

RNA 结合蛋白 Vigilin 在翻译水平上对雌激素受体 ER-beta 的调控研究

贾军祥, 张风群, 黄云仙, 丁 明, 赵辅昆

(浙江理工大学生命科学学院 蛋白质组学与分子酶学研究室, 杭州 310018)

摘 要: Vigilin 是一个由 14 个连续的 KH 结构域组成的 RNA 结合蛋白。它可以通过与 mRNA 结合调控 mRNA 的翻译后表达水平, 并能够结合脂蛋白。本实验室此前的实验中发现 Vigilin 参与了对雌激素信号传导通路的调控, 为详细研究其调控机制, 文章通过凝胶阻滞实验证明了 Vigilin 能在体外结合于雌激素受体 3' 非翻译区 (ER-beta 3' UTR)。借助双荧光素酶报告基因实验发现, 高表达 Vigilin 可以提高雌激素信号通路中的重要受体 ER-beta 的翻译效率。利用激光共聚焦显微镜和荧光蛋白定位实验, 发现 Vigilin 在细胞内大量定位于 p-body 中。通过上述实验证明了 Vigilin 能够通过结合 ER-beta 3' UTR 调控 ER-beta 的表达量, 参与了细胞内雌激素信号传导通路。由于 ER-beta 是雌激素信号传导中非常重要的受体, 因此该研究具有重要的意义。

关键词: RNA 结合蛋白; 雌激素受体; 翻译水平调控; 高密度脂蛋白结合蛋白; 信号通路

中图分类号: Q291 **文献标识码:** A

0 引 言

Vigilin 是一个高度保守的由 KH 结构域构成的多功能蛋白, 广泛存在于从单细胞的酵母到高等哺乳动物多种真核生物中。最先在高密度脂蛋白复合物中被发现^[1-2], 因此也叫高密度脂蛋白结合蛋白 (high density lipoprotein binding protein, HDLBP)。Vigilin 的功能包括参与胆固醇的代谢、脂类的转运和代谢^[3-4]、细胞染色体的分裂^[5], tRNA 的转运^[6-7], mRNA 的稳定^[8-9] 以及调控某些蛋白质的表达^[10-11]。KH 结构域是核酸识别和结合结构域, 能够特异结合 RNA 和单链 DNA, 参与细胞内转录, 翻译过程的调控, 与多种疾病的发生相关^[9]。比如副肿瘤综合征和脆性 X 综合征都是由于含 KH 结构域的基因缺失造成的^[12]。文献^[9]报道 Vigilin 与原癌基因 c-fms 3' UTR 结合并影响其 mRNA 的稳定性和翻译效率。在非洲爪蟾中, Vigilin 与卵黄原蛋白 mRNA 3' UTR 特异结合造成其半衰期的延长^[8]。对于卵黄原蛋白 mRNA, Vigilin 通过结合其

3' UTR, 屏蔽核酸内切酶位点稳定卵黄原蛋白 mRNA, 延长其半衰期, 进而提高卵黄原蛋白表达量。

本实验室前期通过亲和纯化和质谱分析的研究发现, Vigilin 可以与 ER-beta 的 mRNA 3' UTR 特异结合, ER-beta 的表达已被证明与多种癌症的发生、恶化以及存活率有密切关系^[10-13]。因此, 深入研究 Vigilin 与 ER-beta mRNA 3' UTR 的结合对 ER-beta 会有怎样的调控, 不但在细胞内的信号传导领域具有重要的意义, 也能够为阐明肿瘤发生和发展的机制提供重要的线索和证据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

293T, HeLa 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心; 限制性内切酶 *Hind*III, *Sma*I, *Eco*RI, *Bam*HI 和 T4 ligase 购自 Takara 公司; 反转录试剂盒购自 Toyobo 公司; DAPI 试剂购自南京凯基生物技术有限公司; Trizol 试剂, DMEM, MEM 培养基购自 Invitrogen; 3X FLAG

