

细胞周期蛋白 D1 特异性核酶表达载体的构建及其活性

夏金荣 黄晓明 刘乃丰* 胡向阳

(东南大学临床医学院, 南京 210009)

摘要 应用 mfold 程序对锤头状核酶(ribozyme, Rz)和大鼠细胞周期蛋白(cyclin) D1 基因的二级结构进行分析, 设计合成锤头状 Rz 基因, 通过 RT-PCR 扩增获得大鼠细胞周期蛋白 D1 目的基因, 将 Rz 基因和细胞周期蛋白 D1 基因分别克隆入载体 pGEM-3Zf (+)中, 体外转录 Rz 基因和靶基因并进行切割实验; 将 Rz 基因与逆转录病毒载体 pLXSN 重组得到 Rz 真核表达载体 pLXSN-Rz, 将其转染入 HSC-T6 细胞, G418 筛选出阳性细胞克隆, 用 RT-PCR 检测细胞周期蛋白 D1 基因的表达。结果显示: 针对目的基因的 832 位点设计合成了 Rz832, 成功获得 Rz832 基因、细胞周期蛋白 D1 mRNA 的体外转录载体 pGEM3Zf-Rz832 和 pGEM3Zf-cD1, 经体外转录出 Rz832 (105 nt)及细胞周期蛋白 D1 mRNA (1 079 nt)。体外切割实验证实 Rz832 能够特异性切割细胞周期蛋白 D1 mRNA, 产生 1 014 nt 和 65 nt 的切割产物, 切割效率为 80%。所构建的 pLXSN-Rz832 经酶切电泳、PCR 鉴定显示, 插入的 Rz832 序列大小约为 57 bp, 与预期结果相同, 经测序证实 Rz832 序列正确。转染 pLXSN-Rz832 的肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)细胞周期蛋白 D1 mRNA 的表达受到明显抑制, 仅为对照组的 42.22% ($t=-193.443, P<0.01$), 结果表明: Rz832 能够在体外特异性切割细胞周期蛋白 D1 mRNA、并在 HSC-T6 细胞内有效抑制细胞周期蛋白 D1 基因的表达。

关键词 核酶; 细胞周期蛋白 D1; 体外转录; 切割

细胞周期蛋白(cyclin)D1 由位于染色体 11q13 区的细胞周期蛋白 D1 基因(CCND1)编码, 是参与细胞周期调控的周期蛋白(cyclins)家族成员和 G₁ 期细胞增殖信号的关键蛋白质, 在 G₁/S 期转换中发挥着重要的作用^[1]。细胞周期蛋白 D1 超常表达可使细胞缩短 G₁ 期, 加速进入 S 期; 阻断细胞周期蛋白 D1 的作用则可使细胞阻滞于 G₁ 期, 使细胞增殖受到抑制^[2,3]。已发现 CCND1 基因的扩增或蛋白质的过度表达与多种恶性肿瘤的发生、发展和预后密切相关^[4-6]。研究显示^[7], 肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)的激活和增殖也与细胞周期蛋白 D1 的高表达有密切关系, 是肝纤维化发病机制的重要环节。锤头状核酶(ribozyme, Rz)是一类具有自我剪切和催化活性的 RNA 分子, 其特异性序列可通过碱基配对识别、结合并催化裂解靶 RNA, 以抑制某些特异性基因的表达^[8,9], 自发现以来已成为研究某一特定基因功能和基因治疗更具特异性的手段^[10,11]。根据 Rz 的这一特性, 我们以细胞周期蛋白 D1 mRNA 为靶位, 设计合成特异性的锤头状 Rz, 构建了 Rz 基因及其靶基

因的体外转录载体和 Rz 真核表达载体, 探讨了 Rz 在体外对细胞周期蛋白 D1 mRNA 的切割作用和在内 HSC-T6 细胞内抑制细胞周期蛋白 D1 表达的活性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、细胞株 质粒 pGEM-3Zf(+)购自美国 Promega 公司, 逆转录病毒质粒 pLXSN 为 Clontech 公司产品, 大鼠 HSC-T6 细胞株由美国西奈山医学院 Scott L. Friedman 教授惠赠。

