

慢病毒介导的大鼠肝 BRL-3A 细胞 Tmub1 基因沉默及稳定感染细胞系的建立*

王晓枫¹ 刘孟刚² 刘宏鸣² 周 波² 王宝林² 陈红旭² 陈 平^{2△}

(1 武警总医院肝脏移植研究所 北京 100039; 2 第三军医大学大坪医院肝胆外科 重庆 400042)

摘要 目的 构建 Tmub1 基因慢病毒干扰载体,建立稳定转染细胞系,检测大鼠肝 BRL-3A 细胞中 Tmub1 基因表达的干扰效果。方法:设计并构建 4 对针对大鼠 Tmub1 基因的特异性 shRNA 干扰质粒,酶切鉴定、DNA 测序所得质粒。将由 pRSV-Rev、pMDLg-pRRE、pMD2G 和 pLL3.7 干扰质粒组成的包装系统共转染 293T 细胞,产生慢病毒。所得慢病毒感染大鼠正常肝细胞 BRL-3A,Western Blot 检测不同靶点 RNAi 后 Tmub1 蛋白表达情况,确定有效靶点。针对有效靶点大量包装慢病毒。测定病毒滴度并以最适感染复数(multiplicity of infection, MOI)感染 BRL-3A 细胞后,G418 抗生素筛选稳定感染细胞系 BRL-3A/256。RT-PCR 和 Western Blot 检测各组细胞 Tmub1 mRNA 和蛋白质的表达差异。结果:结果显示 Tmub1 RNAi 慢病毒载体构建成功,C0020 Sh2-Hops-256 干扰靶点 RNAi 效果最强。成功包装 Tmub1 基因 RNAi 慢病毒,测定病毒滴度为 2.3×10^8 TU/ml,对 293T 细胞的最适感染复数为 60。成功建立 Tmub1 RNAi 慢病毒载体稳定感染细胞系 BRL-3A/256,且在该细胞系中 Tmub1 mRNA 和蛋白质表达明显降低。结论 成功构建 Tmub1 RNAi 慢病毒载体,有效干扰 BRL-3A 细胞中 Tmub1 mRNA 和蛋白表达 成功筛选出 Tmub1 RNAi 慢病毒稳定感染细胞系 BRL-3A/256。

关键词 Tmub1; RNA 干扰 慢病毒载体 BRL-3A

中图分类号 R575 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 16-3019-07

Lentivirus-mediated Tmub1 Silencing in BRL-3A and Establishment of RNAi Stable Cell Line*

WANG Xiao-feng¹, LIU Meng-gang², LIU Hong-ming², ZHOU Bo², WANG Bao-lin², CHEN Hong-xu², CHEN Ping^{2△}

(1 Institute of Liver Transplantation, General Hospital of Armed Police Forces, Beijing, 100039, China;

2 Department of Hepatobiliary Surgery, Daping Hospital, 3rd Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

ABSTRACT Objective: To construct a RNA interference (RNAi) lentivirus vector of Tmub1 gene, to establish a stable cell line with Tmub1 gene knockdowned, and to detect the silence effect of Tmub1 gene in rat hepatocyte cell line (BRL-3A) transfected with different RNAi vector. **Methods:** Four pairs of oligonucleotide sequences of the Tmub1 gene were designed and synthesized, and cloned into the pLL3.7 vector digested by Xho I and Hpa I, and then the vectors were confirmed by PCR and DNA sequencing. 293T cells were cotransfected with pRSV-Rev, pMDLg-pRRE, pMD2G and pLL3.7, to produce lentivirus. Carrying Tmub1 shRNA, BRL-3A cells were infected with lentivirus. RNA interference effect on Tmub1 expression in BRL-3A cells was detected with Western-Blot. The strongest interference plasmid was packaged to produce Tmub1 RNAi lentivirus LV256. Determine the virus titer and fittest multiplicity of infection (MOI). After BRL-3A cells was infected, G418 antibiotic as used to screen out the stably infected cells line BRL-3A/256. The Tmub1 mRNA and protein expression in the BRL-3A/256 cells line were detected by RT-PCR and Western Blot. **Results:** The data demonstrated that the lentivirus RNAi vector of Tmub1 was constructed successfully. And the C0020 Sh2-Hops-256 target showed the best interference effects. The titer of virus was 2.3×10^8 TU/ml, and the fittest MOI in 293T was 60. Stably infected cells line BRL-3A/256 was successfully established and showed low expression of Tmub1 mRNA and protein. **Conclusion:** The lentivirus RNAi vector of Tmub1 is constructed successfully, and it had effect on the mRNA and protein expression of Tmub1. The stably transfected cells line BRL-3A/256 is established successfully.

Key words: Tmub1; RNA interference; Lentivirus vector; BRL-3A

Chinese Library Classification(CLC): R575 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)16-3019-07

前言

肝脏具有巨大的再生潜能,能够通过内源性途径激活自身肝细胞再生,充分发挥自身肝脏的再生能力,或将为防治肝功

* 基金项目 国家自然科学基金面上项目 (30972895)

作者简介 王晓枫 (1981),男,硕士,主要研究方向 肝脏再生相关分子机制,干细胞肝脏外科临床应用,

E-mail: michaelwong1981@163.com

△通讯作者 陈平,电话 023-68757966, E-mail: chenping10701@hotmail.com

(收稿日期 2011-10-15 接受日期 2011-11-10)

