



DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.10.002
www.csumed.org/xbwk/fileup/PDF/201410994.pdf

RBM5 基因表达载体构建、稳定转染 A549 细胞系的建立及功能的初步研究

肖铜¹, 李念¹, 邢晓为², 何碧秀¹

(中南大学 1. 湘雅医院老年病科, 长沙 410008; 2. 湘雅三医院医学科研中心, 长沙 410013)

[摘要] 目的: 通过构建表达载体、建立稳定转染RNA结合基序5(RNA binding motif 5, RBM5)的A549细胞系, 初步研究RBM5基因过表达对A549细胞增殖以及天冬-谷-丙-组氨酸盒多肽15[DEAH box polypeptide 15, DHX15]表达的影响。方法: 应用分段克隆法构建pcDNA3.1(+)/RBM5真核表达载体; 将测序验证后的重组质粒pcDNA3.1(+)/RBM5转染肺腺癌A549细胞并以G418进行筛选, 采用Western印迹鉴定RBM5基因过表达阳性细胞, 流式细胞仪分别检测经pcDNA3.1(+)/RBM5稳定转染的A549细胞[pcDNA3.1(+)/RBM5-A549]及pcDNA3.1(+)-A549细胞的周期分布; 运用RT-PCR技术分别检测pcDNA3.1(+)/RBM5-A549和pcDNA3.1(+)-A549细胞中剪接相关因子DHX15的表达情况。结果: 成功构建出pcDNA3.1(+)/RBM5真核表达载体, 筛选出RBM5基因稳定转染过表达阳性细胞株; pcDNA3.1(+)/RBM5-A549较pcDNA3.1(+)-A549细胞处于G₁期细胞比例增大、S期细胞比例减小(均 $P<0.01$); pcDNA3.1(+)/RBM5-A549较pcDNA3.1(+)-A549细胞的DHX15表达上调($P<0.01$)。结论: 成功构建重组质粒pcDNA3.1(+)/RBM5, 并建立了RBM5稳定转染的A549细胞系; 初步证实RBM5基因过表达可抑制肺腺癌A549细胞的细胞周期, 并使DHX15表达上调。

[关键词] RNA结合基序5; A549细胞系; 天冬-谷-丙-组氨酸盒多肽15; 基因克隆; 质粒构建; 肿瘤抑制; 细胞周期

Construction of RBM5 vector, establishment of stably transfected A549 cell line and preliminary research on the function of RBM5 gene

XIAO Jian¹, LI Nian¹, XING Xiaowei², HE Bixiu¹

(1. Department of Geriatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008;

2. Department of Medical Research Center, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

收稿日期(Date of reception): 2014-02-24

作者简介(Biography): 肖铜, 硕士, 医师, 主要从事肺癌防治方面的研究。

通信作者(Corresponding author): 何碧秀, Email: hebixiu000@tom.com

基金项目(Foundation item): 湖南省科技计划项目(06SK3029-7)。This work was supported by the Science and Technology Planned Project of Hunan Province, P. R. China (06SK3029-7).

ABSTRACT

Objective: To establish a stable A549 cell line transfected by RNA binding motif 5 (RBMS) expression vector, and to investigate the effect of RBMS gene on proliferation of A549 cell line and the expression of DEAH box polypeptide 15 (DHX15).

Methods: The eukaryotic expression vector pcDNA3.1 (+)/RBMS was constructed by a two-step PCR technique. Then, the recombinant plasmid pcDNA3.1 (+)/RBMS was verified by DNA sequencing and transfected into the lung adenocarcinoma cell A549. The positive cells with overexpression of RBMS gene were identified by Western blotting. Flow cytometry was used to analyze the cell cycles of the positive A549 cells [pcDNA3.1 (+)/RBMS-A549] and the negative controls [pcDNA3.1 (+)-A549]. Finally, RT-PCR was used to detect the expression of DHX15, a splicing-related factor, in the positively transfected A549 cells and the negative controls.

Results: A pcDNA3.1 (+)/RBMS eukaryotic expression vector has been constructed successfully, and the A549 cell line that stably transfected with RBMS gene has been established. Compared with negative control cells, the percentage of G1 phase cells in the positive cells was increased, while the percentage of S phase was decreased (both $P < 0.01$), and the expression of DHX15 is upregulated ($P < 0.01$).