1.1.2 试剂 Taq DNA 聚合酶、Klenow 酶、Rnasin、SP6 和 T7 转录试剂盒、一步法 RT-PCR 试剂盒、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶(*ScaI*、*BglII*、*HindIII*、*EcoRI*、*BamHI*)购自 TaKaRa 公司, X-gal、dNTP、IPTG、DEPC 等为 BBI 产品, [α -³²P]UTP 购自北京

收稿日期: 2006-08-11 接受日期: 2006-10-26

镇江市社会发展基金资助项目(No.SH2002020)

通讯作者: Tel: 025-83272001, Fax: 025-83272010, E-mail:

liunf@seu.edu.cn

亚辉生物工程公司, Trizol 试剂为 Invitrogen 公司产品。

1.1.3 DNA 片段、引物合成和DNA序列分析 由上海生物工程有限公司合成及测序。

1.2 方法

1.2.1 Rz 的设计与合成 以细胞周期蛋白D1 mRNA(GenBank 登录号为 NM-171992)为靶序列, 参照 Haseloff 等^[12]提出的锤头状 Rz 设计原则, 采用 mfold 软件辅助设计。利用 Rz 3' 端的 GA 再加上 ATTC 形成 *Bgl*II 酶切位点以便于 Rz 重组质粒的鉴定, 再分别于其 5' 端和 3' 端引入 *Eco*RI 和 *Bam*HI 酶切位点, 以便于克隆组装。合成的 Rz 基因经 160 g/L PAGE(7 mol/L 尿素)变性凝胶电泳纯化, 两条核苷酸链各取 0.5 μ g, 分别加入退火缓冲液混匀, 置 95 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 缓慢冷却至室温即为 Rz 基因片段。

1.2.2 Rz 基因体外转录载体的构建 分别用 *Eco*RI 和 *Bam*HI 对 Rz 基因片段和 pGEM3Zf (+) 质粒进行双酶切, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳并回收其酶切产物。取适量双酶切后的 Rz 基因片段与 pGEM-3Zf (+) 骨架片段(摩尔比约 10 : 1)连接, 构建 Rz 基因体外转录载体 pGEM3Zf (+)-Rz。将其转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 后行质粒抽提和酶切、PCR 法鉴定及 DNA 测序。

1.2.3 靶基因体外转录载体的构建 取 5×10^6 个 HSC-T6 细胞, 用 Trizol 试剂提取总 RNA, 以 AMV 逆转录酶和 pd(N)6 六核苷酸随机引物 42 $^{\circ}$ C 反应 1 h 合成细胞周期蛋白 D1 cDNA, 再以 CCND1 基因特异引物(其序列为 CCND1F: 5'-GAGAATTCCATGGAAC-ACCAGCTCCTGTGCTGCG-3' 和 CCND1R: 5'-GCG-GATCCTCAGATGTCCACATCTCGGACGTCGG-3') 进行 PCR 扩增得到靶基因目的片段。扩增产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳回收, *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切, 再与同样双酶切后的 pGEM3Zf (+) 骨架片段连接, 构建靶基因体外转录载体 pGEM3Zf (+)-cD1。将其转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 后行质粒抽提和酶切、PCR 法鉴定及 DNA 测序。

1.2.4 Rz 体外转录及对靶 RNA 的切割 分别用 *Hind*III 对 Rz 和靶基因重组质粒进行酶切使之线性化, 利用其质粒中的 T7 启动子进行体外 RNA 转录, 反应条件参照试剂盒说明。靶基因的体外转录以同位素 [α -³²P]UTP 标记。将转录的 Rz RNA 和靶 RNA 以适当比例混合进行切割反应, 在 20 mmol/L MgCl₂, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0 的缓冲体系中 37 $^{\circ}$ C 切割 1

h。转录和切割产物用含 7 mol/L 尿素的 50 g/L PAGE 电泳分离, 放射自显影观察结果。

1.2.5 Rz 重组逆转录病毒载体的构建 分别以 *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切 Rz 基因片段和 pLXSN 质粒, 琼脂糖凝胶电泳并回收酶切产物, 按摩尔比 10 : 1 混合总量为 100 ng 的酶切大、小片段, 加入 T4 DNA 连接酶, 定向将 57 bp 的 Rz DNA 片段克隆于质粒 pLXSN 上, 构建 Rz 重组逆转录病毒载体 pLXSN-Rz。将其转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 后行质粒抽提和序列分析, 测序引物为: 5'-CCCTTGAACCTCC-TCGTTTCGACC-3' 和 5'-GAGCCTGGGGACTTCCA-CACCC-3'。

