

人总 MBP 干扰 RNA 真核表达载体的构建及 MBP 功能初步研究*

兰海霞¹, 呼格吉乐², 王艳艳^{2△}, 高乃康³ (1. 解放军第二五三医院儿科, 呼和浩特 010051; 2. 内蒙古医科大学附属医院检验科, 呼和浩特 010050; 3. 内蒙古医科大学附属医院神经外科, 呼和浩特 010050)

【摘要】 目的 本研究构建 4 个携带髓鞘碱性蛋白(MBP)公共序列的干扰 RNA 真核表达载体, 并转染人神经胶质细胞 U251 细胞, 为研究 MBP 在新生儿脑损伤中的作用提供平台。**方法** (1) 构建 4 个携带新靶点的 MBP 干扰 RNA 真核表达载体, 酶切后将酶切片段测序鉴定; (2) 利用脂质体转染将构建的 MBP 干扰 RNA 真核表达载体转入 U251 细胞株内。**结果** (1) 成功构建了 4 个携带新靶点的 MBP 干扰 RNA 真核表达载体; (2) 在 U251 细胞中有绿色荧光蛋白表达, 经反转录-聚合酶链反应检测 MBP 干扰成功; (3) 干扰 U251 细胞中 MBP 表达后, 致使 U251 细胞生长变慢。**结论** 成功构建携带新靶点的 MBP 干扰 RNA 真核表达载体, 利用载体干扰 MBP 基因, 结果表明 MBP 在 U251 细胞生长过程中起重要作用。

【关键词】 干扰 RNA; 髓鞘碱性蛋白; 神经胶质细胞 U251; 转染

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2015. 23. 008 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)23-3469-03

Construction and preliminary function study of the interfering RNA eukaryotic expression vectors of human MBP gene*

LAN Hai-xia¹, Hujegile², WANG Yan-yan^{2△}, GAO Nai-kang³ (1. Department of Pediatrics, the 253th Hospital of PLA, Hohhot, Inner Mongolia 010051, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia 010050, China; 3. Department of Neurology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia 010050, China)

【Abstract】 Objective To construct the the interfering RNA eukaryotic expression vectors carrying four common subsequences of human myelin basic protein (MBP) gene, and to transfer them into human U251 glioma cells, so as to provide a platform for the research of the role of MBP in neonatal brain injury. **Methods** (1) To construct four interfering RNA eukaryotic expression vectors carrying new targets of human MBP gene, and to identify their sequences after enzyme digestion. (2) To transfer the constructed vectors into human U251 glioma cells via oligofectamine. **Results** (1) Four interfering RNA eukaryotic expression vectors carrying new targets of human MBP gene were successfully constructed. (2) Green fluorescent protein expressed in human U251 glioma cells were successfully detected, and RT-PCR result showed MBP was interfered successfully. (3) The growth of human U251 glioma cells was retarded after MBP being interfered. **Conclusion** The interfering RNA eukaryotic expression vectors carrying new targets of human MBP gene have been successfully constructed and used to interfere the MBP gene, which means MBP plays an important role in the growth of human U251 glioma cells.

【Key words】 interfering RNA; myelin basic protein; U251 glioma cells; transfection

新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)指新生儿围生期发生窒息导致脑的缺氧缺血性损害, 临床出现一系列中枢神经系统异常的表现, 是世界范围内新生儿围生期死亡和后期神经系统发育异常的重要原因。因此, 对新生儿窒息早期诊断和早期治疗是减少新生儿 HIE 发生、发展的必要手段^[1-2]。但目前各国仍缺乏新生儿窒息早期诊断较灵敏、准确的指标, 髓鞘碱性蛋白(MBP)是中枢神经髓鞘膜的主要成分, 起维持中枢神经系统髓鞘结构和功能稳定的作用。近年研究指出, 血清 MBP 浓度升高可作为脑实质性损伤及髓鞘改变的一项特异性生化指标, 因此, MBP 被临床作为诊断、预测新生儿脑损伤的重要监测指标。但目前 MBP 在体内的作用机制还不清楚, 因此本研究将构建 MBP 干扰核糖核酸(RNA)真核表达载体, 利用干扰

