

次性给予充足的水和食物。

参考文献

- 1 Meijer JH, Rietveld WJ. Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol Rev*, 1989, 69(3):671 - 707
- 2 Morin LP. The circadian visual system. *Brain Res Rev*, 1994, 19(1):102 - 127
- 3 Vitaterna MH, King DP, Chang AM, *et al.* Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science*, 1994, 264(5159):719 - 725
- 4 Casiraghi LP, Croci DO, Poirier F, *et al.* "Time sweet time": circadian characterization of galectin - 1 null mice. *J Circadian Rhythms*, 2010, 8:4
- 5 Morin LP, Studholme KM. Millisecond light pulses make mice stop running, then display prolonged sleep - like behavior in the absence of light. *J Biol Rhythms*, 2009, 24(6):497 - 508
- 6 Pendergast JS, Friday RC, Yamazaki S. Endogenous rhythms in Period1 mutant suprachiasmatic nuclei in vitro do not represent circadian

- behavior. *J Neurosci*, 2009, 29(46):14681 - 14686
- 7 Shimomura K, Low - Zeddies SS, King DP, *et al.* Genome - wide epistatic interaction analysis reveals complex genetic determinants of circadian behavior in mice. *Genome Res*, 2001, 11(6):959 - 980
- 8 Duangdao DM, Clark SD, Okamura N, *et al.* Behavioral phenotyping of neuropeptide S receptor knockout mice. *Behav Brain Res*, 2009, 205(1):1 - 9
- 9 Sutton GM, Perez - Tilve D, Nogueiras R, *et al.* The melanocortin - 3 receptor is required for entrainment to meal intake. *J Neurosci*, 2008, 28(48):12946 - 12955
- 10 Janik D, Godfrey M, Mrosovsky N. Phase angle changes of photically entrained circadian rhythms following a single nonphotic stimulus. *Physiol Behav*, 1994, 55(1):103 - 107
- 11 VanReeth O, Turek FW. Stimulated activity mediates phase shifts in the hamster circadian clock induced by dark pulses or benzodiazepines. *Nature*, 1989, 339(6219):49 - 51

(收稿:2011 - 01 - 29)

MTH1 基因的低表达对 HeLa 细胞内 RNA 氧化程度的影响

戴大鹏 干 伟 张立群 聂 犇 徐仁爱 蔡剑平

摘 要 **目的** 建立敲减 MTH1 基因的 HeLa 细胞稳定细胞株,研究 MTH1 基因的低表达对 HeLa 细胞内 RNA 氧化程度的影响。**方法** 设计并合成针对 MTH1 基因的 3 条 siRNA,分别转染 HeLa 细胞,选择干扰效果最为理想的靶序列连接入反转录病毒载体 Retro - Q,在 293T 细胞内包装病毒颗粒,将病毒转染 HeLa 细胞后使用嘌呤霉素筛选抗性克隆株,用 western blot 技术检测克隆株的 MTH1 的表达量以确定干扰效果最理想的稳定细胞株,用 API5000 型质谱仪检测稳定细胞株 RNA 中的 8 - oxoG 与 G 的含量以评价 RNA 的氧化程度。**结果** 本研究设计的 3 条 siRNA 中有 2 条干扰效率可达 90% 以上,所建立的敲减 MTH1 基因 HeLa 细胞稳定细胞株的干扰效果达 80% 以上,质谱检测结果表明 MTH1 基因低表达的稳定细胞株每 10⁶ 个 G 中含有 14.9 个 8 - oxoG,而对照细胞中则仅含 9.7 个 8 - oxoG。**结论** MTH1 基因的低表达可引起 HeLa 细胞中 RNA 氧化程度明显升高。

关键词 8 - oxoG RNA 干扰 MTH1

Oxidization Level Analysis of RNA in MTH1 Knocking Down HeLa Cell. Dai Dapeng, Gan Wei, Zhang Liqun, Nie Ben, Xu Renai, Cai Jianping. The Key Laboratory of Geriatrics, Beijing Hospital & Beijing Institute of Geriatrics, Ministry of Health, Beijing 100730, China

