

甲羟戊酸激酶基因真核及 shRNA 表达载体构建及其对 BxPC-3 细胞周期蛋白表达的影响

金锐 王芳 栾康 罗欣 张胜权

摘要 目的 构建甲羟戊酸激酶(*MVK*)基因真核及 shRNA 表达载体并转染至 BxPC-3 细胞中,观察其对细胞周期蛋白的影响。方法 从 BxPC-3 细胞中提取总 RNA,逆转录 PCR(RT-PCR)法获得目的基因 *MVK* 以及通过化学合成 *MVK* (751~779) 和 *MVK* (1 089~1 117) 位点寡核苷酸片段,构建真核表达及 shRNA 表达载体并转染至 BxPC-3 细胞,筛选稳定表达细胞系。Western blot 法分析转染后对 BxPC-3 细胞周期蛋白的影响。结果 成功获得 *MVK* 基因真核表达(pCDNA3.1-*mvk*)及两个针对 *MVK* shRNA 表达载体(piLenti-RNAi-shRNA1/2)。通过抗生素筛选及 Western blot 分析获得了稳定的 *MVK* 过表达及低表达细胞株。Western blot 分析显示:过表达 *MVK* 的细胞株及 *MVK* knockdown 的细胞株中细胞周期蛋白 Cyclin B1、Cyclin E 表达量与正常及对照细胞相比均显著降低。结论 *MVK* 过表达及低表达均抑制 BxPC-3 细胞周期蛋白 Cyclin B1、Cyclin E 的表达。

关键词 甲羟戊酸激酶; 基因重组; 寡核苷酸; 细胞周期蛋白; BxPC-3; shRNA

中图分类号 R 349.83

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)01-0022-05

甲羟戊酸途径是体内胆固醇生物合成的重要代谢途径^[1],其主要是由乙酰辅酶 A 为原料合成甲羟戊酸,然后在甲羟戊酸激酶(mevalonate kinase, *MVK*)的催化作用下最终生成法尼基焦磷酸(FPP)、牛耳基牛儿焦磷酸(GGPP)、胆固醇(CH)等。中间代谢产物 FPP、GGPP 是细胞蛋白质酯化的戊二烯供体,参与调节细胞增殖、凋亡、分化等过程^[2]。研究^[3]证实:几乎存在一半以上肿瘤细胞中的 p53 能够显著上调细胞中甲羟戊酸途径代谢及蛋白质的酯化过程,提示甲羟戊酸途径可能成为肿瘤治疗的一个新靶点。胰腺癌是常见的消化系统恶性肿瘤,患者死亡率高。Harrison et al^[4]研究发现苯乙酸盐能

够抑制甲羟戊酸途径中类异戊二烯的生物合成进而对胰腺癌细胞有生长抑制作用。真核细胞进行增殖主要依靠有丝分裂方式。分裂周期分为:间期和分裂期。细胞周期的顺利进行需要细胞周期蛋白(Cyclins)及周期蛋白依赖性激酶(CDK)进行调节。当甲羟戊酸代谢途径紊乱,可能对胰腺癌细胞周期蛋白合成产生影响最终产生生长抑制。该研究通过体外构建不同基因表达载体研究其对胰腺癌 BxPC-3 细胞周期蛋白的作用及机制,旨在为胰腺癌治疗提供一个新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 基因重组试剂 TRIzol 试剂、逆转录试剂盒、DNA 上样缓冲液(6×Loading Buffer、DNA Marker(DL2 000 等)、PCR 反应试剂、Hind III 和 Xho I 均购自日本 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶、限制性核酸内切酶 BbsI 购自美国 NEB 公司; 质粒提取试剂盒购自美国 OMEGA 公司; 胶回收试剂盒购自美国 AxyGen 公司。

1.1.2 细胞培养及转染试剂 DMEM、1640、胎牛血清购自美国 Gibco 公司; G418 和嘌呤霉素(Puro-mycin)购自美国 Sigma 公司; MegaTran1.0 Transfection Reagent 购自美国 Origene 公司。

