

· 基础研究 ·

慢病毒介导的 RNA 干扰技术构建人胚椎间盘髓核上皮膜蛋白-1 基因低表达细胞模型

胡明, 马远征, 李大伟, 黄凤山, 杨达宇, 杨同磊, 刘玉川
(解放军第三〇九医院骨科, 北京 100091)

【摘要】 目的: 构建人胚椎间盘髓核上皮膜蛋白-1 基因低表达细胞模型, 为进一步研究 EMP-1 在椎间盘退变中的作用机制提供理想的研究平台。方法: 利用慢病毒载体介导的小发夹状 RNA (small hairpin RNA, shRNA) 转入人胚胎肾细胞(293FT)包装慢病毒, 48 h 后在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达情况, 72 h 后收集病毒上清并感染人胚椎间盘髓核细胞, Western blot、RT-PCR 鉴定基因干扰效果, 凝胶成像分析软件对条带显色程度进行分析, 得到 EMP-1/GAPDH 的平均值。结果: 重组慢病毒滴度测定约为 1×10^7 U/ml, 感染靶细胞后得到 EMP-1 基因低表达细胞模型, EMP-1 mRNA 表达水平比正常细胞下降了 50%。半定量 RT-PCR 结果显示 EMP1/GAPDH 的平均值由 0.46 ± 0.03 降至 0.32 ± 0.01 , Western blot 结果显示 EMP1/GAPDH 的平均值由 0.50 ± 0.01 降至 0.25 ± 0.01 。结论: 通过慢病毒包装技术, 成功构建人胚椎间盘髓核上皮膜蛋白-1 基因低表达细胞模型。

【关键词】 椎间盘; 慢病毒属; 膜蛋白质类; RNA 干扰

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2012.10.014

Construction of Epithelia Membrane Protein 1 gene-deficient in human fetal nucleus pulposus cell model by lentivirus-mediated RNA interference HU Ming, MA Yuan-zheng, LI Da-wei, HUANG Feng-shan, YANG Da-yu, YANG Tong-lei, LIU Yu-chuan. Department of Orthopaedics, 309th Hospital of PLA, Beijing 100091, China

ABSTRACT Objective: To construct Epithelia Membrane Protein 1 gene-deficient in human fetal nucleus pulposus model by lentivirus-mediated RNA interference for building a platform for illustrating the biomechanisms role of EMP-1 during human intervertebral disc degeneration. **Methods:** The lentivirus vector with shRNA targeting EMP-1 mRNA was transected into 293FT cells by liposome. Then the lentivirus supernatant was obtained and used for infecting human fetal nucleus pulposus. The expression of GFP was observed under fluorescence microscope after 48 h. The viral particles were collected at 72 h after transfection. The efficacy of gene interference was tested by Western blot and Real-time RT-PCR. Analysis the results of the fluorescent microscope scenes and get the average values of EMP-1/GAPDH by detected the interference efficiency of various interference DNA sequences with western blot and semi quantitative RT-PCR methods. **Results:** The lentiviruses with high titer were obtained and the EMP-1 gene deficient cell strains were obtained. Semi quantitative RT-PCR and Western blot proved the average values of EMP-1/GAPDH decreased from 0.46 to 0.32 and 0.5 to 0.25 ($P < 0.01$). **Conclusion:** Lentivirus packaging technology can be mastered skillfully. EMP-1 gene-deficient cell models are successfully established.

