

基因调控

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000150

核仁素蛋白调节嗅觉介导素 4 mRNA 表达的研究

安娜¹, 吴莉雅¹, 宋利华², 黄轶², 蒋雪¹, 刘先俊¹

(1. 重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室、分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学附属儿童医院临床分子诊断中心, 重庆 400014)

【摘要】目的:探讨核仁素(nucleolin, NCL 或 C23)蛋白与嗅觉介导素 4(olfactomedin 4, OLFM4)mRNA 之间是否存在相互作用, 以及 NCL 对 OLFM4 转录水平的调控。**方法:**本研究利用 RNA 染色质免疫共沉淀(RNA chromatin immunoprecipitation assay, RNA chip)结合 RT-PCR 确定 NCL 是否能与 OLFM4 mRNA 相互作用, 以及双荧光素酶报告基因试验检测 NCL 对 OLFM4 报告基因的影响。**结果:**在 SGC-7901 细胞内, NCL 能与 OLFM4 mRNA 结合, 且过表达 NCL 质粒的相对荧光素酶活性约为对照质粒的 1.15 倍, 敲低 NCL 质粒的相对荧光素酶活性约为对照质粒的 0.8 倍, NCL 对 OLFM4 具正向调节作用。**结论:**NCL 与 OLFM4 mRNA 可以相互结合, 且 NCL 可以通过增加 OLFM4 转录水平和延长 OLFM4 mRNA 的半衰期来增加 OLFM4 mRNA 的稳定性。

【关键词】核仁素; 嗅觉介导素 4; RNA 染色质免疫共沉淀(RNA Chip); 双荧光素酶报告基因试验

【中图分类号】R735.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-12-31

Olfactomedin4 mRNA expression regulated by nucleolin protein

An Na¹, Wu Liya¹, Song Lihua², Huang Yi², Jiang Xue¹, Liu Xianjun¹

(1. Teaching and Research Section of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Science, Center for Molecular Medicine and Cancer Research, Chongqing Medical University;

2. Clinical Molecular Diagnostic Center, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the interaction between olfactomedin 4(OLFM4) mRNA and nucleolin protein and to discuss the regulatory effect of nucleolin protein on the transcription level of OLFM4. **Methods:** RNA chromatin immunoprecipitation assay(RNA chip) combined with RT-PCR was performed to identify whether OLFM4 interacted with nucleolin and the effects of nucleolin on the OLFM4 were detected by dual-luciferase reporter assay. **Results:** OLFM4 directly interacted with the nucleolin in SGC-7901 cells. Relative luciferase activity of over expression of nucleolin plasmid was about 1.15 times of the control plasmid; relative luciferase activity of knockdown of nucleolin plasmid was about 0.8 times of the control plasmid; nucleolin had positive moderating effect on OLFM4. **Conclusions:** OLFM4 directly interacts with the nucleolin and nucleolin stabilizes the OLFM4 mRNA by increasing OLFM4 transcription and extending OLFM4 mRNA half-life.

【Key words】nucleolin; olfactomedin4; RNA chromatin immunoprecipitation assay(RNA chip); dual-luciferase reporter assay

嗅觉介导素 4(olfactomedin 4, OLFM4)是在胃癌细胞特异高表达的分泌性糖蛋白分子, 与肿瘤的恶性程度、侵袭及转移密切相关。OLFM4 mRNA 在细胞内水平的改变, 一定程度上可以反映细胞抗凋亡或进行凋亡的情况。而 OLFM4 mRNA 水平的高低除了与转录的调控机制有关以外, 也和 mRNA 降

解机制有关^[1], 目前 OLFM4 的研究尚处初期。

核仁素(nucleolin, NCL 或 C23)是真核细胞核仁中最主要的一种磷酸蛋白质, 与细胞的多种代谢过程有关。序列分析发现, NCL 包含 3 个不同功能结构域, 中间区含多个 RNA 结合结构域^[2]。目前报道已证实, NCL 通过与 mRNA 3' 非翻译区(3'-untranslation regions, 3'UTR)富含碱基 AU 的元件相互作用, 增加抗凋亡蛋白 B 细胞淋巴瘤-2(B cell lymphoma, Bcl-2)、Bcl-XL 和 β -球蛋白 mRNA 的稳定性^[3-5]。迄今为止, OLFM4 与 NCL 的关系仍未得到证实。

作者介绍: 安娜, Email: anna1596@126.com,

研究方向: mRNA 稳定性。

通信作者: 蒋雪, Email: jiangxue868@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81001017)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000150.html>

