

·论著·

RNA 干扰沉默 p16 基因对小鼠胚胎成纤维细胞衰老的影响

路璐 李德冠 张俊伶 黄颂 邢永华 王小春 孟爱民

【摘要】目的 探讨 RNA 干扰沉默小鼠 p16 基因表达对 ^{137}Cs γ 射线诱导的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)衰老的影响。**方法** 构建 p16 RNA 干扰载体, 采用实时荧光定量 PCR、Western blot 和衰老相关 β -半乳糖苷酶(SA- β -Gal)染色观察 RNA 干扰前后辐射诱导衰老的 MEF 细胞 mRNA 水平、蛋白水平和衰老细胞百分率等的变化。**结果** 辐射诱导衰老的 MEF 细胞 RNA 干扰后 24 h, 照射+p16 siRNA-1 和照射+p16 siRNA-2 组 p16 mRNA 相对表达水平较照射组显著降低($t=16.52$ 、 16.13 , P 均 <0.05), 蛋白水平较照射组显著降低; 干扰后 5 d, 照射+p16 siRNA-1 和照射+p16 siRNA-2 组 SA- β -Gal 染色阳性细胞百分比[(34.17 ± 2.08)%和(33.83 ± 1.75)%]明显低于照射组[(68.83 ± 1.26)%]($t=37.72$ 、 38.09 , P 均 <0.01)。**结论** RNA 干扰沉默小鼠 p16 基因表达能够抑制 MEF 细胞的衰老, 为其在细胞衰老相关研究中的应用奠定了基础。

【关键词】 基因, p16; RNA 干扰; γ 射线; 小鼠胚胎成纤维细胞; 衰老

Application of RNA interference vector targeting mouse p16 gene in γ -irradiation-induced mouse embryonic fibroblast Lu Lu, Li Deguan, Zhang Junling, Huang Song, Xing Yonghua, Wang Xiaochun, Meng Aimin. Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China
Corresponding author: Meng Aimin, Email: aiminmeng@irm-cams.ac.cn

【Abstract】Objective To explore the effects of silencing p16 gene by RNA interference(RNAi) mediated on γ -irradiation-induced mouse embryonic fibroblast(MEF). **Methods** p16 RNAi vector was constructed by using pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR plasmid. p16 mRNA and protein levels of the irradiation-induced MEF before and after RNAi were detected by real-time PCR, Western blot and the percentage of aging cells was detected by senescence associated- β -galactosidase(SA- β -Gal) staining. **Results** 24 h after RNAi, p16 mRNA levels of the irradiation-induced MEF decreased significantly in the irradiation+p16 siRNA-1 and irradiation+p16 siRNA-2 group as compared with the irradiation group($t=16.52$ and 16.13 , both $P<0.05$), protein levels of the irradiation+p16 siRNA-1 and irradiation+p16 siRNA-2 group also decreased as compared with the irradiation group. 5 days after irradiation the percentages of SA- β -Gal positive cells in the irradiation+p16 siRNA-1 and irradiation+p16 siRNA-2 group were (34.17 ± 2.08)% and (33.83 ± 1.75)%, significantly lower than that of the irradiation group[(68.83 ± 1.26)%]($t=37.72$ and 38.09 , both $P<0.01$). **Conclusion** MEF aging can be effectively controlled by RNAi which can shut down the expression of silencing p16 gene and lay the foundations for its application in the related studies on cells senescence.

【Key words】 Genes, p16; RNA interference; Gamma rays; Mouse embryonic fibroblast cell; Aging

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2014.05.001

基金项目: 国家自然科学基金(81072237); 国家重点基础研究发展计划(2011CB964800-G); 天津市自然科学基金(08JCY-BJC07300); 协和青年基金(3332013044); 中央高校基本科研业务费专项资金(3332013044); 中国医学科学院放射医学研究所学科发展专项基金(1340)

