

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.34.002

大鼠 Hes1 腺病毒干扰载体构建及功能鉴定^{*}

周学亮,方义湖[#],赵 勇,邹 斌,徐 华,吴起才,刘季春[△]
(南昌大学第一附属医院心脏大血管外科,南昌 330006)

[摘要] 目的 构建高滴度大鼠 Hes1 腺病毒干扰载体(Ad-Hes1-shRNA)。方法 设计 3 对 Hes1-shRNA 寡核苷酸序列,通过定向克隆构建 pHBAd-U6-CMV-Hes1-shRNA 干扰质粒,将 pHBAd-U6-CMV-Hes1-shRNA 和 pHBAd-BHG 共转染 293T 细胞,以包装 Ad-Hes1-shRNA,利用改进 TCID₅₀ 法进行病毒滴度测定。Ad-Hes1 感染 H9c2 心肌细胞,Western blot 检测 Hes1 表达。结果 pHBAd-U6-CMV-Hes1-shRNA 构建成功,Ad-Hes1-shRNA 包装顺利,滴度为 1.0×10¹¹ PFU/mL,并可在 H9c2 心肌细胞内发挥干扰效应。结论 Ad-Hes1-shRNA 包装成功,在心肌细胞中具有 Hes1 的干扰效应。

[关键词] 腺病毒科;RNA 干扰;寡核苷酸序列分析;Hes1;质粒构建;病毒包装

[中图分类号] R654.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)34-4757-03

Construction and functional identification of rat Hes1 adenovirus interference vector^{*}
Zhou Xueliang, Fang Yihu[#], Zhao Yong, Zou Bin, Xu Hua, Wu Qicai, Liu Jichun[△]
(Department of Cardiovascular Surgery, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[Abstract] **Objective** To construct the high titers rat Hes1 adenovirus interference vector (Ad-Hes1-shRNA). **Methods** 3 pairs of Hes1-shRNA oligonucleotide sequences were synthesized to construct the pHBAd-U6-CMV-Hes1-shRNA interference plasmid by directly clone. pHBAd-U6-CMV-Hes1-shRNA and pHBAd-BHG plasmids were co-transfected into 293 cells to Ad-Hes1-shRNA, virus titer are determined by modified TCID₅₀. Hes1 was detected by Western blot after Ad-Hes1-shRNA infected with H9c2 myocardial cells. **Results** pHBAd-U6-CMV-Hes1-shRNA was constructed successfully, Ad-Hes1-shRNA packaging smoothly with 1.0×10¹¹ PFU/mL titer, which can play the interference effect in the H9c2 myocardial cells. **Conclusion** The Ad-Hes1-shRNA is successfully packaged and has the interference effect of Hes1 in myocardial cells.

[Key words] adenoviridae; RNA interference; oligonucleotide array sequence analysis; Hes1; plasmid construction; virus packaging

发状分裂相关增强子-1(hairy and enhancer of split 1, Hes1)作为经典的抑制型碱性螺旋-环-螺旋(basic helix loop helix, bHLH)基因,激活后可有效拮抗激活型 bHLH 基因的表达水平^[1];同时作为 Notch 信号通路靶基因,在减轻心肌缺血再灌注损伤中发挥了重要调节作用^[2]。本研究拟采用腺病毒载体系统,通过设计针对大鼠 Hes1 基因干扰序列,构建 Hes1 腺病毒干扰载体(Ad-Hes1-shRNA),并感染 H9c2 心肌细胞,筛选干扰大鼠 Hes1 基因最佳的 Ad-Hes1-shRNA,为进一步观察 Hes1 信号通路在心肌细胞的作用奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及菌株

293T 细胞购于中科院上海生命科学院细胞库, DH5 α 超级化学感受态细胞购于 Invitrogen 公司。

1.1.2 大鼠 cDNA 文库及腺病毒载体系统

大鼠 cDNA 文库来购于大连 TaKaRa 公司; pHBAd-U6-CMV 载体、pHBAd-BHG 骨架质粒购于汉恒生物科技有限公司。

1.1.3 主要试剂

限制性内切酶(BamH I、EcoR I)购于 New England Biolabs 公司, T4 DNA Ligase 购于 Fermentas 公司, 质粒小/中量提取纯化试剂盒、DNA 纯化试剂盒、DNA 凝胶回收与纯化试剂盒购于康为世纪有限公司, LipofiterTM 购于

