

IKK α 基因靶向shRNA真核表达载体的构建及表达

刘丽丽, 陈芳辉, 李宙雪, 占日新, 高艳, 陈元红, 李丽, 黄起壬

刘丽丽, 陈芳辉, 李宙雪, 占日新, 高艳, 陈元红, 李丽, 黄起壬, 南昌大学药学院药理学与分子治疗学实验室 江西省南昌市 330006

国家自然科学基金资助项目, No. 30860111

作者贡献分布: 此课题由黄起壬与刘丽丽设计; 研究过程由刘丽丽、陈芳辉、李宙雪、占日新及高艳操作完成; 全程由黄起壬指导; 数据分析由刘丽丽、陈元红及李丽完成; 本论文写作由刘丽丽完成。

通讯作者: 黄起壬, 教授, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学药学院药理学与分子治疗学实验室, huangqr67@163.com

收稿日期: 2010-04-16 修回日期: 2010-06-19

接受日期: 2010-06-28 在线出版日期: 2010-07-28

Construction and expression of eukaryotic expression plasmids of shRNA targeting the IKK α gene

Li-Li Liu, Fang-Hui Chen, Zhou-Xue Li, Ri-Xin Zhan, Yan Gao, Yuan-Hong Chen, Li Li, Qi-Ren Huang

Li-Li Liu, Fang-Hui Chen, Zhou-Xue Li, Ri-Xin Zhan, Yan Gao, Yuan-Hong Chen, Li Li, Qi-Ren Huang, Department of Pharmacology and Molecular Therapeutics, School of Pharmaceutical Science, Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30860111

Correspondence to: Professor Qi-Ren Huang, Department of Pharmacology and Molecular Therapeutics, School of Pharmaceutical Science, Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. huangqr67@163.com

Received: 2010-04-16 Revised: 2010-06-19

Accepted: 2010-06-28 Published online: 2010-07-28

Abstract

AIM: To construct eukaryotic expressing plasmids of short hairpin RNA (shRNA) targeting the IKK α gene and to evaluate their inhibitory effect on IKK α expression in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).

METHODS: Three pairs of complementary shRNA oligonucleotides targeting the IKK α gene were designed, synthesized, annealed and inserted into the pGPU6/GFP/Neo plasmid. The recombinant plasmids were identified by restriction enzyme analysis and sequence analysis. The inhibitory effect of recombinant plasmids on IKK α expression in HUVECs was detected by Western blot.

RESULTS: After restriction enzyme analysis

and sequence analysis, three eukaryotic expression plasmids of shRNA targeting the IKK α gene were successfully constructed. Western blot analysis showed that pGPU6/GFP/Neo-shRNA3 reduced IKK α expression by 70.6% in HUVECs induced with high glucose.

CONCLUSION: Three eukaryotic expression plasmids of shRNA targeting the IKK α gene are successfully constructed. These recombinant plasmids can efficiently inhibit IKK α expression in HUVECs.

Key Words: IKK α gene; Small hairpin RNA; RNA interference; Recombinant plasmid

Liu LL, Chen FH, Li ZX, Zhan RX, Gao Y, Chen YH, Li L, Huang QR. Construction and expression of eukaryotic expression plasmids of shRNA targeting the IKK α gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(21): 2253-2257

摘要

目的: 研究短发夹RNA(shRNA)真核表达载体在人脐静脉内皮细胞(HUVECs)中对IKK α 基因表达的抑制作用。

方法: 设计3条靶向IKK α 的shRNA, 经退火成互补双链, 克隆到质粒 pGPU6/GFP/Neo中构建重组载体, 经酶切鉴定和测序确认后, 将3个重组表达载体转染到HUVECs, 利用Western blot检测并筛选出抑制效果最好的重组表达载体。

结果: 通过酶切鉴定和测序分析, 靶向IKK α 的3个pGPU6/GFP/Neo-shRNA重组载体构建成功, Western blot结果显示pGPU6/GFP/Neo-shRNA3可有效抑制高糖诱导HUVECs中IKK α 基因的表达, 抑制率为70.6%。

结论: 靶向IKK α 基因的shRNA真核表达载体构建成功, 且能有效抑制HUVECs中IKK α 基因的表达。

关键词: IKK α 基因; 短发夹RNA; RNA干扰; 重组表达载体

刘丽丽, 陈芳辉, 李宙雪, 占日新, 高艳, 陈元红, 李丽, 黄起壬。

■背景资料

胰岛素抵抗是指组织和细胞对于正常剂量的胰岛素敏感性和(或)反应性减弱而产生的一种病理状态, 目前人们对于胰岛素抵抗机制的研究主要集中在肝脏、骨骼肌、脂肪组织等胰岛素敏感的传统靶器官, 然而血管内皮胰岛素抵抗日益受到人们的关注, 但其机制尚未完全清楚。