作者单位: 300192 天津, 中国医学科学院放射医学研究所, 天津市放射医学与分子核医学重点实验室

通信作者: 孟爱民(Email: aiminmeng@irm-cams.ac.cn)

p16 基因是一种抑癌基因, 近年来发现它在细胞衰老过程中发挥重要作用。p16 是细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent protein kinase, CDK) 4 和 CDK6 的抑制物, p16 通过与 CDK4 和 CDK6 结合, 阻滞 CDK4、CDK6 与 cyclinD 结合, 抑制 cyclinD-CDK 复合物的活性, 阻断对 Rb 蛋白(一种核磷酸蛋白)的磷酸化, 使细胞停滞在 G0 期, 不

能进入细胞周期循环而处于静息状态^[1-2]。p16 在许多细胞进入衰老时均过度表达,其持续表达导致了细胞衰老。目前,p16 已成为细胞衰老研究的热门靶点之一。RNA 干扰是转录后水平序列特异性的抑制基因表达的一种天然机制。在本研究中我们构建了 RNA 干扰载体,并将表达载体成功地转染至辐射诱导衰老的小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)中,观察其对 p16 的干扰效果,旨在为后续 p16 相关研究提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

表达载体 pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR、BLOCK-iTTM Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP、脂质体 LipofectamineTM2000 和 Trizol 购自美国 Invitrogen 公司; DH5 α 感受态细胞购自德国 TIANGEN 公司; T4 DNA 连接酶购自美国 Promega 公司; 实时荧光定量 PCR 试剂盒和 ABI Prism 7500 Sequence Detection System 购自美国 ABI 公司; 质粒提取试剂盒购自德国 QIAGEN 公司; Turbo Script 逆转录第一链 cDNA 合成试剂盒购自北京原平皓生物技术有限公司; Radio Immunoprecipitation Assay 裂解液购自美国 Pierce 公司; bicinchoninic acid 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 兔抗小鼠 p16、兔抗小鼠 β -actin 一抗和山羊抗兔二抗购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; Senescence β -Galactosidase Staining Kit 购自美国 Cell Signaling technology 公司。MEF 细胞由本实验室保存。其他试剂均为国产或进口分析纯试剂。ChemiDocTM XRS+ 成像系统购自美国 BIO-RAD 公司; ¹³⁷Cs γ 射线照射源由加拿大原子能有限公司生产,型号为 Autocell40,剂量率 0.80 Gy/min; eclipse 90i 荧光显微镜购自日本 Nikon 公司。

1.2 载体构建

以小鼠 p16 基因(NM_009877)作为目的基因,应用 Invitrogen 公司提供的辅助设计软件(Block-iT RNAi Designer)设计 siRNA。miRNA-155 是目前剪切位点研究较为清楚的天然 miRNA^[3],本研究选择 miRNA-155 作为骨架,结合线性化 pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR 真核表达载体的特点,选择符合条件的靶位点,设计两段互补的寡核苷酸序列,每对

寡核苷酸的核心序列反向互补,并将备选序列和相应的基因数据库进行 Blast 同源比对,排除与 p16 基因高度同源的序列。设计好的序列(表 1)由上海英骏生物技术有限公司合成。

表 1 siRNA 寡核苷酸序列

引物名称	序列
mp16-1F	5'-TGCTGTTAGCTCTGCTCTTGGGATTGGTTTTGG- CCACTGACTGACCAATCCCAAGCAGAGCTAA-3'
mp16-1R	5'-CCTGTTAGCTCTGCTTGGGATTGGTCAGTCACT- GGCCAAAACCAATCCCAAGCAGCAGAGCTAAC-3'
mp16-2F	5'-TGCTGAGCTGAAGCTATGCCCGTCGGGTTTTGG- CCACTGACTGACCCGACGGGTAGCTTCAGCT-3'
mp16-2R	5'-CCTGAGCTGAAGCTACCCGTCGGGTCAGTCAG- TGGCCAAAACCCGACGGGCATAGCTTCAGCTC-3'

