

网络出版时间: 2019-9-19 10:04 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190917.1059.011.html>

鼠源 GFP-VNN1 重组质粒的构建及其功能研究

李琳¹ 李俊²

摘要 目的 构建鼠源绿色荧光蛋白-重组人血管非炎症因子1基因(GFP-VNN1)重组质粒,并观察其对小鼠巨噬细胞RAW264.7细胞因子分泌及细胞凋亡的影响。方法 从RAW264.7细胞中获得总RNA,逆转录得到cDNA,用HindⅢ和BamHⅠ限制性内切酶双酶切后连接至绿色荧光蛋白(GFP)载体上。表达载体经限制性内切酶酶切和DNA序列分析正确后转染至RAW264.7细胞中,ELISA试剂盒及Western blot法检测细胞因子肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白细胞介素-6(IL-6)分泌,流式细胞术检测细胞凋亡。结果 阳性克隆经双酶切法鉴定可见VNN1基因片段,重组质粒GFP-VNN1可以显著促进细胞因子TNF-α和IL-6的分泌及RAW264.7细胞的凋亡。结论 表明成功构建重组GFP-VNN1质粒,其能促进细胞因子分泌及细胞凋亡。

关键词 重组人血管非炎症因子1基因;绿色荧光蛋白;RAW264.7细胞;基因表达;细胞因子;细胞凋亡

中图分类号 R 392.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)11-1717-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.11.011

重组人血管非炎症因子1基因(Vannin-1, VNN1)是一种位于细胞膜上的糖基磷脂酰肌醇

(glycosylphosphatidylinositol, GPI)-锚定蛋白,具有泛酰巯基乙胺酶活性,表达于人类及小鼠的多种组织中,其中肾脏、胸腺和脾等免疫组织具有较高的mRNA表达量^[1]。多项研究^[2-4]显示VNN1可以通过调控氧化应激反应标志物活性氧簇(ROS)、抗氧化剂谷胱甘肽(GSH)、cysteamine及抗氧化蛋白过氧化物酶体增殖物激活受体γ(PPAR-γ)等分子或蛋白参与氧化应激反应,提示以VNN1基因为靶点的治疗未来有可能逆转氧化应激及炎症相关性疾病的进展。本实验拟通过体外构建能够稳定表达VNN1蛋白的重组质粒,并观察其转染RAW264.7细胞后对细胞因子分泌及细胞凋亡的影响,为深入探讨其参与免疫相关性疾病的分子机制奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要实验材料 RAW264.7细胞系、绿色荧光蛋白(GFP)及DH5α感受态细胞由安徽省天然药物活性研究重点实验室保存。总RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒(美国Thermo公司);高糖DMEM液体培养基、胎牛血清(FBS)(美国Gibco公司);凝胶纯化试剂盒、限制性内切酶、T4 DNA marker、DNA连接酶(日本TaKaRa公司);Lipofectamine 2000、Opti-MEM、TRIzol Reagent(美国Invitrogen公司);流式试剂盒(上海贝博公司);小鼠酶联免疫分析(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技

2019-06-18 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81770609)

作者单位:¹ 安徽医科大学第一附属医院药剂科,合肥 230022

² 安徽医科大学药学院,合肥 230032

作者简介:李琳,女,硕士,初级药师;

李俊,男,博士,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: lijun@ahmu.edu.cn

Results Expression of ARL2 was significantly higher in cervical cancer tissues. By construct to the NC group, the protein expression was decreased by 59% ($t = 5.6$, $P < 0.05$) in HeLa cells and 60% ($t = 5.3$, $P < 0.05$) in C33A cells, respectively. MTT assay revealed that cell growth was inhibited, the inhibitory rate was 28% ($t = 2.6$, $P < 0.05$) in HeLa cells and 22% ($t = 2.3$, $P < 0.05$) in C33A cells. siR-ARL2 reduced the colony forming ability of HeLa and C33A cells by 36% and 60%, respectively ($t = 4.7$, $t = 6.2$, $P < 0.05$). Invasion and migration were significantly reduced as well, the inhibitory rate on invasion was 49% ($t = 5.2$, $P < 0.05$) in HeLa cells and 54% ($t = 5.7$, $P < 0.05$) in C33A cells, and inhibited the migration in HeLa cells. **Conclusion** Expression of ARL2 is significantly higher in cervical cancer tissues. Knockdown of ARL2 markedly inhibited cervical cancer cell proliferation, migration and invasion, and may play an important role in the development of cervical cancer.

