

· 技术与方法 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.27.018

携带小鼠信号转导子及转录激活子 3 重组慢病毒载体的构建与鉴定*

杨华安¹, 张 扬¹, 杨钰兴¹, 胡 溯¹, 苟 欣^{2△}

(1. 重庆市渝北区人民医院泌尿外科 401120 ; 2. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科 400016)

[摘要] 目的 构建携带小鼠信号转导子及转录激活子 3(STAT3)的重组慢病毒载体,并检测 STAT3 的蛋白表达,进行慢病毒包装并鉴定。方法 将小鼠成肌细胞总 RNA 通过 STAT3 引物逆转录为 cDNA PCR 扩增、回收后,同 pLVX-IRES-ZsGreen1 载体片段连接,酶切鉴定及测序,将 pLVX-IRES-ZsGreen1-STAT3 转染 293 T 细胞,48 h 后收集细胞,Western blot 检测 STAT3 表达量,通过瞬时转染法包装出病毒上清。结果 测序结果证实 STAT3 成功插入 pLVX-IRES-ZsGreen1 慢病毒载体,成功构建了慢病毒载体 pLVX-IRES-ZsGreen1-STAT3,共转染 293 T 细胞 48 h,Western blot 检测 STAT3 表达量明显增强。测定病毒滴度为 8.4×10^7 TU/mL。结论 成功构建了 STAT3 基因的重组慢病毒表达载体,为进一步应用奠定了基础。

[关键词] 信号转导子及转录激活子 3;慢病毒载体**[中图分类号]** R392.4**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)27-3803-02**Construction and identification of a recombinant lentivirus harboring expressing *Mus musculus* STAT3 gene***Yang Huaan¹, Zhang Yang¹, Yang Yuxin¹, Hu suo¹, Gou Xin^{2△}

(1. Department of Urological Surgery, Yubei District People's Hospital, Chongqing 401120, China;

2. Department of Urological Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective** To construct recombinant lentivirus with the gene STAT3 of the *Mus musculus*, measure the expression of STAT3, and conduct lentivirus packing and identification. **Methods** The mRNA of mouse myoblast was extracted and transformed into STAT3 cDNA by the special primer, then, STAT3 cDNA was amplified and reclaimed and inseted into pLVX-IRES-ZsGreen1 vector. Cleavage map and sequencing analysis were used for identification of the recombinant lentivirus vector (pLVX-IRES-ZsGreen1-STAT3). 293 T cells were transfected with main vector pLVX-IRES-ZsGreen1-STAT3, and 48 h later, Western blott detected the expression of STAT3 protein. Lentiviral vectors were packaged and the titer was determined. **Results** The lentiviral vector plasmid pLVX-IRES-ZsGreen1-STAT3 was identified correctly by cleavage map and Co-transfection of 293 T cells with 48 h, the expression of STAT3 was significantly enhanced by western blot. And DNA sequencing analysis confirmed that STAT3 gene sequencing was exactly the same with that reported by genbank. **Conclusion** Lentiviral vector carrying STAT3 was successfully constructed and could express STAT3 with high efficiency, and can be used in further study.

[Key words] signal transducers and activators of transcription 3; lentivirus vector

信号转导子及转录激活子 3(STAT3)是多种细胞因子及生长因子的信号传导因子,具有促进增殖、抑制凋亡,特别是促进肿瘤免疫抑制微环境形成等多种作用^[1],提示其在树突状细胞致免疫耐受的形成中起相关作用。本研究拟携带小鼠 STAT3 重组慢病毒载体,观察其蛋白表达情况,进行慢病毒包装,测定病毒滴度,为后续实验打下基础。

1 材料与方

1.1 试剂 TRIzol(ambion);DNA 凝胶回收试剂盒(东盛生物);M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen);T4 DNA Ligase(Invitrogen);2×PFU PCR MasterMix(Tiangen);Xho I、Bam H I 限制性内切酶(New England Biolabs);pLVX-IRES-ZsGreen1 载体及病毒包装及检测系统(Clontech);引物均由 Invitrogen 公司合成。DMEM 培养基(Gibco);FBS(Gibco,原产地澳洲);0.25%胰酶(1x,Gibco);DNA Transfection reagent(转染试剂,Roche);Opti-MEM 培养基(Gibco)。anti-STAT3 抗体(Abcam);anti-GAPDH 抗体(CST)、anti-Rabbit 二抗(CST);Super ECL 检测试剂盒(KeyGEN)。

