

论著·基础研究

EEA1 慢病毒表达载体的构建及其对查菲埃立克体感染细胞的影响*

程 琰¹, 毛旭虎², 宋 阳³, 贺政新¹, 陈 晶¹, 曾 倩¹, 高杰英¹, 王缚鲲^{1△}

(1. 中国人民解放军联勤保障部队第九八〇医院/白求恩国际和平医院检验科, 河北石家庄 050082;

2. 陆军军医大学药学与检验医学系临床微生物与免疫学教研室, 重庆 400038;

3. 中国人民解放军总医院第一医学中心检验医学中心, 北京 100853)

摘要:目的 利用分子生物学方法构建早期内吞体相关蛋白 1(EEA1)慢病毒载体,并感染犬的巨噬细胞 DH82,建立稳定表达 EEA1 的 DH82 细胞系。方法 将聚合酶链反应(PCR)扩增得到的 EEA1 和慢病毒载体 GV287 双酶切后连接,构建慢病毒表达载体 GV287-EEA1,经酶切、测序鉴定重组质粒。将重组载体与包装系统 pHelper1.0、pHelper2.0 质粒共转染 293T 细胞,包装慢病毒并测定滴度。将构建好的慢病毒表达载体感染 DH82 细胞,通过实时荧光定量 PCR(qPCR)和 Western blot 检测 DH82 细胞中 EEA1 的过表达情况。进一步利用查菲埃立克体感染稳定表达 EEA1 的 DH82 细胞。结果 GV287-EEA1 经双酶切分析和测序,证实插入序列正确,成功构建慢病毒表达质粒,并成功包装成慢病毒,病毒滴度为 1×10^9 TU/mL;病毒液有效感染 DH82 细胞,依据 GFP 绿色荧光可检测感染率达 80% 以上;qPCR 和 Western blot 的结果证实 EEA1 在 mRNA 和蛋白水平都成功过表达。用查菲埃立克体感染稳定表达 EEA1 的 DH82 细胞 36 h 后,细胞感染率降低,查菲埃立克体在细胞内的增殖被抑制。结论 成功构建了绿色荧光蛋白标记的携带 EEA1 基因的慢病毒载体 GV287-EEA1,建立稳定高表达 EEA1 的犬巨噬细胞系 DH82-EEA1,EEA1 过表达后,查菲埃立克体的繁殖受到抑制。

关键词:查菲埃立克体; 早期内吞体相关蛋白 1; 慢病毒载体**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2019.15.001**中图法分类号:**R376;Q812**文章编号:**1673-4130(2019)15-1793-06**文献标识码:**A**Construction of EEA1 lentivirus vector and its effect on Ehrlichia chaffeensis infecting cells***CHENG Yan¹, MAO Xuhu², SONG Yang³, HE Zhengxin¹, CHEN Jing¹,
ZENG Qian¹, GAO Jieying¹, WANG Fukun^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, The 980st Hospital of the PLA Joint Logistics Support Force/Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050082, China;

2. Department of Clinical Microbiology and Immunology, College of Pharmacy and Medical Laboratory, Army Medical University, Chongqing 400038, China; 3. Center of

Clinical Laboratory, First Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100853, China)

Abstract: Objective To construct early endosomal antigen1 (EEA1) lentiviral vector and establish the high and stable expression of EEA1 in canis macrophage cell line DH82. **Methods** EEA1 was amplified using PCR, and connected to the lentiviral expression plasmid GV287. The recombinant plasmids GV287-EEA1 were identified by double enzymatic digestion and DNA sequencing. The recombinant lentivirus plasmid and packaging plasmid pHelper1.0 and pHelper2.0 were co-transfected into 293T cells. Lentiviruses were packaged and the titer was determined. After infection of DH82 cells with lentiviral vector, EEA1 expression in these cells was confirmed by qPCR and Western blot. DH82 cells infected with lentiviruses were further infected with Ehrlichia chaffeensis. **Results** Enzymatic digestion and sequencing analysis indicated that GV287-EEA1 vector was successfully constructed. The recombinant plasmid was successfully packaged into lentivirus and the viral titer was 1×10^9 TU/mL. The recombinant plasmid with green fluorescent protein was highly expressed in DH82 cells by fluorescence microscopy, and the infection rate was greater than 80%. The qPCR and Western

* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(31200142)。

作者简介:程琰,女,主管技师,主要从事病原微生物与宿主作用机制的研究。△ 通信作者,E-mail:wangfk8@sina.com。

本文引用格式:程琰,毛旭虎,宋阳,等. EEA1 慢病毒表达载体的构建及其对查菲埃立克体感染细胞的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(15):1793-1977.

blot results also proved that the mRNA and protein expression of EEA1 could successfully observed in DH82 cells transfected with GV287-EEA1. Both percentage of infected cells and total number of Ehrlichia chaffeensis morulae were inhibited after 36 h postinfection. **Conclusion** EEA1 lentiviral expression vector was successfully constructed, a stable expression macrophage cell line DH82-EEA1 was established, and Ehrlichia chaffeensis morulae were inhibited after EEA1 overexpression, providing the experimental basis for further study of the pathogenesis mechanism of *E. chaffeensis*.