1.1.3 细胞、质粒、菌株 胰腺癌细胞 BxPC-3 购自中国科学院细胞中心; pcDNA3.1/myc-His A, B, and C、piLenti-RNAi-GFP、*E. coli* JM109 均购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 NCBI GenBank 提供的 *MVK* 序列,设计 *MVK* 真核表达引物。上游引物(带有 Hind III 酶切位点): 5'-CCCAAGCTTATGTTGT-CAGAAGTCCTACTGG-3'; 下游引物(带有 Xho I 酶切位点): 5'-CCGCTCGAGTCAGAGGCCATC-CAGGGCTTGC-3'。利用 shRNA 在线软件设计两条针对 *MVK* 基因 mRNA 的 shRNA 序列。针对 *MVK* (751-779) 的序列: 5'-AGAAACAGGCTGCTCAAGT-

2015-10-12 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81271748)

作者单位: 安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 金锐,男,硕士研究生;

张胜权,男,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: sqz36@yahoo.com

TCCCAGAGAT-3'和 *MVK* (1 089 ~ 1 117) 的序列: 5'-TGGCTTTGACTGCTTGAAACCAGCATCG-3'。寡核苷酸序列由上海生物工程有限公司合成。

1.2.2 HaCaT 细胞培养收集及总 RNA 提取 复苏 HaCaT 细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h,待其状态良好,弃去培养液,PBS 洗 3 次,0.25% 胰酶消化,收集细胞悬液,TRIzol 试剂提取细胞总 RNA。

1.2.3 RT-PCR 扩增野生型 *MVK* 基因

1.2.3.1 逆转录反应 采用逆转录试剂盒进行逆转录反应,依次加入总 RNA 5 μl,10 × RT Buffer 1 μl,Oligo dT 0.5 μl,10 mmol/L dNTP 1 μl,25 mmol/L MgCl₂ 2 μl,AMV Reverse Transcriptase 0.25 μl。轻弹管底使其混匀,点动离心,42 °C 60 min,95 °C 5 min 条件下逆转录,加入 40 μl ddH₂O 即为 cDNA 备用溶液。

1.2.3.2 PCR 反应 取上述 cDNA 5 μl,依次加入 TaqDNA Polymerase 1 μl、上下游引物各 0.5 μl、10 mmol/L dNTP 0.5 μl、10 × Buffer 2.5 μl、25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μl,补 ddH₂O 8.5 μl。94 °C 5 min,94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s,72 °C 10 min,循环 30 次。琼脂糖凝胶电泳分析结果。

1.2.4 重组体的构建及筛选

1.2.4.1 *MVK* 基因真核表达载体的构建、筛选 将质粒 pcDNA 3.1 和 *MVK* 在 37 °C 的恒温体系中分别用核酸内切酶 Hind III 和 Xho I 双酶切 4 h。琼脂糖凝胶电泳分析酶切结果,用胶回收试剂盒回收所需酶切产物。pcDNA 3.1 和目的片段按 5 : 1 摩尔比加入 T4 DNA 连接酶体系中,16 °C 连接过夜。-80 °C 取出感受态 JM109 细胞,将上述重组体转化至 JM109 中,37 °C 培养 12 h,菌落扩增后经 PCR、酶切进行重组体鉴定,测序。-20 °C 保存,备用。重组体命名为 pcDNA 3.1-*mvk*。

1.2.4.2 *MVK* 不同位点 shRNA 表达载体的构建、筛选 合成的 oligoDNA 序列在缓冲体系中依次经过变性、退火反应。质粒 piLenti-RNAi-GFP 及 oligoDNA 经 Bbs I 酶切、电泳、回收,以 5 : 1 的摩尔比 16 °C 连接过夜。将连接产物转化入 JM109,经抗生素及 PCR 筛选出阳性克隆,扩增,测序,提取质粒。-20 °C 保存,备用。重组体命名为 piLenti-RNAi-*mvk* 1/2。

1.2.4.3 重组体转染至 BxPC-3 细胞 复苏冻存的人胰腺癌 BxPC-3 细胞,于含 10% 胎牛血清的 1640 培养基、37 °C、5% CO₂ 中培养,待其状态良好,按 2