1.2 方法

1.2.1 pLVX-IRES-ZsGreen1-STAT3 构建 收集培养小鼠成肌细胞,抽提总 RNA,逆转录成 cDNA,Stat3 上游引物:5'-CCG CTC GAG ATG GCT CAG TGG AAC CAG CT-3',下游引物:5'-CGC GGA TCC TCA CAT GGG GGA GGT AGC A-3',PCR 反应条件:94℃ 3 min;94℃ 30 s,65℃ 30 s,72℃ 2 min×30 个循环;72℃ 5 min。电泳切胶回收 DNA 片段,Xho I 和 Bam H I 双酶切同 pLVX-IRES-ZsGreen1 载体片段连接。将连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5α 于 37℃ 培养 16 h。取单菌落菌液 PCR 鉴定,并扩增菌液,少量快速抽提质粒 DNA,酶切鉴定、电泳,并测序分析。

1.2.2 转染重组载体 pLVX-IRES-ZsGreen1-STAT3 后 293 T 细胞 STAT3 蛋白的表达 设置空载体对照,转染 48 h 后收集细胞,提取蛋白,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行电泳。用 GAPDH 作内参,抗体滴度参照抗体说明书。ECL 化学发光显影。STAT3 蛋白表达强度的计算:表达强度=STAT3 条带灰度/GAPDH 条带灰度。

1.2.3 慢病毒载体的包装 共转染 293 T 细胞及分组接种 293 T 细胞,每个 T 75 细胞培养瓶 $9 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞,

* 基金项目:重庆市科委自然科学基金资助项目(2012JJA10002);重庆市卫生局基金资助项目(20122296)。作者简介:杨华安(1981-),硕士,主治医师,研究方向为肾移植及膀胱肿瘤。△ 通讯作者,E-mail:cymnk@163.com。

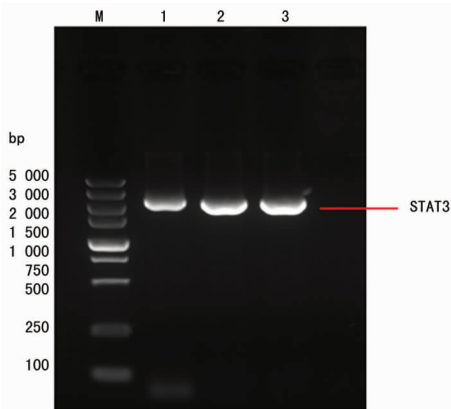
次日观察细胞密度,达 80%~90% 即可用 pLVX-IRES-ZsGreen1-STAT3 重组慢病毒载体包装系统共转染 293 T 细胞。该慢病毒载体的 3 种质粒成分 psPAX2、pMD2G 和 Plvx-IRES-ZsGreen1 20 μg ,浓度比例为 1:1:2。转染 24 h 和 48 h 后收集病毒上清以 0.45 μm 滤器过滤,于 40 mL 超速离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 、72 000 $\times g$ 离心 120 min;500 μL PBS 重悬病毒沉淀,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。同时将空质粒共转 293 T 细胞,并收集上清。

1.2.4 滴度测定 滴度检测前 1 d,选取生长状态良好的 293 T 细胞铺 96 孔板,每个孔加入总体积 100 μL 约 5×10^3 个细胞;第 2 天,准备好无菌 EP 管,取待测定的病毒原液 10 μL 加入到第 1 个管中,轻轻混匀后,用含 10% FBS 的 1640 培养基倍比稀释病毒液;选取所需的细胞孔,每孔加入 10 μL 稀释好的病毒液,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养;36~48 h 后,每孔加入 100 μL 新鲜培养液,小心操作,不要吹起细胞;3 d 后,观察 293 T 细胞荧光表达情况,并计数带荧光的细胞将得到的数值除以稀释倍数,即可计算出病毒原液的滴度值。病毒滴度(BT=TU/mL)计算公式: $\text{TU}/\mu\text{L} = \text{阳性细胞数} \times V \times \text{稀释倍数}$; $V = \text{每孔加入病毒稀释液体积}(\mu\text{L})$, $\text{TU}/\text{mL} = \text{TU}/\mu\text{L} \times 1000$ 。

1.3 统计学处理 使用 SPSS10.0 统计分析软件进行数据分析,两组间比较使用 t 检验,组间多重比较使用 SNK- q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 STAT3 基因的鉴定 根据 GenBank 的 STAT3 基因编码区(CDS)设计相应引物,PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离检测,可见 2 370 bp 的特异条带,与理论值一致。见图 1。



M: 标记物;1~3: 条带。

图 1 STAT3 PCR 酶切鉴定图

2.2 质粒测序 进一步质粒测序鉴定结果显示,目的片段插入方向正确,所测序列与 GenBank 中 STAT3 基因序列比较无差异。部分测序结果见图 2。

2.3 Western blot 检测 转染 48 h 后 293 T 细胞中 STAT3 的表达 转染 48 h 后,与转染空载体重组质粒的 293 T 细胞相比,pLVX-IRES-ZsGreen1-STAT3 重组质粒转染的 293 T 细胞,STAT3 的总蛋白水平显著增加。见图 3。