KEYWORDS Intervertebral disk; Lentivirus; Membrane Proteins; RNA interference

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2012, 25(10): 842-845 www.zggszz.com

笔者在前期采用 4 096 条人类全长基因的 cDNA 表达谱芯片, 以临床切除的正常与退变椎间盘为研究对象, 建立了人类退变椎间盘的基因表达谱, 发现凋亡相关基因中 EMP1 表达呈明显上调^[1]。此前, 有学者报道其同家族基因 PERP 表达的下调会导致马哈鱼脊索细胞变圆, 凋亡增加^[2]。前期笔者利用已建成的人胚椎间盘髓核细胞培养体系, 采用 RT-PCR 和免疫组化方法检测 EMP1 在人胚椎间盘髓核

细胞中存在较高丰度表达^[3]。那么 EMP1 的低表达对椎间盘退变有什么影响? 本研究利用慢病毒介导的 RNA 干扰技术构建人胚椎间盘髓核上皮膜蛋白-1 基因低表达细胞模型, 为进一步研究 EMP-1 在椎间盘退变中的作用机制提供理想的研究平台。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂 质粒 pGC-FU Vector、pHelper 1.0、pHelper 2.0、大肠埃希菌株 DH5 α 、polybrene 由上海吉凯基因化学技术有限公司提供, 限制性内切酶 Pac I (NEB 公司), In-Fusion kit (BD 公司), Plasmid 抽提试剂盒 (Promega 公司), ECL+plusTM Western blotting system 试剂盒 (Amersham 公司)。人肾脏

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30400453)

Fund programs: Provided by National Science Foundation (No. 30400453)

通讯作者: 胡明 E-mail: huming309@hotmail.com

细胞 293 购自中国科学院细胞库, 小鼠抗人 EMP1 多克隆抗体由台湾 Abnova 公司提供, 小鼠抗人 GAPDH 多克隆抗体、HRP 标记的抗小鼠二抗购自北京博奥森生物技术公司, DMEM/F12 培养基、胎牛血清(特优级)购自美国 Hyclone 公司。TC2323 型 CO₂ 培养箱 (美国 Sheldon manufacturing 公司), Olympus IX70 荧光倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司), Real-time PCR 使用 BioRad 170-9780 iQ5(美国 BioRad 公司), Alpha Innotech 凝胶成像系统(Alpha Innotech 公司)。

1.2 模型制备与分组方法

1.2.1 EMP1 干扰的质粒的构建 根据 Genebank 中 EMP1 的基因信息选择了 4 个干扰靶点: ACCATGTATCCCTTATCT, CTGGTCCTGAGAAAGAAA, GGACTTAGAAG-TAGTATGT, AGCAGATACTGTCT-TTGT。设计为短发卡 shRNA 序列合成并退火成双链, BamH I 和 Hind III 酶切 pGCsi 载体以使其线性化, 连接双链 DNA oligo 与线性载体, 转化 DH5 α 细菌, 形成阳性克隆后挑取阳性克隆扩增。12%PAEG 非变性 PAGE 凝胶检测双链形成效率(图 1), 以 5'-GTGTCAGTACTAGGCGGGAACAC-3' 5'-TTATTCCCATGCGACGGTAT C-3' 为上下游引物进行 PCR 鉴定(图 2)。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。设立阴性对照组 (空载质粒为模板) 和阳性对照组 (插入片段 GAPDH 的载体组), 分别排除假阳性和假阴性结果。PCR 阳性克隆送往上海吉凯基因化学技术有限公司进行测序鉴定。测序结果与 Gene Bank 数据库进行 Blast 比对。

1.2.2 有效干扰序列的筛选 由于椎间盘髓核细胞的转染效率过低, 而 HEK293 细胞活力高、易于转染且表达 EMP1 基因, 所以选用 HEK293 细胞作为工具细胞, 检测不同靶点 RNAi 的敲减效率, 筛选有效的干扰靶点。将细胞滴加于培养板中培养 24 h 后, 细胞融合度控制在 70%~80%; 用 RNAi 质粒 (包括 4 种构建的干扰质粒和阴性对照) 与稀释后的 Lipofect AMINE 2000 进行混合做转