Abstract Objective To construct cell lines with decreased levels of MTH1 expression, and to investigate the influence of lowering MTH1 expression on the oxidation level of RNA in HeLa cells. **Methods** Three siRNA targeting to MTH1 ORF region was designed and synthesized. Target sequences with the highest RNA interface efficiency were then introduced into retrovirus vector Retro - Q and used for the package of virus particles which could infect HeLa cells to get the resistant cell clones. Western blot analysis was carried out to screen most reasonable stable cell lines with highest RNAi efficiency. API500 mass spectrometer was used for the detection of 8 - oxoG and G amounts at last in order to evaluate the oxidation level of RNA. **Results** Two of three siRNA could get more than 90% knocking down effi-

基金项目:科技部国际科技合作计划(2006DFB31410);卫生部北京医院面上项目(BJ - 2008 - 77)

作者单位:100730 卫生部北京医院/卫生部北京老年医学研究所卫生部老年医学重点实验室(戴大鹏、干伟、张立群、蔡剑平);325035 温州医学院药学院药理教研室(聂犇、徐仁爱)

通讯作者:蔡剑平,电子信箱:caijp61@vip.sina.com

ciency and at last we got several stable cell lines with knocking down efficiency more than 80%. We found that RNA of MTH1 knocking down stable cell lines contained 14.9 8-oxoG per 10^6 G, whereas control cells contained 9.7 8-oxoG per 10^6 G. **Conclusion** Decreased MTH1 expression in HeLa cell could increase the oxidation level of RNA.

Key words 8-oxoG; RNA interface; MTH1

目前的研究表明,生物体内被氧化的嘌呤和嘧啶单体超过 20 多种,其中与核酸变异最密切的单体是 8-氧化鸟苷(8-oxo-7,8-dihydroguanine, 8-oxoG)。8-oxoG 在 DNA 的复制和转录过程中不仅可与胞嘧啶 C 正确配对,还可以同样的概率与腺嘌呤 A 错误配对,导致 DNA 或 RNA 的遗传信息发生改变。单链 RNA 由于缺乏组蛋白等物质的保护,比 DNA 更易受到活性氧的攻击而产生 8-oxoG,因此富氧环境下 RNA 中有大量氧化形式的鸟嘌呤存在,最终导致变异蛋白的产生而影响细胞的正常生物学功能^[2]。生物体内存在精密的特异性清除 8-oxoG 单体的 RNA 氧化抑制机制。体外实验表明,MTH1 蛋白通过水解 8-oxoGTP 为 8-oxoGMP 而阻止 8-oxoGTP 掺入 RNA 中,抑制了 RNA 发生变异^[3]。本研究以 HeLa 细胞为实验材料,建立了针对 MTH1 基因的稳定干扰细胞株,并利用质谱技术精确分析了 RNA 中 8-oxoG 的含量,在真核细胞水平证明了 MTH1 蛋白抑制细胞内 RNA 氧化的生物学功能。

