·论 著·

小鼠微小 RNA miR-21 真核表达载体构建及其在 293 细胞的活性表达

龙 爽,粟永萍,任 洞,孙慧勤,王 涛 (第三军医大学预防医学院全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆市纳米医药工程技术研究中心,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 构建小鼠微小 RNA miR-21 的真核表达载体,在人胚肾 293 细胞中验证其活性表达,为进一步以此载体研究 miR-21 的功能打下基础。**方法** 根据小鼠 miR-21 的成熟序列及其上下游约 170 bp 的序列设计引物,利用 PCR 技术从小鼠基因组 DNA 扩增含有 miR-21 前体的片段 382 bp,克隆到质粒 pRc/CMV,对重组质粒经双酶切及测序分析,鉴定完全正确后转染人胚肾 293 细胞,G418(1 000 mg/L)筛选后获得 miR-21 稳定表达细胞系, Northern blot 验证其在 293 细胞的过表达;同时构建 pmiR-21-Luc reporter 荧光素酶报告质粒,与 miR-21 重组质粒共转染 293 细胞进行荧光素酶活性分析,验证其调控活性。**结果** 成功构建小鼠 miR-21 的真核表达载体,其可以在 293 细胞中稳定高效表达,荧光素酶活性实验证实其有生物活性。**结论** 成功构建小鼠 miR-21 的真核表达载体,为进一步探讨 miR-21 的生物学功能奠定了实验基础。

[关键词] miRNAs;miR-21;真核表达载体;293 细胞

[中图分类号] R394-33;R394.3;Q782 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2014)02-0111-04

Construction of eukaryotic expression vector of mouse microRNA miR-21 and identification its expression activity in 293 cells

LONG Shuang, SU Yong-ping, REN Jiong, SUN Hui-qin, WANG Tao (Institute of Combined Injury, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Chongqing Engineering Research Center for Nanomedicine, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct the eukaryotic expression vector for mouse microRNA miR-21 and identification its expression activity in 293 cells. **Methods** The genomic sequence containing pre-miR-21 was amplified from mouse genomic DNA by PCR and cloned into the pRC/CMV plasmid. The constructed recombinant plasmid pRC/CMV-mmu-miR-21 was transfected to 293 cells by lipofectamine 2000, and the stably transfected cells were screened with G418, from which total RNA was extracted for detecting the expression of mature miR-21 by northern blot. In the meantime, a luciferase report plasmid examing the activity of miR-21 named pmiR-21-Luc reporter was also constructed, and luciferase activity analysis indicated the product of pRC/CMV-mmu-miR-21 indeed had biological activity. **Results** Both restriction enzyme digestion analysis and sequencing proved the recombinant plasmids were constructed correctly. The miR-21 was highly expressed in the screened clones of 293 cells and it had good biological activity. **Conclusion** The eukaryotic expression plasmid of mouse miR-21 was successfully constructed, which laid the foundation of further investigation of the role of miR-21 during skin wound healing.

Keywords: miRNAs;miR-21;eukaryotic expression vector;293 cells

微小 RNAs(microRNAs, miRNAs)是一类由基因组编码的长度约 20 nt 的高度保守的内源性微小的非编码单链 RNA 分子,通过与对应的靶 mRNA 的 3'非翻译区(3' untranslated region,3'UTR)的非完全或完全配对结合,从而阻止其翻译或破坏其稳定性,实现对基因表达的调控[1]。越来越多的研究表明,miRNAs 参与了细胞增殖、凋亡、分化等众多基础生物学事件,是一类重要的调控分子,其在创伤修复中的作用也越来越受到重视[2-3]。我们和其他学者均发现,miR-21 在皮肤创伤愈合过程中表达上调,创面局部抑制其表达能够显著削弱愈合的速度与质量,证实其是创伤促愈的重要分子,也提示其可能是促进创伤愈合的新的治疗靶点[4-5]。为进一步研究 miR-21 作为潜在治疗靶点的可行性,本研究构建了 miR-21 真核表达质粒,为后续使用其进行创面局部干预治疗奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pRc/CMV、pMIR-Reporter、β-半乳糖苷酶质粒、大肠杆

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201402001

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30901558);烧伤、创伤与复合伤国家重点实验室自主课题(SKLZZ201122)

[通讯作者] 王 涛,E-mail:wangtmmu@hotmail.com

[收稿日期] 2014-01-11 [修回日期] 2014-02-12

菌 DH5α 和 293 细胞由本所保存。快速质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、β 半乳糖苷酶检测试剂盒和荧光素酶活性检测试剂盒购于 Promega 公司,基因组 DNA 提取试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒为 Omega 公司产品。限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶、总 RNA 提取试剂 RNAiso 购自 TaKaRa 公司,引物和探针由上海英骏公司合成,Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司。尼龙膜为 Roche 公司产品,杂交液购自 Clontech。