能衰竭开辟一条新途径。但是肝细胞增殖和肝脏再生是一个非常复杂的过程,涉及大量基因转录、蛋白质合成,并构成复杂的信号通路网络,关于肝细胞增殖调控的分子机制、肝脏再生启动的机制以及肝脏再生的影响因素等都没有得到肯定的答案。研究表明,大鼠 70% 肝切除(partial hepatectomy, PH)后最早、最明显的变化是门静脉系统的改变^[1],肝血窦内压力增高,门静脉血液中各种体液因子(如 IL-6、胰岛素、内皮生长因子、肝细胞生长因子等)浓度增加,低氧的静脉血流相对增加,而动脉血变化不大,使剩余肝脏处于相对低氧的状态^[2,3]。另外,肝血流的急剧变化将活化肝窦内皮细胞 (sinusoidal endothelial cell, SEC),促使其分泌大量肝细胞刺激因子。血流刺激培养模型培养的肝窦内皮细胞分泌的上清液也富含 IL-6、肝细胞生长因子(HGF)、肿瘤坏死因子 alpha(TNF-α)等肝细胞增殖刺激因子,刺激肝细胞增殖^[4]。参与调控肝再生的胞内信号通路主要有 G 蛋白偶联受体信号通路、酪氨酸激酶受体信号通路、补充胞质激酶受体信号通路、核激素受体信号通路等^[5]。2005 年 Della Fazio 等通过对肝切除后肝细胞的 cDNA 文库与对照组肝细胞比较分析,首次报道 Tmub1(transmembrane and ubiquitin-like domain containing 1) 基因,当时命名为 hepatocyte odd protein shuttling (Hops)。Tmub1 蛋白为一种细胞核—细胞浆穿梭蛋白,担负着复杂而又重要的功能,但其是否在肝脏再生过程中起到传递肝细胞增殖信号或调控细胞增殖关键点的作用,目前尚无报道。在本实验研究中,我们运用慢病毒介导的 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术,构建 Tmub1 基因的 shRNA 慢病毒真核表达载体 LV256,并体外转染 BRL-3A 大鼠正常肝细胞,筛选稳定感染细胞系 BRL-3A/256。为深入了解 Tmub1 基因和蛋白在肝细胞增殖和肝再生过程中的作用及分子生物学机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

BRL-3A 大鼠正常肝细胞株、293T 细胞株以及 Hela 细胞购自中科院上海细胞所。DMEM 高糖培养基、LB 培养基、胎牛血清、胰酶、Opti-MEM(GIBCO 公司),dNTPS、Taq 聚合酶、Agarose Gel DNA Purification Kit Ver2.0、Total RNA 提取试剂、RT-PCR 反转录试剂盒(TaKaRa 公司),XhoI 和 HpaI 限制性内切酶、XbaI 和 NheI 限制性内切酶(Fermentas 公司),慢病毒包装系统 (Tronolab 公司),pI3.7 载体、shDNA 退火缓冲剂、1kb/100bp ladder (Telebio Biomedical 公司),T4 Ligation Buffer (北京中杉金桥公司),T4 DNA 连接酶(NEB 公司),质粒 DNA 提取试剂盒(Axygen 公司),制备感受态试剂盒(BIOSCIENCES 公司),凝胶回收试剂盒(Qiagen 公司),Polybrene、G418、Ampicillin(Sigma 公司),rabbit anti-Tmub1 多克隆抗体(Hiroto Hara Ph.D 馈赠),Goat anti rabbit IgG(ABCAM 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 Tmub1 慢病毒载体的构建

1.2.1.1 寡聚核苷酸的设计 针对 Tmub1 基因 (Accession No. AY603378 种属 大鼠)由上海吉玛公司设计并合成 4 对模板链(表 1)。主要设计依据为 1Lentivirus-shRNA 模板中的 loop 结构选用了 TTCAAGAGA 以避免形成终止信号;正义链模板的 5' 端添加了 T,与 BbsI 酶切后形成的粘端互补;反义链模板的 5' 端添加了 AGCT,与 XhoI 酶切后形成的粘端互补。正义链: 5'-T-(GN18)-(TTCAAGAGA)-(N18C)-TTTTTTC- 3';反义链与正义链互补 5' 端产生 XhoI 酶切位点 3'-A (CN18)-(AAGTTCTCT)-(N18G)-AAAAAAGAGCT-5'。

表 1 Tmub1 RNAi 靶点及相应 shRNA 序列
Table 1 Tmub1 RNAi targets and shRNA sequences

靶点	shRNA 序列
C0019	正义链 5'TGGTTCGACTCATCTACCAAGGTTCAAGAGACCTTGGTAGATGAGTCGAACCTTTTTTC-3'
	反义链: 5'TCGAGAAAAAAGGTTTCGACTCATCTACCAAGGTCTCTTGAACCTTGGTAGATGAGTCGAACCA-3'
C0020	正义链 5'TGGTCTCAACACATACGACTGATTCAAGAGATCAGTCGTATGTGTTGAGACCTTTTTTC-3'
	反义链 5' TCGAGAAAAAAGGTCTCAACACATACGACTGATCTCTTGAATCAGTCGTATGTGTTGAGACCA3'
C0021	正义链 5'TGCCATGACAGCCATTGATAGCTTCAAGAGAGCTATCAATGGCTGTCATGGCTTTTTTC-3'
	反义链: 5'TCGAGAAAAAAGCCATGACAGCCATTGATAGCTCTTGAAGCTATCAATGGCTGTCATGGCA-3'
C0022	正义链 5'TGCTACGGTTGAAATTTCTCAATTCAAGAGATTGAGAAATTTCAACCGTAGCTTTTTTC-3'
	反义链: 5'TCGAGAAAAAAGCTACGGTTGAAATTTCTCAATCTCTTGAATTGAGAAATTTCAACCGTAGCA-3'

1.2.1.2 重组慢病毒载体的构建 将经 Xho I、Hpa I 双酶切线性化的 pI3.7 载体 1 μl,DNA oligo 退火形成 shDNA 片段 1 μl, 10× T4 Ligation Buffer 2 μl,T4 DNA ligase 1 μl,ddH₂O 15 μl 配制成 20 μl 连接反应体系,22 ℃ 连接 1 h。连接产物转化 JM109 感受态。每个连接反应挑取 5 个菌落,接种到含 50

μg/ml Ampicillin 的 LB 培养基中。使用碱裂解法抽提质粒,用 Xba I 和 Nhe I 分别对四个重组载体(C0019、C0020、C0021、C0022)进行双酶切鉴定、DNA 测序。
1.2.1.3 慢病毒载体的包装与纯化 将各载体(pRSV-Rev 10 μg, pMDLg-pRRE 15 μg,pMD2G 7.5 μg,pI3.7 干扰质粒 20 μg)加