材料与方法

1. 材料:(1)主要试剂:Taq DNA 聚合酶,dNTP、DNA 相对分子质量梯度标准 Marker 等(日本 TaKaRa 公司);E. Z. N. A. 胶回收试剂盒(美国 Omega Bio-tek 公司);CEQ™ DTCS Quick StartDNA 测序试剂盒(美国 BeckmanCoulter 公司);RNAiMAX 转染试剂、Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);一步法 Sybgreen 定量 PCR 试剂盒(日本 Takara 公司);Retro-Q 反转录病毒及包装试剂盒(美国 Clontech 公司);BCA 蛋白定量试剂盒、SuperSignal West Pico Trial Kit(美国 Pierce 公司);兔抗人 MTH1 多克隆抗体(英国 Abcam 公司);羊抗兔辣根过氧化物酶标记二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);RNeasy Mini Kit(美国 Qiagen 公司);核酸酶 P1(日本 Wako 公司);碱性磷酸酶(美国 NEB 公司)。(2)仪器:普通 PCR 仪(美国 AB 公司)、定量 PCR 仪 SmartCycler(美国 Cepheid 公司)、质谱仪 Agilent 1200 series HPLC(美国 Agilent Technologies)。(3)耗材:本研究所用常规耗材均购自 Axygen 公司。(4)引物及寡核苷酸的合成:针对人 MTH1 基因的 3 条 siRNA 由广州瑞博生物有限责任公司设计并合成,其靶序列分别为:si-1:5'-GCCAGATCGTGTGTTGAGTT-3';si-2:5'-CGACGACAGC-TACTGGTTT-3';si-3:5'-ACACCATCTGGACTACAC-3'。MTH1 基因 realtime-PCR 扩增引物由英俊北京有限公司合成,其引物序列为:M1-F:5'-AGGTGGGCCAGATCGTGTGTTG-

-3'; M1-R:5'-TCGTCGGGCCACATGTCC-3'。针对 MTH1 及 GFP 对照基因 shRNA 病毒载体的构建,由英俊北京有限公司合成如下寡核苷酸:Oligo1:5'-GATCC(N₁)₁₉GTGT-GCTGTCC(N₂)₁₉TTTTTTG-3'; Oligo2:5'-AATCAAAAAA(N₁)₁₉GGACAGCACAC(N₂)₁₉G-3'。其中 N1 为针对目标基因的靶序列,N2 为靶序列的反向互补序列。MTH1 基因靶序列为 CGACGACAGCTACTGGTTT, GFP 基因靶序列为 GCAAGCTGACCCTGAAGTTCA。

2. 方法:(1)筛选最适 siRNA(小干扰 RNA):转染前 1 天 24 孔板内铺 8×10^4 个细胞/孔,次日用 RNAiMAX 试剂分别转染针对人 MTH1 基因的 3 种 siRNA 各 10pmol,每种各转染 3 个孔作为重复,同时设立 3 个无 siRNA 阴性对照。转染 48h 后 Trizol 试剂提取总 RNA。取 70ng 总 RNA 作为模板,按照一步法 Sybgreen 定量 PCR 试剂盒使用说明,利用 MTH1 基因扩增引物进行 MTH1 基因表达量检测,利用 Δct 法计算每种 siRNA 的干扰效率。(2)构建针对 MTH1 及 GFP 对照基因的 shRNA 病毒载体:按照 Retro-Q 病毒载体构建说明书完成两个病毒载体的构建,用 CEQ8000 遗传分析系统对获得的载体进行多重测序验证。(3)筛选针对 MTH1 基因的稳定干扰细胞株:按照 Retro-Q 反转录病毒包装试剂盒使用说明,293T 细胞内共转染反转录病毒质粒、pGP 及 pE-ampho 质粒,2 天后收集含病毒颗粒的培养基并用于转染 HeLa 细胞。次日按照 1:6 比例重悬细胞于含 $2\mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素的选择培养基进行筛选,每隔 3 天更换培养基以去除死亡细胞,2 周后挑取单个细胞克隆团于 96 孔板内继续培养,大约 3~5 天后接种至 24 孔板内培养。裂解细胞并经 BCA 蛋白定量试剂盒定量,取 $20\mu\text{g}$ 总蛋白进行 14% SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜,含 5% 脱脂奶粉 TBST 液室温封闭 1h,按照 1:1000 稀释适量兔抗人 MTH1 抗体,4℃ 孵育 12h,TBST 洗液清洗 3 遍后加入养抗兔二抗(1:2000)孵育 1h,洗液清洗 5 遍,使用 SuperSignal West Pico Trial Kit 配合 X 线片曝光检测杂交信号。(4)RNA 的抽提及消化:按照 RNeasy Mini Kit 使用说明提取总 RNA,取 $20\mu\text{g}$ 总 RNA 95℃ 加热,立即置于冰上。加入 $10\mu\text{l}$ $1\text{U}/\mu\text{l}$ 的核酸酶 P1 于 37℃ 水浴 2h。加入 $5\mu\text{l}$ $1\text{U}/\mu\text{l}$ 碱性磷酸酶,37℃ 水浴 1h。 $12000g$ 离心 3min,去除可能产生的沉淀,吸取上清加入 HPLC 内衬管进行质谱检测。(5)质谱分析条件:采用 waters 公司 Atlantis dC18 $5.0\mu\text{m}$, (2.1mm × 150mm) 色谱柱,流动相为 pH3.75 的 10mmol/L NH_4Ac (A 相)和 100% MeOH (B 相)。采用梯度洗脱,0~8min:6% B,0.28ml/min;8~9min:80% B,0.4 ml/min;9~11min:6% B,0.4ml/min;11.5~12min:6% B,0.28ml/min。样品室温度为 4℃,柱温为 15℃,对照品和检测样品进样体积分别为 $10\mu\text{l}$ 和 $40\mu\text{l}$,整个

