文章编号:1000-5404(2009)01-0075-04

论著

应用双向启动子 RNA 干扰技术抑制大鼠血管平滑肌细胞 MAPK 的表达

王 燕[1],傅春江[2],王旭开[2],曾春雨[2],杨成明[2],章 波[1],许雪青[1],白 云[1] (第三军医大学:[1] 基础医学部医学遗传学教研室,重庆 400038,[2] 大坪医院野战外科研究所心血管内科,重庆 400042)

摘 要:目的 应用双向启动子技术构建针对 MAPK 的干扰载体,观察其对 MAPK 表达的影响。**方法** 设计 MAPK 的干扰序列,构建基于双向启动子的干扰载体 pHippy-MAPK,RT-PCR 检测大鼠血管平滑肌细胞 MAPK 转录水平受抑制情况,免疫印迹检测大鼠血管平滑肌细胞 MAPK 蛋白表达受抑制情况,^{3}H-TdR 掺入法检测大鼠血管平滑肌细胞的增殖,免疫沉淀法检测大鼠血管平滑肌细胞 MAPK 活性。**结果** 构建了针对大鼠 MAPK 3 段序列的干扰载体 pHippy-MAPK,并证实其中的 1 个干扰载体 pHippy-MAPK3 能有效抑制大鼠血管平滑肌细胞 MAPK 的表达。**结论** 基于双向启动子的编号为 3 的 pHippy-MAPK 干扰载体能有效抑制大鼠血管平滑肌细胞 MAPK 的表达,为干预 MAPK 信号途径通路提供了有效手段。

关键词: MAPK;RNA 干扰;双向启动子
中图法分类号: R322.12; R394-33; R394.2 **文献标识码:** A

Suppression of MAPK expression in cultured rat vascular smooth muscle cells by bidirectional promoter RNA interference

WANG Yan[1], FU Chun-jiang[2], WANG Xu-kai[2], ZENG Chun-yu[2], YANG Cheng-ming[2], ZHANG Bo[1], XU Xue-qing[1], BAI Yun[1] ([1]Department of Molecular Genetics, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Department of Cardiovascular Disease, Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To construct a pHippy vector encoding siRNA for mitogen-activated protein kinase (MAPK) by bidirectional promoter RNA interference, and study its suppressing effect on expression of MAPK in rat vascular smooth muscle cells (VSMCs). **Methods** Three siRNA sequences to MAPK were designed and synthesized, and then subcloned into plasmid pHippy. The plasmid expressing EGFP siRNA served as control. After restriction enzyme digestion and sequencing, the selected positive recombinant plasmid were transfected into primary isolated rat VSMCs. The mRNA and protein expressions of MAPK in VSMCs were analyzed by RT-PCR and Western blot analysis respectively. Tritiated thymidine (^{3}H-TdR) incorporation was used to measure the proliferation of the cells, and immunoprecipitation for the activity of MAPK. **Results** Three RNA interference pHippy-MAPK vectors based on bidirectional promoter were constructed and one of them suppressed MAPK expression effectively. And it dramatically inhibited the cell proliferation and the MAPK activity. **Conclusion** One of our obtained pHippy-MAPK3 vector based on bidirectional promoter can suppress MAPK expression in VSMCs significantly, and the vector can be used as a tool to regulate MAPK pathway.

Key words: mitogen-activated protein kinase; RNA interference; bidirectionalpromoter

丝裂原活化蛋白激酶通路丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)是脊椎类动物体内广泛存在于细胞质的、具有丝氨酸/苏氨酸双重磷酸化能力的蛋白激酶,相对分子质量为(40~46)×10^3,为多种细胞外信号从细胞表面受体传向细胞内的一条重要信号转导通路。有许多丝裂酶原通过不同途径激活这一通路,形成一条包括 MAPK 激酶的激酶(MAPKKK)、MAPK 激酶(MAPKK)、MAPK 的共同通路。MAPK 被激活后可激活转录因子,调节细胞增殖、

