维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2007)01-0044-04

微小 RNA 对胚胎细胞 BUB1 基因的表达抑制

施 琼[1,2],翁亚光[1],徐远久[1],蔡 燕[1],蒋洪彦[1]

(1.重庆医科大学临床检验诊断学实验室,2.基础医学院核医学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨微小 RNA 对胚胎细胞 BUB1 基因表达的调控。方法:用定量 real-time PCR 比较 microRNA 转染前后的胚胎细胞内源性基因 BUB1 mRNA 表达水平,同时用 western blot 比较转染前后 Bub1 蛋白的表达水平。结果:对照组的 BUB1 基因 mRNA 拷贝数 /GAPAH mRNA 拷贝数为 0.1960 ± 0.0688,而转染 microRNA 重组质粒后,实验组的 mRNA 比值分别为 0.1968 ± 0.0689 和 0.1962 ± 0.0670,经统计分析,两实验组细胞的内源性 BUB1 基因 mRNA 水平与对照组无显著性差异;而蛋白水平在转染后均有明显降低。结论:microRNA 主要在翻译水平调节哺乳动物细胞内基因的表达,为研究基因表达的调控机制奠定了良好的基础。

【关键词】微小 RNA;BUB1 基因;定量 RT-PCR

【中国图书分类法分类号】R394.2;Q343.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-10-30

Expression of BUB1 gene in trophoblastic cells was depressed by microRNA

SHI Qiong, et al

(*Laboratory of Clinical Diagnostics, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To discuss the depressed expression of BUB1 gene in trophoblastic cells by microRNA. *Methods*: Endogenous BUB1 mRNA level was compared by using quantitative real-time PCR before and after transfected with microRNA plasmid; and the Bub1 protein level was compared by western blot. *Results*: Ratio of BUB1 mRNA/GAPDH mRNA of control group was 0.1960 ± 0.0688, and after transfected with microRNA recombinant plasmid was 0.1968 ± 0.0689 and 0.1962 ± 0.0670 respectively. Statistical study of samples showed they have no instinct different; otherwise the protein level was significantly decreased after transfected with microRNA plamid. *Conclusion*: This study established microRNA can control gene expression in mammalian cells at translation level, it is a good foundation to study on the control of gene expression.

【Key words】microRNA; BUB1 gene; Quantitative real-time PCR

微小 RNA(MicroRNAs, miRNA)是近年发现的一大类单链 RNA 短片段,尽管对 miRNA 的研究还处于初级阶段,据推测 miRNAs 在高级真核生物体内对基因表达的调控作用可能和转录因子一样重要,它可能代表在一个新发现的层次上的基因表达调控方式。近年来,有学者认为在细胞分裂的整个过程中,细胞内有一个监控体系(surveillance systems)保证细胞分裂的正常进行,它对 DNA 的损伤、纺锤丝的完整性及染色体最终是否正常分离起着重要的监控作用。Rieder 等[1,2]认为,细胞内的着丝粒相关蛋白 - 关卡蛋白(Checkpoint Protein, CP)能够准确的识别纺锤丝微管与染色体着丝粒点的连接,是细胞分裂监控体系中的一个重要组成部分。其中 BUB1(Budding Uninhibited by Benomyl)基因编码的 CP 的功能尤其引人注目。本文利用 Real-timePCR、Western blot 等方法比较分析 microRNA 转染前后 BUB1 基因 mRNA 和蛋白水平的变化,探讨 miRNA 对 BUB1 基因表达的调控。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒及菌种:质粒为 PTZU6+1,菌种为 JM109,均来自重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室。

主要试剂和仪器:核酸内切酶购自 Promega 公司,脂质

作者介绍:施 琼(1969-),女,博士生,
主要研究方向:细胞周期和染色体分离。

基金项目:重庆医科大学校办课题(基金号:NSFLX200519)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

体 Lipofectamine2000 购自 Invitrogen，Life technologies。DMEM 和特优级血清购自 Hyclon 公司。CK 抗体和波形蛋白抗体购自北京中山公司。定量 PCR 所用探针由上海 Genecore 合成。BUB1 蛋白一抗购自 Santa cruz 公司(抗体编号 SC-18286)。omniscript™ Reverse Transcriptase 试剂盒购自 QIAGEN。platinum Taq polymerase 购自 invitrogen，life technologies。T 载体试剂盒购自 TaKaRa 公司。Real-time PCR 仪为美国 MJ 公司生产的 opticon monitor2。

