

· 论 著 ·

PINCH-1 基因 RNAi 慢病毒载体的构建及鉴定*

曾东风, 陈幸华, 孔佩艳[△], 徐 葳, 张 曦

(第三军医大学新桥医院血液内科, 重庆市医学重点学科, 重庆 400037)

摘要:目的 构建人 PINCH-1 基因的 RNA 干扰(RNAi)慢病毒载体,并转染人骨髓基质细胞初鉴定转染效果。方法 利用 RNAi 设计软件,设计合成针对人 PINCH-1 基因的特异性 siRNA 序列,利用酶切反应合成包含特异性 shRNA 序列的 pGC-SIL-GFP 慢病毒载体 GC-shBC047440,通过 GC-shBC047440 与 pHelper 1.0 载体和 pHelper 2.0 载体共转染包装 293FT 细胞产毒,并利用 GFP 蛋白表达水平进行滴度测定。获取的病毒上清筛选最适感染复数(MOI 值),并感染骨髓基质细胞,RT-PCR 和 Western blot 检测重组慢病毒对骨髓基质细胞 PINCH-1 蛋白和 RNA 表达的影响。结果 酶切鉴定证实成功构建针对人 PINCH-1 基因的 RNAi 慢病毒干扰载体 GC-shBC047440,载体感染人骨髓基质细胞后 PINCH-1 RNA 表达较未感染组和空载体对照组显著下降。结论 成功构建针对人 PINCH-1 基因的 RNAi 慢病毒载体,该载体能有效沉默 PINCH-1 基因的表达。

关键词:RNA 干扰;慢病毒属;绿色荧光蛋白质类;PINCH-1

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.30.006

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)30-3029-03

Construction and identification of RNAi lentiviral vector targeting for PINCH-1*

Zeng Dongfeng, Chen Xinghua, Kong Peiyan[△], Xu Wei, Zhang Xi

(Department of Hematology, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract:Objective To construct RNAi lentiviral vector targeting for PINCH-1. **Methods** siRNA sequence targeting for PINCH-1 was designed and synthesized, and the specific shRNA targeting for PINCH-1 was inserted into the pGCSIL-GFP vector so called GC-shBC047440. 293FT cells mediated by lipofectamin 2000 were transfected and the packaging plasmids (Helper 1.0 and pHelper 2.0 plasmids) so as to produce the lentivirus. The titer of lentivirus was detected by GFP expression level. **Results** Enzyme digestion confirmed that the RNAi lentiviral vector targeting for PINCH-1 was successfully constructed, and it can effectively infected bone marrow stromal cells and decreased the RNA level of PINCH-1. **Conclusion** The RNAi lentiviral vector targeting for PINCH-1 was successfully constructed, and it could effectively silence the expression of PINCH-1.

Key words:RNA interference; lentivirus; green fluorescent proteins; particularly interesting new cysteine-histidine rich protein

骨髓造血微环境主要由骨髓基质细胞、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)以及多种造血生长因子组成,其中 ECM 及其相关的细胞黏附分子(cell adhesion molecules, CAMs)是形成造血细胞间以及造血细胞与基质细胞间相互作用的基础^[1-2]。在病理情况下,各种因素导致的 ECM 相关蛋白和黏附分子的异常分泌以及异常信号转导的形成,是形成白血病异常骨髓造血微环境的重要原因。PINCH-1(particularly interesting new cysteine-histidine rich protein)蛋白是一种新近发现的与肿瘤相关基质以及黏附分子密切相关的蛋白,由 5 个 LIM(含有 Lin-11, Isl-1 and Mec-3 蛋白的结构域)结构以及一个 C'端构成^[3-4]。作者前期的实验研究发现^[5],白血病骨髓基质细胞 PINCH-1 表达显著高于正常基质细胞。以 PINCH-1 为靶点的肿瘤治疗研究可能成为白血病治疗新的切入点^[6-7]。

RNA 干扰(RNAi)技术目前已经成为研究基因功能的重要方法,同时也为临床治疗提供一个新的疾病治疗途径^[8-9]。通过合适的载体将 RNA 干扰片段导入目的细胞,可以有效地阻抑功能基因的表达。本试验中作者拟设计、构建、鉴定针对 PINCH-1 基因的 RNAi 慢病毒载体,并转染骨髓基质细胞验证其干扰效果,为后续研究 PINCH-1 基因在白血病骨髓微环境中的作用机制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 慢病毒包装细胞 293FT 细胞(Invitrogen 公司),

pGCSIL-GFP 载体及辅助包装质粒(上海吉凯公司), Pure-Link™ HiPure 去内毒素质粒抽提试剂盒(Invitrogen 公司), DMEM 培养基、胎牛血清(Hyclone 公司),山羊抗人 PINCH-1 多克隆抗体(Santa cruz 公司),RT-PCR 试剂 ReverTra Ace-α-TM(TOYOBO 公司)。