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物的设计与合成 根据 Sanger miRBase 数据库所提供的含有 miR-21 前体序列(pre-miR-21)的小鼠基因组序列,针对 pre-miR-21 上游 154 bp 和下游 136 bp 之间的 382 bp 的区域设计引物,并在引物上引入末端的保护性碱基、Hind Ⅲ和 Xba Ⅰ的酶切位点(下划线序列)。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。引物序列如下:F:5'-CCCAAGCTTCCCTGTTCATTTTGTTTTGC-3'; R: 5'-TGCTCTAGA CTTGATACTGCTGCTGTTGT-3'。

1.2.2 PCR 扩增 取 C57 小鼠 1 只,剪取尾部组织,依照试剂盒说明提取全基因组 DNA。以小鼠基因组 DNA 为模板,行 PCR 扩增,得到约 390 bp 的目的片段,退火温度为 50 ℃。

1.2.3 真核表达载体 pRC/CMV-mmu-miR-21 构建与鉴定 以 Hind Ⅲ和 Xba Ⅰ对质粒 pRC/CMV 行双酶切,酶切后对产物进行胶回收。同时对 PCR 扩增的 mmu-miR-21 基因的产物以 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化后也以 Hind Ⅲ和 Xba Ⅰ双酶切,酶切后重复进行产物纯化。将酶切纯化后的 pRC/CMV 和 mmu-miR-21PCR 片段以 T4DNA 连接酶 16 ℃连接过夜,电转法转入 *E. coli* DH5α 感受态细菌,LB 平板筛选氨苄青霉素抗性克隆,菌落 PCR 初步鉴定阳性克隆,Hind Ⅲ/Xba Ⅰ双酶切鉴定后送测序进一步证实。

1.2.4 pmiR-21-Luc reporter 荧光素酶报告质粒的构建 合成含有与 miR-21 分子完全互补的寡核苷酸序列,F:5'-CAATGCACTAGTTCAACATCAGTCTGATAAGCTAgctcagcAATGCA-3'; R:5'-AGCTTGCATTgctgagcTAGC TTATCA GACTGATGTTGAACTAGTGCATTGAGCT-3'。正向序列下划线为其与成熟的 miR-206 分子完全互补的 DNA 序列;小写字母序列为引入的 Blp I 酶切位点序列,以便于连接成功后的鉴定;反向序列与正向除完全互补外,在两端引入了 Sac I 和 Hind Ⅲ突出的酶切位点序列,以斜体大写字母表示。以 Sac I 和 Hind Ⅲ对 pMIR-Reporter 质粒进行双酶切而后纯化回收与寡核苷酸退火产物以 T4DNA 连接酶 16 ℃连接过夜,电转法转入 *E. coli* DH5α 感受态细菌,LB 平板筛选氨苄青霉素抗性克隆,Hind Ⅲ/Xba Ⅰ双酶切鉴定后送测序进一步证实。

1.2.5 细胞转染与稳定克隆的筛选 人胚肾 293 细胞,在含 10% 新生牛血清的 DMEM 高糖培养基中于 37 ℃、5% CO_2 的孵箱中培养。转染前 24 h 以胰酶消化 293 细胞,计数后以每孔 1×10^5 的数目接种于 24 孔板内。转染按照 Lipofectamine 2 000 的说明书进行,分别转染 pRC/CMV 空载体和 pRC/CMV-mmu-miR-21 等 2 个组别。转染后 6 h,更换其完全培养基。转染后 24 h,换以含 G418(1 000 ug/mL)的筛选培养基进行筛选,3 周后获得稳定细胞系,扩大培养。

1.2.6 稳定转染 293 细胞 miR-21 的 Northern blot 检测 转染后获得的稳定细胞系用 RNAiso 裂解,提取总 RNA 具体方法参照说明书进行。DNA 探针序列 miR-21:5'-TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-3',采用地高辛在 3'末端标记探针。取 20 μg 总 RNA 上样,行 20% 尿素变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,半干转印恒流 0.4 A 转尼龙膜 1 h。紫外交联 1 200 μJ/min,而后 80 ℃烘烤 1 h,加入探针后于 42 ℃杂交过夜。洗膜后以含 5% 脱脂奶粉的 PBST 封闭 1 h,碱性磷酸酶(AP)标记的地高辛抗体 1 :1 000 在 37 ℃孵育 2 h,NBT/BCIP 系统进行显色。

