中, 轻轻混匀, 冰上放置 30 min, 42 °C 水浴 90 s,

置冰上 2 min, 加 800 μL LB 培养液, 37 °C 300 r/min, 60 min 摇匀; 取 100 μL 菌液涂匀于氨苄酶素抗性的固体培养基, 普通培养箱 37 °C 培养 12 ~ 14 h, 见培养皿中长出菌落, 挑取菌落 3 ~ 4 个分别放入 5 mL LB + 5 μL Amp, 180 r/min, 37 °C 过夜, 观察培养液变混浊, 取 500 μL 菌液按照质粒小量快速提取说明书操作。提取的重组质粒行双酶切鉴定, 将连接成功的质粒样本根据插入片段不同命名为 pRNAT-U6.1 galectin-3 shRNA1 和 pRNAT-U6.1 galectin-3 shRNA2 送测序。

1.2.4 转染 参照 Lipofectamine 2000™ 产品操作说明书进行。调整细胞密度达到 90% 左右, 分别混合 Lipofectamine 2000™ 10 μL 与 OptiMEN I 240 μL, Galectin-3 shRNA 10 μL 与 OptiMEN I 240 μL, 室温静置 5 min, 混合上述两组液体室温静置 20 min 每孔对应加入 500 μL 转染混合液, 轻摇混匀。置于 37 °C, 50 mL/L CO₂、饱和湿度的培养箱中培养 6 h 后更换无抗生素的含 100 mL/L 小牛血清的 PRMI 1640 培养液, 72 h 后免疫荧光检测转染效率。

1.2.5 Western Blot 验证干扰效果 蛋白提取及 Western Blot, 在室温下用 1 × PBS 冲洗 Lovo 细胞 3 次, 收集细胞。5000 r/min 离心后加入蛋白裂解液 200 μL, 100 mmol/L RBSF 20 μL 匀浆, 冰上膨胀 30 min, 12 000 g 离心 10 min, 取上清, Bradford 法在紫外分光光度仪上绘制蛋白标准曲线, 检测蛋白浓度。

Western Blot: 取 20 μg 胞质蛋白以 12 g/L SDS-PAGE 凝胶电泳分离。半干电转移至 PVDF, 5 g/L 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入一抗 Galectin-3 mAb, (稀释浓度为 1:400), 于 4 °C 封闭袋中摇床上过夜。二抗 (HRP) 标记的羊抗大鼠 (1:1000) 室温封闭 1 h, DAB 法显色结果, 凝胶图像分析系统检测蛋白质印记条带灰度。

1.2.6 RT-PCR Galectin-3 引物片段和 β -actin 引物片段分别参照基因文库 NM_002306 序列和 NM_001101 自行设计, 由上海博亚基因技术有限公司合成, 扩增片段分别为: 750 bp 和 320 bp。Galectin-3 序列, sense: 5'-tc ggatcc aatggcagacaatttttcgc-3, anti-sense: 5'-ca gaattc cttatcatggtatatagaagc-3。 β -actin 序列上游: 5'-gcg cgg cta cag ctt cac cac -3, 下游: 5'-gta ggc gtt tct gga cat gcg -3。按照 Trizol 试剂说明书提取细胞总 RNA。逆转录条件: 42 °C 60 min, 95 °C 5 min, 4 °C 10 min, PCR 条件: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 32 个循环后, 再 72 °C 延伸 5 min。

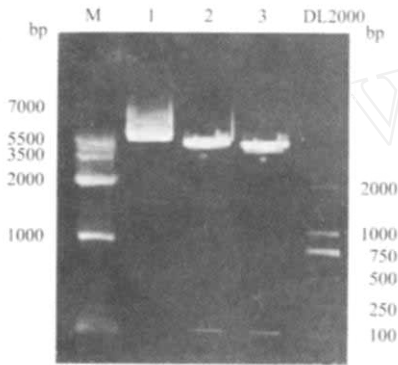
1.2.7 MTT 法检测细胞增殖 消化细胞并调整细

胞数,使每孔细胞数为 4000 个. 培养 24 h 后更换无抗生素的培养液,按照步骤 2,加入混合干扰,每孔 50 μ L,分别设正常对照组和 Galectin-3 shRNA 组,每组设 6 个孔,以不加细胞的孔作为空白对照孔,分别于干扰后 24, 48 和 72 h 在酶标仪上测定各孔 A 值.

统计学处理:结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 软件进行方差分析,组间比较用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义.

