

• 基础实验研究论著 •

XIAP 基因 3'非翻译区荧光素酶报告载体的构建及活性分析*

董 宁¹, 葛高霞¹, 张炜明², 朱 伟³, 徐华国^{1△}

(南京医科大学第一附属医院:1. 检验学部;2. 病理学部;3. 肿瘤科, 江苏南京 210029)

摘 要:目的 构建重组 X 连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)基因 3'非翻译区(3'UTR)荧光素酶报告载体,分析可能调控 XIAP 基因表达的 microRNA(miRNA)。方法 采用聚合酶链反应(PCR)从人 cDNA 中扩增 XIAP-3'UTR 序列,插入荧光素酶报告载体 pGL3-Ctrl,获得重组载体 pGL3-Ctrl/XIAP;采用 Target Scan 6.2 软件预测可能与 XIAP-3'UTR 结合的 miRNA;将 pGL3-Ctrl/XIAP 重组质粒和 miRNA 共转染 A549 细胞,测定 XIAP-3'UTR 荧光素酶的活性。结果 酶切及核酸测序证实,成功构建了 XIAP-3'UTR 序列的荧光素酶报告重组子;miRNA 靶位点的预测显示,XIAP 基因可能是 miR-200b、miR-200c 和 miR-429 的作用靶标;与 miRNA mimic ctrl 组比较,miR-200b、miR-200c 和 miR-429 能明显降低 pGL3-Ctrl/XIAP 的荧光素酶活性,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 成功构建了 XIAP-3'UTR 荧光素酶报告载体,且 miR-200b、miR-200c 和 miR-429 可显著降低其荧光素酶的活性。

关键词:X 连锁凋亡抑制蛋白; 3'非翻译区; 微小 RNAs; 荧光素酶类,细菌; 载体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.09.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)09-1098-03

Construction of XIAP-3'UTR-luciferase reporter vector and its activity analysis*

Dong Ning¹, Ge Gaoxia¹, Zhang Weiming², Zhu Wei³, Xu Huaguo^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Pathology; 3. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

Abstract: **Objective** To construct the recombinant X-linked inhibitor of apoptosis protein(XIAP) gene 3' untranslated region (3'UTR)-luciferase reporter vector, and analyze the microRNA(miRNA) which possibly regulate the expression of XIAP gene. **Methods** Polymerase chain reaction(PCR) was employed to amplify XIAP-3'UTR sequences from human cDNA, in which luciferase reporter vector pGL3-Ctrl was inserted, and the recombinant vector pGL3-Ctrl/XIAP was gained. Target Scan 6.2 software was adopted to predict the miRNA which possibly combined with the XIAP-3'UTR. pGL3-Ctrl/XIAP recombinant plasmids and the miRNA were co-transfected into A549 cells, and the XIAP-3'UTR-luciferase activity was measured. **Results** Confirmed by digestion and DNA sequencing, the XIAP-3'UTR-luciferase reporter recombinant was successfully constructed. Prediction of miRNA target sites indicated that XIAP gene may be the target of miR-200b, miR-200c and miR-429. Compared with miRNA mimic ctrl group, miR-200b, miR-200c and miR-429 significantly reduced the luciferase activity of pGL3-Ctrl/XIAP with statistically significant difference($P<0.05$). **Conclusion** XIAP-3'UTR-luciferase reporter vector is successfully constructed. miR-200b, miR-200c and miR-429 can obviously decrease the luciferase activity.

Key words:X-linked inhibitor of apoptosis protein; 3' untranslated region; microRNA, miRNAs; luciferases, bacterial; vectors