Conclusion: RBMS gene can inhibit the cell cycle and upregulate the expression of DHX15 in A549 cells.

KEY WORDS

RNA binding motif 5; A549 cell line; DEAH box polypeptide 15; gene cloning; plasmid construction; tumor suppression; cell cycle

肺癌是威胁着人类健康和生命的主要恶性肿瘤之一。肿瘤抑制基因功能的缺失是肺癌的发病机制之一。3号染色体短臂2区1带3亚带(3p21.3)缺失是肺癌最常见的基因改变,已证实有95%的小细胞肺癌和50%~80%的非小细胞肺癌的细胞中存在该区域基因的杂合性缺失^[1]。RNA结合基序5(RNA binding motif 5, RBMS)基因(GenBank accession No.AF091263)由Timmer等^[2]分离自前B细胞cDNA文库。不同肺癌细胞系的研究^[3]发现:肺癌常见缺失区3p21.3长370 kb,含有19个基因,其中就包括RBMS。另有研究^[4,6]表明RBMS基因在肺癌等肿瘤组织中较正常组织表达下降。体外实验^[7-8]证明:RBMS基因的表达具有抑制癌细胞增殖及促进凋亡作用,表明RBMS是一种潜在的肿瘤抑制基因。

天冬-谷-丙-组氨酸盒多肽15[DEAH(Asp-Glu-Ala-His)box polypeptide 15, DHX15]是一种在剪接体中发现的DExD/H-box蛋白^[9]。DExD/H-box蛋白在pre-mRNA剪接中可调控RNA-RNA之间和RNA-蛋白之间的相互作用,并且DExD/H-box RNA解旋酶也在pre-mRNA剪接过程的多个步骤中发挥着重要作用^[10]。同时, RBMS也参与剪接调控,有研究^[11-12]证实RBMS存在于前剪接体复合物A中,并且RBMS参与3'端剪接位点识别和调控凋亡相关基因的选择性剪接,可抑制前剪接体复合物向成熟剪接体转变。

最近有研究^[13]指出RBMS在体外可直接与DHX15相互作用并促进DHX15的解旋酶活性。

尽管目前针对RBMS基因肿瘤抑制作用的研究已较为深入,但其具体分子机制仍不清楚,有待进一步研究。本研究拟构建RBMS基因真核表达载体,转染肺腺癌A549细胞以建立稳定转染RBMS基因的A549细胞系,观察RBMS基因过表达对肺腺癌细胞A549周期的影响。同时,由于RBMS与DHX15均参与pre-mRNA的剪接调控,且两者可相互作用,推测RBMS基因过表达可能相应地影响DHX15的表达水平。本研究旨在进一步探讨RBMS基因的肿瘤抑制作用机制,为肺癌的基因治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

A549细胞购自中南大学湘雅中心实验室细胞库; RPMI-1640培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司; 感受态细菌JM109和人睾丸组织cDNA由湘雅三医院医学实验中心留存; pUCm-T载体购自上海生工生物工程公司; pcDNA3.1(+)载体、LipofectamineTM2000购自美国Invitrogen公司; RNA提取试剂盒购自德国Qiagen公司; 连接、胶回收试剂盒购自大连宝生物工程公司; 质粒提取试剂

盒购自美国Axgen公司; Easy-A高保真酶购自美国Agilent公司; 限制性内切酶、第一链cDNA合成试剂盒购自加拿大Fermentas公司; 碘化丙啶购自美国BD公司; 抗RBM5抗体(鼠抗人)购自英国Abcam公司; 兔抗鼠二抗购自中国艾杰生物公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

参考GenBank中RBM5基因序列(AF091263), 将其从中间单酶切位点处(*Kpn* I: GGTACC)分成两个片段分别进行扩增。PCR扩增引物: 1)上游引物序列1(F1)为5'-CGAAGCTTACAATGGG-TTCAGACAAAAGAG-3', 下游引物序列1(R1)为5'-CGGAATTCGGTACCAGGAACCTACACCAG-3'; 2)上游引物序列2(F2)为5'-CGGGTACCAAATATG-CAGTACCTG-3', 下游引物序列2(R2)为5'-CCCT-CGAGCTCCATCTCAGTGAACCGGG-3'(划横线处分别为*Hind* III, *Kpn* I和*Xho* I酶切位点, 并在5'端加入2个保护碱基, 分别为CG, CG, CC)。DHX15基因PCR扩增引物: DHX15-F为5'-GTTCTGAAGGAAGTTGTAAGAC-3'; DHX15-R为5'-GCTTTATTCTCTTACAGGCTTC-3'。

