

ILF3 蛋白对雌激素受体 beta 的调控研究

黄云仙, 张风群, 贾军祥, 丁 明, 赵辅昆

(浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018)

摘 要: 雌激素在体内的生理作用通过雌激素受体(Estrogen Receptor)ER β 和 ER α 的介导来实现调控。ER β 在乳腺癌、前列腺癌、结肠癌和卵巢癌的发生、发展过程中具有调控作用。ILF3 是 RNA 结合蛋白中的一员, 参与细胞周期调控。凝胶阻滞实验(EMSA)证明了 ILF3 蛋白能结合 ER β mRNA 3'UTR。雌激素受体可介导雌激素实现其功能, ILF3 蛋白可能通过与 ER β 结合参与雌激素信号通路的调控。为探讨他们的关系以及调控机制, 构建 ILF3 过表达的慢病毒载体, 通过 Western blot 检测 ER β 蛋白的表达情况。在蛋白水平上, ER β 蛋白的表达量随着 ILF3 蛋白量的升高而升高, ILF3 对 ER β 起正向调控。MTT 实验检测 ILF3 基因表达对 MCF-7 细胞活力有影响。

关键词: ILF3; ER β ; 调控表达; MTT

中图分类号: Q291 **文献标志码:** A

0 引 言

雌激素广泛存在于生殖道、乳腺、中枢神经和骨骼系统等组织中, 在生长、发育和分化中起着重要的作用^[1]。雌激素在体内的生理作用的调控通过雌激素受体(Estrogen Receptor, ER)的介导来实现。雌激素受体属于核受体家族, 在细胞质和细胞核内都有分布, 其具有 2 种亚型: ER α 与 ER β 。ER α 主要存在于子宫内膜、乳腺、卵巢和下丘脑, ER β 主要存在于肾、脑、骨骼、前列腺和内皮细胞^[2]。ER α 与 ER β 具有高度的序列同源性和相似的结合结构域, 但 ER α 与 ER β 在功能上有时表现出相反的调控活性^[3]。研究表明 ER α 能刺激细胞分裂和增殖, ER β 能拮抗 ER α 的表达, 抑制细胞增殖, ER β 可能是肿瘤抑制基因^[4]。雌激素在前列腺细胞的生长和前列腺癌的发生中都起着重要的作用^[5]。研究发现在敲除 ER β (ERKO)的小鼠身上出现了前列腺增生老化现象^[6]。在 ER β 敲除的小鼠的结肠细胞中, 正在增殖的细胞数升高, 上皮细胞分化的标志蛋白减少^[7]。

ILF3(Interleukin Enhancer Binding Factor 3)

即白介素增强结合因子 3, 是双链 RNA 结合蛋白, 位于人类 19 号染色体上。ILF3 蛋白存在于细胞核和细胞质中, ILF3 序列中有一个核定位信号, 两个 dsRNA 结合结构域^[8]。在细胞中, ILF3 蛋白的双链 RNA 结合结构域是作为核输出结构域^[9]。

本文通过凝胶阻滞迁移实验(EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay)验证 ILF3 与 ER β mRNA 的 3'UTR 之间的特异性结合。构建 ILF3 过表达的慢病毒载体, 在乳腺癌细胞 MCF-7 中研究其对 ER β 蛋白表达量的影响, 并通过 MTT 实验检测 ILF3 蛋白对 MCF-7 细胞活力的影响, 为进一步揭示 ILF3 的功能提供了理论依据, 为更深入的研究雌激素信号途径提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

pLJM1-EGFP 来自 Dr. David Sabatini; 293T、MCF-7 细胞由本实验室保存; 大肠杆菌菌株 *E. coli* TOP10、*E. coli* stable3 由本实验室保存; pcDNA3.1 (+)-FLAG-ILF3 质粒、pLKO.1-ILF3-shRNA 质粒由本实验室构建并保存; PSPA2、PMD2. G、pC-

收稿日期: 2012-12-27

作者简介: 黄云仙(1987-), 女, 浙江建德人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤蛋白质组学研究。

通信作者: 丁 明, E-mail: mingding@zstu.edu.cn

MV-dR8. 2、pCMV-VSVG 质粒由本实验室保存; ER β mRNA 3'UTR 片段及 ILF3 蛋白由本实验纯化并保存; MEM、DMEM 培养基购自 Gibco 公司; *Nhe* I、*Eco*R I、T₄ DNA 连接酶购自 Takara 公司; 兔抗人 ILF3 抗体, 兔抗人 ER β , 兔抗人 ER α 抗体购自华安公司; 鼠抗人 β -actin 购自 Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 凝胶阻滞迁移(EMSA)实验

