基础研究 文章编号:0253-3626(2009)12-1617-05

miRNA-451 表达质粒的构建及其对 iNOS 基因表达的抑制

李春蕾[1,2],何晓燕[1,2],彭琼乐[1,2],张 政[1,2],武卫华[2],彭惠民[1,3]

(1. 重庆医科大学基础医学院细胞生物学及遗传学教研室;2. 重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心;3. 重庆医科大学实验教学管理中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 miRNA-451 对肾小球系膜细胞中诱导型一氧化氮合酶(Inducible nitric oxide synthase,iNOS)基因表达的影响。方法:依据 miRBase 数据库中 mmu-miR-451 序列,设计两条寡核苷酸片段,退火处理后克隆至 pGenesil-1 质粒,构建 pGenesil-1-miRNA-451 质粒及阴性对照质粒 pGenesil-1-control。将 pGenesil-1-miRNA-451 及 pGenesil-1-control 质粒分别转染小鼠肾小球系膜细胞,经 G418 筛选,建立稳定表达 pGenesil-1-miRNA-451 及 pGenesil-1-control 的细胞株。采用 MTT 比色法检测活细胞数并绘制生长曲线;RT-PCR、Western blot 及免疫细胞化学检测 iNOS 基因表达的差异。结果:经测序证实重组质粒构建成功,与未处理的小鼠肾小球系膜细胞和稳定表达 pGenesil-1-control 的细胞相比,在稳定表达 pGenesil-1-miRNA-451 的小鼠肾小球系膜细胞中,细胞增殖受到抑制,iNOS 基因的蛋白表达明显受到抑制,而 iNOS 基因的 mRNA 水平无明显变化。结论:miRNA-451 在翻译水平抑制了 iNOS 基因的表达,并对小鼠肾小球系膜细胞生长具有显著的抑制作用。

【关键词】miRNA-451;iNOS 基因;肾小球系膜细胞;基因表达

【中国图书分类法分类号】R587.23; Q78 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-08-31

Construction of miRNA-451 expression plasmid and its inhibitory effect on the expression of iNOS gene

LI Chun-lei, et al

(*Department of Cell Biology and Genetics, College of Basic Medicine Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To elucidate the effect of miRNA-451 on the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene in the mesangial cells of mice. *Methods*: Two template DNA sequences were designed based on mmu-miR-451 sequence in miRBase database. The mmu-miR-451 expression plasmid and a control plasmid, named pGenesil-1-miRNA-451 and pGeneil-1-control respectively, were generated by the cloning of annealed oligonucleotides into pGenesil-1, then transfected into mesangial cells, which were stably selected by G418 to establish mesangial cell lines stablely expressing pGenesil-1-miRNA-451 and pGenesil-1-control. The living cells were counted by MTT assay and cell growth curves were drew to analyze the cell proliferation. The iNOS mRNA level was assessed by RT-PCR. The expression of iNOS protein was determined by Western blot and immunocytochemistry. *Results*: The recombinant vectors were verified by sequencing. The cell growth curves indicated the proliferation of cells transfected with pGenesil-1-miRNA-451 were inhibited significantly, compared with that of cells transfected with pGenesil-control and cells without treatments. RT-PCR analysis showed the levels of iNOS mRNA were almost unchanged in the cells with or without treatments. Western blot and immunocytochemistry demonstrated a significant decrease of iNOS protein levels in the cells transfected with pGenesil-1-miRNA-451, but not in the cells transfected with pGenesil-1-control, when compared with mesangial cells. *Conclusion*: miRNA-451 repressed the expression of iNOS gene translationly, and significantly inhibited cell growth.

【Key words】MiRNA-451; iNOS gene; Mesangial cell; Gene expression

microRNA(miRNA)作为一类进化上非常保守的内源性非编码单链小 RNA 分子,广泛存在于哺乳动物体内,长度约为 21~23 nt,通过与靶 mRNA 的 3'非翻译区(3'UTR)序列不完全配对的方式对相应的蛋白编码基因进行转录后水平调控[1,2]。目前有多项研究显示 miRNA 与糖尿病及其并发症关系密切[3,4]。本课题前期工作从肾脏特异性 miRNA 为切入点,采用 miRNA 芯片筛查早期糖尿病肾病 db/db 小鼠和正常对照 db/m 小鼠肾脏组织 miRNA 差异