Peptide F4799, Anti-Flag M2 Affinity Gel 购自 Sigma-aldrich 公司。激光共聚焦显微镜是尼康公司产品。

1.2 载体构建

以 Trizol 试剂提取 MCF-7 细胞总 RNA,进行逆转录反应后得到的 cDNA 为模板,扩增 Vigilin 和 dcp1 片段,经琼脂糖凝胶电泳回收扩增产物及限制性酶切后,分别与 pcDNA3. 1(+)-dsRED-C1、及 EGFP-C1 质粒连接。得到 pcDNA3. 1-Flag-Vigilin、dsRED-C1-Vigilin 和 EGFP-C1-dcp1。所用 PCR 引物见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	序列
Flag-vigilin5	AGGGCTAGCATGGATTACAAGGAT-
	GACGATGACAAGAGTTCCGTTG-
Flag-vigilin3	CAGTTTTGACCCAAG
	AGTGCATGCCAGCTTGGGTCTC-
dcp1-1	CCTATAGTGAGTCG
	ATTGAATTCTATGGCAGCCGTGGCG-
dcp1-2	GCAG
	ATTGGATCCCCTTG TGCCGAGT-
	TCTAGAAGGACC

注:斜体为酶切位点序列。

1.3 细胞转染及双报告荧光素酶实验

将 MCF-7 细胞接种于六孔板,控制细胞接合度约在 10%,24 h 后,每孔加入 0.5 mL 无血清 MEM,放回培养箱,饥饿处理 4 h;每孔取 4 μ L PEI 试剂与 100 μ L 无血清 MEM 混匀,6 μ g 质粒与 100 μ L 无血清 MEM 混匀,静置 5 min,将两种混合液合并混匀,室温静置 20 min;将质粒转染试剂混合液逐滴均匀加入六孔板中并混匀;培养 7 h 后加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,培养 24 h,收集细胞。将裂解后的细胞 4℃,12 000 r/min 离心 10 min,取上清测定荧光素酶活力。

1.4 凝胶阻滞迁移(EMSA)实验

以构建的 pcDNA3. 1-Flag-vigilin 质粒转染 293T 细胞,转染 36 h 后收集细胞。用预冷的 PBS 洗细胞 2 次,每个 10 cm 培养皿加入 300 μ L 细胞裂解液,摇床上裂解细胞 30 min,用细胞刮将细胞收集到 1.5 mL EP 管中,针筒吹打 15 次,13 200 r/min,4℃,离心 30 min 除去 DNA 及细胞膜碎片,取上清。取 ANTI-FLAG M2 Agarose 亲和填料 100 μ L,在 1.5 mL EP 管中用 500 μ L TBS 缓冲液清洗,4 次,离心,去尽上清。将细胞裂解液上清加入到 ANTI-FLAG M2 Agarose 亲和填料中,置于

摇床上 4℃,50 r/min,结合过夜;离心,去尽上清;TBS 缓冲液洗涤 5 次,离心,去尽上清。加入 100 μ L 3XFlag 洗脱缓冲液,冰上孵育 20 min,离心取上清,纯化得到带 Flag 标签的重组 Vigilin 蛋白。

以 pAdML-M3-ER-beta 3'UTR 质粒为模板,使用上游引物:5'-ACATATTGTCGTTAGAACGCGC-GTA -3';和下游引物:5'-TCTTTATAGTCCT-GTCGGGTTTCGC-3'进行 PCR,扩增含 T7 启动子以及 ER-beta 3'UTR 的 DNA 片段作为转录模板。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定,并割胶回收作为体外转录模板。T7 体外转录使用 Promega 公司体外转录试剂盒,反应条件参考说明书。将 ER-beta mRNA 3'UTR RNA、NTP、反应缓冲液及 T7 RNA polymerase 混合均匀后,37℃反应 4 h,沸水浴 2 min 灭活 T7 RNA polymerase。得到的 RNA 转录产物经 1%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定后置于-80℃备用。

取 T7 转录产物 5 μ L,蛋白纯化产物 10 μ L,混合后冰上孵育 10 min,上样至 1%琼脂糖凝胶电泳,在紫外凝胶成像仪下拍照观察蛋白结合后的 RNA 迁移状态改变。

1.5 激光共聚焦显微镜样品制备及激光共聚焦实验

取 1 cm 直径的圆形盖玻片,浓硫酸洗液中浸泡过夜,洗涤灭菌后以 1 mg/mL 多聚赖氨酸包片,晾干。将包被多聚赖氨酸的载玻片置于六孔板内,接种细胞 HeLa;细胞接种 24 h 后,进行共转染,换液 36 h 后,在荧光显微镜下观察转染效率,当细胞出现强的荧光信号后进行固定。用 PBS 将细胞洗 2 次,每次 5 min。六孔板中加入 500 μ L 4%多聚甲醛,室温孵育 10 min;用 PBS 将细胞洗 2 次,每次 5 min;双蒸水洗细胞 5 min;六孔板每个孔加入 500 μ L 稀释后的 DAPI,37℃孵育 15 min 后洗涤 2 遍,每次 5 min;在水中用针头将载玻片翘起,用尖头镊子取出,在滤纸上晾干后,取 8 μ L 甘油滴在载玻片上,将盖玻片倒扣在甘油上,用指甲油封住。在激光共聚焦扫描显微镜下观察拍照。

