

[文章编号] 1000-4718(2007)08-1609-04

抗转化生长因子 β_1 的 U1 snRNA 嵌合型核酶体外剪切作用

刘芳, 邹萍, 吴耀辉, 张敏

(华中科技大学同济医学院附属协和医院血液病研究所, 湖北 武汉 430022)

[摘要] 目的: 研究抗转化生长因子 β_1 U1snRNA 嵌合型锤头状核酶的细胞外切割活性。方法: 通过计算机设计针对 TGF β_1 的锤头状核酶, 然后把合成的核酶片段克隆入含有 U1 snRNA 启动子/增强子和终止子的 U1 snRNA 核酶载体中。通过 RT-PCR 扩增获得 TGF β_1 的部分基因片段, 将其克隆入 T 载体中 T7 启动子的下游, 体外转录获得核酶和靶 RNA, 转录过程中掺入同位素, 通过变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化回收。 [32 P] 标记的核酶与靶 RNA 在不同条件下进行切割反应, 变性 PAGE 电泳, 放射自显影, 分析反应结果。结果: 活性的 U1 snRNA 嵌合型核酶(U1Rz803)在生理温度下具有良好特异的切割活性; 而点突变型核酶 U1Rz803_m 没有切割活性, 因此这些结果显示 U1Rz803 设计是正确的。结论: 本研究中制备的 U1Rz803 具有良好的特异催化切割活性。U1 snRNA 嵌合型核酶 U1Rz803 有望在胞内抑制 TGF β_1 的表达, 为研究转化生长因子(TGF) β_1 在造血调控中的作用机制提供有效工具。

[关键词] 转化生长因子 β ; RNA, 催化; U1 小核 RNA 嵌合酶

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Cleavage activity of anti-transforming growth factor β_1 RNA by U1 snRNA chimeric ribozyme *in vitro*

LIU Fang, ZOU Ping, WU Yao-hui, ZHANG Min

(Institute of Hematology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China. E-mail: fangliuwh@163.com)

[ABSTRACT] AIM: To determine the cleavage activity of anti-transforming growth factor β_1 hammerhead ribozymes which was inserted into U1 small nuclear RNA in cell-free system. **METHODS:** The hammerhead ribozyme targeting against transforming growth factor β_1 was designed through the analysis of computer software. The ribozyme fragments were synthesized and cloned into the U1 snRNA ribozyme vector pZeoU1EcoSpe, which contained U1 snRNA promoter/enhancer and terminator. TGF β_1 cDNA partial fragment was generated by RT-PCR, and then cloned into the T-vector at the downstream of T7 promoter. The transcripts of ribozyme and target RNA incorporated into isotope were transcribed *in vitro* and purified by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. [32 P]-labeled U1 snRNA chimeric ribozyme transcripts were incubated with target-RNAs at different conditions and autoradiographed after running denaturing PAGE. **RESULTS:** U1snRNA chimeric ribozyme (U1Rz803) cleaved TGF β_1 mRNA efficiently and specifically at 37 °C, while the disable ribozyme (U1Rz803_m) showed no cleavage activity, so these indicated the design of U1Rz803 was correct. **CONCLUSION:** U1Rz803 prepared in this study possesses the perfect specific catalytic cleavage activity in cell-free system. These results indicate that U1 snRNA chimeric ribozyme U1Rz803 may suppress the expression of TGF β_1 *in vivo*, therefore it may provide a new means for exploring the role of TGF β_1 in hematopoietic regulation in the future.

[KEY WORDS] Transforming growth factor beta; RNA, catalytic; U1 small nuclear RNA chimeric ribozyme

体外扩增体系中, 造血祖细胞 (hematopoietic progenitor cell, HPC) 不可避免地存在不同程度的分化。这种分化导致了 HPC 库损耗, 使扩增产物的植入和归巢能力下降, 造成移植后期难以维持长期造血^[1]。转化生长因子 (transforming growth factor β_1 ,

TGF β_1) 是广泛存在体内的具有强大生物学活性的多效细胞因子, 是造血系统重要的负调节因子, 对原始造血干/祖细胞和各系定向祖细胞有显著抑制作用^[2], 它对提高 HPC 的扩增有重要意义。