为汉恒生物科技有限公司, 细胞裂解液购于碧云天生物技术研究, Hes1 单克隆鼠抗购于 Abcam 公司, β -actin 单克隆鼠抗购于 Anbo 公司, HRP 标记的羊抗兔 IgG 购于北京中杉金桥生物技术有限公司, 增强化学发光底物购于 Pierce Biotechnology 公司。

1.1.4 引物设计与合成

针对大鼠 Hes1 基因, 设计 3 对 Hes1-shRNA 寡核苷酸序列(Hes1: 5'-CCG GGC AAG AAT AAA TGA AAG TTT G-3'; N1ICD-shRNA-2: 5'-CAG ACA TTC TGG AAA TGA CAG TGA A-3'; N1ICD-shRNA-3: 5'-CCT CTG AGC ACA GAA AGT CAT CAA A-3'), 分别插入 BamH I 与 EcoR I 酶切位点, 交上海桑尼生物技术有限公司合成 3 对寡核苷酸, 规格为 2A。

1.2 方法

1.2.1 pHBAd-U6-CMV-Hes1-shRNA 干扰质粒构建及筛选

将 3 对寡核苷酸退火形成双链, T4 DNA Ligase 连接 BamH I 与 EcoR I 双酶切后的双链 Oligonucleotide、pHBAd-U6-CMV。将 3 组连接产物转化 DH5 α 化学感受态细胞, 接种于 Amp⁺(氨苄西林)的 LB 培养基平板, 次日随机挑选阳性单克隆菌落, 摇菌过夜, 菌液送上海桑尼生物技术有限公司基因测序, 序列无误后分别命名为 pHBAd-U6-CMV-Hes1-shRNA-

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81570262);赣鄱 555 领军人才计划(赣组字[2013]58 号);江西省自然科学基金重大项目(20152ACB20026)。作者简介:周学亮(1980—),副主任医师,博士,主要从事心肌疾病的信号通路研究 [#] 共同第一作者:方义湖(1971—),教授,博士,主要从事心脏病理方面研究。 [△] 通讯作者, E-mail: liujichun999@163.com。

1、pHBAd-U6-CMV-Hes1-shRNA-2、pHBAd-U6-CMV-Hes1-shRNA-3。

1.2.2 Ad-Hes1-shRNA 包装、收毒、扩增及滴度测定 将 pHBAd-U6-CMV-Hes1-shRNA 2 μ g、pHBAd-BHG 4 μ g 共转染 293 细胞,6 h 后更换新鲜细胞培养液。每天观察细胞出毒迹象,出毒完毕后收集所有细胞及培养液,于-80 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 间冻融 3 次,3 000 r/min 离心 5 min,上清液即为 Ad-Hes1 第一代毒种(P1),作为毒种-80 $^{\circ}$ C 保存。取 P1 代毒种感染 293 细胞,待所有细胞脱落底面开始收毒,2 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 1 mL ST buffer(培养液+10%血清+2.5%甘油),Votex 混匀,于-80 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 间冻融 3 次,3 000 r/min 离心 5 min,取上清液(P2)-80 $^{\circ}$ C 保存。依前法利用 P2 代病毒大量扩增病毒,纯化后利用改良 TCID₅₀ 法行病毒滴度测定。

1.2.3 Ad-Hes1-shRNA 功能鉴定 H9c2 细胞传代 10⁷ 至 6

孔板,每孔分别加入约 Ad-NC、Ad-Hes1-shRNA-1、Ad-Hes1-shRNA-2、Ad-Hes1-shRNA-3,4 h 更换培养液,36 h 后收集细胞蛋白,Western blot 检测 Hes1 表达。

2 结 果

2.1 pHBAd-U6-CMV-Hes1-shRNA 干扰质粒成功构建 DNAMAN 比对分析 pHBAd-U6-CMV-Hes1-shRNA 阳性转化子菌基因测序结果,与 Hes1-shRNA 基因序列完全一致(图 1)。