2 实验结果

2.1 带 Flag 标签的 Vigilin 高表达载体的构建
以 MCF-7 细胞的 cDNA 为模板,PCR 扩增得到 vigilin 片段(图 1,泳道 1),酶切 PCR 片段,T4 DNA 连接酶连接过夜,转化,涂布于固体 LB 培养基平板上筛选单克隆,挑取单克隆提取质粒,并鉴

定。图 1 泳道 2,3 为挑取的 pcDNA3. 1-Flag-vigilin 的不同单克隆质粒电泳图,2 号单克隆经通用引物 T7 promotor primer 测序鉴定序列正确。

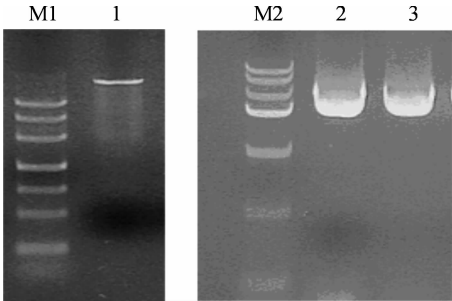


图 1 Flag-Vigilin 高表达载体的构建

泳道 M1. DL2000,DNA Ladder;泳道 M2. DL15000 DNA Ladder;
泳道 1,PCR 扩增产物条带;泳道 2,3. 阳性克隆质粒电泳条带

2. 1 Vigilin 结合 ER-beta mRNA3'UTR 的凝胶电泳迁移实验

基于蛋白质与 DNA 或者 RNA 结合后能够影响其在琼脂糖凝胶中的迁移速率的原理,采用凝胶迁移阻滞实验(EMSA)研究了 Vigilin 与体外合成的 ER-beta 3'UTR 的结合能力。将体外转录稀释后得到的 RNA 5 μ L 和 Flag 标签亲和纯化得到的 10 μ L Vigilin 蛋白混合,在冰上孵育 10 min,用非变性琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色后直接在凝胶成像仪下观察拍照,电泳图见图 2。可以发现 Vigilin 和 RNA 混合的泳道相对于对照 RNA 的泳道,出现了一条相对滞后的条带,因此说明 Vigilin 可以与 ER-beta mRNA 3'UTR 结合,并影响了其在琼脂糖凝胶中的迁移速率。

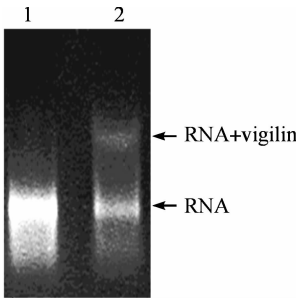


图 2 Vigilin 与 ER-beta mRNA3'UTR 结合后的凝胶迁移阻滞实验

泳道 1. RNA 对照;2. RNA 和 Vigilin 蛋白结合后发生了迁移阻滞现象

2. 3 双荧光素酶报告基因表明 Vigilin 与 UTR 的结合能够提高蛋白质的表达

双报告荧光素酶实验能够更精确地证明细胞内蛋白质对转录的调控^[2],为研究 Vigilin 在细胞内对 ER-beta mRNA3'UTR 翻译效率的影响,笔者重新

构建了一个荧光素酶报告基因质粒,将 ER-beta mRNA3'UTR 插入了 luciferase 的 3' 端,并连接到 pcDNA3. 1 载体后,得到一个 pcDNA3. 1-luciferase-FL 载体。将高表达 Vigilin 蛋白的 pcDNA3. 1-Flag-vigilin 质粒与 pcDNA3. 1-luciferase-FL 质粒共转染 293T 细胞后,检测荧光素酶活力。发现相对于对照组,Vigilin 高表达后,pcDNA3. 1-luciferase-FL 表达的荧光素酶活力升高了 30%($P<0.05$)。