1.2 方法

1.2.1 特异性 shRNA 序列的设计 Genbank 查找到 PINCH-1 所对应的 NM_004987 基因序列,应用 Ambion 公司的 RNAi 设计软件,设计针对人 NM_004987 基因的特异性 siRNA 序列为: aaG GTG ATG TGG TCT CTG CTC。通过 BLAST 同源分析,排除了非特异性抑制其他基因序列的可能。

1.2.2 酶切 取经 Hpa I 和 Xho I 双酶切回收 pGCSIL-GFP 载体 1 μL,退火的 shRNA 片段 1 μL,与 T4 DNA ligase buffer 1 μL, T4 DNA ligase 1 μL, ddH₂O 6 μL 混合成 10 μL 反应体系,4 ℃连接 12 h。连接产物转化 E. coli DH5α 感受态菌,挑取阳性克隆行 PCR 鉴定、DNA 测序。PCR 鉴定阳性克隆的引物;上游:5'-GCC CCG GTT AAT TTG CAT AT-3'; 下游:5'-GAG GCC AGA TCT TGG GTG-3',该载体命名为 GC-shBC047440。

1.2.3 慢病毒包装 取各载体(GC-shBC047440 载体 20 μg, pHelper 1.0 载体 15 μg, pHelper 2.0 载体 10 μg)与 Opti-MEM 混合为 2.5 mL;取 100 μL Lipofectamine 2000 试剂与 2.4 mL Opti-MEM 混合。将各载体与 Lipofectamine 2000 稀释液混合,

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81000195);重庆市自然科学基金资助项目(2009BB5151);第三军医大学青年创新人才基金资助项目(2007XG33)。 △ 通讯作者, E-mail: peiyankong@yahoo.com.cn。

室温下孵育 20 min, 加入 293FT 细胞培养瓶中混匀, 于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。8 h 后弃去培养液, PBS 清洗 1 次, 加入含 10% FBS 的完全培养基 20 mL, 于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中继续培养。48 h 后收集 293FT 细胞上清液, 离心获得病毒浓缩液, 分装后置 -70 °C 冰箱中保存。

1.2.4 重组慢病毒滴度的测定 采用逐孔稀释滴度测定法测定重组慢病毒滴度。取对数生长期 293FT 细胞, 以 2×10^5 /孔接种至 96 孔板, 分 8 组, 每组设 3 个复孔, 每孔加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基 100 μ L, 置 37 °C、5% CO₂ 孵育箱下培养 24 h。准备 8 个无菌的 Ep 管, 每管中加入 90 μ L 的无血清培养基, 取待测定的病毒原液 10 μ L 加入第 1 个管中, 混匀后, 取 10 μ L 加入第 2 管中, 以此操作直至最后一管。稀释成相当于病毒原液 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 浓度梯度选取对应细胞孔, 吸弃 90 μ L 培养基, 加入 90 μ L 稀释好的病毒溶液, 于 37 °C、5% CO₂ 孵育箱培养。各组加入不同浓度病毒液。24 h 后, 补足完全培养基至 200 μ L。72 h 后, 观察绿色荧光表达情况, 病毒滴度为每孔表达 GFP 的细胞数/病毒原液量。

1.2.5 测定最适感染复数(MOI 值) 取对数生长期骨髓基质细胞, 以 5×10^3 /孔接种于 96 孔板, 分 8 组, 每组设 3 个复孔, 每孔加入含 12% FBS 的 DMEM 培养基 100 μ L, 于 37 °C、5% CO₂ 孵育箱培养。24 h 后更换为无血清培养基, 每组分别加入 MOI 值为 1、2、5、8、10、15、20、30 的病毒液, 补足无血清的 DMEM 培养基至 100 μ L; 间隔 15 min 轻轻晃动培养板以使病毒颗粒与细胞充分接触, 2 h 后静置 37 °C、5% CO₂ 孵育箱培养, 10 h 后更换为含 12% FBS 的 DMEM 培养基 200 μ L。72 h 后在荧光显微镜下观察细胞中绿色荧光表达, 选择细胞状态较好、绿色荧光表达率较高、强度较强的 MOI 值作为待测最适 MOI 值。

