

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.08.002

NDY1 shRNA 真核表达质粒构建及其在卵巢癌 A2780 细胞中的稳定表达^{*}

卢芳芳, 况 燕[△], 徐朝欢, 王 旗, 李美仪
(广西医科大学第一附属医院妇产科, 南宁 530021)

[摘要] **目的** 构建 NDY1 shRNA 真核表达载体, 并获得稳定表达 shNDY1 质粒的卵巢癌 A2780 细胞。**方法** 根据 GenBank 数据库提供的 NDY1 基因核苷酸序列, 设计并合成靶向干扰 NDY1 基因的小发夹 RNA(shRNA) 序列, 插入表达载体获得重组质粒 pGPU6/GFP/Neo-shNDY1。重组质粒测序鉴定正确后, 脂质体介导转染 A2780 细胞, 经 G418 筛选及有限稀释法获得稳定转染细胞, 采用实时定量聚合酶链反应法(RT-qPCR)和蛋白免疫印迹法分别检测 A2780 稳定转染细胞 NDY1 mRNA 及蛋白表达。**结果** 重组质粒测序正确, 转染 shNDY1 后, A2780 细胞 mRNA 及蛋白表达水平分别下降(72.89±4.83)%及(55.85±4.84)%, 与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 成功构建 pGPU6/GFP/Neo-shNDY1 真核表达质粒, 并获得 shNDY1 稳定转染的卵巢癌 A2780 细胞, 为细胞水平研究 NDY1 与卵巢癌的关系奠定实验基础。

[关键词] 卵巢肿瘤; NDY1; 质粒构建; A2780 细胞

[中图分类号] R737.31 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)08-1012-04

Construction of NDY1 shRNA eukaryotic expression plasmid and its stable expression in ovarian cancer cell line A2780^{*}
Lu Fangfang, Kuang Yan[△], Xu Chaohuan, Wang Qi, Li Meiyi
(*Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China*)

[Abstract] **Objective** To construct NDY1 shRNA eukaryotic expression plasmid and to obtain shNDY1-stably expressed ovarian cancer cell line A2780 cell. **Methods** Based on the NDY1 gene nucleotide sequence provided by GenBank database, a short hairpin RNA (shRNA) targeted NDY1 gene was designed and synthesised, and the expression vector was inserted for obtaining recombination plasmid pGPU6/GFP/Neo-shNDY1. After identification by sequencing, then liposome mediated transfection to A2780 cell was conducted, stable transfected cells were obtained through G418 selection and limited dilution. NDY1 mRNA and protein expression level were detected by the real time quantitative RT-qPCR and Western blot, respectively. **Results** The sequencing of recombinant plasmid was correct. After shNDY1 transfection, mRNA and protein expression level of A2780 cells were decreased by(72.89±4.83)% and (55.85±4.84)%, the difference in the comparison with the control group was statistically significant. **Conclusion** Eukaryotic expression plasmid pGPU6/GFP/Neo-shNDY1 is successfully constructed, and the stably transfected A2780 cell line is obtained, which lays the foundation for studying the relation of NDY1 ovarian cancer in cellular level.

[Key words] ovarian neoplasms; NDY1; plasmid construction; A2780 cell

组蛋白去甲基化酶 NDY1(not dead yet-1, NDY1)是一种重要的表观调控因子。它属于包含 JmjC 结构域的组蛋白去甲基化酶(JmjC domain-containing histone demethylase, JHDM)家族成员,能够特异性催化 H3K36me2 和 H3K4me3 脱甲基^[1],并在细胞增殖,细胞周期,干细胞自我更新及肿瘤转化等过程中发挥重要调节功能^[1-3]。NDY1 异常表达可促使细胞增殖失控,导致肿瘤表型表达。研究发现,在胰腺癌、乳腺癌、急性白血病等恶性肿瘤中 NDY1 高表达,并与肿瘤细胞的增殖、侵袭转移、临床预后密切相关^[4-6]。对鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)的研究表明,NDY1 通过逆转 microRNA let-7b 对癌基因 EZH2 mRNA 的转录后抑制,诱导 MEFs 永生化。目前已有研究提示 NDY1 具有促癌功能,而 NDY1 与卵巢癌的关系则未见报道。为探明二者的关