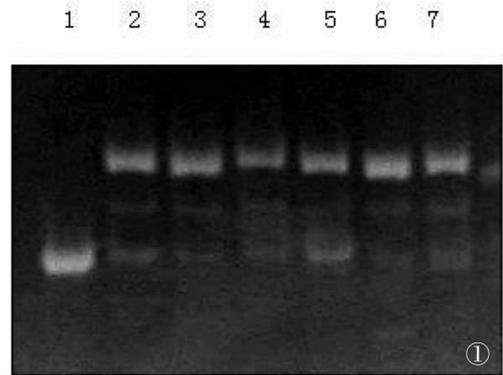


图 1 针对 4 个靶点的双链 DNA oligo 的制备

Fig.1 Preparation of sDNA oligo with double chains aimed at four interference targets

染。转染满 8 h 后需更换新鲜培养液。转染后 36 h 分别抽提 RNA 和收集蛋白进行半定量 RT-PCR 和 Western blot 实验检测干扰效率。结果显示: 序列 1 的干扰效率最低, 在预实验中便排除。RT-PCR 与 Western blot 显示: 2# 靶点的干扰效率 0.75 ± 0.03 , 3# 靶点 0.30 ± 0.02 , 4# 靶点 0.52 ± 0.03 。3# 靶点分别与 2#、4# 靶点比较: $t=10.568, P=0.0005$; $t=21.617, P=0.0000$ (图 3-4)。

1.2.3 EMP1 干扰慢病毒的构建 前期的实验结果表明干扰序列 3 的干扰效率最高, 可以达到 70%

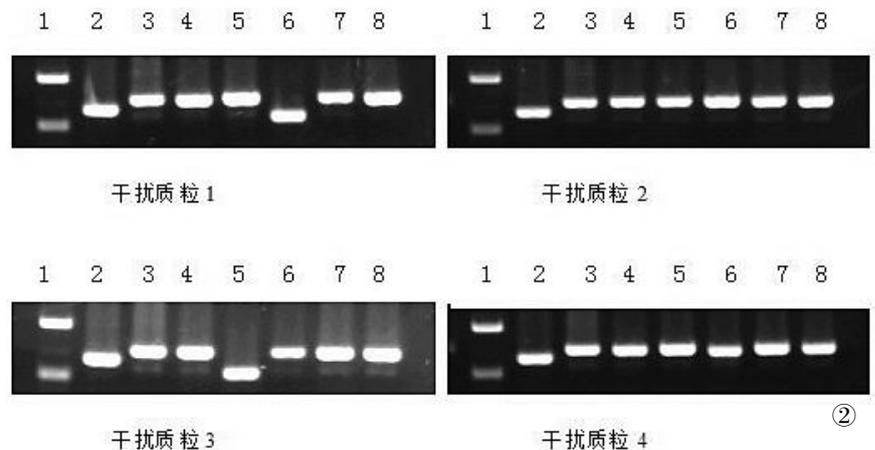


图 2 PCR 方法鉴定构建的干扰质粒

Fig.2 Identify the construction efficiency of sDNA oligo with PCR methods

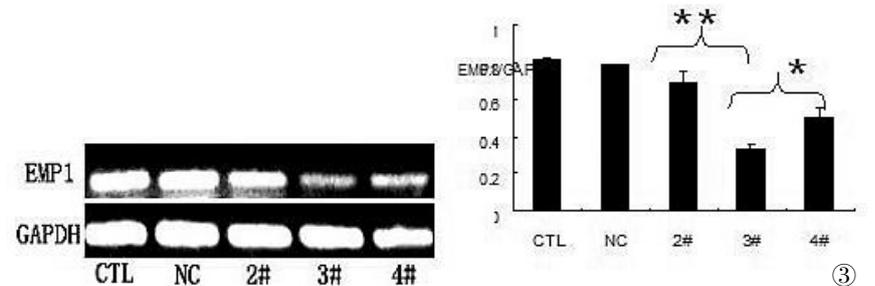


图 3 半定量 RT-PCR 检测各干扰序列的干扰效率

Fig.3 Detected the interference efficiency of various interference DNA sequences with semi quantitative RT-PCR methods respectively