入无菌水定容至 1.8 ml 再加入 CaCl_2 (2.5 mol/L) 溶液 200 μl 混匀, 加入 $2\times$ BBS 缓冲盐溶液 2.0 ml, 室温放置 20 min, 当细胞密度达 60%~70% 时, 将配制好的病毒包装系统溶液转移至含 293T 细胞的培养液中混匀, 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱中培养。12 h 后弃去培养液, 加入 PBS 15 ml 清洗 3 次, 加入含 10% FBS 的细胞培养液 15 ml, 37°C 、5% CO_2 继续培养 48 h。收集 293T 细胞上清液, 4°C 、4000rpm 离心 10 min, 收集上清液。将各种不同 RNA 干扰质粒上清液以 0.45 μm 滤器过滤, 分装后 -70°C 冰箱保存。

1.2.2 有效干扰序列的筛选

1.2.2.1 在 BRL-3A 细胞上筛选有效干扰序列 将 BRL-3A 细胞接种到六孔细胞培养板中, 37°C 、5% CO_2 培养箱培养 24 h, 细胞密度为 60%~70% 时, 更换新鲜的含 2% FBS 的 DMEM 高糖培养基, 加入阴性对照病毒 (Negative), 重组慢病毒载体 C0019、C0020、C0021、C0022 病毒上清液各 1 ml, 培养 24 h 后更换新鲜含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基 37°C 、5% CO_2 继续培养 72 h。收取细胞, 并提取各组细胞蛋白进行 Western Blot 检测。

1.2.2.2 Western Blot 检测不同干扰靶点慢病毒载体对 BRL-3A 细胞 Tmub1 蛋白表达的干扰 重组慢病毒感染 BRL-3A 细胞 96 h 后提取细胞蛋白。弃去旧培养基, 预冷的 PBS 清洗细胞 3 次, 各加入冷的 RIPA 裂解缓冲液 150 μl , 收集细胞至 1.5 ml EP 管中, 超声, 离心, 留取上清。取出少量细胞裂解液测其蛋白浓度, 加入上样 Buffer, 95°C 变性 5 min, 放 -20°C 冰箱保存。聚丙烯酰胺凝胶 (10% 分离胶、4% 积层胶) 电泳, 90V 电压下电泳 30 min, 125V 继续电泳, 至溴酚蓝跑至分离胶的底部, 停止电泳。125 mA 电流转膜 1 h 至 PVDF 膜。TBST 液中短暂漂洗 2 min, 放入含 5% 脱脂奶粉 TBST 室温下封闭 1 h; TBST 洗膜 10 min $\times$ 3 次。将 PVDF 膜置于一抗溶液中 (浓度 1:1000), 4°C 过夜; TBST 洗膜 15 min $\times$ 3 次。将膜置于二抗溶液中 (浓度 1:5000), 孵育 1 h; TBST 洗膜 15 min $\times$ 3 次。取等量 ECL A 液和 B 液 (0.125 ml/cm²) 混合, 将膜置于溶液中温育 2 min, 使其充分浸润并沥干膜; 于暗房中曝光、显影、过水、定影, X 光片晾干。凝胶成像系统获取蛋白条带图像, Quantity 软件进行信号分析, 以 GAPDH 蛋白的灰度值进行校正。

1.2.3 重组慢病毒的大量包装与纯化 将四质粒包装系统 (pRSV-Rev 10 μg , pMDLg-pRRE 15 μg , pMD2G 7.5 μg , C0020 干扰质粒 20 μg) 加入无菌水定容至 1.8 ml, 再加入 CaCl_2 (2.5 mol/L) 溶液 200 μl 混匀, 加入 $2\times$ BBS 缓冲盐溶液 2 ml, 室温放置 20~30 min。当 293T 细胞密度达 60%~70% 时将配制好的病毒包装系统溶液转移至含 293T 细胞的培养液中混匀, 37°C 、5% CO_2 培养 12 h 后弃去培养液, 加入 PBS 15 ml, 清洗 3 次; 加入含 10% FBS 的细胞培养液 15 ml, 37°C 、5% CO_2 继续培养 48 h, 收集转染 72 h 的 293T 细胞上清液, 将收集的上清液于 4°C 、4000rpm 离心 10 min, 收集上清液, 将 C0020 干扰质粒上清液以 0.45 μm 滤器过滤; 于 40 ml 超速离心管中, 4°C 、25000 r/min 离心 20 min, 500 μl PBS 重悬病毒沉淀, 分装后于 -70°C 冰箱保存。

1.2.4 慢病毒载体滴度测定 用 DMEM 培养基重悬对数生长期 Hela 细胞, 接种 2×10^4 细胞/孔, 待细胞贴壁。于 5 个 EP 管中

分别加入 300 μl 无血清 DMEM 培养基, 取 1 μl 浓缩病毒原液至第 1 管, 混匀后再从第 1 管取 30 μl 至第 2 管, 依次类推直至最后一管, 各组加入的病毒原液相当于 1 μl 、0.1 μl 、0.01 μl 、0.001 μl 、0.0001 μl 。以稀释好的慢病毒感染 Hela 细胞, 并在每组加入 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Polybrene。感染 24 h 后换含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 感染 72 h 再次换液, 感染后 96 h 行 FACS 检测细胞 GFP (绿色荧光蛋白, Green Fluorescent Protein) 阳性率, 滴度计算公式为 (原始细胞数 $\times$ GFP%) / 病毒原液量。

1.2.5 稳定感染细胞系的筛选 用含有 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基重悬 BRL-3A 细胞至 5×10^5 个/ml, 在 96 孔板中每孔加入 100 μl 重悬细胞, 于 37°C 、5% CO_2 培养箱内培养。次日解冻慢病毒液, 更换新鲜含 2% FBS 的 DMEM 培养基, 加入病毒液 15 μl , 轻轻混匀。所得 MOI 值为病毒滴度 (Tu/ml) $\times$ 病毒液体积 / 感染细胞数。加入浓度为 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 Polybrene, 37°C 、5% CO_2 培养箱 6 h 后换含 10% FBS 的完全培养基, 72 小时后, 将细胞传代铺板。感染后 96 小时, 加入 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 进行杀伤实验, 每隔 3~4 天更换新鲜的含 G418 的培养基, 第 11 天鉴定到抗性克隆, 挑选 5 个表达水平最高的克隆, 继续培养获得稳定感染细胞系, 命名为 "BRL-3A/256"。