基金项目:国家自然科学基金(30570764, 30772281);重庆市自然科学基金(CSTC2006BB5085)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30570764, 30772281) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2006BB5085)
作者简介:王 燕,女,江苏省常州市人,博士,副教授,主要从事肿瘤表观遗传学方面的研究,发表论文 10 余篇。电话:(023)68753925,E-mail:1961wangyan@163.com
通信作者:王旭开,E-mail:wangxuk@163.com
收稿日期:2008-07-07;修回日期:2008-08-08

分化。许多类型细胞,包括血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs)中的 MAPK 都是经此途径被多种生长因子激活,活化的 MAPK 能强烈地刺激细胞增殖。研究已证实 MAPK 在 VSMCs 增殖、分化、凋亡、细胞骨架等重构及细胞周期中起着非常重要的作用,MAPK 可激活转录因子,增加 VSMCs 的 DNA 合成,促进细胞增殖和迁移。有学者报道硫酸低聚糖的拮抗剂 PI3 可明显抑制动物模型中平滑肌细胞(SMC)的增殖,减少新内膜的增厚,而这种作用是通过阻断 ERK1/2 通路的活性来实现的[1]。

高血压的血管重构、弹性功能降低与 VSMCs 增生、肥大密切相关。既往研究证实 MAPK 对 VSMCs 增殖及 DNA 合成有调控作用,这种作用与蛋白激酶 C(protein kinase C,PKC)途径及 MAPK 信号途径的激活有关[2-4]。本研究观察 MAPK 的特异性 siRNA 对体外培养的 SD 大鼠主动脉 VSMCs 增殖的影响。RNAi 技术被证实是一种特异有效的抑制基因表达手段,为此我们根据 MAPK 的编码区,设计合成 3 段 MAPK 的干扰序列,构建基于双向启动子的干扰载体 pHippy-MAPK,并转染 VSMCs,研究其对 MAPK 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

Wistar 大鼠购自第三军医大学实验动物中心;载体 pHippy 由第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所万瑛副教授惠赠。

1.2 主要试剂

T_4 连接酶、AMV 逆转录酶为 Promega 公司产品,各种限制性内切酶为新英格兰生物公司产品;脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000、血清为 Invitrogen 公司产品;MAPK 多克隆抗体购于 Sigma 公司;辣根过氧化酶标记的羊抗兔的二抗购自中杉公司;寡聚核苷酸合成和序列测定由上海英骏生物技术公司完成,DNA 分子量标准购自北京天为公司。

1.3 siRNA 的载体构建及重组子的鉴定

pHippy 载体含有方向相反的 H1 和 U6 两个 RNA pol Ⅲ启动子,两个启动子之间存有 *Bam*H Ⅰ酶切位点(图 1)。

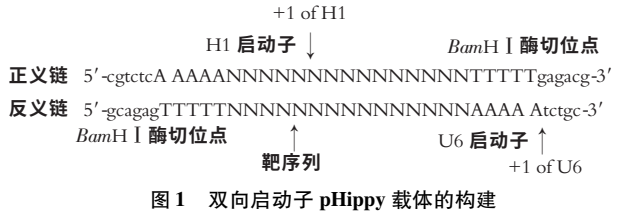


图 1 双向启动子 pHippy 载体的构建

从 GenBank(http://www.ncbi.nlm.nib.gov)获取大鼠 MAPK mRNA 序列,针对序列设计 3 段靶序列,两端均带上 *Bam*H Ⅰ酶切位点,便于和载体 pHippy 连接。具体序列见表 1。将合成的寡核苷酸溶于双蒸水,浓度为 1 mg/μl,各取 1 μl 加入到 5 μl 10×T_4 DNA 连接酶缓冲液中,用双蒸水补至 50 μl。按照下列条件进行退火:95 ℃变性 5 min,95 ~ 70 ℃降温(0.1 ℃/s);70 ℃保温 10 min;70 ~ 30 ℃降温(0.2 ℃/s);取出退火后的 DNA,与载体(pHippy,*Bam*H Ⅰ酶切)常规方法进行连接、转化。挑选转化子,按照试剂盒操作说明进行 DNA 提取,采用酶切鉴定。对初步鉴定的重组子进行序列测定。确定插入片段与预期相同。随后大量扩增重组质粒用于转染 VSMCs 细胞。

