

DNMT3B mRNA 3'非编码区报告基因载体的构建与功能验证*

曹成建¹,杨晓玲^{2,3},王磊¹,杨程¹,蔡欣¹,徐华^{2,3},王洁⁴,姜怡邓^{2,3,△}

(宁夏医科大学:1. 检验学院;2. 基础医学院;3. 心脑血管疾病基础研究

重点实验室;4. 医科大学科技中心,宁夏银川 750004)

摘要:目的 构建用于鉴定 microRNA(miRNA)靶基因的报告基因系统并进行功能验证,为研究动脉粥样硬化的发生发展机制奠定良好基础。方法 在 pGL3-control 载体的荧光素酶基因下游克隆位点插入 DNA 甲基转移酶 3B(DNMT3B)3'非编码区序列,经酶切、测序验证是否插入及正确性。生物信息学分析 DNMT3B 与 miRNA-125b 的靶向关系,并用 miRNA-125b 过表达载体与所构建载体共转染人血管平滑肌细胞,双荧光素酶报告基因系统检测荧光素酶活性。结果 成功构建了 DNMT3B 3'非编码区报告基因载体,经酶切和测序鉴定正确;共转染细胞 24 h 后,双荧光素酶报告基因系统检测荧光素酶活性,结果显示与空载体对照组相比,构建载体组荧光素酶活性下降了 54.8%($P<0.01$)。结论 成功构建了 DNMT3B mRNA 3'非编码区报告基因载体,且提示 miRNA-125b 靶向调控了 DNMT3B。

关键词:DNA 甲基转移酶 3B;微 RNAs;动脉粥样硬化;表遗传学;双荧光素酶报告基因系统

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.13.020

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)13-1587-04

DNMT3B mRNA 3' untranslation region report vector construction and the relationship to atherosclerosis*

Cao Chengjian¹, Yang Xiaoling^{2,3}, Wang Lei¹, Yang Cheng¹, Cai Xin¹, Xu Hua^{2,3}, Wang Jie⁴, Jiang Yideng^{2,3,△}

(1. College of Medical Inspection; 2. College of Preclinical Medicine; 3. Fundamental Research Key

Laboratory of Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases; 4. Technology

Centre, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

Abstract: Objective To construct a reporter gene system for the identification of microRNA target genes and verify its function, and lays a good foundation for studying the mechanisms of the occurrence and development of atherosclerosis. **Methods** Putting the DNA methyltransferase 3B(DNMT3B) 3' untranslation region into the cloning site downstream of the luciferase gene of the pGL3-Control vector, and the correctness was validated by restriction enzyme digestion and sequencing. The bioinformatics was used to analysis the relationship between DNMT3B and miRNA-125b and the miRNA-125b overexpression vector were co-transfected with the constructed vectors into the human vascular smooth muscle cells, and the luciferase activity was detected by dual luciferase reporter assay system. **Results** The DNMT3B 3' untranslation region reporter vector was built successfully, and the correctness was verified by the restriction enzyme digestion and sequencing; after co-transfected 24 h, compared with the empty vector control group, the luciferase activity of the constructed vector group decreased significantly by 54.8% ($P<0.01$). **Conclusion** The DNMT3B 3' untranslation region reporter vector built successfully, which suggest that miRNA-125b may target-regulate DNMT3B.

Key words: DNA methyltransferase 3B; microRNAs; atherosclerosis; epigenetics; dual luciferase reporter gene system

DNA 甲基化是指在 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)的作用下,在 CpG 二核苷酸 5'端的胞嘧啶上加入甲基,使之变为 5-甲基胞嘧啶的过程。研究表明,DNA 甲基化与动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)关系密切,在 AS 的发生发展过程中,可以出现整体基因组 DNA 甲基化状态的改变、相关基因启动子区的高甲基化或低甲基化等状态^[1-3]。甲基化过程受 DNMTs 的调节,其中 DNMT3B 通过从头合成的方式调控甲基化,与 AS 的发生发展密切相关^[4]。

microRNA(miRNA)是一类长度只有 21 nt 左右的内源性非编码单链 RNA,通过与靶 mRNA 的 3'非翻译区(3'UTR)相结合介导靶基因 mRNA 的翻译抑制^[5]。研究表明 miRNA 参与了多种细胞的增殖、凋亡、分化等过程^[6-8]。生物信息学分析