2.2 Ad-Hes1-shRNA 包装、收毒、扩增及滴度测定 HBAd-U6-CMV-Hes1-shRNA、pHBAd-BHG 共转 293 细胞后,每天显微镜下观察细胞出毒迹象,出毒现象为细胞变大变圆,呈葡萄状,并开始出现明显噬斑,待细胞大部分病变并从底部脱落进行收毒,待细胞大部分病变并从底部脱落进行收毒(图 2)。利用改进 TCID₅₀ 法测定 Ad-Hes1-shRNA 滴度,结果为 1.0 \times 10¹¹ PFU/mL,体积 1 mL,总滴度为 1.0 \times 10¹¹ PFU。

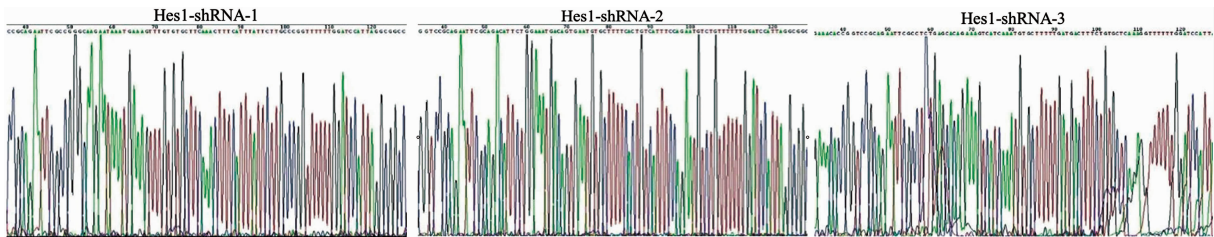


图 1 Hes1-shRNA 基因测序图

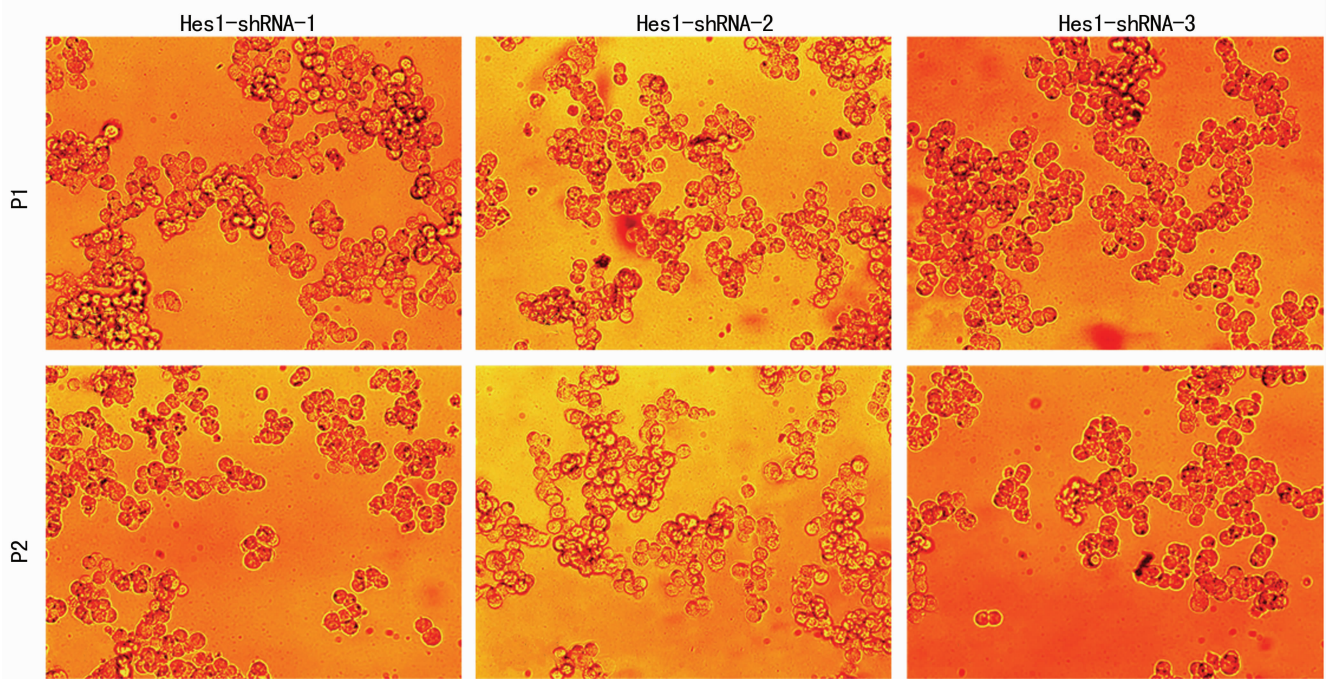
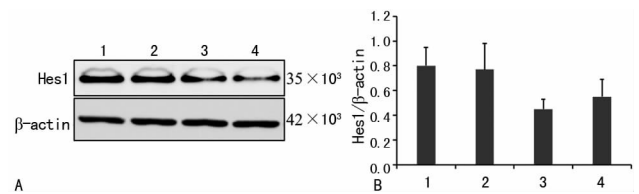