1.2.6 BRL-3A/256 细胞系中 Tmub1 mRNA 及蛋白检测

1.2.6.1 RT-PCR 检测 BRL-3A/256 细胞中 Tmub1 mRNA 的表达 将 BRL-3A 大鼠正常肝细胞系 (Control)、稳定感染细胞系 BRL-3A/256 (LV256) 和阴性对照病毒感染组 (Negative) 分别接种于 6 孔板, 37°C 、5% CO_2 培养箱内培养 96 h 后, 加入 Trizol 试剂 1.0 ml 裂解细胞, 提取总 RNA, DNase I 消化混入的基因组 DNA, 最后进行苯酚/氯仿抽提、乙醇沉淀等纯化总 RNA。紫外分光光度计检测所得 RNA 质量。

根据 Tmub1 基因序列设计 RT-PCR 反应引物, 正向引物链 5'-TCTGTCGAGAACTTAGGA-3'、反向引物链: 5'-TCTGGAGGTGTTGATGCTG-3'。 β -actin 引物 正向引物链: 5'-GTGGGTATGGGTCAGAAGGA-3'、反义引物链 5'-AGCGCGTAACCCCTCATAGAT-3', 扩增片段长为 380 bp。逆转录反应根据 TaKaRa 公司 PrimeScript RT Reagent Kit 说明书所述条件步骤进行。PCR 反应条件 95°C , 2 min; 95°C , 30 s; 62°C , 30 s; 72°C , 30 s (25 个循环); 2.5% 琼脂糖电泳检测 PCR 产物。

1.2.6.2 Western Blot 检测 BRL-3A/256 细胞中 Tmub1 蛋白的表达 将 BRL-3A 大鼠正常肝细胞系 (Control)、稳定感染细胞系 BRL-3A/256 (LV256) 和阴性对照病毒感染组 (Negative) 分别接种于 6 孔板, 37°C 、5% CO_2 培养箱内培养 96 h 后, 弃去原培养基, 预冷 PBS 清洗 2 次, 加入 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, 检测蛋白浓度。加入上样 Buffer, 95°C 变性 5 min。聚丙烯酰胺凝胶电泳 (10% 分离胶、4% 积层胶), 125 mA 恒流电流转膜 1 h 至 PVDF 膜, 在 TBST 液中短暂漂洗 1~2 min, 5% 脱脂奶粉 TBST 封闭, 室温下摇 45 min~1 h。用 TBST 洗膜 10 min $\times$ 3 次。将 PVDF 膜置于一抗溶液中 (一抗浓度 1:1000), 4°C 过夜。用 TBST 洗膜 15 min $\times$ 3 次。将膜置于二抗溶液中 (浓度 1:5000), 摇床上孵育 1 h。TBST 洗膜 15 min $\times$ 3 次。加 ECL 化学发光剂 1 ml, 暗房中曝光、显影、过水、定影, 凝胶成像系统获取蛋白条带图像, Quantity 软件进行信号分析, 以 α -actin 蛋白的

灰度值进行校正。

1.3 统计学分析

各分组所得计量数据采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 SPSS10.0 软件处理数据,两组间均数比较用 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒 DNA 鉴定结果

Tmub1 基因特异性 Lentivirus-shDNA 寡核苷酸序列模板经退火形成双链 DNA,与经 *Xho* I、*Hpa* I 双酶切线性化的 pI3.7 载体进行连接反应后,使用碱裂解法抽提质粒后,所得质粒用 *Xba* I 和 *Nhe* I 分别对四个重组载体(C0019、C0020、C0021、C0022)进行双酶切鉴定(图 1),所有质粒在 1000 bp 大小的均为阳性重组载体,将每组克隆进行测序鉴定。测序结果证实,Tmub1 shRNA 寡核苷酸序列插入正确,表明 Tmub1 shRNA 慢病毒载体构建成功。各个干扰靶点对应 shRNA 质粒 C0019 Sh1-Hops-586 GGTTCGACTCATCTACCAAGG C0020 Sh2-Hops-256 GGTCTCAACACATA CGACTGA C0021 Sh3-Hops-335 GCCATGACAGCCATTGATAGC C0022 Sh4-Hops-481 GCTACGGTTGAAATTTCTC。

2.2 在 BRL-3A 细胞中针对 Tmub1 基因筛选有效的干扰序列

用 pRSV-Rev,pMDLg-pRRE,pMD2G 和干扰质粒组成的包装系统进行慢病毒包装。再用包装好的 Tmub1 慢病毒载体感染 BRL-3A 细胞,培养 72 h 后,收取细胞,并提取细胞蛋白做 Western Blot 检测(图 2)。结果显示 C0020 Sh2-Hops-256 干扰效果最佳。将含有此质粒的 Tmub1 RNAi 慢病毒载体命名为 LV256 并进行大量包装,用于后续实验研究。

2.3 慢病毒载体滴度测定结果

用倍比稀释法稀释病毒液并感染 Hela 细胞 96 h 后 FACS 检测细胞 GFP 阳性率。并用所得数据按以下滴度计算公式计算所得慢病毒滴度 (原始细胞数×GFP%)/病毒原液量。原始细胞数 2×10^4 个/孔,即获得 $(2 \times 10^4 \times 11.82\%)$ TU/0.01 μ l= 2.3×10^5 TU/ μ l= 2.3×10^8 TU/ml。

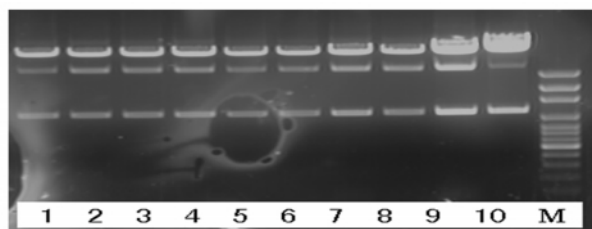


图 1 重组载体的酶切鉴定 M λ mda/Eco130I 1、2 为 C0019 酶切结果,3、4 为 C0020 酶切结果,5、6 为 C0021 酶切结果,7、8 为 C0022 酶切结果,9、10 为阳性对照

Fig.1 Restriction enzyme digestion of recombinant plasmid.

