

论著·基础研究

核糖体结合蛋白 1 干扰慢病毒载体的构建及其对人肝癌细胞的干扰效应*

朱少美,刘集鸿,周 潇

(惠州市第一人民医院检验科,广东惠州 516001)

摘要:**目的** 构建核糖体结合蛋白 1(RPN1)的干扰慢病毒载体,建立下调 RPN1 表达的肝癌细胞系。**方法** 运用分子克隆针对 RPN1 基因构建干扰慢病毒载体,通过与病毒包装辅助质粒共感染 293T 细胞包装病毒,高速离心浓缩病毒,免疫荧光方式测定病毒滴度,感染 Huh7. 5. 1 肝癌细胞系,实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)测定病毒干扰效果。**结果** 成功构建并包装 RPN1 RNA 干扰慢病毒,病毒滴度为 2×10^9 TU/mL,感染 Huh7. 5. 1 细胞后阳性率大于 90. 0%。相对于阴性对照,RPN1 RNA 干扰慢病毒组 RPN1 基因表达敲减效率达到 92. 4%($P < 0. 05$)。**结论** 成功构建并包装了 RPN1 干扰慢病毒,建立下调 RPN1 表达的人肝癌细胞株。

关键词:核糖体结合蛋白 1; 干扰; 慢病毒; 肝癌

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2019. 05. 005

中图法分类号:R34;R735. 7

文章编号:1673-4130(2019)05-0528-04

文献标识码:A

Construction of interference lentiviral vector targeting ribophorin 1 and its interference effect on human hepatoma cells*

ZHU Shaomei, LIU Jihong, ZHOU xiao

(Department of Clinical Laboratory, First People's Hospital of Huizhou, Huizhou, Guangdong 516001, China)

Abstract: Objective To construct a interference lentivirus targeting ribophorin 1 (RPN1), and establish a hepatocellular carcinoma cell line that down-regulates the expression of RPN1. **Methods** A interference lentivirus vector targeting the RPN1 gene was constructed by molecular cloning. The interference lentivirus was packed from 293T cells by coinfection with virus packaging auxiliary plasmids. After high speed centrifugation, the virus was concentrated and its titer was detected by immunofluorescence. The hepatoma cell line Huh7. 5. 1 was infected with the interference lentivirus and the interference effect of the virus was determined by RT-qPCR. **Results** The RPN1 RNA interference lentivirus was successfully constructed and packaged. The titer of virus was 2×10^9 TU/mL, and the positive rate after infection of Huh7. 5. 1 cells was more than 90. 0%. Compared with negative control, the knockdown rate of RPN1 gene expression in RPN1 RNA interference lentivirus group was 92. 4% ($P < 0. 05$). **Conclusion** RPN1 interfering lentivirus was successfully constructed and packaged, and a human hepatocellular carcinoma cell line with down-regulation of RPN1 expression was established.

Key words: ribophorin 1; interference; lentivirus; hepatocellular carcinoma

肝癌是全球恶性肿瘤研究的热点之一,具有高发病率、高病死率的特点,在男性中其发病率占第 5 位,病死率占第 2 位;在女性中其发病率占第 9 位,病死率占第 6 位^[1]。我国是肝癌高发国家,肝癌发病人数占全球发病人数的 55%,死亡人数仅次于肺癌,位居第 2 位^[2]。在我国,引起肝癌发生的主要原因是乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)^[3]等病毒感染,病毒复制依赖宿主细胞,需与宿主蛋白,如核糖体

结合蛋白 1(RPN1)等相互作用。RPN1 是内质网寡糖转移酶的重要功能蛋白,协助初生蛋白进入粗面内质网并进行糖基化修饰^[4-5]。有研究报道表明,黄头病毒、登革病毒等感染宿主细胞后,RPN1 蛋白表达增强并促进病毒感染^[6-7]。因此,RPN1 可能参与肝炎病毒引起的肝癌的发生、发展过程。本研究将利用 RNA 干扰技术,构建针对 RPN1 基因的 RNA 干扰慢病毒,感染肝癌细胞系,建立 RPN1 低表达的稳定细

