

人源核不均一核糖核蛋白E1真核表达载体在神经细胞中的表达

霍丽蓉¹, 王兰英², 邹俊华³, 钟南⁴ (¹首都医科大学附属复兴医院, 北京市 100038; ²首都医科大学教育部神经变性病重点实验室, 北京市 100069; ³北京大学医学部医学遗传系, 北京市 100191; ⁴New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, Staten Island, NY 10314, USA)

文章亮点:

1 课题组经大量研究提出假设“PCBP1对帕金森病模型可能具有保护作用”,并申请国家自然科学基金的支持,该篇论著是此项目前期部分工作总结,还有许多后续研究结果会陆续发表,为构建帕金森病的细胞模型提供了实验依据。在总结相关研究的基础上,目前正在进行相应专利的申请。

2 本实验成功构建了核不均一核糖核蛋白E1的真核表达载体,mRNA和蛋白水平上均证实了该质粒可在神经细胞SH-SY5Y中正确表达,SH-SY5Y细胞在转染核不均一核糖核蛋白E1后表现为加速生长,提示该蛋白对神经细胞的生长发育具有重要的作用。

关键词:

组织构建; 组织工程; 核不均一核糖核蛋白E1; 表达载体; 神经细胞; 国家自然科学基金

主题词:

核糖核蛋白类, 核不均一; 神经元; 转染

基金资助:

国家自然科学基金(31200811); 北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划“学科骨干”(2013-3-096)

摘要

背景: 人源核不均一核糖核蛋白E1功能广泛,可参与神经系统骨架蛋白的表达。

目的: 为深入研究其在神经细胞中的作用,构建其真核表达载体,观察其在神经细胞中的表达。

方法: 利用真核表达载体pcDNATM4/His C,通过亚克隆构建核不均一核糖核蛋白E1-pcDNATM4/His C重组质粒,经酶切、测序鉴定,通过转染神经细胞SH-SY5Y,采用western-blot,RT-PCR鉴定核不均一核糖核蛋白E1重组质粒的表达,并观察转染细胞的生长现象。

结果与结论: 成功构建了核不均一核糖核蛋白E1的真核表达载体,mRNA和蛋白水平上均证实了该质粒可在神经细胞SH-SY5Y中正确表达。SH-SY5Y细胞在转染核不均一核糖核蛋白E1后表现为加速生长。提示该蛋白对神经细胞的生长发育具有重要的作用。该载体为进一步研究核不均一核糖核蛋白E1在神经系统中的功能提供了前提条件。

霍丽蓉, 王兰英, 邹俊华, 钟南. 人源核不均一核糖核蛋白E1真核表达载体在神经细胞中的表达[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(42):6769-6774.

Expression of recombinant plasmid of homo heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1 in SH-SY5Y cells

Huo Li-rong¹, Wang Lan-ying², Zou Jun-hua³, Zhong Nan⁴ (¹Department of Neurology, Fu Xing Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China; ²Key Laboratory for Neurodegenerative Disorders of the Ministry of Education, Capital Medical University, Beijing 100069, China; ³Department of Genetics, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China; ⁴New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities (IBR), Staten Island, NY 10314, USA)

Abstract

BACKGROUND: The functions of homo heterogeneous ribonucleoprotein E1 are very wide. It can participate in the expression of skeleton proteins in the nervous system.

OBJECTIVE: To construct the recombinant plasmid of homo heterogeneous ribonucleoprotein E1 and observe its expression in nerve cells for further studying the functions of it in neurocytes.

METHODS: Using pcDNATM4/His C, the homo heterogeneous ribonucleoprotein E1 was subcloned into recombinant plasmid E1-pcDNATM4/His C, followed by enzyming and sequencing. After SH-SY5Y cells were transfected with the recombinant plasmid, western blot analysis and real time RT-PCR were used to detect the expression of homo heterogeneous ribonucleoprotein E1 in SH-SY5Y cells. And the growth of SH-SY5Y cells was observed.

RESULTS AND CONCLUSION: We successfully constructed the eukaryotic expressed vector of homo heterogeneous ribonucleoprotein E1. The recombinant plasmids were verified to express in SH-SY5Y cells correctly at mRNA and protein levels. And SH-SY5Y cells generated quickly after homo heterogeneous ribonucleoprotein E1 was over-expressed. The homo heterogeneous ribonucleoprotein E1 is an important protein in neural development. And this vector offers the premise for further studying its function in nervous system.

霍丽蓉, 女, 1973年生, 山西省定襄县人, 汉族, 2007年北京大学医学部毕业, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事神经系统疾病的发病机制与治疗机制研究。

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.42.009
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2014)42-06769-06
稿件接受:2014-07-30

Huo Li-rong, M.D., Associate professor, Master's supervisor, Department of Neurology, Fu Xing Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China

Accepted: 2014-07-30

Subject headings: ribonucleoprotein, heterogeneous; neurons; transfection

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 31200811; the "215" Talents Projects in Health System of Beijing, No. 2013-3-096

Huo LR, Wang LY, Zou JH, Zhong N. Expression of recombinant plasmid of homo heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1 in SH-SY5Y cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(42):6769-6774.