1.2.7 重组 miR-21 真核表达质粒的荧光素酶活性检测 收集培养的 293 细胞,转染前 1 d 铺 24 孔板,培养 24 h 后将对照空质粒与重组 miR-21 表达质粒(每孔 200 ng)分别与 pmiR-21-Luc reporter 和 β-半乳糖苷酶质粒(每孔 100 ng)进行共转染,设 3 个复空。转染后 24 h 弃去细胞培养液,PBS 洗 2 次,每空加入细胞裂解液 150 μl,充分裂解细胞后,按照说明书分别进行样品的荧光素酶活性和 β-半乳糖苷酶活性测定。计算荧光素酶/β-半乳糖苷酶活性活性比值(Luc/β-gal),以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,以空质粒对照组活性为 100%,计算重组 miR-21 真核表达质粒的相对荧光素酶活性。

1.2.8 统计学处理 数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,进行单因素方差分析,检验水准以 $P<0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 扩增含有 pre-miR-21 的基因组片段

以小鼠基因组 DNA 为模板进行 miR-21 前体对应的基因组片段扩增,PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳,在 390 bp 处有一清晰特异扩增条带,片段大小与预测长度相符(图 1)。

2.2 重组质粒 pRC/CMV-mmu-miR-21 构建

Hind Ⅲ/Xba Ⅰ双酶切 pRC/CMV-mmu-miR-21 重组载体,1% 琼脂糖凝胶电泳,可见大小约为 0.4 kb 和 5.5 kb 片段。其中 0.4 kb 片段为含有 miR-21 的前体片段,5.5 kb 片段为 pRC/CMV 载体,经测序证实插入片段与预测结果完全相符(图 2)。

2.3 重组 pmiR-21-Luc reporter 荧光素酶报告质粒构建

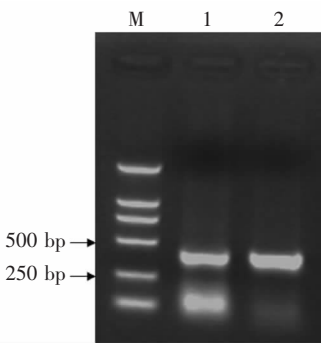
回收 Sac I/Hind Ⅲ双酶 pMIR-Reporter 质粒的产物与前述寡核苷酸的退火产物进行连接后电转感受态菌,涂氨苄青霉素抗性 LB 平板后培养挑取克隆摇菌。对所得的克隆行 Blp I 单酶切可见阳性克隆能够被成功线性化,出现大小约 6 500 bp 的条带(图 3)。进一步测序证实插入片段与预期设计完全相符。

2.4 稳定转染 pRC/CMV-mmu-miR-21 的 293 细胞 miR-21 表达的 Northern blot 鉴定

对稳定转染 pRC/CMV 空载体和 pRC/CMV-mmu-miR-21 重组质粒的 293 细胞提取总 RNA,行 Northern blot 检测miR-21。结果显示:转染 pRC/CMV 空载体的 293 细胞没有杂交信号,而转染 pRC/CMV-mmu-miR-21 重组质粒的 293 细胞中可见明显而特异的杂交条带(图 4)。

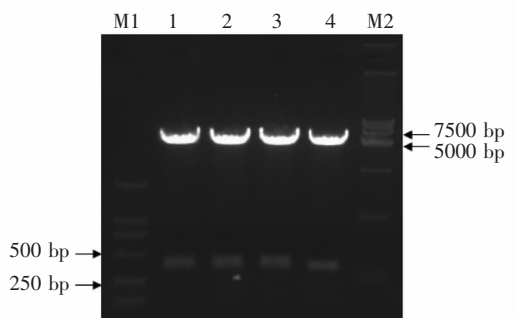
2.5 pRC/CMV-mmu-miR-21 介导的 miR-21 过表达能够调控报告质粒的荧光素酶活性

在荧光素酶基因的 3' UTR 插入与 miR-21 完全互补的序列成功构建 pmiR-21-Luc reporter 报告基因质粒后，通过与 miR-21真核表达质粒共转染 293 细胞，进而检测荧光素酶活性变化，发现过表达的 miR-21 可以通过识别这一位点进而对荧光素酶的活性起到抑制作用，降低为空质粒对照组的 29.19%（$P=0.000\ 12$），差异显著，表明 miR-21 真核表达质粒在 293 细胞中的产物具有生物活性（图 5）。