2 结果

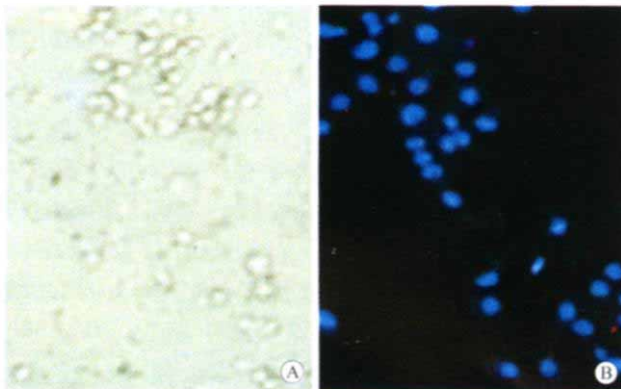
2.1 重组质粒限制性双酶切鉴定 将重组质粒经 *Bam*H 和 *Eco*R 双酶切后行琼脂糖凝胶电泳,见与插入片段约 120 bp 大小相符的条带,未酶切的相应重组质粒未见插入片段的条带,并经测序得以证实 (图 1).



M: Marker; 1: 质粒 pRNAT-U6.1; 2: 双酶切 pRNAT-U6.1/Galectin-3 shRNA1; 3: 双酶切 pRNAT-U6.1/Galectin-3 shRNA2

图 1 重组质粒的琼脂糖凝胶电泳图

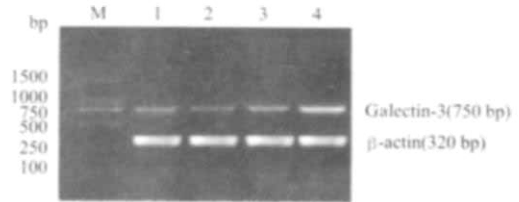
2.2 荧光显微镜观察质粒转染效率 pRNAT-U6.1 shRNA 转染 Lovo 细胞 72 h 后观察被转染细胞,蓝色荧光蛋白表达表明重组载体转染成功 (图 2). 以三个视野取平均值,转染效率为 62%.



A: 正常光; B: 蓝色荧光.

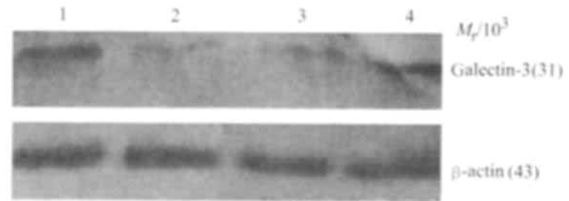
图 2 干扰重组载体转染后 72 h 检测转染效率

2.3 Galectin-3 shRNA 对 Galectin-3 mRNA 水平的抑制 提取转染后 72 h 细胞 RNA,以正常细胞组作为阳性对照组,转染空质粒组为阴性对照组,RT-PCR 结果见图 3, Galectin-3/ β -actin 的相对 A 值在空白、干扰 1、干扰 2 和阴性组分别为: 1.390, 0.986, 0.976 和 1.379.



M: Marker; 1: Lovo/pRNAT-U6.1 Galectin-3 shRNA1; 2: Lovo/pRNAT-U6.1 Galectin-3 shRNA2; 3: Lovo/pRNAT-U6.1; 4: Lovo
图 3 Lovo 细胞转染 pRNAT-U6.1 Galectin-3 shRNA 72 h 后 mRNA 水平

2.4 Galectin-3 shRNA 对 Galectin-3 蛋白水平的抑制 转染细胞 72 h 后提取胞质蛋白进行 Western Blot 结果见图 4. Galectin-3/ β -actin 的 A 值在空白、干扰 1、干扰 2 和阴性组分别为: 0.705, 0.141, 0.137 和 0.686.



1: Lovo; 2: Lovo/pRNAT-U6.1 Galectin-3 shRNA1; 3: pRNAT-U6.1 Galectin-3 shRNA2; 4: Lovo/pRNAT-U6.1

图 4 Lovo 细胞转染 pRNAT-U6.1 Galectin-3 shRNA 后 72 h Galectin-3 蛋白的表达

2.5 Galectin-3 表达的抑制对细胞增殖的影响 MTT 结果显示:干扰后细胞继续生长,与干扰前相比,细胞生长明显减慢,各组间比较见表 1.

表 1 干扰前后 Galectin-3 对大肠癌细胞 Lovo 增殖的影响
($n = 3, A_{575 nm}, \bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h
正常 ^a	1.7860 \pm 0.185	2.635 \pm 0.003	3.5320 \pm 0.006
干扰后阴性 ^a	1.6890 \pm 0.005	2.532 \pm 0.009	3.3560 \pm 0.002
干扰后阳性	0.546 \pm 0.002	1.0250 \pm 0.008	1.4230 \pm 0.506

^a $P < 0.05$ vs 干扰后阳性.

