

• 论 著 •

ICAT 干扰慢病毒表达载体构建及稳转 HL60 细胞株的建立*

王晋蜀¹, 王伟佳², 王 婷¹, 张 彦^{1△}

(1. 重庆医科大学检验医学院/临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016;

2. 中山市人民医院检验医学中心, 广东中山 528403)

摘 要:目的 构建 ICAT 基因的干扰慢病毒表达载体, 建立稳定转染的 HL60 细胞系。方法 人工设计、合成针对 ICAT 基因干扰序列, 退火后连接到 PGLV3 干扰载体上, 与 PG-p1-VSVG、PG-p1-REV、PG-p1-RRE 共转染 293T 细胞, 包装产生慢病毒颗粒并测定病毒滴度, 感染 HL60 细胞, 建立稳定细胞株; 应用 RT-PCR 和 Western Blot 技术检测 HL60 稳定细胞中 ICAT 基因和蛋白表达情况, 并与对照组进行比较。结果 成功构建了针对 ICAT 基因的 RNAi 慢病毒表达载体, 病毒滴度为 2×10^8 TU/mL; 建立稳定转染的 HL60 细胞株。有效干扰验证显示, shICAT 能明显降低 ICAT 的 mRNA 及蛋白水平 ($P < 0.001$)。结论 成功构建 ICAT 基因的 shRNA 慢病毒表达载体, 建立稳定干扰 ICAT 表达的 HL60 细胞株。

关键词: ICAT 基因; RNA 干扰; HL60 细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.07.004

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)07-0875-03

Construction of ICAT interference lentivirus expression vector and establishment of stable HL60 cell line*

Wang Jinshu¹, Wang Weijia², Wang Ting¹, Zhang Yan^{1△}

(1. Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, School of

Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Laboratory

Medical Center, Zhongshan Municipal People's Hospital, Zhongshan, Guangdong 528403, China)

Abstract: Objective To construct the ICAT gene interference lentivirus expression vector targeting and to establish stable transfected cell line HL60. **Methods** The interference sequence targeted at human ICAT gene was designed and synthesized, after annealing, which was connected to PGLV3 interference vector and with PG-p1-VSVG, PG-p1-REV, PG-p1-RRE were co-transfected into 293T cells. The lentivirus particles were packaged and generated. The virus titer was detected. HL60 cells were transfected for establishing the stable cell line; RT-PCR and Western Blot techniques were used to detect ICAT gene and protein expression in stable HL60 cells, then the results were compared with those in the control group. **Results** The lentivirus expression vector targeted at ICAT was successfully constructed and the virus titer was 2×10^8 U/mL. Stable transfected HL60 cell line was established. The effective interference verification revealed that shICAT could significantly reduce the mRNA and protein level of ICAT ($P < 0.001$). **Conclusion** The shRNA lentiviral expression vector of ICAT gene is successfully constructed and the HL60 cell line stably interfering ICAT expression is established.

Key words: ICAT gene; RNA interference; HL60 cell

Wnt 信号传导途径的调控失常是导致多种类型细胞发生癌变的主要原因之一, 该途径成员之一 beta-连环蛋白和 T 细胞因子 4 激活可发生癌变, 而另一成员 beta-连环蛋白和 T 细胞因子 4 抑制子 (inhibitor of beta-catenin and TCF-4, ICAT) 通过抑制 beta-连环蛋白和 T 细胞因子 4 复合物的形成而对 Wnt 信号传导途径进行负调控来发挥抑癌作用。

本研究构建针对 ICAT 基因的 shRNA 慢病毒干扰表达载体, 感染 HL60 细胞, 建立稳定干扰 ICAT 的细胞株, 为进一步 ICAT 在白血病中的功能研究奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 细胞与试剂 人早幼粒白血病细胞系 HL60 细胞购自中国科学院上海生命科学研究所细胞库; 293T 细胞为本实验室冻存; 细胞培养采用 IMDM、DMEM (Hyclone USA) 和胎牛血清 (Gibco USA); 慢病毒载体系统: PGLV3、PG-p1-VSVG、PG-p1-REV、PG-p1-RRE 为重庆威斯腾生物构建制备; DNA 内切酶 (BamHI、EcoRI)、DNA 连接酶、DNA marker 购至 MBI Fermentas; RT-PCR 试剂盒购至大连宝生物有限公司