■同行评议者

徐庆, 教授, 桂林医学院药理教研室

■研发前沿

IKK α 是I κ B激酶的一个催化亚基,调控着NF- κ B信号转导通路。近年来研究发现,IKK α 介导的NF- κ B信号转导通路对于探讨血管内皮胰岛素抵抗机制有着重要意义。

IKK α 基因靶向shRNA真核表达载体的构建及表达. 世界华人消化杂志 2010; 18(21): 2253-2257
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2253.asp>

0 引言

核因子- κ B(nuclear factor kappaB, NF- κ B)信号转导通路调控多种促炎因子、趋化因子、黏附分子等基因的表达,在胰岛素抵抗的发生发展过程中起着重要作用^[1]。

I κ B激酶(I κ B kinase, 又称IKK复合体)是NF- κ B信号转导通路中的一个关键激酶,直接影响NF- κ B的活性而调控相关基因的转录表达^[2]。目前的研究证实血管内皮细胞也是胰岛素敏感细胞,胰岛素抵抗在高糖、氧化应激等条件下与血管内皮功能紊乱密切相关^[3]。近年来,IKK α 介导的NF- κ B信号转导通路参与血管内皮胰岛素抵抗的分子机制研究是近期本领域关注的热点。RNA干扰(RNA interference, RNAi)是通过RNaseIII内切酶Dicer的作用产生与靶基因的转录产物mRNA同源互补的21-23 bp双链RNA(称为小干扰RNA, short interfering RNA, siRNA),介导其互补同源mRNA序列的特异性降解,从而使靶基因沉默、相应功能表型缺失^[4]。我们构建了针对IKK α 基因的短发夹环状小干扰RNA(short hairpin RNA, shRNA)重组载体,并将其转染到人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)进行真核表达;进一步观察转染后细胞IKK α 蛋白表达情况,筛选出抑制效果最好的重组表达载体,从而为研究IKK α , NF- κ B信号转导通路与血管内皮胰岛素抵抗之间的相互关系奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 pGPU6/GFP/Neo质粒购自上海吉玛公司;脂质体LipofectamineTM2000、DMEM培养基干粉购自Invitrogen公司;限制性内切酶Bbs I和BamH I购自美国NEB公司;限制性内切酶Pst I购自Promega公司;T4连接酶和DNA Marker购自TaKaRa公司;质粒小提试剂盒和DNA胶回收纯化试剂盒购自Qiagen公司;Top10感受态细胞购自天根公司;人脐静脉内皮细胞株购自ATCC;特级胎牛血清购自杭州四季青生物制品公司;Kanamycin购自Sigma公司;IKK α 多克隆抗体及HRP标记的二抗购自Santa Cruz公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术公司;DNA由上海生工合成。

1.2 方法

1.2.1 siRNA靶序列的设计与shRNA的合成:利用GenBank检索IKK α 基因核苷酸序列(NM_001278),根据siRNA设计原则,通过Ambion公司在线设计软件辅助设计,使用Blast将选定的序列进行同源性分析,最后选出三条片段作为IKK α 基因干扰片段。设计shRNA模板中的loop结构选用了TTCAAGAGA以避免形成终止信号,shRNA的转录终止序列采用TTTTTT结构。正义链模板的5'端添加了CACC,与Bbs I酶切后形成的黏端互补;反义链模板的5'端添加了GATC与BamH I酶切后形成的黏端互补;如果siRNA的第一个碱基不是G,则在CACC后补加个G(表1)。将合成的发夹结构寡核苷酸单链用无核酶水稀释为浓度3 g/L。按照以下体系退火得到shRNA模板:1 μ L正义链、1 μ L反义链、48 μ L TE(pH8.0)共50 μ L在PCR仪上按照如下程序进行退火处理:90 $^{\circ}$ C 4 min, 80 $^{\circ}$ C 4 min, 75 $^{\circ}$ C 4 min, 70 $^{\circ}$ C 10 min, 37 $^{\circ}$ C 20 min, 10 $^{\circ}$ C 40 min, 4 $^{\circ}$ C保存。将退火后产物稀释20倍,终浓度为6 mg/L用于连接反应。