作者介绍:李春蕾(1977-)女,硕士,

研究方向:miRNA 在糖尿病肾病中的分子机制。

通讯作者:彭惠民,男,教授,E-mail:phm614@qq.com。

基金项目:国家自然科学基金(编号:30800534)。

表达谱,发现表达差异显著的有 66 个 miRNA[5],其中 miRNA-451 经过 real-time RT-PCR 验证,在糖尿病肾病(Diabetic nephropathy,DN)组低表达,提示miRNA-451 可能参与早期 2 型糖尿病肾病的发生。利用 miRBase Target 数据库对 miRNA-451 的靶基因进行预测的过程中,我们发现诱导型一氧化氮合酶(Inducible nitric oxide synthase,iNOS)基因是 miRNA-451 可能的靶基因之一,而已有的文献报道 iNOS 基因与 DN 中肾小球病变关系密切[6]。为进一步研究 miRNA-451 在 DN 发生发展过程中的作用,本实验通过构建 pGenesil-1-miRNA-451 的真核表达载体,并转染到小鼠肾小球系膜细胞(Mesangial cell, MC)中,观察上调 miRNA-451 对 MC 的增殖及 iNOS 基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株及细胞 pGenesil-1 载体购自武汉晶赛公司;E.coli DH5α 由本室保存;小鼠肾小球系膜细胞株购自湘雅医学院细胞中心。

1.1.2 试剂 T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶、质粒抽提、胶回收试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司;脂质体转染试剂 LipofectamineTM 2000 和 RNArose 购自 Invitrogen 公司;兔抗人 iNOS 及鼠抗人 β-actin 多抗购自 Santa Cruz 公司,HRP 标记的羊抗兔 IgG 及羊抗鼠 IgG、兔 SP 检测试剂盒及 DAB 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;化学发光检测试剂盒购自天根生物技术有限公司;蛋白裂解液及 BCA 蛋白定量试剂盒购自碧云天生物技术公司;PVDF 膜(0.22 μm)购自 Millipore 公司;其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 miRNA-451 表达质粒及其对照质粒的构建及鉴定

1.2.1.1 miRNA-451 转录模板 DNA 链的设计 参照文献[7],略有改动,依据 miRBase 数据库中 mmu-miR-451 序列,设计两条寡核苷酸片段,同时设计一对随机对照单链寡核苷酸片断,其顺序为:*BamH* Ⅰ酶切位点,成熟 miRNA 相应的寡核苷酸序列,RNA 聚合酶Ⅲ转录终止序列(polyT),*Sal* Ⅰ酶切位点(用于后续的酶切鉴定),*Hind*Ⅲ酶切位点。其序列为:miRNA-451-sense:5'-GATCCCCAAACCGTTACCATTACTGAGTTTTTTTTGTCGACA-3',miRNA-451-antisense:5'-AGCTTGTCGACAAAAAAAAACTCAGTAATGGTAACGGTTTGGG-3';control-sense:5'-GATCCCCCCGAAATTAGCCTATTTAAGCTTTTTTTGTCGACA-3',control-antisense:5'-AGCTTGTCGACAAAAAAAGCTTAAATAGGCTAATTTCGGGGG-3',由上海生工生物工程公司合成。

1.2.1.2 miRNA-451 重组质粒及其对照质粒的构建 pGensil-1 质粒,其 RNA 聚合酶Ⅲ启动子为人 U6 启动子,抗性标记为卡那霉素。DNA 单链模板退火后,用 T4 连接酶将其与经 *BamH* Ⅰ和 *Hind*Ⅲ双酶切的线性 pGensil-1 空载体进行连接,用大肠杆菌 DH5α 感受态细胞转化,筛选卡那霉素抗性克隆。

1.2.1.3 miRNA-451 重组质粒及其对照质粒的鉴定及测序 分别用限制性内切酶 *Sal* Ⅰ和 *Pst* Ⅰ进行单酶切鉴定,由于合成的寡核苷酸片段中有一个 *Sal* Ⅰ酶切位点,pGensil-1 质粒上也有一个 *Sal* Ⅰ酶切位点,因此用 *Sal* Ⅰ酶切时应该能切下一个约 350 bp 的小片段,而 *Pst* Ⅰ酶切则不能,电泳观察酶切片段的分子量大小初步鉴定,然后送重庆医科大学感染性疾病教育部重点实验室测序,测序正确的重组质粒分别命名为 pGenesil-1-miRNA-451 及 pGenesil-1-control,其中 pGenesil-1-control 为阴性对照质粒。

