

# 热激启动子驱动的真核表达 质粒 pHSP-shPLK1-GFP 的构建与鉴定

柯友群 程 里 余水生 荆珏华

**摘要** 目的 构建热激启动子(pHSP)驱动的靶向敲低 Polo 样蛋白激酶 1 (PLK1) 的真核表达质粒,并观察其对骨肉瘤 U2OS 细胞增殖的影响。方法 首先合成热休克蛋白 HSP70 的启动子,克隆至带有绿色荧光蛋白(GFP)标签的真核表达质粒 pEGFP-C1 中,利用 pHSP 替换原有的 CMV 启动子,构建真核表达载体 pHSP-GFP;其次,利用 RNA 干扰技术合成以 *plk1* 基因为靶向目标的 shRNA,将其定向克隆至真核表达载体 pHSP-GFP 中形成重组质粒 pHSP-shPLK1-GFP;另外设计一组阴性对照质粒 pHSP-NC-GFP,最后利用脂质体 Lipo2000 转染的方法将质粒转染至 U2OS 细胞,非热激组细胞正常培养,热激组及阴性对照组细胞 42 °C 加热 2 h,通过细胞免疫荧光染色实验检测 GFP 的表达,从而确定 pHSP 的驱动能力,采用 Real-time PCR 法检测细胞内 *plk1* 的 mRNA 表达水平,Western blot 法检测 PLK1 蛋白表达水平,MTT 法检测重组质粒对 U2OS 细胞增殖的影响。结果 成功构建了 pHSP 驱动的真核表达质粒 pHSP-shPLK1-GFP;细胞免疫荧光染色实验结果显示 pHSP 可正常驱动 *gfp* 基因的表达,且 GFP 蛋白定位在胞质中;Real-time PCR 结果显示热激组细胞 *plk1* 基因表达量明显降低,与非热激组及阴性对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ );Western blot 结果显示热激组细胞 PLK1 蛋白表达量比非热激组及阴性对照组低( $P < 0.05$ );MTT 结果显示热激组细胞的增殖活性被明显抑制,与非热激组及阴性对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 pHSP 驱动的真核表达质粒 pHSP-shPLK1-GFP 能在 U2OS 细胞中表达,在 42 °C 加热条件下,该重组质粒呈现更强的下调 *plk1* 基因表达和抑制增殖作用。

**关键词** 骨肉瘤;RNA 干扰;质粒构建;热疗;热激启动子  
中图分类号 R 738.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)06-0791-06  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.06.003

骨肉瘤是一种儿童和青少年常见的原发性恶性骨肿瘤,目前临床上治疗骨肉瘤以外科手术联合新

辅助化疗为主,但远期治疗效果难以达到社会预期。近年来,骨肉瘤的热疗(hyperthermia)和基因靶向治疗<sup>[1]</sup>(gene targeted therapy)逐渐成为研究的热点<sup>[2]</sup>,热疗能够将肿瘤及其周围组织加热到一定温度(常为 42 °C),使肿瘤细胞增殖抑制甚至促使细胞凋亡<sup>[3]</sup>,同时热激启动子(pHSP)可以在临床能够达到的条件下使下游基因的表达升高数百倍甚至数千倍<sup>[4-5]</sup>;Polo 样蛋白激酶 1 (Polo-like kinase 1, PLK1) 被发现在细胞周期中起着至关重要的作用,*plk1* 基因在包括骨肉瘤在内的多种肿瘤细胞体内过度表达;因此 *plk1* 成为骨肉瘤基因治疗的重要靶点<sup>[6-7]</sup>。利用 RNA 干扰(RNA interference, RNAi) 技术<sup>[8]</sup>有望高效地抑制 *plk1* 的表达,逆转骨肉瘤的恶性表型,控制其发生和发展,达到骨肉瘤基因治疗的目的<sup>[9]</sup>,该研究利用 pHSP 驱动,靶向下调 PLK1 的真核表达质粒的表达,并在 42 °C 环境下评价其对骨肉瘤细胞 U2OS 的抗肿瘤作用。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 热激启动子(pHSP)序列、克隆载体 pEGFP-C1、PUC57 购自上海吉玛制药技术公司;大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ 、限制性内切酶和 T4 连接酶、凝胶回收试剂盒、细胞总 RNA 提取试剂盒和 cDNA 第一链合成试剂盒、DL2000 DNA marker 购自北京天根生化科技有限公司;LB 培养基自行配制;质粒 DNA 中量抽提试剂盒购自美国 Axygen 公司;脂质体 Lipo2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司;GFP 一抗(兔抗人)、PLK1 一抗(兔抗人)均购自美国 Proteintech 公司;二抗(山羊抗兔)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;二甲基亚砜 DMSO 试剂、DAPI 核染料、抗荧光淬灭剂、Triton X-100 均购自北京亚太恒信生物公司;PLK1 引物由上海复能基因有限公司合成;SYBR green 荧光染料购自美国 Lifetech 公司;U2OS 骨肉瘤细胞系由安徽医科大学第二附属医院中心实验室保存,取对数生长期细胞进行试验。