* 基金项目:广东省自然科学基金-博士启动项目(2017A030310625);惠州市科技计划(医疗卫生)项目(2017Y051)。

作者简介:朱少美,女,主管技师,主要从事分子病毒免疫、临床检验研究。

本文引用格式:朱少美,刘集鸿,周潇.核糖体结合蛋白 1 干扰慢病毒载体的构建及其对人肝癌细胞的干扰效应[J].国际检验医学杂志,2019,40(5):528-531.

胞株,旨在进一步研究 RPN1 基因在肝炎病毒所致肝癌发生、发展中的分子机制,为其防治提供重要的实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂 293T 细胞和 Huh7. 5. 1 细胞是南方医科大学生物技术学院馈赠,培养基为 DMEM(Hyclone)和胎牛血清(上海微科生化试剂有限公司)。慢病毒载体系统:工具质粒 GV248、病毒包装辅助质粒(Helper 1. 0)和病毒包装辅助质粒(Helper 2. 0)均由上海吉凯基因化学技术有限公司提供;引物序列合成与测序由英潍捷基(上海)贸易有限公司完成;限制性内切酶 Age I 和 EcoR I 购自 NEB 公司;T4 DNA ligase 购自 Thermo Scientific 公司;Ta q Plus DNA polymerase 购自南京诺唯赞生物科技有限公司;质粒提取试剂盒 EndoFree midi Plasmid Kit 购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 RNP1 RNA 干扰慢病毒载体构建 针对 RPN1 (基因序列号 NM_002950)序列,设计 RNA 干扰靶

点:GAG GAA GAG AAC AAT TTG GAA,由此构建干扰序列,合成单链引物 RPN1 RNA 干扰-a 和-b,见表 1。合成的单链引物干粉溶解后,90 ℃水浴 15 min 退火,自然冷却至室温,合成双链 DNA 引物。慢病毒载体 GV248 经 Age I 和 EcoR I 37 ℃ 3 h 双酶切成线性。T4 DNA ligase 将双酶切线性化的载体和退火双链 DNA 连接过夜,转化感受态大肠杆菌 DH5α 株,阳性克隆进行 PCR 鉴定。PCR 鉴定引物序列,上游引物 5'-CCA TGA TTC CTT CAT ATT TGC-'3,下游引物 5'-ATG TCC TTC TGC TGA TAC TGG G-'3。反应条件:94 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,循环 22 次;72 ℃ 5 min,最后冷却至 4 ℃。PCR 鉴定阳性的克隆接种于含氨苄抗菌药物的 LB 液体培养基中,37 ℃培养 12~16 h,取适量菌液送测序公司进行测序。对测序结果与目的基因序列进行比对分析,比对正确的菌液进行质粒提取。

表 1 RPN1 RNA 干扰慢病毒载体构建框架序列

序列	5'	STEM	Loop	STEM	3'
RPN1 RNA 干扰-a	CCG G	GAG GAA GAG AAC AAT TTG GAA	TTC AAG AGA	TTC CAA ATT GTT CTC TTC CTC	TTT TTG
RPN1 RNA 干扰-b	AAT TCA AAA A	GAG GAA GAG AAC AAT TTG GAA	TCT CTT GAA	TTC CAA ATT GTT CTC TTC CTC	

1.3 RNA 干扰慢病毒包装与浓缩 将鉴定正确的 RPN1 RNA 干扰慢病毒质粒 20 μg 与病毒包装辅助质粒(Helper 1. 0)15 μg、病毒包装辅助质粒(Helper 2. 0)10 μg 用脂质体瞬时转染包装细胞 293T,转染 6 h 后换 10%血清培养基。转染 48 h 后,观察细胞形态和绿色荧光蛋白表达,收集 293T 细胞上清液。将上清液于 4 ℃、4 000 g 离心 10 min,用 0. 45 μm 滤器过滤,用 Beckman 超速离心机于 4 ℃、25 000 r/min 离心 2 h,离心后,弃去上清,尽量去除残留在管壁上的液体,加入病毒保存液重悬,-80 ℃保存。

