

是 S100 蛋白家族成员之一, S100 蛋白家族是钙调节蛋白家族中最大的亚族。迄今为止, 有文献报道其家族至少有 25 个成员 (Santamria-Kisiel *et al.*, 2006)。S100A4 具有 S100 蛋白家族的共性: 具有 EF-手型双螺旋结构, 在细胞内外均具有调节活性, 基因定位于 1 号染色体长臂 2 区 1 带 (1q21) 上等 (Donato, 2001)。目前已发现, S100A4 在胚胎组织和多种肿瘤组织中高表达, 而在正常成年组织和细胞中不表达。此外, 它还具有促进血管生成的作用等 (Sherbet and Lakshmi, 1998)。总之, S100A4 与肿瘤的发生、发展、侵袭、转移等关系密切, 是一个癌症扩散相关因子。目前, 尚不知道 S100A4 在 AP 细胞中起着何种作用, 抑制其表达是否会影响鹿茸的快速生长甚至再生?

RNAi 技术是近年发展起来的研究内源性基因功能的重要手段。本研究意在通过构建 RNAi 所需的病毒载体以研究梅花鹿 S100A4 的功能, 为下一步 S100A4 基因的沉默和进一步研究 S100A4 基因在器官发生和再生的功能奠定了基础。

1 研究方法

1.1 主要材料

人胚肾细胞 293 T、感受态细胞 DH5 α 、载体质粒 pLVTHM、包膜质粒 pMD2. G、包装质粒 pCMV-dr8.91 均由本实验室保存。限制性内切酶 Cla I、Mlu I (Invitrogen, 美国); T4 DNA 连接酶 (Invitrogen, 美国); 琼脂糖凝胶回收试剂盒 (Qia-gen, 美国); 质粒小提试剂盒 (全式金, 中国); 质粒大提试剂盒 (Qiagen, 美国); 100 bp、1 kb Marker (天根生化, 中国); 酵母提取物、胰蛋白酶 (Oxoid, 英国); DMEM、标准胎牛血清、Opti-MEM、LipofectamineTM 2000 (Invitrogen, 美国); 离心超滤管 (Milipore, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 筛选梅花鹿 S100A4 基因 RNAi 靶位点

本实验室已测序获得梅花鹿 S100A4 基因 cDNA 序列。本实验根据 Angela 等 (2004) 的筛选法则, 并利用 NCBI 中的 BLAST 工具对其进行序列同源性对比去除脱靶情况, 最终选出两条针对梅花鹿 S100A4 基因的 RNAi 靶序列。序列及其命名如下:

siRNA1: GCAACCTGGACTGCAACAA

siRNA2: TCGCCATGATGTGCAATGA

1.2.2 设计 shRNA 寡核苷酸链

由于载体质粒 pLVTHM 所具有的 H1 启动子后

面有合适的多克隆位点, 它可以使 shRNA 直接插入到 Mlu I 与 Cla I 之间。因此, 我们设计的 shRNA 的正义链与反义链如下, 其中下划线部分为这两种酶的酶切位点:

shRNA1 正义链 5' -cgcgtccccGCAACCTGGACT-GCAACAAAttcaagaga TTGTTGCAGTCCAGGTTGcttttg-gaaat-3'

shRNA1 反义链 5' -cgatttccaaaaGCAACCTG-GACTGCAACAAAtctcttgaa TTGTTGCAGTCCAGGTT-GCggggga-3'

shRNA2 正义链 5' -cgcgtccccTCGCCATGATGT-GCAATGAttcaagaga TCATTGCACATCATGGCGAtttttg-gaaat-3'

shRNA2 反义链 5' -cgatttccaaaaTCGCCATGAT-GTGCAATGAtctcttgaa TCATTGCACATCATG-GCGaggga-3'

将 shRNA1、shRNA2 的正义链和反义链交由上海生工生物工程有限公司进行化学合成。合成后, 进行体外退火, 并将其分别命名为 Plvthm-shRNA1、Plvthm-shRNA2, -20℃ 保存备用。