Key words cervical cancer; ARL2; RNA interference; invasion; relative expression

公司); ECL 显色试剂盒(美国 Pierce 公司); BCA 法蛋白浓度定量试剂盒(武汉生物科技有限公司); 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 单克隆抗体(美国 Abcam 公司); 山羊抗兔 IgG 二抗、兔抗小鼠二抗(北京中杉金桥公司)。

1.2 实验仪器 流式细胞仪、CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo 公司); 细菌培养箱(德国 Heraeus 公司); 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳仪、酶标仪(美国 Bio-Rad 公司); 高速低温离心机(美国 Sigma 公司); 紫外凝胶成像系统(南京捷达生物技术公司); PCR 梯度扩增仪(德国 Eppendorf 公司)。

1.3 鼠源 GFP-VNN1 重组质粒构建 从 NCBI GenBank 数据库查找 VNN1 的 DNA 序列, 根据引物设计原则用 Primer 5.0 软件设计 PCR 引物。上游引物: 5'-AAGCTTCCGCTGCACCATGACTACTC-3' (下划线为 Hind III 酶切位点), 下游引物: 5'-GGATCCGCTCGAGCTACCAACTTAATGA-3' (下划线为 BamH I 酶切位点)。PCR 反应条件为 95 °C、3 min; 94 °C、40 s; 58 °C、40 s; 68 °C、110 s; 循环 35 次后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离纯化。纯化后产物经双酶切法与 GFP 载体连接, 连接产物转化摇菌, 挑选阳性克隆, 酶切法鉴定后, 送至上海 Invitrogen 生物技术有限公司测序, 序列比对正确后进行后续实验。

1.4 RAW264.7 细胞培养 RAW264.7 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养基置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养, 培养基应加入青霉素和链霉素各 100 U/ml。每天更换新鲜培养基, 取处于对数期生长的细胞用于实验。

1.5 GFP-VNN1 重组质粒转染 RAW264.7 细胞 转染前 24 h 用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)消化细胞, 接种 2 ml 密度为 1.5×10^5 /ml 的待转染细胞于 6 孔板中, 培养条件为 37 °C、5% CO₂, 待细胞贴壁生长后准备转染。分别将 6 μ l 质粒和 8 μ l 脂质体溶于 150 μ l OPTI-MEM 培养基中, 静置 5 min 后将两者混合均匀, 室温静置 15 min。弃去 6 孔板中旧 DMEM 培养基, PBS 漂洗 2 次后加入 1.7 ml OPTI-MEM, 再逐滴加入质粒-脂质体混合物, 混合均匀后置 37 °C、5% CO₂ 培养 6 h, 然后更换含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基继续培养。

1.6 Western blot 法检测细胞中 VNN1、TNF- α 和 IL-6 蛋白表达 转染 48 h 后, 裂解各组细胞得到总

蛋白样品, 加入 2 $\times$ SDS 上样缓冲液于 100 °C 煮沸 5 min。BCA 法测定蛋白浓度, 与标准蛋白 Marker 一起进行 8% SDS-PAGE 凝胶电泳, 用湿转法将蛋白转到 PVDF 膜上, TBST 洗膜 3 次后, 分别用 VNN1、TNF- α 、IL-6 的一抗于 4 °C 过夜孵育。TBST 洗膜后, 加入 VNN1、TNF- α 、IL-6 的二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜后, ECL 试剂盒显色, 电脑显影成像, Image J 图像分析软件对各条带进行分析, 实验重复 3 次。

1.7 ELISA 法检测细胞上清液中 TNF- α 和 IL-6 表达 转染 48 h 后, 取出 6 孔板中各组细胞上清液, 离心, 按照 ELISA 试剂盒的操作步骤进行操作, 加样、加酶、显色、终止等。使用酶标仪测量各孔吸光度, 最后绘制标准曲线计算样本浓度。实验重复 3 次。

1.8 流式细胞术检测 RAW264.7 细胞凋亡情况 转染 48 h 后, 收集 6 孔板中各组细胞, 按试剂盒说明书操作: 每组用 400 μ l Binding Buffer 重悬细胞, 并加入 5 μ l Annexin V 染液, 避光孵育 15 min, 然后加入 10 μ l PI, 避光孵育 5 min, 1 h 内在流式仪上检测细胞凋亡情况。实验重复 3 次。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件分析, 计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间均数比较采用两独立样本 t 检验, 多组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GFP-VNN1 重组质粒的构建及鉴定 提取的 GFP-VNN1 质粒用 Hind III 和 BamH I 限制性内切酶双酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳分离得到约 1 542、4 735 bp 两条带, 与 VNN1 片段的大小和载体 GFP 的大小相符, 表明 VNN1 已被插入到 GFP 载体中。酶切结果见图 1。VNN1 基因测序结果与 GenBank 上的序列一致, 表明 GFP-VNN1 表达载体构建正确, 可用于后续实验。