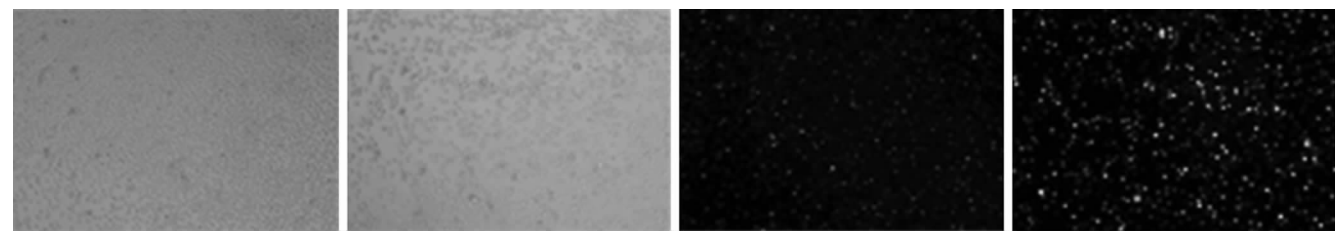
(Takara, Japan); 兔抗人的 ICAT 抗体购自 Abcam 公司; cyclinD1、c-myc、TCF1 抗体购于 Santa Cruz 公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗、鼠抗人 β -actin 单抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 ICAT siRNA 靶序列的设计 针对 NCBI 上已经提交的 ICAT 基因序列并进行分析, 遵循 siRNA 的设计原则, 寻找合适的干扰靶点, 将 DNA oligo 分别用 TE (pH8.0) 溶解, 浓度为 $100 \mu\text{mol/L}$ 。取相应的正义链和反义链 oligo 溶液。在 PCR 仪上按照如下程序进行退火处理: 95°C 5 min; 85°C 5 min; 75°C 5 min; 70°C 5 min; 4°C 保存。退火处理后得到浓度为 $10 \mu\text{M}$ 的 shRNA 模板。将所得模板溶液稀释 50 倍, 终浓度为 200 nM , 用于连接反应。

1.3 ICAT shRNA 和对照 shNC 序列 ICAT shRNA 序列为 5'-GCA GGT GTT CTG CTG ATA TCA-3', 正义链: 5'-GAT CCG CAG GTG TTC TGC TGA TAT CAT TCA AGA GTG ATA TCA GCA GAA CAC CTG CTT TTT TG-3', 反义链 5'-AAT TCA AAA AAG CAG GTG TTC TGC TGA

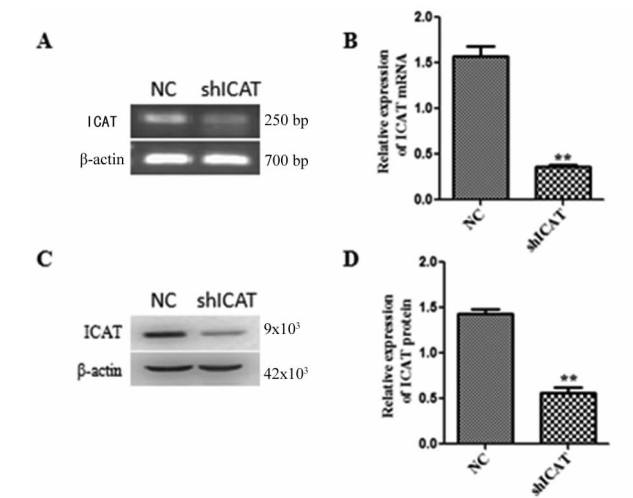
* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81301492)。 作者简介: 王晋蜀, 女, 初级 (师), 主要从事白血病药物机制研究。 △ 通讯作者, E-mail: zy2753@hotmail.com。

2.4 ICAT shRNA 稳定 HL60 细胞株干扰效果鉴定 Real-time PCR 检测结果显示,干扰组 ICAT mRNA 的表达量 (0.36 ± 0.02) 较对照组 (1.57 ± 0.11) 明显下调 ($P < 0.001$, 图 4A、B)。Western Blot 结果显示,干扰组 ICAT 的蛋白表达 (0.56 ± 0.06) 较对照组 (1.44 ± 0.045) 明显下调 ($P < 0.001$, 图 4C、D),这说明所构建的慢病毒介导的 ICAT shRNA 能明显抑制 ICAT 基因水平和蛋白水平的表达。



A,B:白光下观察 shNC 组和 shICAT 组 HL60 细胞;C,D:荧光显微镜下的 shNC 组和 shICAT 组 HL60 细胞(20×)。

图 3 转染细胞的荧光图片



A,B:RT-PCR 检测稳转 HL60 细胞中 ICAT 基因的表达;C,D: Western Blot 检测稳转 HL60 细胞中 ICAT 蛋白的表达(* * $P < 0.001$)。