1.2.6 重组慢病毒感染骨髓基质细胞 取处于对数生长期骨髓基质细胞, 分为干扰组、空病毒组和正常对照组, 每组以 2×10^5 /瓶接种至 25 mL 培养瓶, 培养 24 h 后, 弃去培养基, 干扰组、空病毒组以最适 MOI 值分别加入对应重组慢病毒, 补足无血清培养基至 5 mL, 间隔 15 min 轻轻晃动培养瓶以使病毒颗粒与细胞充分接触, 2 h 后静置 37 °C、5% CO₂ 孵育箱培养, 10 h 后弃去培养液, 加入含 12% FBS 的 DMEM 培养基 5 mL, 96 h 后提取总 RNA 行 RT-PCR 检测。

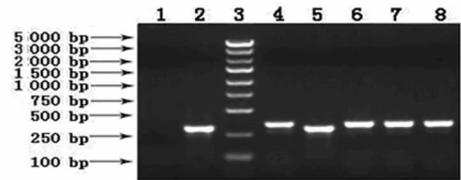
1.2.7 RT-PCR 检测重组慢病毒 RNAi 对骨髓基质细胞 PINCH-1 mRNA 表达的影响 重组慢病毒和空病毒感染骨髓基质细胞 96 h, 后提取各组细胞总 RNA 进行 RT-PCR 检测: 内参照 β -actin 上游引物 5'-ttg taa cca act ggg acg ata tgg-3', 下游引物 5'-gat ctt gat ctt cat ggt ggt agg-3', 产物长度 650 bp; 退火温度 60 °C, 链延伸温度 72 °C, 延伸时间 1 min, 循环 30 次。PINCH-1 引物上游序列: 5'-gca ctt ctt aca gac tgg ctt c-3'; 下游引物: 5'-ccc ttt ctt gga cat cgc-3' 产物长度 237 bp。退火温度 61 °C, 链延伸温度 72 °C, 延伸时间 1 min, 循环 30 次。

2 结果

2.1 质粒 DNA 鉴定结果 PINCH-1 基因特异性 shRNA 的寡核苷酸序列, 经退火形成双链 DNA, 与经 Hpa I 和 Xho I 双酶切后的 pGCSIL-GFP 载体连接, 连接产物转化感受态菌后, 挑取 5 个重组克隆作 PCR 鉴定, 已连接 shRNA 片段的阳性克隆 PCR 片段大小为 343 bp, 未连接 shRNA 片段的空载体克隆 PCR 片段大小为 299 bp。除阳性克隆 2 外, 其余 4 个阳性克隆扩增产物大小均为 343 bp(图 1), 鉴定结果与预期相符。选取 1 号阳性克隆进行 DNA 测序无误, 进行后续病毒包装。

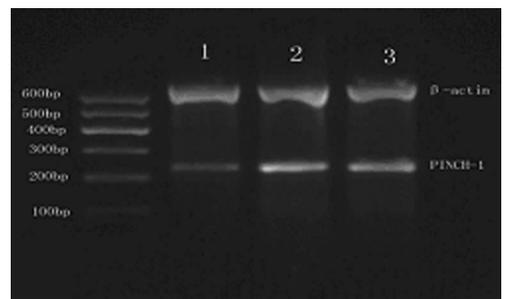
2.2 重组慢病毒滴度的测定 采用逐孔稀释滴度测定法测定

重组慢病毒滴度。重组慢病毒感染 293T 细胞后 72 h 观察其绿色荧光表达, 可见表达荧光细胞数随稀释倍数的递增而递减。在 10^{-4} μ L 病毒原液的孔中观察到 60 个带有荧光的细胞, 说明该孔中至少有 60 个病毒颗粒感染了细胞, 该病毒滴度为荧光细胞数除以病毒原液量, 即 $60/(10^{-4}) = 6 \times 10^5$, 单位 TU/ μ L, 即 6×10^8 TU/mL。



1: 阴性对照 (ddH₂O); 2: control-shRNA; 3: DNA 标准; 4~8: 阳性克隆 1、2、3、4、5。

图 1 重组克隆凝胶电泳



上一条带为 β -actin 电泳条带, 下一条带为 PINCH-1 的条带, 可见 RNA 干预后的 PINCH-1 mRNA 表达比对照组和空病毒组明显降低 (1: RNAi 组; 2: 空病毒组; 3: 正常组)。

