

干涉鸡热休克蛋白 70 基因表达诱导 鸡胚成纤维细胞凋亡

杨帆^{1,2}, 汤承¹, 岳华^{1*}

(1. 西南民族大学, 成都 610041; 2. 成都康弘药业集团股份有限公司, 成都 610036)

摘要: 为研究鸡热休克蛋白 70(HSP70)与细胞凋亡的相关性及分子机制,通过构建表达靶向鸡 *hsp 70* 的短发夹样结构小干扰 RNA (shRNA)质粒载体,转染鸡胚成纤维细胞(CEF),干涉后 18、24、28 h 用 Annexin V-FITC 方法检测干涉 *hsp70* 表达后细胞凋亡情况,同时用荧光定量 RT-PCR 测定凋亡相关基因 *Caspase3* 和 *Caspase8* 的表达水平。结果显示,与未干涉组相比,干涉组 *hsp70* 被分别敲低了 75%、83% 和 96%,凋亡细胞数随着干涉时间的延长而增加,*Caspase3* 表达水平升高,其表达量分别上调至 250%、140% 和 110%,*Caspase-8* 表达水平下降,其表达水平分别下降至 76%、80% 和 34%。由此可见,鸡的 *hsp 70* 可能主要通过线粒体途径保护 CEF 对抗凋亡。

关键词: 热休克蛋白 70;RNA 干涉;鸡胚成纤维细胞;凋亡;半胱氨酸蛋白酶

中图分类号:S852.23

文献标志码:A

文章编号:0366-6964(2013)03-0459-06

Interference of Chicken Heat Shock Protein 70 Gene Expression Induced Chicken Embryo Fibroblast Apoptosis

YANG Fan^{1,2}, TANG Cheng¹, YUE Hua^{1*}

(1. Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China; 2. Chengdu Kanghong Pharmaceutical Group Co., Ltd., Chengdu 610036, China)

Abstract: The purpose of this paper is to study the relationship and molecular mechanisms between chicken heat shock protein 70 (HSP70) and apoptosis. Plasmid vectors expressing short hairpin-like structure small interfering RNA (shRNA) targeting chicken HSP70 were constructed and transfected into the chicken embryo fibroblast (CEF) in this study. At 18, 24, 28 h post interference, the CEF apoptosis was observed by Annexin V-FITC method following interference of *hsp70* expression and *caspase3* & *caspase8* were quantified by real-time RT-PCR. The results showed that, compared with the mock cell, 1) Apoptotic cells increased as the interference time extended. 2) The *hsp70* in CEF cells decreased by 75%, 83% and 96% while *caspase3* increased to 250%, 140% and 110%, and *caspase8* decreased to 76%, 80% and 34% at 18, 24, 28 h post interference respectively. The results projected that chicken *hsp70* protects the CEF cells against apoptosis mainly via the mitochondrial pathway.

Key words: heat shock protein 70; RNA interference; chicken embryo fibroblast; apoptosis; caspase

热休克蛋白 70(HSP70)是热休克蛋白家族的重要成员,是目前发现的主要分子伴侣蛋白之一,在所有生物细胞中高丰度表达,它不仅可以在细胞处

于应激状态下调节细胞的生理功能,而且还在蛋白质跨膜转运、折叠、降解和特定构象维持等方面起重要作用^[1-2],作为一种非特异性的细胞保护蛋白,可

收稿日期:2012-09-20

基金项目:自然科学基金(31172307)

作者简介:杨帆(1984-),男,甘肃徽县人,硕士,主要从事病原分子生物学研究,E-mail:yfqh84@yahoo.com.cn

*通信作者:岳华,教授,E-mail:yhua900@163.com

维持细胞蛋白自稳,提高细胞对应激原的耐受性,使细胞维持正常的生理功能^[3-4]。有关哺乳动物 *hsp70* 基因功能的研究报道较多,有研究证实阻断 *hsp70* 基因表达,细胞表现出增殖抑制、凋亡诱导和对热休克诱导凋亡的敏感性增加^[5]。而对鸡 *hsp70* 基因的研究目前主要集中在与应激的关系^[6-7],其与细胞凋亡的关系及机制尚不十分清楚。

