

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.09.005

Map3k1 基因下调对 B6 小鼠眼睑角质形成细胞增殖和迁移能力的影响*

景瑾^{1,2}, 刘莉莉¹, 尤杰¹, 夏婷婷¹, 张进¹, 刘春^{1,2}, 朱顺星^{1,2,Δ}

(1. 南通大学杏林学院, 江苏南通 226001; 2. 南通大学实验动物中心, 江苏南通 226001)

[摘要] **目的** 为了研究靶向抑制 Map3k1 基因对 B6 小鼠眼睑角质形成细胞增殖和迁移能力的影响。**方法** 通过已构建的靶向沉默 Map3k1 基因 amiRNA 干扰载体, Lipofectamin 2000 转染 B6 小鼠眼睑角质形成细胞(Ctrl Map3k1 组转染空载体, Map3k1 amiRNA-3 组转染 Map3k1 amiRNA-3 干扰载体); Real-Time PCR 和 Western blot 实验分别检测 Map3k1 mRNA 和蛋白的相对表达量, 以测定干扰效率; 四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测 B6 小鼠眼睑角质形成细胞的增殖水平; 划痕实验检测角质形成细胞的迁移能力。**结果** B6 小鼠眼睑角质形成细胞转染 Map3k1 amiRNA-3 干扰载体后, mRNA 和蛋白水平均被有效抑制, 干扰效率高达 70% ($P < 0.05$); Map3k1 amiRNA-3 组在细胞增殖水平上低于 Ctrl Map3k1 组 ($P < 0.05$); Map3k1 amiRNA-3 组在迁移能力上亦显著低于 Ctrl Map3k1 组 ($P < 0.05$)。**结论** 靶向抑制 B6 小鼠眼睑角质形成细胞中 Map3k1 基因的表达后显著抑制细胞的增殖和迁移, 进而影响细胞的生物学行为。

[关键词] Map3k1; 角质形成细胞; RNA 干扰; 细胞增殖; 迁移能力**[中图分类号]** R779.12**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)09-1165-04

Effect of Map3k1 gene down regulation on proliferation and migration abilities of B6 mouse eyelid keratinocytes*

JING Jin^{1,2}, LIU Lili¹, YOU Jie¹, XIA Tingting¹, ZHANG Jin¹, LIU Chun^{1,2}, ZHU Shunxing^{1,2,Δ}

(1. Xinglin College, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China;

2. Laboratory Animal Center of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of targeted inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 (Map3k1) gene on the cell proliferation and migration abilities of B6 mouse eyelid keratinocytes. **Methods** An artificial microRNA (amiRNA) interference vector targeting silent Map3k1 gene was constructed in vitro in the test. Lipofectamin 2000 was used to transfect the B6 mouse eyelid keratinocytes (the Ctrl Map3k1 group was transfected with empty vector, while the Map3k1 amiRNA-3 group was transfected with Map3k1 amiRNA-3 interference vector). The Map3k1 mRNA and protein expression levels were respectively detected by real-time PCR and Western-blot for determining the interference efficiency. The B6 mouse eyelid keratinocytes proliferation level was detected by MTT. The migration ability of keratinocytes was detected by the scratch experiment. **Results** After the keratinocytes were transfected with Map3k1 amiRNA interference vector, the levels of Map3k1 mRNA and protein were effectively inhibited, and the interference efficiency was up to 70% ($P < 0.05$). The proliferation level of keratinocytes in the Map3k1 amiRNA-3 group was lower than that in the Ctrl Map3k1 group ($P < 0.05$). The migratory ability of keratinocytes in the Map3k1 amiRNA-3 group was also significantly lower than that in the Ctrl Map3k1 group ($P < 0.05$). **Conclusion** Targeted inhibition of Map3k1 gene expression in B6 mouse eyelid keratinocytes significantly inhibits cell proliferation and migration, thus influence the cellular biological behaviors.