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌细胞株 SGC-7901 为本室保存。Tripure、脂质体 HP 为 Roche 公司产品,RT-PCR 反转录 Kit、DNA Marker DL2000 购自大连 TaKaRa 公司。双荧光素酶报告基因实验试剂盒购自 Promega 公司,蛋白抽提试剂 RIPA 购自上海申能博彩公司,细胞培养用 DMEM、胎牛血清为 TBD 公司产品,其余试剂均为国产分析纯。过表达 NCL 质粒 GC146-NCL 由上海吉凯生物技术公司构建,敲低 NCL 质粒 pGenesil-1.1-NCL 由武汉晰玛生物技术公司构建,报告基因质粒 pmiR-RB-Report h-OLFM4 由广州市锐博生物科技有限公司构建。RNA CHIP-IT Magnetic Chromatin Immunoprecipitation 试剂盒购自 Active Motif 公司。NCL 抗体购自 Abcam 公司,鼠 IgG 抗体购自 Santa Cruz 公司。引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 分组情况 共分为 5 组。①空白对照组:未转染质粒的 SGC-7901 细胞。②NCL 过表达阴性对照组(GV-142 组):转染 GV-142 质粒的 SGC-7901 细胞。③NCL 过表达组(GV146-NCL 组):转染 GV146-NCL 质粒的 SGC-7901 细胞。④NCL 敲低阴性对照组(pGenesil-1.1-HK 组):转染 pGenesil-1.1-HK 质粒的 SGC-7901 细胞。⑤NCL 过表达阴性对照组(pGenesil-1.1-NCL 组):转染 pGenesil-1.1-NCL 质粒的 SGC-7901 细胞。

1.2.2 Western blot 分析 用包含蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解细胞,收集细胞蛋白质,牛血清白蛋白作为标准品,Bradford 法进行定量,30 μ g 蛋白按 4:1 混合 5 $\times$ 上样缓冲液,煮沸 10 min。经 10%SDS-PAGE(80、120 V 分别电泳 30、60 min)电泳后,电转移至硝酸纤维素膜,在室温下用 10%溶解在 TBST 中的低脂牛奶封闭 1 h,孵育一抗 C23、 β -actin 4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 洗 3 遍,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 室温下孵育 90 min,TBST 洗 3 遍后 ECL 显色曝光。

1.2.3 双荧光素酶报告基因实验 荧光素酶活性用双荧光素酶报告分析系统(promega)根据操作指南在酶标仪上分析。1 $\times$ 10⁴ 个/孔细胞到 96 孔板中,12 h 后,80 ng NCL 过表达质粒 GC146-NCL 或 80 ng NCL 敲低质粒 pGenesil-1.1-NCL 与 20 ng 含萤火虫基因和海肾基因的对照质粒共转染,NCL 过表达对照质粒 GV-142、NCL 敲低对照质粒 pGenesil-1.1-HK 也分别与报告质粒共转染。转染 48 h 之后裂解细胞,检测萤火虫荧光和海肾荧光的表达情况,用两者的比值来评价 NCL 对 OLFM4 基因表达的影响。

1.2.4 细胞核染色质的分离 向 20 ml 无血清细胞培养液中加入 540 μ l 甲醛,轻轻摇匀,室温放置 8 min,弃去培养基,用冷 PBS 漂洗 1 遍,细胞固定后加入 1 $\times$ 的甘氨酸,室温摇动孵育 5 min 后弃去,用 5 ml 冷 PBS(含 20 μ l PMSF)刮下细胞移入 15 ml 离心管中,4 $^{\circ}$ C 3 500 r/min 离心 10 min,弃上清。

1.2.5 细胞裂解和超声波破碎细胞核 每份样品中加入 1

ml 预冷的细胞裂解液(含 5 μ l PIC、5 μ l PMSF 和 1 μ l RNase 抑制剂),充分混匀,冰上裂解 30 min,4 $^{\circ}$ C 5 000 r/min 离心 10 min,弃去上清;加入 350 μ l 超声破碎缓冲液(含 1.75 μ l PIC 和 0.5 μ l RNase 抑制剂)混匀,超声强度:40%功率,每次 1 s,间隔 30 s,执行 30 次,然后 12 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,将染色质打断成 1 000 bp 以下的片段,取 50 μ l 染色质提取 RNA,测定浓度并用琼脂糖凝胶电泳检测剪切结果。

1.2.6 染色质免疫共沉淀 向上述 2 份 10 μ g 染色质中加入预先洗过的磁珠 25、10 μ l 或者 15 μ l RNA-IP 缓冲液、0.5 μ l RNase 抑制剂、1 μ l PIC,一定量的 DEPC 水至最终体积为 100 μ l 或者 150 μ l,最后分别加入 4 μ l C23 抗体和 10 μ l IgG 抗体,混匀,37 $^{\circ}$ C 上下颠倒孵育 4 h 后,4 $^{\circ}$ C 过夜。