0 引言 Introduction

核不均一核糖核蛋白E1也可称作poly(Rc)-结合蛋白1(poly(rC)-binding protein 1, PCBP1)或 α P1, 是核不均一核糖核蛋白家族的成员之一^[1-3]。核不均一核糖核蛋白(heterogeneous ribonucleoproteins, hnRNPs)家族成员在RNA代谢、功能、基因表达的转录后调控及前mRNA的加工和核输出过程中具有重要的功能^[4-5]。核不均一核糖核蛋白E1的相对分子质量为38 000-47 000, 但在不同组织中的相对分子质量还与其翻译后的修饰相关。它在哺乳动物体内的分布与人体内相似, 比如鼠的脑组织, 胎盘组织, 骨髓, 肝脏, 心脏, 肾脏和肺等^[6]。在细胞内的分布也随细胞来源的不同而有一定的差异^[7-8]。在对成纤维细胞的研究中发现, 核不均一核糖核蛋白E1主要分布于核内及核膜并与核纤层蛋白laminA/C在核膜上有共定位。但在对神经组织来源的细胞研究中发现, 不论是胎脑组织还是神经组织来源的细胞系中, 核不均一核糖核蛋白E1主要分布于核膜和细胞浆中, 提示该蛋白在不同的组织中, 其发挥功能的侧重点不同。

在红细胞成熟过程中, 核不均一核糖核蛋白E1和核不均一核糖核蛋白K控制网织红细胞15-酯氧合酶mRNA的稳定性及其翻译。网织红细胞15-酯氧合酶是红细胞分化的关键酶, 在网织红细胞成熟的最后阶段被激活表达并调控线粒体的降解^[9]。网织红细胞15-酯氧合酶 mRNA 3'非翻译区(n-translated region, 3'UTR)括一重复的CU-富集序列并且在它的3'-UTR可形成核不均一核糖核蛋白E1/K-分化控制元件(differentiation control element, DICE)合体。该复合体能够阻止80 S核糖体的形成并使相应mRNA的翻译沉默^[10]。核不均一核糖核蛋白E1等RNA结合蛋白及其相应的转录后调控在基因表达中有重要的作用^[11]。

起初, 核不均一核糖核蛋白E1被确定为一种RNA结合蛋白, 有3个KH功能域^[12], KH功能域是该蛋白与RNA CU-富集区连接的一个结构基础, 由65-70个氨基酸残基组成, 在核不均一核糖核蛋白E1中, 3个KH的排列方式为: 两个KH域位于N-末端附近并被一个可变长度的中央区把它们与C-末端的第三KH域分开。体外已确定核不均一核糖核蛋白E1的第一和第三KH域有poly(rC)结合活性且这种活性能够被磷酸化作用所抑制^[12]。核不均一核糖核蛋白E1的KH域是调节系统的组成成分, 该功能域可使核不均一核糖核蛋白E1参与蛋白与核酸或蛋白与蛋白之间的相互作用并由此而激活细胞内的一些信号转导事件。一直以来, 核不均一核糖核蛋白E1被描述为某些RNA转录和翻译的调节子^[13-16], 它通过KH域结合mRNA CU-富集区并且通过KH域参与mRNA的代谢

过程^[17]。另外, 近年发现核不均一核糖核蛋白E(包括E1和E2)在体内还可作为某些小分子的转运伴侣^[18-20]。这些环节受到影响均可能会改变细胞内的稳态环境, 引发相应疾病的发生^[21-23]。

为了探讨核不均一核糖核蛋白E1在神经细胞中的作用机制, 及其在神经系统疾病中的可能作用模式, 本实验首先构建其真核表达载体, 并且观察该表达载体在神经来源的细胞SH-SY5Y中的表达, 为进一步研究其功能提供条件。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 构建核不均一核糖核蛋白E1-pcDNATM4/His C重组质粒, 观察该表达载体在神经细胞中的表达及对神经细胞生长速度的影响。

时间及地点: 2012年3至5月间在首都医科大学教育部神经变性病重点实验室完成克隆构建、验证的部分工作; 2013年8至12月间在美国IBR实验室完成神经细胞内表达检测的部分工作。

材料:

人源核不均一核糖核蛋白E1真核表达载体在神经细胞中的表达所用试剂:

试剂	来源
SH-SY5Y细胞	美国标准生物制品收藏中心(ATCC, CRL-2266)
含核不均一核糖核蛋白E1序列的重组质粒	本室构建保存
质粒pcDNA TM 4/His C、TRIZOL试剂、脂质体lipofectamine TM 2000	Invitrogen公司
PCR 反应试剂及内切酶	TaKaRa公司
各种细胞培养基	Gibicol公司
抗体包括羊抗核不均一核糖核蛋白E1, 辣根过氧化物酶连接的猴抗羊, 鼠抗 β -actin、HRP连接的猴抗鼠	Santa Cruz公司
FITC标记的鼠抗羊IgG及核染料Hoechst 33258	Sigma公司
BCA分析试剂盒和Super Signal West Pico 化学发光底物	Pierce公司

实验方法:

重组质粒的表达和构建: 人源核不均一核糖核蛋白E1 cDNA的开放阅读框(ORF)(nt31-1101) (Genebank ID 460770)经克隆重组形成核不均一核糖核蛋白E1-pcDNATM4/His C表达载体。首先, 采用PCR扩增核不均一核糖核蛋白E1目的序列; 引物包含限制性的酶切位点

EcoR I, 便于插入pcDNATM4/His C载体。核不均一核糖核蛋白E1的ORF用下面的寡核苷酸引物来扩增: TTC TAG AAT TCA TGG ATG CCG GTG TGA CTG AAA GTG和TTC TAG AAT TCA ACC TAC ACT GTT CTA GCT GCA CC。PCR反应混合物包括2.5 μL 10×Pfu反应缓冲液, 2.0 μL 10 mmol/L dNTPs, 1.5 μL 25 mmol/L Mg²⁺, 0.5 μL引物(50 mg/L)混合物, 2.5 μL模板DNA, 0.25 μL Pfu聚合酶(2.5 U/μL), 加水补足到25 μL。PCR反应的程序为: 95 °C, 4 min; 之后行30个循环包括95 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 1 min; 最后72 °C再延伸5 min。多聚酶链反应片段产物用*EcoR* I消化并连接到pcDNATM4/His C载体上。阳性克隆通过酶切筛选, 琼脂糖凝胶电泳检测以及测序鉴定。

SH-SY5Y细胞培养和转染: 神经母细胞瘤细胞系SH-SY5Y细胞用含体积分数15% FBS, 1%青/链霉素, 10 mmol/L HEPES的RPMI 1640培养基37 °C, 体积分数5% CO₂常规培养, 隔天换液。转染前1 d, 将SH-SY5Y细胞按(3.5–4.0)×10⁶/瓶接种到T175培养瓶中, 在转染时, 细胞密度需达到70%–80%汇片, 并将细胞培养上清液更换为没有抗生素的培养基。取24 μg核不均一核糖核蛋白E1-pcDNATM4/His C质粒或pcDNATM4/His C与5 mL opti-MEM混匀, 同时将72 μL的脂质体与5 mL opti-MEM混匀, 室温孵育5 min后再分别将两种质粒混匀室温放置20 min。之后, 将混合物加入细胞培养基中, 轻轻晃动混匀。转染8 h后更换全培养基。

核不均一核糖核蛋白E1在SH-SY5Y细胞内的表达: 核不均一核糖核蛋白E1抗体用来检测该细胞内表达的相应蛋白, 共聚焦显微镜用来检测荧光的分布。首先需将构建好的重组质粒转染SH-SY5Y细胞。在转染前1 d, 将2.5×10⁵个SH-SY5Y细胞接种到放有灭菌小盖片的六孔培养板中, 转染当天, 将细胞培养媒介更换为无抗生素的培养基。按照前述转染方法取3 μg重组质粒转染SY5Y细胞, 转染48 h后, 将培养细胞上清去掉, 用32 g/L多聚甲醛/1×PBS室温固定15 min, 再用1×PBS洗净多余的固定液; 然后加入0.2% Triton X-100/1×PBS 37 °C, 15 min; 再用1×PBS和0.1% Triton X-100/1×PBS 交替洗2次, 5 min/次; 10%FBS/1×PBS室温封闭45 min; 杂交一抗(羊抗核不均一核糖核蛋白E1, 1:25稀释)4 °C过夜。第2天回收一抗后将细胞爬片用上述方法清洗, 之后杂交FITC标记的二抗(1:50稀释)37 °C, 45 min。同上述方法清洗爬片后加入2.5 mg/L Hoechst室温5–10 min染核(蓝色), 最后甘油封固上机检测。

Western blotting: 1:100稀释的羊抗-核不均一核糖核蛋白E1及1:2 000稀释的辣根过氧化物酶连接的二抗; 猴抗鼠用于检测核不均一核糖核蛋白E1蛋白的表达。48 h后收获相应的细胞, 先将培养上清倒掉, 再用冷的PBS洗涤, 之后用蛋白裂解液冰浴20 min, 15 000×g离