1.2.6 pLXSN-Rz 转染 HSC-T6 细胞 pLXSN-Rz 以 250 nmol/L 的浓度转染传代培养 24 h 的 HSC-T6, 同时以空白及转染 pLXSN 作为对照。转染前更换无血清的 DMEM 培养基每孔 500 μ l, pLXSN-Rz 与脂质体按等体积混匀, 室温温育 20~25 min 后加入 6 孔板中。48 h 后抽提总 RNA 进行检测。

1.2.7 RNA 抽提及 RT-PCR 检测细胞周期蛋白 D1 基因表达 按 Trizol 说明书抽提细胞总 RNA, 溶于 20 μ l DEPC-H₂O, 加 2.5 μ l DNA 酶, 2.5 μ l 10 \times 反应缓冲液, 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 65 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 消化基因组中残余 DNA, 测 A₂₆₀/A₂₈₀ 值, 计算 RNA 得率, 调整 RNA 浓度。细胞周期蛋白 D1 引物 (422 bp): 上游: 5'-AGATGAAGGAGACCATTCCC-3'; 下游: 5'-TTCAATCTGTTTCTGGCAGG-3'。GAPDH 引物 (309 bp): 上游: 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'; 下游: 5'-AGATCCACAACGGATACATA-3'。按日本 TaKaRa 公司一步法试剂盒说明书操作, 取 4 μ l 模板进行反应。反应条件为 RT: 42 $^{\circ}$ C 60 min; PCR: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 45 min, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 28 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。取 8 μ l PCR 产物, 加 1 μ l 6 \times 上样缓冲液混匀, 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 以 Kodak EDAS120 凝胶电泳分析系统对电泳条带进行光密度分析。

1.2.8 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS12.0 软件进行 *t* 检验分析, *P* < 0.05 为有统计学差异。

2 结果

2.1 计算机辅助设计的 Rz 序列

在细胞周期蛋白 D1 mRNA 的编码区 (126~1 013) 有锤头结构候选 Rz 的自然切割位点 (GUC) 8 个, 分别

为 206、325、355、393、832、894、971 和 994, 计算机辅助设计发现其中第 832 位切点附近二级结构暴露, 能级参数比较理想, 核酶二级结构预测较好。在 832 位切点 Rz 序列两端引入 *EcoRI* 和 *BamHI* 酶切位点, 成为 cDNA 及互补序列: 有义链 DNA 5'-GAAT-TCTCTTTCCAGAGTTTCGTCTCACGGACTCA-TCAGATCAAGT-3'; 反义链 DNA 5'-GGATCCACT-TGATCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACTCTG-GAAAGA-3'(下划双线部分为 Rz 催化中心, 下划单线部分为 Rz 特异性结合序列, 未划线部分为 *EcoRI* 和 *BamHI* 酶切位点。), 并模拟 Rz832 与靶 RNA 切点两翼碱基作用的二级结构模型(图 1)。

2.2 pGEM3Zf(+)-Rz832 的克隆酶切、PCR 鉴定及重组子 DNA 序列分析

酶切鉴定: 将构建的 Rz832 基因体外转录载体 pGEM3Zf(+)-Rz832 转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 后抽提质粒, 用 *Bgl*II 和 *Sca*I 酶切 1.5 h, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 双酶切后的片段分别长为 1 433 bp 和 1 799 bp(图 2), 符合原设计意图, 而 pGEM3Zf(+)做相同酶切后所得到一条约 3.2 kb 片段。PCR 鉴定: 以 M13 通用测序引物(M13~47 和 M13~48)进行 PCR 扩增。PCR 反应体积为 25 μ l, 内含: ddH₂O 10 \times PCR 缓冲液, 4 \times dNTP, 2.0 mmol/L MgCl₂, 两种引物各 15 pmol, 1 μ l pGEM3Zf(+)-Rz 阳性克隆菌液, 石蜡油 2D。PCR 循环参数: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 72 $^{\circ}$ C 加 1 μ l Taq DNA 聚合酶, 进入循环后按: 94 $^{\circ}$ C 45 s, 56 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳得到约 220 bp 的 PCR 产物为正确的克隆。挑取正确的克隆测序, 结果证实插入的 Rz 基因片段序列与设计的片段完全一致, 表明载体构建正确。pGEM3Zf(+)-Rz 的测序结果见图 3, 37~93 位是插入的编码 Rz832 的 DNA 反义链。