发现 DNMT3B 是 miRNA-125b 的潜在靶基因。然而,在 AS 的发生发展过程中 miRNA-125b 是否调控了 DNMT3B 的表达,目前尚不清楚。研究 miRNA 对靶 mRNA 的调控,报告基因实验是最常用的方法之一。本研究拟构建 DNMT3B mRNA 3'非编码区的报告基因载体,并转染原代培养的人脐静脉平滑肌细胞(human umbilical vein smooth muscle cell, HU-VSMC),进行功能验证,为今后研究 AS 的发生发展机制打下良好基础。

1 材料与方法

1.1 材料 HU-VSMC 由本实验室培养;大肠杆菌感受态 DH5 α 购自北京博迈德生物科技公司;pMD-19T 载体购自 Takara 公司;报告基因载体 pGL3-Control、内参载体 pRL-TK

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81200118;81260063);教育部新世纪优秀人才计划基金资助项目(NCET-10-0916);宁夏区自然科学基金资助项目(NZ12174)。作者简介:曹成建(1985-),在读硕士,主要从事动脉粥样硬化分子生物学诊断研究。△ 通讯作者, Tel: 13895669145; E-mail: jyjcyx@yeah.net。

载体及双报告基因检测试剂盒购自 Promega 公司; miRNA-125b 过表达载体 hsa-miRNA-125b precursor 购自 Ambion 公司; Taq DNA 聚合酶、dNTP mix 购自宝生物公司; 限制性内切酶 *Xba* I (附带 $10 \times$ Tango buffer)、T4 DNA 连接酶均购自 Fermentas 公司; 转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; 凝胶纯化回收试剂盒、质粒抽提纯化试剂盒购自 Axygen 公司; 引物由上海生工生物工程公司合成, DNA 测序由 Invitrogen 公司完成。PCR 仪购自美国 Eppendorf 公司; 电泳仪及凝胶成像系统购自 Bio-RAD 公司; LB960 微孔板式发光检测仪购自德国 Berthold 公司。

1.2 方法

1.2.1 靶向 DNMT3B 3' 非编码区的 miRNA 预测 采用 Targetscan 6.2 在线软件 (<http://www.targetscan.org/>) 检索与 DNMT3B 3' 非编码区作用的 miRNAs。

1.2.2 HUVSMC 培养与鉴定 采用于海娇等^[9]方法培养及鉴定原代 HUVSMC。

1.2.3 DNMT3B mRNA 3' 非编码区的报告基因载体的构建及鉴定 在 NCBI 网站查找 DNMT3B (序列号: NM_006892.3) mRNA 3' 非编码区序列, 并利用 Primer 5.0 软件设计引物, 引物序列为, 上游引物: 5'-GCT CTA GAA CTG GCT ACT GCT CTG TG-3'; 下游引物: 5'-GCT CTA GAG AAA TGT ATG TCT GTC CCT -3' (含 *Xba* I 酶切位点)。Trizol 法从 HUVSMC 中提取总 RNA 并反转录, 以 c-DNA 为模板 PCR 扩增 DNMT3B mRNA 3' 非编码区序列, 胶回收纯化后进行 T 载体连接。后将连有目的基因的 T 载体与目的载体 (pGL3-control) 分别单酶切后用 1% 琼脂糖凝胶电泳及胶回收纯化。将上述酶切产物用 T4 DNA 连接酶连接后将连接产物转化 DH5 α 大肠杆菌, 挑取克隆并 PCR 鉴定, 并质粒抽提, *Xba* I 酶切反应鉴定。设计相应引物以确定插入片段正反, 引物序列为, 上游引物: 5'-GAG GCG AAC TGT GTG TGA GAG-3' 下游引物: 5'-GCT GAA ATC ATC ATC ATT GTG G-3'。正