2.4 荧光显微镜观察结果 3 质粒共同转染 293 T 细胞观察及病毒滴度测定转染后 48 h,荧光显微镜观察可见大量绿色荧光(图 4),提示转染成功。经计算,病毒滴度为 8.4×10^7 TU/mL。

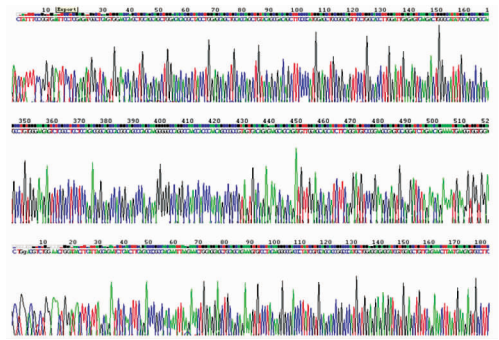
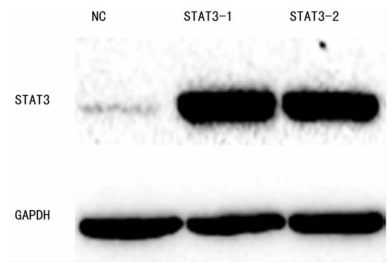


图 2 STAT3 mRNA 部分测序图



NC: 空载体对照组;STAT1 及 STAT2: pLVX-IRES-ZsGreen1-STAT3 重组质粒组。

图 3 Western blot 检测

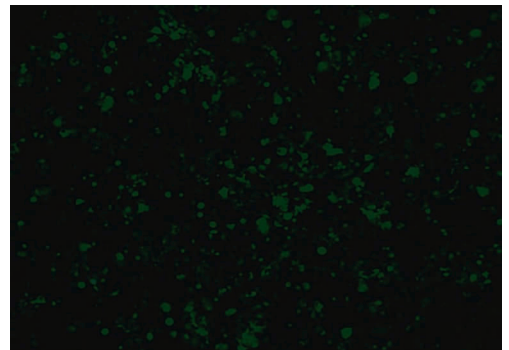


图 4 293 T 细胞荧光图微观察结果

3 讨 论

树突状细胞是高特异性的抗原呈递细胞,它收集各种输入信号,介导免疫反应;同时在自身免疫性疾病或移植耐受研究中起重要作用。目前研究表明树突状细胞的激活对 T 细胞反应起决定性作用,在无感染和相关“危险”信号刺激下,未成熟树突状细胞低水平、稳态地进入淋巴组织,这些静态树突状细胞帮助维持外周免疫耐受^[2]。肿瘤“逃逸”的机制之一是使免疫系统的未成熟树突状细胞数量增加,这类未成熟树突状细胞在患者体内不能转化为成熟状态,而诱导耐受^[3-4]。

正常细胞中 STAT3 在增殖、分化、凋亡等生理过程中起重要作用,正常细胞中 STAT3 磷酸化过程很短暂,而在许多肿瘤组织以及细胞系中可以见到 STAT3 分子持续活化^[5],有利于免疫抑制微环境形成,诱导树突状细胞的免疫耐受^[6],而通过 RNA 干扰细胞的 STAT3 表达,能明显增强树突状细胞的免疫活性^[7]。最近研究人员发现多种自身免疫性疾病同 STAT3 基因突变相关^[8]。而 Hp 细胞毒素相关基因能通过 IL-10 激活 STAT3 信号通路抑制树突状细胞的成熟及功能^[9]。因此,STAT3 可能同树突状细胞的分化密切相关^[10]。

通过慢病毒载体,将 STAT3 基因(目的基因)和 GFP 基因(报告基因)通过 IRES(核糖体内部进入序(下转第 3807 页))

在本研究中发现大部分大鼠子宫系膜异位包块较腹壁上大,与周围组织粘连较严重,镜下观察系膜上的异位内膜腺体也更丰富,可能与系膜上异位内膜得到的血供营养更多有关。通过将术后 4 周造模成功的 EMs 模型大鼠与雄鼠同笼交配,妊娠第 5 天大鼠子宫内膜腺体丰富,腺腔扩张明显,处于窗口期,此时子宫内膜呈现最大程度接收胚胎着床的能力,为后续研究 EMs 患者子宫内膜容受性对胚胎着床的影响提供了有价值的基础模型。