心10 min以去除不溶性物质。Western-blot采用标准的程序进行。最后按照化学发光底物说明书检测抗体-蛋白复合物。

反转录PCR: 质粒转染的程序如上所述。转染后40–48 h, 去掉培养基, 在培养瓶中加入TRIZOL试剂, 常规提取总RNA。反转录后按特定的引物进行PCR监测转染相应质粒后hnENP E1的mRNA的水平, 所用引物包括内参18 S上游引物5'-GGA AGG GCA CCA CCA GGA GT-3'和下游引物5'-TGC AGC CCC GGA CAT CTA AG-3'(300 bp); 核不均一核糖核蛋白E1上、下游引物采用核不均一核糖核蛋白E1全长ORF扩增来验证(同前)。

SH-SY5Y细胞的生长趋势检测: 设立对照组(空质粒)和重组质粒转染组(核不均一核糖核蛋白E1-pcDNATM4/His C), 统一初始细胞浓度1×10⁴个/孔(六孔培养板, 每组24孔), 每组每天计数3孔细胞数, 求平均值/10⁴作为比较终值。

主要观察指标: 核不均一核糖核蛋白E1重组表达载体的电泳及测序鉴定结果, 神经细胞中表达的图像、蛋白含量及mRNA含量分析, 转染核不均一核糖核蛋白E1表达载体后神经细胞的生长速度。

2 结果 Results

2.1 重组质粒核不均一核糖核蛋白E1-pcDNATM4/His C的构建 重组表达质粒核不均一核糖核蛋白E1-pcDNATM4/His C经*EcoR* I酶切后通过琼脂糖凝胶电泳及测序鉴定结果正确, 表明核不均一核糖核蛋白E1基因编码序列及插入酶切位点完全正确, 见图1A和1B。图1A第2泳道为重组质粒的酶切产物, 1 070 bp的条带为切出的目的基因的全长ORF。同时, 图1B中的测序结果也表明插入位点及序列的正确性(箭头所指为插入处)。

2.2 核不均一核糖核蛋白E1在神经细胞中的表达 用重组质粒及对照质粒转染SH-SY5Y细胞, 对细胞爬片转染48 h后经同样浓度的一抗及荧光抗体着染后共聚焦显色可见, 重组质粒转染后核不均一核糖核蛋白E1表达显著增强(图2)。对照及重组质粒转染48 h后提取的细胞蛋白经Western-blot检测结果见图3A和B。图3C为3次Western-blot灰度分析结果, 从图中可以明显的看出, 在两组总蛋白量一致的情况下, 转染重组质粒核不均一核糖核蛋白E1-pcDNATM4/His C的SH-SY5Y细胞中的核不均一核糖核蛋白E1蛋白表达显著增高($P < 0.001$)。

2.3 RT-PCR分析结果 转染核不均一核糖核蛋白E1-pcDNATM4/His C重组质粒和转染空质粒的SH-SY5Y细胞48 h后用RT-PCR分析检测核不均一核糖核蛋白E1的水平(图4A)。在取3次反转录产物通过PCR电泳条带灰度分析(图4B)比较后为同样结论: 重组质粒核不均一核糖核蛋白E1-pcDNATM4/His C转染组中核不均一核糖核蛋白E1的mRNA含量远高于对照质粒转染组($P < 0.001$)。

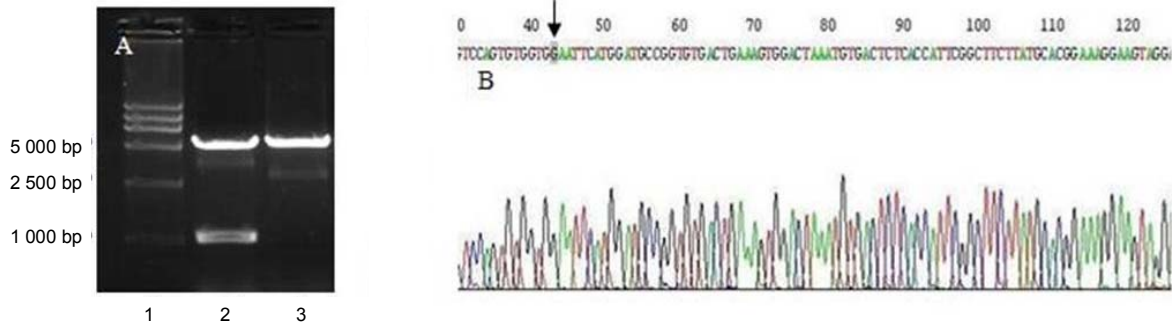


图1 琼脂糖凝胶电泳和测序分析重组表达质粒核不均一核糖核蛋白 E1-pcDNATM4/His C
 Figure 1 Agarose gel electrophoresis and sequencing assays of the recombination plasmid E1-pcDNATM4/His C
 图注: 1: Marker; 2: 重组质粒酶切产物; 3: 核不均一核糖核蛋白 E1-pcDNATM4/His C。图 A 为用琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性重组质粒; B 为阳性重组质粒的测序结果, 可见有阳性片段插入质粒的相应位点。