3 讨论

Galectin-3 因与含 半乳糖苷残基的糖复合物

具有很高的亲和力而得名^[2]。Galectin-3具有两个重要的结构功能区: C末端为碳氢识别位点,与不同的配体结合,发挥不同的生物学功能。N末端含有一个9个氨基酸的重复序列,可作为基质蛋白酶结合的底物。因Galectin-3在结构上缺乏转移到内质网的信号序列,此结构具有传递信号的作用^[3-4]。目前从大体水平已经验证出Galectin-3在多种细胞,包括上皮细胞,肿瘤细胞(甲状腺癌^[3],肝癌^[4]、大肠癌^[5]、胃癌^[6]等)表达,从机制方面初步发现Galectin-3可存在细胞的不同部位,在细胞内表达主要促进其增殖和抑制其凋亡。

应用RNA干扰技术抑制相关基因的表达,可以起到抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡的作用,达到治疗肿瘤的目的^[7]。本试验我们通过构建Galectin-3真核干扰表达载体并顺势转染大肠癌细胞lovo,对两条Galectin-3 shRNA真核重组载体进行双酶切鉴定,酶切出一条约120 bp的条带,这说明载体构建成功。荧光显微镜对转染48 h后检测有绿色荧光,说明转染成功。对转染后72 h的lovo细胞分别提取mRNA和蛋白进行RT-PCR和Western Blot检测,结果发现转染pRNAT-U6.1 shRNA1和pRNAT-U6.1 Galectin-3 shRNA2的lovo在蛋白和mRNA水平均被明显抑制,与空质粒组和正常组相比, $F = 2.214, 148.566, P = 0.000, 0.000$,正常组和空质粒组比较均无统计学意义 $P = 0.448, 0.263$ 。说明转染Galectin-3 shRNA的lovo细胞明显抑制了galectin-3基因的表达。

Inohara等^[8]通过构建Galectin-3重组体并与正常的人类纤维原细胞MP-70静止期的细胞群共培养,刺激了DNA的合成从而首先报道了Galectin-3可以作为一个有丝分裂原的证据。对其机制的进一步探讨发现主要通过ERK1/2-MEK1/2信号通路促进细胞的增殖^[9]。我们通过MTT方法对干扰前后细胞增殖的影响发现,干扰后细胞继续生长。这说明转染Galectin-3 shRNA的lovo细胞明显抑制了galectin-3在大肠癌细胞中的增殖。

目前虽然对Galectin-3在大肠癌中的研究日趋增加,但其确切机制还不清楚。Bresalier等^[10]在2004年对大肠癌血清中Galectin-3的循环配体 - 一种 M_r 为 40×10^3 的糖化结合珠蛋白的发现,使得Galectin-3被认为有可能是大肠癌诊断和预后的肿瘤标记物。因此对Galectin-3进行深入的研究有望对未来大肠癌的早期诊断和预后提供一个靶点。

【参考文献】

- [1] Sanjuan X, Fernandez PL, Castells A. Differential expression of galectin 3 and galectin 1 in colorectal cancer progression [J]. *Gastroenterology*, 1997, 113(6): 1906 - 1915.
- [2] Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, et al. Galectins: Structure and function of a large family of animal lectins [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(33): 20807 - 20810.
- [3] Bartolazzi A. Improving accuracy of cytology for nodular thyroid lesions [J]. *Lancet*, 2000, 355(9216): 1661 - 1662.
- [4] Maeda N, Kawada N, Seki S, et al. Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(221): 18938 - 18944.
- [5] Schoeppner HL, Raz A, Ho SB, et al. Expression of an endogenous galactose-binding lectin correlates with neoplastic progression in the colon [J]. *Cancer*, 1995, 75(12): 2818 - 2826.
- [6] Baldus SE, Zirbes TK, Weingarten M, et al. Increased galectin-3 expression in gastric cancer: Correlations with histopathological subtypes, galactosylated antigens and tumor cell proliferation [J]. *Tumour Biol*, 2000, 21(5): 258 - 266.
- [7] Glunde K, Raman V, Mori N, et al. RNA interference-mediated choline kinase suppression in breast cancer cells induces differentiation and reduces proliferation [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(23): 11034 - 11043.
- [8] Inohara H, Akahani S, Raz A. Galectin-3 stimulates cell proliferation [J]. *Exp Cell Res*, 1998, 245(2): 294 - 302.
- [9] Kim HR, Lin HM, Biliran H, et al. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(16): 4148 - 4154.
- [10] Bresalier RS, Byrd JC, Tessler D, et al. A circulating ligand for galectin-3 is a haptoglobin-related glycoprotein elevated in individuals with colon cancer [J]. *Gastroenterology*, 2004, 127(3): 741 - 748.

编辑 井晓梅