X 连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)是已知的凋亡抑制蛋白(inhibition of apoptosis protein, IAP)中凋亡抑制功能极强的因子之一,它可以直接结合和抑制半胱-天冬氨酸蛋白酶(cysteinyI aspartate specific protease, Caspase),导致细胞凋亡受到抑制。研究表明, XIAP 异常高表达与肿瘤的预后差及化疗、放疗抵抗密切相关^[1-2]。XIAP 的高表达可能在肿瘤细胞介导的凋亡机制中发挥重要作用^[3-5]。微 RNA(microRNA, miRNA)是生物体内源性的非编码小 RNA,在物种进化中相当保守,长度为 19~25 个核苷酸。其通过与靶 mRNA 的 3'非翻译区(3' untranslated region, 3'UTR)部分互补配对而在转录后水平上对基因的表达进行调控,导致 mRNA 的降解或翻译抑制^[6]。目前的研究证实 miRNA 参与了细胞凋亡的调控^[7]。因此,为分析可能调控 XIAP 基因表达的 miRNA,笔者构建了 XIAP-3'UTR 的荧光

素酶报告载体,并初步分析了可能调控其表达的 miRNA。

1 材料与方法

1.1 材料 人肺癌 A549 细胞株购于美国标准菌库(American Type Culture Collection, ATCC),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、Dulbecco's 改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)购自美国 Gibco 公司,体外脂质体转染试剂 Lipofectamine™ 2000、OPTI-MEM 及质粒 DNA 提取试剂盒为美国 Invitrogen 公司产品,荧光素酶载体 pGL3-Ctrl、pRL-TK、虫荧光素酶分析试剂盒为美国 Promega 公司产品,高保真 Taq 酶、限制性内切酶 Xba I、T₄ DNA 连接酶、胶中回收 DNA 试剂盒为日本 TaKaRa 公司产品。

1.2 生物信息学分析 利用 Target Scan 6.2 软件对 XIAP-3'UTR 可能作用的 miRNA 进行预测分析。

1.3 荧光素酶报告载体的构建 以人 cDNA 为模板,用聚合

* 基金项目:国家自然科学基金青年项目(81302531);江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20131018)。 作者简介:董宁,女,检验师,主要从事医学免疫学检验工作。 △ 通讯作者, E-mail: huaguoxu@njmu.edu.cn。

酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增人 XIAP 基因的 3' 侧翼区, 正向引物为: 5'-CGG ATC CTA GCT GAT TTA AAG GCT TAG GCA TG-3' (划线部分为 *Xba* I 酶切位点); 反向引物为: 5'-GGA ATC CTA ACA TCT TAA TCA TCC TAA CGG TA-3' (划线部分为 *Xba* I 酶切位点)。PCR 产物切胶纯化后, 将 PCR 产物及载体 pGL3-Ctrl 经 *Xba* I 酶切、纯化, 目的片段与载体于 16 °C 连接 12 h, 将连接产物转化至大肠埃希菌 DH5 α , 酶切鉴定为阳性克隆, 得到阳性重组子 pGL3-Ctrl/XIAP, 然后由上海英骏生物技术有限公司进行序列测定。

1.4 细胞培养 取液氮冻存的人肺腺癌 A549 细胞,复苏,接种于含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中,培养基中含 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素,置于 5% CO₂、37 °C 恒温、恒湿培养,胰酶消化传代,每 1~2 d 更换培养基。

1.5 瞬时转染 取对数生长期的 A549 细胞,于转染前 24 h 铺板,使转染前的细胞密度达 80%左右;利用 Lipofectamine™ 2000 试剂进行转染,miRNA 和重组载体的使用量分别为 60 pmoL 和 20~200 ng,pRL-TK 作为标准内质量控制,以校正各实验组之间的差异。将实验分组如下:(1)共转 miRNA mimic 和 pGL3-Ctrl/XIAP 组;(2)共转 miR-200b 和 pGL3-Ctrl/XIAP 组;(3)共转 miR-200c 和 pGL3-Ctrl/XIAP 组;(4)共转 miR-429 和 pGL3-Ctrl/XIAP 组。转染 24 h 后进行相关检测。

1.6 荧光素酶活性检测 采用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)洗涤细胞 2 次,加入 100 μL 1 $\times$ 裂解缓冲液,用细胞刮将细胞刮下,移入 1.5 mL EP(eppendorf)管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 离心 2 min,取 50 μL 上清液,按试剂说明书进行操作,用化学发光检测仪检测并报告质粒的荧光素酶活性。