2.3 pGEM3Zf(+)-cD1 的克隆酶切、PCR 鉴定及重组子 DNA 序列分析

酶切鉴定: 将构建的靶基因体外转录载体 pGEM3Zf(+)-cD1 转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 后抽提质粒, 经 *Hind*III 和 *EcoRI* 酶切 1.5 h, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 双酶切后的小片段长约 935 bp, 证实为 CCND1 插入片段。而 pGEM3Zf(+)做相同酶切后所得到的的小片段长约 51 bp。PCR 鉴定: PCR 扩增得到约 1 074 bp 的 PCR 产物为正确的克隆。挑取正确的克隆测序, 结果显示插入的 CCND1 基因片段序列与基因文库中提供的细胞周期蛋白 D1 mRNA 序

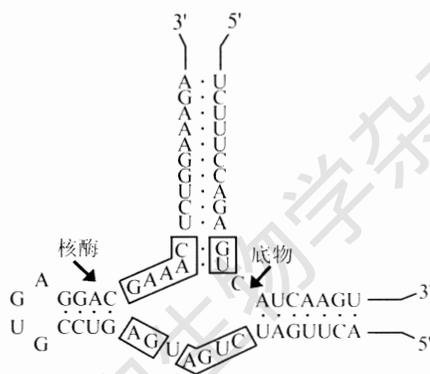


图 1 Rz832 与细胞周期蛋白 D1 mRNA 切点两翼碱基作用的二级结构模型

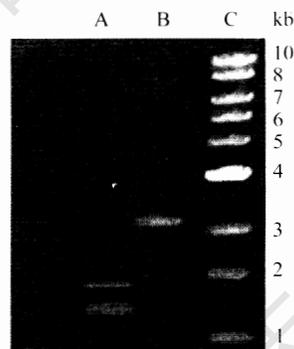


图 2 pGEM3Zf(+)-Rz832 *Bgl*II+*Sca*I 双酶切分析

A: pGEM3Zf-Rz; B: pGEM3Zf(+); C: DNA ladder marker。

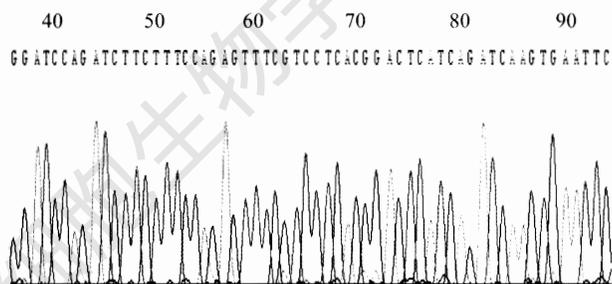


图 3 pGEM3Zf(+)-Rz832 测序鉴定图

37~93 位是插入的编码 Rz832 的 DNA 反义链

列完全一致, 表明载体构建正确。

2.4 Rz832 在体外对靶 RNA 的切割作用

pGEM3Zf(+)-Rz832 和 pGEM3Zf(+)-cD1 分别经 T7 RNA 聚合酶转录出长 105 nt 的 Rz(Rz832)和长 1 079 nt 的底物细胞周期蛋白 D1 mRNA, 以 Rz : 底物 = 5 : 1 的摩尔比浓度进行体外切割反应。切割反应产物进行含 8 mol/L 尿素的 50 g/L 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 放射自显影, 结果显示 Rz832 可切割靶 RNA 产生 1 014 nt 和 65 nt 两条片段, 与预期相符(图 4), 经图像扫描分析, Rz 1 h 的切割效率为 80%。