图 2 PINCH-1 mRNA 的表达

2.3 重组慢病毒感染骨髓基质细胞, 测定 MOI 值 应用慢病毒为载体的 RNAi 片段转染骨髓基质细胞后 24 h, 骨髓基质细胞即出现绿色荧光, 病毒整合入细胞。以 72 h 荧光强度最强, 重组慢病毒感染细胞 72、96 h 后, 分别在荧光显微镜观察, 当 MOI 值为 20 时, 细胞状态最佳, 荧光表达率较高, 荧光强度较强。故选取 20 作为待测最佳 MOI。

2.4 重组慢病毒 RNAi 对白血病骨髓基质细胞 PINCH-1 mRNA 表达的影响 RT-PCR 检测 RNAi 后 PINCH-1 mRNA 的表达, 转染组 PINCH-1 mRNA 表达明显降低, RNAi 组比空白对照组表达明显降低 ($P < 0.05$); RNAi 组与空病毒组相比表达明显降低 ($P < 0.05$); 空病毒组与空白对照组相比差异无统计学意义(图 2)。

3 讨论

PINCH 蛋白是一种含有 5 个 LIM 结构域, 借其 N 端第 1 个 LIM 结构域(LIM1)的双锌指结构与细胞内整合素连接激酶 ILK(一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶)的 N 端的 ANK(ankyrin)序列相结合, ILK 再通过其 C 端与整合素 β_1 亚单位的胞质区相结合。PINCH-1 的 N-端 LIM 结构域(LIM1)在 PINCH-1 靶向到细胞-基质接触位点的过程中发挥着至关重要的作用, 改变 PINCH-1 的表达水平, 还会对 ILK 的表达水平产生可能的影响, 并影响细胞的形态和增殖^[10]。

国内外学者在对多种人类肿瘤组织(乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、肺癌以及皮肤癌)的研究中发现, PINCH-1 在肿瘤相关基质的成纤维细胞胞质中的表达存在明显上调, 而在肿瘤组织向正常组织浸润的边缘区域, PINCH 的上调程度尤其突出。部分研究还发现, 肿瘤相关基质 PINCH-1 的上调程度与肿瘤

的预后以及肿瘤细胞的淋巴结转移存在关系。作者在前期的研究也发现^[5], PINCH-1 蛋白表达于骨髓基质细胞胞质中, 且对于在白血病中 PINCH-1 蛋白的表达有明显上调的趋势。特异性地阻断 PINCH-1 的表达, 可能会影响白血病骨髓微环境对白血病细胞的庇护作用, 并实现对白血病增殖黏附功能的影响。

RNAi 技术是一种有效沉默靶向基因实现其功能阻断的技术, 在癌基因以及肿瘤信号转导的研究中, RNAi 技术可以有效沉默目的基因实现对肿瘤生物学行为的调控, 并有可能成为肿瘤治疗重要的技术^[8]。非病毒载体系统的细胞转染和以病毒为载体的细胞感染方式是 RNAi 的主要转染方式, 目前慢病毒技术是 RNAi 应用于基础和临床的主要研究方向, 其具备高转染效率、稳定传代以及对宿主细胞的毒性和免疫反应弱的特点^[11]。本试验中作者成功设计合成了针对 PINCH-1 的靶向 RNAi 引物, 并通过酶切、重组构建了包含 PINCH-1 shRNA 序列的慢病毒载体, 通过慢病毒包装产毒后, 能够有效转染人骨髓基质细胞, 并在初步的验证试验中发现其能有效阻断 PINCH-1 RNA 表达。该实验为本院后续研究阻断 PINCH-1 后骨髓微环境功能变化及其对白血病细胞的影响奠定了基础。

参考文献:

[1] 李晓青, 吕跃. 骨髓基质细胞与白血病的关系及其在基因治疗中的研究进展[J]. 癌症, 2005, 24(8): 1033-1036.
 [2] Ezoë S, Matsumura I, Satoh Y, et al. Cell Cycle. regulation in hematopoietic stem/progenitor cells [J]. Cell Cycle, 2004, 3(3): 326-332.
 [3] Chuanyue WU. PINCH, N(i)ck and the ILK: network wiring at cell-matrix adhesions [J]. Trends Cell Biol, 2005, 15(9): 460-466.