1.2.2 PCR 扩增目的基因

以人睾丸cDNA(由中南大学湘雅三医院医学实验中心邢晓为博士提供)为模板对目的片段分别进行PCR扩增。10 μ L PCR反应体系如下: 焦磷酸二乙酯处理过的双蒸水6.8 μ L, dNTP 1.0 μ L, PCR高保真反应缓冲液1.0 μ L, Easy-A高保真聚合酶0.2 μ L, 上、下游引物各0.1 μ L, cDNA模板0.8 μ L。RBM5N(以F1和R1为引物扩增的RBM5 N端, 长度为1 364 bp)/RBM5C(以F2和R2为引物扩增的RBM5 C端, 长度为1 127 bp)PCR扩增条件: 94 $^{\circ}$ C预变性3 min, 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 62 $^{\circ}$ C退火40 s, 72 $^{\circ}$ C延伸90 s(RBM5 N)/60 s(RBM5 C), 完成35个循环后再延伸5 min。扩增完成后, 分别取3.5 μ L PCR扩增产物进行琼脂糖(1.5%)凝胶电泳鉴定。

1.2.3 pUCm-T-RBM5N 与 pUCm-T-RBM5C 重组质粒的构建与鉴定

参考TA克隆技术^[14-15], 根据连接试剂盒产品说明步骤将鉴定后的RBM5N和RBM5C分别克隆至pUCm-T载体中, 转化大肠杆菌JM109, 挑选单克隆, 接种至氨苄青霉素选择性LB液体培养基中培养, 以菌液作为模板按照1.2.2中条件进行PCR扩增并鉴定出阳性克隆, 测序验证。

1.2.4 pcDNA3.1(+)/RBM5 重组质粒的构建与鉴定

将阳性克隆小量扩增后按照质粒提取试剂盒标准步骤抽提pUCm-T-RBM5N和pUCm-T-RBM5C质粒, 同时与pcDNA3.1(+)-空白质粒分别进行双酶切, 限制

性内切酶依次为*Hind* III与*Kpn* I, *Kpn* I与*Xho* I, *Hind* III与*Xho* I, 胶回收目的基因片段和载体。根据连接试剂盒说明将酶切后的RBM5N, RBM5C和pcDNA3.1(+)进行连接, 转化感受态大肠杆菌JM109, 挑取阳性克隆, 按1.2.2所述条件进行PCR扩增, 只有RBM5N和RBM5C均能扩增出来的菌液才被认为是阳性菌液, 并进行*Hind* III和*Xho* I双酶切、测序鉴定。

1.2.5 建立稳定转染 RBM5 的肺腺癌 A549 细胞系

肺腺癌细胞A549培养于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中, 放置在37 $^{\circ}$ C、CO₂体积分数为5%的CO₂培养箱中培养。细胞转染前1 d将培养瓶中细胞转种至6孔板, 当细胞融合到80%左右时, 按照脂质体(LipofectamineTM 2000)标准操作流程将重组质粒pcDNA3.1(+)/RBM5和空白质粒pcDNA3.1(+)-A549分别转染肺腺癌细胞A549。转染48 h后, 用胰酶消化转染细胞, 转移至细胞培养瓶中继续培养, 更换为筛选培养基(G418浓度为800 mg/L)。筛选30~35 d后, 获得G418抗性细胞克隆。采用有限稀释法进行亚克隆, 用含G418的培养基进行培养, 观察克隆形成情况, 待克隆形成后挑单克隆进行扩大培养, Western印迹检测阳性细胞克隆中RBM5的表达, 最终获得单克隆阳性表达RBM5的转染细胞系。

