

[文章编号] 1000-1182(2009)03-0244-04

亚甲基四氢叶酸还原酶基因在 小鼠胚胎腭突间充质细胞中沉默效应的研究

肖文林¹ 石冰² 王葵² 郑谦² 黄磊²

(1.青岛大学医学院附属医院 口腔颌面外科, 山东 青岛 266003;

2.四川大学华西口腔医院 唇腭裂外科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 构建亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)特异性小干扰RNA(siRNA)真核表达载体, 体外观察其对MTHFR基因的沉默作用。方法 采用基因克隆技术, 将合成的特异性MTHFR RNA干扰寡核苷酸序列插入真核表达载体PsiRNA-Hh1_{neo}-G2, 构建MTHFR siRNA真核表达载体。应用核转染技术将PsiRNA-MTHFR重组质粒分别导入原代培养的小鼠胚胎腭突间充质(MEPM)细胞。48 h和5 d后用实时定量聚合酶链反应(Real-Time PCR)和Western blot技术检测MEPM细胞内MTHFR mRNA及蛋白水平的表达情况。结果 成功构建PsiRNA-MTHFR真核表达载体。经检测48 h和5 d后转染PsiRNA-MTHFR的MEPM细胞MTHFR mRNA及蛋白表达均显著下调。结论 构建的RNA干扰真核表达载体能明显干扰MTHFR mRNA及蛋白的表达, 为进一步研究MTHFR的功能以及其调控胚胎腭突融合的机制奠定基础。

[关键词] 亚甲基四氢叶酸还原酶基因; RNA干扰; 真核表达

[中图分类号] Q786 **[文献标识码]** A

Gene expression of methylene tetrahydrofolate reductase and its silencing effect in primary culture mouse embryo palatal mesenchymal cell XIAO Wen-lin¹, SHI Bing², WANG Yan², ZHENG Qian², HUANG Lei². (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Medical School Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China; 2. Dept. of Cleft and Palate Surgery, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To construct a small interfering RNA(siRNA) eukaryotic expression vector specific for methylene tetrahydrofolate reductase(MTHFR) gene and to observe its silencing effect on MTHFR gene. **Methods** The expression vectors of PsiRNA-MTHFR were constructed by gene recombination and then were nucleofected into the primary cultured MEPM cell. At 48 h and 5 d after nucleofection, the expression of MTHFR in the levels of mRNA and protein was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction(Real-Time PCR) and Western blot. **Results** The eukaryotic expression vector of PsiRNA-MTHFR, which significantly down-regulated mRNA and protein of MTHFR at 48 h and 5 d after nucleofection, were successfully constructed. **Conclusion** Eukaryotic expression vector of siRNA specific for MTHFR is successfully constructed, which lays the basis for its application in the mechanism research of MTHFR gene regulating embryo palate shelves fusion.

[Key words] methylene tetrahydrofolate reductase gene; RNA interference; eukaryotic expression

亚甲基四氢叶酸还原酶(methylene tetrahydrofolate reductase, MTHFR)在叶酸代谢中起重要作用, 功能为催化5, 10-亚甲基四氢叶酸还原为5-亚甲基四氢叶酸^[1]。MTHFR基因有多种突变型, 错义突变可使其编码的酶的活性及热稳定性下降。目前发现

最常见的MTHFR基因错义突变是C677T^[2]及A1298C^[3]。流行病学研究证实MTHFR基因多态性可以通过影响叶酸代谢导致胎儿先天性唇腭裂的发生^[4-6]。RNA干扰(RNA interference, RNAi)是目前最有效的基因沉默技术, 能特异性抑制靶基因的转录, 进而下调相应蛋白的水平及功能。本研究通过构建MTHFR基因特异性小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)真核表达载体, 检测其对原代培养的小鼠胚胎腭突间充质(mouse embryo palatal mesenchymal, MEPM)细胞的沉默作用, 为进一步研究MTHFR基

[收稿日期] 2008-12-17; [修回日期] 2009-04-10

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30371552)