纯化后的蛋白样品用 5%~50% 的甘油保存于一80℃, 蛋白和 RNA 取出后, 室温融化, 取 2 μ L RNA 与 20 μ L 蛋白样品混合后冰上孵育 5 min。1.5% 的非变性琼脂糖凝胶电泳, 60 V, 2 h, 缓冲液为 TBE(20 \times TBE 缓冲液: 121 g Tris-base, 61.7 g sodium borate, 7.44 g EDTA, 定至 1 L, pH 8.0)。电泳结束后, 搭盐桥, 在 SSC 溶液(3 mol/L NaCl, 0.3 mol/L 柠檬酸钠, pH 7.0)中用上行毛细管转移法将胶上的 RNA 转移至尼龙膜上。膜取出后用 5% BSA 封闭液封闭, 加入稀释后的 SA-HRP, 孵育后加 Super Signal West Pico 化学发光底物显影。

1.2.2 构建 ILF3 过表达慢病毒表达载体

载体 pLJM1-EGFP 和质粒 pcDNA3.1(+)-FLAG-ILF3 具有相同的酶切位点, 用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Eco*R I 进行双酶切 2 h, T4DNA 连接酶链接过夜。连接产物转化感受态细胞 *E. coli* TOP10, 涂布与含氨苄(100 μ g/mL)的 LB 平板上培养 12 h 后挑取单克隆进行菌落 PCR 鉴定, 阳性克隆抽提质粒并用 *Nhe* I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定。鉴定为阳性的克隆送上海桑尼公司测序, 测序引物为 T7 promoter 通用引物。测序正确的载体用于转染细胞。

1.2.3 细胞培养

293T 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养, 培养条件为 37℃, 5% CO₂ 的培养箱。密度达 80% 时传代, 加入 1 mL 浓度为 0.25% 的胰酶溶液, 消化 10 s, 吸出胰酶, 轻轻敲打培养皿底部, 取适量新鲜培养基, 反复轻轻吹打细胞, 使细胞分散成单个细胞, 向新的培养皿中加入适量消化好的细胞, 在加入 10 mL DMEM 培养基, 细胞分布均匀, 放入恒温培养箱中培养。

MCF-7 细胞用含 15% 胎牛血清的 MEM 培养基培养。传代时加入 1 mL 浓度为 0.5% 的胰酶溶液, 消化 40 s, 吸出胰酶, 轻轻敲打培养皿底部, 取适量新鲜培养基, 反复轻轻吹打细胞, 使细胞分散成单个细胞, 再向新的培养皿中加入适量消化好的细胞, 加入 10 mL MEM 培养基, 细胞分布均匀。

1.2.4 慢病毒载体的包装与侵染

293T 细胞铺满 80% 时, 将细胞消化接种至 10 cm 细胞培养皿中培养 24 h, 保证转染时细胞能够铺满 30%~40%。转染当天将细胞培养基换为无血清培养基培养 2 h。取 19.1 μ g 质粒(10 μ g pLJM1、5.5 μ g PSPA2、3.6 μ g PMD2. G)共转染 293T 细胞, 培养 48 h 后, 收集上清培养基至 15 mL 离心管中, 冻于一80℃。将病毒取出融化, 离心后收集上清。MCF-7 细胞长到 30% 时, 加入离心后的病毒, 侵染细胞, 次日再次侵染。之后换成含有 1 μ g/mL 嘌呤霉素、体积 15% 的 FBS 的 MEM 培养基, 筛选稳定转染的细胞。

1.2.5 Western blot 检测 MCF-7 细胞中 ILF3 的蛋白表达

收集对数生长期的细胞, 用 300 μ L 细胞裂解液(10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP40, 1 mM DTT, pH 8.0)收集细胞, 12 000 r/min, 4℃ 离心 10 min, 取上清, Bradford 法测蛋白浓度。取 50 μ g 蛋白进行 12% SDS-PAGE 电泳, 并通过 Western blot 检测 ILF3 过表达效果及 ER β 蛋白量的变化, 以 β -actin 作为内参。