## 1.2 方法

2017-03-04 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81441068);安徽医科大学校科研基金项目(编号:2015xkj034)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院骨科,合肥 230601

作者简介:柯友群,男,硕士研究生;

荆珏华,男,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: aydtgzy@163.com

**1.2.1 pHSP 驱动的真核表达载体 pHSP-GFP 的设计与合成** 在 NCBI-Gene 中查找果蝇 pHSP 序列, 并将其构建到 PUC57 载体中, 用 AseI/NheI 双酶切, 回收 453 bp 片段作为插入片段; 将 pEGFP-C1 用 AseI/NheI 双酶切, 回收 4 100 bp 片段做为载体, 将插入片段用 T4 连接酶连接到载体得到 pHSP-GFP 质粒。

**1.2.2 靶向 PLK1 的 shRNA 的设计与合成** 在 NCBI-Gene 上查找 *plk1* 的 mRNA 序列(基因库: NM\_005030.5), 参照 Tusehl 设计原则, 以此为模板设计 *plk1* 的 shRNA 寡核 5'-AATTCAAAAAAGATCAC-CCTCCTTAAATATTCTCGAGAATATTTAAGGAGGG-TGATCT-3' 由上海吉玛制药技术公司合成、退火并扩增, 记为 shPLK1。同时设计合成一段与人、鼠基因均不同源的 shRNA 片段作为阴性对照 (negative control NC)。

**1.2.3 重组质粒 pHSP-shPLK1-GFP 的构建** 将扩增后的目的基因 shPLK1、NC 和质粒载体 pHSP-GFP 分别利用限制性内切酶 BamH I 和 Hind III 双酶切, 酶切产物回收。T4 连接酶作用 16 °C 连接过夜, 产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 在卡那霉素抗性的 LB 固体培养基中筛选, 转化后进行平板挑菌, 大量培养后提取质粒进行酶切电泳鉴定, 鉴定基因是否阳性。若鉴定为阳性, 将阳性克隆菌液送上海吉玛基因生物技术有限公司测序, 进一步鉴定阳性结果, 构建的目的质粒记为 pHSP-shPlk1-GFP, 阴性对照质粒记为 pHSP-NC-GFP。

**1.2.4 质粒的转染及分组** 将培养的 U2OS 细胞按  $4 \times 10^5$  /ml 接种 6 孔板, 每组重复 5 次, 用完全无抗培养基培养 12 ~ 24 h, 待细胞达 60% ~ 70% 融合度, 按 Lipo 2000 试剂说明书步骤混匀质粒、脂质体及无血清无抗生素培养基 (opti-MEM), 加入换液后的培养细胞中孵育 4 h 后去除含脂质体复合物的培养基, 更换新鲜完全培养基<sup>[10]</sup>, 转染后分组: ① 热激组 (转染 pHSP-shPLK1-GFP 质粒 + 42 °C 热激处理 2 h) 后常规培养; ② 非热激组 (只转染 pHSP-shPLK1-GFP 质粒) 转染后正常培养; ③ 阴性对照组 (转染 pHSP-NC-GFP 质粒, 42 °C 热激处理 2 h) 转入常规培养箱中培养 24 h。

**1.2.5 细胞免疫荧光染色检测 GFP 表达** 细胞转染孵育 24 h 后, 根据细胞免疫荧光标准试验方法进行: 细胞爬片 4% 多聚甲醛固定, Triton X-100 通透, 封闭, 用 GFP 一抗孵育过夜, 加荧光二抗, DAPI 染核, 荧光封片液封片后在荧光显微镜下观察 GFP 的