[作者简介] 肖文林(1971-), 男, 山东人, 副主任医师, 博士

[通讯作者] 石冰, Tel: 028-85501462

因突变导致腭裂发生的病理机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

psiRNA-neo 试剂盒(Invivo Gin公司, 美国), LineSilence™RNA干扰试剂盒(Alele Biotechnology & Pharmaceutical公司, 美国), 质粒提取试剂盒(Qiagen公司, 美国), ImProm-™反转录酶(Promega公司, 美国), *Bbs* 限制性内切酶、实时定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, Real-Time PCR)试剂盒(Takara公司, 日本), pEGFP-N1(Clontech公司, 美国), Human Dermal Fibroblast Nucleofector™ Kit(A-MAXA公司, 德国), MTHFR多克隆抗体(Santa Cruz公司, 美国), ECL检测试剂盒(Amersham Pharmacia公司, 美国)。

1.2 小鼠胚胎腭突间充质细胞的培养

按照文献[7]中的方法培养小鼠胚胎腭突间充质细胞。

1.3 MTHFR基因siRNA序列的筛选

根据MTHFR基因在GenBank中的cDNA序列, 按照文献推荐的siRNA设计原则, 设计4对siRNA寡核苷酸序列^[8-9]。4对siRNA的正义链序列为S1: ggcc-tacctgaattcttc; S2: gagctacatctaccgcaca; S3: cca-gcctgatgaaggaaga; S4: ggatgtaattgagccatc。根据LineSilence™RNA干扰试剂盒说明合成反应的下游引物, 并根据说明进行聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)反应。每一对siRNA的反应产物应用Lipofectamine 2000™脂质体转染剂共转染原代培养的MEPM细胞, 细胞接种于6孔板, 转染方法按转染剂说明进行。转染后继续培养48 h收集细胞, 提取RNA, 行半定量PCR反应, 检测4对siRNA的沉默效率。

1.4 RNAi质粒的构建

半定量PCR反应结果证明S3序列的基因沉默效率最高。根据S3的DNA正反义序列构建MTHFR基因的短发卡样RNA(short-hairpin RNA, shRNA)真核表达载体。质粒载体选用PsiRNA-Hh1_{neo}_G2, 设计合成的shRNA的DNA序列前后两端加上载体中*Bbs*酶切位点, 正反义链中间由7个碱基连接, 这7个碱基在体内转录后形成环状结构。2条互补序列为Oligo 1: 5'-ACCTCCCAGCCTGATGAAGGAAGATC-AAGAGTCTTCCTTCATCAGGCTGGTT-3'; Oligo 2: 5'-CAAAAACCAGCCTGATGAAGGAAGACTCTTGA-TCTTCCTTCATCAGGCTGGG-3'。将退火后的DNA双链与*Bbs* 酶切纯化后的载体以T4连接酶连接构

建带有特定MTHFR基因片段的shRNA表达载体。将S3序列设计合成Oligo后, 构建到PsiRNA-Hh1_{neo}_G2质粒。然后转化大肠杆菌GT116, 卡那霉素进行蓝白筛选, 随机挑取8个克隆, 抽提质粒后, 琼脂糖凝胶电泳验证阳性克隆, 阳性克隆测序证实质粒载体构建成功, 命名为PsiRNA-MTHFR; 根据S3的DNA正反义序列设计MTHFR基因干扰的无义链序列, 并经过BLAST验证后, 合成2条互补序列: Oligo 1: 5'-ACCTCGGTGAAGACCCAAGTGAAGTCAAG-AGTCTCAGTTGGGTCTTCACCTT-3'; Oligo 2: 5'-CAAAAAGGTGAAGACCCAAGTGAAGTCTTGTATC-TCAGTTGGGTCTTCACCG-3'。同法克隆入PsiRNA-Hh1_{neo}_G2构建MTHFR基因RNAi的无义链质粒, 命名为PsiRNA-NMTHFR。

1.5 RNA干扰MTHFR基因效率检测

将空质粒的PsiRNA-Hh1_{neo}_G2(PsiRNA组)、RNAi质粒PsiRNA-MTHFR(PsiRNA-MTHFR组)、无义链质粒PsiRNA-NMTHFR(PsiRNA-NMTHFR组)应用电转仪及Human Dermal Fibroblast Nucleofector™ Kit(amaxa GmbH)转染入原代培养的MEPM细胞, 电转程序为U30。转染后细胞以每孔 2×10^5 接种到6孔板。继续培养48 h和5 d后分别收集细胞, 进行检测。