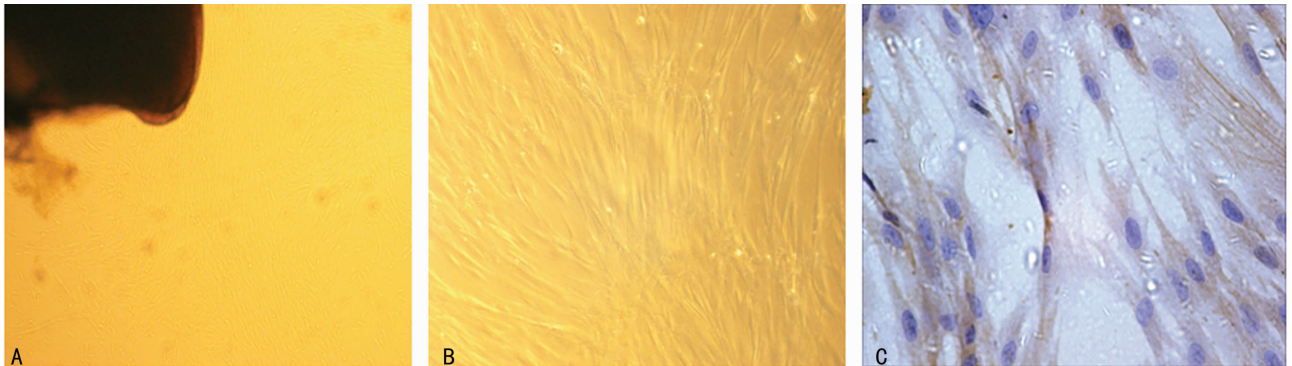
反鉴定后送商业化测序。

1.2.4 细胞转染及报告系统的功能验证 (1) 细胞接种: 待细胞长满细胞培养瓶 80%~90% 时, 按传代培养消化吹散细胞后计数, 将细胞悬液密度调整 2×10^5 /mL, 按每孔 500 μ L 加入 24 孔细胞培养板, 混匀后 37 $^{\circ}$ C 继续培养 24 h。(2) 质粒转染: 转染设空载体对照组、构建载体组, 其中空载体对照组转入 pGL3 空载体及 miRNA-125b 过表达载体 pEZX-miRNA-125b, 而构建载体组转入所构建载体及 pEZX-miRNA-125b, 两组均转入 pRL-TK 质粒。待细胞长满培养孔面积的 80% 左右时进行转染。向 DMEM 培养基 (每孔 50 μ L) 加入 Lipofectamine2000 脂质体 (每孔 1 μ L), 充分混匀, 静置 5 min。向 DMEM 培养基 (每孔 50 μ L) 中依次加入 pRL-TK 质粒 (每孔 5 ng) 和 pGL3-DNMT3B-3' 非编码区重组质粒 (或 pGL3 空载体) (每孔 100 ng) 及 miRNA-125b 过表达载体 pEZX-miRNA-125b, 充分混匀。将分别混有脂质体的 DMEM 溶液和混有上述质粒的 DMEM 溶液相混合 (每孔 100 μ L), 充分混匀, 室温放置 20 min, 分别加入 24 孔细胞培养板各实验孔组中 (每组设 3 个复孔), 稍震荡混匀后, 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中培养 24 h。(3) 报告基因检测: 按照双报告基因检测试剂盒说明书进行检测, 最后用萤火虫荧光强度值/海肾荧光强度值进行标准化校正。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.0 软件进行统计学分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验进行两样本间比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HUVSMC 培养与鉴定 细胞培养第 12 天时, 相差显微镜观察可见长梭形细胞从贴块边缘萌出, 此后细胞沿植块周围呈放射性生长, 培养至 15 d 左右, 成束的细胞平行排列, 部分区域细胞多层重叠, 部分区域呈单层, 高低起伏, 呈现平滑肌细胞特征性的“峰”、“谷”状生长。经 α -actin 免疫细胞化学染色后 98% 的细胞呈阳性, 即细胞质呈细颗粒状棕黄色沉淀, 均匀分布, 细胞核为淡蓝色, 见图 1。