表 1 实验用的寡核苷酸序列

引物名称	序列
MAPK1 正义链	5′-GTCAGGCCTCTGGTTCTTTTTA-3′
反义链	5′-GAACCAGAGGCCTGTTTTTC-3′
MAPK2 正义链	5′-GTGGACAAACACGAGGACTTCTTTTTA-3′
反义链	5′-GAAGTCCTCTGTTTGTCCACTTTTTC-3′
MAPK3 正义链	5′-CGACCCTAACCGTTAAGAATACTTTTTA-3′
反义链	5′-GTATTCTTAACGGTTAGGGTCTTTTTC-3′
EGFP 正义链	5′-TGAACTTCAGGGTCAGCTTGCTTTTTA-3′
反义链	5′-GCAAGCTGACCCTGAAGTTCATTTTTC-3′

1.4 VSMCs 的分离培养

采用纯种 6 ~ 8 周雄性 Wistar 大鼠,分离主动脉,去除内膜与外膜,用贴块法分离 VSMCs,方法见文献[5]。

1.5 细胞转染

用 Lipofectamine 2000 转染试剂,将构建好的 3 个 pHippy-MAPK 转染到分离培养的 VSMCs 细胞中,按说明书操作。

1.6 VSMCs RT-PCR 及 Western blot 检测

按常规 RT-PCR 及 Western blot 方法操作。

1.7 ^{3}H-TdR 掺入法测定细胞 DNA 合成

以每孔 1×10^4 个细胞接种于 24 孔培养板中,对照组、阴性 siRNA 干扰 pHippy-EGFP 组和 pHippy-MAPK3 组各设 5 孔。37 ℃,5% CO_2 培养 24 h。如前述方法转染细胞。48 h 后,去转染液,加入含 10% FBS 的培养基继续培养 24 h,加入 ^{3}H-TdR,使之终浓度为 3.7×10^4 Bq/ml,继续培养 8 h 后,常规消化收集细胞,经微孔滤膜抽滤细胞并用 10% 三氯乙酸(TCA)破碎细胞膜,滤膜烘干后置于闪烁瓶中,加入闪烁液,用液体闪烁计数仪测定放射性强度。

1.8 VSMCs MAPK 活性检测

pMAPK(ERK1/ERK2)活性检测采用 γ-^{32}P 掺入法。按 pMAPK 活性检测试剂盒说明书进行,于 β 液闪仪上检测其放射活性。

1.9 统计学处理

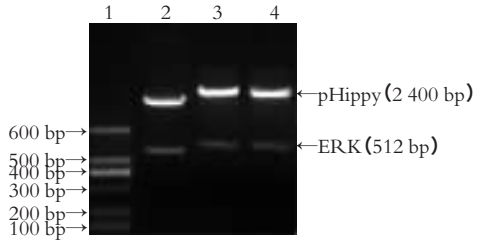
数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析及均数间多重比较。

2 结果

2.1 siRNA 的载体构建结果

将退火的 DNA 于载体连接,转化 *E. coli* DH5α 后可见转化子的产生,从每种中随机挑选 3 个转化子,提取其 DNA 进行酶切,命名为 pHippy-MAPK1、pHippy-MAPK2 和 pHippy-MAPK3,结果见图 2。将阳性克隆送至上海生物工程技术服务有限公司进行 DNA 序列测定。证实干扰序列连入 pHippy 载体的 3 段目的序列和 1 段无关序列均正确连入 pHippy 载体的 H1 和 U6 的