图 2 显微镜下 Ad-Hes1-shRNA 细胞出毒情况(\times 20)



A: Hes1 蛋白 Western blot; B: Hes1 蛋白灰度值。1:模拟感染组; 2: Ad-Hes1-shRNA-1; 3: Ad-Hes1-shRNA2; 4: Ad-Hes1-shRNA-3。

图 3 Ad-Hes1-shRNA 在 H9c2 心肌细胞内的干扰效应

2.3 Ad-Hes1 功能鉴定 构建成功的 Ad-Hes1-shRNA 干扰质粒转染 293T 细胞,48 h 后提总蛋白,Western blot 显示 Ad-Hes1-shRNA-2、Ad-Hes1-shRNA-3 均可达到满意的干扰效果,以 Ad-Hes1-shRNA-2 干扰效果最强,见图 3。

3 讨 论

Hes1 的功能研究目前大多集中在神经发育、体节形成、骨骼发育、T 淋巴细胞发育等四个方面^[3]。最近研究证明 Hes1 在心脏发育中具有重要调节作用,积极影响心室流出道的发育

成熟^[4]。Bhoopathi等^[5]发现Hes1基因表达可以显著促进内源性Stat3的酪氨酸磷酸化水平,并且在表皮生长因子诱导下,Hes1基因的表达使得Stat3更易转运进入细胞核,增加DNA与Stat3的结合活性。在作者前期研究中,同样发现作为Notch1信号通路靶基因,Hes1通过类似途径促进Stat3磷酸化,从而激活SAFE信号通路,发挥强大的心肌保护作用。Hes1无特异性抑制剂,特异性抑制Hes1并非易事,因此利用RNAi技术,针对特定Hes1蛋白构建相应干扰载体,可达到特异性抑制Hes1的作用。

RNA干扰技术是一种由内源性或者外源性双链DNA介导的转录后水平的基因沉默技术^[6-7]。短发卡RNA(short-hairpin RNA,shRNA)是根据siRNA设计的类似双链结构的RNA,相比于siRNA,其在随载体进入细胞时具有更高的内在稳定性,并且shRNA在细胞内可以由单个模板快速合成大量的shRNA,其沉默作用更加持久^[8]。目前,用于目的基因转移的病毒载体主要包括腺病毒、腺相关病毒、反转录病毒和慢病毒载体^[9]。与其他基因载体系统相比,腺病毒载体具有宿主范围广、可感染静止及分裂期细胞、感染率高、靶细胞内多拷贝高效表达、理化性质稳定、遗传毒性较低、包装容量大及不整合等优点,已在基因载体领域应用广泛^[10]。因考虑后期研究涉及细胞及动物实验,对病毒感染效率要求高,因此作者采用腺病毒载体系统构建Hes1干扰载体。

在Ad-Hes1-shRNA构建过程中,作者先用合成3对Hes1-shRNA的寡核苷酸,退火形成双链后利用定向克隆技术,构建HBAAd-U6-CMV-Hes1-shRNA,再与pHBAAd-BHG共转染293T细胞进行病毒包装,细胞出毒后收集第一代(P1)毒液,并以此为毒种进行第二代(P2)出毒及大量病毒扩增,病毒滴度测定后,再感染H9c2心肌细胞,以筛选干扰效果最佳的Ad-Hes1-shRNA,从而为Hes1对缺血心肌细胞保护作用的机制研究奠定了实验基础。

参考文献

[1] Tian C,Tang YJ,Wang TT,et al. HES1 is an Independent prognostic factor for acute myeloid leukemia[J]. *Onco*

(上接第4756页)

2012,32(4):281-285.

