

· 论 著 ·

Notch1 miRNA 干扰质粒构建及功能鉴定*

周学亮, 万 力, 刘季春[△]

(南昌大学第一附属医院心脏外科, 江西南昌 330006)

摘要:目的 设计及构建大鼠 Notch1 微小干扰核糖核酸(miRNA)干扰质粒,最终筛选出效果最好的干扰质粒。方法 针对大鼠 Notch1 基因分别设计 3 对 pre-miRNA 序列,通过 T₄ 连接酶克隆至 pcDNATM 6.2-GW/EmGFP-miRNA 表达载体构建干扰质粒,基因测序鉴定,经 Lipofectamine 2000 转染至 H9c2 心肌样细胞,荧光显微镜下观察绿色荧光确定转染效率,Western blot 检测 3 对干扰质粒、阴性对照质粒对 Notch1 胞内结构域(N1ICD)表达的影响。结果 测序表明,Notch1 干扰序列及读码框完全正确,荧光显微镜观察 H9c2 心肌样细胞 miRNA 瞬时转染效率在 80% 左右。Western blot 显示 miRNA6637 对 Notch1 干扰效果最强。结论 成功构建大鼠 Notch1 miRNA 的有效干扰质粒,为 Notch1 信号通路在心血管领域的功能研究奠定了基础。

关键词: Notch 信号通路;微小干扰核糖核酸;干扰质粒

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.13.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)13-1447-03

Construction and function identification of Notch1 miRNA recombinant eukaryotic expression vectors*

Zhou Xueliang, Wan Li, Liu Jichun[△]

(Department of Cardiac Surgery, First Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: Objective To construct and identify the microRNA(miRNA) eukaryotic expression vectors for Notch1, and to screen the ideal miRNA eukaryotic expression vectors with most interference effect. **Methods** Three pairs of pre-miRNA sequences for rat Notch1 were synthesized and inserted into pcDNATM 6.2-GW/EmGFP-miR vector by T₄ ligase for the construction of miRNA expression plasmid, which were confirmed by sequencing, then the recombinant miRNA vectors were transfected into H9c2 cells by Lipofectamine 2000. The transfection efficiency was observed under the inverted fluorescence microscope. The interference effect of miRNA on Notch1 was evaluated by Western blot for N1ICD(Notch1 intracellular domain). **Results** Sequencing suggested that miRNA eukaryotic expression vectors targeting Notch1 possessed correct nucleotide sequence and read frame, and the express of the green fluorescent protein was over 80% when the transient transfected H9c2 cells observed under the inverted fluorescence microscope. The results of Western blot showed that the sequence of miRNA 6637 could more effectively knockdown the expression level of Notch1 than the others. **Conclusion** miRNA eukaryotic expression vectors targeting Notch1 are successfully constructed and the effectively interference RNA is identified, which lay a foundation of the function study of Notch1 signaling pathway in the cardiovascular field.

Key words: Notch signal pathway; miRNA; interference plasmid

Notch 信号通路于 90 年前经摩根首次发现,其特点为该通路的受体 Notch 活性受糖基化、胞内运输差异和泛素化降解调控,而不依赖于第二信使的放大^[1]。在多种生物的心脏发育期,Notch 信号参与了心肌细胞分化、房室沟分界、瓣膜发育、流出道重塑、心室小梁形成等诸多过程^[2-4];心脏发育成熟后,Notch 的作用可控制心血管系统对缺血缺氧损伤的反应,抑制心肌细胞纤维化,增强受损后心肌细胞活力^[5-7]。本研究拟采用微小干扰核糖核酸(miRNA)技术,通过设计针对大鼠 Notch1 基因干扰序列,构建能在真核细胞中表达 miRNA 序列的载体,并转染 H9c2 心肌细胞,筛选干扰大鼠 Notch1 基因最佳的 miRNA,为进一步观察 Notch 信号通路在心肌细胞的作用奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及菌株 H9c2 心肌样细胞购自中科院上海生命科学院细胞库,Top10 化学感受态细胞购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 干扰质粒 BLOCK-iTTM Pol II miR RNAi Express-

sion Vector Kits 购自 Invitrogen 公司。

1.1.3 主要试剂 T₄ DNA Ligase 购自 TaKaRa 公司,质粒小提试剂盒购自 OMEGA 公司,LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司,RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术研究,兔 Cleaved Notch1 单克隆抗体购自 abcam 公司,小鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔、山羊抗小鼠 IgG 均购自北京中杉金桥公司,化学发光试剂盒(SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate)购自美国 Pierce 公司。