核酶是一类小的催化活性 RNA 分子, 能够序列

[收稿日期] 2005-10-27

[修回日期] 2006-04-03

Tel: 027-85726625; E-mail: fangliuwh@163.com

特异性与靶 RNA 分子结合并对其切割^[3]。近年来研究发现许多核酶在胞外具有良好特异切割活性,但是在转染的细胞内,其活性显著下降^[4]。研究者将核酶基因插入 tRNA 和 snRNA 内,这样可以显著提高核酶的胞内效能。故在本研究中通过计算机设计针对 TGF β_1 的核酶,并把它克隆入 U1snRNA 嵌合型核酶载体中,通过核酶的体外切割验证其能否有效切割靶 RNA 分子,因而可能提示该核酶有望在胞内抑制 TGF β_1 的表达,为造血调控的研究提供一个新的手段。

材 料 和 方 法

1 材料

大鼠肝星状细胞 HSC - T6 细胞株由 Scott L. Friedman 教授(Department of Medicine and Division of Liver Diseases, Mount Sinai School of Medicine)惠赠。pZeoU1EcoSpe 由 Harry C. Dietz 教授(Department of Pediatrics, Medicine and Molecular Biology & Genetics, Johns Hopkins University of Medicine)惠赠。pGEM - T vector kit、transcription kit 购自 Promega 公司,Trizol kit、DMEM 购自 Gibco - BRL 公司。PCR 引物和核酶片段由本实验室 Beckman oligo - 1000 DNA 合成仪合成。Zeocin 购自 Invitrogen 公司。RT - PCR kit、RNase inhibitor、限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。 $[\alpha^{32}\text{P}]$ - UTP 购自北京亚辉公司。

2 方法

2.1 靶 RNA 的体外构建 利用 Trizol kit 抽取活化型大鼠肝星状细胞系 HSC - T6 总 RNA^[5]。合成 RT - PCR 的两条引物,上游引物为 5' - GAA TTC ATT CAG GAC TAT CAC CTA CC - 3',下游引物为 5' - AAG CTT TTC TGG TAG AGT TCT ACG TG - 3'^[6]。再利用一步法 RT - PCR 试剂盒和上述引物从抽提的总 RNA 扩增出 TGF β_1 的 651 个碱基对产物。1% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳纯化回收 PCR 产物,并把其克隆入 pGEM - T 载体的 T7 启动子下游,命名为 pTGF β_1 。利用 PCR 扩增 pTGF β_1 获得的产物作为模板,进行体外转录制备靶 RNA。PCR 的引物序列为 GAATTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG AGG CGG ACT ACT ACG CCA A 和 TTC TGG TAG AGT TCT ACG TG; TAATACGACTCAC - TATAGGG 代表 T7 启动子。体外转录模板通过 1% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳回收。体外转录根据转录试剂盒说明书进行,转录过程中掺入 $[\alpha^{32}\text{P}]$ - UTP,6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,切下放射自显影的转录条带,浸泡过夜,无水乙醇沉淀 RNA,回收产物溶于适量 DEPC 水中。

2.2 核酶转录质粒的构建 pZeoU1EcoSpe 是由 pZeoSV 通过 BamH I 酶切后删除 SV40 启动子、SV40 多聚 A 尾、多克隆位点,然后把位于 pUC13 中的 U1snRNA 表达框^[7]通过 BamH I 酶切回收后连接入 BamH I 酶切过的 pZeoSV 载体形成的。U1 snRNA 的 Sm 蛋白结合位点的 4 个核苷酸的侧翼序列通过定点突变形成为唯一的 EcoR I 和 Spe I 的酶切位点,这样插入的 U1snRNA 的表达框 5' 端含有启动子/增强子,相当于 SV40 的早期启动子。根据 Zuker (加拿大科学院)编写的 pcFOLD 软件对 TGF β_1 的二级结构进行计算机分析,并结合 NCBI GenBank 上的大鼠细胞中 RNA 序列,排除它们之间的同源性可能后,设计针对 TGF β_1 的核酶。根据所设计的核酶切割位点位于 TGF β_1 mRNA 第 803 位碱基。合成的核酶寡核苷酸片段,其序列为:5' - AATT ACA TAT ATA CT (G/A) ATG AGT CCG TGA GGA CGA AAC TGT GT - 3' 和 5' - CTA GAC ACA GTT TCG TCC TCA CGG ACT CAT (C/T) AG TAT ATA TGT - 3'; G 和 C 代表活性核酶, A 和 T 代表失活核酶。将合成的核酶片段等摩尔混合后,克隆入 pZeoU1EcoSpe 的 EcoR I 和 Spe I 的位点就形成 pU1Rz803 和 pU1Rz803_m,酶切鉴定,测序证实。