Key words: Ehrlichia chaffeensis; early endosomal antigen 1; lentiviral vector

查菲埃立克体为一类革兰阴性专性细胞内寄生病原体,是重要的人兽共患自然疫源性疾病病原体。该病原体通过受体介导的内吞侵入宿主细胞,在细胞质空泡中,以膜包裹的包涵体形式生存和繁殖。诸多研究表明^[1-2],查菲埃立克体通过抑制吞噬体溶酶体的融合,从而逃避宿主杀伤并导致宿主的持续性感染,但其机制尚不清楚。本课题组前期研究发现,查菲埃立克体吞噬体虽然具有早期吞噬体标记分子 Rab5,且空泡型腺苷三磷酸酶为阳性,但是缺乏溶酶体标记分子,导致吞噬体的发育成熟及其与溶酶体的融合受到了抑制^[3]。

早期内吞体相关蛋白 1(EEA1)为 Rab5 重要的效应分子之一,通过与活化形式的 Rab5(Rab5-GTP)相互作用在早期吞噬体的发育成熟过程中发挥关键作用^[4]。以往的研究以及本课题组前期的研究均证实了查菲埃立克体感染宿主细胞后,Rab5 存在于吞噬体上,但吞噬体与溶酶体融合受到了抑制,本课题组推测 Rab5 的效应分子 EEA1 在病原体感染过程中发挥重要作用。为验证此假设,本研究拟构建 EEA1 的慢病毒表达载体系统,建立稳定转染的 DH82 细胞系,探索 EEA1 过表达后对细胞感染率及病原体繁殖的影响,为进一步阐明查菲埃立克体导致宿主持续感染的致病机制提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂 慢病毒载体 GV287、包装质粒 pHelper1.0、pHelper2.0 由上海吉凯生物公司提供;Lip2000 脂质体转染试剂盒购自 Invitrogen 公司;Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 BamH I、Age I 购自 TaKaRa 公司;T4 DNA 连接酶购自上海生工公司;质粒抽提试剂盒购自 Omega 公司;胎牛血清、DMEM 培养基、MEM 培养基购自 Gibco 公司;PCR 产物快速回收试剂盒、质粒抽提试剂盒、实时荧光定量 PCR(qPCR)试剂盒均购自 TaKaRa 公司;EEA1 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;兔抗鼠 IgG-HRP 购自中山生物技术有限公司;DH82 细胞、查菲埃立克体分离株由美国德克萨斯医学院病理系于学杰教授惠赠;293T 细胞由陆军军医大学药学与检验医学系临床微生物与免疫学教研室惠赠。

1.2 引物设计与目的片段的扩增 使用 Trizol 法提取犬巨噬细胞总 RNA,反转录获得 cDNA,以 cDNA 为模板扩增目的基因。从 NCBI 数据库中搜索到

EEA1 序列,交由上海吉凯生物有限公司进行引物合成。上游引物序列:5'-GGA TCC CGC CAC CAT GGA AAT TGC A-3',下游引物序列为:5'-ACC GGT TCC TTG CAA GTC ATT GAA ACA T-3',下划线区为酶切位点,上游引物酶切位点为 BamH I,下游引物酶切位点为 Age I。以含有待扩增序列的 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 45 s,58 °C 40 s,72 °C 55 s,共 30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳回收基因片段。

1.3 慢病毒表达载体 GV287-EEA1 的构建与鉴定 PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳,回收目的片段并纯化。目的片段进行 BamH I 和 Age I 双酶切,并与慢病毒表达载体 GV287 连接。连接产物转化感受态受体菌 *E. coli* DH5a,经氨苄抗性筛选,挑取单菌落增菌后抽提质粒,对质粒进行 BamH I 和 Age I 双酶切鉴定。经双酶切及 PCR 鉴定阳性的重组质粒送上海生工公司测序。