1.5.1 Western blot检测 制备细胞总蛋白。按常规进行120 g/L SDS2PAGE。电泳后电转移至硝酸纤维素膜上, 用丽春红染液对滤膜进行染色, 标记笔标记蛋白相对分子质量标准各条带所在位置, 再用去离子水洗去丽春红。加80 g/L脱脂奶粉于室温封闭2 h, 与稀释于40 g/L脱脂奶粉的抗体(抗MTHFR 1:50, 抗 β -actin 1:5 000)4℃孵育过夜, TBST(10 mmol/L Tris base, 150 mmol/L NaCl, 0.5 mL/L Tween20, pH8.0)摇洗4×15 min, 然后与稀释于40 g/L脱脂奶粉的HRP标记的小鼠抗山羊IgG于室温孵育2 h, TBST摇洗4×15 min。最后, 等量混合ECL显色系统中A液和B液, 滴加至硝酸纤维素膜上, X线胶片感光。

1.5.2 Real-Time PCR检测 Real-Time PCR检测MTHFR基因水平: 1)细胞总RNA的提取依照TriPure试剂盒说明书进行。2)采用Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(MBI)在PCR仪上扩增, 逆转录为cDNA。3)Real-Time PCR检测探针序列5'-CCAT-CTTCTGGGCTCCAGAC-3', 上游引物: 5'-GACC-CCAGGCGTCCCTT-3', 下游引物: 5'-AACTCATC-CCAGTCCTGTGT-3'。反应条件为: 94℃预变性2 min; 94℃变性10 s、53℃退火30 s、72℃延伸40 s, 45个循环; 72℃延伸5 min。内参照物的检测采用GAPDH作为对照。4)用各样品中看家基因的定量值

对待测基因的定量值进行均一化，即得到最终的待测基因的相对定量结果。

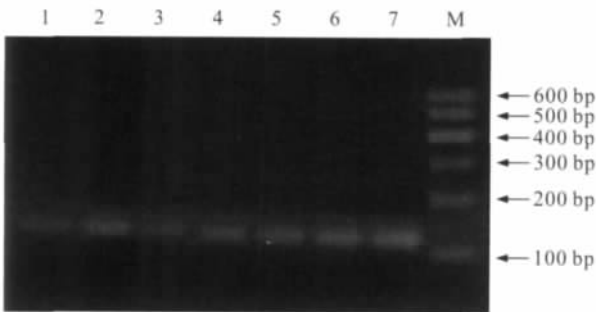
1.6 统计学处理

采用SPSS 11.5统计分析软件，实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 RNA干扰MTHFR重组质粒的构建与鉴定

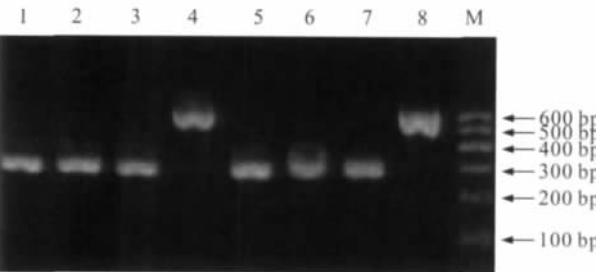
筛选沉默效率最高siRNA序列的半定量PCR反应见图1。与 β -actin内参对比，结果表明S3序列沉默效果最好。琼脂糖凝胶电泳验证PsiRNA-MTHFR阳性克隆(图2)。