系,本研究构建表达 NDY1 shRNA 的真核表达质粒 pGPU6/GFP/Neo-shNDY1,转染卵巢癌 A2780 细胞后获得稳定转染细胞株,从而为进一步研究 NDY1 和卵巢癌的关系奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 人上皮性卵巢癌细胞 A2780 获赠于华中科技大学同济医学院附属协和医院妇瘤实验室。质粒载体 pGPU6/GFP/Neo 购自上海吉玛公司,质粒中量抽提试剂盒购自杭州爱思进生物技术有限公司,DNA 内切酶(Bpi I、Pst I、BamH I)、DNA 连接酶及 DNA mark 均购自 Fermentas 公司,DNA 凝胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司,LipofectamineTM 2000、G418 购自 Invitrogen 公司,RNA 提取试剂盒购自 Ax-ygen 公司,逆转录试剂盒购自 Takara 公司,SYBR Green Real

^{*} **基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(81360389);广西自然科学基金资助项目(2012GXNSFAA053086);广西壮族自治区卫生厅自筹经费科研课题资助项目(Z2013026);2013 年广西研究生教育创新计划资助项目(YCSZ2014101)。**作者简介:** 卢芳芳(1990—),在读硕士,主要从事妇科肿瘤方面的研究。 [△] **通讯作者,** E-mail: kuangyan2004@sina.com。

Time PCR Master Mix 购自 Roche 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,RPMI 1640 培养基购自 Hyclone 公司,细胞质蛋白及核蛋白抽提试剂盒购自碧云天公司,兔抗人 NDY1 多克隆抗体购自 Millipore 公司,兔抗人 LaminB1 抗体购自 Abcam 公司,辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase,HRP)标记的山羊抗兔 IgG 抗体购自 CST 公司,引物由 Takara 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 NDY1 shRNA 序列的设计及合成 根据 GenBank 提供的 NDY1 基因序列(序列号:NM_032590.4),由上海吉玛公司设计并合成针对 NDY1 的特异性 RNAi 序列,NDY1-S:5'-CAC CGG GCA AAG ATT TCA ACT ATG ATT CAA GAG ATC ATA GTT GAA ATC TTT GCC CTT TTT TG-3'; NDY1-AS:5'-GAT CCA AAA AAG GGC AAA GAT TTC AAC TAT GAT CTC TTG AAT CAT AGT TGA AAT CTT TGC CC-3';相应阴性对照(negative control,NC)序列如下,NC-S:5'-CAC CGT TCT CCG AAC GTG TCA CGT CAA GAG ATT ACG TGA CAC GTT CGG AGA ATT TTT TG-3',NC-AS:5'-GAT CCA AAA AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT AAT CTC TTG ACG TGA CAG TTC GGA GAA C-3'。

1.2.2 pGPU6/GFP/Neo-NDY1 质粒的构建及鉴定 在 PCR 仪上进行 NDY1 shRNA 单链退火反应,反应条件为:95℃ 5 min;85℃ 5 min;75℃ 5 min;70℃ 5 min。退火处理后得到 NDY1 shRNA 模板用于连接反应。将 pGPU6/GFP/Neo 载体用 BpiI、BamHI 37℃ 酶切 1 h,琼脂糖电泳估算浓度并回收。在连接反应体系中加入线性化的载体及 NDY1 shRNA 模板,T4 连接酶 22℃ 反应 1 h,用于构建 pGPU6/GFP/Neo-NDY1 真核表达质粒。连接产物转化感受态 Top10 细菌,取 200 μL 转化后的细胞涂布于含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 平板上,37℃ 培养 16 h,从每块平板上挑取 5 个菌落,接种到含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中,37℃ 摇床振荡 16 h;使用碱裂解法抽提质粒,所得质粒用 BamHI、Pst I 分别酶切鉴定,挑选两个酶切结果正确的质粒送至上海英骏公司测序。

1.2.3 卵巢癌 A2780 细胞株的稳定转染 选择处于对数生长期的 A2780 细胞,以每孔 1.5×10^5 个细胞接种于 24 孔板中,每孔添加含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基 500 μL,并置于 37℃ 含 5% CO₂ 的恒温培养箱中培养。24 h 后待细胞汇合度达到 80%~90%,按照 Lipofectamine™ 2000 转染试剂说明书将 pGPU6/GFP/Neo-shNDY1 质粒转染 A2780 细胞,同时转染 pGPU6/GFP/Neo-shNC 作为阴性对照,以未转染 A2780 作为空白对照。转染 24 h 后,细胞以 1:10 比例传代并接种于另一块 24 孔板,次日加入终浓度为 300 μg/mL 的 G418 进行筛选。2 周后用有限稀释法挑取单个阳性克隆细胞接种于 96 孔板,待其长满后逐渐传入 24 孔板,6 孔板、最后移入培养瓶中扩大培养。