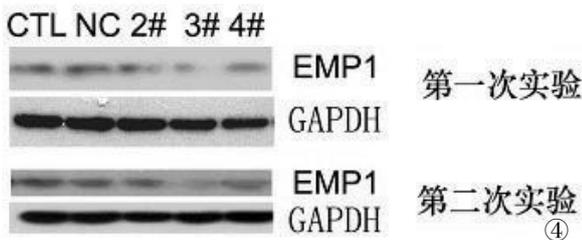


图 4 Western 检测各序列干扰效率

Fig.4 Detected the interference efficiency of various interference DNA sequences with western blot methods respectively

以上,所以挑选序列 3 作为干扰靶点构建 EMP1 干扰慢病毒。病毒的构建由上海吉凯基因生物科技有限公司完成。病毒滴度 108 TU/ml。

1.2.4 EMP1 干扰慢病毒的转染 以 10⁵/瓶接种于 25 cm² 培养瓶,培养细胞至待融合率达到 30%~40%,加入病毒 5×10⁶,及 1 000×的 polybrene 使终浓度为 8 μg/ml,前后轻轻混匀。培养 8 h 后更换为新鲜培养基,继续培养。24 h 后出现绿色荧光,3 d 后 GFP 阳性细胞达到高峰。

1.3 观测指标与方法 以 5' ATCTTTGTGGTCCACATCGCT 3', 5' CTCTCCATGGTGAAGAGCT 3' 为上下游引物(该引物为编码框内),抽提 RNA 并逆转录为 cDNA。PCR 反应:反应体系同上。具体条件如下:95 ℃ 4 min;95 ℃ 45 s,54 ℃ 45 s,72 ℃ 30 s,27 循环;72 ℃ 10 min,4 ℃ 5 min。以 GAPDH 作为内参照。对 PCR 产物行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定和 Western 检测。转染后 48 h 通过 Olympus IX70 荧光倒置相差显微镜对绿色荧光阳性细胞比例进行检测,Western blot、RT-PCR 实验过程独立重复 3 次后,凝胶成像分析软件对条带显色程度进行分析,得到 EMP1/GAPDH 的平均值。

1.4 统计处理方法 GAPDH 作为内参平衡组间的差异,凝胶成像分析软件得到 EMP1/GAPDH 的平均值,所有数据均采用 SPSS13.0 软件包进行统计分析。定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,定性资料比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

转染后 48 h 检测绿色荧光阳性细胞比例大于 80%(图 5)。半定量 RT-PCR(图 6a)检测结果显示干扰组 EMP1 的条带较暗,实验过程独立重复 3 次后,凝胶成像分析软件对条带进行分析,GAPDH 作为内参平衡组间的差异,数据进行统计学分析,统计结果显示 EMP1/GAPDH 的平均值由 0.46±0.03 降至 0.32±0.01,差别有统计学意义($P < 0.01$)。Western blot(图 6b)检测结果显示干扰组 EMP1 条带较淡,实验独立重复 2 次后对结果进行类似 RT-PCR 的处理,统计结果显示 EMP1/GAPDH 的平均值由 0.50±0.01

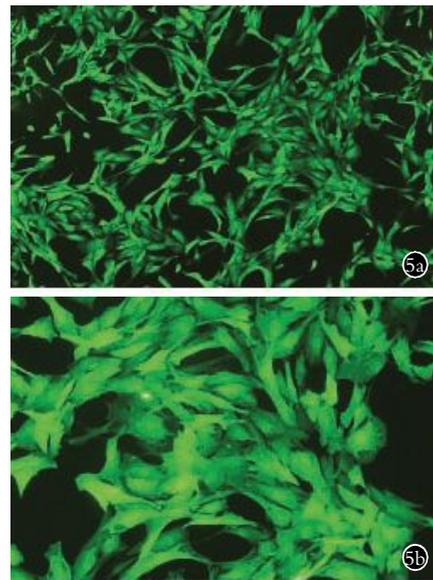


图 5 干扰慢病毒转导的人胚椎间盘髓核细胞(绿色荧光染色 5a. 100× 5b. 200×)