分析时间为 12min。

结 果

1. 筛选针对 MTH1 最适 siRNA 的结果:将合成的 3 种 siRNA 转染 HeLa 细胞后,利用 realtime RT-PCR 检测 MTH1 mRNA 的表达量,获得如图 1 所示的实验结果。从图 1 可以看出,除 MTH1-3 外,其余两条 siRNA 均可获得高达 90% 以上的干扰效率,其中 MTH1-2 siRNA 干扰效果最佳,可以用于后续 shRNA 载体的构建。

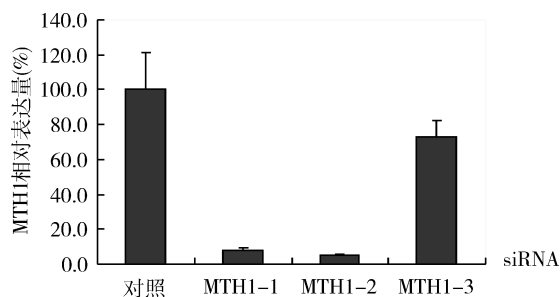


图 1 针对 MTH1 的 3 条 siRNA 干扰效率检测

2. 建立针对 MTH1 的稳定干扰细胞株:将筛选出的 siRNA 对应靶序列插入 shRNA 反转录病毒载体 Retro-Q,转染 HeLa 细胞后经过筛选我们最终获得了多个抗性克隆株,免疫印迹(western blot)实验结果如图 2 所示,除 2 号外,其余克隆株均具有一定的干扰效率,其中 1、3 号克隆干扰效果最佳。

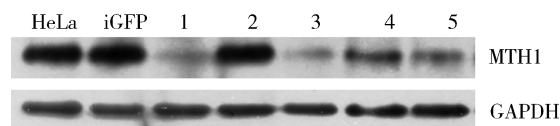


图 2 MTH1 稳定干扰细胞株干扰效率的 western 检测
iGFP. 对照细胞株;1~5. 抗性细胞株

3. MTH1 干扰细胞株 RNA 中 8-oxoG 含量的检测:利用质谱法,我们对已获得的 MTH1 稳定干扰 1 号细胞株及对照抗性细胞株的 RNA 氧化水平进行了检测,结果如图 3 所示,HeLa 细胞及对照细胞 RNA 中每 10^6 个 G 中分别有 9.3 个及 9.7 个 8-oxoG,而 MTH1 干扰细胞株中则有 14.9 个。这一结果显示, MTH1 基因表达被干扰后可明显增加细胞内 RNA 中的氧化水平,8-oxoG 的含量明显升高。