1.2.4 RT-qPCR 检测 NDY1 mRNA 的相对表达 采用 Axygen 公司 RNA 提取试剂盒提取各组细胞总 RNA,按照 Takara 逆转录试剂盒说明书合成相应 cDNA,用于定量 PCR 的 NDY1 引物序列如下,上游引物:5'-CTC ACT GCT GTT GGC ACC AC-3',下游引物:5'-TGC TTG CAG TAC CTC AGG TCA ATA-3';以 β-actin 作为内参,上游引物序列:5'-CAG

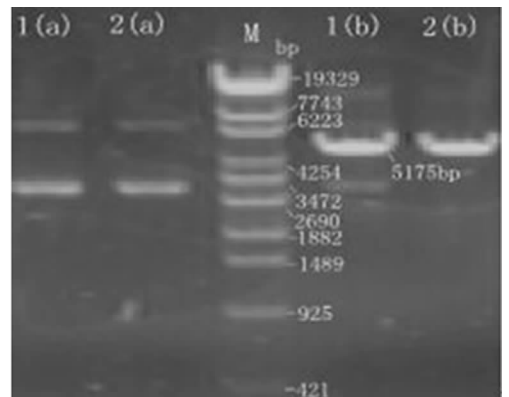
GCA CCA GGG CGT GAT-3',下游引物序列:5'-TAG CAA CGT ACA TGG CTG GG-3',扩增反应在 ABI 7300 荧光定量 PCR 仪上完成。PCR 反应条件:95℃ 10 min;95℃ 15 s,60℃ 1 min,共 40 个循环,反应结束后用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组细胞 NDY1/β-actin 比值,本实验重复 3 次。

1.2.5 Western blot 检测 NDY1 蛋白表达 试剂盒法提取细胞核蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。将蛋白样品煮沸变性 5 min,取 20 μg 核蛋白置于含 10% 分离胶的 SDS-PAGE 中电泳;随后 200 mA,2 h 转移至 PVDF 膜,5% BSA 封闭液封闭 2 h;加入兔抗人 NDY1 一抗(1:500)及兔抗人 LaminB1(1:10 000)一抗 4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,加入 HRP 标记的山羊抗兔荧光二抗(1:8 000)避光孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,采用 Odyssey 红外荧光扫描系统识别并拍照;本实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件对数据进行统计学处理,多组间的均值比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SLD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 pGPU6/GFP/Neo-shNDY1 真核表达质粒的鉴定 如图 1 所示,分别用 DNA 内切酶 Pst I、BamH I 酶切鉴定重组质粒,经 Pst I 处理后质粒不能被切开;经 BamH I 酶切后,在 5 175 bp 处出现条带;结果表明:合成目的片段正确插入 pGPU6/GFP/Neo 载体预期位点。经上海英骏公司测序结果证实质粒测序结果正确,pGPU6/GFP/Neo-sh NDY1 真核表达质粒构建成功(图 2)。



M: Lamda/Eco130I DNA Marker;1(a)、2(a):pGPU6/GFP/Neo-sh NDY1 质粒 1、2 的 Pst I 酶切鉴定结果;1(b)、2(b):pGPU6/GFP/Neo-sh NDY1 质粒 1、2 的 BamH I 酶切鉴定结果。