1.2.6 流式细胞仪检测 RBM5 基因过表达对 A549 细胞周期的影响

将重组质粒pcDNA3.1(+)/RBM5稳定转染的A549细胞[pcDNA3.1(+)/RBM5-A549]和空白质粒pcDNA3.1(+)-A549细胞[pcDNA3.1(+)-A549]进行常规培养, 经消化、洗涤、固定后予以碘化丙啶(50 mg/L)避光孵育30 min处理, 流式细胞仪进行DNA检测, 以Modifit软件分析各时相细胞周期的比例。

1.2.7 RT-PCR 检测 pcDNA3.1(+)/RBM5-A549 与 pcDNA 3.1(+)-A549 细胞中 DHX15 基因的表达

将pcDNA3.1(+)/RBM5-A549和pcDNA3.1(+)-A549细胞持续传代, 分别提取其细胞总RNA, 合成第一链cDNA, 然后以此为模板进行20 μ L PCR反应体系扩增: 94 $^{\circ}$ C预变性3 min, 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 62 $^{\circ}$ C退火40 s, 72 $^{\circ}$ C延伸40 s, 完成30个循环后再延伸5 min(预实验表明30个循环PCR产物尚未达到平台期)。反应结束后, 取少量PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

1.3 统计学处理

本研究的实验数据运用SPSS18.0统计软件进行统计学分析。数据结果采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 各项指标的两样本均数的比较采用独立样本的*t*检验。*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RBM5N 与 RBM5C PCR 扩增结果

以人睾丸 cDNA 为模板扩增 RBM5N 和 RBM5C, PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 发现 RBM5N(图1A)和 RBM5C(图1B)均有特异性扩增条带, 大小分别约为 1.3 和 1.1 kb, 与实验预期扩增片段大小相符合。

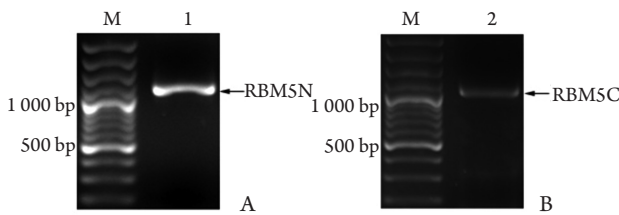


图1 RBM5N与RBM5C PCR扩增结果

Figure 1 Amplification results of RBM5N and RBM5C PCR

A: Amplification result of RBM5N; M: 100 bp DNA ladder; 1: RBM5N; B: Amplification result of RBM5C; M: 100 bp DNA ladder; 2: RBM5C

2.2 重组质粒 pUCm-T-RBM5N 和 pUCm-T-RBM5C 阳性克隆的筛选与鉴定

分别挑取 pUCm-T-RBM5N 和 pUCm-T-RBM5C 单克隆在含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中培养约 7 h 后, 以菌液为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测。结果发现: 前者 1~5 号克隆为阳性(图2A), 后者 1~7 号克隆均为阳性(图2B)。随机取二者中阳性克隆送上海生工生物工程公司进行测序验证。

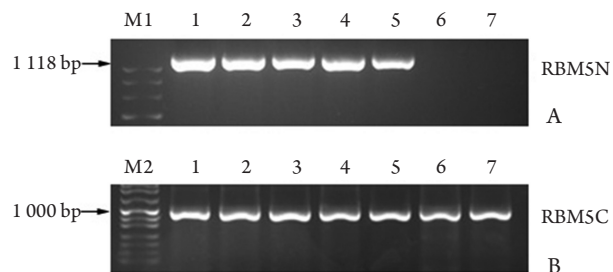


图2 重组质粒 pUCm-T-RBM5N 和 pUCm-T-RBM5C 阳性克隆的筛选与鉴定

Figure 2 Screening and identification of the recombinant plasmid pUCm-T-RBM5N and pUCm-T-RBM5C

A: pUCm-T-RBM5N positive clones by PCR identification; B: pUCm-T-RBM5C positive clones by PCR identification. M1: pUCMix8 DNA ladder; M2: 100 bp DNA ladder; 1~7: DNA ladder of different clones

2.3 RBM5N 与 RBM5C 双酶切结果

分别用 *Hind* III 和 *Kpn* I 与 *Kpn* I 和 *Xho* I 对 pUCm-T-RBM5N 和 pUCm-T-RBM5C 进行双酶切, 结果发现, 两者能够被双酶切, 片段大小与预期相符(图3)。将 RBM5N 和 RBM5C 片段进行胶回收。