M: λ mda/Eco130I; 1, 2: C0019; 3, 4: C0020; 5, 6: C0021; 7, 8: C0022; 9, 10: Positive control

2.4 最适感染复数 MOI 值的测定

倒置荧光显微镜观察病毒对目的细胞的感染效率和细胞的生长状态(图 3)。最适感染复数(MOI)为 60 时,在 293T 细胞

中慢病毒 LV256 可有较高感染效率,且细胞生长状态良好。但鉴于目的细胞 BRL-3A 大鼠正常肝细胞与 293T 细胞相比通常较难被感染,故提高 MOI 值为 70 的 LV256 感染 BRL-3A 细胞可达较佳的感染效率,且细胞生长状态良好。并在此基础上用 G418 抗生素筛选稳定转染细胞系 BRL-3A/256。

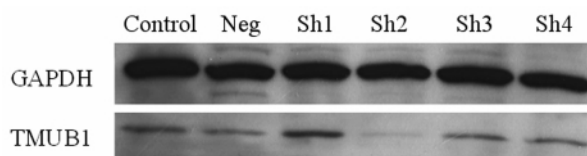


图 2 Western Bolt 检测结果显示感染重组慢病毒 C0020 Sh2-Hops-256 后 Tmub1 蛋白表达明显下调

Fig. 2 Western Blot result: Tmub1 expression significantly down-regulated after transfected with C0020 Sh2-Hops-256

2.5 Tmub1 RNAi 慢病毒稳定感染细胞系的筛选和建立

以 MOI 为 70 的病毒液感染 BRL-3A 细胞,培养 72 h 后,将细胞传代铺板,当细胞密度为 50%~60%时,加入 100 μ g/ml G418 进行杀伤实验。每隔 3~4 天更换新鲜的含 G418 的培养基,第 11 天鉴定到抗性克隆。挑选至少 5 个表达水平最高的克隆,继续培养获得稳定感染的 BRL-3A/256 细胞系(图 4)。

2.6 稳定感染细胞系 BRL-3A/256 中 Tmub1 mRNA 及蛋白表达检测

RT-PCR 验证 Tmub1 RNAi 慢病毒稳定感染细胞系 BRL-3A/256 中 Tmub1 基因的 mRNA 表达情况。结果表明,该细胞系 Tmub1 mRNA 表达较 Control 组与 Negative 组相比明显降低,Control 组与 Negative 组间 Tmub1 mRNA 表达无明显差异(图 5)。

Western Blot 验证 Tmub1 RNAi 慢病毒稳定感染细胞系 BRL-3A/256 中 Tmub1 蛋白的 mRNA 表达情况。结果表明,该细胞系 Tmub1 蛋白表达较 Control 组与 Negative 组相比明显降低,Control 组与 Negative 组间 Tmub1 蛋白表达无明显差异(图 6)。

3 讨论

肝脏再生的发生发展机制极为复杂,肝切除后肝细胞内近 500 个基因在此时期有明显的变化,其中 Tmub1 基因表达在手术后 6、24 h 均明显上调。Della Fazia 等的研究结果显示:1、肝细胞的 Tmub1 mRNA 在 PH 术后明显增加,而正常肝细胞却检测不到;2、Tmub1 蛋白质合成在 PH 术后早期即开始逐渐增加,到术后 48 小时达到高峰,此后又缓慢下降;3、正常情况下 Tmub1 蛋白的亚细胞定位于细胞核中,胞浆中很少,PH 术后 30 分钟开始向胞浆中转运,术后 8 小时基本转运至胞浆中,术后 12 小时又开始向细胞核中转运,到了术后 48 小时基本上全在核内,而术后 72 小时又开始缓慢的向胞浆中转运;4、Tmub1 蛋白为一种细胞核-细胞浆穿梭蛋白,其氨基酸结构中含有细胞核输出信号区域 (nuclear export signal region, NES),Tmub1 通过 CRM-1 从核输出至胞浆中,此过程可以被 CRM-1 特异性抑制剂来谱霉素 B (lyptomycin B, LMB) 阻断;5、过表达 Tmub1 可阻断大鼠 H-35 肝癌细胞增殖,而且,应用相应逆转录病毒载

体对 Tmub1 RNAi 后引起的 NIH-3T3 细胞增殖也可由于 Tmub1 的过表达而发生增殖抑制^[6]。研究还发现,HOPS/Tmub1 与 eEF-1A(延长因子 1-A)结合从而干扰蛋白质的合成。现在认识到 Tmub1 基因,位于大鼠 4 号染色体 4q11 位置,基因全长 1381bp,蛋白质全长 245 个氨基酸,其中包含一个类似泛素结构的区域(ubiquitin-like domain ;102-175aa),一个脯氨酸富集区域(proline rich region ;176-183aa),3 个亮氨酸富集的 alpha 螺旋结构 (Leucine rich alpha -helixes ;13-32,190-212,197-209aa)。然而其在肝细胞增殖和肝脏再生过程中的确切作用还不清楚。以往研究表明,肝部分切除术(partial hepatectomy,PH)诱导肝

再生的过程中 IL-6 是重要的因素之一^[7]。Cressman 等^[8]发现, IL-6 基因缺失小鼠 PH 术后肝细胞 DNA 合成明显受抑制,G1 期异常,包括 STAT3 的激活被抑制,AP1、Myc 及 cyclinD1 的表达亦呈抑制状态,这也就是说由于 IL-6 基因的缺失,肝细胞的增殖受到抑制,而对于术前给予 IL-6 的小鼠来说,上述改变可以得到纠正。另有研究发现 TNF- α 受体 I(TNFR1)基因剔除的小鼠 PH 术后的肝细胞增殖抑制现象也可以通过注射 IL-6 得到恢复^[9]。缺失 IL-6 基因的小鼠肝细胞 DNA 合成受阻^[10]。因此,可以认为 IL-6 促进肝细胞增殖,而且它与 TNF- α 一样是启动肝再生的早期信号转导机制中不可缺少的组成部分。