[Key words] Map3k1; keratinocyte; RNA interference; cell proliferation; migration ability

研究表明眼睑发育异常主要是由于眼睑角质形成细胞迁移受阻所致^[1]。大量资料显示, Map3k1 基因在小鼠眼睑形态建成过程中起到关键作用。Map3k1 是丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 家族中的重要成员, 其表达的蛋白细胞外信号调节激酶 1 (MEKK1) 具有广泛的生物学功能。MEKK1 蛋白是 MAPK 信号传导通路的结点, 可以调节 JNK^[2]、ERK1/2^[3]、P38^[4]、IKK-NFκB^[5] 等信号通路, 这些信号通路参与调控相关细胞的增殖、分化、凋亡、迁移和侵袭等^[2-5], 对细胞的生存、生长起着至关重要的作用。本研究拟采用 RNA 干扰技术, 实现对 Map3k1 的特异性沉默, 来检测其对 B6 小鼠眼睑角质形成细胞生物学功能的影响。

1 材料与方法

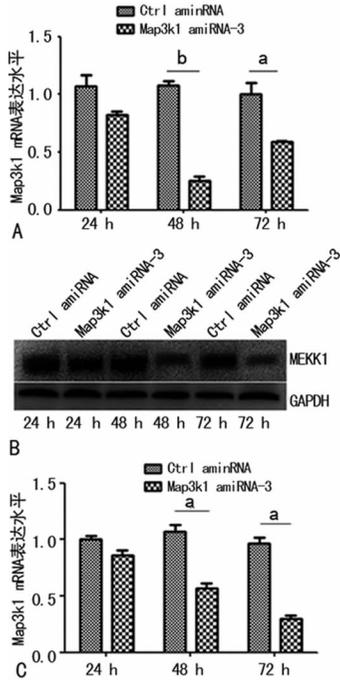
1.1 材料

1.1.1 实验动物 B6 (C57BL/6, B6) 小鼠购自南通大学实验动物中心, 饲养在清洁级屏障动物房内, 室内温度为 (23 ± 2) °C, 湿度控制为 (55 ± 5) %, 自由采食和饮水, 室内照明采用 12 h : 12 h 明暗交替, 定期更换笼具、垫料。

1.1.2 主要仪器及试剂 CO₂ 细胞培养箱购自 Thermo 公司 (美国); 倒置相差显微镜购自 Leica 公司 (德国); 抗菌药物、大豆胰蛋白酶抑制剂购自 Amresco 公司 (美国); 角质形成细胞无血清培养基 (DK-SFM)、0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸 (EDTA) 购自 Gibco 公司 (美国); 中性蛋白酶 II 购自 Roche 公司 (瑞士); 24 孔细胞培养板购自 Corning 公司 (美国); 质粒抽提试剂盒购自 Omega 公司 (美国); Mouse monoclonal to MEKK1 购自 Abcam 公司 (英国); Anti-Mouse IgG、HRP-linked Antibody 购自 Cell Signaling 公司 (美国)。

* 基金项目: 江苏省高等学校大学生创新创业训练计划项目 (201513993008Y); 南通市市级科技计划项目 (YYZ16044)。 作者简介: 景瑾 (1991—), 硕士, 主要从事人类疾病动物模型的研究。 Δ 通信作者, E-mail: zhussx@ntu.edu.cn。

blot 结果(图 2B、C)表明在转染 Map3k1 amiR-3 质粒后 72 h, B6 小鼠眼睑角质形成细胞 Map3k1 基因蛋白的表达量下降最为显著,干扰效率高达 70%($P < 0.05$)。



A: Real-Time PCR 检测 Map3k1 mRNA 相对表达量; B: Western blot 检测 Map3k1 amiRNA-3 蛋白的相对表达量; C: Map3k1 amiRNA-3 蛋白的相对表达量; ^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$

图 2 Real-Time PCR、Western blot 检测 Map3k1 amiRNA-3 的干扰效率

2.3 MTT 法检测 B6 小鼠眼睑角质形成细胞的增殖水平
细胞增殖水平检测结果显示: Map3k1 amiRNA-3 组在转染 24、48、72 h 细胞增殖水平显著低于 Ctrl amiRNA 组 ($P < 0.05$)。见表 1、图 3。