RNA 干涉(RNA interference, RNAi),是一种由双链 RNA 介导的真核细胞质内序列特异的 RNA 降解过程,通过 21~23 bp 的双链小分子干扰 RNA (Small interference RNA, siRNA) 片段中的反义链与细胞内同源 mRNA 通过序列互补结合,激活内源性 RNA 内切酶,特异性降解同源 mRNA,从而达到高特异性的基因沉默作用^[8]。目前 RNAi 技术已经广泛地应用于基因功能的研究。有多种不同的表达载体用于表达 siRNA,其中,质粒编码的发夹样结构 siRNA(shRNA)具有不易被降解、干涉效果持久等优点而被广泛使用^[9]。本研究通过构建 shRNA 质粒载体表达系统用于研究鸡 *hsp70* 基因与细胞凋亡的相关性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III、*Sal* I 购自 NEB 公司;脂质体转染试剂 Silent fect 购自 Bio-Rad 公司;T₄ 连接酶购自 MBI 公司;大肠杆菌 DH5 α 为西南民族大学动物医学实验室保存;质粒提取试剂盒购自 Axygen 公司;TRIzol 试剂、质粒提取试剂盒、DMEM 高糖培养基购自美国 Gibco PBRL 公司;反转录试剂盒购自 Toyoba 公司。pGenesil-3 质粒、靶序列无关的 shRNA 阴性质粒载体 HK(携带红荧光蛋白基因)购自武汉晶赛公司。SPF 鸡胚购自北京北京梅里亚维通实验动物技术有限公司。Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自艾美捷科技有限公司。*Taq* 酶、SYBR[®] Premix Ex *Taq*TM、RNAiso Reagen 购自日本 TaKaRa 公司。

1.2 shRNA 转录模板的设计与合成

对 GenBank 中登录的鸡 *hsp70* 基因 mRNA 序列比对分析,参考 shRNA 设计原则^[10-11],设计 3 个 shRNA 表达模板,结构为:5'-*Bam*H I 酶切位点+正向 siRNA 序列+Loop 环+反向 siRNA+终止信号+*Hind* III 酶切位点-3'(表 1)。靶点位于 *hsp70* 基因 mRNA 序列的 432—451、1 774—1 793 及

1 879—1 898 bp,与选择的 *hsp70* 基因无碱基错配,与家禽及人类已知基因组无同源性,G+C 含量分别为 42.1%、47.4%和 42.1%。shRNA 表达模板由武汉晶赛公司合成。

1.3 重组质粒的构建及鉴定

以 pGenesil-3 质粒为载体,进行 *Bam*H I/*Hind* III 双酶切,回收线性化的 pGenesil-3 质粒。取 30 μ L 退火 Buffer 溶解上述合成的 2 OD shRNA 模板。3 种转录模板分别取 2 μ L 正义链和 2 μ L 反义链加入 16 μ L 退火 Buffer 混匀,总体积为 20 μ L,94 $^{\circ}$ C 水浴 1 min 后自然冷却至室温。取 1 μ L 100 倍稀释退火产物,加 1 μ L 线性化 pGenesil-3 质粒,1 μ L T4 连接酶,1 μ L 10 \times Ligase Buffer,1 μ L dH₂O,于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。将获得的重组质粒命名为 shRNA-1、shRNA-2、shRNA-3,分别转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,阳性克隆送北京三博远志公司测序,提取质粒并采用 *Sal* I 酶切进行鉴定。

1.4 CEF 的培养及转染

参考文献[12]培养 CEF 于 25 mL 培养瓶中,待细胞长成单层后用 0.5%胰蛋白酶消化,将 CEF 转入加有载玻片的 24 孔培养板中,5 \times 10⁴ 个细胞 \cdot 孔⁻¹,置 5%CO₂ 培养箱 37 $^{\circ}$ C 培养至 80%汇合度时用于转染。Silent fect 与 shRNA-1、shRNA-2、shRNA-3 分别按 3:1(μ L: μ g)混合制备转染复合物,按 1 μ g \cdot 孔⁻¹核酸剂量转染 CEF,用无血清和无抗生素 DMEM 补足 200 mL \cdot 孔⁻¹,置 5% CO₂ 培养箱 37 $^{\circ}$ C 感作 1.5 h,用 3%小牛血清 DMEM 培养基换液,置 5% CO₂ 培养箱 37 $^{\circ}$ C 培养。以同样方法转染 HK 作为阴性对照,每个处理设 3 复孔。