将 2 对合成好的 oligo 用灭菌双蒸水溶解成 100 μ mol/L 双蒸水,互补单链各取 5 μ l 两两混合,加入 2 μ mol/L 10 \times 退火缓冲液和 8 μ l 灭菌双蒸水,95 $^{\circ}$ C 加热 5 min,然后放置室温自然冷却 20 min,形成双链 oligo。取 1 μ l 退火产物,继续稀释成 10 nmol/L 浓度。在无菌离心管中,依次加入 4 μ l 5 \times 连接缓冲液、9 μ l 灭菌双蒸水、2 μ l pcDNA6.2-GW/EmGFPmiR 质粒、4 μ l 10 nmol/L ds oligo、1 μ l 1U/ μ l T4 DNA 连接酶,充分混匀后室温连接 30 min。取 2 μ l 上述重组体转化 DH5 α 感受态细胞,在含 50 μ g/ml 壮观霉素的 Luria-Bertani 琼脂板上培养 16h,挑选阳性克隆摇菌过夜。利用试剂盒提取质粒,送上海英骏公司测序,以验证重组克隆中插入片段序列是否与设计的 oligo 序列一致。

1.3 细胞培养、转染及分组

将生长状态良好的 MEF 细胞按照每孔 1×10^5 个细胞接种于六孔板中,H-DMEM 培养液(含 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素)在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内培养,待细胞生长融合至 80%左右,用 10.0 Gy ¹³⁷Cs γ 射线照射细胞^[4]。照射后,采用脂质体 LipofectamineTM2000 进行质粒转染细胞。具体转染操作根据脂质体转染说明书进行。每孔细胞分别加入 2 μ g 质粒和 5 μ l 脂质体,转染 4h 更换含 10%胎牛血清的无抗生素 H-DMEM 培养液,继续培养。

实验分组:对照组(不做任何处理)、照射组(接受 10.0 Gy ¹³⁷Cs γ 射线照射)、照射+p16 siRNA-1 组、照射+p16 siRNA-2 组(接受 10.0 Gy ¹³⁷Cs γ 射线照射后分别转染 p16 基因特异性 siRNA-1 和 siRNA-2)、照射+空载组(接受 10.0 Gy ¹³⁷Cs γ 射线照射后转染空载对照 siRNA)。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测 RNA 干扰后 p16 基因 mRNA 表达水平的变化

细胞转染后 24 h, 收集细胞, 用 Trizol 法提取细胞的总 RNA。取少量用于 RNA 含量及纯度测定。总 RNA 按照 Turbo Script 逆转录第一链 cDNA 合成试剂盒进行 cDNA 第一链的合成。cDNA 反转录反应体系为 20 μ l, 反应条件为 65 $^{\circ}$ C 5 min, 42 $^{\circ}$ C 50 min, 70 $^{\circ}$ C 15 min; 用实时荧光定量探针法检测样品中成熟 mRNA 分子的水平, 实时荧光定量 PCR 反应体系为 25 μ l, 反应条件为 50 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min, (95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 s) \times 40 循环。每个样本重复测量 3 次。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶的表达量为参照标准, 按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 p16 mRNA 相对表达量。

1.5 Western blot 检测 RNA 干扰后 p16 基因 mRNA 表达水平的变化

收集转染后 24 h 的细胞, 用 PBS 洗涤 2 遍, 细胞总蛋白抽提液提取总蛋白, 并采用 BCA 法检测样品中蛋白的含量。取 20 μ g 混合蛋白上样缓冲液, 在 100 $^{\circ}$ C 下加热 10 min, 采用 15% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离, 电泳后转至聚偏二氟乙烯膜。转膜结束后室温封闭 1 h, 加入兔抗小鼠 p16 抗体 4 $^{\circ}$ C 过夜, 洗膜后加入相对应的二抗室温孵育 1 h, 洗膜, 最后加化学发光显色试剂, 在 ChemiDocTM XRS+ 成像系统中成像。另外, 采用抗 β -actin 多克隆抗体检测 β -actin 蛋白表达作为样品内参以及转膜的效果。

1.6 衰老相关 β -半乳糖苷酶 (senescence associated- β -galactosidase, SA- β -Gal) 活性的检测

细胞转染后 5 d, 将 24 孔板中的细胞用 PBS 洗涤 2 遍, 在室温下用 1 \times 定影液固定细胞 10~15 min, 用 PBS 洗涤 2 遍, 加入 1 ml 染色混合液, 37 $^{\circ}$ C 下过夜, 具体操作步骤按照 SA- β -Gal 检测试剂盒说明书进行。衰老细胞染成蓝色为阳性细胞, 光镜下观察并拍照, 同时计算每 200 个细胞中阳性细胞的百分率^[9]。