1.2.3 载体质粒 pLVTHM 的酶切与连接

使用限制性内切酶 Mlu I 和 Cla I 对载体质粒 pLVTHM 进行双酶切, 然后在紫外光下切胶回收酶切产物, 从而获得载体。通过 T4 连接酶在 37℃ 条件下, 将退火产物分别与载体进行连接。将连接产物转化到感受态细胞 DH5 α 中, 并涂布于 LB 固体培养板 (含 Amp 100 μ g/mL) 上。经过 37℃ 过夜培养后, 长出克隆菌落。

1.2.4 pLVTHM 重组质粒的小量提取与 PCR 鉴定

挑取大小适宜的单菌落接种到添加了 5 mL LB 液体培养基 (含 Amp 100 μ g/mL) 离心管中, 37℃, 220 rpm 震荡培养 12 h 左右。取 3 mL 菌液, 使用全式金质粒小提试剂盒提取质粒。对提取的质粒进行 PCR 鉴定, 引物如下:

上游引物: 5' —CTGGGAAATCACCATA-AACG—3'

下游引物: 5' —TTATTCCCATGCGACGG-TAT—3'

将 PCR 鉴定为阳性的重组质粒, 分别命名为 Plvthm-siRNA1 和 Plvthm-siRNA2, 并送交上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.2.5 慢病毒三质粒的大量提取

将由上海生工测序为阳性的质粒与包膜质粒 pMD2. G 及包装质粒 pCMV-dr8.91 各取 0.5 μ L 分

别进行转化、涂布、挑菌及小量扩增。然后,按1:500 的比例将菌液稀释到 LB 液体培养基(含 Amp100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)中,37 $^{\circ}\text{C}$,220 rpm 进行大量培养。当 OD 值达到 0.8 左右时,使用 Qiagen 大量质粒提取试剂盒提取质粒。 -20°C 保存备用。

1.2.6 重组慢病毒的包装

取若干细胞培养皿,每板添加 12 mL DMEM 培养基(含 10% 的标准胎牛血清,不含抗生素),接种一定数量的 293 T 细胞。当细胞融合度达到 90% 以上,即可进行转染。按照 $M_{\text{Plvthm-siRNA1}}:M_{\text{pCMV-dr8.91}}:M_{\text{pMD2.G}}=2:1.5:0.75$ 的比例取 24 μg 质粒 DNA 稀释于 1.5 mL Opti-MEM 培养基中,同时取 60 μl LipofectamineTM 2000 稀释于 1.5 ml Opti-MEM 培养基中,室温孵育 5 min。然后将二者混合,并轻轻摇匀,室温孵育 20 min。Plvthm-siRNA2 的操作步骤同 Plvthm-siRNA1。将细胞培养皿中的培养基更新,然后分别逐滴加入 DNA/脂质体复合物,并轻轻摇动培养皿使其混匀。37 $^{\circ}\text{C}$,5% (体积分数, ψ) 的 CO_2 培养箱培养 24 h 后,在倒置荧光显微镜下观察转染效果。若转染效果良好,即可进行第一次收毒。将培养皿中的培养液小心移至离心管,使用 0.45 μm 滤器过滤,然后将滤液移至 Millipore Amicon Ultra - 15 离心超滤管,4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 $\times g$ 离心 30 min。将浓缩病毒分装于 EP 管,冻存于 -80°C 。转染 48 h 后进行第二次收毒,操作过程与第一次收毒相同。