启动子之间,序列分析显示 H1 和 U6 的启动子的起始转录位点为目的序列的第 1 个碱基。测序图略。

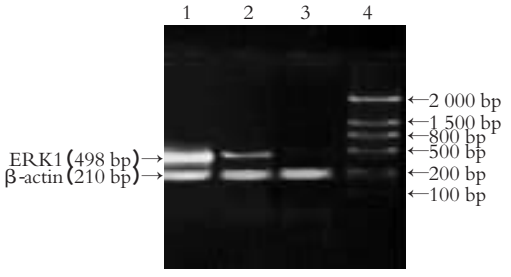


1：DNA 标准；2：pHippy-MAPK1；3：pHippy-MAPK2；4:pHippy-MAPK3

图 2　pHippy-MAPK 载体构建电泳结果

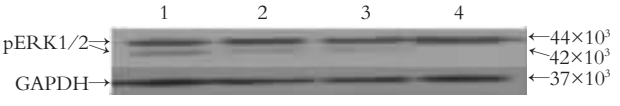
2.2　VSMCs MAPK 被抑制的结果

培养的 VSMCs 细胞转染 pHippy-MAPK 后 48 h,提取一部分细胞总 RNA,逆转录后对 β-actin 为内参照和 MAPK 进行 PCR 扩增,结果 3 个干扰载体均能不同程度的抑制 MAPK 的 mRNA 水平,而以编号为 3 的干扰载体较为明显(图 3)。另以部分细胞进行免疫印迹以进一步明确 MAPK 分子在蛋白水平被抑制情况。结果显示于 RT-PCR 结果一致(图 4),编号为 3 的 pHippy-MAPK3 抑制 MAPK 蛋白表达效果显著。



1:pHippy-MAPK1；2:pHippy-MAPK2；3:pHippy-MAPK3；4:DNA 标准

图 3　RT-PCR 检测 pHippy-MAPK 抑制 VSMCs 中 MAPK mRNA 表达的结果



1:pHippy-EGFP；2:pHippy-MAPK1；3:pHippy-MAPK2；4:pHippy-MAPK3

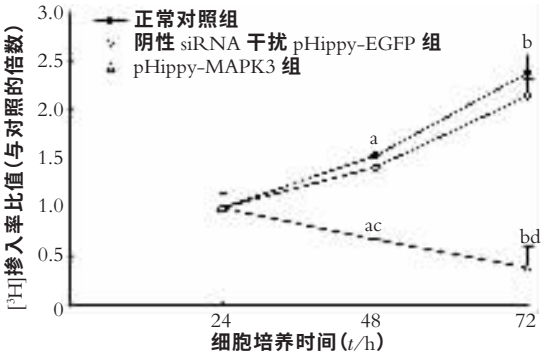
图 4　Western blot 检测 pHippy-MAPK 抑制 VSMCs 中 MAPK 蛋白表达的结果

2.3　MAPK siRNAs 对 VSMCs 细胞增殖的影响

将 pHippy-MAPK3 和阴性 siRNA 干扰 pHippy-EGFP 转染到分离培养的 VSMCs。^{3}H-TdR 掺入法检测转染后 24 ~ 72 h VSMCs 细胞增殖,结果 pHippy-MAPK3 组的 VSMCs ^{3}H-TdR 掺入率明显低于正常对照组和阴性 siRNA 干扰 pHippy-EGFP 组,提示 MAPK 基因沉默后 VSMCs 的增殖能力受到抑制(图 5)。