1.5 有效 shRNA 分子的筛选

收获转染后 24 h CEF,用基于 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 检测转染后不同处理 CEF 细胞 *hsp70* mRNA 表达水平。引物序列:上游引物 5'-TAACACCACCATTCCCACCA-3',下游引物:5'-ATAGCCCTCTCACCTTCATACACC-3',采用 20 μ L 反应体系:10 μ L SYBR Green I,0.4 μ L ROX,Primer1、Primer2 各 0.75 μ L,2 μ L cDNA,6.1 μ L 水。优化的反应条件为 95 $^{\circ}$ C 5 min,95 $^{\circ}$ C 15 s,56.5 $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环。用鸡 β actin 基因作为内参,参照文献[13],计算 *hsp70* 基因 mRNA 的表达量,并按照公式:干涉效率=(对照组靶基因表达量-干涉组靶基因表达量)/对照组靶基因表达量 \times 100%计算干涉效率,以干涉效率 $>$ 75%为有效。

表 1 编码靶向鸡 HSP70 的 shRNA 模板序列

Table 1 The sequences of templates cording shRNAs targeting chinken HSP70

shRNAs	序列 Sequence	
	正义链 Sense strand	反义链 Antisense strand
shRNA-1	5'- GATCC AGTACAAGGGTGAGATGAA TTCAAGACG TTCATCTCACCCCTTGAC TTTTTTGTGCGAC AGCTT -3'	5'- AGCTT GTCGACAAAAAAGTACAAGGGTGA GATGAA CGTCTTGAA TTCATCTCACCCCTTGACT GATCC -3'
shRNA-2	5'- GATCC GACAGTGGAGGATGAGAAA TTCAAGACG TTTCTCATCTCCACTGTC TTTTTTGTGCGAC AGCTT -3'	5'- AGCTT GTCGACAAAAAAGACAGTGGAGGATG AGAAA CGTCTTGAA TTTCTCATCTCCACTGTC GATCC -3'
shRNA-3	5'- GATCC GGCAGAGAAAAGAAGAGTAT TTCAAGACG ATACTCTTCTTTCTCTGCC TTTTTTGTGCGAC AGCTT -3'	5'- AGCTT GTCGACAAAAAAGGCAGAGAAAAGAA GAGTAT CGTCTTGAA ATACTCTTCTTTCTCTGCC GATCC -3'
HK	5'- GATCC GACTGAGAAAAGAAGAGTAT TTCAAGACG ATACTCTTCTTTCTCTGCC TTTTTTGTGCGAC AGCTT -3'	5'- AGCTT GACGACAAAAAAGGCAGAGAAAAGAA GAGTAT CGTCTTGAA ATACTCTTCTTTCTCTGCC GATCC -3'

 示干涉靶点, 示 loop 环

 as interenfce target; as loop ring

1.6 shRNA 干涉鸡 hsp 基因在 CEF 细胞中的表达

用筛选出的有效 shRNA 按 1.4 方法转染 CEF, 分别收获转染后 18、24、28 h CEF, 用荧光定量 RT-PCR 方法检测 hsp 基因 mRNA 表达水平。

1.7 shRNA 干涉 hsp 基因在 CEF 中的表达对细胞凋亡的影响

1.7.1 CEF 凋亡的观察 于转染后 18、24、28 h 分别取干涉组合对照组载玻片, 每组设 3 重复孔, 按照 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒说明书染色, 于荧光倒置显微镜下观察细胞凋亡情况。

1.7.2 凋亡相关基因的定量检测 用荧光定量 RT-PCR 对 *Caspase3*、*Caspase8* 基因的表达水平进行检测, 扩增 *Caspase3* 基因上游引物序列为 5'-TTAGATTCTGGTATTGAAGC-3', 下游引物序列为 5'-GAAATCCTGTGCGAGTGGAGCAGG-3'; 扩增 *Caspase8* 基因的上游引物序列 5'-GGGT-GTCTCCGTTCAAGTAT-3', 下游引物序列为 5'-TCAACAGGCTCTTGCCACT-3'; RRT-PCR 反应体系为 20 μ L: SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 10 μ L, 上、下游引物各 0.3 μ L (10 pmol \cdot L⁻¹), cDNA 2 μ L, 补充去离子水至 20 μ L。扩增 *Caspase3* 基因的反应条件为 95 $^{\circ}$ C, 3 min, 94 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72