RNA 技术初步探讨 MBP 的作用机制, 为以后深入研究 MBP 在体内的作用机制构建平台。

1 材料与方法

1.1 材料 人脑胶质瘤 U251 细胞株购自中科院上海细胞库, 脱氧核糖核酸(DNA)内切酶、DNA 连接酶等购自 MBI 公司, 聚合酶链反应(PCR)试剂盒购自 Takara 公司, DNA 凝胶回收试剂盒、琼脂糖等购自天根生化科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 设计干扰 RNA 短发夹 RNA(shRNA)模板中的 loop 结构选用了 TTCAAGAGA 以避免形成终止信号, shRNA 的转录终止序列采用 T6 结构。反义链模板的 5' 端添加了 GATC, 与 BamH I 酶切后形成的黏端互补; 正义链模板的 5'

* 基金项目: 内蒙古科技厅应用技术与开发资金资助项目(20120406); 内蒙古自治区卫生和计划生育委员会医疗卫生科研计划资助项目(201303062); 内蒙古自治区高等学校科学技术研究重大资助项目(NJZZ13411); 内蒙古自然基金面上资助项目(2012MS1147)。

作者简介: 兰海霞, 女, 硕士, 副主任医师, 主要从事儿科及分子生物学研究。△ 通讯作者, E-mail: wangyanyan8311@163.com。

端添加了 CACC,与 BbsI 酶切后形成的黏端互补;如果 siRNA 的第一个碱基不是 G,则在 CACC 后补加一个 G。设计序列如下。pGPU6/GFP/Neo-MBP-1: GGA CTG TCC CTG AGC AGA TTT CAA GAG AAT CTG CTC AGG GAC AGT CCT T; pGPU6/GFP/Neo-MBP-2: GCA GAG CGT CCG ACT ATA AAT TTC AAG AGA ATT TAT AGT CGG ACG CTC TGC TT; pGPU6/GFP/Neo-MBP-3: GGC TGT GCA ACA TGT ACA AGG TTC AAG AGA CCT TGT ACA TGT TGC ACA GCC TT; pGPU6/GFP/Neo-MBP-4: GCG TAG TCC ACT TCT TCA AGA ATT CAA GAG ATT CTT GAA GAA GTG GAC TAC GTT。

1.2.2 退火 用 TE(pH8.0)分别溶解 DNA oligo 至浓度 100 $\mu\text{mol/L}$,取正义链和反义链 oligo 溶液,进行退火反应。退火反应体系:10 $\times$ 反应缓冲液 5 μL ;上游引物 5 μL ;下游引物 5 μL ;加无菌去离子 35 μL 至总体积 50 μL 。在 PCR 仪上依照以下程序进行退火处理:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;85 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;75 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;70 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。退火后,将得到浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 shRNA 模板稀释 50 倍至终浓度为 200 nmol/L,以用于连接反应。

1.2.3 载体线性化 取 2 μg pGPU6/GFP/Neo 载体,37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 1 h,电泳检测回收后估算浓度,稀释至终浓度为 50 ng/ μL 。

1.2.4 载体的构建 将 pGPU6/GFP/Neo-shRNA 载体转入感受态细胞 JM109 中,每个反应分别挑取 5 个菌落,接种到含 50 $\mu\text{g/mL}$ Kanamycin 的 LB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。分别挑取过夜培养平板上单个菌落接种于 5 mL 含卡那霉素(30 $\mu\text{g/mL}$)的 LB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$,250 g/min,振荡培养 12 h。提取质粒后,分别将质粒用 BamH I、Pst I 酶切鉴定,并测序。

1.2.5 连接产物的转化 取出感受态细胞 JM109,加入 10 μL 连接产物,将 200 μL 孵育后的细胞均匀涂布于含 50 $\mu\text{g/mL}$ Kanamycin LB 平板上,将平板倒置于培养箱中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h。

1.2.6 阳性克隆的鉴定 在这几个连接反应里挑选出 5 个菌落,孵育后使用碱裂解法抽提质粒,对所得质粒用 BamH I、Pst I 分别酶切鉴定。试验所得阳性重组载体应该可以被 BamH I 切开,而不能被 Pst I 切开。挑 2 个酶切结果符合的质粒进行测序。采用高纯度质粒抽提试剂盒(中量)对测序结果正确的菌株进行质粒抽提。