讨 论

大肠杆菌中 MutT 基因可特异性的水解 8-oxoGTP 及 8-oxodGTP,从而阻止其进入新合成的 RNA 及 DNA 链中引起突变^[3,4]。MTH1 基因是真核生物中第一个被克隆的 MutT 同源基因,体外实验表明,纯化的 MTH1 蛋白同样具有水解 8-oxoGTP 为 8-ox-

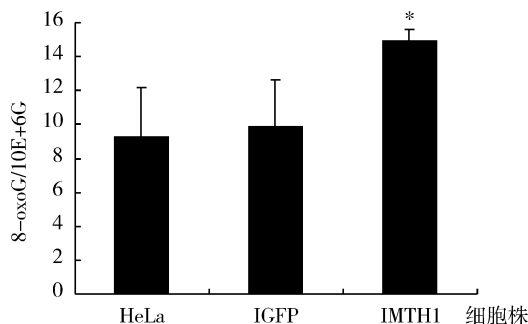


图 3 MTH1 稳定干扰细胞株 RNA 中 8-oxoG 含量检测

* 代表与另外两种细胞相比有显著性差异 ($P < 0.05$)

oGMP 的生物学活性^[4]。但生物体内所表达的 MTH1 蛋白其活性是否与体外实验一致,目前尚缺乏直接的实验证据。本研究,我们利用 RNA 干扰技术 (RNAi),建立了稳定干扰 MTH1 基因表达的细胞株,通过质谱法方法检测了 RNA 中的 8-oxoG 含量。检测数据表明,相对于对照细胞,MTH1 基因表达量下降后可引起细胞内 RNA 氧化程度明显升高,说明 MTH1 基因的正常表达在真核细胞中确实具有抑制哺乳动物细胞内 8-oxoG 掺入 RNA 中的生物学功能。

大肠杆菌中的研究数据表明,MutT 基因出现缺陷,可明显增加 RNA 中 8-oxoG 的含量,并直接导致变异蛋白质的产生和积累^[3,4]。生物体内的研究结果显示, RNA 中 8-oxoG 含量的升高可能是导致老年性痴呆等老年神经系统退行性病变发生的重要因素^[5]。我们的早期研究显示,12 月龄快速老化痴呆小鼠 SAMP8 海马组织中 MTH1 及 MTH2 基因的表达水平较 SAMR1 对照鼠明显下降,与之相对应,SAMP8 小鼠海马组织 8-oxoG 的含量较 SAMR1 明显升高,同时其淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 表达量也明显上升^[6~8]。我们前期的研究结果还表明,老年痴呆病患者海马细胞中 MTH1 基因表达量下降与 RNA 中 8-oxoG 含量的升高具有明确的相关性。因此,我们推测,哺乳动物或人的海马细胞中 MTH1 基因表达量的下降,通过 RNA 中 8-oxoG 含量增加,以及 RNA 变异的中间环节,而与海马细胞中变异蛋白的产生密切相关。

本研究首次通过建立 MTH1 基因表达量稳定下降的敲减细胞株,并用高敏感的质谱检测技术在体外直接观察到了 RNA 中氧化程度的变化。虽然在敲减细胞株中 RNA 氧化程度的增加与对照株相比较有显

著性增加,但是这种增加是在极其微量的水平发生的,这可能揭示了许多老年病的发病随增龄而增加的本质。在此基础上,我们认为进一步开展对 RNA 氧化生物学意义的研究是必要的。

参考文献

- 1 Radak Z, Boldogh I. 8-oxo-7,8-dihydroguanine: Links to gene expression, aging, and defense against oxidative stress[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(4):587-596
- 2 Hayakawa H, Fujikane A, Ito R, *et al.* Human proteins that specifically bind to 8-oxoguanine-containing RNA and their responses to oxidative stress[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 403(2):220-224
- 3 Taddei F, Hayakawa H, Bouton M, *et al.* Counteraction by MutT protein of transcriptional errors caused by oxidative damage[J]. *Science*, 1997, 278(5335):128-130