表 1 MTT 法不同时间细胞增殖水平检测 ($\bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h
Ctrl amiRNA 组	0.089 ± 0.027	0.149 ± 0.017	0.279 ± 0.136
Map3k1 amiRNA-3 组	0.036 ± 0.019 ^a	0.085 ± 0.054 ^a	0.137 ± 0.122 ^b

^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$, 与 Ctrl amiRNA 组比较

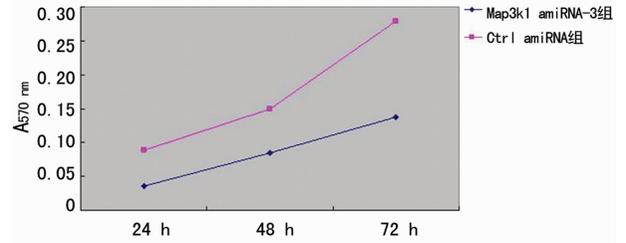


图 3 MTT 法不同时间细胞增殖水平检测

2.4 划痕实验检测 B6 小鼠眼睑角质形成细胞的迁移能力
Map3k1 amiRNA-3 组角质形成细胞,在划痕后 24 h,其穿过划痕区的细胞数量与相对距离均明显低于转染空载体的 Ctrl amiRNA 组(图 4),定量分析发现 Ctrl amiRNA 组迁移的细胞数为(615 ± 39)个,Map3k1 amiRNA-3 组仅有(325 ± 34)个,差异有统计学意义($P < 0.05$);细胞迁移划痕区的相对距离, Ctrl amiRNA 组为(0.339 ± 0.015), Map3k1 amiRNA-3 组为(0.181 ± 0.027),两组差异有统计学意义($P < 0.05$)。