图 1 pGPU6/GFP/Neo-shNDY1 酶切鉴定结果

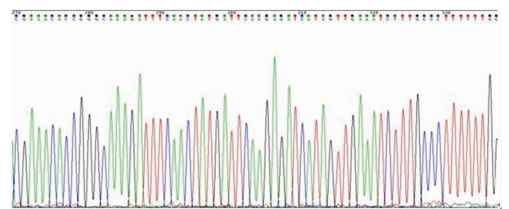
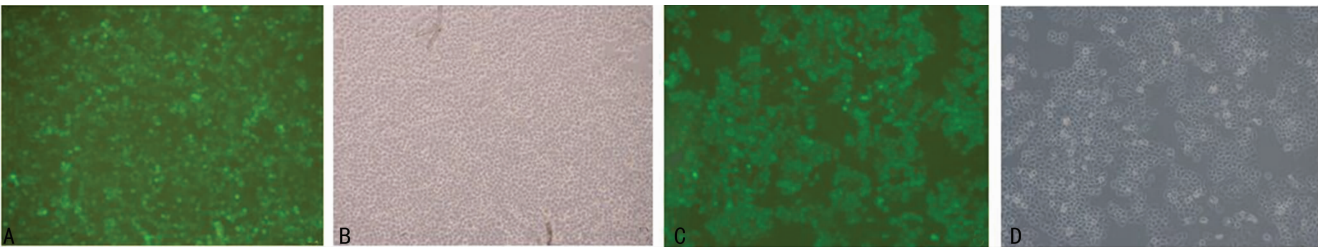


图 2 pGPU6/GFP/Neo-shNDY1 质粒测序图谱

2.2 shNDY1 稳定转染的 A2780 细胞株筛选 重组质粒转染 24 h 后,荧光显微镜下可见表达绿色荧光蛋白的 A2780 细胞;经扩大培养以及 G418 筛选 2 周后,显微镜下可见阳性克隆细胞团形成,转染效率达 90%(图 3)。



A:shNDY1-A2780 细胞荧光光源成像;B:shNDY1-A2780 细胞普通光源成像;C:shNC-A2780 细胞荧光光源成像;D:shNC-A2780 细胞普通光源成像。

图 3 pGPU6/GFP/Neo-shNDY1 在稳定转染的 A2780 细胞中的表达 (×100)

2.3 A2780 细胞 NDY1 mRNA 的相对表达 RT-qPCR 结果显示,以未转染的 A2780 细胞 NDY1 mRNA 表达水平为 100%,shNDY1-A2780 细胞 mRNA 表达水平较未转染组下降(72.89±4.83)%($P=0.001$),较 shNC 组亦有明显下调($P=0.001$);而与未转染组细胞相比,shNC 组 NDY1 mRNA 相对表达量下降约(5.34±8.79)%,二者差异无统计学意义($P>0.05$),表明所构建的质粒能明显抑制 A2780 细胞 NDY1 mRNA 表达(图 4)。

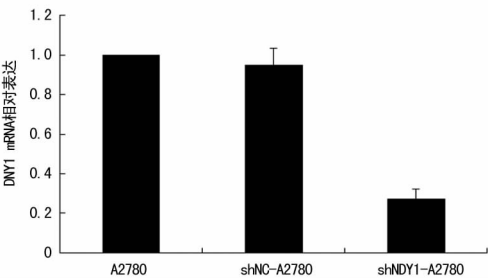


图 4 RT-qPCR 检测各组细胞 NDY1 mRNA 表达情况

2.4 A2780 细胞 NDY1 蛋白表达变化 以未转染 A2780 细胞的 NDY1 蛋白表达水平为 100%,shNDY1-A2780 细胞的 NDY1 蛋白表达下调(55.85±4.84)%($P=0.027$),与 shNC-A2780 组相比亦有明显下调,差异有统计学意义;而 shNC-A2780 组蛋白表达水平为(111.20±2.84)%,与未转染组相比差异无统计学意义($P=0.581$)。表明重组质粒转染后,能有效降低 NDY1 蛋白表达(图 5)。

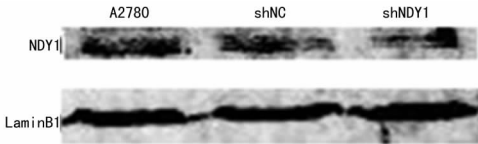


图 5 Western blot 检测各组细胞 NDY1 蛋白表达情况

3 讨 论

表观遗传学是近年肿瘤研究领域的研究热点,其包括 DNA 甲基化、染色质重塑、组蛋白修饰、非编码 RNA 在内的多种调控形式。研究表明,表观遗传机制参与细胞增殖、细胞凋亡、干细胞更新以及肿瘤耐药等多种生理病理过程^[7-10]。Rebbani 等^[11]发现,肝细胞癌组织中抑癌基因位点 DNA 甲基化异常增加;对卵巢癌的研究证实,miR-130a、miR-374a 在卵巢癌耐药细胞中高表达,并通过调节 MDR1 进而影响细胞耐药性^[12]。