1.4 梯度稀释法测定病毒浓度 将 293T 细胞铺板按 4×10⁴ 细胞/孔铺于 96 孔板。次日,将待测病毒取 10 μL,加入 90 μL 无血清培养基,记为 1E+1 μL,分别逐级 10 倍梯度稀释至 1E-6 μL。将细胞原培养基弃掉,加入病毒液,4 d 后,观察荧光表达情况并计算出荧光但数量最少的孔中荧光细胞数,病毒滴度=荧光细胞数/病毒原液量,单位为 TU/mL。

1.5 RPN1 RNA 干扰慢病毒在肝癌细胞的表达 在 37 ℃、5%CO₂ 条件下,肝癌细胞系 Huh7. 5. 1 培养于 10%胎牛血清的 DMEM 培养基。将 2×10⁵/孔接种于 6 孔板中。实验按 10 MOI 加入病毒进行感染,分为两组:RPN1 RNA 干扰慢病毒组和阴性对照组(NC,插入非相关序列的慢病毒,阴性对照插入序列为 TTC TCC GAA CGT GTC ACG T),感染后 16 h 换成完全培养基,72 h 后用荧光显微镜观察

拍照。

1.6 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)测定病毒干扰效果 Trizol 提取细胞 RNA,通过 RT-qPCR 方法测定 RPN1 的表达,GAPDH 为内参基因,逆转录和 RT-qPCR 检测分别使用 Promega 的 M-MLV 试剂盒和 TAKARA 的 SYBR Master Mixture 试剂盒严格按说明书进行操作。引物序列:RPN1 上游引物 5'-GGA CCT ACT GGA TTA TGG G-'3,下游引物 5'-GAT GGT CTT AAA AGA ACG GA-'3;GAPDH 上游引物 5'-TGA CTT CAA CAG CGA CAC CCA-'3,下游引物 5'-CAC CCT GTT GCT GTA GCC AAA-'3。反应条件:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,循环 40 次;95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s,95 ℃ 15 s。结果采用 ΔΔCt 法进行相对定量分析。

1.7 统计学处理 采用 SPSS21. 0 进行统计学分析,每组数据重复 3 次实验,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异用两独立样本 *t* 检验分析,*P*<0. 05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RPN1 RNA 干扰慢病毒载体的鉴定 RPN1 RNA 干扰双链 DNA 引物与酶切线性化的慢病毒载体 GV248 连接后,转化感受态细胞,阳性克隆进行 PCR 鉴定,见图 1。将 PCR 鉴定正确的阳性克隆培养后,取菌液测序,结果正确。