表达情况, 并拍照。

**1.2.6 Real-time PCR 检测** 基因沉默效果根据引物设计原则筛选一对针对 *plk1* 的 PCR 引物, 上游引物序列: 5'-CGGACCCAGAGAACATTA-3', 下游引物序列: 5'-TCCTTGAACACGAACCATA-3', 同时设计一对内参  $\beta$ -actin 引物, 上游引物序列: 5'-CGGACCAGAGAACATTA-3', 下游引物序列: 5'-TCCTTGAACACGAACCATA-3', 用 Lipo2000 将 pHSP-shPLK1-GFP、pHSP-NC-GFP 分别转染 U2OS 细胞系。同时设计一组空白对照, 即细胞不做转染, 正常培养。根据天根 RNA 提取说明书提取细胞总 RNA, 并反转为 cDNA 第一链, 参照 All-in-one<sup>TM</sup> qPCR 试剂盒说明书用 Real-time PCR 检测各组到达荧光阈值的循环次数, 用 *plk1* 的 CT 值 - 内参  $\beta$ -actin 的 CT 值, 记为  $\Delta$ CT,  $\Delta\Delta$ CT = 实验组 *plk1* 的  $\Delta$ CT 值 - 对照组  $\Delta$ CT 值, 其相对表达量以公式  $2^{-\Delta\Delta$ CT} 表示。

**1.2.7 Western blot 检测 PLK1 蛋白表达** 用蛋白裂解液提取各组细胞总蛋白, 用 Bradford 法测定蛋白质的浓度, SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗为兔抗人 PLK1 (1 : 1 000) 和内参  $\beta$ -actin (1 : 400) 多克隆抗体, 二抗为辣根过氧化物标记的山羊抗兔抗体 (1 : 5 000), 加 ECL 发光液显色后用 Bandscan 分析软件进行条带灰度分析, 半定量比较分析, 自身灰度值校正, 以目的基因 PLK1 的条带灰度与内参  $\beta$ -actin 的灰度比值表示蛋白的表达水平。

**1.2.8 MTT 法测定肿瘤细胞增殖活性** 取对数生长期的 U2OS 骨肉瘤细胞, 用 DMEM 完全培养基稀释后计数, 制成单细胞悬液, 于 96 孔板中接种 200  $\mu$ l U2OS 骨肉瘤细胞, 转染后设置热激组、非热激组、阴性对照组 3 组, 调整细胞密度为  $1 \times 10^4$  /ml, 每组设置 5 个复孔, 另设空白对照, 培养 24 h。热激组和阴性对照组用 42 °C 处理 2 h, 之后转入常规培养箱中培养 24 h, 非热激组正常培养相同时间, 弃去上清液, 每孔加入 20  $\mu$ l MTT 溶液 (浓度为 5 mg/ml, 经滤器除菌), 在 37 °C、饱和湿度 5% CO<sub>2</sub> 孵箱内培养约 4 h。每孔中加入 150  $\mu$ l 二甲基亚砷 DMSO, 置于摇床上低速震荡 10 min, 使结晶充分溶解。在酶联免疫检测仪 570 nm 处测定各孔吸光度值 (absorbance, A), 细胞生长抑制率 (%) = (对照组 A 值 - 实验组 A 值) / 对照组 A 值  $\times$  100%。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 正态分布计量数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组均

数比较采用单因素方差分析, SNK-q 检验比较组间差异, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 pHSP 序列的设计** 在 NCBI 中查找 pHSP 序列, 结果见图 1。

**2.2 阳性克隆菌液的测序鉴定** 构建的目的质粒 pHSP-shPLK1-GFP 测序结果见图 2, 结果显示插入片段的序列大小、位点和方向与设计的片段完全一致, 图 3 为重组质粒构建的示意图。

```
CTATTCAGAGTTCTCTTCTGTATTCAATAAATTACTTCTTGGCAGATTTTCAGT
AGTTGCAGTTGATTTACTTGGTTGCTGGTTACTTTTAATTGATTCACCTTAA
CTTGACCTTTACTGCAGATTGTTAGCTTGTTCAGCTGCGCTTGTATTATTG
CTTAGCTTTGCTTAGCGACGTTTCACTTTGCTTGTGAATTGAATTGT
CGCTCCGTAGACGAAGCGCTCTATTATACTCCGGCGCTCTTTTCGCGAA
CATTGAGGCGCGCTCTCTGAACCAACGAGAGCAGTATGCCGTTACTG
TGTGACAGAGTGAGAGAGCATTAGTGCAGAGAGGGAGACCCAAAAAGAAA
AGAGAGAATAACGAATAACGGCCAGAGAAATTTCTCGAGTTTCTTCTGCG
AAACAAATGACCTACCACAATAACAGTTTGTTTGGGATTCTA
```