1.4 EEA1 慢病毒的包装和滴度测定 将成功构建的 GV287-EEA1 载体与 2 种辅助包装载体 pHelper1.0、pHelper2.0 混合,按照 Invitrogen 公司 Lip2000 脂质体转染试剂盒说明共转染 293T 细胞。37 °C 孵育 8 h 后弃掉培养基,PBS 洗涤 3 次,加入新鲜培养基,37 °C 继续培养 48 h。收集含有病毒颗粒的 293T 细胞上清,4 °C 4 000×g 离心 10 min,去除细胞碎片,以 0.45 μm 滤器过滤上清液,获得慢病毒原液,并使用逐孔稀释法测定病毒滴度。测定前 1 d,按照每孔 1×10^4 个细胞将 293T 细胞接种于 96 孔板,每孔接种 100 μL,37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h。准备 8 个 Ep 管,每管中加入 90 μL 无血清培养基,取待测定的病毒原液 10 μL 加入到第 1 管中,混匀后取 10 μL 加入到第 2 管中,依次倍比稀释至最后 1 管。选取所需细胞孔,弃去原孔中 90 μL 培养液,加入 90 μL 对应稀释好的病毒原液,37 °C、5% CO₂ 条件下继续培养,24 h 后加入完全培养基 100 μL,96 h 后观察荧光表达情况。根据表达绿色荧光蛋白的细胞数计算病毒滴度。病毒滴度(TU/mL)=GFP 阳性细胞数/稀释倍数。

1.5 慢病毒感染 DH82 细胞及 qPCR 鉴定 EEA1 表达 将生长状态良好的 DH82 细胞接种在 6 孔板,每孔 2×10^5 个细胞,培养过夜。细胞密度达到 70%~80%时,按照慢病毒转染复数(MOI)30 进行转染。弃

去细胞上清液,加入 GV287-EEA1 慢病毒与无血清培养基的混合液,加入 Polybrene 至终浓度为 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。同时设立慢病毒空载体 GV287 对照组,培养条件同 GV287-EEA1 慢病毒感染组。12 h 后更换细胞上清为新鲜 MEM 培养基,继续培养 72 h,在荧光显微镜下观察 GV287-EEA1 慢病毒感染组细胞内 GFP 表达,计算慢病毒感染效率。分别收集 GV287-EEA1 慢病毒载体和 GV287 慢病毒空载体感染的 DH82 细胞,提取各组细胞总 RNA。采用 TaKaRa 公司 qPCR 试剂盒检测 EEA1 表达水平。以总 RNA 反转录生成 cDNA,以 cDNA 为模板进行实时定量 PCR 扩增。EEA1 上游引物序列为:5'-AGA AAG CTG GAT AAT AC CACT GC-3',下游引物序列为:5'-TAC TGA GAA GCC TTT CCC ACA-3';反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,45 个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。应用相对定量法进行数据分析。mRNA 的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法来表示,其中 ΔCt = 目的基因 Ct 值 - 内参基因 Ct 值, $-\Delta\Delta\text{Ct}$ = 对照组 ΔCt 平均值 - 各样品 ΔCt 值。 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 反映实验组相对对照组样品目的基因的相对表达水平。

1.6 Western blot 检测感染细胞 EEA1 的表达 分别收集 GV287-EEA1 慢病毒感染组和 GV287 慢病毒空载体组的 DH82 细胞,用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次,800 r/min 离心收集细胞。加入预冷的含有酶抑制剂 PMSF 的细胞裂解液 RIPA,冰浴 5~10 min 后刮取细胞至离心管,冰浴超声 3 次,每次 10 s。4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,10 000 r/min 离心后收集上清,加入上样缓冲液,并于 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 10 min。蛋白经 12% SDS-PAGE 分离后,将凝胶电转印至硝酸纤维素膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭过夜以阻断非特异性结合位点。利用 EEA1 单克隆抗体作为一抗,HRP 标记的兔抗鼠 IgG 作为二抗,进行 Western blot 检测,同时以 BSA 作为阴性对照。

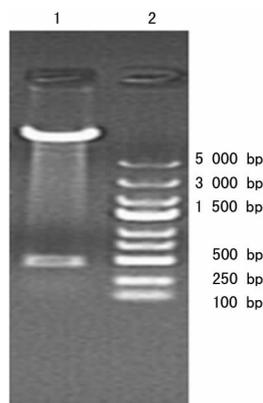
1.7 DH82 细胞感染率及胞内查菲埃立克体繁殖检测 当细胞感染率达到 90% 时,收集细胞, MEM 培养基洗涤后,加入不含新生牛血清的 MEM 细胞培养液,重悬细胞,加入玻璃珠,利用震荡器破碎细胞(3 次,30 s/次),4 $^{\circ}\text{C}$,400 \times g 离心 3 min 去除细胞核和未破碎的细胞,利用 5 μm 过滤器分离获得不含宿主细胞的查菲埃立克体。待 DH82 细胞及稳定高表达 EEA1 的 DH82 细胞密度约为 60% 时,加入不含宿主细胞的查菲埃立克体(MOI = 50:1~100:1),37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱培养 12、24、36、48、60、72 h 后,参考文献^[5]的方法,通过 Diff-Quik 染色分别检测 DH82 细胞组及高表达 EEA1 DH82 细胞组在不同感染时间的细胞感染率并计数细胞内染成紫色的查菲埃立克体桑葚状包涵体数目。

