

• 基础实验研究论著 •

人 GLIPR-2 基因慢病毒 RNAi 载体的构建及鉴定

张乐乐, 黄绍光, 蒋栋能, 李 毅, 刘 飞, 蒲晓允[△]

(第三军医大学新桥医院检验科, 重庆 400037)

摘要:目的 构建人 GLIPR-2 基因慢病毒 RNA 干扰(RNAi)载体,并鉴定其感染人肝癌细胞系 HepG2 后缺氧条件下的 GLIPR-2 基因表达变化。方法 根据 GLIPR-2 基因序列合成 siRNA 片段,克隆至慢病毒载体 pMAGi7.1 上,转染 293T 细胞进行包装,收获并浓缩重组慢病毒颗粒。感染 HepG2 细胞,流式细胞术检测 GFP 的表达率,并用 Western blot 检测目的蛋白在缺氧条件下的表达变化。结果 重组 RNAi 质粒 pMAGi7.1-shRNA-GLIPR-2 经菌落 PCR 鉴定及测序证实构建正确;稳定感染 HepG2 细胞后,GFP 的表达率分别为 84.48%、69.97% 和 39.82%;Western blot 结果显示慢病毒转染组 GLIPR-2 蛋白的表达水平较对照组明显降低。结论 成功构建了 GLIPR-2 基因慢病毒 RNAi 载体,该载体在缺氧条件下可明显抑制目的蛋白在 HepG2 细胞中表达,为进一步研究 GLIPR-2 的生物学功能奠定了基础。

关键词:GLIPR-2; 慢病毒载体; RNA 干扰**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2013.24.011**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2013)24-3294-03**Construction and identification of RNAi lentiviral vectors targeting human GLIPR-2 gene**Zhang Lele, Huang Shaoguang, Jiang Dongneng, Li Yi, Liu Fei, Pu Xiaoyun[△]

(Department of Clinical Laboratory, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To construct a lentiviral RNA interference(RNAi) vector targeting GLIPR-2 gene and identify the expression of GLIPR-2 in infected hepatocellular carcinoma cell line HepG2 under hypoxia condition. **Methods** The siRNA fragment was synthesized according to GLIPR-2 gene sequence and cloned into lentiviral vector pMAGi7.1. The recombinant lentivirus plasmid was transfected to 293T cell line, and the packaged virus was determined for titer. Recombinant lentivirus particles were harvested and concentrated, then infected to HepG2 cells and determined the expression rate of GFP by flow cytometry and the expression of GLIPR-2 by Western blot under hypoxia condition. **Results** PCR amplification of bacterial colony and sequencing proved that recombinant lentiviral plasmid were constructed correctly. The expression rate of GFP in HepG2 cells stably infected with the recombinant lentiviral plasmid was 84.48%, 69.97% and 39.82%, while the expression level of GLIPR-2 significantly decreased compared with the control. **Conclusion** The lentiviral RNA interference vector GLIPR-2 was constructed successfully and could suppress GLIPR-2 expression in HepG2 cells, which laid a foundation of further study on biological function of GLIPR-2.

Key words:GLIPR-2; lentiviral vector; RNAi

神经胶质瘤致病相关蛋白-2(GLIPR-2)属于植物致病相关蛋白(PR-1)家族,首次发现于坏死性病毒感染植物的免疫反应中^[1]。组织筛查发现 GLIPR-2 在单核细胞、肺脏、脾脏中高表达,这种特异性表达提示其可能与哺乳动物的免疫系统有关^[2]。Baxter 等发现人 GLIPR-2 与肾纤维化发生发展密切相关,在肾纤维化过程中表达上调^[3]。研究显示 GLIPR-2 基因可通过磷酸化 ERK1/2 通路促进肾小管上皮细胞的间质化转变(EMT),此型 EMT 被分类为 II 型 EMT^[4]。本研究发现, GLIPR-2 在肝癌组织中表达增加,缺氧微环境是促进其表达的因素之一,表达该基因的肝癌细胞迁移侵袭能力明显增强,但 GLIPR-2 是否通过调控 III 型 EMT 进而促进肝癌细胞的迁移侵袭能力还需进一步研究。为此本研究通过构建 GLIPR-2 基因慢病毒 RNAi 载体并感染肝癌细胞株 HepG2 细胞,确定其是否能够抑制该基因的表达,为进一步研究 GLIPR-2 的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒及细胞 慢病毒干扰载体 pMAGi7.1 购自上海生博医学生物工程有限公司; pCD/NL-BH DDD 包装质粒和 pLTR-G 质粒均购自 Addgene 公司(美国); 293T, HOS 和 HepG2 细胞为本科室保存细胞株; DH5 α 感受态细胞购自 TaKaRa 公司(日本)。