图 1 pHSP 序列设计结果

**2.3 细胞免疫荧光对 GFP 表达的检测结果** 采用细胞免疫荧光法检测转染 pHSP-shPLK1-GFP 和 pHSP-NC-GFP 质粒后 GFP 在 U2OS 中的表达 (图 4), GFP 主要表达在胞质中, 相关分析结果显示 pHSP 可正常驱动 GFP 的表达, 且呈现出高表达。

**2.4 Real-time PCR 对基因沉默效果的检测结果** Real-time-PCR 分别检测非热激组、热激组、阴性对照组的 *plk1* 基因的相对表达量, 结果显示: *plk1*

的表达在热激组有明显下调, 与非热激组及阴性对照组比较, 差异均有统计学意义 ( $F = 551.57, P < 0.05$ )。非热激组 *plk1* 基因也有一定的表达下调, 但表达下调幅度远低于热激组, 阴性对照组没有明显表达下调现象。见图 5。

**2.5 Western blot 对 PLK1 蛋白表达的检测结果** 提取的各组细胞蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转膜, 进行 Western blot 实验, 检测到 PLK1 的条带位于 66 ku 附近, 内参  $\beta$ -actin 反应条带位于 43 ku 处, 与预期结果完全相同。对 PLK1 反应条带进行半定量分析, 热激组 PLK1 的相对表达水平与非热激组、阴性对照组比较差异有统计学意义 ( $F = 427.12, P < 0.05$ )。

**2.6 MTT 法对肿瘤细胞增殖活性的检测结果** 转染质粒 24 h 后, 重组质粒对 U2OS 细胞的增殖影响结果显示, 非热激组、热激组、阴性对照组细胞抑制率分别为  $(7.97 \pm 1.25)\%$ 、 $(32.16 \pm 2.34)\%$ 、 $(6.57 \pm 1.95)\%$ , 热激组与非热激组、阴性对照组比较, 差异均有统计学意义 ( $F = 615.37, P < 0.05$ )。

## 3 讨论

骨肉瘤的治疗是目前骨科面临最棘手的问题之一, 由于其好发于青少年, 恶性程度高, 早期转移, 因而其社会危害性极大。临床上目前的治疗手段远远难以达到社会预期, 国内外众多学者为寻找骨肉瘤新的可行的治疗方案而苦苦探索。许多研究<sup>[11-15]</sup>