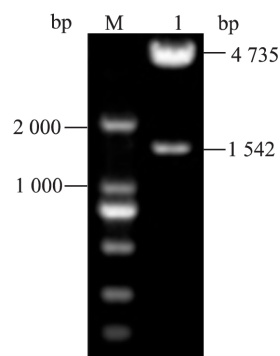


图1 GFP-VNN1 重组质粒经双酶切鉴定电泳图
M: DNA Marker; 1: Hind III 和 BamH I 双酶切 GFP-VNN1 重组质粒

2.2 VNN1 蛋白在 RAW264.7 细胞中的表达 经 Western blot 法检测显示正常组、空质粒转染组以及 GFP-VNN1 重组质粒转染组细胞内均有 VNN1 蛋白表达。GFP-VNN1 重组质粒转染组 VNN1 蛋白的表达明显高于其他两组细胞,与正常组比较差异有统计学意义($P < 0.01$, $F = 3.063$),见图 2,表明 GFP-VNN1 重组质粒能在 RAW264.7 细胞稳定高表达 VNN1 蛋白。

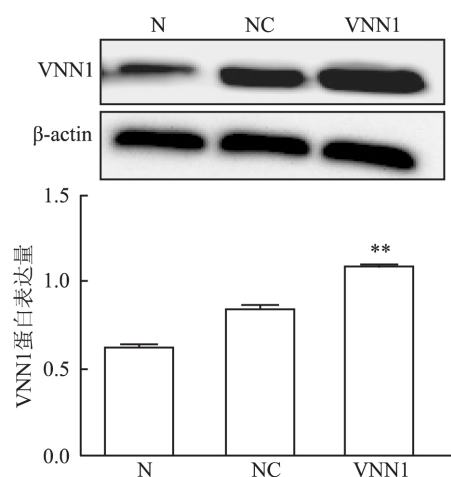


图 2 Western blot 法检测 RAW264.7 细胞中 VNN1 蛋白的表达
N: 正常组; NC: 空质粒转染组; VNN1: GFP-VNN1 重组质粒转染组; 与正常组比较: ** $P < 0.01$

2.3 GFP-VNN1 重组质粒对细胞因子 TNF- α 和 IL-6 分泌的影响 ELISA 结果显示, GFP-VNN1 重组质粒能显著升高 RAW264.7 中 TNF- α 和 IL-6 的表达($P < 0.05$, $F = 0.082$; $P < 0.05$, $F = 0.592$),与正常组比较差异有统计学意义; Western blot 法检测 RAW264.7 细胞中 TNF- α 和 IL-6 蛋白表达升高($P < 0.05$, $F = 1.538$; $P < 0.05$, $F = 1.509$),与正常组比较差异有统计学意义。结果见图 3、4,提示 GFP-VNN1 重组质粒能促进细胞因子 TNF- α 和 IL-6 分泌。

2.4 GFP-VNN1 重组质粒对 RAW264.7 细胞凋亡的影响 与正常组比较, GFP-VNN1 重组质粒转染组凋亡率升高,差异有统计学意义($P < 0.05$, $F = 0.076$)。说明重组质粒 GFP-VNN1 能促进 RAW264.7 细胞发生凋亡。见图 5。

3 讨论

泛酰巯基乙胺酶(Vanin, VNN)是近几年生物学研究的热点,是一种泛酰巯基乙胺的水解酶,能水解泛酰巯基乙胺形成泛酸和半胱胺。Vanin 基因的亚型包括 VNN1、VNN2 和 VNN3,小鼠体内有 VNN1 和