1.7 统计学处理

实验结果以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 数据分析采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒测序结果

测序分析证明重组体中插入片段的碱基序列完

整, 没有碱基的突变以及丢失, 表明已成功构建了针对鼠 p16 基因的 p16 siRNA-1 和 p16 siRNA-2 表达质粒。

2.2 干扰质粒转染 MEF 细胞

pcDNATM 6.2-GW/EmGFPmiR 质粒带有绿色荧光蛋白基因, 转染细胞 24 h 后, 通过荧光显微镜观察绿色荧光, 显示辐射诱导衰老 MEF 细胞在转染后有绿色荧光蛋白表达, 说明转染成功(图 1)。

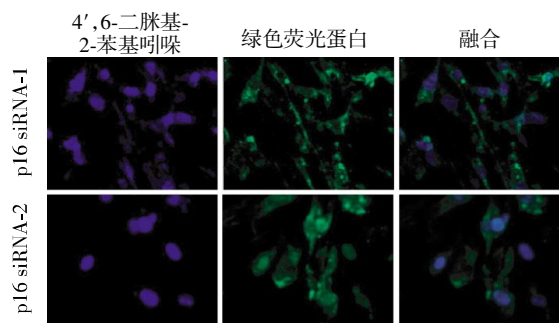


图 1 荧光显微镜下观察转染后的小鼠胚胎成纤维细胞($\times 200$)

Fig.1 Expression of pcDNATM 6.2-GW/EmGFP miR plasmid after transfecting the mouse embryonic fibroblast cells under the fluorescence microscope($\times 200$)

2.3 p16 基因 mRNA 表达水平的变化

由图 2 可见, 经 10 Gy¹³⁷Cs γ 射线照射后 24 h, 照射组小鼠胚胎成纤维细胞 p16 的 mRNA 相对表达水平较对照组升高, 两者间的差异有统计学意义 ($t=87.60, P<0.05$); 照射+空载组与对照组比较, p16 的 mRNA 相对表达水平升高 ($t=85.32, P<0.05$); 辐射诱导衰老的 MEF 细胞 RNA 干扰后 24h, 与照射组比较,

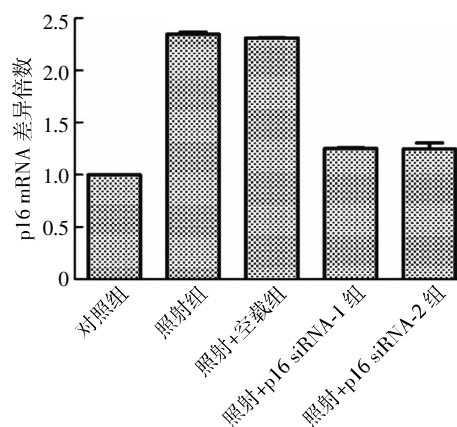


图 2 实时荧光定量 PCR 检测各组小鼠胚胎成纤维细胞 p16 mRNA 的表达

Fig.2 Expression levels of p16 mRNA in mouse embryonic fibroblast cells before and after transfection was measured by real-time PCR

照射+p16 siRNA-1 和照射+p16 siRNA-2 组 p16 的 mRNA 水平显著降低($t=16.52$ 、 16.13 , P 均 <0.05)。

2.4 p16 基因蛋白表达水平的变化

与照射组比较, 照射+p16 siRNA-1 和照射+p16 siRNA-2 组的 p16 蛋白表达水平有所降低, 而照射+空载组的 p16 蛋白表达水平与照射组相比则无显著差别(图 3)。

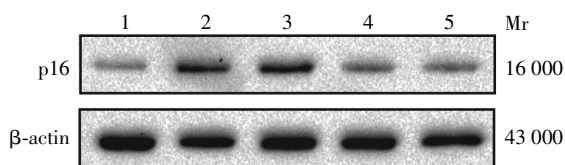


图 3 Western blot 检测各组小鼠胚胎成纤维细胞 p16 蛋白的表达 图中, 1: 对照组; 2: 照射组; 3: 照射+空载组; 4: 照射+p16 siRNA-1 组; 5: 照射+p16 siRNA-2 组; Mr: 相对分子质量。