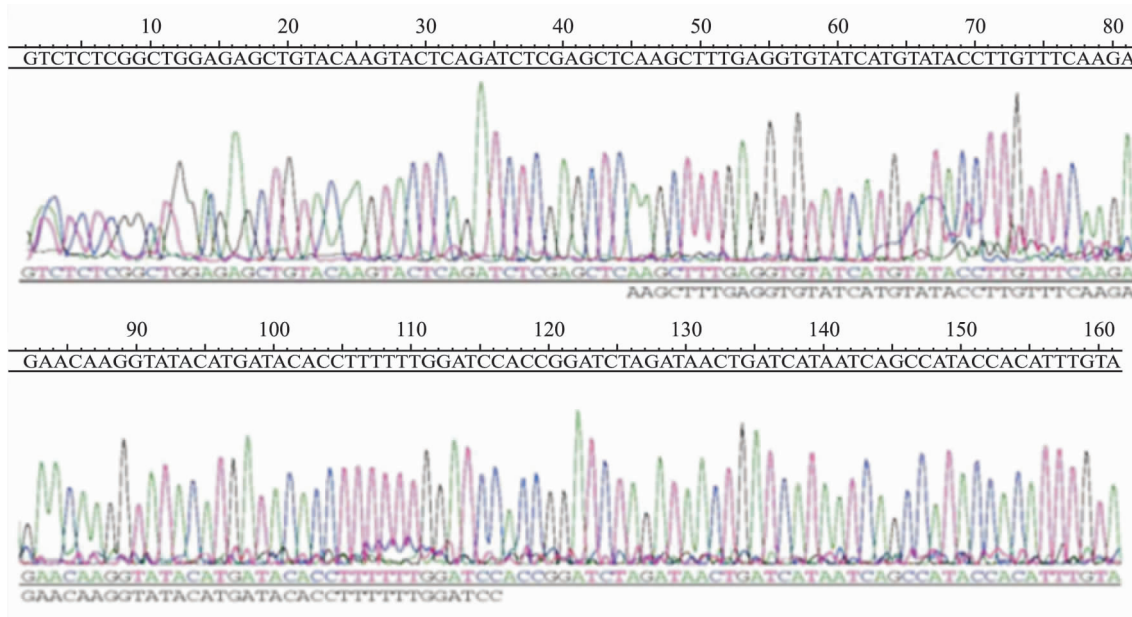


图 2 重组质粒 pHSP-shPLK1-GFP 的测序结果

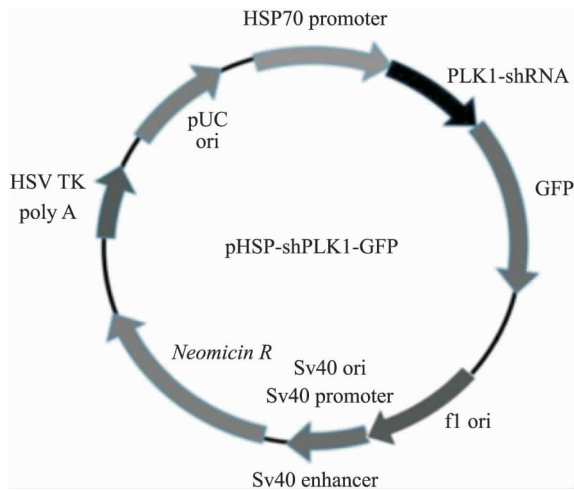


图3 重组质粒构建示意图

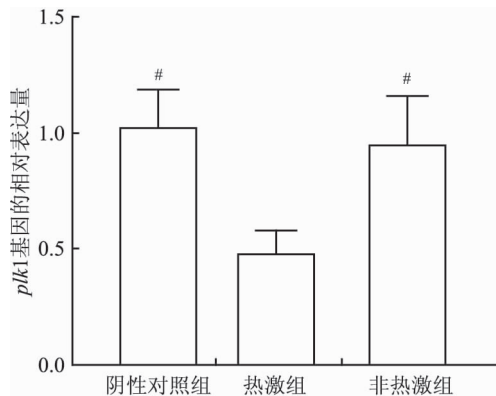


图5 plk1的相对表达量检测结果  
与热激组比较: #P < 0.05

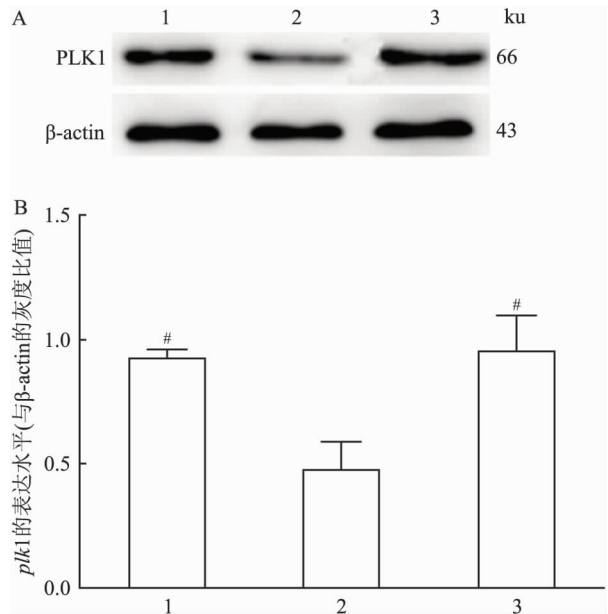


图6 Western blot 检测 PLK1 蛋白表达的结果

A: Western blot 检测 PLK1 和  $\beta$ -actin 蛋白表达的结果; B: 半定量检测 PLK1 蛋白的表达水平; 1: 非热激组; 2: 热激组; 3: 阴性对照组; 与热激组比较: #P < 0.05