× 10⁵ /ml 密度接种于 12 孔板中培养,待其达到 90% ~ 95% 汇合时,用 MegaTran1.0 Transfection Reagent 将重组质粒转染至 BxPC-3 细胞中,设置复孔培养 24 h 后,分别用 G418 和 Puromycin 抗性培养基筛选。同时设置空白未处理及转染空载 pcDNA3.1、piLenti-RNAi-GFP 细胞组作为对照。

1.2.4.4 Western blot 检测 *MVK* 基因表达产物 6 组细胞(空白未处理细胞、pcDNA3.1、pcDNA3.1-*mvk*、piLenti-RNAi-GFP、piLenti-RNAi-*mvk* 1/2 稳定转染的细胞)培养后,提取细胞总蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,按 10 μl /孔上样量加入 12% 凝胶孔中,依次进行:电泳(浓缩胶 60 V,分离胶 120 V 约 2 h)、转移(150 mA 恒流 3 h 左右)、封闭(5% 脱脂牛奶常温封闭 2 h)、孵育一抗(4 °C 孵育过夜)、孵育二抗(常温摇床孵育 2 h)、Thermo Scientific SuperSignal West Pico Trial Kit 化学发光底物显影,分析 *MVK* 基因表达产物。

1.2.4.5 Western blot 检测细胞周期蛋白表达 通过 1.2.4.4 步骤鉴定出 *MVK* 基因高表达及 knock-down 的细胞,接种 24 孔培养板,Western blot 步骤同 1.2.2.4,化学发光分析各组细胞中细胞周期蛋白(Cyclin B1 及 Cyclin E)的表达。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,多组均数比较采用方差分析。

2 结果

2.1 PCR 扩增 *MVK* 基因编码区(CDS)及化学合成 shRNA 经 RT-PCR 获得大量 *MVK* 基因全长片段,1.5% 琼脂糖凝胶电泳可见 1 190 bp 左右特异性扩增条带,见图 1A。

2.2 *MVK* 真核表达重组体的构建与鉴定 *MVK* 基因经酶切、回收、连接、转化后,PCR 及双酶切筛选阳性克隆,结果可见 1 190 bp 的 *MVK* PCR 产物,酶切后可见 5 500 bp 的 pcDNA3.1 及 1 190 bp 的 *MVK* 片段,见图 1A、1B。阳性克隆扩增后测序,结果经 Blast 比对正确(图 1C,给出 *MVK* 的部分序列),保存备用。

2.3 shRNA 表达载体的构建与鉴定 shRNA 经酶切、电泳、回收、转化、连接、转化后,经酶切筛选阳性克隆(图 1D)。扩增后测序,结果经 Blast 比对正确(图 1D,给出 shRNA1 的序列),保存备用。

2.4 转染 BxPC-3 观测 GFP 荧光和筛选稳定表达细胞系 piLenti-RNAi-GFP-*mvk* (751-779 shRNA1)

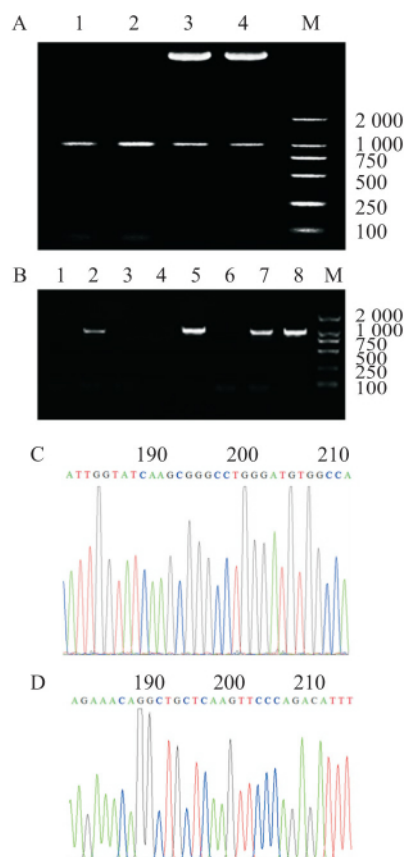


图1 *MVK* 真核表达载体及 shRNA 表达载体构建

M: Marker; A: *MVK* 全长片段获取及重组体筛选; 1,2: *MVK* PCR 扩增产物; 3,4: *MVK* 重组体酶切结果; B: PCR 筛选 *MVK* 重组体克隆; 1,3,4,6: 阴性克隆; 2,5,7,8: 阳性克隆; C: *MVK* 测序结果(部分序列); D: shRNA1 测序结果(部分序列)