1.2.2 酶切和连接反应: pGPU6/GFP/Neo载体按如下反应体系进行双酶切:10 \times NEBbuffer 2 μ L、100 \times BSA 0.2 μ L、pGPU6/GFP/Neo 1 μ g、Bbs I 0.8 μ L、BamH I 0.5 μ L、加无核酶水至20 μ L, 37 $^{\circ}$ C酶切3 h。1% TAE琼脂糖凝胶电泳,使用凝胶回收试剂盒回收。将退火片段与经双酶切后的载体按摩尔比4:1进行连接反应,置16 $^{\circ}$ C连接16 h。

1.2.3 重组质粒的转化、筛选和鉴定:将连接产物接种于Top10感受态细胞进行转化,涂布到3 mL含Kanamycin(终浓度为30 mg/L)的LB固体培养基平板上,37 $^{\circ}$ C恒温箱培养过夜,各挑取2个菌落,接种到含30 mg/L Kanamycin的LB液体培养基中摇菌过夜。用质粒小提试剂盒抽提质粒,所得质粒用Pst I和BamH I分别酶切鉴定。得到的重组质粒分别命名pGPU6/GFP/Neo-shRNA1, 2, 3。将初步鉴定证实的细菌扩增培养,取1 mL菌液送北京三博远志进行测序鉴定。测序引物为T7,测序方向为正向测序。

1.2.4 重组质粒转染HUVECs:取处于对数生长期的HUVECs,用胰酶消化后使用不含血清和抗生素的正常培养基重悬为2-8 $\times 10^5$ 个/mL后,接种至6孔培养板上,待细胞生长至70%-80%汇合时进行转染。LipofectamineTM2000试剂和质粒比例为10 μ L:4 μ g,按照转染试剂说明书进行转

■相关报道

有研究报道IKK α 不仅可调控NF- κ B信号转导通路,而且可直接进入细胞核内,并有可能参与基因的调控。

表 1 针对IKK α 基因设计合成的shRNA序列

	起始位置	shRNA序列
shRNA1	185–205 bp	正义链5'CACCGTCTTGTGCCTAGAGCTATTCAAGAGATAGCTCTAGGCGACAAGACTTTTTTG3' 反义链5'GATCCAAAAAAGTCTTGTGCCTAGAGCTATCTCTTGAATAGCTCTAGGCGACAAGAC3'
shRNA2	1 110–1 130 bp	正义链5'CACCGAAGTCTTTTCAGAGACAGTTCAAGAGACTGTCTCTGAAAGAAGTTCTTTTTTG3' 反义链5'GATCCAAAAAAGAAGTCTTTTCAGAGACAGTCTCTTGAAGTGTCTCTGAAAGAAGTTC3'
shRNA3	1 510–1 530 bp	正义链5'CACCGCATTGAGCTTGACTTGGATTCAAGAGATCCAAGTCAAGCTGAATGCTTTTTTG3' 反义链5'GATCCAAAAAGCATTGAGCTTGACTTGGATCTCTTGAATCCAAGTCAAGCTGAATGC3'

■创新盘点

本研究利用RNA干扰技术,通过构建shRNA真核表达载体,下调人脐静脉内皮细胞系中IKK α 的表达,并利用Western blot方法进行验证。

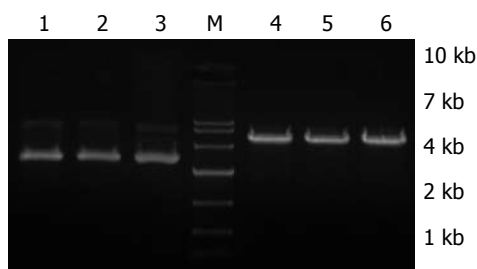


图 1 重组质粒酶切鉴定结果. M: DNA Marker; 1–3: 三个重组质粒分别被*Pst* I 单酶切; 4–6: 三个重组质粒分别被*Bam*H I 单酶切。

染, 6 h后换成高糖培养基(33 mmol/L). 转染24 h时荧光显微镜下观察HUVECs绿色荧光的表达情况, 观察质粒的转染效率. 实验分为空白对照组(Control组)、高糖组(HG组)、空质粒转染组(HG+Non-silencing shRNA组)和重组质粒转染组(HG+RNAi 1, 2, 3组), 每组重复3次。