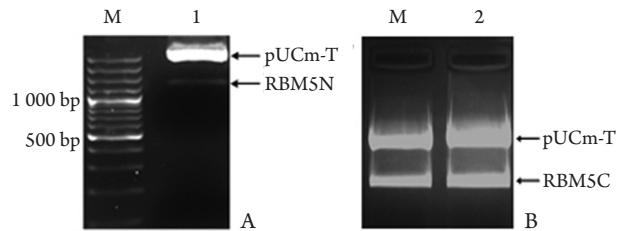


图3 RBM5N与RBM5C双酶切结果

Figure 3 Double enzyme digestion results of RBM5N and RBM5C

A: Double enzyme digestion result of pUCm-T-RBM5N; M: 100 bp DNA ladder; 1: pUCm-T and RBM5N; B: Double enzyme digestion result of pUCm-T-RBM5C; M: 100 bp DNA ladder; 2: pUCm-T and RBM5C

2.4 pcDNA3.1(+)/RBM5 重组质粒的鉴定

将双酶切回收的 RBM5N, RBM5C 和 pcDNA3.1(+) 空白质粒进行连接, 筛选阳性克隆。将所筛选的阳性克隆用 *Hind* III 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定, 结果阳性克隆能够切下大小约为 2.4 kb 的条带(图4), 与 RBM5 基因开放阅读框长度相符。将所筛选到的阳性克隆送至上海生工生物工程公司测序鉴定, 结果显示 RBM5 基因能够正确插入到 pcDNA3.1(+) 表达载体中, 没有移码和碱基突变(图5), 说明 pcDNA3.1(+)/RBM5 真核表达载体构建成功。

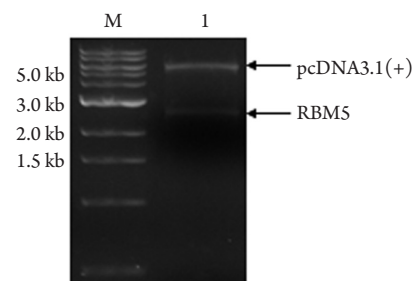


图4 pcDNA3.1(+)/RBM5 双酶切结果

Figure 4 Double digestion result of pcDNA3.1(+)/RBM5

M: 1 kb DNA ladder; 1: pcDNA3.1(+) and the full length of the open reading frame of the RBM5

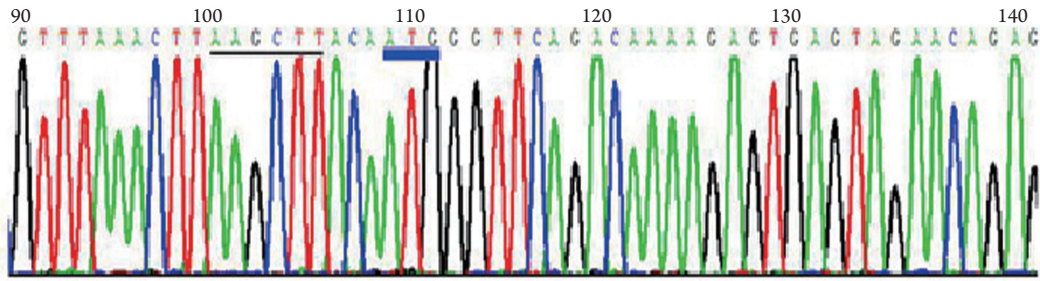


图5 pcDNA3.1(+)/RBM5质粒测序结果

Figure 5 Result of pcDNA3.1 (+)/RBM5 plasmid sequencing

The underlined AAGCTT is restriction enzyme cutting site of *Hind* III. ATG is initiation codon

2.5 Western 印迹检测鉴定 RBM5 基因过表达结果

将重组质粒pcDNA3.1(+)/RBM5和空白质粒pcDNA3.1(+)分别转染肺腺癌细胞A549后, 经G418筛选得到抗性细胞克隆, 然后挑取经有限稀释法亚克隆后形成的单克隆扩大培养, 分别提取细胞总蛋白行Western 印迹检测, 以GAPDH为内参。结果实验组细胞中RBM5蛋白(约90 kD)表达明显高于对照组(图6), 表明A549/RBM5稳转细胞系构建成功。