Fig.3 Expression levels of p16 protein in mouse embryonic fibroblast cells after 48 h of transient transfection of the plasmid

2.5 SA-β-Gal 活性的变化

SA-β-Gal 染色后衰老细胞呈阳性, 胞质内可见蓝色颗粒; 阴性细胞未着色。结果表明, 照射组和照射+空载组的 SA-β-Gal 染色阳性细胞百分比显著高于对照组 ($t=72.91$ 、 72.73 , P 均 <0.01); 照射+p16 siRNA-1 和照射+p16 siRNA-2 组 SA-β-Gal 染色阳性细胞百分比与对照组 ($t=35.19$ 、 34.92 , P 均 <0.01)和照射组($t=37.72$ 、 38.09 , P 均 <0.01)比较, 差异均有统计学意义(图 4、表 2)。

3 讨论

本研究设计并构建了小鼠 p16 的 RNA 干扰载

体, 经测序证实了所构建表达载体的正确性, 而后通过脂质体介导的质粒转染, 通过观察到目的细胞 MEF 中绿色荧光蛋白的表达, 说明所构建的重组体能够有效地转染到目的细胞。

表 2 各组小鼠胚胎成纤维细胞衰老相关 β-半乳糖苷酶染色阳性细胞百分比($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Figure.2 The percentage of mouse embryonic fibroblast cells senescence associated-β-galactosidase positive cells in different group($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	SA-β-Gal 阳性细胞百分比(%)
对照组	1.83±0.76
照射组	68.83±1.26
照射+空载组	68.67±1.76
照射+p16 siRNA-1 组	34.17±2.08
照射+p16 siRNA-2 组	33.83±1.75

注: 表中, SA-β-Gal: 衰老相关 β-半乳糖苷酶。

已有大量研究证实, 电离辐射可以引起 DNA 损伤, 最终导致细胞衰老^[6-7]。本研究采用我们前期建立的 10.0 Gy ¹³⁷Cs γ 射线照射诱导的小鼠胚胎成纤维细胞衰老模型^[4,8], 经实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测表明: 2 个 RNA 干扰载体都能使靶基因 p16 的 mRNA 和蛋白表达水平降低, 而照射+空载组的 p16 mRNA 和蛋白表达水平与照射组比较则无显著差异, 这提示 2 个 siRNA 干扰载体在转染目的细胞辐射诱导衰老的 MEF 细胞后都有干扰 p16 基因表达的作用。

Dimri 等^[5]1995 年首次提出一种鉴定细胞衰老的标志酶 SA-β-Gal, 他们的研究发现, 衰老成纤维细胞和角质形成细胞均表达此酶, 而休眠细胞和终末分化细胞则缺乏。因此, 目前将 SA-β-Gal

(下转第 303 页)

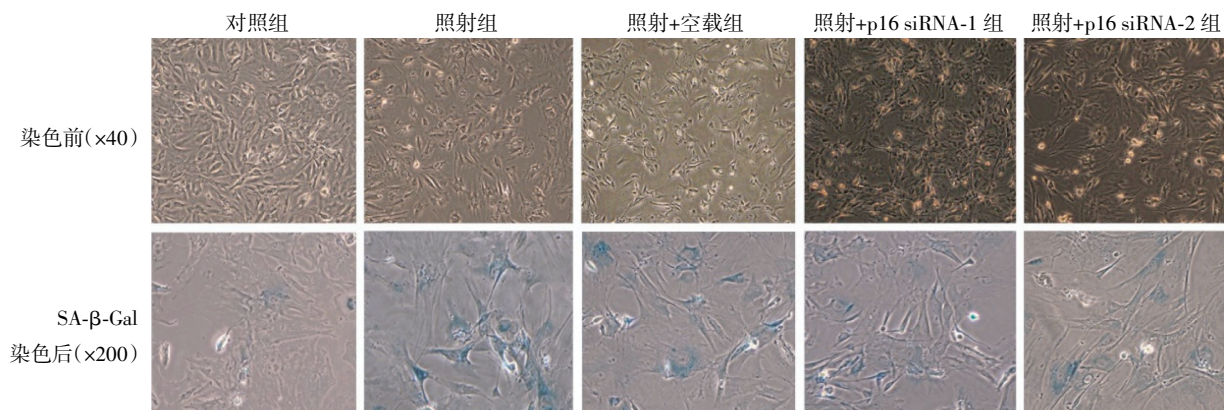


图 4 各组小鼠胚胎成纤维细胞衰老相关 β-半乳糖苷酶活性的变化图 图中, SA-β-Gal: 衰老相关 β-半乳糖苷酶。

Fig.4 Representative images of mouse embryonic fibroblast cells senescence associated-β-galactosidase activity in different group