1.8 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据分析,符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均

数比较采用两独立样本的 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

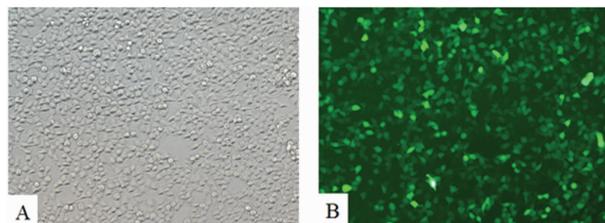
2.1 重组慢病毒载体 GV287-EEA1 的酶切鉴定与测序 经过 PCR 扩增及 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,所得产物 EEA1 基因片段大小为 400 bp,与预期大小相符。PCR 产物酶切后,与载体 GV287 连接,转化感受态受体菌 DH5a,经氨苄抗性筛选挑取单个菌落增菌后,抽提质粒,经 BamH I 和 Age I 双酶切后电泳检测,在 400 bp 处可见酶切片段,见图 1。初步证实目的基因已经插入到质粒载体 GV287 中。重组质粒测序结果表明,目的基因成功克隆入慢病毒载体,其序列与 GeneBank 中公布的完全一致。



注:1 为 GV287-EEA1 双酶切后的产物;2 为标准带

图 1 重组慢病毒载体 GV287-EEA1 的双酶切鉴定

2.2 慢病毒载体 GV287-EEA1 的包装与病毒滴度测定 将构建的慢病毒载体 GV287-EEA1 及包装质粒载体共转染 293T 细胞,收集浓缩病毒液。慢病毒表达载体中含有绿色荧光蛋白报告基因标记,可通过荧光显微镜计数荧光细胞,结合稀释倍数计算病毒滴度。荧光显微镜观察可见大量绿色荧光,见图 2。提示转染成功。本次构建病毒滴度为 1×10^9 TU/mL。



注:A 为 GV287-EEA1 转染 293T 细胞后白光图像($\times 200$);B 为 GV287-EEA1 转染 293T 细胞后绿色荧光图像($\times 200$)

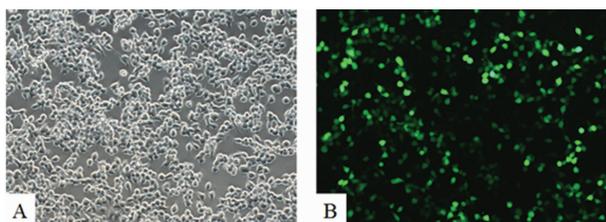
图 2 慢病毒载体转染 293T 后 GFP 表达

2.3 慢病毒 GV287-EEA1 感染 DH82 细胞 携带 EEA1 基因的慢病毒感染 DH82 细胞后,荧光显微镜可观察到绿色荧光蛋白的表达,感染率为 80% 以上,见图 3。

2.4 qPCR 检测 EEA1 mRNA 的表达 qPCR 检测结果显示,GV287-EEA1 慢病毒载体与 GV287 病毒空载体感染的 DH82 细胞表达 EEA1 存在差异,GV287-EEA1 慢病毒感染组 EEA1 表达丰度是

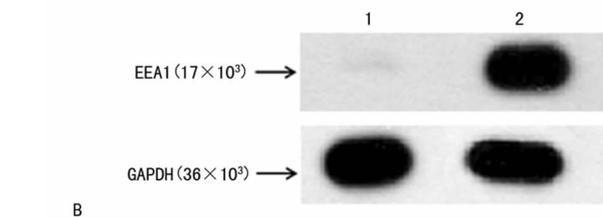
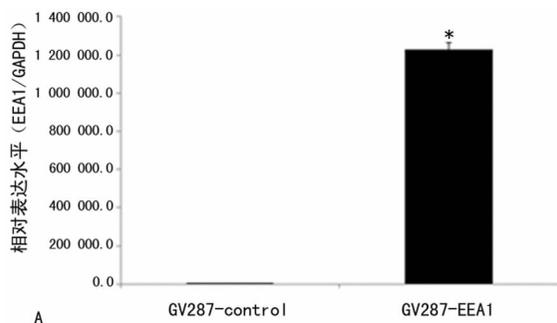
GV287 慢病毒空载体对照组的 1 227 343. 825 倍 ($P < 0.05$), 见图 4A。