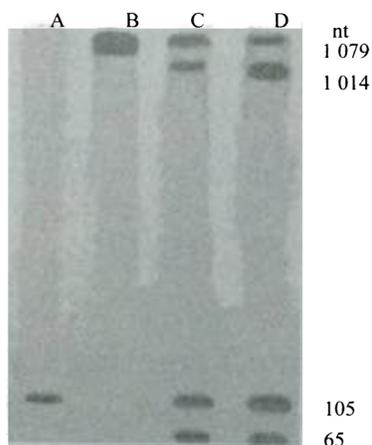


图4 Rz832对靶基因的体外切割作用

A: 核酶; B: 底物; C: 核酶:底物=1:1(摩尔比); D: 核酶:底物=5:1(摩尔比)。

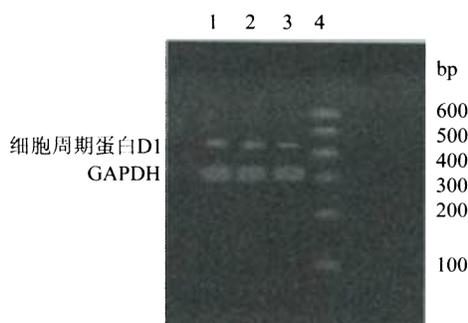


图5 pLXSN-Rz832抑制HSC-T6细胞细胞周期蛋白D1基因表达

1: 空白对照组; 2: 转染pLXSN组; 3: 转染pLXSN-Rz832组。

2.5 pLXSN-Rz的鉴定

Rz基因与pLXSN连接后得到重组质粒pLXSN-Rz,用PCR鉴定可扩增出相应的Rz基因插入带。pLXSN-Rz的DNA测序结果证实插入的Rz基因片段序列与设计的完全一致。

2.6 Rz832在HSC-T6内显著抑制细胞周期蛋白D1 mRNA表达

RT-PCR结果经计算机灰度扫描并与内参照GAPDH比较分析显示:转染pLXSN-Rz832组的灰度比明显降低,细胞周期蛋白D1 mRNA的表达量较pLXSN对照组下调 $(57.78 \pm 2.22)\%$ ($t = -193.443, P < 0.01$) (图5),表明Rz832在mRNA水平能显著抑制细胞周期蛋白D1基因表达。

3 讨论

自Cech等^[13]发现PNase P分子中的RNA组分具有催化活性以来,人们陆续发现和研究了多种类型

的Rz,包括I类内含子、II类内含子、RNAase P、锤头状Rz、发夹状Rz和斧头状Rz。它们的结构和作用方式各不相同,其中锤头状Rz由于其结构相对简单、容易设计和合成,可操作性强并具有:(1)序列特异性;(2)不编码蛋白质,无免疫原性;(3)可以重复使用;(4)与目前所用的反义RNA或反义寡核苷酸相比,对靶RNA具有特异性封闭和切割双重作用,且其作用较后者强等独特的优点而使其在基因治疗领域中倍受青睐^[14,15]。随着对Rz的深入研究,已经认识到Rz在治疗遗传病、肿瘤和病毒性疾病上的潜力。

Rz是一类具有酶活性的RNA分子,可序列特异性切割靶RNA,RNA干扰(RNAi)是一种发生于mRNA水平的转录后基因沉默^[16-18],两者都能特异性地抑制有害基因的表达。虽然RNA干扰技术以其简便、高特异性和高效性等显著优势在基因功能组和生物医学的广泛应用中均取得了显著的基因沉默效果,但RNA干扰并不能完全替代核酶等技术。有证据表明^[19],RNA干扰主要在哺乳动物细胞的细胞质发挥作用,而针对定位于细胞核内的RNA序列没有观察到基因沉默效应;但核酶可以应用于针对核定位的RNA分子,并抑制其表达。细胞周期蛋白D1 mRNA是定位于细胞核内的RNA分子,故本研究仍选用了核酶表达载体途径。

体外合成的Rz基因首次克隆时,由于Rz基因末端无磷酸化而相对较难,特别是由于Rz基因较小(一般仅几十个bp),重组子鉴定困难,使Rz基因的首次克隆成了整个实验的关键步骤,为此,我们采用酶切电泳和PCR法双重鉴定以保证Rz基因克隆的准确性。

本研究证实:所制备的抗细胞周期蛋白D1 Rz832在体外能有效切割靶RNA,在HSC-T6细胞内也可显著抑制细胞周期蛋白D1基因的表达,但其胞内抑制活性(57.78%)较胞外切割活性(80%)低,这可能与HSC-T6细胞内细胞周期蛋白D1 mRNA所形成的二级或三级结构影响Rz与其结合及剪切、与Rz转染细胞的亚细胞器分布、Rz受核酸酶的降解和Rz与核蛋白体形成的复合物以及基因转染选用的载体等因素影响Rz的抑制活性有关。