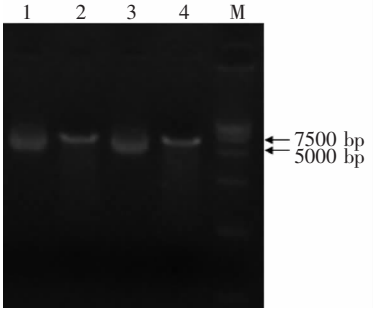
M：DL2000 marker；1、2：miR-21 前体片段 PCR 产物

图 1 miR-21 对应小鼠基因组片段 PCR 产物扩增



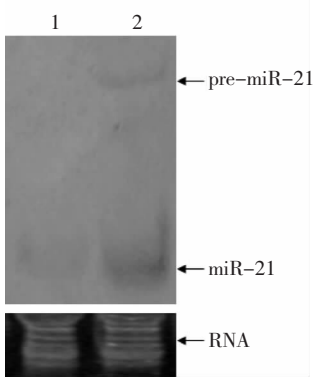
M1：DL2000；M2：DL15000；1-4：Hind Ⅲ/Xba Ⅰ 双酶切阳性克隆

图 2 重组质粒 pRC/CMV-mmu-miR-21 的双酶切鉴定



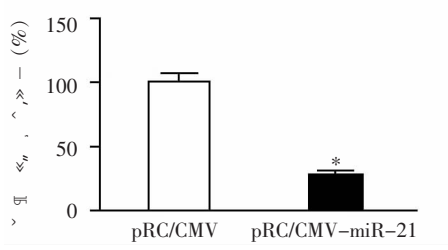
M：DL15000；1-4：BlpI 单酶切质粒；1、3：未重组质粒；2、4：重组质粒

图 3 重组质粒 pmiR-21-Luc reporter 的酶切鉴定



1：空载体对照；2：pRC/CMV-mmu-miR-21 转染组

图 4 稳定表达 pRC/CMV-mmu-miR-21 的 293 细胞中 miR-21 表达的 Northern blot 鉴定



20140089 `œ, <5

*：与空质粒对照组（pRC/CMV）比较，$P<0.01$

图 5 pRC/CMV-mmu-miR-21 下调荧光素酶报告基因的活性

3 讨论

miR-21 是进化非常保守的一个 miRNA 分子，在小鼠定位于 11 号染色体，位于穿膜蛋白基因 TMEM49 的 3' UTR 区域。众多研究表明，miR-21 具有促进细胞增殖与迁移、抑制细胞凋亡等重要功能，由于其在胶质瘤、乳腺癌、结肠癌、肝癌等多种肿瘤组织高表达，因此认为其是一重要的癌基因[6-8]。目前已鉴定出的 miR-21 分子的靶基因包括 PTEN、PDCD4、TPM1 等，这些靶基因多属于抑癌基因，能够抑制细胞增殖、移行，促进凋亡[9-11]。

我们前期进行了小鼠正常皮肤和全层皮肤切割伤修复早期组织的 miRNAs 表达谱差异分析，发现并验证 miR-21 分子在损伤后上调非常明显，原位杂交显示其在损伤修复细胞呈广谱的上调表达，推测其作为癌基因在损伤后上调表达可能具有重要的促进愈合的生理功能。后续的研究发现，创面局部抑制 miR-21 分子的表达能够显著抑制创面的愈合，会明显延迟创面早期收缩、再上皮化和胶原的后期沉积，表明其是创面愈合的重要促愈分子[5]。其他的研究也相互印证地表

明 miR-21 在创伤愈合中的重要作用[4,12]。然而,亦有学者认为, miR-21 在静脉曲张难愈性创面表达上调,参与了创面难愈的发生[13]。这种截然相反的结论是实验动物种属的差别所致,还是实验材料的不同所致,很有理清的必要。我们认为其在损伤后的广谱表达上调,抑制后的修复延迟,都提示 miR-21 具有作为促愈靶点的潜力。而创面直接注射裸质粒是一种有效的实验性促愈效应观察手段,为此我们构建了 miR-21 的真核表达载体。