2.5 Western blot 检测感染细胞中 EEA1 的表达 GV287-EEA1 及 GV287 病毒空载体感染 DH82 细胞 72 h 后, Western blot 检测目的蛋白 EEA1 的表达。与 GV287 慢病毒空载体对照组相比 GV287-EEA1 慢病毒感染组在相对分子质量 17×10^3 处检测到一条明显的蛋白条带, 而空载体对照组未检测到蛋白条带。结果提示, 慢病毒载体 GV287-EEA1 感染的 DH82 细胞中 EEA1 蛋白稳定表达, 见图 4B。



注: A 为慢病毒 GV287-EEA1 感染 DH82 细胞后白光图像 ($\times 200$); B 为慢病毒 GV287-EEA1 感染 DH82 细胞后绿色荧光图像 ($\times 200$)

图 3 慢病毒感染 DH82 后 GFP 表达

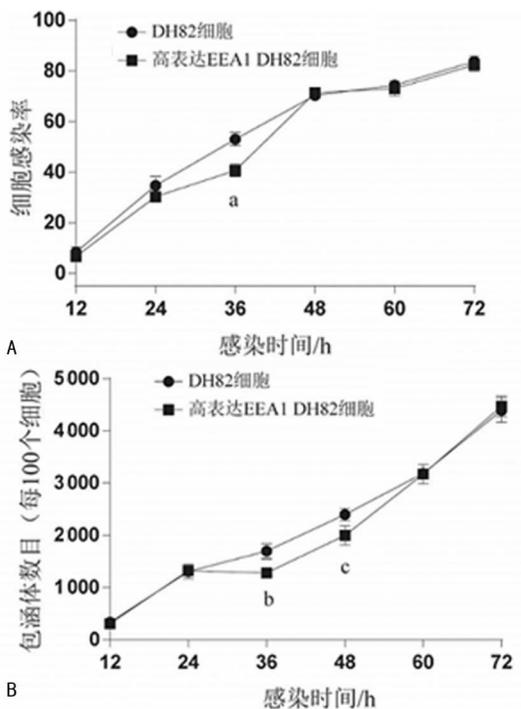


注: A 为 qPCR 检测 EEA1 mRNA 的表达, GV287-control 表示 GV287 慢病毒空载体对照组, GV287-EEA1 表示 GV287-EEA1 慢病毒感染组; B 为 Western blot 检测 EEA1 蛋白的表达, 1 表示 GV287 慢病毒空载体对照组, 2 表示 GV287-EEA1 慢病毒感染组

图 4 qPCR 及 Western blot 检测 EEA1 的表达

2.6 EEA1 过表达可抑制细胞感染及细胞内查菲埃立克体桑葚状包涵体繁殖 如图 5 所示, 查菲埃立克体分别感染 DH82 细胞及稳定高表达 EEA1 的 DH82 细胞 36 h 后, 高表达 EEA1DH82 细胞组的细胞感染率低于对照组的, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 高表达 EEA1DH82 细胞组细胞内查菲埃立克体包涵体数目低于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。感染后 48 h, 高表达 EEA1DH82 细胞组细胞内包涵体数目少于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 但两组细胞感染率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。感染 2 d 后, 高表达 EEA1 的 DH82 细胞组与 DH82 细

胞组的细胞感染率及胞内包涵体数目差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果表明, 在感染后的 36 h, 细胞感染率有所下降, 胞内查菲埃立克体的增殖受到一定程度的抑制。



注: A 为细胞感染率的比较; B 为包涵体数目的比较

图 5 EEA1 过表达对细胞感染及细胞内查菲埃立克体桑葚状包涵体繁殖的影响

3 讨论

立克次体目、无形体科、埃立克体属的查菲埃立克体, 是一种寄生于单核细胞内的革兰阴性病原体。该病原体于 1987 年首次被报道, 1991 年从患者血液中获得分离鉴定^[6]。其所致病为单核细胞埃立克体病 (HME), 是一种经蜱传播的人兽共患病。近年来, 世界范围内查菲埃立克体感染的报道逐年上升, 目前已成为世界性关注的疾病^[7-8]。美国已将其列为法定上报传染病。分子流行病学证据提示我国存在人埃立克体病感染和流行的危险^[9-10]。然而, 我国对埃立克体的研究开展较晚, 临床确诊病例较少, 埃立克体导致宿主持续感染的机制研究还尚属空白。因此, 有必要及时深入开展埃立克体的相关研究, 明确其与宿主相互作用模式和致病机制, 为埃立克体的防控提供参考和指导。但是, 查菲埃立克体为专性细胞内寄生病原体, 无法在体外培养基中分离培养, 其基因敲除技术也面临巨大挑战, 并且缺乏有效的研究工具, 很大程度上制约了其与其宿主细胞相互作用机制的研究。