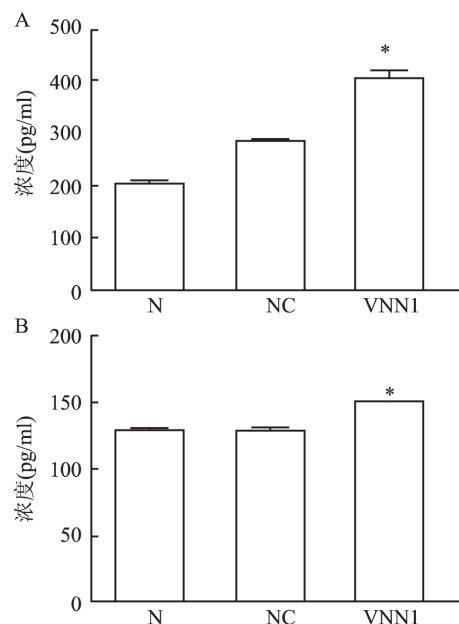


图 3 ELISA 法检测 GFP-VNN1 重组质粒对细胞因子 TNF- α 和 IL-6 分泌的影响

A: TNF- α ; B: IL-6; N: 正常组; NC: 空质粒转染组; VNN1: GFP-VNN1 重组质粒转染组; 与正常组比较: * $P < 0.05$