参考文献 (References)

- [1] Sandhu C et al. *Cancer Direct Prev*, 2000, **24**: 107
- [2] Sauter ER et al. *Clin Cancer Res*, 2000, **6**: 654
- [3] Lang S et al. *J Am Soc Nephrol*, 2000, **11**: 1398

- [4] Joo M *et al. Liver*, 2001, **21**: 89
- [5] Zhang J *et al. Int J Cancer*, 2003, **105**: 281
- [6] Utsunomiya T *et al. Oncology*, 2001, **61**: 226
- [7] 陈岳祥等。《中华肝脏病杂志》, 2005, **13**: 571
- [8] Takagi Y *et al. Biochem Soc Trans*, 2002, **30**: 1145
- [9] Sullivan JM *et al. Mol Vis*, 2002, **8**: 102
- [10] Suzuki T *et al. Gene Ther*, 2000, **7**: 241
- [11] Maeda A *et al. J Hum Virol*, 2001, **4**: 227
- [12] Haseloff J *et al. Biotechnology*, 1992, **24**: 264
- [13] Cech TR *et al. Cell*, 1981, **27**: 487
- [14] Hammann C *et al. ChemBiochem*, 2002, **3**: 690
- [15] Kamochi J *et al. Int J Oncol*, 2002, **21**: 81
- [16] Liao H *et al. Oligonucleotides*, 2005, **15**: 196
- [17] Huang YT *et al. Anticancer Res*, 2005, **25**: 2017
- [18] Huh JW *et al. Biotechnol Lett*, 2005, **27**: 1229
- [19] Zeng Y *et al. RNA*, 2002, **8**: 855

Construction of Specific Hammerhead Ribozyme Targeting Cyclin D1 mRNA and Its Activity *in Vitro* and Hepatec Stellate Cells

Jin-Rong Xia, Xiao-Ming Huang, Nai-Feng Liu*, Xiang-Yang Hu
(School of Clinical Medicine, Southeast University, Nanjing 210009, China)

Abstract The secondary structures of hammerhead ribozyme (Rz) and rat cyclin D1 were analyzed and simulated by mfold software. Hammerhead ribozyme DNA sequence was synthesized. Cyclin D1 DNA sequence was obtained by reverse transcription PCR. Ribozyme and cyclin D1 DNA sequences were separately cloned into pGEM-3Zf(+) vectors. Ribozyme and cyclin D1 mRNA were obtained *in vitro* transcription, and ribozyme cleavage experiment was made *in vitro*. pLXSN-Rz vector was constructed by inserting ribozyme gene into retroviral vector and transfected into rat-derived HSC-T6 cell line with lipofectin. The expression of cyclin D1 gene was detected by RT-PCR. The results showed that a ribozyme directing to 832 site of cyclin D1 mRNA coding domain was selected by mfold software, and its DNA sequence was synthesized. The transcription vectors of Rz832 and cyclin D1 mRNA were constructed successfully. Ribozyme and cyclin D1 mRNA were expressed *in vitro* transcription. Cleavage experiments *in vitro* showed that Rz832 cleaving cyclin D1 mRNA produced 1 014 nt and 65 nt fragments. The cleavage efficiency was 80%. Restriction analysis showed that Rz832 DNA was correctly inserted into plasmid pLXSN as expected. Sequencing showed that there were no mutation in the ribozyme gene. The expression of cyclin D1 at mRNA level was effectively down-regulated in Rz832-transfected hepatic stellate cells (HSCs) by 42.22% of that in control cells ($t=-193.443$, $P<0.01$). The results indicated that Rz832 can specifically cleave cyclin D1 mRNA *in vitro* and significantly inhibit cyclin D1 gene expression in HSCs.

Key words ribozyme; cyclin D1; *in vitro* transcription; cleavage

Received: August 11, 2006 Accepted: October 26, 2006

This work was supported by the Social Development Foundation of Zhenjiang (No.SH2002020)

*Corresponding author. Tel: 86-25-83272001, Fax: 86-25-83272010, E-mail: liunf@seu.edu.cn