$^{\circ}$ C 30 s 共 40 个循环; 扩增 *Caspase8* 基因的反应条件为 95 $^{\circ}$ C, 3 min, 94 $^{\circ}$ C 15 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s 共 40 个循环。以鸡 β actin 基因 mRNA 作为内参基因^[14], 对检测结果进行标化, 以 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法^[15] 进行相对定量。

2 结果

2.1 构建靶向鸡 hsp70 基因的 shRNA 重组质粒

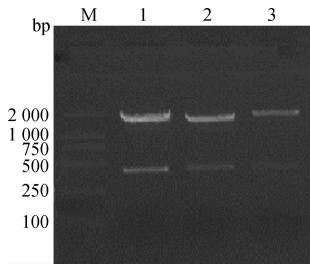
shRNA-1、shRNA-2、shRNA-3 三个重组质粒经 *Sal* I 酶切后电泳, 分别出现了一条约 2 000 bp 的大片段和一条 400 bp 的小片段, 与预期结果相符, 见图 1。测序结果显示 3 种 shRNA 分子插入正确, 无碱基突变, 表明编码 3 个 shRNA 分子的重组质粒均构建成功。

2.2 shRNAs 抑制鸡 hsp70 的表达

2.2.1 有效 shRNA 的筛选 荧光定量 RT-PCR 检测结果显示, shRNAs 转染 CEF 后 24 h, shRNA-1 能显著干涉 hsp70 mRNA 的表达, 干涉效率为 92.07%, 而 shRNA-2 和 shRNA-3 则对 hsp70 mRNA 无明显干涉作用, 结果见图 2。

2.2.2 shRNA-1 干涉 CEF 中 hsp70 基因的表达 shRNA-1 转染 CEF 后 18、24、28 h hsp70 基因

的表达受到显著抑制, mRNA 的表达水平分别被敲低 75%、93% 和 96%, 见图 3。



M. DL2000 相对分子质量标准; 1. shRNA-1; 2. shRNA-2; 3. shRNA-3

M. DL2000 marker; 1. shRNA-1; 2. shRNA-2; 3. shRNA-3

图 1 重组质粒 *Sal I* 酶切鉴定

Fig. 1 Electropherogram of recombination plasmid digested by *Sal I* enzyme

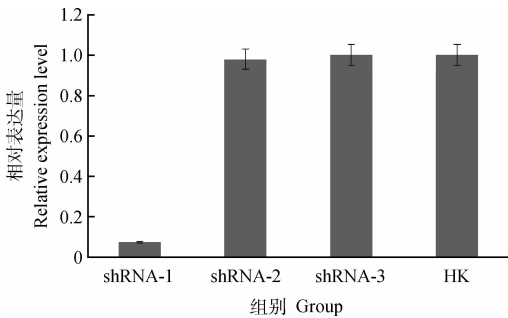


图 2 shRNAs 干扰 *hsp70* 基因 mRNA 在 CEF 中的表达
Fig. 2 The interference of *hsp70* mRNA express in CEF by shRNAs

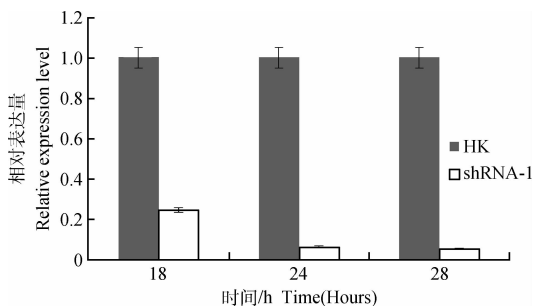


图 3 shRNA1 抑制 *hsp70* 基因的表达
Fig. 3 *hsp70* mRNA expression inhibited by shRNA1

2.3 干扰 *hsp70* mRNA 表达诱导 CEF 凋亡

Annexin-V 检测结果显示, 干扰 *hsp70* 表达后 18 h, CEF 凋亡细胞数量增多, 且随着干扰时间的延长, 凋亡细胞数量显著高于对照组(图 4)。