1.2 方法

1.2.1 干扰片段设计与合成 针对 GeneBank 中的大鼠 Notch1 基因编码序列(NCBI Reference Sequence: NM_001105721.1),在 Invitrogen 网站分别在线设计 3 对 pre-miRNA 序列(表 1),交 Invitrogen 公司合成,规格为 2 OD。

1.2.2 靶向 Notch1 miRNA 干扰质粒的构建 将 3 对 Oligonucleotide 各自用 TE Buffer 溶解成 200 μmol/L,互补单链经退火形成双链,反应体系:200 μmol/L Top Strand Oligonucle-

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81260024);江西省自然科学基金资助项目(20122BAB205026);江西省研究生创新专项资金资助项目(YC2011-B013)。作者简介:周学亮(1980~),主治医师,博士研究生,主要从事心肌保护基础与临床研究。△ 通讯作者,Tel:(0791)88692707;E-mail:liujichun999@yahoo.com.cn。

表 1 Notch1-miRNA 寡核苷酸序列

名称	寡核苷酸序列
miRNA1281	上链 5'-TGCTGAGTAGAAGGAAGCCACACGGTGT TTTGGCCACTGACTGACACCGTGTGTTCTTCTACT-3'
	下链 5'-CCTGAGTAGAAGGAACACACGGTGT CAGTCAGTGGCCAAAACACCGTGTGGCTTCCTTCTACTC-3'
miRNA4072	上链 5'-TGCTGTTAACACGCTGCACGCAGTTCG TTTTGGCCACTGACTGACGAACTGCGCAGCGTGTAA-3'
	下链 5'-CCTGTTAACACGCTGCGCAGTTCGTCAGT CAGTGGCCAAAACGAACTGCGTGCAGCGTGTAAAC-3'
miRNA6637	上链 5'-TGCTGCATGGATGGAGACTGCTGGAAG TTTTGGCCACTGACTGACTTCCAGCACTCCATCCATG-3'
	下链 5'-CCTGCATGGATGGAGTGTGGAAGTCAGT CAGTGGCCAAAACCTCCAGCAGTCTCCATCCATGC-3'

otide 5 μ L, 200 μ mol/L Bottom Strand Oligonucleotide 5 μ L, 10 \times Oligo Annialing Buffer 2 μ L, dddH₂O 8 μ L; 退火条件: 95 $^{\circ}$ C, 1 min \rightarrow 85 $^{\circ}$ C, 1 min \rightarrow 75 $^{\circ}$ C, 1 min \rightarrow 65 $^{\circ}$ C, 1 min \rightarrow 55 $^{\circ}$ C, 1 min \rightarrow 45 $^{\circ}$ C, 1 min \rightarrow 35 $^{\circ}$ C, 1 min \rightarrow 25 $^{\circ}$ C, 1 min \rightarrow 25 $^{\circ}$ C, 10 min; 形成的 double strand Oligonucleotide 分别用 dddH₂O 稀释到 100 μ mol/L。然后用载体构建试剂盒 BLOCK-iTTM Pol II miR RNAi Expression Vector Kits 进行重组克隆, 将双链的 miRNA Oligo 利用 T₄ DNA Ligase 各自连接到 miRNA 表达载体 pcDNATM 6.2-GW/ EmGFP-miR Vector 中, 以构建 Notch1 miRNA 质粒。

1.2.3 干扰质粒转化与测序分析 将 3 组连接产物转化 Top10 化学感受态细胞, 接种于 Spe⁺(大观霉素)的 Luria-Bertani(LB)培养基平板, 次日随机挑选阳性单克隆菌落, 于 Spe⁺ LB 液态琼脂培养基摇菌过夜, 隔日小提质粒, 送北京诺赛基因组研究中心有限公司基因测序, 序列无误后分别命名为 miRNA1281、miRNA4072、miRNA6637。

1.2.4 细胞培养及转染 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)+10% Fetal bovine serum(FBS)培养 H9c2 心肌样细胞, 铺 12 孔板, 细胞生长至 90% 融合度时, 按 LipofectamineTM 2000 方法, 分 4 组进行转染: Mock 组(无效对照

miRNA 干扰质粒转染)、miRNA1281 组(转染 miRNA1281)、miRNA4072 组(转染 miRNA4072)、miRNA6637 组(转染 miRNA6637)。