1.2.7 干扰质粒对 U251 细胞的稳定转染 按照 LipofectamineTM 2000 转染试剂说明书,将高纯度的上述质粒及阴性对照质粒分别转入 U251 细胞中,培养后荧光显微镜下观察转染效果。

1.2.8 反转录 PCR(RT-PCR)检测 MBP 基因表达 本研究将转入 PGPU6/GFP/Neo-MBP-1 细胞设为干扰组;未进行任何处理的细胞设为正常组;将转入 PGPU6/GFP 空载体的细胞设为阴性对照组。3 组各取 10⁸ 细胞铺满 96 孔板进行培养,培养 48 h 后收集细胞提取细胞总 RNA,利用 Takara 公司 PCR 试剂盒进行 RT-PCR,MBP 上游引物为 5'-CTA ATG CCT GCG GAG TTG TGC-3';下游引物为 5'-GTA GGC AGC GAA CAC CAG AA-3'。内参磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)上游引物为 5'-CGG GAA ACT GTG GCG TGA T-3',下游引物为 5'-ACG CGA ATT CAG CTA ATT GGG G-T3'。PCR 体系:Ex Taq DNA 聚合酶 12.5 μL ;上游引物 0.5 μL ;下游引物 0.5 μL ;模板 1 μL ;加无菌去离子水 10.5 μL 至总体积 25 μL 。在 PCR 仪上按照如下程序进行 PCR:94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s;55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s;28 个循环,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。对 PCR 产物进行电泳分

析。

1.2.9 MTT 法检测细胞的增殖能力 每组设 5 个复孔,并设一组空白对照孔。取各组细胞,以 4 $\times 10^3$ 的细胞浓度接种于 96 孔板,分别在第 1、2、3、4、5 天每孔加入 20 μL 5 mg/mL 的 MTT 液,再培养 4 h 后,移去旧液,加入 200 μL DMSO,振荡 10 min,用酶标仪检测,然后计算并分析。

2 结 果

2.1 酶切结果 将提取质粒进行酶切鉴定,阳性重组质粒载体应该可以被 BamH I 切开,而不能被 Pst I 切开,结果表明本试验构建的 4 个质粒均为阳性重组质粒载体。

2.2 测序鉴定 分别从 4 组中选取 2 个克隆进行测序,鉴定结果显示构建载体序列未发现突变、缺失、插入等异常,以 pGPU6/GFP/Neo-MBP-1 测序图为例,见图 1。

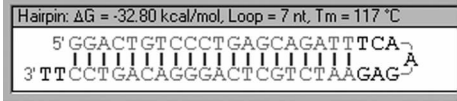


图 1 pGPU6/GFP/Neo-MBP-1 转录产物序列结构

2.3 倒置荧光显微镜观察 MBP 干扰 RNA 真核表达载体稳定转染结果 在倒置荧光显微镜下观察各组转染后的细胞,各组细胞都有绿色荧光蛋白表达,其中 PGPU6/GFP/Neo-MBP-1 组效果最明显,见图 2。

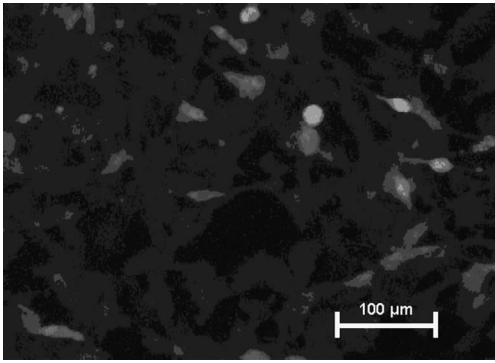


图 2 转染 PGPU6/GFP/Neo-MBP-1 的细胞

2.4 RT-PCR 检测 MBP 基因表达 RT-PCR 检测 MBP 基因表达结果见图 3,结果显示干扰组 MBP 的条带亮度明显低于其他两组,正常组与阴性对照组 MBP 的条带亮度基本一致,说明干扰组 MBP 的表达下调,干扰成功。



注:1 为干扰组;2 为正常组;3 为阴性对照组。

图 3 MBP 基因半定量结果

2.5 MBP 干扰 RNA 对 U251 细胞生长的影响 P^{MBP-1}-U251 组细胞从第 3 天开始,细胞生长变慢,明显低于 P^{NC-siRNA}-U251 细胞和 U251 组细胞的生长速度。而 P^{NC-siRNA}-U251 细胞和 U251 组细胞的生长速度差异不明显,见图 4。

