

# SMAD 家族成员 4 shRNA 干扰慢病毒构建与分析

李忱炜(重庆市渝北区人民医院检验科 401120)

**【摘要】** 目的 制备 shRNA 干扰人 SMAD 家族成员 4(SMAD4)的慢病毒载体(shRNA-SMAD4),为深入研究 BMPs/SMAD 信号通路奠定基础。方法 利用在线干扰设计网页进行干扰引物设计,根据小干扰 RNA 的设计原则,选取 3 对针对 SMAD4 特异性干扰引物而合成。合成的片段连接到慢病毒载体质粒 pSIH1-H1,形成 pSIH1-H1-shRNA-SMAD4 质粒。用 PCR 及测序对其鉴定,然后与慢病毒包装质粒混匀,由脂质体转染至 HEK293T 细胞进行包装,产生慢病毒 shRNA-SMAD4,并收集上清液感染乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,通过 RT-PCR 及 Western Blot 鉴定重组慢病毒干扰效果。结果 (1)shRNA 干扰 SMAD4 特异性引物的获得。(2)pSIH1-H1-shRNA SMAD4 质粒经 PCR 验证和测序后,证实构建成功。(3)shRNA-SMAD4 在 HEK293T 中重组成慢病毒,并成功感染 MDA-MB-231。(4)shRNA-SMAD4 感染乳腺癌 MDA-MB-231 细胞后 SMAD4 的表达降低。结论 成功构建 shRNA-SMAD4 慢病毒载体,并能有效抑制 SMAD4 表达。

**【关键词】** 慢病毒载体; 短发卡 RNA; SMAD 家族成员 4

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.11.035 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)11-1582-03

**SMAD4 shRNA interference lentivirus build and analysis** Li Chen-wei (The People's Hospital of Chongqing Yubei District, Chongqing 401120, China)

**【Abstract】** Objective To construct the recombinant Lentivirus vector interfering human SMAD4 gene for the further research of BMPs/SMAD cell signal. Methods ShorthairpinRNA (shRNA) targeting SMAD4 gene was designed and DNA template was synthesized and subcloned into the Lentivirus expression plasmid pSIH1-H1. The recombinant plasmid pSIH1-H1-shRNA-SMAD4 was confirmed by PCR and gene sequencing. Then pSIH1-H1-shRNA-SMAD4 and Lentiviral packaging plasmid was transfected into HEK293 cells for packaging by liposome. And collected Supernatant culture medium to infected MDA-MB-231 breast cancer cells. shRNA-SMAD4 was identified by RT-PCR and Western blot. Results (1) The gene sequence of shRNA targeting SMAD4 gene was obtained. (2) The recombinant Lentivirus expression plasmid pSIH1-H1-shRNA-SMAD4 and were successfully constructed. (3) The recombinant Lentivirus vector shRNA-SMAD4 could be packaged in HEK293T and infected MDA-MB-231 Successfully. (4) The expression of SMAD4 gene was reduced in the breast cancer MDA-MB-231 cells infected by shRNA-SMAD4. Conclusion The recombinant Lentivirus vector shRNA-SMAD4 was successfully constructed which could inhibit the expression of SMAD4.