2.3 核酶的体外制备 U1 snRNA 嵌合型核酶(失活核酶)转录的模板是通过 PCR 扩增 pU1Rz803 (pU1Rz803_m) 获得。PCR 反应的上游引物 5' - GAATTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG GAT ACT TAC CTG GCA GGG GA - 3'; 下游引物 5' - CAG GGG AAA GCG CGA ACG CA - 3'; TAA TAC GA C TCA CTA TAG GG 代表 T7 启动子。核酶的体外转录和纯化与靶 RNA 相同。

2.4 U1Rz803 和 U1Rz803_m 的体外切割 将 U1Rz803、U1Rz803_m 和靶 RNA 各取 1 μL 测放射性的 counts/min 值进行定量。切割反应在 50 mmol/L Tris · HCl (pH7.5)、20 mmol/L MgCl₂ 条件下进行,反应体积为 5 μL 。靶 RNA 和核酶的摩尔比是根据 counts/min 值和 RNA 中所含有的 U 值进行计算的。加 1 μL 上样缓冲液 (0.25% 二甲苯青,0.25% 溴酚蓝,20 mmol/L EDTA 和饱和尿素)终止切割反应,用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结果。切割效能通过检测底物(S)与产物(P)条带的 Bq 值进行计算。切割率(CE) = $[P/(S + P)] \cdot 100\%$ 。

结 果

1 核酶和靶 RNA 转录载体的鉴定

因 PCR 扩增的片段克隆入 pGEM - T 载体中,无法确定插入片段的方向性,因此在 PCR 上游和下游引物的 5' 末端设计了载体和 PCR 产物所没有的酶

切位点 *EcoR* I 和 *Hind* III, 这样就可以确定插入片段的方向性。正向克隆, 即所需的克隆(pTGFβ₁) 经过 *EcoR* I / *Spe* I 酶切后可以观察到 2 个片段, 而反向克隆则只会观察到唯一的酶切片段(图 2)。pU1Rz803 和 pU1Rz803_m 因插入含有 *EcoR* I 和 *Spe* I 半酶切位点的核酶基因片段, 所以此质粒的 *EcoR* I / *Spe* I 酶切位点消失, 这样 *EcoR* I 和 *Bam*H I 酶切嵌合型核酶表达质粒可以观察到两个片段, 而 pZeoU1 EcoSpe 酶切后可以观察到 3 个片段, 与设计相符(图 3), 并经测序证实。

2 核酶与靶 RNA 转录的鉴定

通过 PCR 扩增模板转录的靶 RNA 应该 220 nt。在本研究中虽核酶序列插入 U1snRNA 内, 而 U1snRNA 的茎环结构仍然保持(图 1)。因此由 PCR 扩增模板产生的转录物包括 U1 snRNA 和核酶, U1 snRNA 嵌合型核酶转录物应为 205 nt。转录结果(图 4)显示与我们的设计相符。

3 U1Rz803 和 U1Rz803_m 的体外切割反应

切割结果显示 U1Rz803 在体外能够切割靶 RNA, 它能有效且确切地把靶 RNA(220 nt) 切割成 2 个片段 93 nt/127 nt., 然而 U1Rz803_m 在 120 min 内没有显示切割活性(图 5), 即便在核酶: 底物 = 5:1 时(结果未显示)。在 U1Rz803: 底物 = 1:1 时, 37 °C、120 min, 切割效能(CE) = 51.36%; 在 U1Rz803: 底物 = 1:5 时, CE = 27.81%。

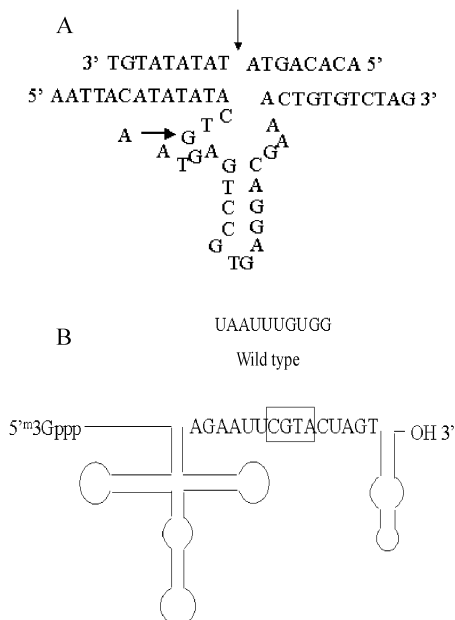


Fig 1 Schematic representation of ribozyme and U1 snRNA ribozyme express vector. A: RZ803 strategy. Arrows indicate cleavage site and mutational site of disable ribozyme; B: U1 snRNA expression cassette. Box is the inserted site of ribozyme.