Fig.5 The expression of EMP-1 in human fetal NPCs suppressed by using the specific RNA interference sufficient transfection were presented (under Fluorescent microscope; 5a. 100× 5b. 200×)

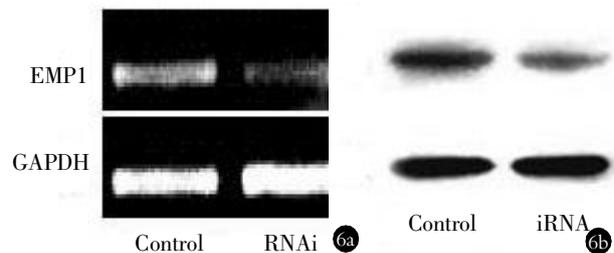


图 6 转染后半定量 RT-PCR(6a)和 Western blot(6b)证实 EMP-1 的表达下降

Fig.6 Significant decrease of expression of EMP-1 in mRNA (6a) and protein (6b) levels were analyzed with semi quantitative RT-PCR and western blot respectively

降至 0.25±0.01($t=30.619, P=0.000 0$)。

3 讨论

目前研究认为,EMP1 基因可能与细胞的黏附、增殖、凋亡、分化、肿瘤的形成、转移以及抗性形成等相关^[4],尚未见 EMP1 在椎间盘中作用的报道。笔者通过对已建成的人胚椎间盘髓核细胞,采用 RT-PCR 和免疫组化方法检测了 EMP1 在细胞中的表达情况,发现 EMP1 在正常和退变椎间盘细胞中均存在表达,且风度较高,结合其结构的高度保守特点,认为 EMP1 参与了椎间盘细胞的退变。那么 EMP-1 的变化对椎间盘细胞的生物学特性究竟有什么影响呢?为此构建了 EMP-1 基因低表达的细胞模型,并准备进一步观察细胞增殖、凋亡以及胶原纤维的表达变化。

本实验根据慢病毒载体质粒 pLenty-GFP-Neo 的特点,需将 Math1 基因插入到载体的 Sma1 和

Kpn1 之间;用 PDRAW32 软件检测 Math1 基因发现上游有 Sma1 位点,但是该位为平端,故而可以设计上游没有位点的引物,下游带有 Kpn1 位点的引物,用 PFU 酶 PCR 后产生平末端。再与经 Sma1 和 Kpn1 双酶切的线性慢病毒载体 pLenty-GFP 连接,形成含 Math1 的慢病毒表达质粒,该步是构建的关键步骤。

本研究在成功将干扰片段导入靶细胞后,用 real-time RT-PCR 方法对 EMP-1 基因进行鉴定,结果表明感染成功且基因抑制效果明显。由于选择的靶位点不同,不同的干扰片段对目的基因的抑制率存在差异。根据 Genbank 中 EMP1 的基因信息选择了 4 个干扰靶点,选用 HEK293 细胞作为工具细胞,检测不同靶点 iRNA 的敲减效率,从而筛选出最优的干扰片段。研究中检测到抑制 EMP-1 基因的几条片段中 5'-GGACTTAGAAG-TAGTATGT-3' 序列抑制作用最大,在细胞内可以长期稳定的表达,维持基因表达的抑制,为后续的实验建立了一个良好的研究平台^[5]。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术作为一种重要的策略手段,被广泛应用于特异抑制基因的表达及其功能的研究^[6]。而慢病毒载体介导的 RNA 干扰技术,与传统的基因敲除技术相比,具有转染宿主范围广、转染效率高的优点,且携带的外源基因能够在细胞的增殖过程中不会被沉默掉,能够随着细胞基因组的复制长期稳定的表达^[7-8]。