- [5] Finlay IG, Mason MD, Shelley M. Radioisotopes for the palliation of metastatic bone cancer: a systematic review[J]. *Lancet Oncol*, 2005, 6(6): 392-400.
- [6] 潘中允. 放射性核素治疗学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 217.
- [7] 翟士军, 万卫星, 吴娜静, 等. $^{89}\text{SrCl}_2$ 联合唑来膦酸治疗转移性骨肿瘤的疗效观察[J]. *中国辐射卫生*, 2013, 22(4): 404-406.
- [8] Body JJ. Clinical research update; zoledronate[J]. *Cancer*, 1997, 80 (8 Suppl): S1699-1701.
- [9] Skerjance A, Berenson J, Hsu C, et al. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with varying degrees of renal function[J]. *J Clin Pharmacol*, 2003, 43 (2): 154-162.
- [10] Neville-Webbe HI, Coleman RE. The use of zoledronic acid in the management of metastatic bone disease and hypercalcaemia[J]. *Palliat Med*, 2003, 17(6): 539-553.
- [11] Matsumoto S, Kimuta S, Seqawa H, et al. Efficacy of the third-generation bisphosphonate, zoledronic acid alone and combined with anti-cancer agents against small cell lung cancer cell lines[J]. *Lung Cancer*, 2005, 47(1): 31-39.
- [12] Croucher P, Jagdev S, Coleman R. The anti-tumor potential of zoledronic acid[J]. *Breast*, 2003, 12 Suppl 2: S30-36.

(收稿日期: 2014-02-13)

(上接第 284 页)

染色作为细胞衰老的生物学标志^[2]。p16 在许多细胞进入衰老时均过度表达, 其持续表达导致了细胞衰老。在本研究中, 通过脂质体介导的质粒转染组 SA- β -Gal 染色阳性细胞百分比较照射组明显降低, 说明转染后 p16 表达降低, 衰老在一定程度上被抑制。

本研究初步探讨了 RNA 干扰沉默 p16 基因表达可以抑制 MEF 细胞的衰老, 为后续相关研究提供了实验基础。

参 考 文 献

- [1] Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, et al. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16(INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93 (24): 13742-13747.
- [2] 邢文英, 金辉, 丁一. 衰老相关- β -半乳糖苷酶和 P16 在老年大鼠脾内的表达及意义[J]. *解剖学杂志*, 2008, 31(4): 486-488.
- [3] Dang LT, Kondo H, Aoki T, et al. Engineered virus-encoded pre-microRNA (pre-miRNA) induces sequence-specific antiviral response in addition to nonspecific immunity in a fish cell line; convergence of RNAi-related pathways and IFN-related pathways in antiviral response[J]. *Antiviral Res*, 2008, 80(3): 316-323.
- [4] 路璐, 黄颂, 李德冠, 等. ^{137}Cs γ -射线诱导小鼠胚胎成纤维细胞衰老模型的建立[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014, 30(1): 87-89.
- [5] Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(20): 9363-9367.
- [6] Ye C, Zhang X, Wan J, et al. Radiation-induced cellular senescence results from a slippage of long-term G2 arrested cells into G1 phase[J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(9): 1424-1432.
- [7] Zou Y, Zhang N, Ellerby LM, et al. Responses of human embryonic stem cells and their differentiated progeny to ionizing radiation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 426(1): 100-105.
- [8] 王月英, 吴红英, 李德冠, 等. 不同剂量 ^{137}Cs γ 射线照射对小鼠造血系统的影响[J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2013, 37(1): 1-4.

(收稿日期: 2013-12-03)