[13] Kolasa IK,RembiszewskaA,Janiec-Jankowska A,et al. PTEN mutation expression and LOH at its locus in ovarian carcinomas[J]. *Relation to TP53,K-RAS and BRCA1 mutations*. *Gynecol Oncol*,2006,103(2):692-697.

[14] Zhu L,Loo WT,Louis WC. PTEN and VEGF:possible predictors for sentinel lymph node micro-metastasis in breast cancer[J]. *Biomed Pharmacother*,2007,61(9):558-561.

[15] Schmitz M,Grignard G,Margue C,et al. Complete loss of PTEN expression as a possible early prognostic marker for prostate cancer metastasis[J]. *Int J Cancer*,2007,120(6):1284-1292.

[16] Liang Z,Li Y,Huang K,et al. Regulation of miR-19 to breast cancer chemoresistance through targeting PTEN[J]. *Pharm Res*,2011,28(12):3091-3100.

[17] Meng F,Henson R,Wehbe-Janek H,et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer[J]. *Gastroenterology*,

Targets Ther,2015,8(10):899-904.

[2] Zhou XL,Wan L,Xu QR,et al. Notch signaling activation contributes to cardioprotection provided by ischemic preconditioning and postconditioning[J]. *J Transl Med*,2013,11(1):251.

[3] Liu ZH,Dai XM,Du B. Hes1:a key role in stemness,metastasis and multidrug resistance[J]. *Cancer Biol Ther*,2015,16(3):353-359.

[4] Rochais F,Dandonneau M,Mesbah K,et al. Hes1 is expressed in the second heart field and is required for outflow tract development[J]. *PLoS One*,2009,4(7):e6267.

[5] Bhoopathi P,Chetty C,Dontula RA,et al. SPARC stimulates neuronal differentiation of medulloblastoma cells via the notch1/STAT3 pathway[J]. *Cancer Res*,2011,71(14):4908-4919.

[6] Sarisozen C,Salzano G,Torchilin VP. Recent advances in sirna delivery[J]. *Biomol Concepts*,2015,6(4):321-341.

[7] Karlsson C,Rak J,Larsson J. RNA interference screening to detect targetable molecules in hematopoietic stem cells[J]. *Curr Opin Hematol*,2014,21(4):283-288.

[8] Tan PH,Yu SW,Lin VC,et al. RNA interference-mediated gene silence of the NR1 subunit of the NMDA receptor by subcutaneous injection of vector-encoding short hairpin RNA reduces formalin-induced nociception in the rat[J]. *Pain*,2011,152(3):573-581.

[9] Liu YP,Berkhout B. miRNA cassettes in viral vectors: problems and solutions[J]. *Biochim Biophys Acta*,2011,1809(11/12):732-745.

[10] Janssen JM,Liu J,Skokan J,et al. Development of an AdEasy-based system to produce first- and second-generation adenoviral vectors with tropism for CAR- or CD46-positive cells[J]. *J Gene Med*,2013,15(1):1-11.

(收稿日期:2016-07-20 修回日期:2016-09-08)

2007,133(2):647-658.

[18] Huse JT,Brennan C,Hambardzumyan D,et al. The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo[J]. *Genes Dev*,2009,23(11):1327-1337.

[19] Yang H,Kong W,He L,et al. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer:miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN[J]. *Cancer Res*,2008,68(2):425-433.

[20] 黄秀兰,崔国辉,周克元. PI3K-Akt 信号通路与肿瘤细胞凋亡关系的研究进展[J]. *癌症*,2008,27(3):331-336.

[21] Wu H,Goel V,Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma[J]. *Oncogene*,2003,22(20):3113-3122.

[22] Maehama T,Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1,dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate[J]. *J Biol Chem*,1998,273(22):13375-13378.

(收稿日期:2016-07-18 修回日期:2016-09-06)