表明 肿瘤细胞会在热刺激下产生一类保护性蛋白质 - 热休克蛋白 (heat shock proteins , HSPs) ,同时利用 pHSP 高效性这一特点 ,可以将其利用到基因工程研究中去调控目的基因的表达; PLK1 在细胞分裂和增殖等过程中起重要作用 ,其过度表达被认为是很多肿瘤预后不良的标志。利用 RNAi 技术 ,靶

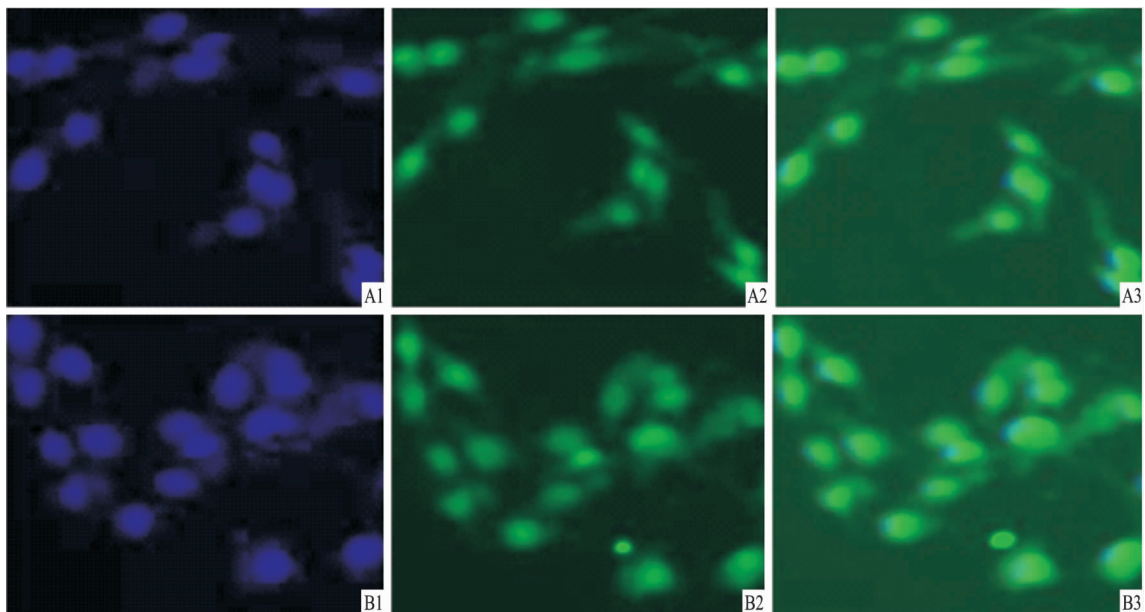


图4 细胞免疫荧光检测 GFP 表达情况 ×400

A: pHSP-NC-GFP 转染组; B: pHSP-shPLK1-GFP 转染组; 1: DAPI 染色; 2: GFP 荧光; 3: Merge

向敲低 *plk1* 的表达,进而控制肿瘤的发生与发展,为肿瘤的治疗提供了新的思路和方法。本文构建 *plk1* 靶向的 shRNA 质粒,并将其转染入体外培养的 U2OS 细胞中,通过 MTT、Western blot、Real-time PCR 等方法对细胞增殖及分子水平的表达变化进行了检测,并分析 shRNA 干扰质粒对 U2OS 细胞增殖的影响。

本研究设计 *plk1* 的干扰 RNA-shPLK1,以 GFP 标记构建的重组体经 DNA 测序显示与设计的片段序列完全一致,证明重组 pHSP-shPLK1-GFP 构建成功。细胞免疫荧光检测结果显示,重组基因中的标记基因 *gfp* 可以在骨肉瘤 U2OS 细胞体内表达成功,证明基因转染后目标基因可以顺利表达;MTT 法测定肿瘤细胞增殖活性的结果表明热激组细胞的生长活性受到明显抑制,而非热激组及阴性对照组细胞的生长活性未受明显影响,这种现象说明 RNA 干扰具有序列特异性,细胞的凋亡是由于干扰特定序列的表达而引起的,RT-PCR 及 Western blot 结果提示热激组 U2OS 骨肉瘤细胞中 PLK1 的表达明显下调,可推测 pHSP-shPLK1-GFP 表达了特异性的 shRNA,从而降解了 *plk1* 的 mRNA,使 PLK1 蛋白合成减少,癌细胞 U2OS 的增殖能力下降,并发生凋亡或死亡。