1.2.5 靶向 Notch1 miRNA 干扰质粒的筛选 4 组 H9c2 心肌样细胞转染 48 h 后, 分别加 90 μ L RIPA 裂解细胞, 4 $^{\circ}$ C、12 000 g 离心提取总蛋白, 二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)测定蛋白水平。加等量十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液(2 \times), 沸水煮 10 min 各上样 30 μ g, 行 8% SDS-PAGE 蛋白电泳, 湿转法将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉封闭后, 分别用稀释的一抗 [Cleaved Notch1(1:500)、GAPDH(1:200)] 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 次日辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(1:5000)、山羊抗小鼠 IgG(1:5000)常温孵育 1 h, 结束后采用增强化学发光法曝光, 检测 Notch1 胞内结构域(N1ICD)的表达。

2 结 果

2.1 靶向 Notch1 miRNA 干扰质粒成功构建 将双链的 miRNA Oligo 与 pcDNATM 6.2-GW/EmGFP-miR Vector 各自连接后, 转化 Top10 化学感受态细胞, 小提质粒, 送北京诺赛基因组研究中心有限公司基因测序, 序列无误, 见图 1。

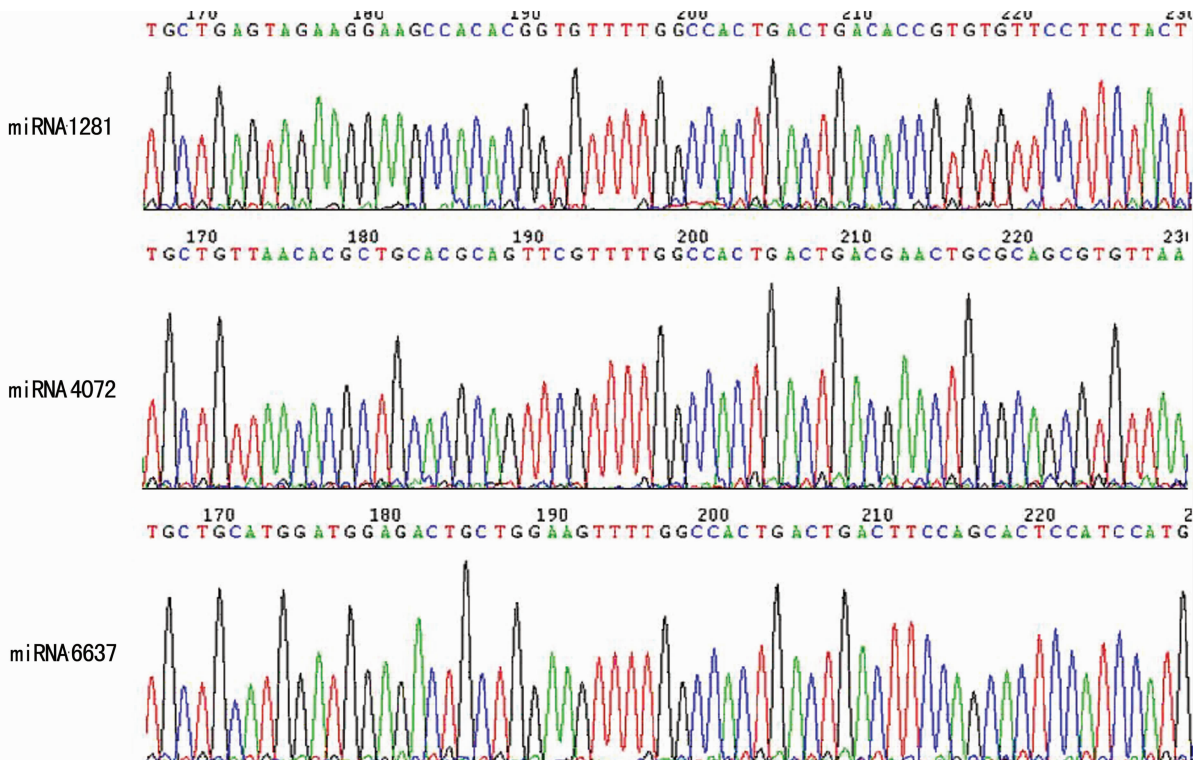


图 1 靶向 Notch1 miRNA 干扰质粒基因测序图

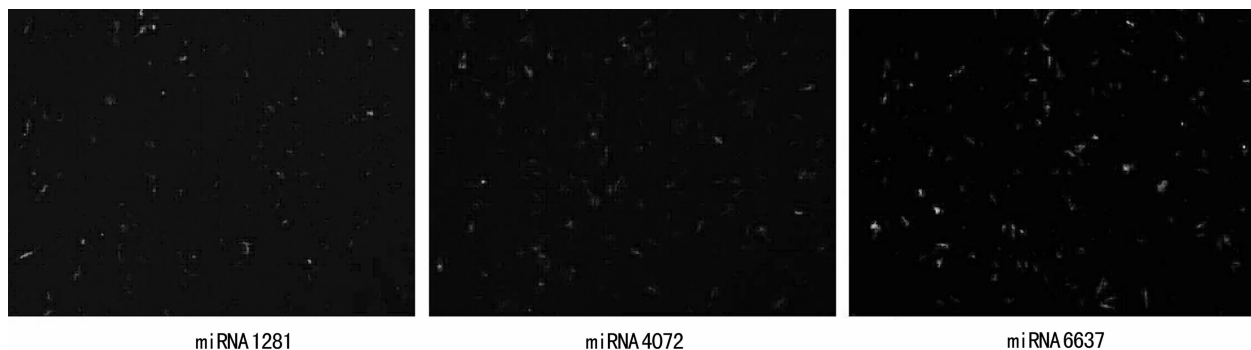
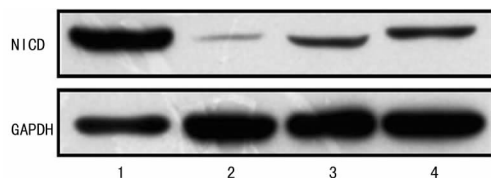


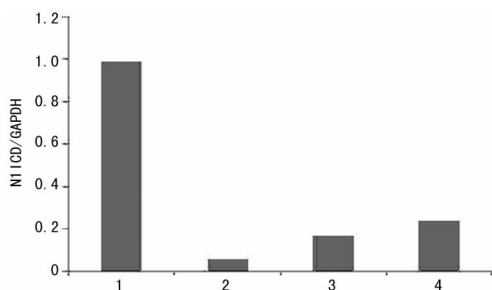
图 2 荧光显微镜观察 H9c2 心肌样细胞 Notch1 miRNA 的转染效率