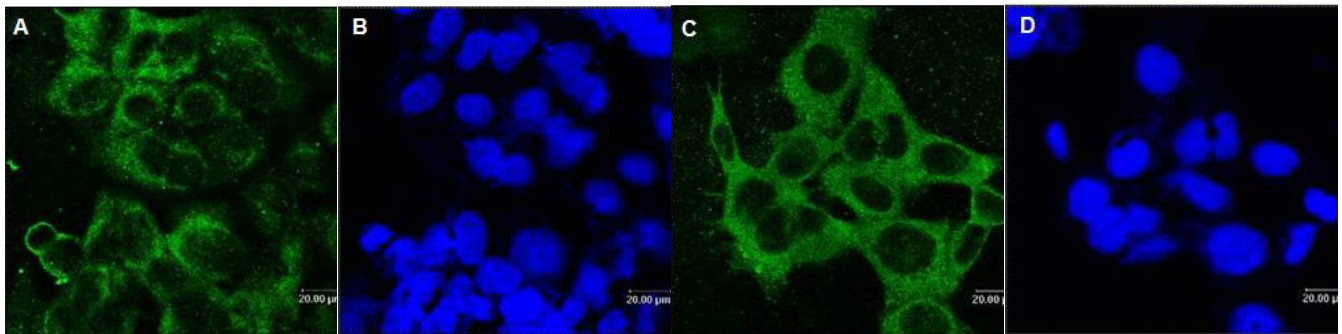


图2 免疫荧光共聚焦显微镜分析核不均一核糖核蛋白 E1 在 SH-SY5Y 细胞中的表达。
 Figure 2 Expression of homo heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1 in SH-SY5Y cells as detected by immunofluorescence staining and confocal microscopy
 图注: 图中 A 为对照质粒转染 SH-SY5Y 细胞后核不均一核糖核蛋白 E1 的表达; B 为与图 A 对应的细胞核着色; C 为重组质粒转染 SH-SY5Y 细胞后核不均一核糖核蛋白 E1 的表达(同样的激发光强); D 为与图 C 对应的细胞核着色。可见转染重组质粒 SH-SY5Y 细胞中的核不均一核糖核蛋白 E1 表达明显增高。

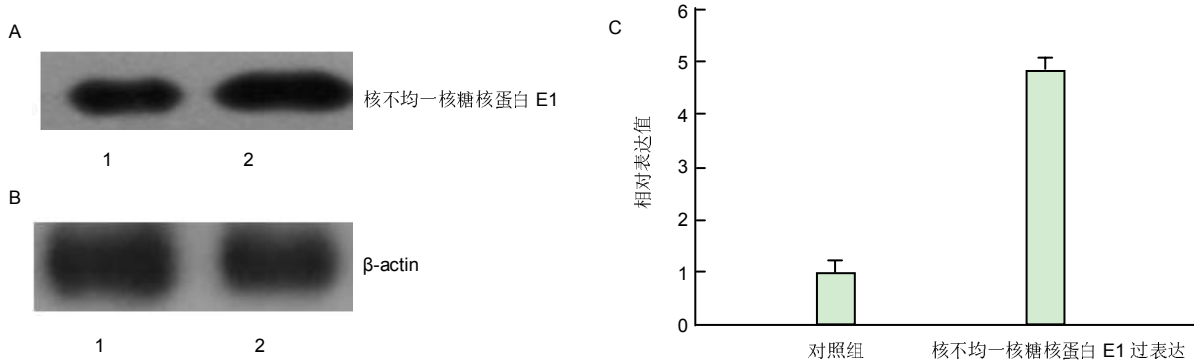


图3 Western blot 分析核不均一核糖核蛋白 E1 在 SH-SY5Y 细胞中的表达
 Figure 3 Expression of homo heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1 in SH-SY5Y cells as detected by western blot assay
 图注: 1: 对照组; 2: 核不均一核糖核蛋白 E1。图中 A 为核不均一核糖核蛋白 E1 的蛋白表达条带; B 为内参蛋白表达条带; C 为 3 次 Western-blot 灰度分析相对量。从蛋白表达的水平再次可见转染重组质粒的 SH-SY5Y 细胞中的核不均一核糖核蛋白 E1 表达显著增高。

2.4 SH-SY5Y细胞转染核不均一核糖核蛋白E1后的生长现象 如图5所示, 将核不均一核糖核蛋白E1重组质粒转染入SH-SY5Y细胞中时, 发现细胞加速生长, 常规铺板 1×10^4 个SH-SY5Y细胞/孔后(图5A1, B1), 到第6天会发现细胞汇片达到95%以上(图5A2), 计数细胞均值为铺板时的6.06倍, 而转染了核不均一核糖核蛋白E1重组质粒的SH-SY5Y细胞在第3天就达到了铺板时的6.8倍(图5B2)。实验组和对照组细胞生长情况图6。