及 piLenti-RNAi-GFP-*mvk*(1 089 ~ 1 117, shRNA2) 转染 BxPC-3 经 Puromycin(0.5 μ g/ml) 筛选, 荧光镜下结果见图 2, Western blot 分析显示 shRNA1 稳定转染的细胞中 *MVK* 蛋白表达显著降低, 见图 3。

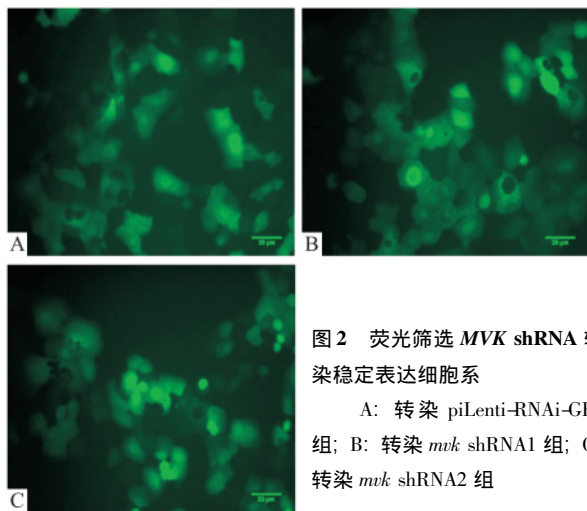


图2 荧光筛选 *MVK* shRNA 转染稳定表达细胞系

A: 转染 piLenti-RNAi-GFP 组; B: 转染 *mvk* shRNA1 组; C: 转染 *mvk* shRNA2 组

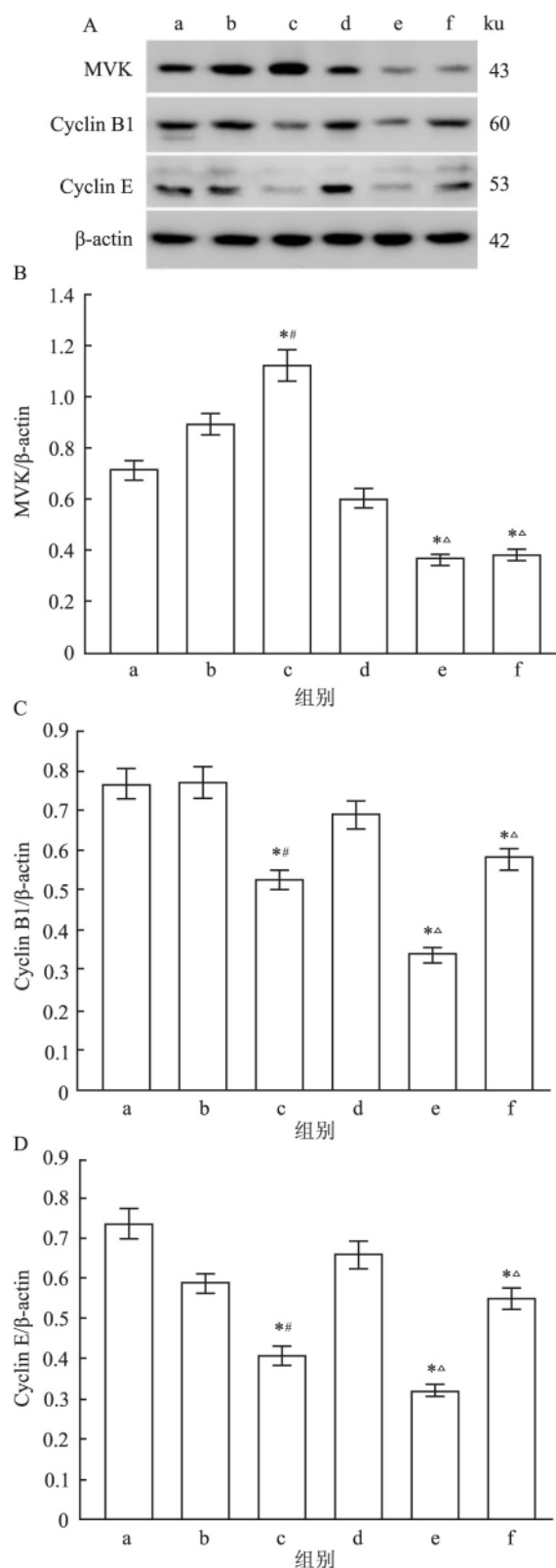


图3 Western blot 分析 *MVK* 及 Cyclins 结果

a: 空白未处理组; b: 转染 pcDNA3.1 组; c: 转染 pcDNA3.1-*mvk* 组; d: 转染 piLenti-RNAi-GFP 组; e: 转染 piLenti-RNAi-GFP-*mvk*(751-779, shRNA1) 组; f: piLenti-RNAi-GFP-*mvk*(1 089 ~ 1 117, shRNA2) 组; 与空白未处理组比较: * $P < 0.05$; 与转染 pcDNA3.1 组比较: # $P < 0.05$; 与转染 piLenti-RNAi-GFP 组比较: $\Delta P < 0.05$

pcDNA3.1-*mvk* 转染 BxPC-3 后,用抗生素 G418 (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 筛选稳定表达细胞株,Western blot 结果显示 pcDNA3.1-*mvk* 稳定转染的细胞中 MVK 蛋白表达显著升高,见图 3。