Rab 蛋白是一类属于 Ras 蛋白家族的小 GTP 酶, 人的 Rab 蛋白包括 60 多个成员, Rab 蛋白家族成员可以特异性地定位于胞质中的某些亚细胞器^[11], 参与调节细胞内的蛋白转运过程, 包括囊泡的形成、迁移和融合过程^[12-14]。Rab5 主要位于早期内体, 控制

早期体内间的融合与成熟^[15],可作为早期吞噬体的标记分子。Rab5 存在活化和失活两种功能状态,与 GDP 结合时处于失活状态,而与 GTP 结合时为活化状态。EEA1 是 Rab5 蛋白重要的效应分子,EEA1 与 Rab5-GTP 相互作用使早期吞噬体发育为晚期吞噬体。以往的研究发现 EEA1 存在于查菲埃立克体吞噬体上^[16];另有研究报道,EEA1 短暂(宿主细胞吞噬乳胶珠的 1 h 内)地募集于乳胶珠吞噬体上,但在结核分枝杆菌吞噬体上未检测到 EEA1^[17];课题组前期利用密度梯度离心法成功获得了查菲埃立克体吞噬体,并将吞噬体进行质谱分析,质谱结果显示查菲埃立克体吞噬体具有早期吞噬体标记分子 Rab5,但未检测到 EEA1 及溶酶体标志分子^[3],推测可能原因:EEA1 短暂的一过性地出现在查菲埃立克体吞噬体上,并与 Rab5 相互作用促进吞噬体的发育,但本课题组提取吞噬体并进行质谱检测是在感染率达到 90%,此时距病原体感染宿主细胞已有 2~3 d 的时间。基于以上论述,Rab5 的效应分子 EEA1 成为进一步研究查菲埃立克体抑制吞噬体溶酶体融合机制的关键分子之一,如果可以获得 EEA1 的过表达细胞株,将为下一步研究查菲埃立克体致病机制提供实验基础。

犬的巨噬细胞 DH82 细胞是查菲埃立克体的易感细胞,因此本研究选用 DH82 细胞作为工具细胞。慢病毒载体是在人类免疫缺陷病毒 1 型基础上改造而成的一种能高效地将目的基因有效地整合到宿主染色体上并达到持久性表达的病毒载体系统。与其他反转录病毒相比,慢病毒不仅对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力,而且具有长期稳定表达、对组织器官无毒性作用、外源基因片段容量大等优点。为了获得长期稳定表达 EEA1 的细胞株,本研究选用慢病毒载体。

本研究首先采用分子生物学技术和基因工程技术,构建了慢病毒表达质粒 GV287-EEA1,经测序证实插入片段序列准确无误。将慢病毒重组载体 GV287-EEA1 转染 293T 细胞,结果证实病毒具有良好的滴度及转染效率。然后,利用构建成功的 EEA1 慢病毒载体感染犬的巨噬细胞 DH82,通过 qPCR 和 Western blot 从 mRNA 及蛋白水平检测 DH82 细胞中 EEA1 的表达情况,结果显示慢病毒成功感染 DH82 细胞。那么,EEA1 过表达后,是否会降低病原体在胞内的繁殖呢?本课题组又进一步用查菲埃立克体感染稳定表达 EEA1 的 DH82 细胞,结果发现在感染后的 36 h,细胞感染率有所下降,胞内查菲埃立克体的增殖受到一定程度的抑制,但病原体没有能够被完全清除。这一结果提示,Rab5 与单一效应分子 EEA1 相互作用不足以完全清除病原体;宿主细胞多种分子在吞噬体与溶酶体融合以及吞噬溶酶体形成中均发挥作用,其他分子,如 Rab7、Rab7 的效应分子 RILP/ORP1L、Rab7 与 Rab5 的共同效应分子 Mon1/