2. 4 Vigilin 在细胞内的共定位

将重组载体 EGFP-C1-Vigilin 与重组载体 dsRED-Dcp1 共转染 Hela 细胞,转染后 36 h 将载玻片取出,DAPI 染色,固定后经激光共聚焦扫描显微镜观察样品,在激光共聚焦扫描显微镜下观察拍照,见图 3。图 3 可见带红色荧光蛋白标签的 Vigilin 和绿色荧光蛋白标签的 Dcp1 经叠加后显示出明显的黄色分布,说明 Vigilin 与 Dcp1 存在共定位现象。由于 Dcp1 被认为是 p-body 的标志蛋白^[14],而 p-body 又是细胞内重要的 mRNA 存储器,Vigilin 与 Dcp1 这种共定位说明 Vigilin 在细胞内可能参与了 p-body 相关的 mRNA 存储过程。

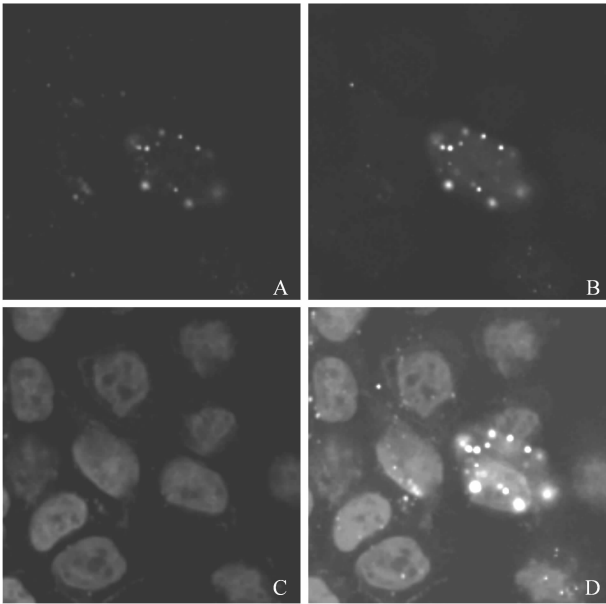


图 3 Vigilin 在细胞内的定位(激光共聚焦显微镜在不同波长下的荧光照片及重叠后结果)

注:A. RFP-Vigilin;B. GFP-Dcp1;C. DAPI 染细胞核;D. 重叠

3 讨论

Vigilin 作为一个 RNA 结合蛋白^[6],具有 14 个连续的高度保守的 RNA 结合区^[1-2],其目前已知的有关 RNA 的功能包括参与 tRNA 细胞核内和细胞质内的复合物形成^[7],以及 Vigilin 与卵黄原蛋白和

c-fms 的 mRNA 3'UTR 结合并调控被结合的 mRNA 的半衰期^[8-9],进而调控相应蛋白的表达量。笔者通过 EMSA 实验和双荧光素酶报告基因实验证明了 Vigilin 与 ER-beta 3'UTR 结合并能够提高 ER-beta 的表达量。在乳腺癌肿 ER-beta 通常被认为能够拮抗 ER-alpha 的功能,因此 Vigilin 很有可能通过调控 ER-beta 的翻译效率从而平衡雌激素信号通路。Vigilin 作为 RNA 结合蛋白却没有 RNA 结合保守序列^[11],说明 Vigilin 可能结合于多种 mRNA 的 3' 非翻译区,调控着大量蛋白质的表达。Vigilin 表达量与多种蛋白的表达量相关等证据也说明 Vigilin 可能参与到了多种其它蛋白的翻译调控中^[5],本文中的共定位实验指出 Vigilin 与 p-body 的标志蛋白 Dcp1 有共定位,提供了一个 Vigilin 调控 mRNA 翻译效率的一个可能的途径,为进一步研究 Vigilin 的功能提供了重要基础。

参考文献:

- [1] Graham D L, Oram J F. Identification and characterization of a high density lipoprotein-binding protein in cell membranes by ligand blotting [J]. J Biol Chem, 1987, 262(16): 7439-7442.
- [2] Koller E, Koller F, Binder B R. Purification and identification of the lipoprotein-binding proteins from human blood platelet membrane [J]. Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(21): 12412-12418.
- [3] Martin L J, Connelly P W, Nanchoo D, et al. Cholesterol ester transfer protein and high density lipoprotein responses to cholesterol feeding in men: relationship to apolipoprotein E genotype [J]. Journal of Lipid Research, 1993, 34(3): 437-446.
- [4] Hilgendorf I, Gellersen O, Emmrich J, et al. Estradiol has a direct impact on the exocrine pancreas as demonstrated by enzyme and vigilin expression [J]. Pancreatology, 2001, 1(1): 24-29.
- [5] Cortés A, Huertas D, Fanti L, et al. DDP1, a single-stranded nucleic acid-binding protein of Drosophila, associates with pericentric heterochromatin and is func-