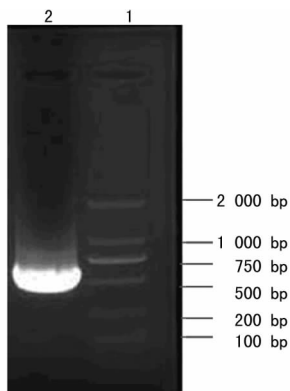
A:($\times 40$); B:($\times 20$); C:($\times 400$)。

图 1 HUVSMC 的培养与鉴定

2.2 融合 DNMT3B mRNA 3' 非编码区的报告基因载体的构建与鉴定 (1) 目的片段: DNMT3B mRNA 3' 非编码区的扩增以从平滑肌细胞提取的总 RNA 逆转录的 cDNA 为模板, 利用所设计引物, PCR 扩增得到 589 bp 的特异性片段, 与预期的目的片段大小一致, 见图 2。(2) 目的基因与 pGL3 酶切后连接鉴定: 将连有目的片段的 T-A 载体与 pGL3-control 空载体分别用 *Xba* I 酶切, 并胶回收, 回收后 T4 DNA 连接酶连接。连接

后转化 DH5 α 感受态大肠杆菌, 并作 PCR 鉴定及酶切鉴定。PCR 鉴定结果显示在 589 bp 位置出现单一的阳性条带, 见图 3A, 经 *Xba* I 酶切后分别在 5 000 bp 和 589 bp 位置出现阳性条带, 见图 3B。(3) 连接正反鉴定: 设计特定引物以验证插入片段正反, 若插入片段为正, PCR 则能出现目的片段, 若插入是反向的, 则不能出现目的片段或者出现非特异条带, 见图 4 泳道 2; 以上述连接产物为模板, PCR 后电泳结果显示出现了

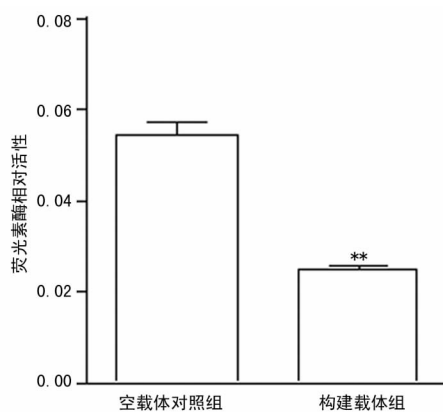
目的片段,见图 4 泳道 3,则证明插入了正向片段。同时将上述目的连接产物送商业化测序,测序结果和 GenBank 中人 DNMT3B mRNA 3'非编码区序列比对,100%匹配。