Ccz1,在查菲埃立克体吞噬体成熟、吞噬溶酶体形成、清除病原体过程中发挥的作用仍有待后续实验进一步研究。

4 结 论

综上所述,本实验成功构建了 EEA1 慢病毒表达载体,建立 DH82-EEA1 稳定转染细胞系,EEA1 过表达后,病原体的繁殖受到抑制,为进一步研究查菲埃立克体抑制吞噬体溶酶体融合机制提供实验基础。但是,本研究仍存在一些不足,EEA1 过表达后,尽管在一定程度上对查菲埃立克体的繁殖起到了抑制作用,但并未清除病原体。其他效应分子的作用及这些分子与 EEA1 协同在促进吞噬体成熟、吞噬溶酶体形成、有效清除病原体中发挥的作用有待进一步研究,本课题组将会在后续研究中不断探索。

参考文献

- [1] GOKCE H I, ROSS G, WOLDEHIWET Z. Inhibition of phagosome-lysosome fusion in ovine polymorphonuclear leucocytes by Ehrlichia (Cytoecetes) phagocytophila[J]. J Comp Pathol, 1999, 120(4):369-381.
- [2] LIN M, LIU H, XIONG Q, et al. Ehrlichia secretes Etf-1 to induce autophagy and capture nutrients for its growth through RAB5 and class III phosphatidylinositol 3-kinase [J]. Autophagy, 2016, 12(11):2145-2166.
- [3] YAN C, YAN L, BIN W, et al. Proteomic analysis of the Ehrlichia chaffeensis phagosome in cultured DH82 cells [J]. PLoS One, 2014, 9(2):e88461.
- [4] SIMONSEN A, LIPPE R, CHRISTOFORIDIS S, et al. EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion[J]. Nature, 1998, 394(6692):494-498.
- [5] BARNEWALL R E, RIKIHISA Y. Abrogation of gamma interferon-induced inhibition of Ehrlichia chaffeensis infection in human monocytes with iron-transferrin[J]. Infect Immun, 1994, 62(11):4804-4810.
- [6] ANDERSON B E, DAWSON J E, JONES D C, et al. Ehrlichia chaffeensis, a new species associated with human ehrlichiosis[J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(12):2838-2842.
- [7] KOH F X, KHO K L, KISOMI M G, et al. Ehrlichia and Anaplasma infections: serological evidence and tick surveillance in Peninsular Malaysia [J]. J Med Entomol, 2018, 55(2):269-276.
- [8] SACHDEV S H, JOSHI V, COX E R, et al. Severe life-threatening Ehrlichia chaffeensis infections transmitted through solid organ transplantation [J]. Transpl Infect Dis, 2014, 16(1):119-124.
- [9] 王卓, 吴琼, 于森, 等. 中韩边境地区林区鼠类几种重要蜱媒病原体感染的血清学调查[J]. 微生物学杂志, 2017, 37(6):41-44.
- [10] 王卓, 吴琼, 杨慎江, 等. 长白山地区蜱类和鼠类中查菲埃立克体感染调查及 16S rRNA 序列分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 12(10):971-978.
- [11] WANDINGER-NESS A, ZERIAL M. (下转第 1801 页)

表达量显著增加,同时发现亲本株细胞与耐药株细胞的 miR-218 表达量差异无统计学意义($P>0.05$),说明耐药的发生可能与 miR-218 表达量无关。在含有一定量顺铂的培养基中 miR-218/耐顺铂 SiHa 的增殖速度和 IC_{50} 显著低于耐药株,但与亲本株无差异,说明虽然耐药的发生过程与 miR-218 无关,但过量表达 miR-218 后可以增加耐药株细胞对顺铂的敏感性。之后的划痕试验和 Transwell 试验均证实了 miR-218 对耐药株细胞迁移和侵袭能力的抑制,这与目前大多研究结果相一致。

本研究通过持续缓慢增加顺铂浓度的方法成功构建了 SiHa 耐药株,慢病毒转染法建立了过表达 miR-218 的 SiHa 细胞株及耐药株。与 SiHa 及耐顺铂 SiHa 相比,miR-218/耐顺铂 SiHa 细胞株的 miR-218 表达量显著升高;在含有顺铂培养液中,耐顺铂 SiHa 的克隆增殖与 IC_{50} 显著高于 SiHa 与 miR-218/耐顺铂 SiHa,miR-218/耐顺铂 SiHa 的划痕愈合率与细胞穿膜次数显著低于 SiHa 及耐顺铂 SiHa。

4 结 论

miR-218 基因可能不参与宫颈癌细胞的耐药发生,但对于已经发生耐药的宫颈癌细胞,转染 miR-218 基因后使基因过表达 miR,则可以增加对顺铂的敏感性,同时迁移和侵袭能力下降,对于临床耐药而导致化疗失败的患者而言,提供了一条新的科研和治疗思路。