- 4 Ishibashi T, Hayakawa H, Ito R, *et al.* Mammalian enzymes for preventing transcriptional errors caused by oxidative damage[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(12):3779-3784
- 5 Nunomura A, Hofer T, Moreira PI, *et al.* RNA oxidation in Alzheimer disease and related neurodegenerative disorders[J]. *Acta Neuropathol*, 2009, 118(1):151-166
- 6 蔡剑平, 黑爱莲. 快速老化痴呆模型小鼠 SAMP8 学习记忆能力的增龄性变化[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2005, 12(4):219-222
- 7 郑君德, 宋晓宁, 蔡剑平. MTH2 蛋白在快速老化 P8 小鼠海马中表达的增龄性变化[J]. *中华老年医学杂志*, 2008, 27(7):537-540
- 8 Zheng JD, Hei AL, Zou PP, *et al.* Age-related alterations in the expression of MTH2 in the hippocampus of the SAMP8 mouse with learning and memory deterioration[J]. *J Neurol Sci*, 2009, 287(1):188-196

(收稿:2011-03-14)

miR-223 在胰腺癌组织中的表达及意义

王卫卫 刘建强 黄浩杰 邹多武 李兆申 高 军

摘 要 目的 分析胰腺癌及其配对癌旁组织中 miR-223 的表达差异,评价 miR-223 对胰腺癌潜在的诊断价值。方法 收集笔者医院 28 例胰腺癌患者手术标本的癌组织及配对的癌旁组织,3 例正常胰腺组织作为对照。采用 TaqMan Real-time PCR 方法,以 U6 为内参,检测 miR-223 在胰腺癌及配对癌旁组织中的相对表达量,并分析其与胰腺癌临床病理参数的关系。结果 胰腺癌组织中 miR-223 的表达量显著高于癌旁组织($P=0.008$),胰腺癌中 miR-223 的高表达和肿瘤临床特征无关($P>0.05$)。结论 miR-223 可能在胰腺癌的发生发展中发挥一定作用,并可能成为新的胰腺癌诊断标志物。

关键词 胰腺癌 miR-223 相对表达量 临床特征

The Expression and Significance of MicroRNA-223 in Pancreatic Cancer. Wang Weiwei, Liu Jianqiang, Huang Haojie, Zou Duowu, Li Zhaoshen, Gao Jun. Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract Objective To detect the expression of miRNA-223 in pancreatic cancer, paracancerous tissues and normal pancreas tissues and evaluate the diagnostic value of miR-223 as a diagnostic marker in pancreatic cancer. **Methods** Twenty-eight cases of pancreatic cancer patients were included in this study. Pancreatic cancer and paracancerous tissue were collected from every pancreatic cancer patient after surgery. Three normal pancreas were used as control. Relative quantification (RQ) of miR-223 in tissues were detected by reverse transcriptase PCR and real time PCR. U6 was used as internal control. The relationships between clinicopathologic characteristics of pancreatic cancer and the RQ of miR-223 were analyzed. **Results** The RQ of microRNA-223 in pancreatic cancer tissues were significantly higher than those in paracancerous tissues($P=0.008$). The highly expressed miR-223 did not correlate with clinicopathologic characteristics such as sex, age, tumor maximal diameter and the level of serum CA19-9($P>0.05$). **Conclusion** The miR-223 might play an important role in the tumorigenesis and development of pancreatic cancer. It may be used as a new potential diagnostic biomarker for pancreatic cancer.

Key words Pancreatic cancer; miR-223; Relative quantification; Clinicopathologic characteristics

基金项目:国家科技支撑计划(2006BAI02A12)

作者单位:200433 上海,第二军医大学附属长海医院消化内科

通讯作者:李兆申、高军,电子信箱:zhshli@81890.net

近年来,胰腺癌在全球的发病率呈逐年上升趋势。据统计,美国 2009 年新增胰腺癌病人 42470 例,其中约有 83% 的病人于 1 年内死亡,胰腺癌仅占癌