1.2.2 细胞培养及稳定转染 用含 15%小牛血清的 DMEM 高糖培养基,于 37℃,5%CO_2 的培养箱中培养 MC。转染前 24 h 以每孔 1×10^5 个细胞接种 6 孔培养板,细胞汇合度达 70%左右时,利用 LipofectamineTM2000 将 pGenesil-1-miRNA-451 和 pGenesil-1-control 分别转染小鼠肾小球系膜细胞,转染 24 h 后,更换为选择性培养基(含 600 μg/ml G418 和 15%小牛血清的 DMEM 高糖培养基)进行培养,隔天换液。2 周后出现抗性克隆,挑单克隆再以 400 μg/ml 维持量的 G418 扩大培养,建立稳定转染的细胞系。稳定转染细胞系分别命名为 MC-miRNA-451 细胞及 MC-control 细胞。

1.2.3 噻唑蓝(MTT)比色试验 取对数生长期未转染质粒的 MC 以及稳定表达了 pGenesil-1-miRNA-451 和 pGenesil-1-control 的 MC,接种 96 孔培养板,细胞密度为每孔 2×10^3 个细胞,每组 5 孔,连续 6 d 每天取样,MTT 法测定活细胞数并绘制生长曲线,实验重复 3 次。

1.2.4 总 RNA 抽提和一步法 RT-PCR 用 RNArose 试剂分别提取未转染质粒的 MC 及稳定表达 pGenesil-1-miRNA-451 及 pGenesil-1-control 的 MC 总 RNA,采用一步法行 RT-PCR 反应。反应条件:RT 反应:50℃ 30 min,94℃ 2 min;PCR 反应:94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 1.5 min,共进行 35 个循环,最后 72℃延伸 10 min。iNOS 基因引物:上游 5'-GTGTTCCACCAGGAGATGTTG-3';下游 5'-CTCCTGCCCACTGAGTTCGTC-3',PCR 产物为 576 bp。GAPDH 为内参照,其引物为:上游 5'-GATGACATCAAGAAGGTGGTGAA-3';下游 5'-TTCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT-3',PCR 产物为 240 bp。PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳检测后,由 Bio-Rad 凝胶成像仪摄取凝胶图像,用 Quantity One 进行半定量分析。

1.2.5 蛋白提取和 Western blot 用冰预冷的 RIPA 细胞裂解液分别裂解未转染的 MC、稳定表达了 pGenesil-1-miRNA-451 及 pGenesil-1-control 的 MC,离心收集上清。BCA 法

测定蛋白浓度。取 20 μg 蛋白上样,经 6%SDS-PAGE 凝胶电泳后转膜,室温封闭 2 h,加入一抗(iNOS,1:500;β-actin,1:400),4℃过夜;TBST 洗膜 3 次后加二抗 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:1 000)37℃孵育 1 h,用 TBST 洗膜 3 次后,ECL 化学发光显色,由 Bio-Rad 凝胶成像仪摄取凝胶图像,用 Quantity One 测定其面积及灰密度值。

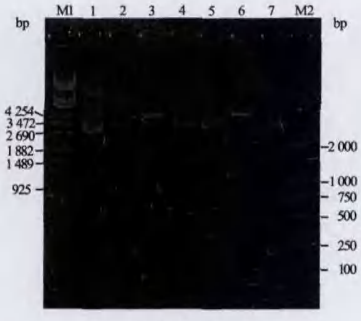
1.2.6 免疫细胞化学 取对数生长期的未转染质粒的 MC,稳定表达了 pGenesil-1-miRNA-451 及 pGenesil-1-control 的 MC,以每孔 5×10^4 个细胞分别接种于内置玻片的 24 孔板,细胞爬片 24 h 后,PBS 清洗 3 次,4%多聚甲醛固定 30 min,PBS 清洗 3 次。然后用 3%H_2O_2 孵育 10 min 去除内源性过氧化物酶;正常羊血清作用 10 min 去除非特异性结合物质;兔抗 iNOS 抗体(1:50),4℃孵育过夜。次日,用生物素标记的羊抗兔 IgG,37℃孵育 30 min;辣根酶标记链酶卵白素工作液作用 30 min;最后加入 DAB 底物显色,苏木精复染胞核。NIKON TE2000-U 型倒置显微镜 200 倍下观察。

1.2.7 统计学分析 使用 SPSS 11.5 软件进行统计分析,实验数据以均数 ± 标准差表示,多组数据的比较采用一维方差分析,以 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 pGenesil-1-miRNA-451 及 pGenesil-1-control 重组质粒的酶切鉴定与测序