1.2.6 MTT 实验检测细胞增殖能力

将 pLKO.1-ILF3-shRNA、pCMV-dR8.2、pCMV-VSVG 三种质粒共同转染 293T 细胞, 病毒包装, 浓缩后侵染 MCF-7 细胞, 利用嘌呤霉素筛选稳定株。低表达的 RNA 干扰组(pLKO.1-ILF3-shRNA), 阴性对照组(pLKO.1-scramble)的 MCF-7 稳定株细胞用胰酶消化后计数。以每孔 2×10^4 个细胞接种于 5 块 96 孔板中, 每孔加 200 μ L 培养基, 置于 37℃ 的 CO₂ 培养箱中培养; 分别在培养 24、48、72、96、120 h 后取出一块 96 孔板, 每孔加入 10 μ L MTT 溶液(5 mg/mL), 继续培养 4 h; 吸掉孔内培养基, 每孔加入 150 μ L DMSO, 低速摇床振荡 10 min, 使紫色针状结晶充分溶解; 在酶标仪上测定各孔吸光值, 吸光波长为 570 nm。

2 实验结果

2.1 EMSA 实验验证 ILF3 与 ER β mRNA 3'UTR 的结合

体外转录的 RNA 与 FLAG-ILF3 蛋白复合物结合后, 迁移速度变慢, 有明显的拖尾现象, 如图 1 所示, ILF3 能与 ER β mRNA 3'UTR 结合。



图 1 EMSA 实验验证 ILF3 蛋白与 ER β mRNA 3'UTR 的结合

注:泳道 1 为 ER β mRNA 3'UTR;泳道 2 为 ER β mRNA 3'UTR+FLAG-ILF3 蛋白

2.2 ILF3 过表达载体的构建

用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Eco*R I 双酶切载体 pLJM1-EGFP 和 pcDNA3.1(+)-FLAG-ILF3 质粒,酶切后回收的条带与预期大小相符。产物连接,转化后挑选单克隆进行菌落 PCR,1%琼脂糖凝胶电泳结果显示如图 2,其中泳道 5,13,14,15,17 条带较亮,且大小与预期一致,为阳性克隆,挑选泳道 5 和泳道 13 的克隆测序,测序结果显示 2 个克隆均为目的克隆,选取 13 号克隆进行大量抽提质粒,用于转染 293T 细胞,包装病毒。

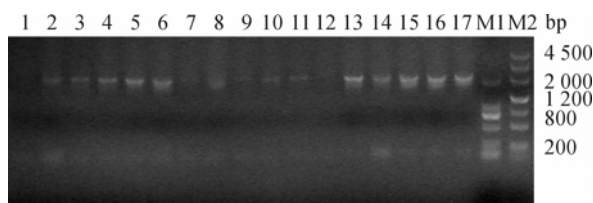


图 2 ILF3 过表达载体 pLJM1-FLAG-ILF3 的构建

注:图 2 重组载体菌落 PCR 凝胶电泳图,泳道 1~17 为挑选的单克隆,泳道 M1,M2 均为 marker

2.3 pLJM1-FLAG-ILF3 的表达与鉴定

将测序正确的 pLJM1-FLAG-ILF3 重组质粒、PSPA2、PMD2. G 三质粒共同转染 293T 细胞,包装病毒后,侵染 MCF-7 细胞。利用嘌呤霉素筛选稳定株,以转染 pLJM1-EGFP 载体的 MCF-7 细胞作为对照。用兔抗人 ILF3 抗体进行 Western blot 验证,结果显示转染了 pLJM1-FLAG-ILF3 载体的 MCF-7 细胞中 ILF3 的表达含量比转染 pLJM1-EGFP 载体的 MCF-7 细胞 ILF3 蛋白含量高,ILF3 过表达载体构建成功,如图 3 所示。随着 ILF3 蛋白过量表达,ER β 蛋白量相应的增加,而 ER α 蛋白含量没有明显的变化。实验表明 ILF3 蛋白对 ER β 起调控作用。

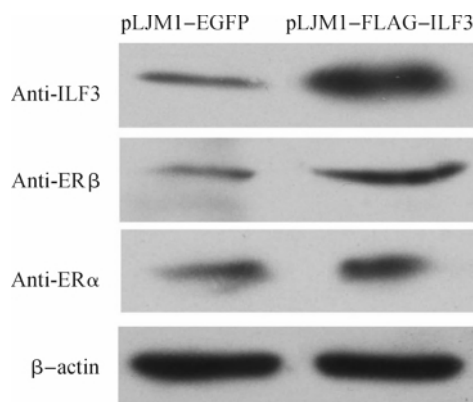


图 3 Western Blot 检测 ILF3 过表达及 ER β ,ER α 蛋白的变化

注:pLJM1-EGFP 为稳定转染了 pLJM1-EGFP 质粒的 MCF-7 细胞裂解液;pLJM1-FLAG-ILF3 为稳定转染了 pLJM1-FLAG-ILF3 表达载体的 MCF-7 细胞裂解液