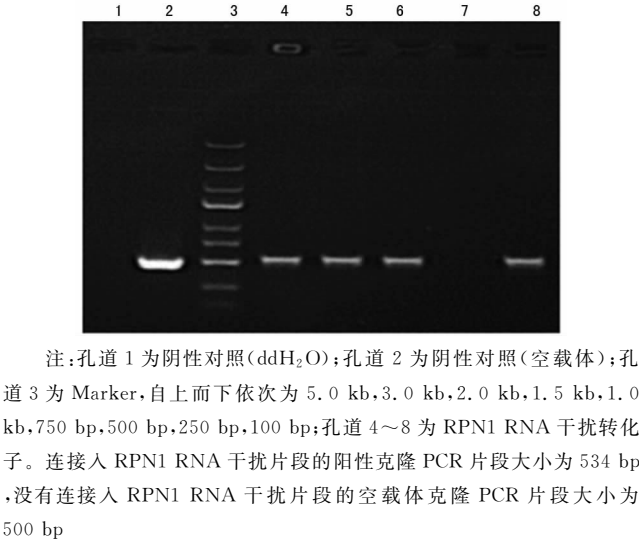


图 1 RPN1 RNA 干扰慢病毒载体 PCR 鉴定

2.2 RPN1 RNA 干扰慢病毒的包装及滴度测定
RPN1 RNA 干扰慢病毒感染 293T 细胞 48 h 后可观察到明显绿色荧光蛋白,收集病毒上清并浓缩,用梯度稀释法测定病毒滴度为 2×10^9 TU/mL。病毒包装成功。

2.3 RPN1 RNA 干扰慢病毒在 Huh7. 5.1 细胞的表达
Huh7. 5.1 细胞感染 RPN1 RNA 干扰慢病毒 72 h 后可检测到绿色荧光蛋白,绿色荧光阳性率达 90.0% 以上,表明该慢病毒可在细胞内表达且表达率高。见图 2。

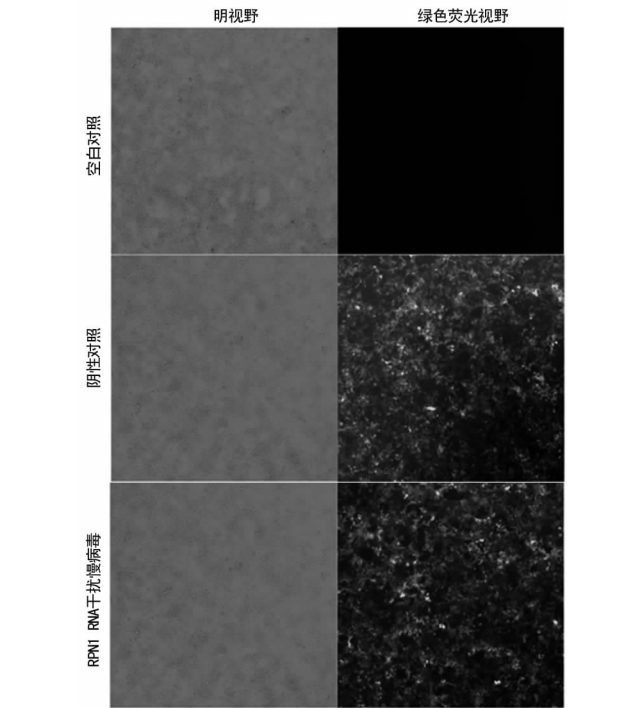


图 2 慢病毒感染 Huh7. 5.1 细胞荧光图

2.4 RPN1 RNA 干扰慢病毒的干扰效果 Huh

7. 5.1 细胞感染 RPN1 RNA 干扰慢病毒 72 h 后用 RT-qPCR 测定 RPN1 基因的干扰效果,见图 3,RPN1 RNA 干扰慢病毒组 RPN1 mRNA 表达量为 0.076 ± 0.022 ,而对照组为 1.007 ± 0.006 。相对于阴性对照,RPN1 RNA 干扰慢病毒组 RPN1 基因表达明显下降($t=69.788, P<0.05$),敲减效率达到 92.4%,表明成功干扰了 RPN1 基因的表达。