2.5 Western blot 分析转染后 MVK 基因在 BxPC-3 中表达情况以及对 BxPC-3 细胞周期蛋白表达的影响 a 到 f 组细胞各指标分别进行方差分析,SPSS 17.0 软件分析得出 $F_{\text{MVK}} = 716.86$, $F_{\text{CyclinB1}} = 55.346$, $F_{\text{CyclinE}} = 93.321$, 各组均为 $P > 0.05$, 即方差齐性,对各指标分别进行 t 检验,结果显示:转染 pcDNA3.1-*mvk* 组、空白未处理组、转染 pcDNA3.1 组相比, MVK 相对表达量显著升高,细胞周期蛋白 (Cyclin B1、Cyclin E) 相对表达量显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。转染 MVK shRNA1/shRNA2 组与空白未处理组、转染 piLenti-RNAi-GFP 组相比, MVK 相对表达量显著降低,细胞周期蛋白 (Cyclin B1、Cyclin E) 相对表达量也显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3。

3 讨论

甲羟戊酸代谢途径是体内合成脂类物质的一种重要代谢途径,参与细胞的生理进程,几乎存在于所有高等真核生物和病毒中^[5]。其中 MVK 起到关键作用,是合成下游重要营养物质的桥梁^[6]。研究^[7-8]表明甲羟戊酸基因突变将导致 MVK 缺失症,是一种稀有的常染色体代谢性疾病。

本研究通过体外构建 MVK 基因的真核表达载体转染至人胰腺癌细胞 BxPC-3,旨在研究 MVK 基因不同程度表达对其增殖相关蛋白的影响。通过体外研究发现,转染含有野生型 MVK 基因的重组体使 BxPC-3 细胞 MVK 基因高表达,并在很大程度上降低细胞周期蛋白 Cyclin B1、Cyclin E 的表达水平;转染 MVK 基因的 shRNA1/2 均能下调 BxPC-3 细胞 MVK 基因的表达水平且不同程度地抑制其周期蛋白 Cyclin B1、Cyclin E 的表达。该研究采用基因工程及 knockdown 技术构建不同基因表达载体来干预胰腺癌细胞 MVK 基因表达程度,从而为更详细地研究甲羟戊酸途径在胰腺癌中的作用机制打下了一个新的基础。