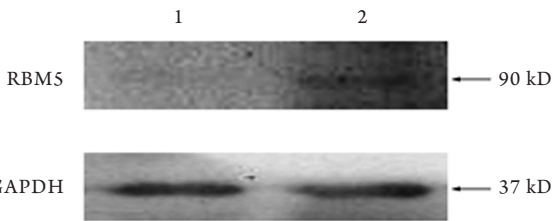


图6 Western 印迹检测RBM5蛋白表达

Figure 6 RBM5 protein expression detected by Western blot

1: pcDNA3.1 (+) transfected cells; 2: pcDNA3.1 (+)/RBM5 transfected cells

2.6 流式细胞检测结果

分别将重组质粒pcDNA3.1(+)/RBM5稳定转染的A549细胞[pcDNA3.1(+)/RBM5-A549]和空白质粒pcDNA3.1(+)稳定转染的A549细胞[pcDNA3.1(+)-A549]应用流式细胞技术进行检测。结果显示: 与pcDNA3.1(+)-A549相比, pcDNA3.1(+)/RBM5-A549处于G₁期细胞比例增大, S期细胞比例减小(均P<0.01, 表1)。

2.7 pcDNA3.1(+)/RBM5-A549 和 pcDNA3.1(+)-A549 细胞的 DHX15 基因 RT-PCR 扩增结果

分别以 pcDNA3.1(+)/RBM5-A549 和 pcDNA3.1(+)-A549 细胞总RNA为模板进行RT-PCR检测, GAPDH为内参, 结果显示两种细胞均可见大小为289 bp的目的条带和496 bp内参条带(图7A), 且pcDNA3.1(+)/RBM5-A549细胞的条带亮度较pcDNA3.1(+)-A549细胞高。利用Quantity One软件对两组电泳条带进行光密度分析, 并计算目的条带与内参条带光密度相对值, 结果表明pcDNA3.1(+)/RBM5-A549细胞DHX15的条带相对值明显高于pcDNA3.1(+)-A549细胞(图7B, P<0.01), 表明DHX15在pcDNA3.1(+)/RBM5-A549细胞内的表达上调。

表1 pcDNA3.1(+)/RBM5-A549 和 pcDNA3.1(+)-A549 细胞周期分布百分比 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Percentage of cell cycle in pcDNA3.1(+)/RBM5-A549 and pcDNA3.1(+)-A549 cells (n=5, $\bar{x} \pm s$)

细胞类型	G ₁ 期/%	S期/%	G ₂ /M期/%
pcDNA3.1(+)/RBM5-A549	74.09 ± 3.22**	16.83 ± 3.28††	9.08 ± 1.08
pcDNA3.1(+)-A549	64.20 ± 2.86	26.25 ± 3.15	9.55 ± 2.14

与pcDNA3.1(+)-A549比较, G₁期细胞比例增大, **P<0.01; S期细胞比例减小, ††P<0.01

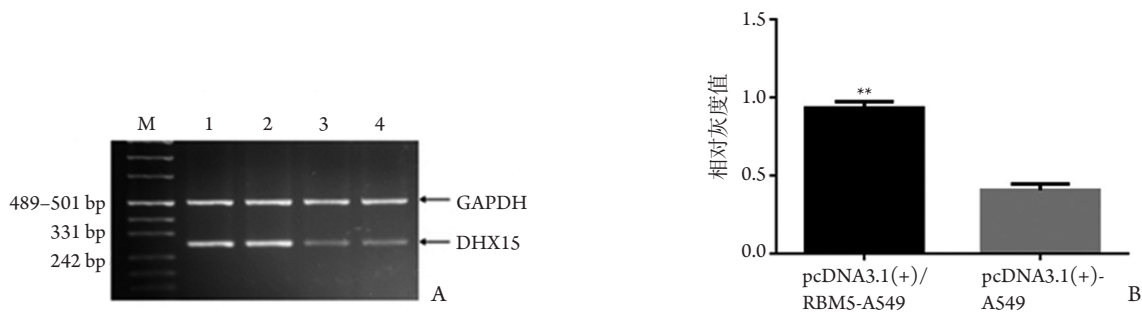


图7 pcDNA3.1(+)/RBMS-A549和pcDNA3.1(+)-A549细胞的DHX15基因RT-PCR扩增结果

Figure 7 RT-PCR amplification of DHX15 gene in pcDNA3.1(+)/RBMS-A549 and pcDNA3.1(+)-A549 cells