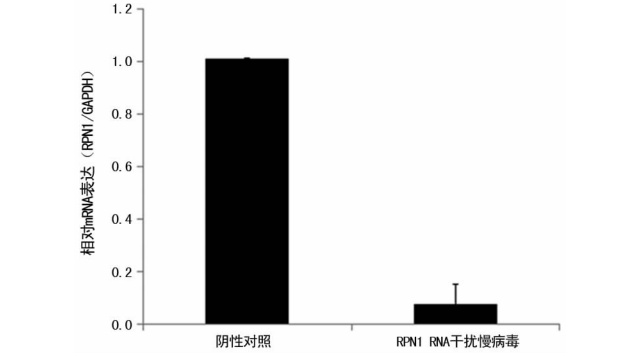


图 3 RPN1 基因在 Huh7. 5.1 的表达

3 讨 论

RPN1 是粗面内质网寡糖转移酶的一部分,横穿内质网膜腔内的氨基末端和细胞质内的羧基端,协助待加工蛋白进入粗面内质网,参与核糖体结合、新生蛋白跨膜易位及进一步修饰,有研究发现其表达与肺癌、甲状腺癌等发生相关^[8-10],相对于健康组织,癌症组织的表达明显升高,而其与肝癌的关系尚不明确。原发性肝癌中约 90% 属于肝细胞癌,而其中约 80% 是 HBV 或 HCV 的携带者^[11]。病毒感染引起机体免疫系统活跃,在病毒与机体免疫系统相互抗争过程中不可避免带来持续性的慢性肝损伤,这是肝炎病毒引起肝癌的主要原因^[12]。研究肝炎病毒的复制对控制肝炎病毒引起的肝癌至关重要。病毒与内质网上功能蛋白相互作用,从而介导病毒的复制增殖^[13]。粗面内质网作为真核细胞中蛋白加工、折叠、糖基化修饰的主要场所,由于氧化应激、病毒感染等病理因素,未折叠蛋白或错误折叠蛋白聚集在内质网,容易诱发内质网应激效应^[14],而内质网应激效应在肿瘤的发生、发展中均发挥着十分重要的作用^[15]。RPN1 是粗面内质网内质网寡糖转移酶最重要的功能蛋白,可以与肝炎病毒引起的内质网应激效应相关,参与肝炎病毒的复制并导致肝癌的发生,而目前尚无任何文献报道,其基因功能尚未清晰。

RNA 干扰是正常生物体内抑制特定基因表达的一种现象,利用该现象建立了 RNA 干扰技术,该技术可以快速、特异、高效沉默特定的基因片段,是目前研究基因功能的有效手段^[16-17]。RNA 干扰效应常用的小干扰 RNA (siRNA) 和短发夹 RNA (shRNA)。

siRNA 制备简单,其转染具有瞬时性。而 shRNA 是具有两个短的反向重复序列的 RNA,具有高效性和可持续复制等优势,近年来更多应用于基因沉默表达的相关研究中^[18-19]。质粒载体转染细胞表达率低,不能持续性表达,而慢病毒或者腺病毒感染具有操作容易、感染效率高、稳定性好等优势,尤其在肿瘤细胞等惰性细胞中仍具有较高的转染率^[20],在 RNA 干扰技术中越来越受到重视。针对靶基因,设计 shRNA 慢病毒载体,包装病毒进行感染实验,是目前 RNA 干扰的常用策略。本研究为了探索 RPN1 与肝癌发生、发展的关系,选用的是目前体外广泛应用的肝癌细胞系 Huh7.5.1,通过构建针对 RPN1 基因的 shRNA 载体,构建干扰慢病毒,在该细胞下调该基因的表达,为该基因的研究提供很好的实验基础。本研究中,针对 RPN1 的 shRNA 质粒易于构建,PCR 结果鉴定显示构建成功。并通过辅助质粒共转染系统成功在 293T 细胞上进行病毒包装,浓缩的病毒滴度高达 10^9 TU/mL 以上,高于文献报道的其他慢病毒载体的感染病毒滴度^[21-22],表明该慢病毒感染系统包装效率高。同时该构建的慢病毒感染肝癌细胞的阳性率高达 90.0% 以上,荧光定量检测 RPN1 表达量发现其敲减效率达到 92.4%,敲减效果明显,表明选取的针对目的基因序列的干扰作用明显,并且该慢病毒干扰体系十分有效。

4 结 论

综上所述,应对 RPN1 可能与肝癌的发生、发展关系密切,但尚未明确这一研究现状,本研究构建针对 RPN1 基因的 shRNA 感染慢病毒载体,利用辅助质粒共转染系统成功包装高滴度的干扰慢病毒,感染人肝癌细胞系 Huh7.5.1 并确定了其干扰效应,建立了 RPN1 低表达的稳定细胞株,将为进一步研究 RPN1 基因在肝癌发生、发展中分子机制的研究奠定重要的实验基础。