NDY1 是一种重要的表观调控因子,其编码产物包含具有

去甲基化酶活性的 JmjC 结构域,通过催化组蛋白 H3K36me2 和 H3K4me3 去甲基化进而影响靶基因转录过程^[1,3-4]。现已证实,NDY1 在胰腺癌、乳腺癌、急性髓细胞白血病中呈现高表达,影响肿瘤的发生发展,因此被认为是一种促癌基因^[4-6]。研究发现,NDY1 通过下调 p15Ink4b 加速细胞周期进程,促进鼠胚胎成纤维(MEF)细胞增殖^[13]。骨髓细胞 NDY1 上调能诱导 Nsg2 表达,干扰幼稚造血细胞的发育成熟,促进髓系及 B 淋巴细胞白血病的发生^[14-15]。在胰腺癌中,过表达的 NDY1 与 KrasG12D 协同促进肿瘤的进程,且 NDY1 的表达水平与肿瘤分级、分期及远处转移密切相关;而沉默 NDY1 表达则能逆转胰腺癌细胞的致瘤性^[4],提示 NDY1 可能成为恶性肿瘤治疗的新靶点。

尽管已有研究表明 NDY1 的异常表达可以影响肿瘤的发生发展,但 NDY1 和卵巢癌的关系却尚未见报道。为了探索 NDY1 对卵巢癌发病的影响,寻找临床治疗卵巢癌的新靶点,本研究构建表达 shNDY1 的真核表达载体 pGPU6/GFP/Neo-shNDY1,经酶切鉴定及 DNA 测序检测证实目的质粒构建成功。脂质体法将目的质粒导入卵巢癌细胞 A2780,经 G418 加压筛选成功获得稳定表达 shNDY1 的阳性单克隆;RT-qPCR 检测转染后 NDY1 mRNA 的抑制率达(72.89±4.83)%,其相应蛋白表达亦明显下调。

综上所述,本研究构建的真核表达载体能够成功抑制卵巢癌细胞内源性 NDY1 基因表达,并在细胞水平为研究 NDY1 与卵巢癌的关系以及探索以 NDY1 为治疗靶点的卵巢癌临床治疗新方法奠定实验基础。

参考文献

[1] Tzatsos A, Pfau R, Kampranis SC, et al. Ndy1/KDM2B immortalizes mouse embryonic fibroblasts by repressing the Ink4a/Arf locus[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(8):2641-2646.
[2] Blackledge NP, Farcas AM, Kondo T, et al. Variant PRC1 complex-dependent H2A ubiquitylation drives PRC2 recruitment and polycomb domain formation[J]. Cell, 2014, 157(6):1445-1459.
[3] Ge R, Wang Z, Zeng Q, et al. F-box protein 10, an NF-κB-dependent anti-apoptotic protein, regulates TRAIL-induced apoptosis through modulating c-Fos/c-FLIP pathway[J]. Cell Death Differ, 2011, 18(7):1184-1195.
[4] Tzatsos A, Paskaleva P, Ferrari F, et al. KDM2B pro-