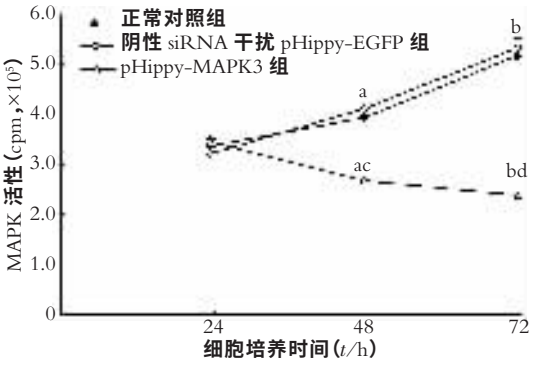
2.4　MAPK siRNAs 对 VSMCs 中 MAPK 活性的影响

将 pHippy-MAPK3 和阴性 siRNA 干扰 pHippy-EGFP 转染到分离培养的 VSMCs。检测转染后 72 h VSMCs MAPK 的活性,pHippy-MAPK3 组的 MAPK 活性明显低于正常对照组和阴性 siRNA 干扰 pHippy-EGFP 组,提示 MAPK 基因沉默后 MAPK 活性受到抑制(图 6)。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与培养 24 h 比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与正常对照组和阴性 siRNA 干扰 pHippy-EGFP 组比较

图 5　^{3}H-TdR 掺入法检测 VSMCs 细胞增殖的结果



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与培养 24 h 比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与正常对照组和阴性 siRNA 干扰 pHippy-EGFP 组比较

图 6　VSMCs MAPK 活性检测的结果

3　讨论

RNA 干扰是近来发现的一项有效的基因沉默手段,其利用短的双链 RNA(19 ~ 23 nt)来自干扰目的基因的表达,分析目的基因的相关功能,从而起到 Knock-down 的目的。有着特异、有效、容易大量制备的特点。为此我们用 RNAi 技术抑制 MAPK 的表达,研究 MAPK 信号通路对细胞因子的反应。

目前关于 RNA 干扰序列的设计还没有确切的规则,往往针对同一条基因选取多个序列。为此,我们参考相关原则,选取了针对大鼠 MAPK 的 3 段序列。在后续实验中也发现,pHippy-MAPK3 干扰效果最好。由于 RNA 合成昂贵且易降解,现在多采用短发卡 RNA(shRNA)的方式来进行 RNA 干扰实验。该方法在体外合成一段能互补形成发卡结构的 DNA 序列,其连入载体后,能利用载体上的 pol Ⅲ类 RNA 聚合酶启动子转录生成发卡结构的 RNA(shRNA),进而在细胞内发挥类似 siRNA 的作用。本研究中,我们利用相向转录的 2 个 pol Ⅲ类 RNA 聚合酶启动子,以同一段

DNA为模板,转录生成互补的两段RNA,进而发挥siRNA的作用。与shRNA的方法相比,双向启动子的方法生成的是直接互补的两段RNA,不带发卡结构,更贴近与siRNA的作用;双向启动子的方法只须合成较短的碱基序列(23~25 bp),序列中没有发卡结构,更利于合成和连接到载体上,而shRNA的方法往往要合成较长序列(60 bp左右),且序列中需要发卡结构,给后续的退火、连接带来一定难度。发卡结构的存在也使构建成功的载体不易测序验证,且在某些常用工程菌中存在载体稳定性的问题[6,7]。干扰载体能较好、较广泛地转移干扰转录框,还能有效的抑制靶基因的作用,为研究目的基因的功能提供了有效的手段[8]。

参考文献:

[1] Cheng J, Du J. Mechanical stretch simulates proliferation of venous smooth muscle cells through activation of the insulin-like growth factor-1 receptor[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27(8): 1744-1751.

[2] Giannattasio C, Mancia G. Arterial distensibility in humans. Modulating mechanisms, alterations in diseases and effects of treatment[J]. J Hypertens, 2002, 20(10): 1889-1899.

[3] Cho A, Graves J, Reidy M A. Mitogen-activated protein kinases mediate matrix metalloproteinase-9 expression in vascular smooth muscle cells [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20(12): 2527-2532.

[4] MacKenzie C J, Wakefield J M, Cairns F, *et al*. Regulation of glucose transport in aortic smooth muscle cells by cAMP and cGMP[J]. Biochem J, 2001, 353(Pt 3): 513-519.

[5] Gennaro G, Menard C, Michaud S E, *et al*. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation in injured arteries by a novel, oral mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase inhibitor[J]. Circulation, 2004, 110(21): 3367-3371.