1.2.7 蛋白质-RNA 复合物的洗脱和去交联 吸去上清,用洗涤缓冲液 1 洗 4 遍,洗涤缓冲液 2 洗 2 遍后,加入 100 μ l 洗脱缓冲液(含 0.1 μ l RNase 抑制剂),室温上下颠倒孵育 15 min,吸去上清,加入 2 μ l 5 mol/L NaCl 和 2 μ l 蛋白酶 K 到每个样本中,42 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 消化蛋白,65 $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h 反向交联。

1.2.8 RNA 纯化和逆转录 加入 150 μ l DEPC 水和 750 μ l Tripure,再加入 200 μ l 氯仿剧烈震荡 15 s,室温放置 15 min,4 $^{\circ}$ C 12 000 g/min 离心 10 min,将上层 500 μ l 液体移入新管中,加等体积异丙醇,混匀放置 15 min,4 $^{\circ}$ C 12 000 g/min 离心 10 min 沉淀 RNA,弃去上清后加 1 ml 75%乙醇,混匀,7 500 g/min 离心 5 min,弃上清,空气中干燥至少 5 min,加 DEPC 水溶解 RNA,检测浓度。取一定量的 RNA 逆转录成 cDNA。

1.2.9 PCR 检测 所用 OLFM4 的上游引物:5'-CGTGGA TGACCGTGGGACCTG -3',下游:5' -AGGGTGGACGACAG -GGGTGTT -3'。扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min。取 5 μ l PCR 产物用 2%琼脂糖凝胶电泳检测。正常小鼠 IgG 作为阴性对照。免疫共沉淀之前稀释的染色质作为内对照。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 18.0 软件进行分析,组间差异采用独立 *t* 检验分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

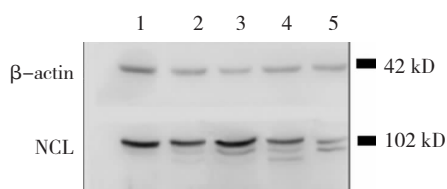
2.1 NCL 过表达质粒和敲低质粒的效果鉴定

经 Western blot 分析,空白对照组和转染后各组细胞中 NCL 蛋白表达情况如图 1。结果显示:NCL 蛋白在空白对照组与 GV-142 组和 pGenesil-1.1-HK 组中表达基本一致,但在 GV146-NCL 组中表达上调,pGenesil-1.1-NCL 组中表达下调。这表明 pGenesil-1.1-NCL 质粒上调 NCL 基因有效,pGenesil-1.1-NCL 质粒能导致 NCL 基因的下调。

2.2 NCL 对 OLFM4 活性的影响

OLFM4-报告基因质粒分别与过表达、敲低 NCL 质粒及其对照质粒共转染,48 h 后检测样本报告基因的萤火虫

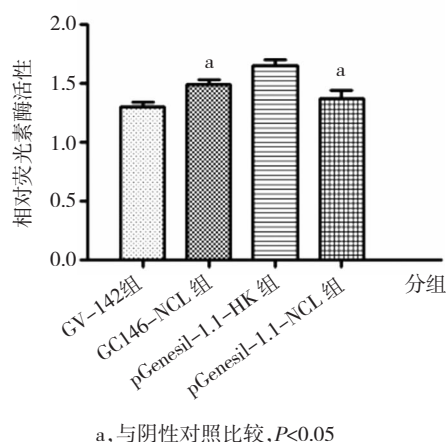
荧光素荧光和海肾荧光素荧光强度的绝对比值。过表达质粒 GC146-NCL 的相对荧光素酶活性约为对照质粒的 1.15 倍, 2 组相比差异有统计学意义 ($t=-3.420, P=0.027$); 敲低质粒 pGenesil-1.1-NCL 的相对荧光素酶活性约为对照质粒的 0.8 倍, 2 组相比差异有统计学意义 ($t=3.408, P=0.027$) (图 2)。该结果从正反两面显示 NCL 对人 OLFM4 基因的转录具有正向调节作用。



1. 空白对照组; 2. GV-142 组; 3. GC146-NCL 组; 4. pGenesil-1.1-HK 组; 5. pGenesil-1.1-NCL 组