293TCells

BRL-3A

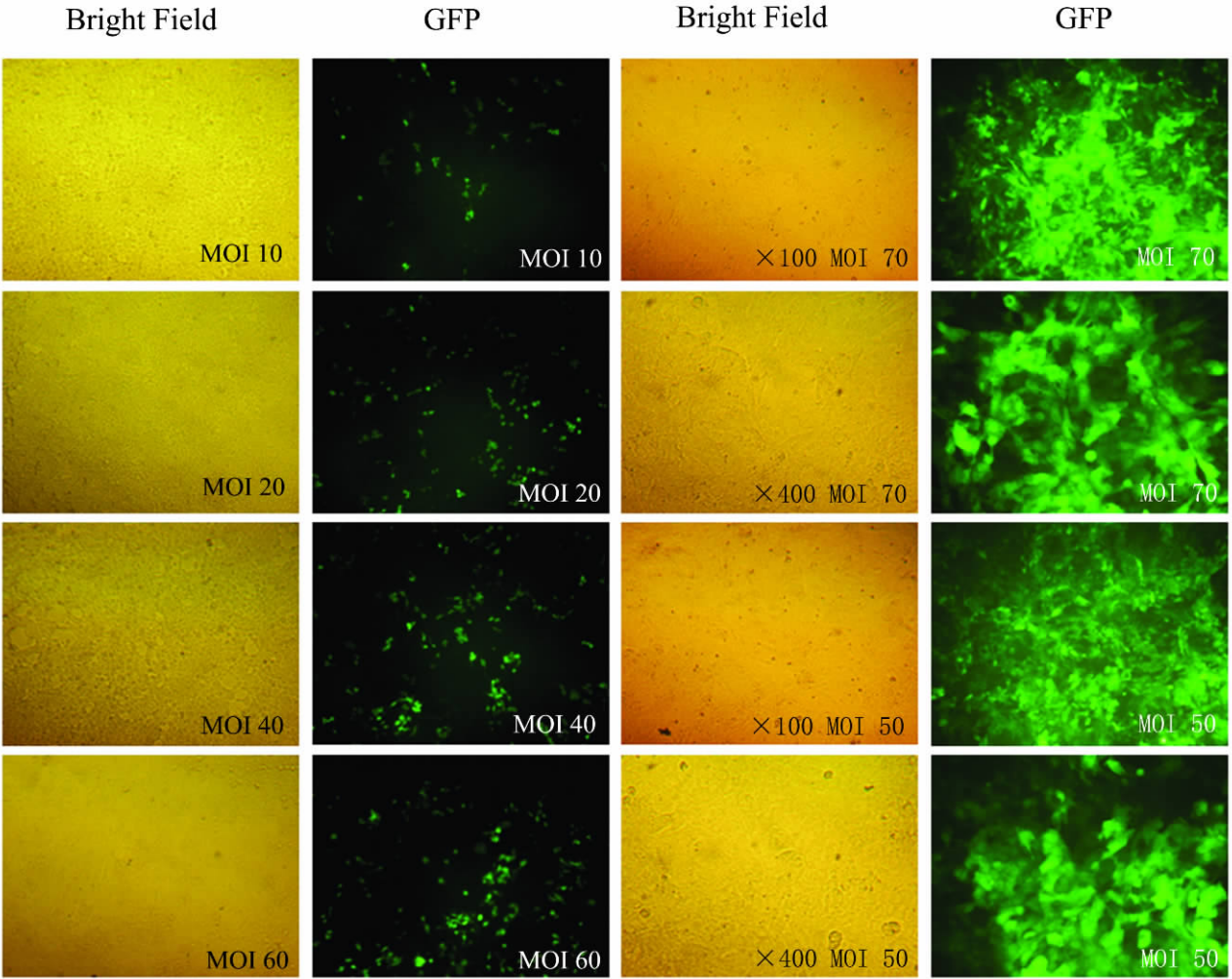


图 3 最适感染复数(MOI)的测定

Fig. 3 Efficiency of GFP expression in 293T and BRL-3A cells after infection with different MOI

PH 术后,肝细胞或组织大量缺失,刺激肝脏库弗氏细胞迅速释放 TNF- α 及其他细胞因子,引起氧自由基 (ROS) 产生, NF- κ B 激活,发生核转移,活化下游基因,IL-6 表达增加。IL-6 与其受体 IL-6R 结合,触发 gp130 形成同源二聚体并激活 JAK^[11]。随后,gp130 被 JAK 磷酸化,进而使 STAT3 发生磷酸化,活化的 STAT3 和其他的转录因子(C/EBP β 、AP-1)协同增强 c-myc,

c-fos 等与细胞增殖相关因子的表达,并协同 HGF、EGF 等生长因子共同促进肝细胞的有丝分裂和增殖^[12,13]。因此可以认为, PH 术后 NF- κ B $\rightarrow$ IL-6 $\rightarrow$ STAT3 信号通路被激活,最终启动了肝脏的再生^[14]。NF- κ B 是这条传导通路上一个关键环节,IL-6 分泌及 STAT3 活化和 c-myc 的表达均依赖于 NF- κ B 的活化^[15]。有学者用分别剔除 IL-6 和 C/EBP β /NF-IL-6 基因的小鼠进行试