慢病毒载体是近年来众多转基因方法中的热点之一,目前研究较为深入的 HIV-1 型慢病毒载体有其不可比拟的优势^[9]。与质粒载体比较,HIV-1 慢病毒载体具有容纳较大外源性目的基因片段的特点;与传统的腺病毒载体相比,该载体既可以瞬时表达、检测相关指标,也可通过抗生素筛选出稳定表达的转染细胞系,以作长期研究之用。慢病毒载体还具有感染谱广的特点,可感染分裂期和非分裂期细胞,目的基因整合在靶细胞基因组内后,较少发生基因沉默现象,能够长期稳定表达,引起宿主免疫反应较小,安全性较好^[10]。

本研究中首次通过构建相应的慢病毒载体转染人椎间盘细胞,达到了理想的转染率(60%以上)转

染后细胞活力良好,未出现形态的变化,无坏死漂浮的细胞,转染后 3 d 胎盘兰染色发现 2 组活细胞率 97%以上。慢病毒作为一种新型的 RNA 病毒载体可以转染增值期和静止期的细胞并能整合到宿主细胞基因组中稳定持久的表达。无疑,慢病毒载体的使用是对基因与人椎间盘细胞生物功能研究的有益尝试,为椎间盘退变的生物治疗提供了新的途径。

参考文献

- [1] 胡明,张传森,陈道运,等.人退变椎间盘组织的基因表达谱[J].解剖学杂志,2004,27(4):348-351.
Hu M,Zhang CS,Chen DY,et al. Analysis of gene expression pattern of lumbar intervertebral disc degeneration in human[J]. Jie Pou Xue Za Zhi,2004,27(4):348-351. Chinese.
- [2] Ben-Porath I,Yanuka O,Benvensity N. The tmp gene, encoding a membrane protein, is a c-Myc target with a tumorigenic activity[J]. Mol Cell Boil,1999,19(5):3529-3539.
- [3] 胡明,马远征,李大伟,等.上皮膜蛋白-1 在人椎间盘髓核细胞中的表达[J].实用骨科杂志,2011,17(2):144-147.
Hu M, Ma YZ, Li DW, et al. The expression of Epithelia Membrane Protein 1 in human nucleus pulposus cell[J]. Shi Yong Gu Ke Za Zhi,2011,17(2):144-147. Chinese.
- [4] Bruggeman LA, Martinka S, Simske JS. Expression of TM4SF10, a Claudin/EMP/PMP22 family cell junction protein, during mouse kidney development and podocyte differentiation[J]. Dev Dyn, 2007, 236(2):596-605.
- [5] Kim SM, Lee KN, Lee SJ, et al. Multiple shRNAs driven by U6 and CMV promoter enhances efficiency of antiviral effects against foot-and-mouth disease virus[J]. Antiviral Res, 2010, 87(3):307-317.
- [6] Kaneko N, Miura K, Gu Z, et al. siRNA-mediated knockdown against CDCA1 and KNTC2, both frequently overexpressed in colorectal and gastric cancers, suppresses cell proliferation and induces apoptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 390(4):1235-1240.
- [7] Pang MS, Chen X, Lu B, et al. Lentiviral vector-mediated doxycycline-inducible iASPP gene targeted RNA interference in hepatocellular carcinoma[J]. Chin J Cancer, 2010, 29(9):796-801.
- [8] Ryan BM, O'Donovan N, Duffy MJ. Survivin: a new target for anti-cancer therapy[J]. Cancer Treat Rev, 2009, 35(7):553-562.
- [9] Cockrell AS, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors[J]. Mol Biotechnol, 2007, 36(3):184-204.
- [10] Buchsacher GL Jr, Wong-Staal F. Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases[J]. Blood, 2000, 95(8):2499-2504.

(收稿日期:2012-03-13 本文编辑:连智华)