3 讨论 Discussion

基因的真核表达载体是研究相应基因在真核细胞中功能的良好分子工具。Poly(C)-结合蛋白是细胞内一组多功能蛋白, 而且目前仍在不断发现其新的角色^[3, 14, 24]。目前认为, 核不均一核糖核蛋白E1不仅可与RNA结合, 还可与DNA结合并参与某些基因表达的各个水平的调控, 包括DNA复制、转录、前mRNAs加工, mRNAs运输及其稳定性和翻译控制, 在细胞内具有桥梁分子的角色^[25]。也就是说, 某种程

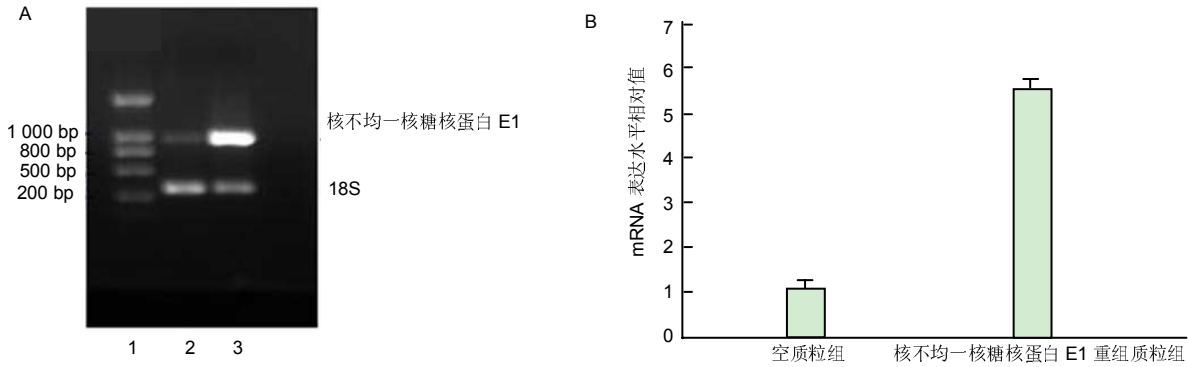


图 4 反转录 PCR 分析检测核不均一核糖核蛋白 E1 mRNA 水平

Figure 4 Homo heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1 mRNA levels identified by RT-PCR

图注: 1: Marker; 2: 空质粒组; 3: 核不均一核糖核蛋白 E1 重组质粒组。图中 A 为反转录-PCR 扩增后, 琼脂糖凝胶电泳观察两组核不均一核糖核蛋白 E1 mRNA 表达水平; B 为两组 mRNA 表达水平的灰度统计相对量。从 mRNA 水平再次可见转染重组质粒的 SH-SY5Y 细胞中的核不均一核糖核蛋白 E1 表达显著增高。

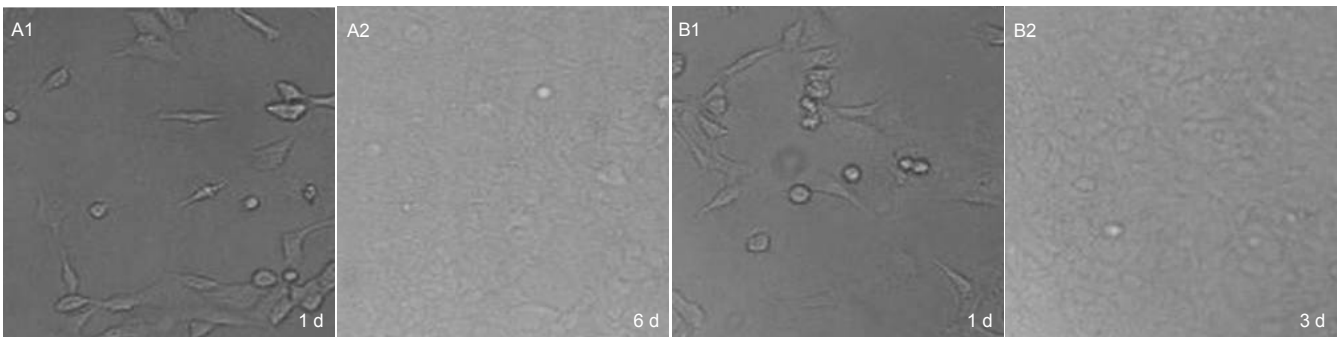


图 5 核不均一核糖核蛋白 E1 转染后促进细胞生长现象

Figure 5 The growth of SH-SY5Y cells transfected with homo heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1