2.2 靶向 Notch1 miRNA 干扰质粒顺利筛选 利用 Lipofectamine™ 2000 将构建成功的 miRNA1281、miRNA4072、miRNA6637 干扰质粒转染 H9c2 心肌样细胞, 荧光显微镜观察转染效率(图 2), 48 h 后提总蛋白, Western blot 显示 N1ICD 在 Mock 组、miRNA1281 组、miRNA4072 组、miRNA6637 组表达逐渐降低, 以 miRNA6637 组表达最低, 约为 Mock 组的 90%, 说明 3 组 miRNA 均可靶向干扰 Notch1 基因, 以 miRNA6637 效果最佳, 根据沉默效果筛选理想的 Notch1 miRNA: Western blot 检测 H9c2 心肌样细胞 miRNA 转染后 N1ICD 的表达(图 3); 各组 N1ICD 灰度值比较见图 4。



1: MOCK 组; 2: miRNA6637 组; 3: miRNA4072 组; 4: miRNA1281 组。

图 3 H9c2 心肌样细胞 miRNA 转染后 N1ICD 的表达



1: MOCK 组; 2: miRNA6637 组; 3: miRNA4072 组; 4: miRNA1281 组。

图 4 各组 N1ICD 灰度值比较

3 讨论

深入研究发现 miRNA 是一类存在于生物体内, 长度约 19~25 个核苷酸的非编码小 RNA, 通过与 mRNA 的互补配对, 使 mRNA 发生降解或翻译受抑, 负性调控靶基因的表达^[8-9]。在哺乳动物中, 大约 50% 的蛋白受 miRNA 调控, 研究显示 miRNA 几乎参与了迄今为止所有细胞之间的调控, 在细胞发育、分化、凋亡、增殖中发挥重要作用, 其表达的改变与人类多种疾病着密切相关^[10]。目前研究表明 miRNA 对靶基因的干扰效果是小干扰 RNA (siRNA) 的 10 倍^[11]。因此, 采用 miRNA 干扰技术将会有更理想的干扰效应。本研究通过设计合成 miRNA, 成功转入 pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR Vector 中, 基因测序无误后, 脂质体法瞬时转染 H9c2 心肌样细胞, 荧光显微镜观察到各组 miRNA 转染效率约为 80% 左右,