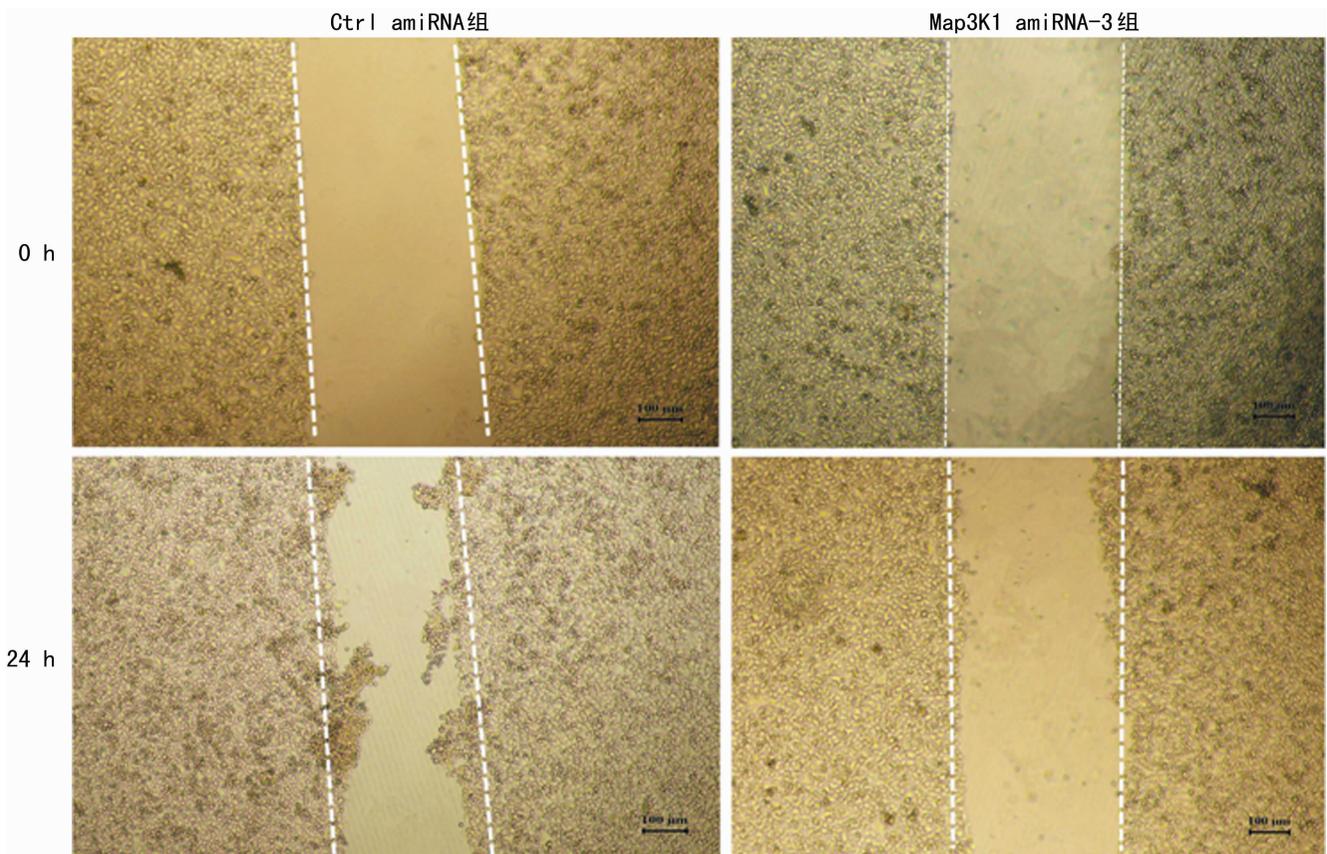


图 4 划痕实验检测 B6 小鼠眼睑角质形成细胞的迁移能力

3 讨 论

眼睑是眼球前的软组织,当眼受到外界各种刺激时,可通过中枢神经的指挥及时将其关闭,从而阻挡外来异物或强光对眼睛造成伤害,对眼的发育和保护具有重要作用。若眼睑发育异常便会受到各种眼部疾病的困扰,如角膜病、白内障、视力减退等。研究表明眼睑发育异常主要是由于眼睑角质形成细胞迁移受阻所致^[1]。有研究发现通过 MEKK1 的转导,可以引发角质形成细胞的迁移,MEKK1 对角质形成细胞的运动有着至关重要的作用^[7]。

RNA 干扰是由双链 RNA(dsRNA)诱发同源 mRNA 高效且特异性降解的现象,可以特异性剔除或关闭目的基因的表达,该技术具有成本低廉、高效率、高特异性、操作方便等优势^[8-10],已成为各大实验室探索基因功能的常用技术。

Map3k1 基因位于 5q11.2,其编码的蛋白称为 MEKK1,全长 196×10^3 。MEKK1 是 MAPK 家族中的重要成员,具有 Ser/Thr 激酶活性,其 C-端为催化结构域,N-端为调节结构域,可以磷酸化与其结合的下游靶蛋白,从而介导蛋白间的相互作用并影响其行为和生物学功能。MEKK1 蛋白是 MAPK 信号传导通路的结点,可以调节 JNK^[2]、ERK1/2^[3]、P38^[4]、IKK-NF κ B^[5] 等信号通路,这些信号通路参与调控相关细胞的增殖、分化、凋亡、迁移和侵袭等^[2-5]。Map3k1 对细胞的发生、发展起着至关重要的作用,有研究表明 Map3k1 具有可决定细胞命运的开关样功能,即促进和抑制细胞凋亡的双重作用^[11]。而 MEKK1 作为几个 MAPK 通路的上游调节因子,亦涉及不同种类和细胞类型的生物学反应,包括角质形成细胞的分化、T 细胞活化和压力刺激诱导的细胞凋亡等。因而,本研究拟采用 RNA 干扰技术,实现对 Map3k1 的特异性沉默,来检测其对 B6 小鼠眼睑角质形成细胞生物学功能的影响。期许为更好的理解、掌握 Map3k1 在 B6 小鼠眼睑角质形成细胞中的作用,及其在眼睑发育过程中的作用提供理论依据。