图 1 核酶和 U1snRNA 核酶表达载体的结构示意图

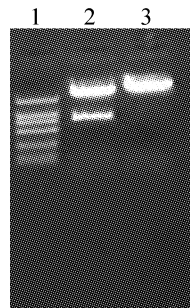


Fig 2 2% agarose gel analysis of pTGFβ₁ digested by *EcoR* I and *Spe* I. 1: DL2000 DNA marker; 2: positive clone digested by *EcoR* I and *Spe* I; 3: reverse clone digested by *EcoR* I and *Spe* I.

图 2 pTGFβ₁ 的酶切鉴定图(2%琼脂糖凝胶电泳)

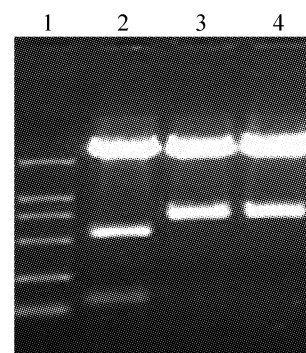


Fig 3 2% agarose gel analysis of U1snRNA chimeric ribozyme plasmid digested by *EcoRI* and *BamHI*. 1: DNA marker (DL2000); 2: pZoocinU1EcoSpe; 3: pU1Rz803; 4: pU1Rz803_m.

图 3 U1snRNA 核酶质粒经 *EcoR* I 和 *BamH* I 酶切鉴定图(2%琼脂糖凝胶电泳)

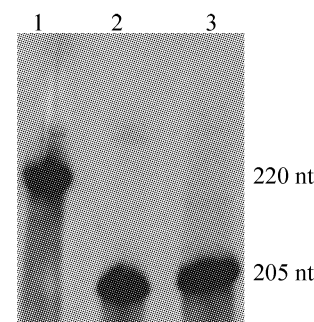


Fig 4 Transcripts of target RNA and U1snRNA chimeric ribozyme *in vitro*. 1: transcript of target RNA(220 nt) *in vitro*; 2: transcript of U1Rz803 (205 nt) *in vitro*; 3: transcript of U1Rz803_m (205 nt) *in vitro*.

图 4 靶 RNA 及 U1snRNA 嵌合型核酶的体外转录

讨 论

TGFβ 作为一类多效的细胞因子, 主要生物学功能为刺激成纤维细胞生长、与白细胞介素和其它细胞因子相互作用参与免疫炎症和造血调节, 以及抑制多种细胞增殖^[8]。TGFβ₁ 在 TGFβ 家族中生物活

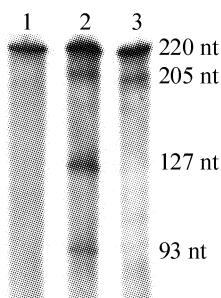


Fig 5 Cleavage reaction of U1Rz803 and U1Rz803_m *in vitro*. 1: target RNA; 2: target RNA + U1Rz803; 3: target RNA + U1Rz803_m.

图5 U1Rz803 和 U1Rz803_m 体外切割反应

性最为明显,它在造血方面主要起负调控作用。多种正常的造血细胞均能产生 TGFβ₁。TGFβ₁ 能够抑制较原始的造血祖细胞从静止期进入循环增殖期,而且这种作用是可逆的^[9]。因此抑制 TGFβ₁ 的产生可能促进造血,运用于干细胞移植。