重组质粒经 *Sal* Ⅰ酶切,在约 350 bp 可见一条带;而经 *Pst* Ⅰ单酶切,仅可见线性载体条带,见图 1,初步表明重组质粒构建成功。随后在重庆医科大学感染性疾病教育部重点实验室测序,测序结果如图 2 示:pGenesil-1-miRNA-451(从第 601 到第 642 个碱基序列),pGenesil-1-control(从第 477 到第 518 个碱基序列)与我们设计的寡核苷酸片段完全吻合,证实重组质粒构建成功。



M1. DNA marker λ-EcoT14 Ⅰ digest; 1. pGenesil-1; 2. pGenesil-1-miRNA-451; 3. pGenesil-1-miRNA-451 digested with *Sal* Ⅰ; 4. pGenesil-1-miRNA-451 digested with *Pst* Ⅰ; 5. pGenesil-1-control; 6. pGenesil-1-control digested with *Sal* Ⅰ; 7. pGenesil-1-control digested with *Pst* Ⅰ; M2. DNA marker DL 2 000

图 1 重组质粒 pGenesil-1-miRNA-451 及 pGenesil-1-control 的酶切鉴定

2.2 建立稳定转染 pGenesil-1-miRNA-451 及 pGenesil-1-control 的小鼠肾小球系膜细胞株

质粒转染细胞后 24 h,荧光显微镜观察荧光表达情况。转染 pGenesil-1-miRNA-451 及 pGenesil-1-control 的 MC 组,表达荧光的细胞数量较多,转染效率均高于 70%,而未转染质粒的 MC 无荧光表达,见图 3。

2.3 MTT 检测细胞增殖能力

通过对不同细胞连续 6 d 取样的 MTT 法比色测定,绘制出细胞生长曲线(图 4),转染 pGenesil-1-miRNA-451 的 MC 与未转染的 MC 细胞相比,生长速度明显减慢,而转染 pGenesil-1-control 的 MC 与未转染的 MC 细胞相比,生长速度无明显差别,表明 miRNA-451 可显著抑制 MC 细胞增殖。

2.4 RT-PCR 检测 iNOS mRNA 的表达水平

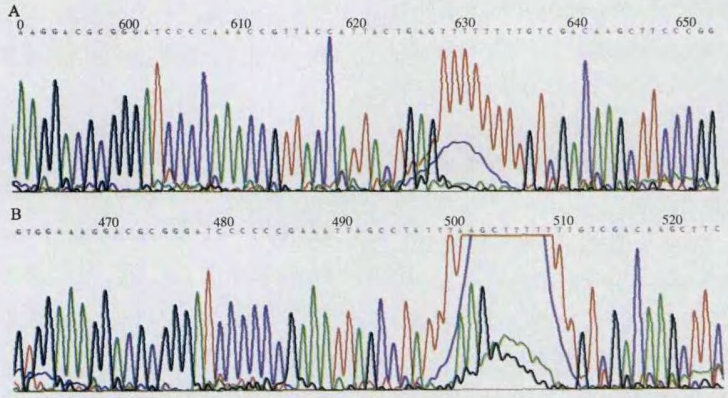
3 组细胞的 iNOS mRNA 的表达情况见图 5,与未转染和转染了 pGenesil-1-control 的 MC 相比,转染了 pGenesil-1-miRNA-451 的 MC 中 mRNA 表达水平无明显变化密度扫描半定量分析未见显著差异($P>0.05$)。

2.5 Western bolt 检测 iNOS 蛋白的表达水平

Western blot 分析显示(图 6),与未转染的小鼠肾小球系膜细胞相比,转染了 pGenesil-1-miRNA-451 的 MC 中 iNOS 蛋白的表达明显下调($P<0.01$),密度扫描半定量分析显示 iNOS 蛋白的表达降低了大约 50%,而转染了 pGenesil-1-control 的 MC 与未转染的 MC 相比,其 iNOS 蛋白的表达无明显变化($P>0.05$),表明 miRNA-451 在翻译水平抑制了的 iNOS 表达。