1.2 胚胎细胞的培养及鉴定

由重庆医科大学附属医院妇产科收集妊娠 10 周以内的人工流产胚胎，夫妇双方均无有毒有害物质接触史，家族中无遗传病史，女方无自然流产史和先兆流产的症状、年龄在 23~32 岁之间，染色体核型分析正常。

胚胎组织的所有器械均进行无菌处理，专人将胚胎组织及时送达细胞培养室，立即对胚胎组织进行洗涤和分选，获取其绒毛组织。

基础培养液是 DMEM，胎牛血清浓度为 20%，原代细胞培养 7~10 天进行传代，以后每次传代细胞的时间为 4~6 天。

用 CK7 抗体鉴定绒毛滋养层细胞为阳性，而非滋养层细胞为阴性；相反波形蛋白抗体作为阴性对照，鉴定绒毛滋养层细胞为阴性，而非滋养层细胞为阳性，鉴定细胞为 3~5 代的细胞。

1.3 microRNA 表达质粒的构建

美国哈福大学的分子实验室以实验为依据，应用生物信息学相关知识，为预测人类基因的 miRNA 建立了专门的检索网站：http://www.microrna.org/mammalian/index_new.html，在该网站查找到本课题所需的 hBUB1 的 miRNA 及作用位点是 1581:has-mir-27b 和 1587:has-mir-199a*.其中茎环结构为 7 个碱基 TTAAGAG.BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)分析，microRNA 序列与其他基因没有同源性。BUB1 基因的 microRNA 序列交由上海生工合成，将其溶于三蒸水，使其终浓度为 25μmol/L。将正反链按等摩尔数加入退火缓冲液，95℃孵育 5min，然后水浴缓慢使其降至室温，使其形成双链。

克隆所用的两个核酸内切酶位点是 Sal1 和 Xba1，鉴定所用酶切位点 EcoR Ⅰ和 *Hind*Ⅲ，克隆质粒交由博亚测序，测序结果与合成序列完全吻合。

设计的 BUB1 基因的 microRNAs 序列如下：

BUB1-miRNA-1-F:TCGAGGTGTTGAATCGGTGA-CACTTTTAAGAGAAGTGTCACCGATTCAACACTTTTT

BUB1-miRNA-1-R:CTAGAAAAAGTGTTGAATCGGT-GACACTTCTCTTAAAAGTGTCACCGATTCAACACC

BUB1-miRNA-2-F:TCGAGTTGGTTACACGTCTGAT-GACATTTAAGAGATGTCATCAGACGTGTAACCAATTTTT

BUB1-miRNA-2-R:CTAGAAAAATTGGTTACACGTCT-GATGACATCTCTTAAATGTCATCAGACGTGTAACCAAC

1.4 转染胚胎细胞

测序鉴定后质粒抽提保存于 -80℃。将培养 3~5 代的绒毛细胞计数后传至培养板中进行培养，24h 后，细胞完全贴壁，使用 Lipofectamine 2000 转染细胞，操作方法照说明书。

1.5 用定量 real-time PCR 测定转染前后 BUB1 基因的 mRNA 水平

A 实验组别设计：将原代培养的胚胎细胞，每空按 1×10^6 个细胞数种于 6 孔板中，待其长满后，3 孔转染 1.0μgPTZU6+1 空质粒即对照组，3 孔转染 1.0μg BUB1-miRNA-1 质粒组；3 孔转染 1.0μg BUB1-miRNA-2 质粒组，转染 48h 后，收集每组 1 孔细胞提取总 RNA，操作按说明书，紫外分光光度计对总 RNA 定量。应用一步法，即逆转录和扩增在同一体系内完成的聚合酶链反应。反应体积为 25μl。反应条件：50℃ 2min，95℃ 10min 1 个循环；95℃ 30s，60℃ 1min 40 个循环。其余两空收集细胞提取总蛋白，用于作 western blot 检测。

B BUB1 基因特异的引物和探针序列如下：(交由上海 necore 公司合成)

BUB1-FAM:5'AGGTCCGAGGTTAATC3'

BUB1-FP:5'ATCTGCCCGCTTCCCAG3'

BUB1-RP:5'AGCCTACACTTGGCCCCAT3'

C 标准品用 T 载体构建(T 载体试剂盒购自 TaKaRa 公司)，克隆序列如下：

TGAGCAATGGGTAAATGAAGACAGA-CATTATATGAAAAGGAAAGAAGCAAAT-GCTTTTGAAGAACAGCTATTAAAACA-GAAAATGGATGAACTTCATAA-GAAGTTGCATCAGGTGGTGGAGACATC-CCATGAGGATCTGCCCGCTTC-CCAGGAAAGGTCCGAGGT-TAATCCAGCACGTATGGGGCCAAGTG-TAGGCTCCCAGCAGGAACTGAGAGCGC-CATGTCTTCCAGTAACCTATCAGCAGA-CACCAGTGAACATGGAAAAG