A: Electrophoresis of RT-PCR amplification; M: pUCMix8 DNA ladder; 1-2: pcDNA3.1(+)/RBMS-A549 cells; 3-4: pcDNA3.1(+)-A549 cells; B: Histogram of RT-PCR amplification, ** $P < 0.01$ vs pcDNA3.1(+)-A549 cells

3 讨论

RBMS基因是位于人类染色体3p21.3杂合性缺失区的多个基因之一, 大量研究^[4]证实RBMS基因在多种肿瘤组织中表达均不同程度下降, 尤其是在肺癌组织中表现明显。且动物实验^[6]发现将RBMS基因过表达的小鼠纤维肉瘤细胞接种至裸鼠体内后可显著抑制肿瘤的生长, 表明RBMS基因具有潜在肿瘤抑制作用。本研究以人睾丸cDNA为模板对RBMS基因进行扩增。RBMS基因开放阅读框全长2 460 bp, 预实验时应用Easy-A高保真酶扩增RBMS全长时出现了不同程度碱基错配现象, 于是将RBMS基因从单酶切位点*Kpn* I(GGTACC, 始于1 355 bp)处分成两段分别进行PCR扩增, 然后分别克隆至pUCm-T载体中, 经转化、筛选阳性克隆、酶切、胶回收以及反复验证, 成功将全长RBMS基因克隆至真核表达载体pcDNA3.1(+)中, 表明选择的分段克隆法不失为长片段基因克隆的一种可行方法。

本研究借助脂质体成功将重组质粒pcDNA3.1(+)/RBMS转染肺腺癌细胞A549, 并用Western印迹鉴定出RBMS基因过表达A549细胞株。RBMS基因过表达A549细胞经流式细胞检测显示重组质粒pcDNA3.1(+)/RBMS转染组处于G₁期细胞比例增大, S期细胞比例减小, 提示RBMS基因过表达可使细胞周期停滞于G₁期, 表明RBMS基因过表达可通过抑制细胞周期进程而抑制细胞增殖, 进一步证实了RBMS基因的肿瘤抑制功能, 这与国外相关研究^[7]结果一致。

DHX15属于DEXD/H-box蛋白家族一员, 是剪接体的组分之一^[9], DEXD/H-box蛋白在pre-mRNA剪接中调控RNA-RNA之间和RNA-蛋白之间的相互作用, 并且DEXD/H-box RNA解旋酶也

在pre-mRNA剪接过程的多个步骤中发挥着重要作用^[10]。目前已有诸多研究表明RBMS基因在剪接调控中也发挥着重要作用^[13,16-17], 且研究发现RBMS可直接与DHX15剪接体成份相互作用, 并且可有效促进DHX15的解旋酶活性^[13]。由此可知RBMS与DHX15之间存在分子机制联系。本研究分别检测了重组质粒pcDNA3.1(+)/RBMS转染组和空白质粒pcDNA3.1(+)转染组肺腺癌细胞A549中DHX15的表达水平, 结果显示前者细胞中DHX15的表达较后者明显上调, 表明RBMS基因可能通过影响pre-mRNA的剪接对DHX15的表达进行调控。

综上所述, 本研究成功构建重组质粒pcDNA3.1(+)/RBMS, 并建立了RBMS稳转的A549细胞系, 为进一步研究RBMS基因在肺腺癌中的作用打下了基础。初步证实RBMS基因过表达可抑制肺腺癌细胞A549周期, 并发现RBMS基因表达可使DHX15表达上调, 这可能是RBMS基因对pre-mRNA剪接调控的机制之一。