作为内源性分子的 miRNAs 通常是通过 pol-Ⅱ启动子启动转录,进而经过复杂的剪切加工才形成成熟的单链功能分子[14-15]。但利用人工的 shRNA 的质粒骨架,引入类似于 siRNA 的较短设计序列也可以实现 miRNA 产物的高效加工表达[16]。然而,作为内源性调控分子的 miRNAs 的加工有其特殊性,这一点在 miR-21 分子的表现很明显,miR-21 分子的表达除了受到转录调控外,还存在 TGF-/Smad 通路的转录后调控[17]。考虑到后续创面研究的实际情况,存在创面大量 TGF-β 分子的表达[18-20]。因此本研究选择了带有 CMV 启动子的 pRc/CMV 质粒。我们将含有 pre-miR-21 片段的大约 400 bp 的 PCR 产物克隆到该真核表达载体,经酶切鉴定和测序验证,成功构建了重组质粒。然而,其能否成功表达成熟的 miR-21 产物还需要验证,因为转录出的序列的正确加工有赖于其与周围序列相互作用的结构,克隆产物未必一定能加工出成熟 miR-21 的分子。为此我们进行了后续的鉴定工作,将重组真核表达质粒转染到 293 细胞,经培养基中 G418 的筛选压力获得持续稳定表达的细胞,进而通过 Northern blot 检测到其确实高效表达了成熟的 miR-21 分子。miRNA 的作用方式主要是与靶 mRNA 分子的 3'非翻译区(3'UTR)结合,从而导致靶 mRNA 的降解或抑制它的翻译。我们进一步通过荧光素酶报告基因活性分析,确认该质粒表达的 miR-21 可以抑制报告基因的活性,表明其具有功能。这些工作为后续在皮肤创面研究 miR-21 的功能和以其为靶点的促愈策略初步奠定了基础。

[参考文献]

[1] Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing[J]. Cell, 2003, 113(6): 673 – 676.

[2] Roy S, Sen CK. miRNA in wound inflammation and angiogenesis[J]. Microcirculation, 2012, 19 (3): 224 – 232.

[3] Bostjancic E, Glavac D. Importance of microRNAs in skin morphogenesis and diseases[J]. Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat, 2008, 17 (3): 95 – 102.

[4] Yang X, Wang J, Guo SL, et al. miR-21 promotes keratinocyte migration and re-epithelialization during wound healing[J]. Int J Biol Sci, 2011, 7 (5): 685 – 690.

[5] Wang T, Feng Y, Sun H, et al. miR-21 regulates skin wound healing by targeting multiple aspects of the healing process[J]. Am J Pathol, 2012, 181(6): 1911 – 1920.

[6] Nair VS, Maeda LS, Ioannidis JP. Clinical outcome prediction by microRNAs in human cancer: a systematic review[J]. J Natl Cancer Inst, 2012, 104(7): 528 – 540.

[7] Moore LM, Zhang W. Targeting miR-21 in glioma: a small RNA with big potential[J]. Expert Opin Ther Targets, 2010, 14(11): 1247 – 1257.

[8] Xiong B, Cheng Y, Ma L, et al. MiR-21 regulates biological behavior through the PTEN/PI-3 K/Akt signaling pathway in human colorectal cancer cells[J]. Int J Oncol, 2013, 42(1): 219 – 228.

[9] Qi L, Bart J, Tan LP, et al. Expression of miR-21 and its targets (PTEN, PDCD4, TM1) in flat epithelial atypia of the breast in relation to ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma[J]. BMC Cancer, 2009, 9: 163.

[10] Wang T, Zhang L, Shi C, et al. TGF-beta-induced miR-21 negatively regulates the antiproliferative activity but has no effect on EMT of TGF-beta in HaCaT cells[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(2): 366 – 376.

[11] Das A, Ganesh K, Khanna S, et al. Engulfment of apoptotic cells by macrophages: a role of microRNA-21 in the resolution of wound inflammation[J]. J Immunol, 2014, 192(3): 1120 – 1129.

[12] Madhyastha R, Madhyastha H, Nakajima Y, et al. MicroRNA signature in diabetic wound healing: promotive role of miR-21 in fibroblast migration[J]. Int Wound J, 2012, 9(4): 355 – 361.

[13] Pastar I, Khan AA, Stojadinovic O, et al. Induction of specific microRNAs inhibits cutaneous wound healing[J]. J Biol Chem, 2012, 287 (35): 29324 – 29335.

[14] Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors[J]. Mol Cell, 2004, 16(6): 861 – 865.

[15] Zeng Y, Cullen BR. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells [J]. RNA, 2003, 9(1): 112 – 123.

[16] Wu J, Bonsra AN, Du G. pSM155 and pSM30 vectors for miRNA and shRNA expression[J]. Methods Mol Biol, 2009, 487(2): 205 – 219.

[17] Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, et al. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation[J]. Nature, 2008, 454(7200): 56 – 61.

[18] Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines[J]. Physiol Rev, 2003, 83(3): 835 – 870.

[19] Cross KJ, Mustoe TA. Growth factors in wound healing[J]. Surg Clin North Am, 2003, 83(3): 531 – 545.

[20] Grazul-Bilska AT, Johnson ML, Bilski JJ, et al. Wound healing: the role of growth factors[J]. Drugs Today (Barc), 2003, 39(10): 787 – 800.

(编辑:周小林)