1.7 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,每组实验重复 3 次,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析和 t 检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 重组 pGL3-Ctrl/XIAP 荧光素酶报告质粒的构建与鉴定 经PCR扩增,获得长度为 538 bp 的 XIAP-3'UTR 序列。将该片段用 *Xba* I 单酶切后与线性化的 pGL3-Ctrl 载体相连,转化感受态大肠埃希菌。随机挑取阳性克隆扩增后提取质粒,进行 *Xba* I 酶切鉴定,结果产生大小约 5 000 bp 和 538 bp 的 2 个条带,表明该质粒经酶切鉴定正确。测序序列与美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的报告序列完全一致,重组质粒构建成功,并将其命名为 pGL3-Ctrl/XIAP,见图 1。

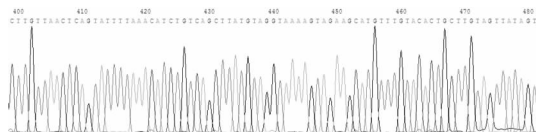


图 1 pGL3-Ctrl/XIAP 部分测序图

2.2 XIAP-3'UTR 存在 miR-200b、miR-200bc 和 miR-429 的结合位点 根据 Target Scan 6.2 软件数据库,在 1 255~1 261 bp位置预测到 1 个在不同种属之间高度保守的 miR-200b、miR-200bc、miR-429 结合位点,见图 2。

2.3 miR-200b、miR-200c 和 miR-429 与 XIAP-3'UTR 靶向结合的鉴定结果 为初步探讨 miR-200b、miR-200c 或 miR-429 是否能够靶向结合 XIAP-3'UTR, 分别将 miR-200b、miR-

200c、miR-429 和 miRNA mimic 与 pGL3-Ctrl/XIAP 共转染至 A549 细胞中,应用荧光素酶报告系统检测转染后各组的细胞荧光素酶活性,检测结果见图 3。与 miRNA mimic 比较,miR-200b、miR-200c 和 miR-429 能明显降低 pGL3-Ctrl/XIAP 的荧光素酶活性,差异有统计学意义($P<0.05$)。

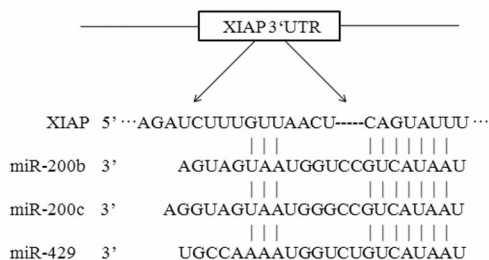


图2 XIAP-3'UTR miRNA 靶点预测结果

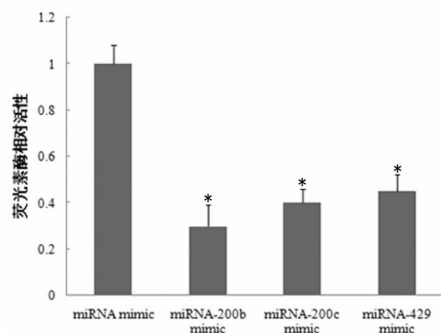
* : $P < 0.05$, 与 miRNA mimic 比较。

图 3 pGL3-Ctrl/XIAP 与 miRNA 转染 A549 细胞
相对荧光素酶活性测定

3 讨 论

XIAP 是 IAP 家族中的一员,其分子结构中包含 2 个特征性结构域:(1)N-末端 3 个杆状病毒 IAP 重复结构域(baculovirus IAP repeat domain, BIR),即 BIR-1、BIR-2 和 BIR-3;(2)C-末端由 1 个环状锌指结构组成,为基因的 4 个开放阅读框转录翻译形成^[8]。XIAP 能够分别通过 BIR-2 和 BIR-3 结构域竞争性结合 Caspase-3、-7 和 -9,从而抑制 Caspase 级联反应,阻止凋亡的发生。因此,XIAP 被认为是 IAP 家族成员中最具潜在抑制活性的蛋白质^[9]。已有研究表明,XIAP 在肺癌、胰腺癌等肿瘤中高度表达,并可能在这些肿瘤的化疗、放疗抵抗中发挥重要的作用^[1-3]。因此,在肺癌、胰腺癌等肿瘤的治疗过程中,抑制 XIAP 的表达能有效逆转肿瘤细胞的凋亡抵抗,从而增强其化疗敏感性。