1:目的片段 PCR;2:DNA 分子标记物。

图 2 目的基因片段 PCR 鉴定

DNMT3B 的表达。



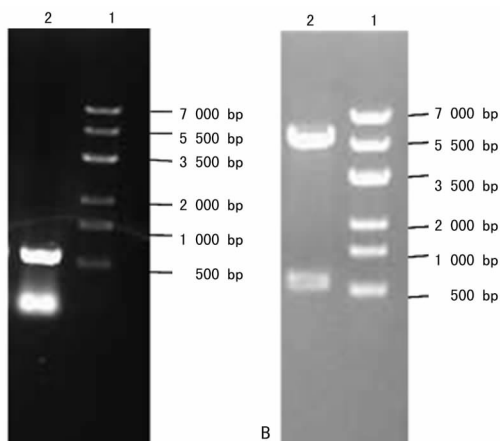
** : $P < 0.01$, 与空载体对照组比较。

图 5 双荧光素酶报告基因系统检测荧光素酶活性

3 讨论

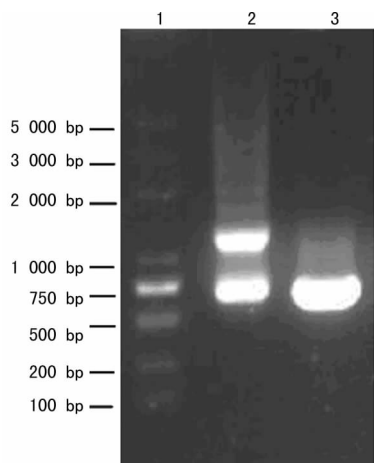
AS 的发生发展包括内皮细胞的损伤、单核巨噬细胞的浸润、泡沫细胞的形成及平滑肌细胞的增殖和迁移等病理过程,有报道在人平滑肌细胞、内皮细胞、单核细胞等发现存在全基因组及特定基因的异常甲基化^[10-13]。DNMTs 是甲基转移过程的关键环节,已经成为 AS 研究的热点。研究发现,在同型半胱氨酸刺激的血管平滑肌细胞中 DNMT3B 表达增高^[6],而在与 AS 疾病相关的血管内皮细胞功能失调中,抑制 DNA 甲基转移酶的活性或者敲除 DNMT3B 可以消除同型半胱氨酸引起的 p66^{Shc} 蛋白增高,从而抑制 p66^{Shc} 蛋白引起的氧化应激反应^[14],提示 DNMT3B 在 AS 的发生发展过程中扮演了重要角色。

miRNAs 在生物体基因调控中发挥了重要作用,主要通过转录后水平发挥基因沉默效应。成熟的单链 miRNAs 可以与一系列蛋白形成 miRNA 诱导的沉默复合体(miRISC),该复合体结合到目标靶 mRNA 上,miRISC 中的单链 miRNA 与靶 mRNA 的 3' UTR 不完全互补配对,结合于靶 mRNA 的 3' UTR,阻止所结合的 mRNA 的翻译或直接降解靶 miRNA。miRNA 虽然大约只占人类预测基因的 3% 以上,但却调控大约 30% 的蛋白编码基因,涉及细胞的增殖、分化等。研究显示,miRNA-125b 在小鼠的肺脏、大脑和主动脉以及 H2V 血管内皮细胞和平滑肌细胞中高表达^[15]。通过生物信息学分析,利用 Targetscan 在线软件预测 DNMT3B 调控 miRNAs,发现 miR-125b 是靶向调控 DNMT3B 的 miRNA 之一,提示 miRNA-125b 可能调控了 DNMT3B 的表达。因此,作者选择 pGL3-control 荧光素酶报告基因载体,在其上插入包含有 DNMT3B 3'非编码区序列,构建了 DNMT3B mRNA 3'非编码区的报告基因载体,将构建的载体与 miRNA-125b 过表达载体共转染 HUVMSC,以双荧光素酶报告基因系统检测报告基因活性,结果显示 miRNA-125b 对所构建质粒 DNMT3B-3'非编码区的荧光素酶活性存在抑制作用,一方面表明构建载体成功并发挥了功能,另一方面也提示 miRNA-125b 靶向调控了 DNMT3B。总之,本研究成功构建了 DNMT3B mRNA 3'非编码区的报告基因载体,并验证了其在血管平滑肌细胞中的功能,为今后研究深入 AS 的发生发展机制提供了新思路。



A:目的连接 PCR 鉴定,1:PCR 鉴定;2:DNA 分子标记物。B:目的连接酶切鉴定,1:DNA 分子标记物;2:酶切鉴定。

图 3 目的基因与目的载体连接鉴定



1:DNA 分子标记物;2:非正向插入片段;3:正向插入片段。

图 4 目的基因连接正反鉴定

2.3 细胞转染及报告基因的功能验证 将构建载体转染 VSMC 24 h 后,用双荧光素酶报告基因系统检测萤火虫荧光素酶活性,用海肾荧光素酶为归一化标准,计算二者比值,统计结果如图 5 所示。结果显示,与空载体对照组相比,构建载体组荧光素酶活性明显下降了 54.8%,差异有统计学意义($P < 0.01$),说明所构建载体发挥了功能,提示 miRNA-125b 抑制了

参考文献:

- [1] Sharma P, Kumar J, Garg G, et al. Detection of altered global DNA methylation in coronary artery disease patients[J]. *DNA Cell Biol*, 2008, 27(7): 357-365.
- [2] Jiang Y, Zhang J, Xiong J, et al. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor inhibit homocysteine-induced DNA methylation of inducible nitric oxide synthase gene[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2007, 39(5): 366-376.
- [3] Ying AK, Hassanain HH, Roos CM, et al. Methylation of the estrogen receptor- α gene promoter is selectively increased in proliferating human aortic smooth muscle cells[J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 46(1): 172-179.
- [4] Yideng J, Jianzhong Z, Ying H, et al. Homocysteine-mediated expression of SAHH, DNMTs, MBD2, and DNA hypomethylation potential pathogenic mechanism in VSMCs[J]. *DNA Cell Biol*, 2007, 26(8): 603-611.
- [5] Bartel DP. MicroRNAs, genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [6] Kima VN, Nam JW. Genomics of microRNA[J]. *Trends Genet*, 2006, 22(3): 165-173.
- [7] Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis[J]. *Nature*, 2005, 436(748): 214-220.
- [8] Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation[J]. *Nat Genet*, 2006, 38(2): 228-233.
- [9] 于海娇, 马琳娜, 徐支芳, 等. 同型半胱氨酸对血管平滑肌细胞周期及 P27 和 CyclinA 表达的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21(36): 4487-4492.
- [10] Huang Y, Peng K, Su J, et al. Different effects of homocysteine and oxidized low density lipoprotein on methylation status in the promoter region of the estrogen receptor α gene[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2007, 39(1): 19-26.
- [11] 王丽珍, 张敬各, 王树人. 同型半胱氨酸对人血管平滑肌细胞 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶基因启动子甲基化修饰及 mRNA 表达的影响[J]. *卫生研究*, 2007, 36(3): 291-294.
- [12] Jiang Y, Sun T, Xiong J, et al. Hyperhomocysteinemia-mediated DNA hypomethylation and its potential epigenetic role in rats[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2007, 39(9): 657-667.
- [13] Yi-Deng J, Tao S, Hui-Ping Z, et al. Folate and ApoE DNA methylation induced by homocysteine in human monocytes[J]. *DNA Cell Biol*, 2007, 26(10): 737-744.
- [14] Kim CS, Kim YR, Naqvi A, et al. Homocysteine promotes human endothelial cell dysfunction via site-specific epigenetic regulation of p66^{Shc} [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 92(3): 466-475.
- [15] Li D, Yang P, Xiong Q, et al. MicroRNA-125a/b-5p inhibits endothelin-1 expression in vascular endothelial cells[J]. *J Hypertens*, 2010, 28(8): 1646-1654.

(收稿日期: 2013-11-17 修回日期: 2014-02-11)

(上接第 1586 页)

- Coexpression of cholecystokinin-B/gastrin receptor and gastrin gene in human gastric tissues and gastric Cancer cell line[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(6): 791-794.
- [12] Colucci R, Blandizzi C, Tanini M, et al. Gastrin promotes human colon Cancer cell growth via CCK-2 receptor-mediated cyclooxygenase-2 induction and prostaglandin E2 production[J]. *Br J Pharmacol*, 2005, 144(3): 338-348.
- [13] pathogenesis MI. Diagnosis, and treatment of gastroesophageal cancers[J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(1): 35-47.
- [14] Song Y, Xu Y, Wang Z, et al. MicroRNA-148b suppresses cell growth by targeting cholecystokinin-2 receptor in colorectal Cancer[J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(5): 1042-1051.
- [15] Berna MJ, Jensen RT. Role of CCK/gastrin receptors in gastrointestinal/metabolic diseases and results of human studies using gastrin/CCK receptor agonists/antagonists in these diseases[J]. *Curr Top Med Chem*, 2007, 7(12): 1211-1231.

(收稿日期: 2013-12-18 修回日期: 2014-02-28)

欢迎投稿

欢迎订阅