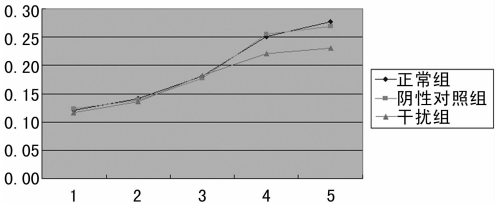


图 4 3 组细胞生长速度

3 讨 论

新生儿 HIE 是由于各种围生期因素引起的缺氧和脑血流量减少或暂停而导致胎儿和新生儿脑损伤,是新生儿死亡和致残的常见疾病,是新生儿窒息后的严重并发症,也是导致儿童神经系统伤残的常见原因之一^[1-2]。因此,早期判断脑损伤程度及有效的干预方法成为近年来国内外研究的热点。窒息引起的潜在性脑损伤是一个十分复杂的病理过程,涉及多种因子和信号传导途径,只有深入研究参与神经损伤过程中的每个因子的作用及其相互关系,才能更细致地了解脑损伤的实质,最终攻克神经损伤后的早期诊断与治疗的难题^[3-4]。

MBP 是少突胶质细胞和雪旺细胞合成的一种强碱性膜蛋白,主要在少突胶质细胞内以共价键结合于髓鞘质浆膜面,并与细胞骨架、微管、微丝相连,起维持中枢神经系统髓鞘结构和功能稳定的作用,其血清水平的增高是急性脑实质损伤和脱髓鞘改变的特异性生化指标^[3-6]。MBP 基因 7 个外显子转录产物具有不同的剪接方式,人脑中有至少 5 种不同的剪接产物,研究发现其对人脑发育、神经细胞分化、髓鞘发生与髓鞘形成具有重要生理作用^[7]。生理状态下,脑组织中 MBP 水平很低,一般很难被检测,当脑损伤病变累及髓鞘时,致使 MBP 发生崩解,并释放入血液和脑脊液中,导致血液中 MBP 水平升高,并引起神经功能障碍,说明体内 MBP 水平变化能特异地反映髓鞘脱失程度进而反映神经组织病损程度^[5]。另有研究显示,MBP 是中枢神经系统损害和急性脱髓鞘有效的生化指标,并可以作为判断以颅脑伤为主多发伤患者脑挫伤病情严重程度和评估预后的指标^[6-8]。

RNA 干扰现象是指内源性或外源性 dsRNA 介导细胞内的同源 mRNA 发生特异性降解,导致靶基因表达沉默,产生相应功能表型缺失。这一现象属于转录后的基因沉默(PTGS)机制,是存在于真核生物体内的一种阻断外源基因表达的自我防御体系。RNA 干扰原理是将双链 RNA(dsRNA)裂解为 21~25 个核苷酸组成的小的小干扰 RNA(siRNA)作为介导子,引起同源序列特异性的 mRNA 降解^[9]。目前,使用 RNA 干扰技术可以特异性剔除或关闭特定基因的表达,在基因功能的研究上呈现巨大的应用前景,提供了一种高通量分析途径。这项技术已被广泛应用于分子医学研究的众多领域:如多药耐药性^[10],抑制肿瘤的侵袭、增殖^[11],抗病毒感染疾病等研究^[12]。