2.4 干扰 *hsp70* 表达对 *Caspase3* 和 *Caspase8* 表达的影响

荧光定量检测结果显示, 干扰 *hsp70* 表达后

18、24、28 h, *Caspase3* 的表达上调, 分别是对照组的 250%、140% 和 110%, 而 *Caspase8* 的表达下降, 分别为对照组的 76%、80% 和 34%, 见图 5、6。

3 讨论

HSP70 家族的功能表现在多方面, 作为分子伴侣, HSP70 家族在应激状态下帮助需要折叠的蛋白质正确折叠, 加快正常蛋白质合成的恢复; 在细胞保护方面, HSP70 表达的增加可以缓解细胞所受到伤害, 增强机体对应激的抵抗力; 同时, HSP70 在抗细胞凋亡、抗氧化和免疫反应中也起着重要作用^[16]。近年来的研究表明, HSP70 通过介入细胞凋亡信号转导通路而直接影响细胞凋亡, 作为细胞凋亡调控的关键因子发挥了重要作用。I. Hirata 等发现在胃上皮细胞中过表达 HSP70 可有效抵制吡啶美辛诱导的细胞凋亡^[17], 在小鼠组织细胞中过表达 HSP70, 可以抵御热诱导的细胞凋亡作用^[18], 而采用 RNA 干扰技术抑制 *hsp70* 基因在胃癌细胞中的表达, 可导致细胞生长抑制, 并且促进了细胞凋亡的发生^[19], 朱青等人通过 RNA 干扰技术敲低了 K562 细胞中的 *hsp701A* 基因也得到类似结果^[5]。本研究采用 RNA 干扰技术抑制 *hsp70* 基因在 CEF 中的表达, 同样促进了细胞凋亡的发生, 与在哺乳动物细胞中的研究结果一致, 说明家禽 *hsp70* 同样具有保护细胞对抗凋亡的作用。

目前研究认为线粒体途径、细胞表面膜死亡受体途径是经典的凋亡信号传导通路。线粒体途径为凋亡信号诱导了细胞色素 C(Cyt-c) 从线粒体的释放, 从而驱动了相对分子质量较大的 Caspase 活化复合物装配成凋亡小体, 凋亡小体中寡聚化的细胞凋亡激活因子在 dATP 存在的条件下发生聚集, 促进了细胞凋亡执行蛋白 Caspase3 的自我切割活化, 进而引发 Caspases 级联反应, 导致细胞凋亡; 膜受体途径为肿瘤坏死因子诱导含死亡结构域的接头蛋白 FADD 聚合, FADD 利用其死亡效应结构域 (DED) 募集含有 DED 的 Caspase8、Caspase10 等, 形成死亡诱导信号复合物 (DISC), 在 DISC 上出现大量活化的 Caspase8, 从而切割活化 Caspase3, 最终导致细胞凋亡。本研究对干扰 *hsp70* 表达后 CEF 细胞中 *Caspase3* 和 *Caspase8* 基因表达水平的动态监测结果显示, 抑制 *hsp70* 基因表达, 诱导了 *Caspase3* 基因的表达, 轻度抑制了 *Caspase8* 基因的表达。Caspase8 基因的募集为膜受体介导的细胞凋亡的重要标志, 本研究中干扰 *hsp70* 基因后 CEF 中 *Caspase8* 基因被抑制, 故可以排除是通过