**【Key words】** recombinant lentivirus vector; shRNA; human SMAD4

乳腺癌是一类易发生转移的肿瘤,近年来研究发现骨形态发生蛋白(BMPs)作为转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )超家族成员,在乳腺癌的生长、侵袭、迁移中起着重要作用<sup>[1]</sup>。本组前期研究和文献报道均表明,BMPs/SMAD 参与乳腺癌 MDA-MB-231 生长、侵袭、迁移过程,而且 BMPs/SMAD 在 MDA-MB-231 中处于激活状态<sup>[1]</sup>。骨形态发生蛋白 7(BMP7)和骨形态发生蛋白 9(BMP9)作为乳腺癌的负性因子能够抑制 MDA-MB-231 生长、侵袭、迁移以及转移过程,有研究还发现 BMP9 能抑制 MDA-MB-231 的骨转移过程<sup>[2]</sup>。但 MDA-MB-231 中内源性 BMP7 和 BMP9 未见其表达或表达明显降低。MDA-MB-231 作为一株恶性程度较高的三阴性乳腺癌细胞株,抑制其处于激活状态的 BMPs/SMAD 通路会对 MDA-MB-231 的生长、侵袭、迁移中起各种调节作用。SMAD 家族成员 4 (SMAD4)作为 BMPs/SMAD 这一信号通路的中间环节,对信号通路调控起着重要作用<sup>[3-4]</sup>。如下调 SMAD4 表达,抑制 BMP/SMAD 参与 MDA-MB-231 的生长、侵袭、迁移过程,MDA-MB-231 的恶性程度是否明显降低。本研究通过美国 SBI 公司第 4 代慢病毒包装系统,构建 SMAD4 慢病毒表达载体,为乳腺癌转移分子机制奠定基础,从而有效治疗乳腺癌。

报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** pSIH1-H1 质粒和慢病毒包装质粒 pPACKH1 购自美国 SBI 公司。大肠埃希菌 STBL-3 菌种以及人胚肾 HEK293T 细胞,由重庆医科大学临床检验诊断学实验室提供。

**1.2 主要试剂** Trizol,脂质体 2000 转染试剂盒(Life 公司); DMEM 高糖培养基,胎牛血清(Hyclone 公司);干扰引物(Invitrogen 上海生物技术有限公司合成);限制性内切酶 BamH I 和 EcoR I, T4 连接酶(New England Biolab 公司);DNA 纯化试剂盒(Omega 公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 SMAD4 干扰引物设计与合成** 将人 SMAD4 的 mRNA 基因(GenBank 序列号为 NM\_005359.5)CDS 区输入至 Life RNA 在线设计干扰网页中,按照小干扰 RNA 的设计原则,选取 3 对干扰引物作为实验组,同时设计 1 对完全随机引物作为阴性干扰对照组,将选取的干扰引物按照 shRNA 的构成原则,中间以 TCAAGAG 为颈环结构,并在 2 端添加 BamH I 和 EcoR I 酶切位点。合成的 DNA 分别命名为 shRNA-SMAD4 和 shRNA-Negative。

**1.3.2 干扰质粒 PCR 验证引物设计** SMAD4 干扰质粒 PCR 验证上游引物:5'-AAT GTC TTT GGA TTT GGG AAT CTT AT-3';下游引物:5'-TGG TCT AAC CAG AGA GAC CCA GTA-3',未插入干扰片段质粒扩增长度 105 bp,插入干扰片段后质粒扩增长度为 161 bp。SMAD4 PCR 上游引物:5'-CTG GAC TGG AAG TAG GAC-3';下游引物:5'-AAG TAA GCA ATG GAA CAC-3',扩增长度 186 bp。GAPDH 上游引物:5'-CAG CGA CAC CCA CTC CTC-3';下游引物:5'-TGA GGT CCA CCA CCC TGT-3',扩增长度 120 bp。

**1.3.3 2 种基因与载体 pSIH1-H1 的连接** BamH I 和 EcoR I 酶切 pSIH1-H1 质粒,酶切产物经纯化试剂盒纯化,DNA 连接试剂盒连接,shRNA-SMAD4 基因采用连接产物命名为 pSIH1-H1-shRNA-SMAD4,shRNA-Negative 基因使用连接产物命名为 pSIH1-H1-shRNA-Negative。

**1.3.4 pSIH1-H1-shRNA-SMAD4 和 pSIH1-H1-shRNA-Negative 质粒的鉴定** 连接产物经 Cacl2 化转入 STBL-3 菌株,接种于含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板,37 °C 培养过夜后挑取单个菌落,加入至 3 mL 含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基,37 °C,220 r/min 摇床培养 12 h 将菌液扩大培养后