1.2 仪器及试剂 胎牛血清和 DMEM 培养基购自 HyClone

公司(美国); Opti-MEM 培养基和 SunBioTM Trans-EZ 转染试剂购自上海生博生物科技有限公司; 寡核苷酸退火缓冲液(5 \times)和 Western blot 试剂购自碧云天生物技术研究所; DNA 聚合酶、dNTP、DNA 回收试剂盒和 DL2 000 DNA Marker 购自 TaKaRa 公司(日本); T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司(加拿大); Age I 和 EcoR I 购自 NEB 公司(美国); 质粒小抽提试剂盒购自 Promega 公司(美国); DNA 定量试剂盒购自 Bio-Rad 公司(美国); 小鼠抗人的 GLIPR-2 单克隆抗体和 β -action 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司(美国); 辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; FAC-Saria 流式细胞仪购自 BD 公司(美国)。

1.3 目的基因 RNA 干扰慢病毒载体构建及鉴定 查询 GenBank 数据库, 获得 GLIPR-2 序列(NM_022343), 设计了 3 个针对 GLIPR-2 基因的 siRNA 序列和阴性对照 siRNA 序列。通过 GenBank 数据库比对, 证明所选择的序列与其他基因没有同源性。正反链之间各有 9 个寡核苷酸(TTCAAGAGA)间隔, 以 TTTT 作为终止信号, 两端分别引入 Age I 和 EcoR I 酶切位点。合成好的寡核苷酸经退火形成双链 DNA 片段与 Age I 和 EcoR I 双酶切后的慢病毒载体 pMAGi7.1 产物, 按 1:3 比例混合, 加入 T4 连接酶于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接好的产物转入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 挑取阳性克隆, 进行菌落 PCR 鉴定, 上游引物: 5'-TAC GAT ACA AGG CTG TTA

GAG AG-3',下游引物:5'-CTA TTA ATA ACT AAT GCA TGG C-3'。对鉴定正确的质粒将其菌液送公司测序,测序正确后,再继续接种抽提质粒。

1.4 慢病毒包装及浓缩 对数生长期的 293T 细胞作为包装细胞,慢病毒载体系统的三种质粒 pMAGic7. 1-shRNA-GLIPR-2 质粒、pCD/NL-BH DDD 包装质粒和 pLTR-G 膜蛋白表达质粒按 SunBio™ Trans-EZ 转染试剂使用说明进行共转染 293T 细胞,于 37℃、5% CO₂ 孵箱中继续培养 6 h 后,更换为 DMEM 完全培养基。培养 48 h 后,收集所有上清液,4℃、500 g 离心 10 min,上清过滤后分装成 50 μL 每份,保存在病毒管中,-80℃ 长期保存。

1.5 定量 PCR 法测定病毒滴度 6 孔板接种对数生长期的 HOS 细胞,每孔细胞为 5×10⁴ 个。24 h 后取两孔计数,确定感染时细胞的实际数目。将浓缩病毒用培养基稀释 200 倍,在 3 个培养孔中分别加入 0.5、5、50 μL 的稀释病毒。继续培养 48 h。按 DNA 回收试剂盒和定量试剂盒使用说明抽提基因组 DNA 并定量。在预冷的 96 孔 PCR 板上建立 PCR 体系。测得的 DNA 样品中整合的慢病毒载体拷贝数用基因组数加以标定,得到每基因组整合的病毒拷贝数。