参考文献

[1] 唐秦,邢高升,彭君臣,等. 杉醇联合铂类方案治疗中晚期宫颈癌的疗效[J]. 热带医学杂志,2016,16(2):213-216.
 [2] ZHU H, LUO H, ZHANG W, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer[J]. Drug Des Devel Ther, 2016, 10 (1):1885-1895.
 [3] 方芳,蔡军波,王萍. 欧前胡素逆转宫颈癌细胞对顺铂的抵抗性及机制研究[J]. 浙江实用医学,2016,21 (6):391-393.
 [4] 沈小姣,于波,秦晓蕾. miRNA 在高危 HPV 感染的宫颈组织中表达的意义[J]. 热带医学杂志,2016,16(11):

1382-1385.
 [5] 陶贝贝,周文娟,张婷. MicroRNA-10b 对宫颈癌细胞侵袭迁移能力的影响及机制研究[J]. 国际妇产科学杂志,2017,44(6):703-708.
 [6] 李祎博,邓金桂,陈晶,等. 顺铂耐药人宫颈癌 HeLa 细胞株的建立及其相关耐药微小 RNA 的表达情况[J]. 广西医学,2017,39 (8):1198-1202.
 [7] 张婷婷,彭慧霞. microRNA217 逆转人宫颈癌细胞顺铂耐药及其作用机制[J]. 陕西医学杂志,2017,46 (10):1348-1350.
 [8] 张建洁,袁琳,陈雪,等. 宫颈癌组织 HeLa 细胞 RNF43 表达及其对宫颈癌细胞增殖能力的影响[J]. 疑难病杂志,2016,15(6):617-620.
 [9] 赵醒,赵宇阳,王军,等. Caveolin-1 对宫颈癌细胞增殖和迁移能力的影响及其机制[J]. 中国妇幼保健,2016,31 (3):608-610.
 [10] OLIVETO S, MANCINO M, MANFRINI N, et al. Role of microRNAs in translation regulation and cancer[J]. World J Biol Chem, 2017, 8 (1):45-56.
 [11] TANG S, WANG D, ZHANG Q, et al. miR-218 suppresses gastric cancer cell proliferation and invasion via regulation of angiopoietin-2[J]. Exp Ther Med, 2016, 12(6):3837-3842.
 [12] LIU B, TIAN Y, FANG L, et al. Tumor-suppressing roles of miR-214 and miR-218 in breast cancer[J]. Oncol Rep, 2016, 35 (6):3178-3184.
 [13] 王涛,马思聪,戚星星,等. MicroRNA-218 下调肝细胞癌中的 E2F2 基因表达抑制细胞增殖的研究[J]. 肝脏,2016,21 (3):179-182.
 [14] JIANG Z, SONG Q, ZENG R, et al. MicroRNA-218 inhibits EMT, migration and invasion by targeting SFMBT1 and DCUN1D1 in cervical cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7 (29):45622-45636.
 [15] 崔英. 宫颈癌组织 miR-218、Stat3 表达变化及其临床意义[J]. 山东医药,2017,57(36):79-81.
 [16] 石玉荣,刘健,贺伟,等. MiR-218 在宫颈癌组织中的表达及对 HeLa 细胞凋亡及转移的影响[J]. 四川大学学报(医学版),2016,47 (5):697-702.

(收稿日期:2018-12-20 修回日期:2019-03-18)

(上接第 1797 页)

Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014, 6 (11):a022616.
 [12] PRASHAR A, SCHNETTGER L, BERNARD E M, et al. Rab GTPases in immunity and inflammation[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 29(7):435.
 [13] LANGEMEYER L, FROHLICH F, UNGERMANN C. Rab GTPase function in endosome and lysosome biogenesis[J]. Trends Cell Biol, 2018, 28(11):957-970.
 [14] PFEFFER S R. Rab GTPases: master regulators that establish the secretory and endocytic pathways[J]. Mol Biol Cell, 2017, 28(6):712-715.

[15] BUCCI C, PARTON R G, MATHER I H, et al. The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway[J]. Cell, 1992, 70(5):715-728.
 [16] MOTT J, BARNEWALL R E, RIKIHISA Y. Human granulocytic ehrlichiosis agent and Ehrlichia chaffeensis reside in different cytoplasmic compartments in HL-60 cells[J]. Infect Immun, 1999, 67(3):1368-1378.
 [17] FRATTI R A, BACKER J M, GRUENBERG J, et al. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest[J]. J Cell Biol, 2001, 154(3):631-644.

(收稿日期:2019-01-20 修回日期:2019-04-15)