图 1 NCL 过表达质粒和 NCL 敲低质粒的效果鉴定

Fig.1 Effect appraisal of NCL over expression plasmid and NCL knockdown plasmid



a, 与阴性对照比较, $P<0.05$

图 2 调节 NCL 的变化对 OLFM4 的影响

Fig.2 Effects of regulation of NCL changes on OLFM4

2.3 SGC-7901 细胞株胞核染色质切割有效性的确定

为得到合适大小的 RNA 片段, 摸索了各种超声波破碎条件, 最终确定了合适的超声波破碎条件: 即输出功率 40%, 每次 1 s, 间隔 30 s, 共 30 次 (图 3)。

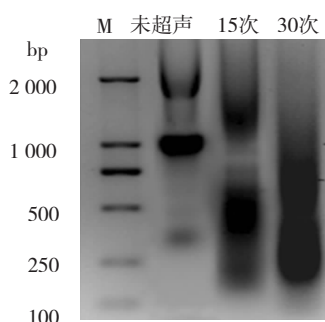


图 3 琼脂糖电泳检测超声打断染色质效果图

Fig.3 Agarose gel electrophoresis detection of ultrasonic interrupted chromatin

2.4 OLFM4 与 NCL 结合鉴定

抗 NCL 抗体免疫沉淀染色质片段, 提取 RNA, 以逆转录成的 cDNA 为模版, PCR 扩增 OLFM4 基因 490 bp 片段 (324~813 bp), 结果显示模版中含有被扩增区段 cDNA, 而 control-IgG 染色质却得不到扩增 (图 4)。

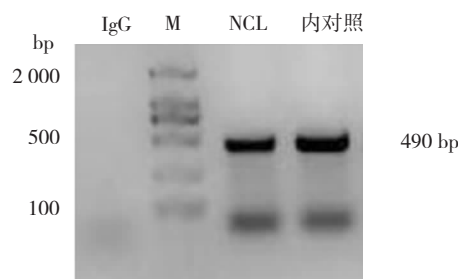


图 4 RNA 染色质免疫共沉淀的 PCR 结果分析

Fig.4 PCR results analysis of RNA chromatin immunoprecipitation

3 讨论

NCL 主要位于细胞核, 在生长细胞和肿瘤细胞中表达丰富^[6]。其氨基酸顺序揭示, 它含有 3 个不同的结构域: N 末端结构域、中间结构域和羧末端结构域。中心结构域含有 4 个 RNA 结合结构域命名为 RBD 或 RRM 结构域, 负责与 RNA 相互作用^[7]。NCL 能参与调控 rRNA 的转录和核蛋白体的生物形成^[8], 它是转录因子 LR1、Myb 的组成成分, 参与多种基因转录的调节^[4]。NCL 具有能识别 RNA 的特殊序列, 是一种小的茎-环结构, 该结构存在于所有的 rRNA 前体, 被称为 NCL 识别元件, 其核心序列为 (U/G) CCG (A/G)^[9], 这个核心序列能与 mRNA 中富含 AU 的元件结合^[4], 从而阻断 mRNA 3'-UTR 富含 AU 顺式元件区域加速降解 mRNA 的过程, 延长半寿期, 增加其翻译水平, 从而增加细胞内相应蛋白质的水平^[10]。目前的研究已揭示 NCL 能影响多种 mRNA 的稳定性。Soundararajan 等^[3]证实 NCL 通过和 Bcl-2 mRNA 3'-UTR 结合, 增加 Bcl-2 mRNA 的半衰期, 导致肿瘤细胞产生抗凋亡作用, 给肿瘤治疗带来不利影响。本研究关心的是 NCL 与 mRNA 的相互作用, 尤其是与 OLFM4 的作用。

OLFM4, 最初克隆于人的原始粒细胞, 编码含有 510 个氨基酸的分泌型糖蛋白。OLFM4 在胃癌中的研究最先是通过串联分析寻找胃癌特异性标志物时发现的。与正常组织相比, OLFM4 在胃癌中高表达, 能促进肿瘤细胞生长, 具有抗凋亡作用^[11]。通

过生物信息学分析发现 OLFM4 mRNA 存在类似富含 AU 元件能结合 NCL 的序列,但 NCL 是否能与我们关心的 OLFM4 作用仍不得而知。

本实验经双荧光素酶报告基因检测发现:转染 GC146-NCL 后,与对照组相比 OLFM4 报告基因的活性显著增强;反之,转染 pGenesil-1.1-Ncl 后,与对照组相比 OLFM4 报告基因的活性显著减弱,均有统计学意义。表明 NCL 能调节 OLFM4 mRNA 的转录水平。并应用 RNA-chip 技术结合 PCR 扩增的方法发现人胃癌细胞 SGC-7901 中 OLFM4 mRNA 能与 NCL 蛋白结合。由此推断:NCL 一方面通过促进 OLFM4 的转录,增加细胞内 OLFM4 mRNA 水平;另一方面 NCL 作为 AUBP(AU 富含区结合蛋白)与 OLFM4 mRNA 3'-UTR 结合,增加 OLFM4 mRNA 的稳定性,使肿瘤细胞产生抗凋亡作用,促进胃癌细胞生长。本研究为将来进一步研究 NCL 与 OLFM4 之间的关系奠定了基础,还可能为胃癌的临床治疗提供新的思路 and 理论依据。