1.2.5 Western blot检测IKK α 基因的蛋白表达: 转染48 h后提取HUVECs总蛋白, BCA试剂盒检测蛋白浓度. 上样量为20 μ g, 经SDS-PAGE电泳后, PVDF膜印迹, 室温封闭2 h, 加入IKK α 一抗孵育过夜, 辣根过氧化物酶HRP标记的二抗孵育2 h, ECL化学发光显色, X-光片显影、定影. ImageTool图像分析软件测定各条带灰度值, 以 β -actin为内参照进行数据分析, 计算抑制率。

统计学处理 采用SPSS16.0统计分析软件对实验数据进行单因素方差分析, 实验数据比较采用*t*检验, 所得数值均以mean \pm SD表示, $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 重组质粒酶切鉴定 pGPU6/GFP/Neo的*Bam*H I 和*Bbs* I 酶切位点之间是*Pst* I 的酶切位点, 插入目的基因干扰片段之后, *Pst* I 酶切位点被取代, 故不能被*Pst* I 所酶切, 但可被*Bam*H I 酶切开, 条带在5 100 bp左右(图1)。

2.2 重组质粒测序鉴定 3个重组质粒测序鉴定

shRNA编码序列与设计的片段完全一致, 表明载体构建成功(图2)。

2.3 重组质粒转染HUVECs 可见光显微镜($\times 100$)下观察, 正常HUVECs贴壁生长, 呈铺路石状镶嵌排列, 细胞为梭形或扁平多角形. 重组质粒转染入HUVECs 24 h后, 荧光显微镜($\times 100$)下观察, 较多细胞发出绿色荧光, 转染效率约为65%–70%(图3)。

2.4 shRNA对HUVECs中IKK α 蛋白表达的影响 Western blot检测结果显示, 以 β -actin为内参照, IKK α 在正常HUVECs中呈基础表达(图4). 高糖培养48 h后, HUVECs中IKK α 蛋白表达量上升, 与对照组相比具有显著性差异($P<0.05$); 而转入了IKK α shRNA后用高糖培养基培养48 h, RNAi 1, 2, 3组HUVECs中IKK α 蛋白表达较HG组和Non-silencing shRNA组均显著性降低($P<0.01$); 但HG组和Non-silencing shRNA组间相比无明显差异, 说明转入IKK α shRNA后, 部分抑制了IKK α 基因的表达, 使IKK α 蛋白在高糖诱导下转录生成减少. RNAi 1, 2, 3组与HG组比较IKK α 表达抑制率分别为54.1%、46.7%、70.6%。

3 讨论

血管内皮胰岛素抵抗发生发展的机制一直是近年来研究的热点, 目前大量的研究表明, NF- κ B信号转导通路的激活在血管内皮胰岛素抵抗的分子机制中发挥重要作用^[5,6]. IKK复合体是NF- κ B信号转导途径中的关键激酶, 包括IKK α 、IKK β 和IKK γ /NEMO, 可使I κ B蛋白磷酸化, 从而活化NF- κ B, 调控多种基因的转录^[7,8]。

Yuan等^[9]对小鼠IKK β 基因缺失和胰岛素抵抗研究发现, 遗传性肥胖和高脂喂养的小鼠因IKK β 基因缺失杂合体而避免了胰岛素抵抗的发生. 目前人们的研究主要集中在IKK β 与胰岛素抵抗的相关性, 而对于IKK α 在胰岛素抵抗发病机制方面的研究较少. Li等^[10]在用肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)刺激小