[6] 王旭开, 王 燕, 何作云, 等. MAPK对胰岛素介导的人血管平滑肌细胞PKCα的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 1999, 15(4): 346-349.

[7] Jian R, Peng T, Deng S, *et al*. A simple strategy for generation of gene knockdown constructs with convergent H1 and U6 promoters[J]. Eur J Cell Biol, 2006, 85(5): 433-440.

[8] Chen M, Zhang L, Zhang H Y, *et al*. A universal plasmid library encoding all permutations of small interfering RNA[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(7): 2356-2361.

(编辑 吴培红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2009)01-0078-01

卵巢多囊性间皮瘤1例

李培峰[1],李 懿[2],王 涛[1] ([1]解放军第89医院病理科,山东 潍坊 261000;[2]第三军医大学西南医院病理学研究所,重庆 400038)

患者,女性,35岁,因"痛经进行性加重伴月经量增多6年,查体发现子宫肌瘤5年"入院,欲行全子宫切除术。B超示右侧卵巢区—6.5 cm×2.7 cm混合性包块,内透声差,可见条带状分割,未见血流信号。诊断:右卵巢区混合性包块。血CA125:142.3 U/ml(参考值0~50 U/ml)。行全子宫切除及右侧卵巢部分切除术。术中见右侧卵巢表面附着成簇大小不等的葡萄样透明囊泡组织,体积6 cm×3 cm×2.5 cm,囊泡直径0.2~2 cm,囊壁较薄,腔内充以清亮液体。镜检:肿瘤位于卵巢表面,由大小不等的囊腔和结缔组织构成,囊壁内衬单层扁平或立方间皮细胞,细胞分化良好,局部形成小乳头状突起,囊壁疏松的纤维结缔组织由成熟的胶原纤维和毛细血管构成,少量炎细胞浸润,肿瘤局部向卵巢内浸润性生长(图1)。免疫组化:Calretinin(+),广谱细胞角蛋白(+),上皮膜抗原EMA(+),Vimentin(+)(图2)。病理诊断:右侧卵巢多囊性间皮瘤。患者同时患有子宫多发性平滑肌瘤、子宫内膜息肉、右侧输卵管子宫内膜异位,均经病理证实。随访10个月肿瘤无复发。

作者简介:李培峰,男,山东省东营市人,医师,主要从事妇科肿瘤诊断方面的研究,发表论文9篇。电话:(0536)8439196,E-mail: lipeifeng00@sina.com

收稿日期:2008-07-06;修回日期:2008-07-17

讨论

多囊性间皮瘤(multicystic mesothelioma)是一种极少见的间皮源性肿瘤。该病多发生于生育期女性,腹膜多见,发生在卵巢者非常罕见。一般认为该病属肿瘤性病变[1],因其缓慢侵袭性生长特性和高复发潜能,仅个别导致死亡,故认为其生物学性质为交界性或低度恶性[2,3]。本例肿瘤向卵巢内浸润性生长,支持此观点。患者多无明显症状,查体或因其他手术时偶然发现;也可表现为无任何诱因的腹部间断性弥漫性隐痛或不适,或因肠道部分性梗阻而产生腹胀、恶心、呕吐等症状。本例患者因子宫肌瘤术前查体发现,没有特异性症状。B超、CT、MRI检查常提示多发性囊性肿块,很难与其他囊性或非囊性病变鉴别。

肿瘤大体上呈大小不等的囊性结节,小者呈水泡样或葡萄样,部分囊泡可融合成大的囊肿,囊腔内充以清亮或微黄色液体,囊内壁光滑,局部可呈斑块状增厚或形成小乳头状突起,镜下主要由大小不等的囊腔和纤维结缔组织分隔构成,囊壁内衬单层扁平或立方间皮细胞,少数病例细胞发生鳞化,细胞无明显异型,核分裂相罕见,有报道极少数肿瘤多次复发后,细胞出

(下转84页)