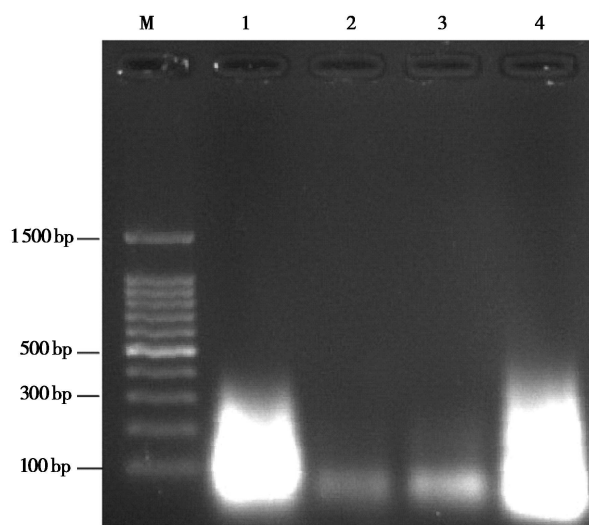


图 1 shRNA 退火连接结果. M: DNA Marker(100 bp);1: shRNA1 正义链;2: shRNA1;3: shRNA2;4: shRNA1 反义链

Fig. 1 Gel electrophoresis of annealing shRNA. M: DNA Marker (100 bp); 1: sense strand of shRNA1; 2: shRNA1; 3: shRNA2; 4: antisense strand of shRNA1

2 结果

2.1 shRNA 退火连接结果

将化学合成的 shRNA 正义链与反义链进行体外退火形成双链 DNA 片段,以 shRNA1 的正义链和反义链为对照,如图 1 所示:第 1 泳道和第 4 泳道分别为 shRNA1 的正义链和反义链,为 67 bp 寡核苷酸单链,且有拖带;第 2 泳道和第 3 泳道分别为 shRNA1 和 shRNA2 的退火产物,小于 100 bp,实验预期退火产物约为 65 bp,说明退火连接成功。

2.2 载体质粒 pLVTHM 酶切结果

载体质粒 pLVTHM 为 11 085 bp,呈环状, Mlu I 与 Cla I 双酶切位点之间片段为 17 bp。该质粒经酶切后形成大小为 11 068 bp 的线性片段。如图 2 所示:第 1 泳道为酶切后产物,大于 10 000 bp,呈线状无拖带,与实验预期相符;另一条带为 17 bp,由于太小,图中无法显示。结果说明该质粒酶切成功。

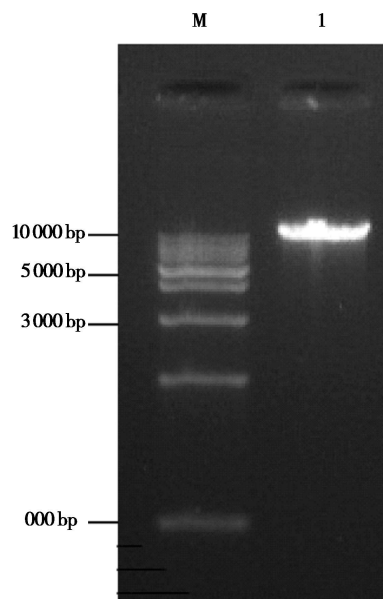


图 2 载体质粒 pLVTHM 酶切结果. M: DNA Marker(1 kb);1: 载体质粒 pLVTHM 酶切后产物

Fig. 2 Double enzymes digest of pLVTHM. M: DNA Marker (1 kb); 1: Carrier plasmid pLVTHM after double enzymes digestion

2.3 pLVTHM 重组质粒 PCR 鉴定结果

以空白质粒 pLVTHM 为阴性对照,将重组质粒进行 PCR 扩增,电泳结果如图 3。PCR 鉴定所设计的一对引物,其中上游引物始于插入位点上游 84 bp,下游引物始于插入位点下游 21 bp,所以空白载体质粒 PCR 扩增片段为 105 bp。由于重组质粒片段为 67 bp,所以重组质粒 PCR 扩增片段为 172 bp。如图 3 所示:第 1 泳道为空白载体质粒阴