提取质粒,5 μL 菌落 PCR 鉴定,10 μL 送南京金斯瑞有限公司测序。

**1.3.5 shRNA 干扰慢病毒的包装和病毒上清液收集** 将构建好并测序正确的干扰质粒和慢病毒包装质粒按慢病毒包装质粒试剂盒混匀,并与 Lipofectamine 2000 转染入 HEK293T 细胞,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的饱和湿度细胞培养箱培养,观察荧光表达量,至 48 h 后收集细胞培养液,离心后获取上清液至无菌 EP 管备用。

**1.3.6 重组干扰慢病毒在 MDA-MB-231 的感染以及干扰效果测定** 将包含病毒颗粒的培养液加入至 MDA-MB-231,24 h 观察慢病毒感染荧光表达情况,并提取细胞总 RNA,干扰慢病毒 48 h 后提取细胞总蛋白,观察 mRNA 和蛋白水平干扰效果。

**2 结 果**

**2.1 shRNA-SMAD4 和 shRNA-Negative 引物序列** 根据 Ambion 在线设计干扰引物网页,点击干扰片段设计,遵循干扰 RNA 设计原则,选取其中 3 对作为 SMAD4 干扰靶序列,设计合成 shRNA 引物。见表 1。

表 1 3 对 shRNA 干扰引物和阴性对照引物序列

类型	引物序列
shRNA-SMAD4-1	5'-GATCCGTGTGCAGTTGGAATGTAATCAAGAG TTACATTCCAACCTGCACAC TTTTGTG-3' 5'-AATTCAAAAA GTGTGCAGTTGGAATGTAA CTCTTGA TTACATTCCAACCTGCACAC G-3'
shRNA-SMAD4-2	5'-GATCCGTACTTCATACCATGCCGATCAAGAG TCGGCATGGTATGAAGTAC TTTTGTG-3' 5'-AATTCAAAAAGTACTTCATACCATGCCGACTCTTGA TCGGCATGGTATGAAGTACG-3'
shRNA-SMAD4-3	5'-GATCCGTAGGACTGCACCATACACTCAAGAG GTGTATGGTGCAGTCTACTTTTGTG-3' 5'-AATTCAAAAAGTAGGACTGCACCATACACTCTTGA GTGTATGGTGCAGTCTACT G-3'
shRNA-Negative	5'-GATCC GTTGATACGTGCGGTGATTCAAGAG ATCACCACGATGCAAC TTTTGTG-3' 5'-AATTCAAAAAGTTGCATACGTGCGGTGATCTCTTGA ATCACCACGATGCAACG-3'

**2.2 shRNA-SMAD4 和 shRNA-Negative 的鉴定** 构建完成的质粒经 PCR 初步鉴定后,扩增出相应条带,认为质粒初步构建成功,立即送公司测序,经测序后进行序列比对,确定质粒是否构建成功。经 PCR 初步验证后在 105 bp 有条带,认为连接成功,送公司测序并将测序结果进行比对后,证明质粒完全构建成功。见图 1、2。

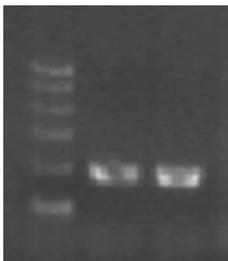


图 1 shRNA-SMAD4-1PCR 检测结果图



图 2 shRNA-SMAD4-1 的测序比对图

毒收集 shRNA-SMAD4、shRNA-Negative 和慢病毒载体混匀后,经脂质体转染入 HEK293T 细胞,48 h 后收集细胞上清培养液,离心去除细胞碎片后,收集病毒液(以 shRNA-SMAD4-2 和 shRNA-Negative 举例说明)。加入直径 6 cm 铺有细胞密度 60%~80% 的 MDA-MB-231 培养皿中,24 h 观察荧光表达,表达量约为 60%,见图 3。