综上所述,本研究通过热激启动 shPLK1 基因的表达,观察到 U2OS 细胞生长受抑现象,为骨肉瘤的基因及靶向治疗提供了新的可能途径和参考,后期可以考虑利用纳米载体材料搭载该重组质粒进行骨肉瘤的基因靶向治疗的相关研究。

### 参考文献

- [1] Shaikh A B, Li F, Li M, et al. Present advances and future perspectives of molecular targeted therapy for osteosarcoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(4):506.
- [2] Luetke A, Meyers P A, Lewis I, et al. Osteosarcoma treatment - where do we stand? A state of the art review [J]. *Cancer Treat Rev*, 2014, 40(4):523-32.
- [3] Falk M H, Issels R D. Hyperthermia oncology [J]. *Int J Hyperthermia*, 2001, 17(1):1-18.
- [4] Bhayani K R, Rajwade J M, Paknikar K M. Radio frequency induced hyperthermia mediated by dextran stabilized LSMO nanoparticles: *in vitro* evaluation of heat shock protein response [J]. *Nanotechnology*, 2013, 24(1):015102.
- [5] Wang H Y, Fu J C, Lee Y C, et al. Hyperthermia stress activates heat shock protein expression via propyl isomerase 1 regulation with heat shock factor 1 [J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(24):4889-99.
- [6] Liu X. Targeting polo-like kinases: a promising therapeutic approach for cancer treatment [J]. *Transl Oncol*, 2015, 8(3):185-95.
- [7] Van den Bossche J, Lardon F, Deschoolmeester V, et al. Spotlight on volasertib: preclinical and clinical evaluation of a promising Plk1 inhibitor [J]. *Med Res Rev*, 2016, 36(4):749-86.
- [8] 余明杰,徐元宏,王萍. RNA 干扰 A20 基因的表达对人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖、凋亡和迁移的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(9):1215-9.
- [9] Greco K A, Franzen C A, Foreman K E, et al. PLK-1 silencing in bladder cancer by siRNA delivered with exosomes. [J]. *Urology*, 2014, 191(4):e1-7.
- [10] 彭云云,黄成,马陶陶,等. pEGFP-C2-MeCP2 重组质粒的构建和表达 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(9):1193-7.
- [11] Nylandsted J, Brand K, Jäättelä M. Heat shock protein 70 is required for the survival of cancer cells [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 926(1):122-5.
- [12] Suto R, Srivastava P K. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides [J]. *Science*, 1995, 269(5230):1585-8.
- [13] Yamaguchi M, Ito A, Okamoto N, et al. Heat-inducible transgene expression system incorporating a positive feedback loop of transcriptional amplification for hyperthermia-induced gene therapy [J]. *J Biosci Bioeng*, 2012, 114(4):460-5.
- [14] Huang Q, Hu J K, Lohr F, et al. Heat-induced gene expression as a novel targeted cancer gene therapy strategy [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(13):3435-9.
- [15] Kust N, Rybalkina E, Mertsalov I, et al. Functional analysis of drosophila HSP70 promoter with different HSE numbers in human cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8):e101994.

## Construction and identification of eukaryotic expression plasmid pHSP-shPLK1-GFP driven by heat shock promoter

Ke Youqun, Cheng Li, Yu Shuisheng et al

(Dept of Orthopedics, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

**Abstract Objective** To construct the eukaryotic expression plasmid of a target knock down Polo like protein kinase 1 (PLK1) driven by heat shock promoter and observe its effect on the proliferation of osteosarcoma U2OS cells. **Methods** Firstly, the promoter of heat shock protein HSP70 was synthesized, then promoter HSP70 was

# 糖尿病大鼠下颌下腺内 nNOS 和 NT-3 表达变化及意义

胡惠贞<sup>1,2</sup>, 贾雪梅<sup>1</sup>, 桂 丽<sup>1</sup>, 黄大可<sup>1</sup>, 汪 渊<sup>1</sup>, 王 璐<sup>3</sup>, 周岳堃<sup>3</sup>