1.6 重组慢病毒感染 HepG2 细胞 将处于对数生长期的 HepG2 细胞接种于 6 孔板中,37℃、5% CO₂ 培养,待细胞融合度达到约 30%~40%;根据 HepG2 复感染指数(MOI),加入适量浓缩病毒液,再加入多聚凝胺调制终浓度为 5 μg/mL;24 h 后更换新鲜完全培养基;72 h 后,收集细胞,PBS 清洗 2 遍后再用 1 mL PBS 重悬细胞,流式细胞仪检测 GFP 阳性率,收集 GFP 阳性的细胞,继续培养。

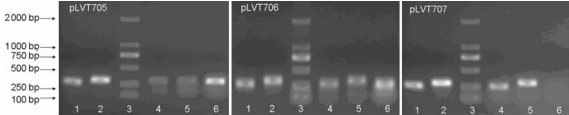
1.7 Western blot 检测 GLIPR-2 蛋白的表达 将感染慢病毒的细胞于缺氧条件下培养 48 h,收集细胞,裂解,蛋白定量,各取 20 μg 进行 SDS-PAGE 电泳,20 V 电压半干转移 30 min,

PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉的 TBST 中,封闭 2 h,TBST 洗膜 3 次,加入小鼠抗人 GLIPR-2 单克隆抗体(封闭液稀释 1:200)和 β-actin 单克隆抗体(封闭液稀释 1:1 000)4℃ 过夜反应,TBST 洗膜 3 次,再加入 HRP 标记的山羊抗小鼠二抗(封闭液稀释 1:5 000)37℃ 反应 1 h,TBST 洗膜 3 次,DAB 显色。

2 结 果

2.1 合成的双链 DNA 片段 针对 GLIPR-2 基因设计的 3 个 siRNA 序列(分别为 LVT705、LVT706、LVT707)和阴性对照 siRNA 序列(LVT7)。并分别合成包含这 4 条 siRNA 序列的短发夹状 RNA(shRNA)模板(下划线部分),经退火形成双链 DNA 片段,见表 1(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

2.2 重组慢病毒质粒的鉴定 各挑 3 个长出的转化子进行 PCR 鉴定,其扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析,阴性克隆(空载体自连)得到 285 bp 条带,阳性克隆(以 pLVT7 为标准)得到 331 bp 条带,见图 1。



1:阳性克隆(空载体,285 bp);2:阳性克隆(以 pLVT7 为标准,331 bp);3:DL2000 DNA 标记物;4~6:挑取的 3 个转化子(pLVT705 中的 4、5、6,pLVT706 中的 5,pLVT707 中的 5 所代表的转化子为 shRNA-GLIPR-2 片段定向插入了载体的重组质粒)。

图 1 重组慢病毒质粒的 PCR 鉴定

2.3 重组慢病毒质粒 重组慢病毒质粒测序结果,见表 2。

2.4 重组慢病毒的滴度 根据公式计算出 pLVT705 滴度为 2.56×10⁹ IU/mL;pLVT706 滴度为 2.22×10⁸ IU/mL;pLVT707 滴度为 1.32×10⁹ IU/mL;pLVT7 滴度为 1.04×10⁹ IU/mL。

表 2 重组慢病毒质粒测序

序列号	测序结果
pLVT705	CTG GGG AAA A...GGA CGA AAC ACC GGC CTT GCA TGG GCA TCC TAT TTC AAG AGA ATA GGA TGC CCA TGC AAG GTT TTT TGA ATT CGG ATC...ACA CTT CTC T
pLVT706	TTT AGA ATT A...GGA CGA AAC ACC GGG ATG GTA CAG TGA AAT CAA TTCA A GAG ATT GAT TTC ACT GTA CCA TCT TTT TTGAAT TCG GAT C...TCT CAC CCG A
pLVT707	GTT TAC ATA T...GGA CGA AAC ACC GGG CCA TGG TAT GGA AGA ACA TTC A AGA GAT GTT CTT CCA TAC CAT GGC TTT TTT GAA TTC GGA TC...AAA CCG TCA G
pLVT7	CTT TAA TAT A...GGA CGA AAC ACC GGT TCT CCG AAC GTG TCA CGT TTC AAG AGA ACG TGA CAC GTT CGG AGA ATTT TTG AAT TCG GAT C...GTG TAA ATC A