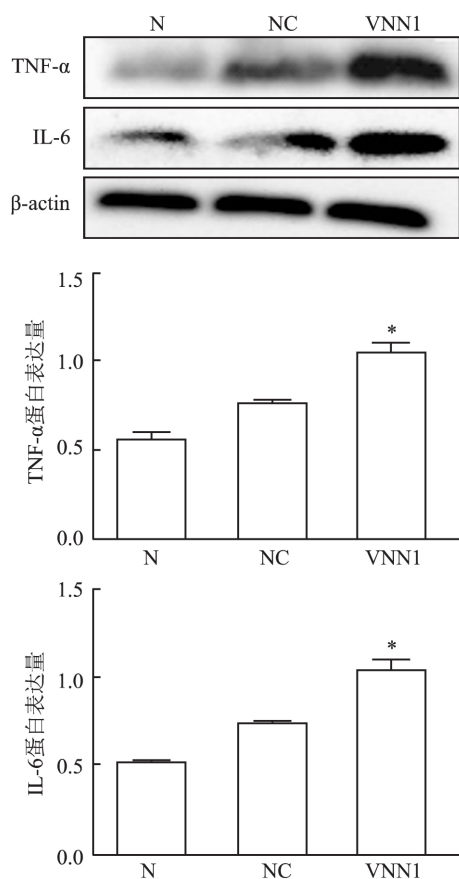


图 4 Western blot 法检测 GFP-VNN1 重组质粒对细胞因子 TNF- α 和 IL-6 分泌的影响

N: 正常组; NC: 空质粒转染组; VNN1: GFP-VNN1 重组质粒转染组; 与正常组比较: * $P < 0.05$

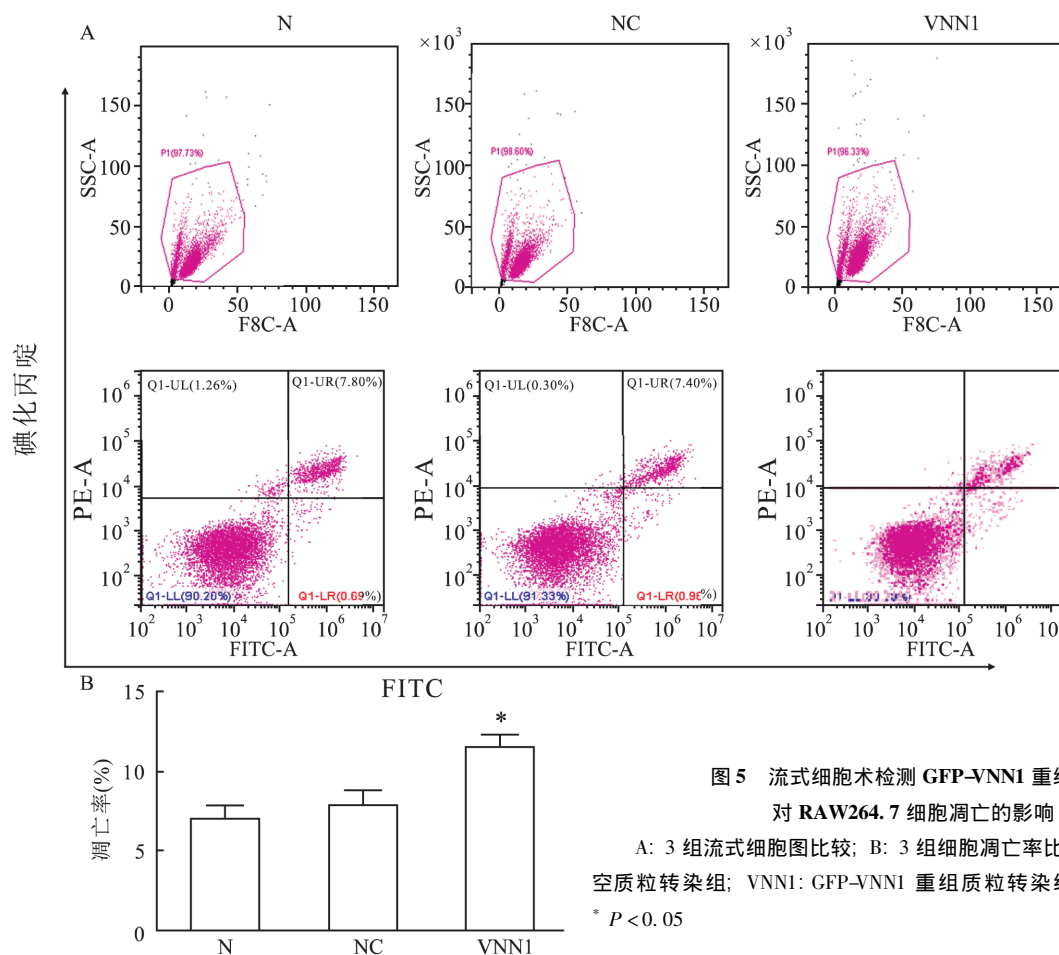


图5 流式细胞术检测 GFP-VNN1 重组质粒对 RAW264.7 细胞凋亡的影响

A: 3 组流式细胞图比较; B: 3 组细胞凋亡率比较; N: 正常组; NC: 空质粒转染组; VNN1: GFP-VNN1 重组质粒转染组; 与正常组比较: * $P < 0.05$

VNN3 两种亚型,位于 10 号染色体的 10A2B1; 人体内有 VNN1、VNN2 和 VNN3 三种亚型,位于 6 号染色体的 q22 ~ 24,人类和小鼠的 Vanin 基因的总氨基酸具有高度一致性^[5-7]。

VNN1 是 Vanin 家族中研究最多的一个亚型,其对氧化应激反应的调控引起了越来越多科研人员的关注。研究^[8]显示 VNN1 与 NF- κ B 通路的激活成正相关,干扰 VNN1 基因后,不仅抑制了 LPS 对 NF- κ B 的激活,还抑制了 NF- κ B 的核转位,进而抑制了氧化应激和炎症的发生;同时应用 NF- κ B 抑制剂 BAY11-7082 也能部分削弱 VNN1 介导的氧化应激反应。干扰 VNN1 表达的细胞株中即使给予白介素-1 β (IL-1 β) 这一高效的促炎刺激因素,也未能引起炎症因子表达水平的增加,提示在炎症反应中 VNN1 是一个关键的作用因子^[9]。研究^[10]显示在小鼠糖尿病模型中,体内或体外实验中敲除 VNN1 基因后,胰岛细胞凋亡减弱,有学者推测 VNN1 基因可能通过调控组织释放 cystamine 对胰岛细胞产生保护作用。以上研究结果提示 VNN1 基因的表达与多项炎症相关性疾病的病程进展有很强的关联性。

在生物医学研究中 GFP 因其在相应波长的紫外光激发下发出绿色荧光故常作为标记蛋白,用以实时观察目标蛋白在细胞中的移动和定位,或用以检测基因转录效率,目的蛋白的表达量等^[11-12]。GFP 作为使用最为广泛的标记蛋白之一,由于其分子量小,可以与其他目的基因形成融合蛋白,且融合蛋白仍能保持荧光激发活性,同时不影响目的基因的生物活性^[13]。

本实验通过基因重组技术成功建立了过表达 VNN1 的 GFP-VNN1 载体,并且进一步研究发现过表达 VNN1 能促进 RAW264.7 细胞炎症因子 TNF- α 、IL-6 分泌和细胞的凋亡。本研究还发现与正常组比较,空质粒转染组 VNN1、TNF- α 、IL-6 的表达均有轻微升高,这种现象可能是由于转染试剂中的 Lipofectamine 2000 所致。Lipofectamine 2000 对细胞具有一定的毒性,可以激活 RAW264.7 细胞,分泌炎症因子如 TNF- α 和 IL-6,导致空质粒转染组 TNF- α 和 IL-6 分泌增加。而 TNF- α 和 IL-6 为体内重要的炎症因子,能与相应的受体结合,激活相应的炎症反应,导致空质粒转染组 VNN1 的表达升高。本研