验,结果发现 2 种小鼠在肝大部切除术后均表现出肝脏再生障碍^[16]。将 IL-6 进行皮下注射可促进大鼠的肝细胞增殖,血及肝组织中 HGF 含量于注射 IL-6 1 天后明显增高,这说明 IL-6 的促肝细胞增殖作用与由 IL-6 引发的 HGF 增高密切相关^[17]。然而也有证据表明,IL-6 可以不依赖于 HGF、TGF、EGF 而直接促进肝再生,从而调控肝细胞的生长^[18]。IL-6 作为一种典型的多效性细胞因子可以调节多种诸如细胞增殖和分化等生理事件,调控多种特殊基因的表达,尤其是肝细胞中急性期蛋白(acute phase proteins,APP)的表达^[19]。有研究表明,给裸鼠注射 IL-6 后在没有肝脏损伤的情况下会导致肝脏肿大以及肝细胞增生。这表明 IL-6 在肝脏中作为一个完整的促细胞分裂原,而不是在肝脏再生的启动阶段作为启动效应的介质。转录因子 STAT3 通过细胞因子 IL-6 来激活后迅速诱导即刻早期基因表达^[20]。活化的 STAT3 一般在 PH 后 1~2h 内即可出现,并且可以持续 4~6h^[21]。STAT3 活化后进入核内,调节与炎症、细胞增殖、急性期反应等有关的基因表达^[22]。有学者认为 PH 后即刻早期基因迅速地被激活,表达上调,且其高表达水平会持续增加到开始合成 DNA^[23]。Niehof 等^[24]研究发现,在 IL-6 的诱导下磷酸化的 STAT3 (tyrosine-phosphorylated STAT3) 在核中的表达在给药 30min 后可明显升高,且在 4h 内可维持高表达状态,而在给药 12h 后则检测不到其表达。

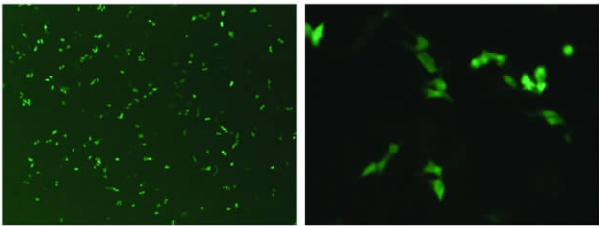


图 4 Tmub1 RNAi 慢病毒稳定感染细胞系 BRL-3A/256 细胞系
Fig. 4 BRL-3A/256 stable cell line of Tmub1 RNAi mediated by lentivirus

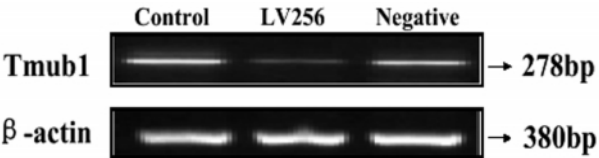


图 5 Tmub1 PCR 产物凝胶电泳结果
Fig. 5 Result of Tmub1 mRNA expression

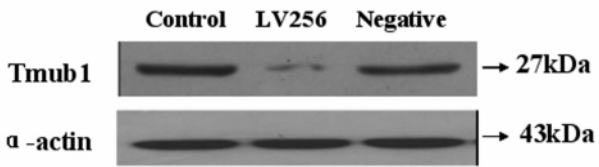


图 6 Tmub1 蛋白质 Western Blot 检测结果
Fig. 6 Result of Tmub1 protein expression

基于上述研究,我们推测 PH 术后,NF- κ B $\rightarrow$ IL-6 $\rightarrow$ STAT3 信号传导通路被激活,从而促进肝细胞增殖及肝脏再生的同时,为了防止细胞过度增殖,IL-6 的大量表达也可使 Tmub1 表达增强,从而抑制肝细胞增殖和肝再生过程中的某些重要因

子,而对肝细胞增殖和肝再生过程起到调控作用。本研究旨在利用 RNAi 技术,使大鼠肝正常肝细胞 BRL-3A 中 Tmub1 基因表达沉默,以深入地了解及求证探讨 Tmub1 与 IL-6/STAT3 信号传导通路之间的关联,以及它在 IL-6 诱导的肝细胞增殖和肝再生过程中的作用。

慢病毒载体介导的 RNAi 技术感染细胞的范围较广,能够高效感染肝细胞等稳定细胞,且 RNAi 稳定性强、作用持久。更为重要的是它能够将遗传物质整合到宿主的基因组,因此更有利于稳定感染细胞系的建立和在活体动物实验中的应用。本研究中,我们首先设计、筛选了 4 针对大鼠 Tmub1 基因的 RNAi 靶序列,并以 U6 为启动子,分别构建 4 种表达 Tmub1 shRNA 的质粒。再用 pRSV-Rev、pMDLg-pRRE 和 pMD2G 质粒组成的辅助包装原件载体质粒与慢病毒干扰质粒一起进行慢病毒的小量包装。shRNA 质粒能表达绿色荧光蛋白(GFP),pRSV-Rev,pMDLg-pRRE,pMD2G 含有病毒包装所必须的元件。分别用不同 Tmub1 shRNA 质粒生产的慢病毒感染目的细胞 BRL-3A,结果显示含有 C0020 的慢病毒载体对 Tmub1 基因表达的特异性抑制效率最高,提示序列 Sh2-Hops-256 GGTCTCAACACATACGACTGA 为 Tmub1 基因的有效靶序列。而后,我们用 C0020 大量包装生产了表达 Tmub1 shRNA 的慢病毒载体,至此 Tmub1 RNAi 慢病毒载体 LV256 构建成功。该载体能表达由 CMV 启动子驱动 GFP,可用于病毒包装时转染效率及感染宿主细胞效率的检测。其次,我们用倍比稀释法和 FACS 技术检测细胞 GFP 阳性率,计算出获得重组慢病毒的滴度为 2.3×10^8 TU/ml。随后,在倒置荧光显微镜下观察不同 MOI 的病毒对 293T 细胞和 BRL-3A 细胞的感染效率和细胞的生长状态。当 MOI 为 60 时,在 293T 细胞中慢病毒 LV256 可有较高感染效率,且细胞生长状态良好。但鉴于肝细胞与 293T 细胞相比通常较难被感染,故提高 MOI 值为 70,用于感染 BRL-3A 细胞,即在感染 5×10^4 个细胞时使用 $15 \mu\text{l}$ 滴度为 2.3×10^8 TU/ml 病毒液。结果显示,重组慢病毒有效感染 BRL-3A 细胞,且细胞生长状态良好。在此基础上我们用 G418 抗生素对感染了 Tmub1 RNAi 慢病毒载体大鼠肝 BRL-3A 细胞进行达 12 天的杀伤实验,筛选出了 Tmub1 RNAi 慢病毒稳定感染细胞系 BRL-3A/256。用 RT-PCR 与 Western Blot 方法检测稳定感染细胞系 BRL-3A/256 中 Tmub1 mRNA 和蛋白质的表达水平。结果显示,BRL-3A/256 细胞系 (LV256 组) 中 Tmub1 mRNA 和蛋白质表达水平均比仅添加等量生理盐水的 BRL-3A 细胞 (Control 组) 显著降低;而由于 Negative 组的 BRL-3A 细胞只感染了包含 pL3.7 空载体,未对 Tmub1 表达进行干预,因此其 Tmub1 表达水平与 Control 组相近。这表明 BRL-3A/256 稳定感染细胞系筛选成功,此细胞中 Tmub1 表达被有效抑制。综合实验数据证实,Tmub1 RNAi 慢病毒表达载体构建成功,干扰片段在稳定感染细胞系 BRL-3A/256 中稳定表达,为进一步研究 Tmub1 基因及蛋白产物对大鼠肝细胞系 BRL-3A 生物学行为的影响,探讨 Tmub1 在肝细胞增殖和肝再生中相关信号传导通路中的作用,寻找肝功能衰竭的新疗法奠定了基础。