目前发现,多种天然药物增强肿瘤对传统化疗药物的化疗敏感性,与肿瘤中 *XIAP* 的表达水平密切相关。人工合成的百里香酚类似物 TQ-2G、TQ-4A1 和 TQ-5A1 正是通过抑制其靶基因 *XIAP* 等的表达,显著增强吉西他滨和奥沙利铂诱导的对吉西他滨耐药的胰腺癌细胞的凋亡^[10]。联合马斯里酸治疗,能通过抑制 *XIAP* 等抗凋亡蛋白的表达,增强肿瘤坏死因子 α 诱导的细胞凋亡,抑制细胞增殖^[11]。

miRNA 的发现为基因调控研究提供了新的方向,人们认识到使用特定基因的靶向 miRNA 进行肿瘤治疗的重要性和可行性。miRNA 是一类长度为 19~25 个核苷酸的非编码小分子 RNA,主要通过 与靶基因 mRNA 3'UTR 的完全或不 完全配对,引起 mRNA 的降解或翻译抑制,从(下转第 1102 页)

苗,患者局部出现红肿的概率更小,对儿童更安全。1999 年美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration,FDA)及欧洲药品评价局(European Medicines Evaluation Agency,EMA)为使疫苗更为安全,要求疫苗生产停止使用硫柳汞。在最终产品中不添加防腐剂。通过试生产的 3 批不含硫柳汞的儿童剂量流感病毒裂解疫苗的保存结果分析,H1N1、H3N2 及 B 血凝素浓度下降的最大幅度分别为 14.54%、17.15% 及 11.03%(下降值分别为 1.06、1.41 及 0.75 g);加速稳定性试验显示,H1N1、H3N2 及 B 血凝素浓度的最大降幅分别为 13.99%、15.82%、10.16%(下降值分别为 1.02、1.31、0.69 g)。为确保疫苗质量,对保存的各型别半成品在使用时有必要进行血凝素浓度的检测,以确保半成品的血凝素浓度在控制范围内。笔者所在单位根据稳定性试验结果,在配制儿童剂量疫苗时,将血凝素浓度的企业内控标准规定为 33~36 μg/mL。在 2011 年制备的儿童剂量流感疫苗中含有较高的血凝素,提供了足够的抗原量,保证了疫苗的有效性;在疫苗制备过程中不添加防腐剂,降低了不良反应的发生。动物实验显示其安全性和免疫性与国外疫苗效果基本一致,免疫后 H1N1、H3N2 和 B 型抗体阳性率(抗体滴度不小于 1:40)分别达 94%、97% 和 70%;各型抗体的几何平均滴度(geometric mean titer,GMT)增加值均超过 4 倍以上,H1N1、H3N2 和 B 分别为 30、24、8 倍,具有良好的安全性和免疫性^[13],为制备不含防腐剂、安全、有效的流感病毒裂解疫苗的研究及应用提供了依据。

参考文献

[1] New influenza A (H1N1) virus: global epidemiological situation, June 2009[J]. Wkly Epidemiol Rec, 2009, 84(25): 249-257.
[2] World Health Organization. New influenza A (H1N1) virus: global epidemiological situation, June 2009[J]. Wkly Epidemiol Rec, 2009, 84(25): 249-257.

(上接第 1099 页)

而在转录水平上调控基因的表达^[6]。miRNA 能通过调控其下游靶基因的表达而参与调控细胞的凋亡、增殖以及分化等^[12]。

本研究根据 Target Scan 6.2 软件,在 1 255~1 261 bp 位置预测到一个在不同种属中高度保守的 miR-200b、miR-200c 和 miR-429 结合位点,并且通过分子克隆及荧光素报告系统,确定 miR-200b、miR-200c 和 miR-429 能靶向负性调控 XIAP-3'UTR。今后,仍需进一步通过蛋白质印迹技术检测 miRNA 对 XIAP 蛋白表达水平的影响,从而确定调控 XIAP 表达的 miRNA。总之,本研究为寻找可能调控 XIAP 基因表达的 miRNA 奠定了实验基础,并为提高化疗药物敏感性提供了新的思路。