D 内参选用人的 GAPDH 基因，其探针和引物购自 Genecore 公司。

1.6 Western blot 检测 Bub1 蛋白水平

一抗已述，滴度 1:300。用 β-actin 作内参，选用鼠抗人的 β-actin 抗体(购自 Santa cruz 公司，编号为 SC-7210)。二抗为辣根过氧化物酶标记的鼠抗羊(用于 BUB1 蛋白检测)和羊抗鼠(用于 β-actin 检测)(均购自北京中山公司)，滴度 1:5000。

维普资讯 http://www.cqvip.com

Western blot 用化学发光方法显色。北京鼎国的预染 marker。

2 结 果

2.1 滋养层细胞的培养和鉴定

绒毛组织块原代培养,再经消化传代法对其进行纯化,用 anti-cytokeratin 和 anti-vimentin 抗体对传代到第 5 代的细胞进行鉴定,结果 85%以上的细胞为滋养层细胞,满足实验要求。

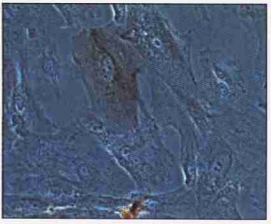
2.2 定量 Real-time PCR 检测 BUB1 基因的 mRNA 水平

标准曲线:r_2=0.997

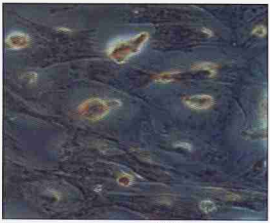
每一样品做 5 个平行管。每例标本 BUB1 基因 mRNA 拷贝数与该标本 GAPDH 基因 mRNA 拷贝数之比值显示,转染 microRNA 质粒后,BUB1 基因的 mRNA 水平分别与对照组经 SPSS12.0 软件对两独立样本进行 t-test 统计学检验,两实验组与对照组的比较结果均显示 $P>0.05$,无显著性差异,说明胚胎细胞在转染 microRNA 质粒后,其内源性基因 BUB1 的 mRNA 水平未受到影响,microRNA 在转录水平未参于 BUB1 基因表达的调控(见表 1)。

2.3 Western blot 检测转染 microRNA 质粒前后 Bub1 蛋白的表达

microRNA 质粒转染胚胎细胞 48h 后,Western



anti-cytokeratin 阳性



anti-vimentin 阴性

图 1 免疫细胞化学鉴定滋养层细胞(×20P)

表 1 转染 microRNA 质粒前后胚胎细胞 BUB1 基因的 mRNA 拷贝数/GAPDH 基因 mRNA拷贝数的统计分析表(n=5)

分组	MAD2 基因的 mRNA 拷贝数 /GAPDH 基因 mRNA 拷贝数均值
对照组	0.1960 ± 0.0688
转染 BUB1-miRNA-1 质粒组	0.1968 ± 0.0689
转染 BUB1-miRNA-2 质粒组	0.1962 ± 0.0670

blot 检测结果证实两实验组的 Bub1 蛋白水平均明显下调,说明 microRNA 主要在翻译水平参于基因的下调。

3 讨 论

在生物体中 microRNA(小分子 RNA)对靶基因的调节作用正逐渐被人类所认识,科学家开始认识到这些普遍存在的小分子在真核基因表达调控中有着广泛的作用,也是基因表达调控机制研究的一个崭新切入点。MicroRNA(miRNA)是一种大小约 21~23 个核苷酸的单链小分子 RNA,是由具有发夹结构的约 70~90 个碱基大小的单链 RNA 前体经过 Dicer 酶加工后生成[3]。国外已研究发现,哺乳动物的胚胎癌性细胞(ECC)内有多种稳定存在的 microRNA,分别对不同的基因表达进行调控。MicroRNA 还具有组织和器官的特异性,在人的肝、肾、肺等组织器官分化形成阶段发现不同的 microRNAs 的稳定表达,以此来确立和(或)保持组成器官的细胞和组织生物学性状的稳定[4]。目前认为 microRNA 对目的基因的调节是依靠 microRNA 与目的基因的转录产物 mRNA 的 3'untranslated re-