(上接第 3028 页)

[4] 凌家瑜, 孙晓非, 严苏丽, 等. 112 例淋巴系统恶性肿瘤骨髓免疫表型分析[J]. 癌症, 2007, 26(4): 418-422.
 [5] Sah SP, Matutes E, Wotherspoon AC, et al. A comparison of flow cytometry, bone marrow biopsy, and bone marrow aspirates in the detection of lymphoid infiltration in B cell disorders[J]. J Clin Pathol, 2003, 56(2): 129-132.
 [6] Maes B, Achten R, Demunter A, et al. Evaluation of B cell lymphoid infiltrates in bone marrow biopsies by morphology, immunohistochemistry and molecular analysis [J]. J Clin Pathol, 2000, 53(11): 835-840.
 [7] Palacio C, Acebedo G, Navarrete M, et al. Flow cytometry in the bone marrow evaluation of follicular and diffuse large B-cell lymphoma[J]. Haematologica, 2001, 86(9): 934-940.
 [8] Gomyo H, Shimoyama M, Minagawa K, et al. Morphologic, flow cytometric and cytogenetic evaluation of bone marrow involvement in B-cell lymphoma[J]. Haematologica, 2003, 88(12): 1358-1365.
 [9] 万岁桂, 孙雪静, 惠吴函, 等. 多参数流式细胞术检测 B 细胞非霍奇金淋巴瘤骨髓侵犯[J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(2): 473-476.
 [10] Stetler-Stevenson M, Braylan RC. Flow cytometric analy-

[4] Tu Y, Li F, Goicoechea S, et al. The LIM-only protein PINCH directly interacts with integrin-linked kinase and is recruited to integrin-rich sites in spreading cells[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(3): 2425-2434.
 [5] 徐葳, 曾东风, 孔佩艳, 等. PINCH-1 因子在白血病骨髓基质细胞中的表达及意义[J]. 免疫学杂志, 2009, 25(6): 701-704.
 [6] Dougherty GW, Jose C, Gimona M, et al. The Rsu-1-PINCH1-ILK complex is regulated by Ras activation in tumor cells[J]. Eur J Cell Biol, 2008, 87(8/9): 721-734.
 [7] Chen K, Tu Y, Zhang Y. PINCH-1 regulates the ERK-Bim pathway and contributes to apoptosis resistance in cancer cells [J]. J Biol Chem, 2008, 283(5): 2508-2517.
 [8] Tiemann K, Rossi JJ. RNAi-based therapeutics-current status, challenges and prospects[J]. EMBO Mol Med, 2009, 1(3): 142-151.
 [9] Meade BR, Dowdy SF. The road to therapeutic RNA interference(RNAi): Tackling the 800 pound siRNA delivery gorilla [J]. Discov Med, 2009, 8(43): 253-256.
 [10] Ito S, Takahara Y, Hyodo T, et al. The roles of two distinct regions of PINCH-1 in the regulation of cell attachment and spreading [J]. Mol Biol Cell, 2010, 21(23): 4120-4129.
 [11] Towne C, Aebischer P. Lentiviral and adeno-associated vector-based therapy for motor neuron disease through RNAi [J]. Methods Mol Biol, 2009, 555: 87-108.

(收稿日期: 2011-04-17 修回日期: 2011-05-25)

sis of lymphomas and lymphoproliferative disorders[J]. Sem in Hematol, 2001, 38(2): 111-123.
 [11] 王娜, 谢守军, 申兴斌, 等. 细胞遗传学联合免疫细胞化学检查在首诊非霍奇金淋巴瘤骨髓侵犯中的应用[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(4): 582-584.
 [12] 河福金, 谢彦, 李吉友, 等. 多参数流式细胞术在非霍奇金淋巴瘤诊断中的应用[J]. 中华病理学杂志, 2006, 35(4): 203-208.
 [13] LeBoit P, Burg G, Weedon D, et al. World Health Organization classification of tumors: pathology and genetics of skin tumors[M]. Lyon: IARC Press, 2006: 220.
 [14] 刘恩彬, 陈辉树, 杨晴英, 等. 非霍奇金淋巴瘤侵犯骨髓的病理形态及免疫表型特点分析[J]. 中国肿瘤临床, 2005, 32(16): 923-927.
 [15] John GH, Jill C, Dennis C, et al. Real-time quantitative reverse transcription PCR for cyclin D1 mRNA in blood, marrow and tissue specimens for diagnosis of mantle cell lymphoma[J]. Clin Chem, 2004, 50(1): 80-87.
 [16] Zanetto U, Dong H, Huang Y, et al. Mantle cell lymphoma with aberrant expression of CD10[J]. Histopathology, 2008, 53(1): 20-29.

(收稿日期: 2011-04-17 修回日期: 2011-05-25)