**摘要** 目的 观察不同病程糖尿病大鼠下颌下腺内神经型一氧化氮合酶(nNOS)和神经生长因子-3(NT-3)的表达变化,探讨其对糖尿病下颌下腺结构和功能的影响。方法 48只SD大鼠随机分为对照组、糖尿病组和治疗组。糖尿病组和治疗组给予腹腔注射链脲佐菌素复制2型糖尿病模型,治疗组给予胰岛素治疗,于造模后3个月和6个月每组分别处死8只大鼠,测定空腹血糖,并取下颌下腺组织,分别进行HE染色、免疫组织化学染色和计算机图像分析。结果 糖尿病组血糖较同期对照组升高且随着病程的延长显著,治疗

组血糖较同期糖尿病组下降。光镜下,与对照组相比,糖尿病组下颌下腺腺泡萎缩加重,颗粒曲管数目减少,管腔变窄,治疗组无明显变化;免疫组织化学法检测显示 nNOS在糖尿病组表达较同期对照组增强,在造模3个月表达最强,治疗组表达较同期糖尿病组降低;NT-3在糖尿病组表达较同期对照组降低且随病程的延长减少,治疗组较同期糖尿病组增强。结论 糖尿病大鼠下颌下腺内 nNOS 表达升高和 NT-3 表达下降,可能是引起糖尿病下颌下腺结构和功能紊乱的重要原因;胰岛素治疗可能与 nNOS 和 NT-3 的表达改变有关。**关键词** 糖尿病;下颌下腺;神经型一氧化氮合酶;神经生长因子-3

2017-03-10 接收

基金项目:安徽省高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2012A164)

作者单位:安徽医科大学<sup>1</sup> 基础医学院、<sup>3</sup> 临床医学院,合肥 230032

<sup>2</sup>安徽人口职业学院解剖学与组织胚胎学教研室,池州 247000

作者简介:胡惠贞,女,讲师,硕士研究生;

贾雪梅,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:jiaxueme@126.com

桂 丽,女,助理研究员,责任作者,E-mail:teguili@163.com

中图分类号 R 587.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)06-0796-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.06.004

下颌下腺不仅能分泌唾液,其导管上皮细胞内还能表达多种生物活性物质,这些物质可通过外分泌、内分泌及旁分泌作用于特定的生理部位,有报道<sup>[1]</sup>在正常大鼠下颌下腺导管内有神经型一氧

cloned into the eukaryotic expression plasmid pEGFP-C1 with green fluorescent protein(GFP) tag, replace the original CMV promoter with the heat shock promoter(pHSP), to construct eukaryotic expression vector pHSP-GFP, secondly, RNAi was used to synthesize the shRNA sequence of *plk1* gene, and it was cloned into the eukaryotic expression vector pHSP-GFP to form the recombinant plasmid pHSP-shPLK1-GFP; in addition, we designed the negative control plasmid pHSP-NC-GFP. Finally, the plasmid was transfected into U2OS cells by Lipo2000, non heat stimulated group were cultured in normal condition, heat shock group and negative control group was heated at 42 °C for 2 hours, The expression of GFP was detected by immunofluorescence staining, so the driving ability of heat shock promoter was determined, The expression of *plk1* in mRNA was detected by Real-time PCR method, Western blot was used to detect the expression level of PLK1 protein and the effect of recombinant plasmid on the proliferation of U2OS cells was detected by MTT method. **Results** The eukaryotic expression plasmid pHSP-shPLK1-GFP driven by heat shock promoter was successfully constructed. Cell immunofluorescence staining showed that the heat shock promoter could drive the expression of GFP. GFP protein is expressed in cytoplasm. The results of Real-time PCR showed that the expression of *plk1* in heat shock group was significantly lower than that in non heat stimulated group and negative control group ( $P < 0.05$ ). The Western blot results showed that the expression of PLK1 protein in heat shock group was lower than that of non heat stimulated group and negative control group ( $P < 0.05$ ); MTT results showed that the cell proliferation activity was significantly inhibited, compared with the non heat stimulated group and negative control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The eukaryotic expression plasmid pHSP-shPLK1-GFP driven by heat shock promoter can be expressed in U2OS cells, the recombinant plasmid showed a stronger down regulation of *plk1* expression and inhibition of proliferation under the heating condition of 42 °C.

**Key words** osteosarcoma; RNA interference; plasmid construction; hyperthermia; heat shock promoter