图注: 图中 A 为对照组细胞生长状况; 图 B 转染重组质粒组细胞生长状况。

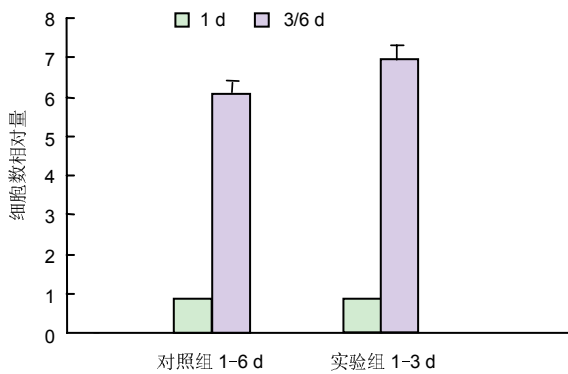


图 6 转染了核不均一核糖核蛋白 E1 重组质粒的实验组和对照组细胞生长情况

Figure 6 The growth of SH-SY5Y cells transfected with homo heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1 in two groups

图注: 可见在同样初始密度的情况下, 实验组用较少的时间(3d)可达到与对照组花较长时间的细胞生长密度。

度上核不均一核糖核蛋白 E1 可通过参与不同的蛋白-RNA 复合体来完成不同的功能。神经系统中, PCBP 同样具有不可忽视的作用。

目前已知神经纤维的发育有核不均一核糖核蛋白 E1 的参与, 当脊椎动物的轴突发育成熟时, 神经丝-M(NF-M)表达增加, 一定程度上归因于 NF-M mRNA 的稳定, 这是由于

不均一核糖核蛋白 E1 结合 NF-M mRNA 的 3'-UTR 区并对其进行转录后调控的结果。经亲和纯化及质谱分析确定是核不均一核糖核蛋白 E1 参与形成了蛋白-RNA 复合体, 识别并结合到 NF-M mRNA 3'-UTRs 的 CU-富含区, 伴随轴突的成熟, 稳定了 mRNA 并增加了胞浆 NF-M 的水平^[26]。另外, 核不均一核糖核蛋白 E1 参与神经细胞内 mRNA 的运输, 如运输 A2RE RNA 到少突胶质细胞的髓鞘以及神经元的树突中时, 核不均一核糖核蛋白 E1 可与核不均一核糖核蛋白 A2 绑定在一起被招募到 A2RE RNA 上。但这里核不均一核糖核蛋白 E1 的存在起到了在颗粒运输中抑制 A2RE mRNA 翻译的作用^[27]。那么, 究竟核不均一核糖核蛋白 E1 在神经细胞中如何分布, 当其表达增强后, 对神经细胞会发生什么样的作用, 作者设计了一系列的试验来观察。这部分则是成功构建了核不均一核糖核蛋白 E1 的真核表达载体, 并通过荧光抗体染色观察到了核不均一核糖核蛋白 E1 主要表达在 SH-SY5Y 细胞的胞浆中、核膜上。少量表达在细胞核内。表明该蛋白存在的范围比较广泛。

有研究认为 KH 域类蛋白(核不均一核糖核蛋白 E1/E2 和核不均一核糖核蛋白 K)参与神经元细胞骨架成分的组成, 及神经发育过程中参与多种成分的运输, 多种异常的调控可使 NFs (NF-L, NF-M, NF-H) 产生有害的聚集, 参与神经系统

疾病的发生^[24]。在观察转染了核不均一核糖核蛋白E1重组质粒的SH-SY5Y细胞时,发现细胞生长成倍加速,转染空质粒的细胞需要第6天才能达到的细胞数量,而过表达核不均一核糖核蛋白E1的细胞3 d就超过了这样的水平,究竟在细胞内发生了什么事情,会有什么样的基因调控网络的变化,作者会继续深入研究。

作者贡献: 设计为第一作者、实施为第一和第二作者,由第三和第四作者进行盲法评估。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

学术术语: KH 域-KH域是Poly(C)-结合蛋白与mRNA 结合的结构基础,也是机体内调控系统的组成部分,可使得Poly(C)-结合蛋白参与蛋白/核酸、蛋白/蛋白之间的相互作用,范围涉及复制、转录、mRNA 稳定和翻译控制等过程。