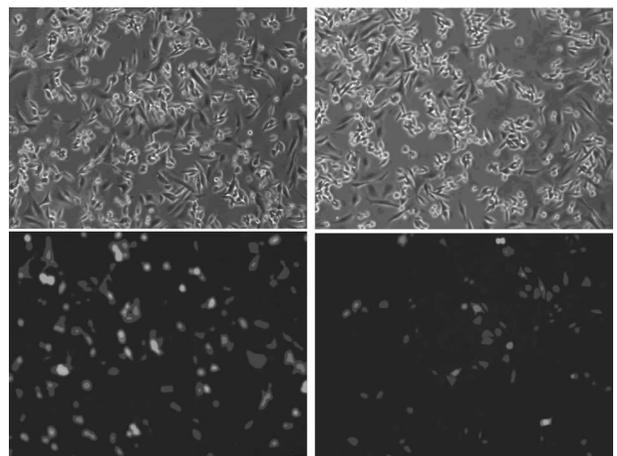
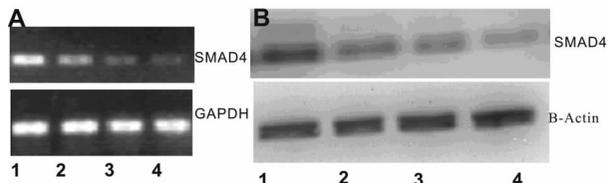


图 3 shRNA-Negative 荧光表达图(×100)

**2.3 shRNA-SMAD4 和 shRNA-Negative 慢病毒的包装和病**

**2.4 shRNA-SMAD4 和 shRNA-Negative 在 mRNA 和蛋白水**

平的表达 慢病毒感染 MDA-MB-231 后, 24 h 提取细胞总 RNA, 48 h 提取细胞总蛋白。通过聚合酶链式反应(RT-PCR)和免疫印迹试验(Western-blot)检测 SMAD4 干扰慢病毒的干扰效果。慢病毒感染 24 h 后, 感染率均值约 60%。RT-PCR 显示 shRNA-SMAD4-1、shRNA-SMAD4-2 和 shRNA-SMAD4-3 组细胞 SMAD4 mRNA 的表达较 shRNA-Negative 组均有所降低, 分别降低 52.17%、46.33%、40.18%。表明 shRNA-SMAD4-3 的干扰效果最好, 且得到 Western-blot 进一步证实。本组实验结果提示, 干扰慢病毒载体构建成功。见图 4。



注: 1: shRNA-Negative; 2: shRNA-SMAD4-1; 3: shRNA-SMAD4-2; 4: shRNA-SMAD4-3。

图 4 SMAD4 基因的沉默效果图

### 3 讨 论

肿瘤的发生发展是一个多因素作用、多基因参与的复杂生物学过程, 目前其机制尚未完全明了。乳腺癌作为女性常见的恶性肿瘤, 占女性恶性肿瘤的第 1 位。目前有文献报道 BMPs/SMAD 在乳腺癌的生物学过程中起着重要作用, Katsuno 等<sup>[5]</sup> 研究发现骨形态发生蛋白 2 (BMP2) 通过 BMPs/SMAD 通路促进 MDA-MB-231 侵袭迁移。BMP2 在体内外能够促进雌激素受体阳性的 MCF7 侵袭迁移, 过表达 BMP2 的 MCF-7 细胞复制乳腺癌异种移植瘤, 裸鼠动物模型中发现有明显新生血管形成<sup>[6]</sup>。Liu 等<sup>[7]</sup> 结合临床标本和实验数据提出 SMAD4 可作为乳腺癌的诊断指标。Xue 等<sup>[8]</sup> 研究表明 SMAD4 作为一关键分子参与肿瘤转移过程, Flanders 进一步证实这一结果。大量研究提示 SMAD4 在乳腺癌的发生、发展中起着重要作用, 深入研究 SMAD4 的功能对阐明乳腺癌发病机制具有临床价值<sup>[9-10]</sup>。

本组通过 SBI 公司第 4 代慢病毒包装系统, 利用干扰在线设计网页, 设计 3 对针对 SMAD4 的短发卡 RNA, 并成功包装成干扰慢病毒。经 RT-PCR 和 Western-blot 发现 3 对短发卡 RNA 对 SMAD4 均有干扰效果, shRNA-SMAD4-1 (52.17%)、shRNA-SMAD4-2 (46.33%)、shRNA-SMAD4-3 (40.18%)。shRNA-SMAD4-3 干扰效果最好, 干扰慢病毒的成功构建为后续研究 SMAD4 功能作出良好铺垫工作。