以前关于 U1 snRNA 嵌合型核酶的体外切割活性的研究,核酶是通过合成含有 T7/SP6 启动子的核酶基因来体外制备的^[7],这样转录物只包括核酶。但是核酶长的侧翼序列所引起的二级结构对核酶构象的改变会影响核酶的转换率/结合活性,从而造成核酶较少正确与底物结合和较少的切割底物。在本研究中,我们通过 PCR 扩增的产物来制备核酶,该转录物含有 U1 snRNA 和核酶,与以前的研究相比,这可能更准确地反映核酶胞内的切割活性。U1 snRNA 的 5' 端的三甲基鸟苷帽子结构,两端稳定的茎环结构和 3' 环中丰富的 GC 含量使其在体内具有抗外核酸酶降解的作用^[10]。5' 端高甲基帽子结构和 Sm 结合位点使 U1 snRNA 聚集在细胞核内,这些使 U1 snRNA 表达载体实现核酶在胞内高效表达且定位于细胞核。同位素标记的核酶转录物,不仅使我们可以通过切割放射自显影条带来分离核酶提供便利,而且与未标记核酶的体外转录物相比其定量更准确。在本研究中,U1Rz803 的 K_m 和 K_{cat} 是在 37 °C 下测定的,不是核酶的最佳切割温度。因为核酶将用于体内且体内的温度始终为 37 °C,这些结果更能反映核酶在生理条件的切割活性。

核酶不仅具有反义 RNA 的各种特性,而且具有催化切割活性。为了剔除核酶切割活性外的反义作用,我们通过在核酶催化的核心区用一个失活的核苷酸来代替一个必需的核苷酸来构建失活核酶。切割反应显示 U1Rz803 具有良好的切割活性,而 U1Rz803_m 则没有催化活性。所以它可以作为对照以排除核酶体内的反义作用,以便于证明 U1Rz803 胞内活性是因为催化切割作用造成的。U1Rz803 在

胞外具有特异良好的切割 TGFβ₁ 转录物的能力,因此 U1Rz803 值得进一步在完整细胞进行研究,有望未来发展成为核酸药物。但是体外研究不能完全代表细胞内情况;在细胞内总的 TGFβ₁ mRNA 转录物所形成二级及三级结构;核酶和靶 RNA 的亚细胞器分布,核酶的降解,在细胞内核酶与核蛋白体所形成的复合体及基因转导的载体都会影响核酶的表达和核酶的切割活性,所以有必要进行核酶细胞内作用的研究。

[参 考 文 献]

[1] Fernandez MN, Granena A, Millan I, et al. Evaluation of engraftment of ex - vivo expanded cord blood cells in human[J]. Bone Marrow Transplant, 2000, 25 (Suppl 2): 61 - 67.

[2] Rosler E, Brandt J, Chute J, et al. Cocultivation of umbilical cord blood cells with endothelial cells leads to extensive amplification of competent CD34⁺ CD38⁻ cells [J]. Exp Hematol, 2000, 28(7): 841 - 852.

[3] Persidis A. Ribozyme therapeutics [J]. Nat Biotechnol, 1997, 15(9): 921 - 922.

[4] Muotri AR, da Veiga Pereira L, dos Reis Vasques L, et al. Ribozymes and the anti - gene therapy: how a catalytic RNA can be used to inhibit gene function [J]. Gene, 1999, 237(2): 303 - 310.

[5] Vogel S, Piantedosi R, Frank J, et al. An immortalized rat liver stellate cell line (HSC - T6): a new cell model for the study of retinoid metabolism *in vitro* [J]. J Lipid Res, 2000, 41(6): 882 - 893.

[6] Qian SW, Kondaiah P, Roberts AB, et al. cDNA cloning by PCR of rat transforming growth factor beta - 1 [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(15): 3059.

[7] Liu R, Li W, Karin NJ, et al. Ribozyme ablation demonstrates that the cardiac subtype of the voltage - sensitive calcium channel is the molecular transducer of 1, 25 - dihydroxyvitamin D(3) - stimulated calcium influx in osteoblastic cells [J]. J Biol Chem, 2000, 275(12): 8711 - 8718.

[8] 毛斐斐, 王 珏, 余小锋, 等. 环孢素 A 慢性肾毒性时肾转化生长因子 - β₁ 表达和细胞凋亡间的相关性及茶多酚的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(6): 1155 - 1158.

[9] Grzegorzewski K, Ruscetti FW, Usui N, et al. Recombinant transforming growth factor β₁ and β₂ protect mice from acutely lethal dose of 5 - fluo - rouracil and doxorubicin [J]. J Exp Med, 1994, 180(3): 1047 - 1057.

[10] Green MR. Biochemical mechanisms of constitutive and regulated pre - mRNA splicing [J]. Annu Rev Cell Biol, 1991, 7(7): 559 - 599.