■应用要点

本研究构建并筛选出的shRNA重组质粒对IKK α 基因有明显沉默效应,为进一步研究NF- κ B信号转导通路与血管内皮胰岛素抵抗奠定基础。

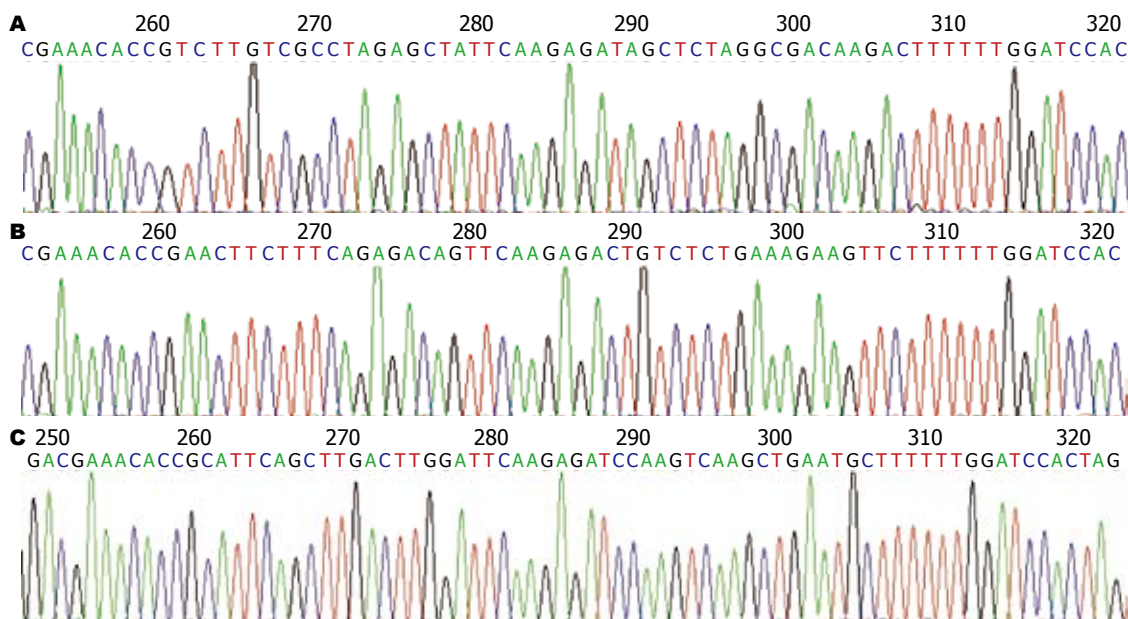


图2 重组质粒测序结果. A: pGPU6/GFP/Neo-shRNA1; B: pGPU6/GFP/Neo-shRNA2; C: pGPU6/GFP/Neo-shRNA3.

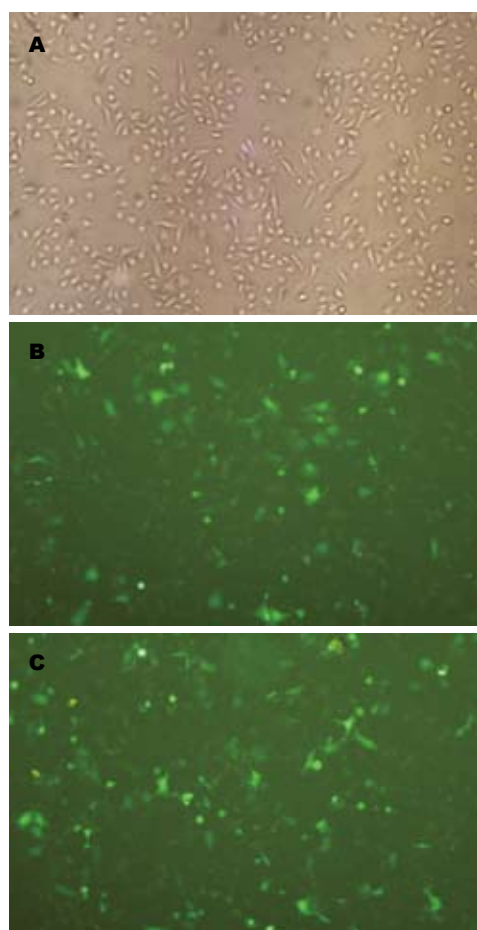


图3 荧光显微镜观察重组质粒转染HUVECs($\times 100$). A: 未转染质粒细胞; B: 转染空质粒细胞; C: 转染重组质粒细胞。

鼠胚胎成纤维细胞研究中发现, IKK α 与IKK β 及IKK γ /NEMO一样对于NF- κ B依赖性靶基因的表达起着重要作用. Yamamoto等^[11]发现IKK α 具

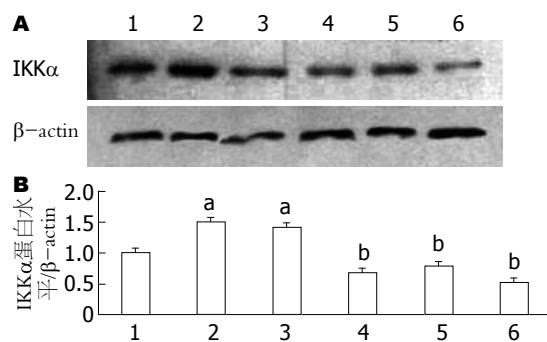


图4 Western blot 检测各组IKK α 蛋白表达. ^a $P < 0.05$ vs 对照组, ^b $P < 0.01$ vs HG组; 1: 对照组; 2: HG组; 3: Non-silencing shRNA; 4: RNAi1; 5: RNAi2; 6: RNAi3.