通过 Western blot 检验 3 组 miRNA 转染后 N1ICD 的表达差异, 结果显示 3 组 N1ICD 表达均降低, 以 miRNA6637 组最为明显, 约为 Mock 组的 90%, 可见 miRNA6637 对 Notch1 的干扰效果最佳。

Notch 配体在果蝇内为 Serrate 家族, 在哺乳动物为 Jagged/Delta 家族, 与配体结合后, Notch 受体获得活性发生构象改变, 经 TNF-α 转化酶 (TNF-α converting enzyme, TACE)、γ-secretase 的二次裂解, 形成 NICD 进入细胞核, 与重组信号的免疫球蛋白结合蛋白 Jκ (Recombination signal binding protein for immunoglobulin Jκ, RBP-Jκ) 结合, 启动多毛和分裂增强子 1 (Hairy and enhancer of split 1, Hes1)、多毛相关转录因子 (Hairy-related transcription, HRT) 等靶基因的转录^[12]。有研究发现 Notch1 信号通路可刺激缺血心肌细胞增生, 产生良好的心肌保护效应^[13]。国内文献报道, 应用 Notch 信号通路阻断剂-3,5-二氟苯乙酰-L-丙氨酸-S 苯基甘氨酸 t-丁酯 (DAPT) 能抑制原代乳鼠心肌细胞增殖, 促使心肌细胞发生凋亡^[14]。最新研究发现, Notch1 信号通路的激活可加快心肌梗死后期心功能的恢复, 对于缺血性心脏病的治疗具有积极的临床意义^[15]。本研究成功构建并顺利筛选靶向 Notch1 miRNA 的有效干扰质粒, 为 Notch 信号通路对缺血心肌细胞保护作用的机制研究奠定了实验基础。

参考文献:

[1] Tien AC, Rajan A, Bellen HJ. A notch updated[J]. J Cell Biol, 2009, 184(5): 621-629.
 [2] Niessen K, Karsan A. Notch signaling in cardiac development[J]. Circ Res, 2008, 102(10): 1169-1181.
 [3] Niessen K, Karsan A. Notch signaling in the developing cardiovascular system[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 293(1): C1-11.
 [4] Nemir M, Pedrazzini T. Functional role of Notch signaling in the developing and postnatal heart[J]. J Mol Cell Cardiol, 2008, 45(4): 495-504.
 [5] Al Haj Zen A, Madeddu P. Notch signalling in ischaemia-induced angiogenesis[J]. Biochem Soc Trans, 2009, 37(Pt 6): 1221-1227.
 [6] Croquelois A, Domenighetti AA, Nemir M, et al. Control of the adaptive response of the heart to stress via the Notch1 receptor pathway[J]. J Exp Med, 2008, 205(13): 3173-3185.
 [7] Urbanek K, Cabral-da-Silva MC, Ide-Iwata N, et al. Inhibition of notch1-dependent cardiomyogenesis leads to a dilated myopathy in the neonatal heart[J]. Circ Res, 2010, 107(3): 429-441.

间变长,最终影响肠道功能。

GJ 由相邻胞膜上的连接子衔接形成,每个连接子又包含 6 个 Cx,其中 Cx43 的表达最广泛^[13],具有生化耦联和保证肌细胞间电兴奋快速扩散、协调细胞间活动一致性的功能,并受细胞内 pH 值、Ca²⁺ 浓度、跨通道电压、Cx 的磷酸化状态等因素影响。有文献报道,在糖尿病大鼠胃体和胃窦 Cx43 表达明显减少,导致胃运动功能障碍^[14]。本实验结果显示,SHI 后肠肌层中的 Cx43 表达量减少,提示细胞间 GJ 破坏,ICC 之间及与平滑肌之间激素、神经介质和一些激动剂或拮抗剂等物质交换不畅,导致该部位动作电位传递受阻,这与国外学者的研究结果一致^[15-16]。说明 SHI 后自由基增加、代谢产物蓄积、pH 值改变以及肠道内菌群失调、黏膜屏障破坏等可能因素造成的细胞连接损伤,GJ 功能丧失,最终影响了肠道收缩活动。

综上所述,肠肌丛 ICC 数量减少和网络受损,以及 Cx43 的表达缺失或减少,是造成肠神经-ICC-平滑肌网络结构电信号传递障碍,引起肠道收缩模式紊乱,导致脑损伤后动力障碍的可能机制之一。该研究结果提示,以预防或减轻 ICC 的损伤,促进受损 ICC 的修复,增加 Cx43 蛋白的表达可能是 SHI 后肠动力障碍治疗的新思路。

参考文献:

[1] Herbert MK, Holzer P. Standardized concept for the treatment of gastrointestinal dysmotility in critically ill patients—current status and future options[J]. *Clin Nutr*, 2008, 27(1): 25-41.