- motes pancreatic cancer via Polycomb-dependent and-independent transcriptional programs [J]. *J Clin Invest*, 2013,123(2):727-739.
- [5] Kottakis F, Foltopoulou P, Sanidas I, et al. NDY1/KDM2B functions as a master regulator of polycomb complexes and controls self-renewal of breast cancer stem cells[J]. *Cancer Res*, 2014,74(14):3935-3946.
- [6] He J, Nguyen AT, Zhang Y. KDM2b/JHDM1b, an H3K36me2-specific demethylase, is required for initiation and maintenance of acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2011,117(14):3869-3880.
- [7] Zhang F, Xu L, Xu L, et al. JMJD3 promotes chondrocyte proliferation and hypertrophy during endochondral bone formation in mice[J]. *J Mol Cell Biol*, 2015,7(1):23-34.
- [8] Haag T, Herkt CE, Walesch SK, et al. The apoptosis associated tyrosine kinase gene is frequently hypermethylated in human cancer and is regulated by epigenetic mechanisms[J]. *Genes Cancer*, 2014,5(9/10):365-374.
- [9] Hasemann MS, Lauridsen FB, Waage J, et al. C/EBPIs required for Long-Term Self-Renewal and lineage priming of hematopoietic stem cells and for the maintenance of epigenetic configurations in multipotent progenitors [J]. *PLoS Genet*, 2014,10(1):e1004079.
- [10] Zhang YW, Zheng Y, Wang JZ, et al. Integrated analysis of DNA methylation and mRNA expression profiling reveals candidate genes associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer[J]. *Epigenetics*, 2014,9(6):896-909.
- [11] Rebbani K, Marchio A, Ezzikouri S, et al. TP53 R72P polymorphism modulates DNA methylation in hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2015,14(14):74.
- [12] Li N, Yang L, Wang H, et al. MiR-130a and MiR-374a function as novel regulators of cisplatin resistance in human ovarian cancer a2780 cells[J]. *PLoS One*, 2015,10(6):e0128886.
- [13] He J, Kallin EM, Tsukada Y, et al. The H3K36 demethylase Jhdm1b/Kdm2b regulates cell proliferation and senescence through p15 (Ink4b) [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2008,15(11):1169-1175.
- [14] Ueda T, Nagamachi A, Takubo K, et al. Fbxl 10 overexpression in murine hematopoietic stem cells induces leukemia involving metabolic activation and upregulation of Nsg2[J]. *Blood*, 2015,125(22):3437-3446.
- [15] Tzatsos A, Paskaleva P, Lymperi S, et al. Lysine-specific demethylase 2B (KDM2B)-let-7-enhancer of zester homolog 2 (EZH2) pathway regulates cell cycle progression and senescence in primary cells[J]. *J Biol Chem*, 2011,286(38):33061-33069.

(收稿日期:2015-10-19 修回日期:2015-12-10)

(上接第 1011 页)

- [2] Imberti B, Tomasoni S, Ciampi O, et al. Renal progenitors derived from human iPSCs engraft and restore function in a mouse model of acute kidney injury[J]. *Sci Rep*, 2015(5):8826.
- [3] 熊龙辉,何国林,张志,等. 西藏猪模型对新型生物人工肝治疗安全性的评估[J]. *重庆医学*, 2014,43(9):1038-1040.
- [4] Gueler F, Shushakova N, Mengel M, et al. A novel therapy to attenuate acute kidney injury and ischemic allograft damage after allogenic kidney transplantation in mice[J]. *PLoS One*, 2015,10(1):e0115709.
- [5] 方桂珍,郑传权. 贝朗 Dialog 血液透析机的定标与校准[J]. *中国医疗设备*, 2012,27(4):121-122.
- [6] 孟伶俊. 费森尤斯 4008S 血液透析机的报警问题与维修措施[J]. *医疗装备*, 2014,29(8):72-73.
- [7] 杨敬华,孙咏梅,许辉,等. 连续性肾脏替代治疗在多器官功能衰竭救治中的临床应用[J]. *中国现代医学杂志*, 2002,12(11):68-70.
- [8] 陈桂珍. 慢性肾衰患者血液透析并发症及其预防[J]. *辽宁医学杂志*, 2003,17(3):138.
- [9] Awad AS, El-Sharif AA. Curcumin immune-mediated and anti-apoptotic mechanisms protect against renal ischemia/reperfusion and distant organ induced injuries[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011,11(8):992-996.
- [10] Kelly KJ. Distant effects of experimental renal ischemia/reperfusion injury[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003,14(6):1549-1558.
- [11] 陶琦,姚源璋. 急性肾衰竭动物模型研究进展[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2013,14(7):654-655.
- [12] Chiu PY, Leung HY, Ko KM. Schisandrin B enhances renal mitochondrial antioxidant status, functional and structural integrity, and protects against Gentamicin-Induced nephrotoxicity in rats[J]. *Biol Pharm Bull*, 2008,31(4):602-605.
- [13] 顾为望,刘运忠,唐小江,等. 西藏小型猪血液生理生化指标的初步研究[J]. *中国实验动物学报*, 2007,15(1):60-63.
- [14] 袁进,吴清洪,陈丽,等. 西藏小型猪与人血液流变学指标的比较分析[J]. *中国比较医学杂志*, 2008,17(10):82.

(收稿日期:2015-10-14 修回日期:2015-12-15)