究结果提示 VNN1 的高表达可能会加剧炎症相关性疾病的发展,而干扰 VNN1 表达则可能对疾病缓解有重要意义。本研究结果为深入研究 VNN1 基因的分子机制奠定了基础,并为研究其生物学活性和在免疫相关性疾病中的作用提供了新思路。以 VNN1 基因为靶点的治疗将可能逆转炎症等相关疾病的发展,但这需要通过大量的实验室研究和临床试验证实。

参考文献

- [1] Yamashita N, Yashiro M, Dqawa H, et al. Metabolic pathway catalyzed by Vanin-1 pantetheinase plays a suppressive role in influenza virus replication in human alveolar epithelial A549 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 489(4): 466–71.
- [2] Løvf M, Nome T, Bruun J, et al. A novel transcript, VNN1-AB, as a biomarker for colorectal cancer [J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(9): 2077–84.
- [3] Rommelaere S, Miclet V, Gensollen T, et al. PPARalpha regulates the production of serum Vanin-1 by liver [J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(22): 3742–8.
- [4] 史晓丽. VNN1 调节炎症状态下的肝脏 Hecidin 表达及肝铁紊乱的分子机制[D]. 南京: 南京师范大学, 2015: 1–68.
- [5] 王中亮, 李洁, 姚文, 等. 泛酰巯基乙胺酶(Vanin-1)基因的研究进展[J]. *畜牧与兽医*, 2018, 50(9): 111–5.
- [6] Kang M, Qin W, Buya M, et al. VNN1, a potential biomarker for pancreatic cancer-associated new-onset diabetes, aggravates pancreatic islet dysfunction by increasing oxidative stress [J]. *Cancer Lett*, 2016, 373(2): 241–50.
- [7] 李洁, 周浩, 郁建峰, 等. 鹅 VNN1 基因的克隆及组织表达分析[J]. *南京农业大学学报*, 2018, 41(1): 140–6.
- [8] Giessner C, Millet V, Mostert K J, et al. Vnn1 pantetheinase limits the Warburg effect and sarcoma growth by rescuing mitochondrial activity [J]. *Life Sci Alliance*, 2018, 1(4): e201800073.
- [9] Naquet P, Pitari G, Duprè S, et al. Role of the Vnn1 pantetheinase in the tissue tolerance to the stress [J]. *Biochem Soc Trans*, 2014, 42(4): 1094–110.
- [10] Roisin-Bouffay C, Castellano R, Valéro R, et al. Mouse Vanin-1 is cytoprotective for islet beta cells and regulates the development of type 1 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2008, 51(7): 1192–201.
- [11] 李琳, 彭云云, 黄成, 等. 鼠源 pEGFP-C2-NLRC5 重组质粒的构建及其表达 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(2): 145–8.
- [12] 孙艺佩. 绿色荧光蛋白——结构及应用 [J]. *当代化工研究*, 2017(8): 124–5.
- [13] 刘娣, 张巨源, 陈雯莉, 等. 甲醛固定对 GFP 发光特性的影响 [J]. *氨基酸与生物资源*, 2015, 37(4): 67–71.

Construction and functional study of mouse GFP-VNN1 recombinant plasmid

Li Lin¹, Li Jun²

(¹Dept of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²School of Pharmacy Anhui Medical University Hefei 230032)

Abstract **Objective** To construct the GFP-tagged eukaryotic expression vector of Vanin-1 (VNN1), observe its effect on the cytokine secretion and apoptosis of RAW264.7 cells. **Methods** The total RNA of VNN1 was obtained from RAW264.7 cells, and reverse transcription into cDNA sequence. Then VNN1 cDNA and the vector GFP were digested with restriction enzymes Hind III and BamH I, then inserted into the eukaryotic expression vector GFP. The recombinant vector was verified by restriction enzymes cut and sequencing identified, then transfected into RAW264.7 cells. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) secretion were detected by ELISA and Western blot. Cell apoptosis was detected by flow cytometry with AnnexinV-FITC/PI double-staining method. **Results** The VNN1 fragment was contained in the positive recombination by identification of restriction enzymes. The recombinant plasmid GFP-VNN1 could significantly promote the secretion of cytokines TNF- α and IL-6 and the apoptosis of RAW264.7 cells. **Conclusion** Successfully constructed eukaryotic expression vector of VNN1, recombinant GFP-VNN1 plasmid could significantly promote cytokine secretion and apoptosis. **Key words** VNN1; GFP; RAW264.7 cells; gene expression; cytokine; apoptosis