有组蛋白H3激酶的特性,在细胞因子的刺激下,IKK α 可进入细胞核使组蛋白H3磷酸化,激活NF- κ B介导的基因表达.因此,研究IKK α 介导的NF- κ B信号转导通路对于探讨血管内皮胰岛素抵抗的分子机制有重要意义。

RNAi技术是近年来发展起来的一种基因沉默技术,是进行基因治疗有力可靠的研究工具^[12,13].与传统的反义核酸技术和基因敲除技术相比, RNAi技术具有快速、高效、便于操作等优点,被广泛应用到基因功能研究、基因表达调控机制研究等热门领域^[14,15].因此,本实验采用RNAi技术,利用GenBank检索IKK α 基因核苷酸序列,根据siRNA设计原则,使用Blast将选定的序列进行同源性分析,最后选出三条片段作为IKK α 基因干扰片段,然后将真核表达载体pGPU6/GFP/Neo与针对IKK α 基因设计的shRNA相连接,构建重组体.在成功构建了重组

载体pGPU6/GFP/Neo-shRNA后, 通过脂质体转染法导入HUVECs, 进行Western blot检测, 筛选出了沉默效果最好的重组表达载体, 为进一步研究IKK α 介导血管内皮细胞胰岛素抵抗的机制奠定了基础。

4 参考文献

- 1 Ruan H, Pownall HJ. The adipocyte IKK/NF-kappaB pathway: a therapeutic target for insulin resistance. *Curr Opin Investig Drugs* 2009; 10: 346-352
- 2 O'Neill LA, Kaltschmidt C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* 1997; 20: 252-258
- 3 Richards OC, Raines SM, Attie AD. The role of blood vessels, endothelial cells, and vascular pericytes in insulin secretion and peripheral insulin action. *Endocr Rev* 2010; 31: 343-363
- 4 芦军, 赵金满, 孟艳, 余永红. COL1A1-shRNA表达质粒构建及抑制COL1A1表达的有效序列的筛选. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1622-1627
- 5 Austin RL, Rune A, Bouzakri K, Zierath JR, Krook A. siRNA-mediated reduction of inhibitor of nuclear factor-kappaB kinase prevents tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetes* 2008; 57: 2066-2073
- 6 Shoelson SE, Lee J, Yuan M. Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27 Suppl 3: S49-S52
- 7 Tedgui A, Mallat Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. *Circ Res* 2001; 88: 877-887
- 8 Häcker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* 2006; 2006: re13
- 9 Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 2001; 293: 1673-1677
- 10 Li X, Massa PE, Hanidu A, Peet GW, Aro P, Savitt A, Mische S, Li J, Marcu KB. IKKalpha, IKKbeta, and NEMO/IKKgamm are each required for the NF-kappa B-mediated inflammatory response program. *J Biol Chem* 2002; 277: 45129-45140
- 11 Yamamoto Y, Verma UN, Prajapati S, Kwak YT, Gaynor RB. Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature* 2003; 423: 655-659
- 12 Kim D, Rossi J. RNAi mechanisms and applications. *Biotechniques* 2008; 44: 613-616
- 13 Shrivastava N, Srivastava A. RNA interference: an emerging generation of biologicals. *Biotechnol J* 2008; 3: 339-353
- 14 宋晓宇, 李铁钢, 于艳秋, 张海鹏. 靶向TNF- α RNA干扰重组体的构建及序列分析. *中国病理生理杂志* 2009; 25: 1870-1872
- 15 Nencioni A, Sandy P, Dillon C, Kissler S, Blume-Jensen P, Van Parijs L. RNA interference for the identification of disease-associated genes. *Curr Opin Mol Ther* 2004; 6: 136-140

■同行评价

本文实验设计合理, 结果真实可信, 并具有一定的创新性。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》按时完成2009年度出版任务

本刊讯 2009-12-28, 《世界华人消化杂志》按时完成2009年1-36期的出版任务, 出版各类文章774篇, 全部经过同行专家评议. 其中评论性文章158篇(20.41%), 原创性文章237篇(30.62%), 研究快报91篇(11.76%), 临床经验253篇(32.69%), 病例报告13篇(1.68%), 会议纪要2篇(0.26%).

2010年, 《世界华人消化杂志》将坚持开放获取(open access, OA)的出版模式, 编辑出版高质量文章, 努力实现编委、作者和读者利益的最大化, 努力推进本学科的繁荣和发展, 向专业化、特色化和品牌化方向迈进.