图 3 GLIPR-2 在缺氧环境下的表达



A:重组慢病毒 pLVT705 感染组与对照慢病毒感染组比较;B:重组慢病毒 pLVT706 感染组与对照慢病毒感染组比较;C:重组慢病毒 pLVT707 感染组与对照慢病毒感染组比较。

图 4 Western blot 检测感染慢病毒的 HepG2 细胞中 GLIPR-2 的表达

2.5 重组慢病毒感染 HepG2 细胞的效率 慢病毒感染

HepG2 细胞,72 h 后,经流式细胞仪检测,对照慢病毒 GFP 的表达率为 71.02%,重组慢病毒 GFP 的表达率分别为 84.48%、69.97%、39.82%,见图 2(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

2.6 慢病毒感染 HepG2 细胞后 GLIPR-2 蛋白在缺氧条件下的表达变化 首先检测缺氧(1% O₂)刺激 0、24、48、72 h 后 HepG2 细胞 GLIPR-2 的表达变化,随缺氧时间的延长,GLIPR-2 的表达量逐渐增加,见图 3。感染慢病毒后,缺氧 48 h 后检测 GLIPR-2 蛋白水平的表达,重组慢病毒感染组与对照慢病毒感染组比较,GLIPR-2 表达量明显下降,表明构建的重组质粒能够在 HepG2 细胞中高效表达,见图 4。

3 讨 论

原发性肝癌(HCC)是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,由于肝癌细胞在初期就具有很强的迁移和侵袭能力造成全身转移致使其预后不良,常常导致患者的死亡[5]。上皮间质化

转变(EMT)在肿瘤的迁移侵袭中扮演着重要的角色,此型 EMT 被分类为Ⅲ型 EMT^[6]。体外实验已经证实,在 EMT 过程中,已分化的上皮细胞失去极性和黏附性(E-cadherin 下调)获得肌成纤维细胞表型(α -平滑肌肌动蛋白和波形蛋白上调),并伴随着细胞迁移和侵袭能力的增强^[7-8]。缺氧微环境普遍存在于多种恶性实体瘤中,主要是由于肿瘤生长十分迅速、氧消耗量及弥散的距离增加;肿瘤血管增生异常血流淤滞、血供不足,因而使得肿瘤区域氧的供求失衡而出现相对缺氧^[9-11],其被认为是引发 EMT 过程的诱因^[8,12]。因此,研究肝癌在缺氧条件下发生转移的机制,寻找有效的干预靶点显得尤为重要。

GLIPR-2 是 PR 蛋白质超家族中的一种位于高尔基体的膜蛋白,具有 PR 保守结构域,在体内的分布较为局限,具有一定的组织和细胞特异性。本研究发现 GLIPR-2 促进了Ⅱ型 EMT 的发生,但该基因是否能够促进Ⅲ型 EMT 并在肿瘤的发展进程中发挥作用尚不清楚。数据显示缺氧刺激 0、24、48、72 h 后能显著上调 HepG2 细胞 GLIPR-2 蛋白水平,为此进一步探讨 GLIPR-2 基因在肝癌细胞侵袭转移中的作用,发现分子机制,有望以 GLIPR-2 为靶点,为临床防治肝癌早期转移提供新的途径和理论基础,具有广阔的社会应用前景。

目前慢病毒被广泛地应用于 RNA 干扰的研究中。慢病毒载体较反转录病毒载体具有宿主范围更广,能够有效感染周期性和非周期性细胞等特点,能够实现在多种类型细胞中稳定的基因功能性沉默,为在人和动物组织的原代细胞中快速而高效地抑制特定基因的表达,研究基因功能,提供了可能性。在本实验中所使用的 pMAGic7.1 是一种高效慢病毒表达载体,通过与干扰片段连接,成功构建重组慢病毒质粒,达到干扰 GLIPR-2 表达的目的,并能够在 HepG2 细胞中高效表达,为进一步研究 GLIPR-2 的生物学功能奠定了基础。

参考文献

[1] van Loon LC, van Kammen A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. “Samsun” and “Samsun NN”. II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus[J]. *Virology*, 1970, 40(2): 190-211.