纵观甲羟戊酸整个代谢途径,当 MVK 缺失后将导致下游的 FPP、GGPP、CH 等的缺失及上游甲羟戊酸的累积。其中 FPP、GGPP 是细胞蛋白质酯化的戊二烯供体^[9]。细胞内蛋白质的异戊二烯化使定位于细胞膜上的 GTP 酶介导细胞信号的转导,从而调控细胞的生长及凋亡进程。其中,研究最多的就是

小 G 蛋白参与的细胞调控机制。常见的小 G 蛋白如 Ras、Rho、Rab、Ran 家族等,它们是细胞内多个信号转导的中心环节,因此参与对细胞生理功能的影响,并与抗肿瘤治疗有关^[10]。代谢中产生的 CH 是细胞膜系统的重要组成成分,在细胞的生理功能各个方面扮演着非常重要的角色。由此可以推断, MVK 基因突变后导致 MVK 功能缺失,造成下游产物 FPP、GGPP 等缺乏,导致细胞蛋白质酯化过程不能进行,从而可能影响细胞周期蛋白及其蛋白因子表达,进而阻碍细胞的生长。而当 MVK 活性过度增强时,将很大程度加快代谢反应的进程,促使下游产物 FPP、GGPP 等合成持续增加,促进细胞蛋白质酯化过程加快过度,从而可能不同程度地影响细胞的信号转导造成生理功能紊乱,如降低周期蛋白的表达水平,表现为细胞生长抑制,其深入的分子机制有待进一步研究。因此,下一步将重点进行 MVK 正常表达、低表达和高表达情况下, BxPC-3 细胞增殖相关情况及其相同条件下小 G 蛋白酯化情况及其介导的信号通路方面的研究。

参考文献

- [1] Rauthan M, Pilon M. The mevalonate pathway in *C. elegans* [J]. Lipids Health Dis, 2011, 10: 243.
- [2] Joo J H, Jetten A M. Molecular mechanisms involved in farnesol-induced apoptosis [J]. Cancer Lett, 2010, 287(2): 123-35.
- [3] Thurnher M, Nussbaumer O, Gruenbacher G. Novel aspects of mevalonate pathway inhibitors as antitumor agents [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(13): 3524-31.
- [4] Harrison L E, Wojciechowicz D C, Brennan M F, et al. Phenylacetate inhibits isoprenoid biosynthesis and suppresses growth of human pancreatic carcinoma [J]. Surgery, 1998, 124(3): 541-50.
- [5] Gelb M H, Brunsfeld L, Hrycyna C A, et al. Therapeutic intervention based on protein prenylation and associated modifications [J]. Nat Chem Biol, 2006, 2(10): 518-28.
- [6] Haas D, Hoffmann G F. Mevalonate kinase deficiencies: from mevalonic aciduria to hyperimmunoglobulinemia D syndrome [J]. Orphanet J Rare Dis, 2006, 1: 13.
- [7] Tricarico P M, Marcuzzi A, Piscianz E, et al. Mevalonate kinase deficiency and neuroinflammation: balance between apoptosis and pyroptosis [J]. Int J Mol Sci, 2013, 26; 14(12): 23274-88.
- [8] De Leo L, Marcuzzi A, Decorti G, et al. Targeting farnesyl-transferase as a novel therapeutic strategy for mevalonate kinase deficiency: *in vitro* and *in vivo* approaches [J]. Pharmacol Res, 2010, 61(6): 506-10.
- [9] Buhaescu I, Izzedine H. Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutical implications [J]. Clin Biochem, 2007, 40(9-10): 575-84.
- [10] Galle M, Crespo R, Kladniew B R, et al. Suppression by geraniol of the growth of A549 human lung adenocarcinoma cells and inhibition of the mevalonate pathway in culture and *in vivo*: potential use in cancer chemotherapy [J]. Nutr Cancer, 2014, 66(5): 888-95.