参考文献

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] 聂笠. 慢性乙型和丙型病毒性肝炎合并原发性肝癌的相关因素研究[D]. 北京:中国疾病预防控制中心, 2017.
- [4] WILSON C M, ROEBUCK Q, HIGH S. Ribophorin I regulates substrate delivery to the oligosaccharyltransferase core[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(28): 9534-9539.
- [5] TAKEDA K, QIN S Y, MATSUMOTO N, et al. Associa-

- tion of malectin with ribophorin I is crucial for attenuation of misfolded glycoprotein secretion[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 454(3): 436-440.
- [6] MOLTHATHONG S, BUAKLIN A, SENAPIN S A, et al. Up-regulation of ribophorin I after yellow head virus (YHV) challenge in black tiger shrimp penaeus monodon [J]. Fish Shellfish Immunol, 2008, 25(1/2): 40-46.
- [7] MARCEAU C D, PUSCHNIK A S, MAJZOUB K, et al. Genetic dissection of Flaviviridae host factors through genome-scale CRISPR screens[J]. Nature, 2016, 535(7610): 159.
- [8] HOLMES D R, KEREIAKES D J, GARG S, et al. Stent thrombosis[J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 56(17): 1357.
- [9] 董孟权, 杨丽英. 核糖体结合蛋白在甲状腺癌中的表达及其与临床病理特征的关系[J]. 蚌埠医学院学报, 2016, 41(2): 215-216.
- [10] 董孟权. 浅论核糖体结合蛋白在不同甲状腺微小癌患者中的表达关系[J]. 医药卫生(文摘版), 2015, 7(12): 00012.
- [11] 卢明芹, 杨敏. 丙型肝炎病毒相关性肝癌的研究进展[J]. 现代医药卫生, 2017, 33(20): 3080-3082.
- [12] 秦健, 李文静, 冯勇, 等. 乙型肝炎, 丙型肝炎病毒相关性肝癌基因差异表达的生物信息学分析[J]. 武汉大学学报(医学版), 2017, 38(4): 604-609.
- [13] 曾洁, 黄天壬, 邓伟. 乙型肝炎病毒 X 蛋白与内质网应激关系的研究进展[J]. 病毒学报, 2018, 34(2): 272-276.
- [14] 潘玲, 张翠薇, 马程功, 等. 内质网应激诱导自噬的分子机制[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(13): 2590-2593.
- [15] 钟强, 陈小伍, 朱达坚. 内质网应激与肿瘤关系的研究进展[J]. 广东医学, 2015, 36(12): 1937-1939.
- [16] 王晋蜀, 王伟佳, 王婷, 等. ICAT 干扰慢病毒表达载体构建及稳转 HL60 细胞株的建立[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(7): 875-877.
- [17] 宁慧宇, 刘才, 邹华文. 基因功能缺失技术及研究现状[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(8): 1405-1412.
- [18] 蒲小勇, 周香雪, 肖恒军, 等. 短发夹 RNA 靶向沉默大鼠阴茎海绵体平滑肌细胞胰岛素样生长因子结合蛋白-3 的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2017, 34(8): 228.
- [19] RAO D D, VORHIES J S, SENZER N, et al. siRNA vs. shRNA: similarities and differences[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2009, 61(9): 746-759.
- [20] 隋玉飞, 刘乃政, 司磊. 慢病毒载体介导 survivin 基因 siRNA 对裸鼠移植人肺腺癌的体内抗癌机制研究[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(5): 583-585.
- [21] 文扬, 朱亚琴. PERK 干扰慢病毒载体的构建及其在人牙髓细胞中的表达[J]. 上海口腔医学, 2017, 26(4): 363-367.
- [22] 房超, 尹晶, 于秋爽, 等. 慢病毒介导的靶向干扰 MEX3A 基因膀胱癌稳定细胞株的建立[J]. 中国医科大学学报, 2017, 46(12): 1057-1061.