性对照，位于 100 bp 与 200 bp 之间靠近 100 bp 处；第 2 泳道和第 3 泳道分别为 Plvthm-siRNA1 和 Plvthm-siRNA2，位于 100 bp 与 200 bp 之间靠近 200 bp 处。结果均与实验预期相符，说明重组质粒连接成功。

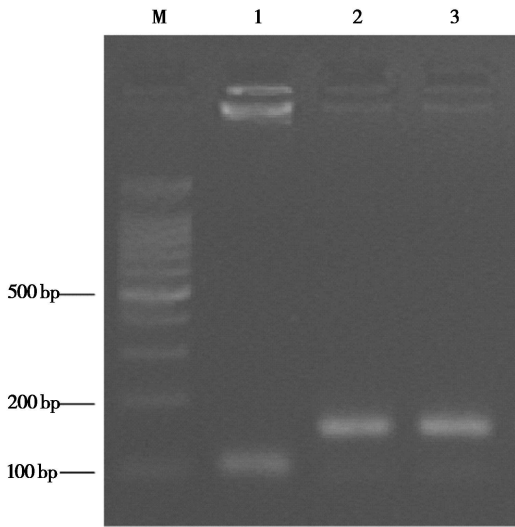


图 3 阳性质粒 PCR 鉴定结果 . M:DNA Marker(100 bp);1:空白质粒阴性对照;2:Plvthm-siRNA1;3:Plvthm-siRNA2
Fig 3 PCR results of the positive clones. M: DNA Marker (100 bp); 1:The negative control of blank vectors; 2: Plvthm-siRNA1; 3: Plvthm-siRNA2

2.4 重组慢病毒三质粒共转染效果检测

由 LipofectamineTM 2000 介导，将阳性重组载体质粒 Plvthm-siRNA1/Plvthm-siRNA2 与包膜质粒 pMD2. G 和包装质粒 pCMV-dl8.91 按一定比例共转染到 293 T 细胞中。24 h 后，在倒置荧光显微镜下观察细胞生长情况，如图 4 (a) 所示，我们可观察到大量绿色荧光均匀分布在视野中。在倒置相差

显微镜下观察细胞生长情况，如图 4 (b) 所示，我们可观察到细胞布满视野紧密排列。以上现象表明，质粒成功转染入 293 T 细胞，病毒包装成功。

3 讨论

鹿茸生长于鹿头额外嵴，是角柄的附属器官，每年进行周期性的脱落与完全再生。早期的研究认为鹿茸再生与蜥蜴的肢体再生一样，是一种基于芽基的再生 (Allen *et al.*, 2002)。蜥蜴的肢体再生过程根据形态学可划分为四个阶段分别为：最初的伤口愈合期、锥体期、平板期和切口期 (Wallance, 1981)。与其相比，在鹿茸再生的前期没有出现椎体结构的生成 (Li *et al.*, 2009)。通过组织学与形态学观察发现鹿茸再生来源于角柄骨膜组织。角柄并不是先天存在的，它是额外嵴上一块被称之为生茸区骨膜组织的直接衍生物。进一步的研究发现其中的生茸区骨膜细胞 (anterogenic periosteum cell, APC) 和角柄骨膜细胞 (pedicle periosteum cell, PPC) 均为多能成体干细胞，因而推测鹿茸再生是一个基于干细胞的过程。后来，研究人员通过生茸区骨膜的同体移植 (Li and Suttie, 2001)、异体移植 (Li *et al.*, 2001)、角柄骨膜的剔除实验 (Li *et al.*, 2007) 及遗传标记追踪 (Li and Suttie, 2001) 等一系列实验，证实了上述观点，并将 APC/PPC 定义为鹿茸干细胞。有趣的是，同为鹿茸干细胞的 APC 和 PPC 并不完全相同，因为实验证明 S100A4 基因只在 APC 中表达而不在 PPC 中表达。为了研究这一机制，本实验首次针对鹿茸干细胞 APC，成功构建了针对 S100A4 基因的 RNAi 重组慢病毒载体。