首先通过前期实验中已成功构建靶向沉默 Map3k1 基因的 amiRNA 表达载体^[6],实现对 Map3k1 的特异性沉默,干扰效率高达 70%,为研究 B6 小鼠眼睑角质形成细胞生物学效应在干扰 Map3k1 前后的变化奠定了基础。

Map3k1 基因参与调节各种类型的细胞运动迁移,研究发现 Map3k1 基因敲除的新生鼠由于上皮细胞迁移缺陷,导致出生时眼睑不能闭合^[12],说明 Map3k1 基因在小鼠眼睑形态建成过程中起到关键作用。Map3k1 表达的缺乏可减少细胞的迁移和侵袭能力^[13]。在本实验中发现靶向抑制 Map3k1 的表达后,B6 小鼠眼睑角质形成细胞的迁移能力被显著抑制,无论是迁移的距离还是迁移的细胞数量都显著下调($P < 0.05$)。此外,还发现 Map3k1 的表达被抑制后,会影响 B6 小鼠眼睑角质形成细胞的增殖能力($P < 0.05$)。这些结果表明靶向抑制 Map3k1 的表达能够广泛的影响 B6 小鼠眼睑角质形成细胞的生物学行为,从而影响眼睑的发育。

参考文献

[1] KATO S, MOHRI Y, MATSUO T, et al. Eye-open at birth phenotype with reduced keratinocyte motility in

LGR4 null mice[J]. FEBS Lett, 2007, 581(24): 4685-4690.

- [2] LU H J, NING X J, TAO X E, et al. MEKK1 associated with neuronal apoptosis following intracerebral hemorrhage[J]. Neurochem Res, 2016, 41(12): 3308-3321.
- [3] CHENG Y, LIN C H, CHEN J Y, et al. Induction of connective tissue growth factor expression by hypoxia in human lung fibroblasts via the MEKK1/MEK1/ERK1/GLI1/GLI-2 and AP-1 pathways[J]. PLoS One, 2016, 11(8): 1-23.
- [4] HUANG D S, LI X J, SUN L, et al. Regulation of hippo signalling by p38 signalling[J]. J Mol Cell Biol, 2016, 8(4): 328-337.
- [5] AL-SADI R, GUO S H, YE D M, et al. TNF-alpha modulation of intestinal tight junction permeability is mediated by NIK/IKK-alpha axis activation of the canonical NF-kappa B pathway[J]. Am J Pathol, 2016, 186(5): 1151-1165.
- [6] 王胜洁,刘春,汪海峰,等. 靶向抑制 MAP3K1 对小鼠乳腺癌细胞生物学行为的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016, 290: 26-31.
- [7] XIA Y, KAO W W. The signaling pathways in tissue morphogenesis: a lesson from mice with eye-open at birth phenotype[J]. Biochem Pharmacol, 2004, 68(6): 997-1001.
- [8] SUGAHARA R, TANAKA S, JOURAKU A, et al. Geographic variation in RNAi sensitivity in the migratory locust [J]. Gene, 2017, 605: 5-11.
- [9] KAMATH R S, FRASER A G, DONG Y, et al. Systematic functional analysis of the Caenorhabditis elegans genome using RNAi[J]. Nature, 2003, 421(6920): 231-237.
- [10] VOLPE T, KIDNER C, HALL I M, et al. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi[J]. Science, 2002, 297(5588): 1833-1837.
- [11] ZEBROWSKI D C, ALCENDOR R R, KIRSHENBAUM L A, et al. Caspase-3 mediated cleavage of MEKK1 promotes p53 transcriptional activity[J]. J Mol Cell Cardiol, 2006, 40(5): 605-618.
- [12] YUJIRI T, WARE M, WIDMANN C, et al. MEK kinase 1 gene disruption alters cell migration and c-Jun NH2-terminal kinase regulation but does not cause a measurable defect in NF-kappa B activation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000; 97: 7272-7277.
- [13] STEED E, ELBEDIWY A, VACCA B, et al. MarvelD3 couples tight junctions to the MEKK1-JNK pathway to regulate cell behavior and survival[J]. J Cell Biol, 2014, 204(5): 821-838.

(收稿日期:2017-10-22 修回日期:2017-12-06)