参考文献

[1] Wong HH, Lemoine NR. Pancreatic Cancer: molecular pathogenesis and new therapeutic targets[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2009, 6(7): 412-422.
[2] Fulda S. Apoptosis pathways and their therapeutic exploitation in pancreatic Cancer[J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(7): 1221-1227.
[3] Lacasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, et al. IAP-targeted therapies for Cancer[J]. Oncogene, 2008, 27(48): 6252-6275.
[4] Hunter AM, Lacasse EC, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as Cancer targets[J]. Apoptosis, 2007, 12(9): 1543-1568.

[3] 赵凯,章以和,李河民,等.医学生物制品学[M].2 版.北京:人民卫生出版社,2007.
[4] 曾祥兴,李康生.流感百年:20 世纪流感大流行的回顾与启示[J].医学与社会,2010,23(11):4-6.
[5] Fiore AE, Shay DK, Broder K, et al. Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2008[J]. MMWR Recomm Rep, 2008, 57(RR-7): 1-60.
[6] Hanquet G, Van Damme P, Brasseur D, et al. Lessons learnt from pandemic A(H1N1) 2009 influenza vaccination. Highlights of a European workshop in Brussels (22 March 2010) [J]. Vaccine, 2011, 29(3): 370-377.
[7] Centers for Disease Control and Prevention. Prevention and control of seasonal influenza with vaccines. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices—United States, 2013-2014[J]. MMWR Recomm Rep, 2013, 62(RR-07): 1-43.
[8] Gerdil C. The annual production cycle for influenza vaccine[J]. Vaccine, 2003, 21(16): 1776-1779.
[9] Wood JM, Dunleavy U, Newman RW, et al. The influence of the host cell on standardisation of influenza vaccine potency[J]. Dev Biol Stand, 1999, 98(1): 183-188.
[10] 郭元吉,程小雯.流行性感病毒及其实验技术[M].4 版.北京:中国三峡出版社,1997.
[11] 邵铭,刘书珍,邱平,等.2011 年流感疫苗批签发情况总结与质量分析[J].中国生物制品学杂志,2012,25(9):1242-1244.
[12] 张延龄,张晖.疫苗学[M].北京:科学出版社,2006:1171-1185.
[13] 戴宗祥,王湘宜,王俊,等.流感病毒裂解疫苗儿童剂型在小鼠中的安全性及免疫原性研究[J].国际检验医学杂志,2012,33(15): 1793-1794.

(收稿日期:2014-01-11)

[5] Krepela E, Dankova P, Moravcikova E, et al. Increased expression of inhibitor of apoptosis proteins, survivin and XIAP, in non-small cell lung carcinoma[J]. Int J Oncol, 2009, 35(6): 1449-1462.
[6] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. Cell, 2009, 136(2): 215-233.
[7] Mourtada-Maarabouni M, Watson D, Munir M, et al. Apoptosis suppression by candidate oncogene PLAC8 is reversed in other cell types[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2013, 13(1): 80-91.
[8] Dufournet C, Uzan C, Fauvet R, et al. Expression of apoptosis-related proteins in peritoneal, ovarian and colorectal endometriosis [J]. J Reprod Immunol, 2006, 70(1/2): 151-162.
[9] Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family[J]. EMBO Rep, 2006, 7(10): 988-994.
[10] Banerjee S, Azmi AS, Padhye S, et al. Structure-activity studies on therapeutic potential of Thymoquinone analogs in pancreatic Cancer[J]. Pharm Res, 2010, 27(6): 1146-1158.
[11] Li C, Yang Z, Zhai C, et al. Maslinic acid potentiates the anti-tumor activity of tumor necrosis factor alpha by inhibiting NF-kappaB signaling pathway[J]. Mol Cancer, 2010, 9: 73.
[12] Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in cancer[J]. Annu Rev Med, 2009, 60: 167-179.

(收稿日期:2013-12-15)