2.4 pLKO.1-ILF3-shRNA 干扰 ILF3 低表达的鉴定

将 pLKO.1-ILF3-shRNA、pCMV-dR8.2、pCMV-VSVG 三种质粒共同转染 293T 细胞,病毒包装,浓缩后侵染 MCF-7 细胞。利用嘌呤霉素筛选稳定株,pLKO.1-scramble 作为对照,经 Western blot 鉴定两个质粒的干扰效果,如图 4 所示,两个干扰质粒都能较好抑制 ILF3 的表达,可用于后续的 MTT 实验。

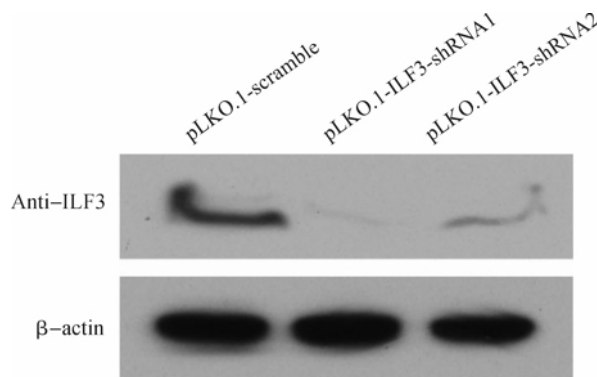
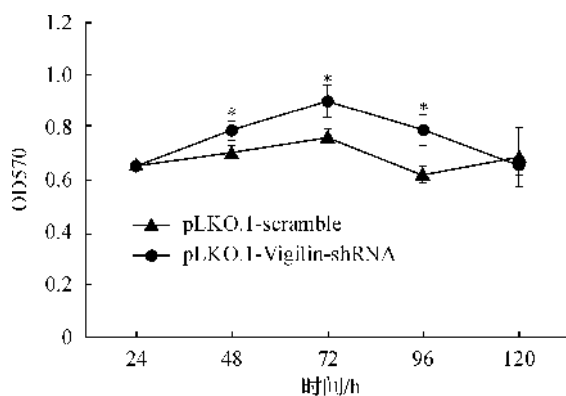


图 4 Western Blot 检测 RNA 干扰 ILF3 的表达效果

注:pLKO.1-scramble 为稳定转染了随机干扰序列质粒的 MCF-7 细胞裂解液;pLKO.1-ILF3-shRNA1 和 pLKO.1-ILF3-shRNA2 为稳定转染了 ILF3 蛋白干扰质粒的 MCF-7 细胞裂解液

2.5 MTT 实验研究 ILF3 蛋白对 MCF-7 细胞增殖能力的影响

利用 MTT 法分析 ILF3 蛋白被干扰时对 MCF-7 细胞增殖能力的影响。结果如图 5 所示,当 ILF3 蛋白表达量下降时,MCF-7 细胞的增值能力增强。



* $p < 0.05$, 与 pLKO.1-scramble 比较

图5 MTT 检测 ILF3 蛋白低表达后对 MCF-7 细胞的增殖能力的影响

3 讨论

病毒载体将表达基因插入到基因组 DNA 中,相对于瞬时转染的细胞,稳定转染的细胞可以在细胞内长时间存在并表达,不需要在每次实验时进行细胞转染,去除了转染试剂对细胞的影响,使细胞内的环境更接近生理水平。稳定转染的细胞作为实验对象比瞬时转染细胞更有优势。为了探讨 ILF3 蛋白对雌激素受体的作用,本实验构建了 pLJM1-FLAG-ILF3 过表达载体,转染 MCF-7 细胞后,利用嘌呤霉素筛选稳定株细胞。我们构建的稳定细胞株为后续的实验提供了实验材料。