参考文献

- Ji L, Minna JD, Roth JA. 3p21.3 tumor suppressor cluster: prospects for translational applications[J]. *Future Oncol*, 2005, 1(1): 79-92.
- Timmer T, Terpstra P, van den Berg A, et al. A comparison of genomic structures and expression patterns of two closely related flanking genes in a critical lung cancer region at 3p21.3[J]. *Eur J Hum Genet*, 1999, 7(4): 478-486.
- Wei MH, Latif F, Bader S, et al. Construction of a 600-kilobase cosmid clone contig and generation of a transcriptional map surrounding the lung cancer tumor suppressor gene (TSG) locus on human chromosome 3p21.3: progress toward the isolation of a lung cancer

- TSG[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(7): 1487-1492.
4. Liang H, Zhang J, Shao C, et al. Differential expression of RBM5, EGFR and KRAS mRNA and protein in non-small cell lung cancer tissues[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012, 31(1): 36.
 5. Kim YS, Hwan JD, Bae S, et al. Identification of differentially expressed genes using an annealing control primer system in stage III serous ovarian carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 576.
 6. Oh JJ, West AR, Fishbein MC, et al. A candidate tumor suppressor gene, H37, from the human lung cancer tumor suppressor locus 3p21.3[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(11): 3207-3213.
 7. Oh JJ, Razfar A, Delgado I, et al. 3p21.3 tumor suppressor gene H37/Luca15/RBM5 inhibits growth of human lung cancer cells through cell cycle arrest and apoptosis[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(7): 3419-3427.
 8. Zhao L, Li R, Shao C, et al. 3p21.3 tumor suppressor gene RBM5 inhibits growth of human prostate cancer PC-3 cells through apoptosis[J]. *World J Surg Oncol*, 2012, 10: 247.
 9. Fouraux MA, Kolkman MJ, van der Heijden A, et al. The human La (SS-B) autoantigen interacts with DDX15/hPrp43, a putative DEAD-box RNA helicase[J]. *RNA*, 2002, 8(11): 1428-1443.
 10. Cordin O, Banroques J, Tanner NK, et al. The DEAD-box protein family of RNA helicases[J]. *Gene*, 2006, 367: 17-37.
 11. Deckert J, Hartmuth K, Boehringer D, et al. Protein composition and electron microscopy structure of affinity-purified human spliceosomal B complexes isolated under physiological conditions[J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(14): 5528-5543.
 12. Bonnal S, Martinez C, Forch P, et al. RBM5/Luca-15/H37 regulates Fas alternative splice site pairing after exon definition[J]. *Mol Cell*, 2008, 32(1): 81-95.
 13. Niu Z, Jin W, Zhang L, et al. Tumor suppressor RBM5 directly interacts with the DExD/H-box protein DHX15 and stimulates its helicase activity[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(7): 977-983.
 14. 杨幼波, 向红, 邢晓为. 人TSARG4真核表达载体的构建及稳定转染HeLa细胞系的建立[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 25(8): 684-687.
YANG Youbo, XIANG Hong, XING Xiaowei. Construction of eukaryotic expression vector of human TSARG4 and establishment of its stable transfected HeLa cell line[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2009, 25(8): 684-687.
 15. 邢晓为, 袁洪, 王维. 小鼠睾丸生精新基因SRG4原核表达与纯化[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2007, 23(8): 701-703.
XING Xiaowei, YUAN Hong, WANG Wei. Prokaryotic expression and purification of SRG4, a novel mouse spermatogenesis gene[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2007, 23(8): 701-703.
 16. Kotlajich MV, Hertel KJ. Death by splicing: tumor suppressor RBM5 freezes splice-site pairing[J]. *Mol Cell*, 2008, 32(2): 162-164.
 17. Fushimi K, Ray P, Kar A, et al. Up-regulation of the proapoptotic caspase 2 splicing isoform by a candidate tumor suppressor, RBM5[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(41): 15708-15713.

(本文编辑 傅希文)

本文引用: 肖铜, 李念, 邢晓为, 何碧秀. RBM5基因表达载体构建、稳定转染A549细胞系的建立及功能的初步研究[J]. *中南大学学报: 医学版*, 2014, 39(10): 994-1000. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.10.002

Cite this article as: XIAO Jian, LI Nian, XING Xiaowei, HE Bixiu. Construction of RBM5 vector, establishment of stably transfected A549 cell line and preliminary research on the function of RBM5 gene[J]. *Journal of Central South University. Medical Science*, 2014, 39(10): 994-1000. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.10.002