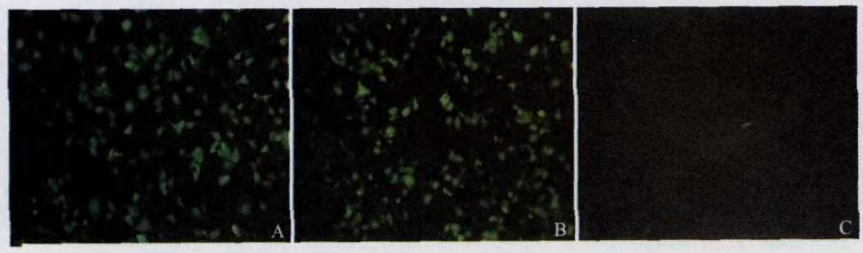
2.6 免疫细胞化学观察 iNOS 基因的表达情况

免疫细胞化学检测 iNOS 基因在 3 组细胞中的表达,结果显示未转染的 MC 和转染了 pGenesil-1-control 的 MC 均呈强阳性反应,着色部位主要位于胞浆,转染了 pGenesil-1-miRNA-451 的 MC 呈弱阳性反应(图 7)。用 Image Pro Plus 软件在 3 组细胞中分别随机选择 10 个不同视野进行半定量分析,发现在转染了 pGenesil-1-miRNA-451 的 MC 中 iNOS 蛋白水平较未转染的 MC 和转染了 pGenesil-1-control 的 MC 显著降低($P<0.01$),与 Western blot 结果一致。



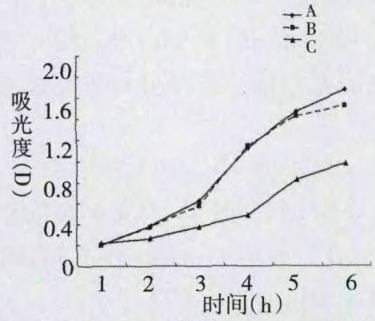
A. pGenesil-1-miRNA-451 测序图谱; B. pGenesil-1-control 测序图谱

图 2 重组质粒测序图谱



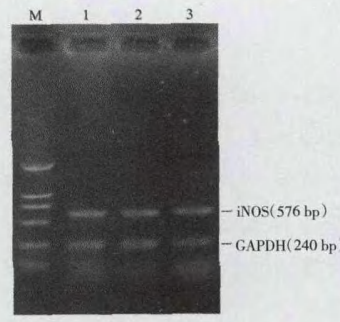
A. MC-miRNA-451 细胞; B. MC-control 细胞; C. MC

图 3 转染 24 h 荧光表达情况



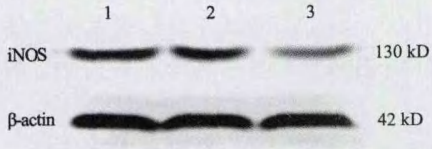
A. MC; B. MC-control 细胞; C. MC -miRNA-451 细胞

图 4 3 组细胞生长曲线



M. DNA marker DL 2 000; 1. MC; 2. MC-control 细胞; 3. MC- miRNA-451 细胞

图 5 RT-PCR 检测 iNOS mRNA 的表达



1. MC; 2. MC-control 细胞; 3. MC-miRNA-451 细胞

图 6 Western blot 检测 iNOS 的蛋白表达



A. MC; B. MC-control 细胞; C. MC-miRNA-451 细胞

图 7 免疫细胞化学检测 iNOS 表达

3 讨 论

DN 是严重的糖尿病并发症之一。越来越多的研究表明,miRNA 通过与靶基因的相互作用调控人类至少 1/3 基因的表达, 从而参与了很多生理和病理过程[8]。已报道胰岛特异性 miR-375 过度表达,可抑制小鼠胰腺 β 细胞的胰岛素分泌而导致糖尿病[3];miR-133 通过抑制 ERG 基因钾离子通道表达促进糖尿病心脏病变的发生[4]。因此,miRNA 可能参与了糖尿病及其并发症的发生发展。

本课题此前经 miRNA 芯片检测发现表达差异显著的 66 个 miRNA 中,在糖尿病肾病组 35 个呈高表达,31 个呈低表达; 其中有 7 个 miRNAs 在两组的表达量信号值较高均大于 1 000,且差异显著,

表达量信号值高提示可靠性、可重复性较好，差异显著表明与 DN 关系密切，选取这 7 个 miRNAs 进行荧光定量 RT-PCR 验证显示芯片结果可靠，这提示 miRNA 可能参与了早期 DN 的发生。本实验中我们选取在糖尿病肾病组低表达的 miRNA-451 为研究对象，根据 miRBase Target 数据库，在 miRNA-451 可能靶基因中包含 iNOS 基因。我们此前的研究发现 iNOS 基因与糖尿病肾病相关[9]，还有研究表明糖尿病大鼠早期肾组织中的 iNOS 基因表达是 DN 发病的重要诱因之一[10]。因此，本文构建 miR-451 真核表达质粒，用于考察上调小鼠 MC 中 miR-451 的表达量对 MC 增殖及 iNOS 表达的影响。