参考文献

- [1] Ulukus M, Ulukus EC, Tavmergen Goker EN, et al. Expression of interleukin-8 and monocyte chemotactic protein 1 in women with endometriosis[J]. *Fertil Steril*, 2009, 91(3):687-693.
- [2] Coccia ME, Rizzello F, Mariani G, et al. Impact of endometriosis on in vitro fertilization and embryo transfer cycles in young women: a stage-dependent interference[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2011, 90(11):1232-1238.
- [3] 武泽,李蓉,乔杰.辅助生殖技术治疗中子宫内膜容受性变化的研究进展[J]. *生殖与避孕*, 2011, 31(8):538-543.
- [4] Bellelis P, Podgaec S, Bro MM. Environmental factors and endometriosis[J]. 2011, 57(4):448-452.
- [5] Kuivasaari P, Hippelinen M, Anttila M, et al. Effect of endometriosis on IVF/ICSI outcome: stage III/IV endometriosis worsens cumulative pregnancy and live-born rates[J]. *Hum Reprod*, 2005, 20(11):3130-3135.
- [6] Zanatta A, Rocha AM, Carvalho FM, et al. The role of the Hoxa10/HOXA10 gene in the etiology of endometriosis

and its related infertility: a review[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2010, 27(12):701-710.

- [7] 刘爱红,戴淑真,姚琴,等.子宫内异位症大鼠模型复制[J]. *动物医学进展*, 2005, 26(2):89-92.
- [8] Zou J, Guan Z, Zhang WY, et al. Beneficial effects of the Chinese herbal medicine Sanjie Zhentong Capsule on experimental endometriosis in rats[J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(6):666-672.
- [9] Uchiide I, Ihara T, Sugamata M. Pathological evaluation of the rat endometriosis model[J]. *Fertil Steril*, 2002, 78(4):782-786.
- [10] Hull ML, Escareno CR, Godsland JM, et al. Endometrial-Peritoneal interactions during endometriotic lesion establishment[J]. *Am J Pathol*, 2008, 173(3):700-715.
- [11] Laschke MW, Menger MD. In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis[J]. *Hum Reprod Update*, 2007, 13(4):331-342.
- [12] Lopopolo M, Affaitati G, Fabrizio A, et al. Effects of tramadol on viscerovisceral hyperalgesia in a rat model of endometriosis plus ureteral calculosis[J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2014, 28(3):331-341.
- [13] Sevket O, Sevket A, Buyukpinarbasili N, et al. The effects of ranibizumab on surgically induced endometriosis in a rat model: a preliminary study[J]. *Reprod Sci*, 2013, 20(10):1224-1229.

(收稿日期:2015-03-20 修回日期:2015-05-24)

(上接第 3804 页)

列)连接并转入到慢病毒主体质粒中,载体中的 IRES 可以使 STAT3 和 GFP 分别在细胞内表达。将重组载体转染 293 T 细胞验证了 STAT3 插入载体后,Western blot 实验发现转染后的 293 T 细胞 STAT3 表达明显强化,表明其蛋白表达的正确及有效表达。载体质粒及包装质粒共转染 293 T 细胞 48 h 后通过荧光显微镜观察到大量绿色荧光,说明包装产毒成功。病毒滴度测定结果显示,获得的病毒滴度达到 8.4×10^7 TU/mL。本实验成功构建了 STAT3 和 GFP 基因共表达的高滴度慢病毒载体,为后继实验打下基础。

参考文献

- [1] Huang SY. Regulation of metastases by signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway: clinical implications[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(5):1362-1366.
- [2] Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes[J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(3):151-161.
- [3] de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(1):24-37.
- [4] da Cunha A, Michelin MA, Murta EF. Pattern response of dendritic cells in the tumor microenvironment and breast cancer[J]. *World J Clin Oncol*, 2014, 5(3):495-502.
- [5] Masciocchi D, Gelain A, Villa S, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3): a promising

target for anticancer therapy[J]. *Future Med Chem*, 2011, 3(5):567-597.

- [6] See AP, Han JE, Phallen J, et al. The role of STAT3 activation in modulating the immune microenvironment of GBM[J]. *J Neurooncol*, 2012, 110(3):359-368.
- [7] Brady MT, Miller A, Sait SN, et al. Down-regulation of signal transducer and activator of transcription 3 improves human acute myeloid leukemia-derived dendritic cell function[J]. *Leuk Res*, 2013, 37(7):822-828.
- [8] Flanagan SE, Haapaniemi E, Russell MA, et al. Activating germline mutations in STAT3 cause early-onset multi-organ autoimmune disease[J]. *Nat Genet*, 2014, 46(8):812-814.
- [9] Kaebisch R, Mejias-Luque R, Prinz C, et al. Helicobacter pylori cytotoxin-associated gene A impairs human dendritic cell maturation and function through IL-10-mediated activation of STAT3[J]. *J Immunol*, 2014, 192(1):316-323.
- [10] Masciocchi D, Gelain A, Villa S, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3): a promising target for anticancer therapy[J]. *Future Med Chem*, 2011, 3(5):567-597.

(收稿日期:2015-04-15 修回日期:2015-06-20)