[2] Groves MR, Kuhn A, Hendricks A, et al. Crystallization of a Gol-

gi-associated PR-1-related protein(GAPR-1) that localizes to lipid-enriched microdomains[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2004, 60(Pt 4): 730-732.

[3] Baxter RM, Crowell TP, George JA, et al. The plant pathogenesis related protein GLIPR-2 is highly expressed in fibrotic kidney and promotes epithelial to mesenchymal transition in vitro[J]. *Matrix Biol*, 2007, 26(1): 20-29.

[4] Huang S, Liu F, Niu Q, et al. GLIPR-2 Overexpression in HK-2 Cells Promotes Cell EMT and Migration through ERK1/2 Activation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58574.

[5] Christofori G. New signals from the invasive front[J]. *Nature*, 2006, 441(7092): 444-445.

[6] Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(4): 265-273.

[7] Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(1): 1-12.

[8] Harrison L, Blackwell K. Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy? [J]. *Oncologist*, 2004, 9 Suppl 5: S31-40.

[9] Sahlgren C, Gustafsson MV, Jin S, et al. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(17): 6392-6397.

[10] Simon F, Bockhorn M, Praha C, et al. Deregulation of HIF1-alpha and hypoxia-regulated pathways in hepatocellular carcinoma and corresponding non-malignant liver tissue—influence of a modulated host stroma on the prognosis of HCC [J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2010, 395(4): 395-405.

[11] Tanaka M, Masaki Y, Tanaka K, et al. Reduction of fatty acid oxidation and responses to hypoxia correlate with the progression of de-differentiation in HCC[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(2): 365-370.

[12] Subarsky P, Hill RP. The hypoxic tumour microenvironment and metastatic progression[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2003, 20(3): 237-250.

(收稿日期:2013-07-28)

(上接第 3293 页)

决,如口服 HP1188-IgY 后在体内的分布、稳定性、抗感染作用的发挥、储存稳定性以及质量标准的确立等都有待进一步研究和探索。

参考文献

[1] Agarwal K, Agarwal S. *Helicobacter pylori* vaccine: from past to future[J]. *Mayo Clin Proc*, 2008, 83(2): 169-175.

[2] 胡伏莲. 中国幽门螺杆菌耐药研究现状[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2008, 17(7): 517-518.

[3] Sugiyama T, Asaka M. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer[J]. *Med Electron Microsc*, 2004, 37(3): 149-157.

[4] 谢川,吕文华. 幽门螺杆菌与胃肠外疾病的关系[J]. *中华消化杂志*, 2011, 31(12): 843-845.

[5] Rubinsztein-Dunlop S, Guy B, Lissolo L, et al. Identification of two new *Helicobacter pylori* surface proteins involved in attachment to epithelial cell lines[J]. *J Med Microbiol*, 2005, 54(Pt 5): 427-434.

[6] 邹全明. 幽门螺杆菌疫苗的研究进展[J]. *胃肠病学*, 2007, 12(9):

567-570.

[7] 郭立君,李春晖,赵锋,等. 抗轮状病毒 IgY 的研制[J]. *中国生物制品学杂志*, 2001, 14(1): 24-26.

[8] Rudiger Sejade,张小莺,郑礼. IgY 技术及其医药应用理论基础[J]. *中国药理学通报*, 2004, 20(5): 491-595.

[9] Shin JH, Yang M, Nam SW, et al. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002, 9(5): 1061-1066.

[10] 韩飞,杨致邦,王长本,等. 抗幽门螺杆菌 HP1188 蛋黄抗体的研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(4): 390-392.

[11] Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, et al. Classification and grading of gastritis: the updated Sydney system[J]. *Am J Surg Pathol*, 1996, 20(10): 1161-1181.

[12] 黄进,秦思栋,杨致邦,等. HpaA IgY 抑制小鼠胃内幽门螺杆菌的定植[J]. *免疫学杂志*, 2008, 24(5): 522-526.

(收稿日期:2013-08-18)