- tionally homologous to the yeast Scp160p, which is involved in the control of cell ploidy [J]. The EMBO Journal, 1999, 18(13): 3820-3833.
- [6] Kruse C, Grunweller A, Notbohm H, et al. Evidence for a novel cytoplasmic tRNA-protein complex containing the KH-multidomain protein vigilin [J]. Biochem J, 1996, 320 (Pt 1): 247-252.
- [7] Kruse C, Grunweller A, Willkomm D K, et al. tRNA is entrapped in similar, but distinct, nuclear and cytoplasmic ribonucleoprotein complexes, both of which contain vigilin and elongation factor 1 alpha [J]. Biochem J, 1998, 329 (Pt 3): 615-621.
- [8] Cunningham K S, Dodson R E, Nagel M A, et al. Vigilin binding selectively inhibits cleavage of the vitellogenin mRNA 3'-untranslated region by the mRNA endonuclease polysomal ribonuclease 1 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(23): 12498-12502.
- [9] Woo H H, Yi X, Lamb T, et al. Post-transcriptional suppression of proto-oncogene c-fms expression by Vigilin in breast cancer [J]. Molecular and Cellular Biology, 2011, 31(1): 215-225.
- [10] Kruse C, Emmrich J G, Rumpel E, et al. Production of trypsin by cells of the exocrine pancreas is paralleled by the expression of the KH protein Vigilin [J]. Experimental Cell Research, 1998, 239(1): 111-118.
- [11] Yates K E, Mizuno S, Glowacki J. Early shifts in gene expression during chondroinduction of human dermal fibroblasts [J]. Experimental Cell Research, 2001, 265(2): 203-211.
- [12] Valverde R, Edwards L, Regan L. Structure and function of KH domains [J]. FEBS J, 2008, 275 (11): 2712-2726.
- [13] Roger P, Sahla M E, Mäkelä S, et al. Decreased expression of estrogen receptor β protein in proliferative preinvasive mammary tumors [J]. Cancer Research, 2001, 61(6): 2537-2541.
- [14] Aizer A, Brody Y, Ler LW, et al. The dynamics of mammalian P body transport, assembly, and disassembly in vivo [J]. Mol Biol Cell, 2008, 19(10): 4154-4166.

(下转第 892 页)

New Problems and Countermeasures in Intellectual Property
Protection and Management in Universities

YANG Xiao-gang¹, WANG Shi-feng²

- (1. Department of Science and Technology, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;
- 2. Scientific Research Management Office, Zhejiang Science and Technology Information Research Institute, Hangzhou 310013, China)

Abstract: On the basis of understanding the new problems in intellectual property rights (IPR) protection and management encountered by colleges in the current information technology environment, this paper focuses on the three key nodes of IPR in universities, and analyzes the current status of intellectual property protection. Then, it discusses the problems faced by universities in intellectual property protection and management. This paper provides certain measures related to IPR from the legal, technical, and management perspectives.

Key words: university; intellectual property protection; intellectual property management; research work; digital libraries; patent protection

(责任编辑: 马春晓)

(上接第 882 页)

Translational Level Regulation of RNA-Binding
Protein Vigilin to ER-beta

JIA Jun-xiang, ZHANG Feng-qun, HUANG Yun-xian, DING Ming, ZHAO Fu-kun
(Proteomics and Molecular Biology Laboratory, School of Life Sciences,
Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Vigilin is known as an RNA-binding protein with a 14-repeat KH RNA-binding domain. It can bind mRNA 3' UTR and regulate the translation. It can also bind high-density lipid proteins. Vigilin has been found to have a key function in the estrogen signal pathway. Through the EMSA experiment, Vigilin is proved to have the ability to bind to ER-beta 3' UTR. Using the dual reporter luciferase assay, we discover that it also upregulates the level of ER-beta. The GFP-and RFP-tagged fusion proteins are used to co-localize Vigilin with mRNA-decapping enzyme 1 (Dcp1), which is a marker protein of p-body. During the co-localization of Vigilin and Dcp1, we find that Vigilin has a key function in localizing the mRNA to the p-body. Given that ER-beta is a significant receptor in the estrogen signal pathway, this study is considered to have major research value.

Key words: RNA-binding protein; estrogen receptor; translational regulation; high-density lipid protein; signal pathway

(责任编辑: 许惠儿)