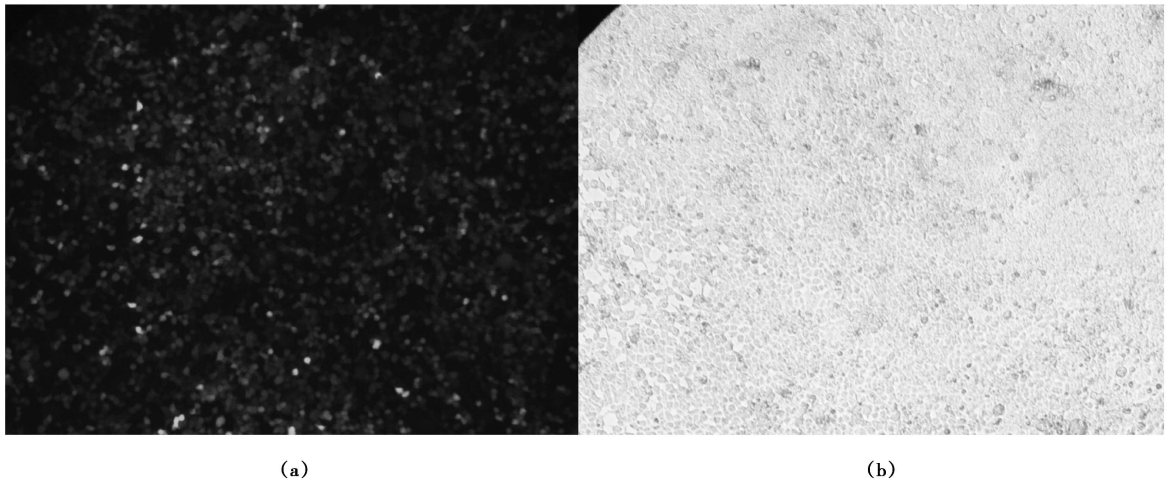


图 4 转染 24 h 后,293 T 细胞生长情况(a:倒置荧光显微镜下荧光表达情况;b:倒置相差显微镜下 293 T 细胞生长情况;放大倍数:50 ×)
Fig. 4 293 t cells 24 hours after co-transfection. (a: fluorescence was observed under inverted fluorescent microscope; b: cells under inverted phase contrast microscope; magnification: 50 ×)

S100A4 基因和癌症有着千丝万缕的关联。从基因方面着手研究癌症已经成为我们了解癌症并试图攻克癌症难题的重要方法。其中, RNAi 技术是研究基因功能的重要手段。马雷等 (2010) 通过对乳腺癌 MCF-7 细胞的 S100A4 基因的沉默发现, 抑制该细胞 S100A4 基因表达可以显著降低该细胞的增殖水平并诱导细胞进入晚期凋亡。Takahiro 等 (2009) 发现人胰腺癌中 S100A4 基因表达受到抑制还可降低细胞的迁移水平, 并诱导癌症抑制基因 PRDM2 和 VASH1 的表达。Hua 等 (2009) 通过对无毛鼠胃癌肿瘤进行瘤内注射 pS100A4-shRNA 可以抑制肿瘤的生长。Ma 等 (2010) 通过对骨肉瘤细胞系 MG-63 和 U-2OS 进行 RNA 干扰发现, S100A4 可能通过调节一些可降低细胞外基质粘附性并促进其降解的蛋白的表达, 来促进骨肉瘤细胞的增殖、侵袭和转移。AP 组织中 S100A4 基因广泛存在并大量表达, APC 具有类似癌症细胞的无限的增殖潜能。但是, 由 AP 组织衍生而来的角柄及鹿茸却是井然有序的没有任何癌变的迹象。与之对应的是, S100A4 基因不在 PP 组织中表达。在 AP 组织分化为 PP 组织的过程中, S100A4 基因起着何种作用, 是否其在干细胞的命运分化中扮演着关键的调控作用, 非常值得探讨。而鹿茸模型为研究这一问题提供了天然的良机。利用 RNAi 技术可以有效地抑制 APC 中内源 S100A4 的表达, 进而分析 S100A4 在 APC 中的作用。进行这些研究首先需要解决的问题是构建出合适的载体以导入有效的 shRNA 片段沉默 S100A4 的表达。