维普资讯 http://www.cqvip.com

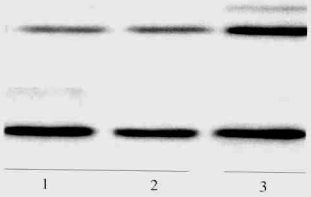


图 2 胚胎细胞转染 microRNA 质粒 48h 后 Bub1 蛋白的 western blot 结果图

1.转染 pBUB1-miRNA-1 质粒后 48h
2.转染 pBUB1-miRNA-2 质粒后 48h
3.转染 ptzu6+1 空质粒后 48h

gions(3'UTR,非编码区)的特异核苷酸序列配对结合,可在翻译或转录后两个水平上实现[5]。在人类,microRNAs 主要是对基因表达翻译水平的调节,所以对于翻译水平调节的基因,则 microRNAs 是基因表达调节很重要的机制;而对那些转录后水平调节的基因,microRNAs 同样可通过翻译水平的下调,起到辅助或补充调节的作用。针对不同的生物体以及同一生物体内不同的靶基因,microRNA 对其调控的方式是不明确的,使其成为 microRNA 研究中一个急待解决的问题。目前国内外对基因调控的机理尚不明确,这也是基因组学研究的重点和难点之一。随着人类基因组计划的完成,人类基因组结构已经阐明,并且建立了较为系统的庞大数据库;其他物种的基因组结构也在不断地阐明与完善,使基因表达调控机理的研究显得越为重要。MicroRNAs 作为一大类最近发现的不能编码蛋白质的调节性基因,在基因表达中的调控作用正得到广泛的关注。由于 miRNAs 存在的广泛性和多样性,提示 miRNAs 可能有非常广泛多样的生物学功能[6]。miRNAs 在生命过程的某个阶段关闭或调控基因表达水平,从而控制细胞的多种生命活动,包括早期发育(Reinhart 2000),细胞增殖,细胞凋亡,细胞死亡(Brennecke 2003),脂肪代谢(Xu 2003)和细胞分化(Kawasaki 2003)。MiRNA 在胚胎的发育和肿瘤的发生机制中有很重要的意义[7]。

染色体正常分离是细胞分裂中一个十分重要的过程,在染色体的分离过程中有一个由 check-point protein(CP)组成的监控体系,能够准确地识别纺锤丝微管与染色体着丝粒点的连接,从而保证染色体的正常分离。目前认为 BUB1 是 CP 的主要成分之一[8],可以通过调节相应蛋白的活性起到调节纺锤体微管和着丝粒连接的作用。BUB1 在染色体分离过程中的作用机制目前尚不完全清楚[9],深入研究细胞内 BUB1 基因的表达,对探讨染色体不分离的分子机制具有十分重要的意义。

本课题组在完成 shRNA 干扰抑制 BUB1 基因表达的研究基础上,进一步研究 microRNA 对基因表达的调控机制。实验中分别用定量 real-time PCR 和 western blot 方法检测转染 microRNA 质粒前后的 BUB1 基因的 mRNA 水平和蛋白水平,发现 mRNA 水平在对照组和实验组无显著差异而蛋白水平在实验组明显降低,说明 microRNA 主要在翻译水平参于基因的表达调控。而与以前的 RNA 干扰主要在转录水平调节目的基因的表达有所区别。虽然近年来,人们发现了很多 miRNAs,但对其功能的研究进展缓慢。miRNAs 作为基因表达的重要调控机理,有很多奥秘等着我们去探索。随着我们在人体内发现的 miRNA 的增多,以及对 miRNA 认识的深入,人类就会在更高的层面上诠释与生命现象和疾病的发生有关的基因调控机理,为防治胚胎发育异常和肿瘤的发生奠定坚实的理论基础。

参 考 文 献

[1] Rieder CL,Cole RW,Alexey K,et al.The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores[J].J Cell Biol,1995;130(4):941-948.

[2] Ouyang B.,Lan Z.,Meadows J,et al.Tension-sensitive kinetochore phosphorylation in vitro[J].J Cell Sci,1998;111(21):3189-3196.

[3] Palatnik JF,Allen E,Wu X,et al.Control of leaf morphogenesis by microRNAs[J].Nature,2003;425:257-263.

[4] Lagos-Quintana M,Rauhut R,Meyer J,et al.New microRNAs from mouse and human[J].et al.RNA,2003;9:175-179.

[5] Palatnik JF,Allen E,Wu X,et al.Control of leaf morphogenesis by microRNAs[J].Nature,2003;425:257-263

[6] Ke XS,Liu CM,Liu DP,et al.MicroRNAs:key participants in gene regulatory networks[J].Curr Opin Chem Biol,2003;7:516-523.

[7] Freemantle SJ,Kerley JS,Olsen SL,et al.Developmentally-related candidate retinoic acid target genes regulated early during neuronal differentiation of human embryonal carcinoma[J].Oncogene,2002;21:2880-2889.