图 4 稳定细胞株干扰效果验证

3 讨 论

ICAT 是 Tago 等^[1]用酵母双杂交系统筛选鼠胚胎 cDNA 文库时发现的一个蛋白质基因,基因定位于染色体 1P36.1-1P36.2D1S214H~D1S244 之间。在鼠胚胎发育过程中,ICAT 的 mRNA 表达相当恒定。ICAT 是目前发现为数不多的能够直接负向调节 beta-连环蛋白的基因。其 cDNA 序列分析显示,它编码一个含 81 个氨基酸残基,相对分子质量为 9×10^3 的蛋白质^[1]。

ICAT 的尾巴能与 beta-连环蛋白结合并排斥后者与 T 细胞因子 4 结合,ICAT 阻止 beta-连环蛋白/T 细胞因子 4 复合物形成的能力可能是它在细胞质中的主要的功能,而它的三螺旋束为结合 beta-连环蛋白的结构域^[2-4]。

ICAT 作为 beta-连环蛋白/T 细胞因子 4 抑制子,在肿瘤当中的作用也有大量的报道,它可以通过抑制经典 Wnt 信号通路达到抑制肿瘤细胞的增殖^[1];目前有报道 ICAT 高表达会促进黑色素瘤的转移和侵袭^[5],但也有报道表明通过高表达 ICAT 能抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路活性从而抑制子宫肌瘤细胞的增殖^[6]、抑制胶质母细胞瘤细胞的增殖与迁移等^[7],ICAT 与胰腺癌的发展也有密切联系^[8]。通过这些文献报道可知 ICAT 在肿瘤细胞的发生发展中具有重要的作用。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是正常生物体内抑制特定基因表达的一种现象,是指在进化过程中高度保守的、由双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)诱发的、同源 mRNA 高效特异性降解的现象。这种现象发生在转录后水平,又称为转录后基因沉默(post-transcriptional gene silen-

cing, PTGS)。双链 RNA 经酶切后会形成很多小片段,称为 siRNA,这些小片段一旦与信使 RNA(mRNA)中的同源序列互补结合,会导 mRNA 失去功能,即不能翻译产生蛋白质,也就是使基因“沉默”^[9-10]。

本研究成功构建了 ICAT shRNA 表达载体,通过构建慢病毒干扰体,感染 HL60 细胞,建立了稳定细胞株。应用 real-time PCR、Western Blot 检测发现 ICAT mRNA 与蛋白水平表达均受抑制。为进一步研究 ICAT 基因对 HL60 细胞功能的影响奠定基础。

参考文献

[1] Tago K, Nakamura T, Nishita M, et al. Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein[J]. Genes Dev, 2000, 14(14): 1741-1749.

[2] Graham TA, Clements WK, Kimelman D, et al. The crystal structure of the beta-catenin/ICAT complex reveals the inhibitory mechanism of ICAT[J]. Mol Cell, 2002, 10(5): 563-571.

[3] Daniels DL, Weis WI. ICAT inhibits beta-catenin binding to Tcf/Lef-family transcription factors and the general coactivator p300 using independent structural modules[J]. Mol Cell, 2002, 10(5): 573-584.

[4] Choi HJ, Huber AH, Weis WI. Thermodynamics of beta-catenin-ligand interactions: the roles of the N- and C-terminal tails in modulating binding affinity[J]. J Biol Chem, 2006, 281(9): 1027-1038.

[5] Domingues MJ, Rambow F, Job B, et al. Beta-catenin inhibitor ICAT modulates the invasive motility of melanoma cells[J]. Cancer Res, 2014, 74(7): 1983-1995.

[6] Ono M, Yin P, Navarro A, et al. Inhibition of canonical WNT signaling attenuates human leiomyoma cell growth[J]. Fertil Steril, 2014, 101(5): 1441-1449.

[7] Zhang K, Zhu S, Liu Y, et al. ICAT inhibits glioblastoma cell proliferation by suppressing Wnt/beta-catenin activity[J]. Cancer Lett, 2015, 357(1): 404-411.

[8] Campos ML, Sánchez-Arévalo Lobo VJ, Rodolosse A, et al. ICAT is a novel Ptf1a interactor that regulates pancreatic acinar differentiation and displays altered expression in tumours[J]. Biochem J, 2013, 451(3): 395-405.

[9] de la Fuente J, Kocan KM. RNA interference for the study and genetic manipulation of ticks[J]. Trends Parasitol, 2007, 23(9): 427-433.

[10] Yang M, Mattes J. Discovery, biology and therapeutic potential of RNA interference, microRNA and antagomirs[J]. Pharmacol Ther, 2008, 117(1): 94-104.