1~4: 4对siRNA序列; 5: 转染任意siRNA (S3) 序列反义链; 6: 空白对照; 7: 只加入脂质体转染剂; M: Marker

图 1 筛选沉默效率最高siRNA序列的半定量PCR反应琼脂糖电泳结果

Fig 1 Analysis of PCR products for selecting the most efficient siRNA sequence



1~3、5~7: 阴性克隆, 为300 bp; 4、8: 阳性克隆, 约520 bp; M: Marker

图 2 质粒阳性克隆鉴定
Fig 2 Identification of recombinant plasmid vector

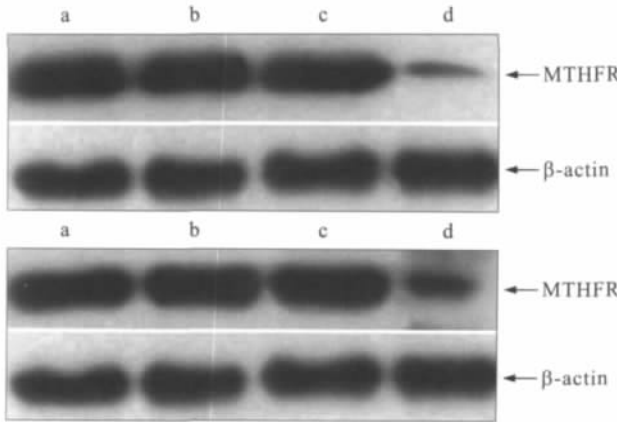
2.2 MTHFR基因沉默效率分析

Western blot检测结果表明，MTHFR蛋白相对分子质量为 7.4×10^4 ，与PsiRNA组、PsiRNA-NMTHFR组及空白对照组相比，PsiRNA-MTHFR组的表达量明显降低($P < 0.001$)，经Gel-Pro Analyzer软件分析确定48 h后MTHFR的沉默效率大于80%，5 d后MTHFR的沉默效率仍达70%以上(图3)。

2.3 Real-Time PCR检测结果

转染PsiRNA-MTHFR后，收集培养48 h和5 d的细胞，提取总RNA，采用Real-Time PCR检测细胞MTHFR mRNA的表达。转染PsiRNA-MTHFR后的

MEPM细胞MTHFR mRNA表达不同程度的受到抑制。统计分析表明，MTHFR基因沉默48 h、5 d时转染PsiRNA-MTHFR组与空白对照组相比MTHFR mRNA表达显著下降($P < 0.001$)。48 h抑制率接近89%，5 d抑制率仍接近80%(图4)。



上、下: 分别为RNA干扰48 h、5 d后MTHFR蛋白的表达; a: 空白对照组; b: PsiRNA-NMTHFR组; c: PsiRNA组; d: PsiRNA-MTHFR组

图 3 MTHFR基因沉默48 h及5 d后的MTHFR蛋白表达
Fig 3 MTHFR protein expression after MTHFR gene silencing for 48 h and 5 d

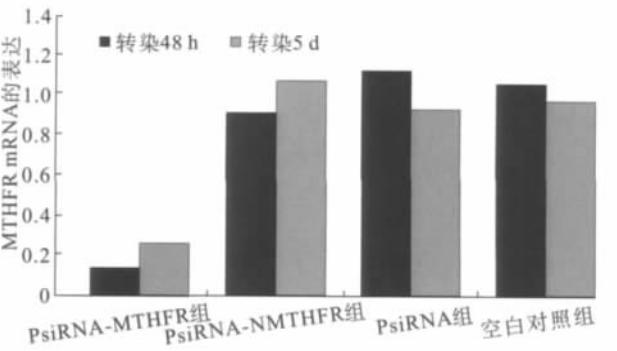


图 4 MTHFR基因沉默48 h及5 d后MTHFR mRNA的表达
Fig 4 MTHFR mRNA expression after MTHFR gene silencing for 48 h and 5 d

3 讨论

唇腭裂是一种常见的先天性发育畸形，它涉及到环境因素和遗传因素，倾向于继发的基因-环境的相互作用造成的。对先天性唇腭裂具有遗传易感性的基因应具备以下4个条件：1)基因在胚胎的特定区域表达或在腭突发育的特定时期表达；2)基因的生物活性与唇腭裂发病机制有关；3)动物实验已鉴别出此基因；4)基因与药物、杀虫剂等异型生物物质相互影响^[10]。流行病学及动物实验等研究表明MTHFR基因具备以上条件，因此被认为是重要的关于唇腭裂的候选基因。

对于功能基因的研究，反义RNA抑制及基因敲除等反向遗传学手段是最常用的方法^[11-12]。但这2种

方法都存在着缺陷,特别是当用于胚胎研究时,如基因敲除能从根本上完全消除目标基因活性,但可能不适用于研究特定基因在特定胚胎发育阶段的功能,这包括一些控制发育与细胞分裂的基因与拷贝基因。同时,由于反义RNA技术对内源性基因表达的抑制较弱,往往产生一些过渡性表型,误导对目标基因功能的判断。而最近出现的RNA干扰技术^[13-14]为从反向遗传学角度研究胚胎发育过程中未知基因的功能提供了新的方法和思路。

本研究成功构建了MTHFR的特异性siRNA真核表达载体,转染原代培养的MEPM细胞后,检测结果表明培养48 h及5 d后siRNA表达载体均能显著性的抑制MTHFR基因mRNA水平和蛋白水平的表达。构建的RNA干扰真核表达载体能明显干扰MTHFR mRNA及蛋白的表达,为进一步研究MTHFR的功能以及其调控胚胎腭突融合的机制奠定了基础。

[参考文献]

[1] Goyette P, Frosst P, Rosenblatt DS, et al. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency[J]. *Am J Hum Genet*, 1995, 56(5) :1052-1059.