参考文献 (References)

[1] Morine Y, et al. Effects of preactivation by portal vein ligation on liver

- regeneration following massive hepatectomy in rats [J]. Hepatogastroenterology, 2007, 54(76):1216-1221
- [2] Khan Z, Michalopoulos G K, Stolz D B. Peroxisomal localization of hypoxia-inducible factors and hypoxia-inducible factor regulatory hydroxylases in primary rat hepatocytes exposed to hypoxia-reoxygenation[J]. Am J Pathol, 2006,169(4): 1251-1269
- [3] Fausto N, Campbell J S, Riehle K J. Liver regeneration[J]. Hepatology, 2006,43(Suppl 1): 45-53
- [4] Ping C, et al. Hepatic sinusoidal endothelial cells promote hepatocyte proliferation early after partial hepatectomy in rats[J]. Arch Med Res, 2006, 37(5): 576-583
- [5] 刘现忠, 李相成, 仲跻巍. 肝脏再生信号机制研究进展[J]. 中华肝脏病杂志, 2007,15(2):158-160
Liu Xian-zhong, Li Xiang-cheng, Zhong Ji-wei. The signal mechanisms in liver regeneration [J]. Chinese Journal of Hepatology, 2007, 15(2):158-160
- [6] Della Fazio, et al. HOPS: a novel cAMP-dependent shuttling protein involved in protein synthesis regulation[J]. J Cell Sci, 2005, 118(14): 3185-3194
- [7] Salazar Montes A, et al. Chemically induced liver regeneration is characterized by specific IL-6 gene expression [J]. Hepato Res, 1999, 15: 10-21
- [8] Cressman DE, et al. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice [J]. Science, 1996, 274(5291): 1379-1383
- [9] Galun E, et al. The role of cytokines in liver failure and regeneration: potential new molecular therapies [J]. Biochim Biophys Acta, 2002,1592(3): 345-358
- [10] Streetz KL, Luedde T, Manns MP. Interleukin 6 and liver regeneration[J]. Gut,2000,47:309-312
- [11] Hirano T, Kishimoto T. Molecular biology and immunology of interleukin-6[J]. Res Immunol,1992,143(7):723-724
- [12] Luk JM, Wang PP, Lee CK, et al. Hepatic potential of bone marrow stromal cells: development of invitro co-culture and intra-portal transplantation models[J]. J Immunol Methods, 2005, 305(1):39-47
- [13] Bardelli A, Saha S, Sager JA, et al. PRL-3 expression in metastatic cancers[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(15): 5607-5615
- [14] Gehling UM, Willems M, et al. Partial hepatectomy induces mobilization of a unique population of haematopoietic progenitor cells in human healthy liver donors[J]. J Hepatol, 2005, 43(5): 845-853
- [15] Liu F, Pan XB, Chen GD, et al. Hematopoietic stem cell mobilization after rat partial orthotopic liver transplantation [J]. Transplant Pro, 2006, 38(7):1603-1609
- [16] Lu C, Li Y, Zhao Y, et al. Intracrine hepatopoietin potentiates AP-1 activity through independent of MAPK pathway [J]. FASEB J, 2002,16(1): 90-92
- [17] Khan AZ, Mudan SS. Liver regeneration: mechanisms, mysteries and more[J]. ANZ J Surg, 2007, 77(1-2): 9-14
- [18] Zimmers TA, et al. Massive liver growth in mice induced by systemic interleukin 6 administration [J]. Hepatology, 2003, 38 (2): 326-334
- [19] Thiele DL, et al. Tumor necrosis factor, the acute phase response and the pathogenesis of alcoholic liver disease[J]. Hepatology, 1989, 9(3): 497-499
- [20] Rakemann T, Niehof M, Kubicka S, et al. The designer cytokine hyperinterleukin-6 is a potent activator of STAT3-dependent gene transcription in vivo and in vitro [J]. J Biol Chem, 1999, 274 (3): 1257-1266
- [21] Cantz T, Zuckerman D, Burdam. Quantitative gene expression analysis reveals transition of fetal liver progenitor cells to mature hepatocytes after transplantation in uPA/ RAG22 mice [J]. Am J Pathol, 2003, 162(1): 37-45
- [22] Leu JI, Crissey MA, Leu JP, et al. Interleukin-6-induced STAT3 and AP-1 amplify hepatocyte nuclear factor 1-mediated transactivation of hepatic genes, an adaptive response liver injury [J]. Mol Cell Biol, 2001, 21(2): 414-424
- [23] Hovew, van Hoek B, Bajema I, et al. Extensive chimerism in liver transplants: vascular endothelium, bile duct epithelium, and hepatocytes[J]. Liver Transplantation, 2003, 9: 552-556
- [24] Monika Niehof, Konrad Streetz, Tim Rakemann, et al. Interleukin-6-induced Tethering of STAT3 to the LAP/C/EBP β Promoter Suggests a New Mechanism of Transcriptional Regulation by STAT3 [J]. J Biol Chem, 2001, 276: 9016-9027