本研究成功构建出针对鹿茸干细胞 S100A4 的慢病毒载体, 为下一步通过 RNAi 技术对梅花鹿 S100A4 基因进行沉默来探索该基因和癌症的关系奠定了基础。

参考文献:

- Allen S P, Maden M, Price J S. 2002. A role for retinoic acid in regulating the regeneration of deer antlers. *Dev Biol*, **251**: 409-423.
- Angela R, Devin L, Queta B, et al. 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol*, **22** (3): 326-330.
- Donato R. 2001. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol*, **33** (7): 637-668.
- Gao Z and Li C. 1988. The study on the relationship between antler's growth rate, relative bone mass and circulation testosterone, estradiol, AKP in sika deer. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, **19** (30): 224-231.
- Goss R J. 1970. Problems of antlerogenesis. New York: Clin Orthopaed, **69**: 227-238.
- Hua J, Chen D, Fu H, Zhang R, Shen W, Liu S, Sun K, Sun X. 2009. Short hairpin RNA-mediated inhibition of S100A4 promotes apoptosis and suppresses proliferation of BGC823 gastric cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Letters*, **292**: 41-47.
- Li C, Harper A, Puddick J, Wang W, McMahon C. 2012. Proteomes and signaling pathways of antler stem cells. *PLoS One*, **7** (1): 1-11.
- Li C, Harris A J, Suttie J M. 2001. Tissue interactions and antlerogenesis: new findings revealed by a xenograft approach. *J Exp Zool*, **290** (1): 18-30.
- Li C, Mackintosh C G, Martin S K, et al. 2007. Identification of key tissue type for antler regeneration through pedicle periosteum deletion. *Cell Tissue Res*, **328**: 65-75.
- Li C, Suttie J M. 2001. Deer antlerogenic periosteum: a piece of postnatally retained embryonic tissue. *Anat Embryol (Berl)*, **204** (5): 375-388.
- Li C, Suttie J M, Clark D E. 2004. Morphological observation of antler regeneration in red deer (*Cervus elaphus*). *J Morphol*, **262**: 731-740.
- Li C, Yang Y, Sheppard A. 2009. Adult stem cells and mammalian epimorphic regeneration-insights from studying annual renewal of deer antlers. *Current Stem Cell Research & Therapy*, **4**: 237-251.
- Ma L, Wu A, Ji S, Yang H. 2010. Effect of short hairpin RNA targeting S100A4 gene on proliferation and migration potential of MCF-7 cells in vitro. *Cancer Research on Prevention and Treatment*, **37** (4): 402-406. (in Chinese)
- Ma X, Wang Y, An G, Lv G. 2010. Small interfering RNA-directed knockdown of S100A4 decreases proliferation and invasiveness of osteosarcoma cells. *Cancer Letters*, **299**: 171-181.
- Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey A C, Shaw G S. 2006. Calcium-dependent and-independent interactions of the S100 protein family. *Biochem J*, **396** (2): 201-214.
- Sherbet G V, Lakshmi M S. 1998. S100A4 (MTS1) calcium binding protein in cancer growth, invasion and metastasis. *Anticancer Res*, **18**: 2415-2421.
- Takahiro T, Nobukazu T, Abbas A I F, Sumitaka Y, Toru F, Masaharu I, Daisuke S, Zhaodi G, Hiroki N, Shinichi E, Makoto S, Akira H. 2009. RNA interference targeting against S100A4 suppresses cell growth and motility and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **390**: 475-480.
- Wallace H. 1981. Vertebrate limb regeneration. Chichester: John Wiley & Sons.