慢病毒病毒载体作为一种有效的基因工程载体, 已证实其可用于基因治疗、免疫治疗及基础生物学的有力工具。作为基因载体, 其具有较多优点, 如可以制备较高滴度慢病毒, 所携带的基因表达水平高, 所感染的宿主细胞和组织范围广, 几乎可以干扰所有细胞, 慢病毒可以整合到基因组, 能够形成稳

定的基因表达, 今后可用于获得性免疫缺陷综合征(AIDS)、神经系统疾病、血液系统疾病的基因治疗。本实验采用 SBI 安全性更高的第 4 代慢病毒包装系统, 为以后的实验研究奠定了良好的基础。

### 参考文献

- [1] Ye S, Park BH, Song KJ, et al. In vivo inhibition of bone morphogenetic protein-2 on breast cancer cell growth[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2013, 38(3):143-150.
- [2] 王科, 冯红蕾, 孙笑笑, 等. 骨形态发生蛋白 9 对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 肿瘤, 2011, 31(5):389-394.
- [3] Yang Y, Wolfram J, Shen J, et al. Live-cell single-molecule imaging reveals clathrin and caveolin-1 dependent docking of SMAD4 at the cell membrane[J]. FEBS Lett, 2013, 587(24):3912-3120.
- [4] Yu SL, Lee DC, Son JW, et al. Histone deacetylase 4 mediates SMAD family member 4 deacetylation and induces 5-fluorouracil resistance in breast cancer cells[J]. Oncol Rep, 2013, 30(13):1293-1296.
- [5] Katsuno Y, Hanyu A, Kanda H, et al. Bone morphogenetic protein signaling enhances invasion and bone metastasis of breast cancer cells through Smad pathway[J]. Oncogene, 2008, 27(49):6322-6333.
- [6] Clement JH, Raida M, Snger J, et al. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces in vitro invasion and in vivo hormone independent growth of breast carcinoma cells [J]. Int J Oncol, 2005, 27(5):401-407.
- [7] Liu NN, Xi Y, Callaghan MU, et al. SMAD4 is a potential prognostic marker in human breast carcinomas [J]. Tumour Biol, 2014, 35(10):641-650.
- [8] Xue J, Lin X, Chiu WT, et al. Sustained activation of SMAD3/SMAD4 by FOXM1 promotes TGF- $\beta$ -dependent cancer metastasis[J]. J Clin Invest., 2014, 124(4):564-579.
- [9] 姜晶, 王彩芹, 刘楠楠. Smad4 在乳腺癌及癌周组织中的表达及意义[J]. 中国老年学杂志, 2014, 14(15):1253-1255.
- [10] Flanders KC, Heger CD, Conway C, et al. Bright field proximity ligation assay reveals both canonical and mixed transforming growth factor- $\beta$ /bone morphogenetic protein smad signaling complexes in tissue sections [J]. J Histochem Cytochem, 2014, 20(22):1554-1556.

(收稿日期:2014-12-15 修回日期:2015-02-08)

(上接第 1581 页)

- RF 在类风湿关节炎诊断中的应用[J]. 四川医学, 2006, 27(7):690-691.
- [7] 葛艳玲, 宋慧, 赵育靖. 单独检测抗环瓜氨酸肽抗体诊断类风湿关节炎[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(1):94-97.
- [8] 曾小峰, 艾脉兴. 抗环瓜氨酸肽抗体检测在类风湿关节炎中的意义[J]. 中华风湿病学杂志, 2001, 5(5):281-284.
- [9] 胡学芳, 魏华, 朱爱萍, 等. 抗环瓜氨酸肽抗体检测在类风湿关节炎诊断中的临床意义[J]. 中华检验医学杂志,

2003, 26(8):484-487.

- [10] Schellekens GA, de Jong BA, Van den Hoogen FH, et al. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies[J]. Journal of Clinical Investigation, 1998, 101(10):273-275.

(收稿日期:2014-12-16 修回日期:2015-02-13)