[8] Deantoni A,Sala V,Musacchio A,et al.Explaining the oligomerization properties of the spindle assembly checkpoint protein Mad2

(下转第 51 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

子宫内膜细胞中特异的激素受体改变来调节的[1]。本文观察组与正常对照组子宫内膜在增生期血卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、雌激素(E2)、催乳素(PRL)、孕酮(P)及睾酮(T)水平无差异,两组PR表达水平相比差异无显著性意义。但ER、VEGF及KDR表达在观察组低于对照组,差别有显著性。说明雌激素可能通过与其受体结合发挥作用,进而影响VEGF及KDR的表达。

子宫内膜新血管形成的过程,受多种因子调控,其中VEGF被认为是作用最强、特异性最高的调控因子。VEGF主要作用于血管内皮细胞,与内皮细胞上的KDR和Flt-1受体高亲和力结合后可作为内皮细胞特异性有丝分裂原,诱导内皮细胞增生、毛细血管袢形成,同时还可增加微血管通透性,通过诱导间质产生,促进体内新血管的生成[2]。本研究中观察到观察组和正常对照组子宫内膜腺上皮和血管内皮细胞同时表达VEGF和KDR,提示自分泌或旁分泌是VEGF促进血管生成的重要途径。VEGF通过自分泌或旁分泌机制刺激血管内皮增生、移位和结构形成,促进血管生长发育并维持血管的通透性。Herve MA[3]实验发现通过VEGF旁分泌途径调节,E2增加子宫内膜KDR表达。

本研究结果表明雌激素可能是VEGF表达增强的主要调节因素之一。Hyder[4]发现在VEGF基因上有和ER基因上雌激素反应元件(estrogen responsive element,ERE)高度同源的两个核苷酸序列,分别位于VEGF基因的5'和3'非翻译区,这两个序列可以和ERβ或ERa特异地结合。ER的表达与VEGF的表达存在正相关。Buteau-Lozano[5]等发现人VEGF 0.7kb片段启动子(+54/+749),它序列有80%与ERE序列同源,其能与ER结合。Matthew Stoner[6]发现在VEGF基因GC/GT近端及远端通过ERa/Sp1和ERa/Sp3表达,Koos RD[7]研究也表明ERa与VEGF基因启动子富含GC区Sp1/Sp3相联系。Koduri S[8]认为ERa变异体能增加VEGF表达。

通过以上实验我们认为可能是由于ER下降使VEGF及KDR下降,减少子宫内膜血管形成,子宫内膜增生修复困难导致原因不明月经过少。当然ER减少机制及其它调控作用有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Jabbour HN,Kelly RW,Fraser HM,et al.Endocrine regulation of menstruation[J].Endocr Rew,2006;27(1):17-46.

[2] Wagatsuma A,Tamaki H,Ogita F.Sequential expression of vascular endothelial growth factor,Flt -1,and KDR/Flk -1 in regenerating mouse skeletal muscle[J].Physiol Res,2006;[Epub ahead of print].

[3] Herve MA,Medyri G.Regulation of the vascular endothelial growth factor(VEGF)receptor Flk-1/KDR by estradiol through VEGF in uterus[J].J Endicrinol,2006;188(1):91-99.

[4] Hyder SM,Nawaz Z,Chiappetta C,et al.Identification of functional estrogen response elements in the gene coding for the potent angiogenic factor vascular endothelial growth factor[J].Cancer Research,2000;60(12):3183-3190.

[5] Buteau-Lozano F.Transcriptional Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor by Estradiol and Tamoxifen in Breast Cancer Cells A Complex Interplay between Estrogen Receptors and β [J].Cancer Research,2002;62(17):4977-4984.

[6] Stoner M,Wormke M,Saville B,et al.Estrogen regulation of vascular endothelial growth factor gene expressionin ZR-75 breast cancer cells through interaction of estrogen receptor alpha and SP proteins[J].Oncogene,2004;23(5):1052 1063.

[7] Koos RD,KaziAA.New insight into the transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor expression in the endometrium by estrogen and relaxin[J].Ann N Y Acad Sci,2005;1041:233-247.

[8] Koduri S,Goldhar AS,Vonderhaar BK.Activation of vascular endothelial growth factor(VEGF)by the ER-alpha variant,ER Delta3 [J].Breast Cancer Res Treat,2006;95(1):37-43.

(上接第 47 页)

[J].Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,2005;29(3):637-648.

[9] Vigneron S,Prieto S,Bernis C,et al.Kinetochore localization of spindle checkpoint proteins:who controls whom [J].Mol Biol Cell,2004;15(10):4584-4596.