膜受体的途径实现的细胞凋亡。抑制 CEF 中的 *hsp70* 基因后细胞通过线粒体途径诱导了凋亡,文献报道也证实了 *hsp70* 基因与细胞的作用与线粒体

密切相关^[20],因此可以推测,CEF 中 HSP70 蛋白可能是通过线粒体途径保护细胞对抗凋亡。

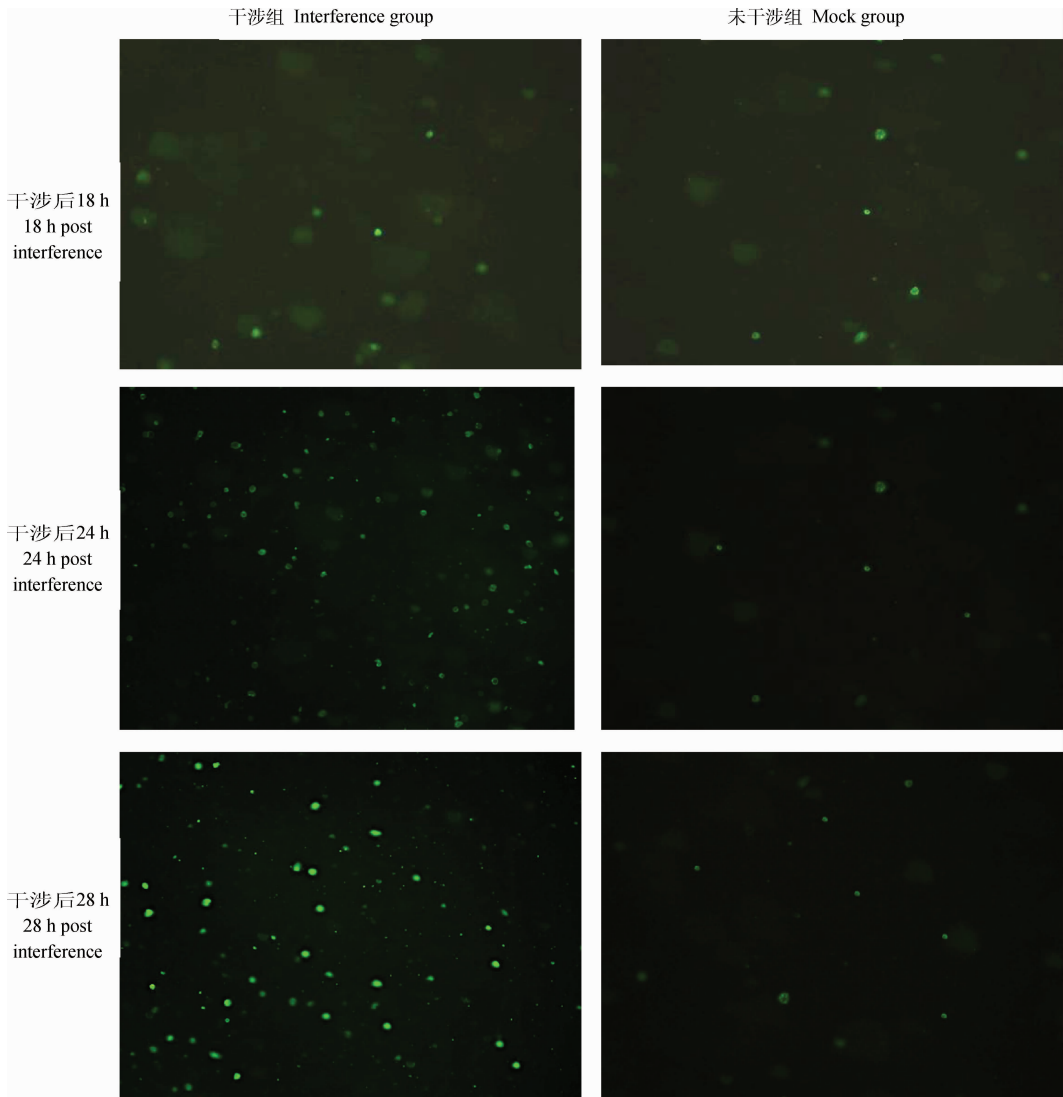


图 4 干涉后不同时间凋亡的 CEF 细胞 345×

Fig. 4 CEF apoptosis at different time post interference with shRNA1 345×

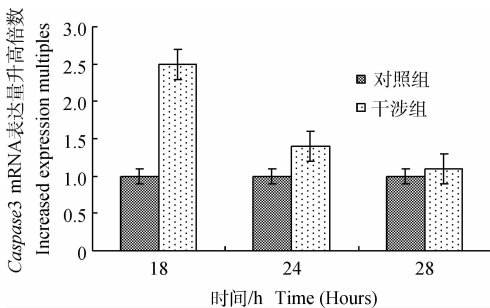


图 5 干涉 *hsp70* 的表达诱导了 CEF 细胞中 Caspase3 的表达

Fig. 5 Ineteferece *hsp70* expression promote the expression of Caspase3 in CEF

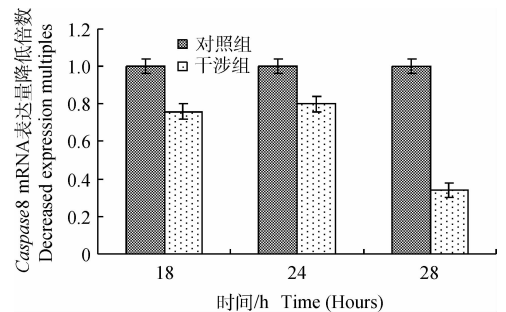


图 6 干涉 *hsp70* mRNA 表达抑制 CEF 细胞中 Caspase8 基因 mRNA 的表达

Fig. 6 Ineteferece *hsp70* expression inhibiting Caspase8 expression in CEF

参考文献:

- [1] CASTELLI C, RIVOLTINI L, RINI F, et al. Heat shock proteins: biological functions and clinical application as personalized vaccines for human cancer[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(3): 227-233.
- [2] GUPTA R S, RAMACHANDRA N B, BOWES T, et al. Unusual cellular disposition of the mitochondrial molecular chaperones Hsp60, Hsp70 and Hsp10[J]. *Novartis Found Symp*, 2008, 291:59-68.
- [3] ZHAO Y, WANG W, QIAN L. Hsp70 may protect cardiomyocytes from stress-induced injury by inhibiting Fas-mediated apoptosis[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2007, 12(1): 83-95.
- [4] YANG J, TOWER J. Expression of hsp22 and hsp70 transgenes is partially predictive of drosophila survival under normal and stress conditions [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2009, 64(8): 828-838.
- [5] 朱青, 张王刚, 王立锋. Hsp701A 的 RNA 干涉诱导 K562 细胞凋亡[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2006, 22(4): 480-484.
- [6] MOSSER D D, CARON A W, BOURGET L, et al. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(19): 7146-7159.
- [7] PADMINI E, VIJAYA GEETHA B. Modulation of ASK1 expression during overexpression of Trx and HSP70 in stressed fish liver mitochondria[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2009, 14(5): 459-467.
- [8] WILSON J A, JAYASENA S, KHVOROVA A, et al. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(5): 2783-2788.
- [9] BRENZ VERCA M S, WEBER P, MAYER C, et al. Development of a species-specific RNA polymerase I-based shRNA expression vector[J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(2): e10.
- [10] MCINTYRE G J, FANNING G C. Design and cloning strategies for constructing shRNA expression vectors[J]. *BMC Biotechnol*, 2006, 6: 1 (doi: 10.1186/1472-6750-6-1).
- [11] TAXMAN D J, LIVINGSTONE L R, ZHANG J, et al. Criteria for effective design, construction, and gene knockdown by shRNA vectors[J]. *BMC Biotechnol*, 2006, 6: 7 (doi: 10.1186/1472-6750-6-7).
- [12] 张卓然. 培养细胞学与细胞培养技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 654-673.
- [13] GIULIETTI A, OVERBERGH L, VALCHX D, et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 386-401.
- [14] 马莉, 谢秀兰, 岳华. 鸡 β -actin 基因实时荧光定量 PCR 方法的建立[J]. *中国畜牧兽医*, 2007, 34(2): 73-75.
- [15] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [16] REED J C, DOCTOR K, ROJAS A, et al. Comparative analysis of apoptosis and inflammation genes of mice and humans [J]. *Genome Res*, 2003, 13(6b): 1376-1388.
- [17] HIRATA I, NAITO Y, HANDA O, et al. Heat-shock protein 70-overexpressing gastric epithelial cells are resistant to indomethacin-induced apoptosis [J]. *Digestion*, 2009, 79(4): 243-250.
- [18] SREEDHAR A S, PARDHASARADHI B V, KHAR A, et al. A cross talk between cellular signalling and cellular redox state during heat-induced apoptosis in a rat histiocytoma[J]. *Free Radic Biol Med*, 2002, 32(3): 221-227.
- [19] XIANG T X, LI Y, JIANG Z, et al. RNA interference-mediated silencing of the Hsp70 gene inhibits human gastric cancer cell growth and induces apoptosis *in vitro* and *in vivo* [J]. *Tumori*, 2008, 94(4): 539-550.
- [20] INOUE H, UYAMA T, SUZUKI T, et al. Phosphorylated hamartin-Hsp70 complex regulates apoptosis via mitochondrial localization [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(1): 1148-1153.

(编辑 白永平)