ILF3 蛋白是 dsRNA 结合蛋白家族中的一员^[10]。本实验通过 FLAG 标签亲和纯化得到 ILF3 蛋白,体外转录 ER β mRNA 3'UTR 的基因片段,通过凝胶阻滞实验验证了 ILF3 能与 ER β mRNA 3'UTR 结合。并且在蛋白水平上,ILF3 蛋白能调控 ER β 的蛋白表达量,当 ILF3 表达量升高时,ER β 的表达也升高,但 ER α 的含量没有明显的变化,如图 3 所示。当 ILF3 蛋白被干扰时,ER β 的表达量明显下降,如图 4。MTT 实验表明 ILF3 稳定低表达的 MCF-7 的增殖能力比对照组的明显降低。文献报道 ER β 能抑制细胞增殖,可能是肿瘤抑制基因^[4]。ILF3 可能通过调控 ER β 的表达而影响细胞的增殖能力。

参考文献:

- [1] Couse J F, Korach K S. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? [J]. *Endocr Rev*, 1999, 20(3): 358-417.
- [2] Koehler K F, Helguero L A, Haldosen L A, et al. Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta[J]. *Endocr Rev*, 2005, 26(3): 465-478.
- [3] Paech K, Webb P, Kuiper G G, et al. Differential ligand activation of estrogen receptors α and β at ap1 sites[J]. *Science*, 1997, 277(5331): 1508-1510.
- [4] Strom A, Hartman J, Foster J S, et al. Estrogen receptor beta inhibits 17 β -estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line t47d[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(6): 1566-1571.
- [5] Ho S M, Leung Y K, Chung I. Estrogens and antiestrogens as etiological factors and therapeutics for prostate cancer[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1089: 177-193.
- [6] Imamov O, Morani A, Shim G J, et al. Estrogen receptor beta regulates epithelial cellular differentiation in the mouse ventral prostate[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(25): 9375-9380.
- [7] Wada-Hiraike O, Imamov O, Hiraike H, et al. Role of estrogen receptor beta in colonic epithelium[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(8): 2959-2964.
- [8] Reichman T W, Parrott A M, Fierro-Monti I, et al. Selective regulation of gene expression by nuclear factor 110, a member of the nf90 family of double-stranded rna-binding proteins[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 332(1): 85-98.
- [9] Brownawell A M, Macara I G. Exportin-5, a novel karyopherin, mediates nuclear export of double-stranded rna binding proteins[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2002, 156(1): 53-64.
- [10] Buaas F W, Lee K, Edelhoff S, et al. Cloning and characterization of the mouse interleukin enhancer binding factor 3(ilf3) homolog in a screen for rna binding proteins[J]. *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, 1999, 10(5): 451-456.

(下转第 900 页)

Separation and Identification of Endophytic Bacteria in *Dendrobium Officinale* and Analysis on Enzyme Activity

YU Jie, ZHOU Xiao-feng, HU Xiu-fang

(School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: 52 strains of endophytic bacteria are obtained by separation from *dendrobium officinale* tissue, among which 42 are separated from the root and 10 are separated from the stem. Four strains respectively numbered as FHGXJ7, FHGXJ15-1, FHJXJ3 and FHJXJ5 have rapid growth and large and many bacterial colonies in NA culture medium and are dominant population. The result of identification of dominant strains and enzyme activity test shows that four strains are respectively an unknown species of genus bacillus, bacillus thuringiensis, achromobacter xylosoxidans and bacillus amyloliquefaciens, which have different degrees of activity of protease, amylase, lecithinase and nitrogenase activity.

Key words: *dendrobium officinale*; endophytic bacteria; separation; identify; enzyme activity

(责任编辑: 许惠儿)

(上接第 890 页)

Research on Regulation of Estrogen Receptor Beta by ILF3 Protein

HUANG Yun-xian, ZHANG Feng-qun, JIA Jun-xiang, DING Ming, ZHAO Fu-kun

(School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: The physiological effect of estrogen in vivo is regulated through the mediation of estrogen receptors ER β and ER α . ER β has regulating effect in the occurrence and development process of breast cancer, prostatic cancer, colon cancer and ovarian cancer. ILF3 is a member of RNA binding protein and participates in cell cycle regulation. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) proves that ILF3 protein can bond with ER β mRNA 3'UTR. Estrogen receptor can mediate estrogen receptor to realize its function and ILF3 protein might participate in the regulation of signal channel of estrogen receptor through binding with ER β . To discuss their relationship and regulatory mechanism, this paper establishes lentiviral vector of ILF3 overexpression and detects the expression of ER β protein through western blot. In terms of protein level, the expression quantity of ER β protein increases with the increase of ILF3 protein quantity and ILF3 has positive regulation effect on ER β . MTT experiment detects that ILF3 gene expression has influence on MCF-7 cell viability.

Key words: ILF3; ER β ; regulation of expression; MTT

(责任编辑: 许惠儿)