TLR4 乙酰化对 LPS-TLR4-NF- κ B 通路的影响及其在妊娠期糖尿病发病机制中的作用

李松 丛林 袁静 方慧琴 陈薇 李琴 杨琴

摘要 目的 研究 Toll 样受体 4 (TLR4) 乙酰化在妊娠期糖尿病 (GDM) 孕妇外周血单核细胞 (PBMC) 中的表达及其在内毒素 (LPS)-TLR4-核因子 κ B (NF- κ B) 通路中的作用, 进一步探讨 GDM 的炎症发病机制。方法 选取正常孕妇、GDM 孕妇各 30 例, 抽取静脉血 15 ml, 密度梯度离心法分离 PBMC 进行体外培养, 并保留血清用于检测 LPS 的量; 将研究分成正常组 (对照组)、正常 + LPS 组、GDM 组和 GDM + LPS 组。PBMC 用于免疫共沉淀法、Western blot 法检测 TLR4 乙酰化和 NF- κ B 蛋白的表达量; 上清液用于 ELISA 法检测炎症因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素-1 (IL-1)、白介素-10 (IL-10) 的水平。结果 正常孕妇、GDM 孕妇体内 LPS 量的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。GDM 组发生 TLR4 乙酰化变化,

而对照组未检测到 TLR4 乙酰化; LPS 干预后, 正常 + LPS 组、GDM + LPS 组 TLR4 乙酰化的程度明显增加, 且 GDM + LPS 组 TLR4 乙酰化程度明显高于 GDM 组和正常 + LPS 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。4 组 NF- κ B 的表达和炎症因子 TNF- α 、IL-1、IL-10 水平的差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。各组 TLR4 乙酰化与 NF- κ B 蛋白表达量之间具有正相关性 ($P < 0.05$)。结论 TLR4 乙酰化通过影响 LPS-TLR4-NF- κ B 通路的活化介导炎症因子的释放, 促进孕妇体内抗炎-致炎的失衡, 从而参与 GDM 的发生。

关键词 妊娠期糖尿病; 炎症; Toll 样受体 4; 乙酰化

中图分类号 R 714.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)01-0026-05

2015-10-20 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金项目 (编号: 1208085MH172), 安徽高校省级自然科学基金项目 (编号: KJ2011Z215)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院妇产科产前诊断中心, 合肥 230022

作者简介: 李松, 男, 硕士研究生;

丛林, 女, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: conglin1957@163.com

妊娠期糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) 的发病率在逐年上升, 其近、远期并发症给母儿健康带来了严重的危害。为预防和治疗 GDM, 其发病机制的研究显得尤为重要。目前认为, 胰岛功能受损、胰岛素抵抗 (insulin resistant, IR) 是 GDM 的主要病因。GDM 孕妇体内慢性炎症状态、抗炎-致

The construction of eukaryotic and shRNA expression vector of mevalonate kinase gene and its effect on cyclins expression in BxPC-3

Jin Rui, Wang Fang, Luan Kang, et al

(Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To construct the eukaryotic expression and shRNA expression vectors of mevalonate kinase (MVK) gene and study the effect on cyclins expression in BxPC-3 cells. **Methods** Total RNA was extracted from BxPC-3 cells, and the desired gene MVK was obtained by RT-PCR and acquiring chemical synthesis MVK (751-779) and MVK (1089-1117) locus oligo fragments. After construction of eukaryotic and shRNA expression vectors using genetic engineering, the recombinant was transfected into BxPC-3 and cell lines of stable expression were selected by antibiotic. Western blot was used to analyze the expression of MVK and cyclins in BxPC-3. **Results** MVK eukaryotic (pcDNA3.1-mvk) and two shRNA (piLenti-RNAi-shRNA1/2) expression vectors for MVK were successfully constructed. The cell lines with stable MVK over-expression and knockdown were obtained by antibiotic selection and Western blot. Western blot results showed that Cyclin B1 and Cyclin E expressed significantly lower both in BxPC-3 cell with MVK over-expression and MVK knockdown compared with the control. **Conclusion** Both MVK over expression and knockdown can inhibit the expression of Cyclin B1, Cyclin E in BxPC-3.

Key words mevalonate kinase; genetic recombination; oligos; cyclins; BxPC-3 cell; shRNA