应注意的是,双荧光素酶报告基因检测系统只能对感兴趣分子群的功能进行初步、快速地筛选,其生物学功能的确认尚需通过电泳迁移率变动分析直接检测转录因子的活化情况,以及应答基因在 mRNA 水平、蛋白水平的变化需要进一步验证^[12]。

mRNA 稳定机制十分复杂,目前主要认为与 5'-帽结合蛋白,编码区结合蛋白,3'-UTR 结合蛋白,poly(A)结合蛋白等有关^[14]。尽管本研究也明确了 NCL 通过结合 OLFM4 mRNA 3'-UTR 延长其半寿期,增加 OLFM4 mRNA 稳定性,但是目前只是停留在对现象的观察,至于 NCL 结合 OLFM4 mRNA 3'UTRs 后如何增加它的稳定性,是否与富含 AU 顺式元件结合因子 1 等^[15]有关,有待深入研究。

参 考 文 献

[1] Aung PP, Oue N, Mitani Y, et al. Systematic search for gastric cancer-specific genes based on SAGE data; melanoma inhibitory activity

and matrix metalloproteinase-10 are novel prognostic factors in patients with gastric cancer[J]. *Oncogene*, 2006, 25(17): 2546-2557.

[2] Greco A, Arata L, Soler E, et al. Nucleolin interacts with US11 protein of herpes simplex virus 1 and is involved in its trafficking[J]. *J Virol*, 2012, 86(3): 1449-1457.

[3] Soundararajan S, Chen W, Spicer EK, et al. The nucleolin targeting aptamer AS1411 destabilizes Bcl-2 messenger RNA in human breast cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(7): 2358-2365.

[4] Zhang J, Tsapralis G, Bowden GT. Nucleolin stabilizes Bcl-XL messenger RNA in response to UVA irradiation[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(4): 1046-1054.

[5] Jiang Y, Xu XS, Russell JE. A nucleolin-binding 3' untranslated region element stabilizes beta-globin mRNA in vivo[J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(6): 2419-2429.

[6] Mongelard F, Bouvet P. AS-1411, a guanosine-rich oligonucleotide aptamer targeting nucleolin for the potential treatment of cancer, including acute myeloid leukemia[J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2010, 12(1): 107-114.

[7] Farin K, Di Segni A, Mor A, et al. Structure-function analysis of nucleolin and ErbB receptors interactions[J]. *PLoS One*, 2009, 4(7): e6128.

[8] Tajrishi MM, Tuteja R, Tuteja N. Nucleolin: the most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus[J]. *Commun Integr Biol*, 2011, 4(3): 267-275.

[9] Finger LD, Trantirek L, Johansson C, et al. Slouction structures of stem-loop RNAs that bind to the two N-terminal RNA-binding domains of nucleolin[J]. *Nucleic Acids Reserch*, 2003, 31(22): 6461-6472.

[10] Piccinelli P, Samuelsson T. Evolution of the iron-responsive element[J]. *RNA*, 2007, 13(7): 952-966.

[11] 黄 轶, 杨梅华, 杨华安, 等. GW112 基因 siRNA 对人胃癌 SGC-7901 细胞体外增殖的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(13): 1379-1382.

[12] 孙大康, 安新业, 李彩玉, 等. 衔接蛋白 TAB1/2/3 对 NF- κ B 荧光素酶报告基因活性的影响[J]. *现代免疫学*, 2011, 31(3): 228-231.

[13] Bittencourt D, Auboeuf D. Analysis of co-transcriptional RNA processing by RNA-ChIP assay[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 809: 563-577.

[14] 韩 飞, 王 高. 真核生物 mRNA 稳定性的控制机制[J]. *安徽农学通报*, 2007, 13(11): 27-29.

[15] Ishimaru D, Zuraw L, Ramalingam S, et al. Mechanism of regulation of bcl-2 mRNA by nucleolin and A+U-rich element-binding factor 1 (AUF1)[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(35): 27182-27191.

(责任编辑: 冉明会)