[2] Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase[J]. *Nat Genet*, 1995, 10(1) :111-113.

[3] van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EM, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: An additional risk factor for neural-tube defects[J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 62(5) :1044-1051.

[4] van Rooij IA, Vermeij-Keers C, Kluijtmans LA, et al. Does the interaction between maternal folate intake and the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms affect the risk of cleft lip with or without cleft palate[J]. *Am J Epidemiol*, 2003, 157(7) :

583-591.

[5] Jugessur A, Wilcox AJ, Lie RT, et al. Exploring the effects of methylenetetrahydrofolate reductase gene variants C677T and A1298C on the risk of orofacial clefts in 261 Norwegian case-parent triads[J]. *Am J Epidemiol*, 2003, 157(12) :1083-1091.

[6] Zhu J, Ren A, Hao L, et al. Variable contribution of the MTHFR C677T polymorphism to non-syndromic cleft lip and palate risk in China[J]. *Am J Med Genet A*, 2006, 140(6) :551-557.

[7] 肖文林, 石冰, 黄磊, 等. 小鼠胚胎腭突间充质细胞的分离与体外培养方法研究[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2006, 37(1) :137-140.

XIAO Wen-lin, SHI Bing, HUANG Lei, et al. Separation and culture of mouse embryonic palatal mesenchymal cells *in vitro*[J]. *J Sichuan University(Medical Science Edition)*, 2006, 37(1) :137-140.

[8] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs[J]. *Genes Dev*, 2001, 15(2) :188-200.

[9] Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, et al. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells [J]. *Genes Dev*, 2002, 16(8) :948-958.

[10] Bianchi F, Calzolari E, Ciulli L, et al. Environment and genetics in the etiology of cleft lip and cleft palate with reference to the role of folic acid[J]. *Epidemiol Prev*, 2000, 24(1) :21-27.

[11] O'Brodovich H. Fetal lung liquid secretion: Insights using the tools of inhibitors and genetic knock-out experiments[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 25(1) :8-10.

[12] Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, et al. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition[J]. *Hum Mol Genet*, 2001, 10(5) :433-443.

[13] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669) :806-811.

[14] Hannon GJ. RNA interference[J]. *Nature*, 2002, 418(6894) :244-251.

(本文编辑 王晴)

(上接第243页)

gy, 2003, 50(53) :1407-1410.

[7] Kurahashi T, Hara I, Oka N, et al. Detection of micrometastases in pelvic lymph nodes in patients undergoing radical cystectomy for locally invasive bladder cancer by real-time reverse transcriptase-PCR for cytokeratin 19 and uroplakin [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(10) :3773-3777.

[8] 李宝江, 黄晓平, 韦尉东, 等. 检测乳腺癌患者骨髓中CK19的表达及其临床意义[J]. *癌症*, 2005, 24(6) :735-739.

LI Bao-jiang, HUANG Xiao-ping, WEI Wei-dong, et al. Expression and clinical significance of cytokeratin 19 in bone marrow of patients with breast cancer[J]. *Chin J Cancer*, 2005, 24(6) :735-739.

[9] Jung YS, Lee KJ, Kim HJ, et al. Clinical significance of bone

marrow micrometastasis detected by nested RT-PCR for keratin-19 in breast cancer patients[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2003, 33(4) :167-172.

[10] Nogi H, Takeyama H, Uchida K, et al. Detection of MUC1 and keratin 19 mRNAs in the bone marrow by quantitative RT-PCR predicts the risk of distant metastasis in breast cancer patients [J]. *Breast Cancer*, 2003, 10(1) :74-81.

[11] Lin JC, Chen KY, Wang WY, et al. Evaluation of cytokeratin-19 mRNA as a tumor marker in the peripheral blood of nasopharyngeal carcinoma patients receiving concurrent chemoradiotherapy[J]. *Int J Cancer*, 2002, 97(4) :548-553.

(本文编辑 王晴)