作者声明: 文章为原创作品,无抄袭剽窃,无泄密及署名和专利争议,内容及数据真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Akindahuni AA, Bandiera A, Manzini G. Vertebrate 2xRBD hnRNP proteins: a comparative analysis of genome, mRNA and protein sequences. *Comput Biol Chem.* 2005;29(1): 13-23.
- [2] Choi HS, Hwang CK, Song KY, et al. Poly(C)-binding proteins as transcriptional regulators of gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 380(3): 431-436.
- [3] Cho SJ, Jung YS, Chen X. Poly (C)-binding protein 1 regulates p63 expression through mRNA stability. *PLoS One.* 2013;8 (8): e71724.
- [4] Kim JH, Hahm B, Kim YK, et al. Protein-protein interaction among hnRNPs shuttling between nucleus and cytoplasm. *J Mol Biol.* 2000;298(3): 395-405.
- [5] Sola I, Mateos-Gomez PA, Almazan F, et al. RNA-RNA and RNA-protein interactions in coronavirus replication and transcription. *RNA Biol.* 2011;8(2): 237-248.
- [6] Xiao XL, Tang YS, Janet MY, et al. Isolation and characterization of a folate receptor mRNA-binding trans-factor from human placenta. *J Biol Chem.* 2001;276(44): 41510-41517.
- [7] Chkheidze AN, Liebhaber SA. A Novel Set of Nuclear Localization Signals Determine Distributions of the α CP RNA-Binding Proteins. *Mol Cell Biol.* 2003;23(23): 8405-8415.
- [8] Gamarnik A, Andino R. Two functional complexes formed by KH domain containing proteins with the 5' noncoding region of poliovirus RNA. *RNA.* 1997;3(8): 882-892.
- [9] Grüllich C, Duvoisin RM, Wiedmann M. Inhibition of 15-lipoxygenase leads to delayed organelle degradation in the reticulocyte. *FEBS Lett.* 2001;489 (1): 51-54.
- [10] Ostareck DH, Ostareck-Lederer A, Wilm M, et al. mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNPK and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end. *Cell.* 1997;89(4):597-606.
- [11] Ghanem LR, Chatterji P, Liebhaber SA. Specific enrichment of the RNA-binding proteins PCBP1 and PCBP2 in chief cells of the murine gastric mucosa. *Gene Expr Patterns.* 2014;14(2): 78-87.
- [12] Leffers H, Dejgaard K, Celis J. Characterisation of two major cellular poly (rC)-binding human proteins, each containing three Khomologous (KH) domains. *Eur J Biochem.* 1995;230(2): 447-453.
- [13] Kuhn H, Heydeck D, Brinckman R, et al. Regulation of cellular 15-lipoxygenase activity on pretranslational, translational, and posttranslational levels. *Lipids.* 1999; 34(Suppl): S273-S279.
- [14] Reimann I, Huth A, Thiele H, et al. Suppression of 15-lipoxygenase synthesis by hnRNP E1 is dependent on repetitive nature of LOX mRNA 30-UTR control element DICE. *J Mol Biol.* 2002;315(5): 965-974.
- [15] Walter BL, Parsley TB, Ehrenfeld E, et al. Distinct poly(rC) binding protein KH domain determinants for poliovirus translation initiation and viral RNA replication. *J Virol.* 2002; 76(23):12008-12022.
- [16] Yeap BB, Voon DC, Vivian JP, et al. Novel binding of HuR and poly(C)-binding protein to a conserved UC-rich motif within the 30-untranslated region of the androgen receptor messenger RNA. *J Biol Chem.* 2002; 277(30): 27183-27192.
- [17] Mili S., Shu H.J., Zhao Y. and Pinol-Roma S. Distinct RNP complexes of shuttling hnRNP proteins with pre-mRNA and mRNA: candidate intermediates in formation and export of mRNA. *Mol Cell Biol.* 2001;21(21):7307-7319.
- [18] Shi HF, Bencze KZ, Stemmler TL, et al. A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science.* 2008;320 (5880):1207-1210.
- [19] Leidgens S, Bullough KZ, Shi H, et al. Each member of the poly-r(C)-binding protein 1(PCBP) family exhibits iron chaperone activity toward ferritin. *J Biol Chem.* 2013; 288(24): 17791-17802.
- [20] Yanatori I, Yasui Y, Tabuchi M, et al. Chaperone protein involved in transmembrane transport of iron. *Biochem J.* 2014 May 23. [Epub ahead of print].
- [21] Thyagarajan A, Szaro BG. Dynamic endogenous association of neurofilament mRNAs with K-homology domain ribonucleoproteins in developing cerebral cortex. *Brain Res.* 2008;1189:33-42.
- [22] Song Q, Sheng W, Zhang X, et al. ILEI drives epithelial to mesenchymal transition and metastatic progression in the lung cancer cell line A549. *Tumour Biol.* 2014;35(2): 1377-1382.
- [23] Zhang HY, Dou KF. PCBP1 is an important mediator of TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition in gall bladder cancer cell line GBC-SD. *Mol Biol Rep.* 2014 Jun 3. [Epub ahead of print]
- [24] 霍丽蓉, 邹俊华, 钟南. 酵母双杂交系统3筛选人源核不均一核糖核蛋白E1的功能伙伴[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(20):3714-3717.
- [25] Makeyev AV, Liebhaber SA. The poly(C)-binding proteins: A multiplicity of functions and a search for mechanisms. *RNA.* 2002;8: 265-278.
- [26] Thyagarajan A, Szaro BG. Phylogenetically conserved binding of specific K homology domain proteins to the 3'-untranslated region of the vertebrate middle neurofilament mRNA. *J Biol Chem.* 2004;279 (48):49680-49688.
- [27] Kosturko LD, Maggipinto MJ, Korza G, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) E1 binds to hnRNP A2 and inhibits translation of A2 response element mRNAs. *Mol Biol Cell.* 2006;17 (8): 3521-3533.