[2] Huizinga JD, Zarate N, Farrugia G. Physiology, injury, and recovery of interstitial cells of Cajal; basic and clinical science[J]. *Gastroenterology*, 2009, 137(5): 1548-1556.

[3] Kashyap P, Farrugia G. Diabetic gastroparesis: what we have learned and had to unlearn in the past 5 years[J]. *Gut*, 2010, 59(12): 1716-1726.

[4] 杨焯,侯豫,赵新,等. 先天性巨结肠肠壁 Cx43 蛋白和 Cajal 间质细胞的分布[J]. *中国当代儿科杂志*, 2009, 11(3): 213-216.

[5] Li M, Li F, Luo C, et al. Immediate splenectomy decreases mortality and improves cognitive function of rats after severe traumatic brain injury[J]. *J Trauma*, 2011, 71(1): 141-147.

[6] 代从新,齐清会. 连接蛋白 43 与胃肠运动[J]. *国际消化病杂志*, 2009, 29(5): 334-336.

[7] Kiyosue M, Fujisawa M, Kinoshita K, et al. Different susceptibilities of spontaneous rhythmicity and myogenic contractility to intestinal muscularis inflammation in the hapten-induced colitis[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2006, 18(11): 1019-1030.

[8] 韩鹏,何扬涛,梅峰. 小肠缺血再灌注损伤导致 Cajal 间质细胞凋亡的实验研究[J]. *局解手术学杂志*, 2010, 19(2): 80-82.

[9] 李毅,齐清会,张栋梁,等. 大承气汤对 MODS 大鼠小肠深部肌间 Cajal 间质细胞损伤的作用[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2008, 14(3): 230-234.

[10] Yu XY, Yin HH, Zhu JC. Increased gut absorptive capacity in rats with severe head injury after feeding with probiotics[J]. *Nutrition*, 2011, 27(1): 100-107.

[11] 李睿明,易燕锋,张蓓,等. 基于 Cajal 间质细胞异常的胃肠道动力障碍动物模型研究进展评述[J]. *现代中西医结合杂志*, 2008, 17(16): 2576-2577.

[12] Matsuura T, Masumoto K, Ieiri S, et al. Morphological and physiological changes of interstitial cells of Cajal after small bowel transplantation in rats[J]. *Transpl Int*, 2007, 20(7): 616-624.

[13] 王琪. 缝隙连接蛋白 43 研究进展[J]. *中西医结合研究*, 2010, 2(6): 312-316.

[13] 吴汉妮,田晗,张喜婷,等. Cajal 间质细胞和间隙连接蛋白 43 参与糖尿病胃轻瘫机制的实验研究[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2007, 23(6): 555-556.

[14] Cai ZX, Li Y, Qi QH. Morphological changes in interstitial cells of Cajal in the deep muscular plexus and enteric motor neurons of the intestine in rats with multiple organ dysfunction syndrome[J]. *Nutrition*, 2010, 5(8): 635-636.

[16] Segnani C, Battolla B, Ippolito C, et al. Cx43, RhoA and c-kit in diverticular disease[J]. *J Anat*, 2011, 116(1): 169-170.

(收稿日期:2012-12-06 修回日期:2013-01-25)

(上接第 1449 页)

[8] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. *Cell*, 2009, 136(2): 215-233.

[9] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs[J]. *Cell*, 2009, 136(4): 642-655.

[10] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay[J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(9): 597-610.

[11] Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, et al. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing[J]. *Cell*, 2005, 123(4): 631-640.

[12] Wang MM. Notch signaling and Notch signaling modifi-

ers[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(11): 1550-1562.

[13] Gude NA, Emmanuel G, Wu W, et al. Activation of notch-mediated protective signaling in the myocardium[J]. *Circ Res*, 2008, 102(9): 1025-1035.

[14] 杨阳,段维助,周京军,等. γ -分泌酶抑制剂对正常乳鼠心肌细胞的影响[J]. *中国体外循环杂志*, 2011, 9(2): 89-92.

[15] Li Y, Hiroi Y, Ngoy S, et al. Notch1 in bone marrow-derived cells mediates cardiac repair after myocardial infarction[J]. *Circulation*, 2011, 123(8): 866-876.

(收稿日期:2012-09-08 修回日期:2012-12-22)