人胎脑中以 21.5×10^3 MBP 表达为主,成年脑中以 18.5×10^3 MBP 表达最多,提示 MBP 在体内不同组织、不同时期有其他的表达。此前研究利用 RNA 干扰对 MBP 进行研究,所干扰的靶点是针对 21.5×10^3 的 MBP^[13]。本文对基因库中所有人的 MBP cDNA 序列进行比对分析,查找 MBP cDNA 序列的共同序列,参考 MBP 的公共 cDNA 上找到 4 个新的可能高效干扰 MBP mRNA 的靶点,经人工合成,随后分别构建 MBP 干扰 RNA 真核表达载体,分别将载体转入 JM109 感受态细胞中,每个连接反应挑取 5 个菌落,培养后抽提质粒,经 BamH I、Pst I 分别酶切鉴定,所有构建载体均为阳性重组载体,测序结果表明构建的干扰载体序列与设计序列完全相同,说明 4 个 MBP 干扰 RNA 真核表达载体均构建成功。本研究分别提取构建成功的质粒并与 Lipofectamine™ 2000 结合进行转染,在倒置荧光显微镜下观察各组转染后的细胞,各组细胞都有绿色荧光蛋白表达,其中 P^{GPU6/GFP/Neo-MBP-1} 组效果最明显;同时利用 RT-PCR 检测 MBP 基因在细胞中的表达,结果显示干扰组

MBP 表达下调,干扰成功。本研究利用 MTT 法检测细胞的增殖能力,生长试验发现下调 MBP 的表达使 U251 细胞的生长明显减慢。

总之,本研究成功构建人 MBP 的真核表达载体,利用 RNA 干扰技术干扰 MBP 的表达,从而抑制了 U251 细胞生长。说明 MBP 在 U251 细胞生长过程中起重要作用,为进一步研究 MBP 对人脑神经细胞的影响奠定了试验基础,也为 MBP 在新生儿脑损伤中的作用提供试验平台和有价值的资料。

参考文献

- [1] 苏永棉. 血清 MBP、S100B 的变化在新生儿窒息中的临床意义[J]. 临床研究, 2012, 10(19): 53-54.
- [2] 杨扬, 董玉海, 殷洁. MRI 影像对 36 例新生儿缺血缺氧性脑病预后分析[J]. 中国误诊学杂志, 2008, 8(25): 6225.
- [3] 陆镇奇, 何力, 高平明. 新生儿缺氧缺血性脑病早期振幅整合脑电图背景活动的特点及意义[J]. 实用医学杂志, 2014, 2(30): 279-281.
- [4] 蔡娜莉, 付亚林. 足月 HIE 新生儿血清 MBP 和 NSE 变化及其临床意义[J]. 山东医药, 2012, 13(52): 91-92.
- [5] Kuboyama K, Fujikawa A, Masumura M, et al. Protein tyrosinephosphatase receptor type z negatively regulates oligodendrocyte differentiation and myelination [J]. PLoS One, 2012, 7(11): e48797.
- [6] Inglis HR, Greer JM, McCombe PA. Gene expression in the spinal cord in female lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis induced with myelin basic protein[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e48555.
- [7] Nawaz S, Kippert A, Saab AS, et al. Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate-dependent interaction of myelin basic protein with the plasma membrane in oligodendroglial cells and its rapid perturbation by elevated calcium[J]. J Neurosci, 2009, 29(15): 4794-4807.
- [8] 李永领, 朱烈烈, 张荣, 等. 以颅脑伤为主的多发伤患者血清 NSE 和 MBP 的检测及意义[J]. 浙江医学教育, 2012, 3(11): 39-41.
- [9] 王明玉, 王文静, 宋现让. RNA 干扰在乳腺肿瘤治疗中的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(2): 272-275.
- [10] Xue JD, Anding L, Zhuan Z, et al. SiRNA inhibition of telomerase enhances the anti-cancer effect of doxorubicin in breast cancer cells[J]. BMC Cancer, 2009, 5(9): 133-139.
- [11] 呼格吉乐, 张军力, 段美庆, 等. 新靶点 CDK2 干扰 RNA 对人脑胶质瘤增殖影响[J]. 中国公共卫生杂志, 2013, 6(29): 855-857.
- [12] Satnh MC, Van Rij RP, Andino R. RNA silencing in viral infections: insights from poliovirus[J]. Virus Res, 2004, 102(1): 11-17.
- [13] 田瑞敏, 鄢佳程, 易芳, 等. 21.5 kD MBP RNAi 有效靶点的筛选及验证[J]. 川北医学院学报, 2013, 28(2): 112-116.