Takamizawa 等使用 pH1-RNApuro 质粒有效地上调了 miRNA 基因的表达[7]。本文选用 pGenesil-1 质粒，带有 U6 启动子、卡那霉素及新霉素抗性基因和 EGFP 基因，便于对质粒进行筛选及转染和稳定表达细胞株筛选；并证实用此方法构建的 miRNA 真核表达载体，能够有效地提高在糖尿病肾病组低表达的 miRNA 在 MC 细胞中的表达量[5]。本文经经酶切、测序证实成功构建了 pGenesil-1-miRNA-451 和 pGenesil-1-control，可用于进一步研究 miRNA-451 在早期 DN 中的生物学功能。

本文结果表明 miRNA-451 对 MC 细胞生长增殖具有显著的抑制作用，并且在翻译水平抑制了 iNOS 基因的蛋白表达。已有研究证实抑制 iNOS 可以缓解由 NO 引起的肾小球硬化[11]，中药黄芪和葛根素等对 iNOS 的表达有抑制作用且可用来治疗 DN[12,13]。从 miRNA-451 抑制 iNOS 表达的角度来讲，miRNA-451 很可能是 DN 的保护性因子。此外，其它研究也发现高表达 miR-377 可引起肾小球纤维粘连蛋白分泌的增加，从而对 DN 产生作用[14]。这说明，miRNA 的异常表达调控参与了 DN 的发生发展。

本文结果为研究 miRNA-451 在 DN 中的作用机制提供了依据；明确 miRNA-451 在 DN 中的作用可为通过干预 miRNA 表达研发 DN 防治新药奠定基础。

参 考 文 献

[1] Lai E C. MicroRNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation[J]. Nat Genet, 2002, 30(4): 363-364.

[2] Standart N, Jackson R J. MicroRNAs repress translation of m7Gppp-capped target mRNAs in vitro by inhibiting initiation and promoting deadenylation[J]. Genes Dev, 2007, 21(16): 1975-1982.

[3] Poy M N, Eliasson L, Krutzfeldt J, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion[J]. Nature, 2004, 432 (7014): 226-230.

[4] Xiao J, Luo X, Lin H, et al. MicroRNA miR-133 represses HERG K+ channel expression contributing to QT prolongation in diabetic hearts [J]. J Biol Chem, 2007, 282(17): 12363-12367.

[5] Zhang Z, Peng H, Chen J, et al. MicroRNA-21 protects from mesangial cell proliferation induced by diabetic nephropathy in db/db mice [J]. FEBS Lett, 2009, 583(12): 2009-2014.

[6] 郑 旭，罗 杰，杨文英，等.一氧化氮在糖尿病肾病中的作用[J]. 中华肾脏病杂志，1999，15(2)：91-95.

[7] Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival [J]. Cancer Res, 2004, 64(11): 3753-3756.

[8] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The C.elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14 [J]. Cell, 1993, 75(5): 843-854.

[9] 张 政，彭惠民，张素华，等.iNOS 基因(CCTTT)n 微卫星多态性与中国汉族人群糖尿病肾病的相关性研究[J].中华内分泌代谢杂志，2004，20(6)：527-528.

[10] 祁忠华，林善锬.早期糖尿病大鼠肾脏诱生型一氧化碳合酶基因表达[J].中华内分泌代谢杂志，1998，14(1)：4.

[11] 印晓星，张银娣. 糖尿病肾病的发病机理及其药物治疗[J].广东药学院学报，2004，20(5)：541-544.

[12] 祁忠华，林善锬，黄宇锋.黄芪改善糖尿病早期肾血流动力学异常的研究[J].中国糖尿病杂志，1999，7(3)：3147-149.

[13] 王秋红，张景坤，刘淑霞，等. 葛根素对糖尿病肾病大鼠肾组织中一氧化氮和诱导型一氧化氮合酶水平的影响[J].中国病理生理杂志，2009，25(1)：188-190.

[14] Wang Q, Wang Y, Minto A W, et al. MicroRNA-377 is up-regulated and can lead to increased fibronectin production in diabetic nephropathy[J]. FASEB, 2008, 22(12): 4126-4135.

(责任编辑：关蕴良)