

免疫与感染

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000018

ALR 基因 RNA 干扰慢病毒表达载体的构建及其在肝癌细胞中对 ALR 表达的抑制

郭虹利¹, 刘 杞¹, 郭 晖¹, 杨 超², 孙 航¹, 吴传新²

(重庆医科大学附属第二医院 1. 病毒性肝炎研究所; 2. 肝胆外科, 重庆 400010)

【摘要】目的:构建肝再生增强因子(augmenter of liver regeneration, ALR)基因 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)慢病毒载体,并检测其对肝癌细胞株 HepG2 和 QGY 中 ALR 基因表达的干扰效率。**方法:**针对 ALR 基因 RNAi 的有效靶序列,合成靶序列的 OligoDNA,退火形成双链 DNA,与经 *Hpa* I 和 *Xho* I 双酶切线性化的 GV118 慢病毒载体连接产生 LV-ALR-shRNA 重组慢病毒载体,经转化感受态细胞后筛选出阳性克隆,并进行测序鉴定。用 293T 细胞包装产生慢病毒,逐孔稀释法测定病毒滴度。再将包装浓缩后的慢病毒转染肝癌细胞株 HepG2 和 QGY,应用 Real-time PCR 和 Western blot 方法检测 HepG2 和 QGY 细胞中 ALR 基因 mRNA 和蛋白的表达情况。**结果:**酶切鉴定证实成功构建了针对人 ALR 基因的 RNAi 慢病毒载体,包装并浓缩慢病毒,病毒滴度为 $8E+8$ TU/ml。将病毒感染肝癌细胞株 HepG2 和 QGY 后,2 种细胞的干扰组 ALR 的 mRNA 表达水平较阴性对照组及空白对照组均明显下降(HepG2 细胞, $P_{\text{干扰组 vs 阴性病毒对照组}}=0.004$, $P_{\text{干扰组 vs 空白对照组}}=0.001$; QGY 细胞, $P_{\text{干扰组 vs 阴性病毒对照组}}=0.005$, $P_{\text{干扰组 vs 空白对照组}}=0.001$),同样,干扰组 ALR 在蛋白水平的表达也明显降低。**结论:**成功构建 ALR 基因 RNAi 慢病毒载体,该载体能有效干扰肝癌细胞株 HepG2 和 QGY 中 ALR 基因的表达。

【关键词】RNA 干扰;慢病毒载体;肝再生增强因子基因**【中图分类号】**R73**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-10-09

Construction of recombinant lentiviral vector of siRNA for augmenter of liver regeneration gene and its expression in HepG2 cells

Guo Hongli¹, Liu Qi¹, Guo Hui¹, Yang Chao², Sun Hang¹, Wu Chuanxin²

(1. Institute for Virus Hepatitis; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To construct a lentiviral vector for RNA interference(RNAi) for augmenter of liver regeneration(ALR) gene and to detect its interference efficiency in human hepatoma cell line HepG2 and QGY. **Methods:** Effective sequence of siRNA targeting ALR gene was confirmed. The complementary DNA containing both sense and antisense Oligo DNA of the targeting sequence was designed, synthesized and cloned into the *Hpa* I and *Xho* I restriction sites of GV118 lentiviral vector. The resulting lentivirus vector containing ALR shRNA was named LV-ALR-shRNA. The competent *E.coli* cells were transformed and positive clone were screened, identified and sequenced. The recombinant lentivirus was packaged into mature lentivirus by 293T cells and the virus titer was measured by hole dilution method. The packaged lentivirus was used to infect HepG2 and QGY cells. The expression of ALR in the cells was detected by real-time PCR and Western blot. **Results:** PCR and sequencing verified that the recombinant lentiviral RNAi vector of ALR was constructed successfully. The titer of concentrated virus was $8E+8$ TU/ml. After being transfected by virus, ALR mRNA and protein levels were obviously reduced in both human hepatoma cell line HepG2 and QGY compared with those of negative control and blank control cells ($P<0.05$). **Conclusion:** The lentiviral RNAi expression vector targeting ALR gene is successfully constructed and it could effectively silence the expression of ALR in human hepatoma cell line HepG2 and QGY.

【Key words】RNA interference; lentivirus; augmenter of liver regeneration gene

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC),简称

作者介绍:郭虹利,Email:guohongli0517@163.com,

研究方向:肝脏疾病

通信作者:孙 航,Email:sunhang-wu@21cn.com。

基金项目:重庆市卫生局医学科研计划资助项目(编号:2010-2-130; 2012-1-042)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000018.html>

肝癌,是我国最常见的恶性肿瘤之一,已有研究表明,许多细胞因子参与了肝癌的发生发展。肝再生增强因子(augmenter of liver regeneration, ALR)是90年代初发现的一种具有热稳定性、非特异性促进肝细胞再生的细胞因子^[1],并且在肝癌的发生、发展过程中起重要作用,但其在肝癌生长分化中的具体作

用机制仍不清楚。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)作为一种可以高效、特异地降解靶基因 mRNA 的实验技术^[2],已成为研究基因功能和基因表达调控的重要方法。本实验通过设计并构建针对 ALR 基因的 RNAi 慢病毒载体,并转染人肝癌细胞株 HepG2 和 QGY 验证其干扰效果,为后续研究 ALR 基因在肝癌的发生和发展过程中的作用机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

慢病毒载体系统包括 GV118、pHelper1.0、pHelper2.0, 293T 细胞、HepG2 细胞,购自上海吉凯基因化学有限公司;人肝癌细胞株 QGY 由本研究所保存;DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司;限制性内切酶、T4 连接酶购自 NEB 公司;Lipofectamine2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司;大量质粒 DNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司;RNA 提取试剂、cDNA 合成试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 试剂公司;兔抗人 ALR 多克隆抗体购自 Santa Cruz biotechnology 公司; β -actin 抗体购自北京四正柏生物科技有限公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗购自联科生物技术有限公司;ECL 显色试剂盒购自凯基生物科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 shRNA 慢病毒载体构建 根据 GenBank 数据库中人 ALR 基因编码序列(NM-005262),按照 RNA 干扰序列设计原则,设计并合成针对 ALR 基因 siRNA 的核苷酸序列(oligo)。通过 BLAST 同源性分析,证实所选序列与其他的基因不具有同源性。同时设计合成了一段无意义序列作为阴性对照序列。干扰靶点序列为:5'-GTGTGCTGAAGACCTAAGA-3',设计并合成 shRNA 的 DNA 片段,经退火形成双链 DNA:5'-TGAGTGTGCTGAAGACCTAAGACTCGAGTCTTAGGTCTTCA-GCACACTCTTTTTTC-3'和 5'-TCGAGAAAAAAGAGTGTG-CTGAAGACCTAAGACTCGAGTCTTAGGTCTTCAGCACACTC A-3'(上海吉凯基因化学有限公司合成)。与经 *Hpa* I 和 *Xho* I 双酶切后的 GV118 线性化载体连接,转化 DH5 大肠杆菌,挑取重组阳性克隆进行 PCR 鉴定并进行测序分析。PCR 阳性克隆的引物:上游引物:5'-GCCCCGGTTAATTTCATAT-3';下游引物:5'-CACCCAAGATCTGGCCTC-3',该质粒命名为 LV-ALR-shRNA。

1.2.2 慢病毒包装 转染前 24 h,将对数生长期的 293T 细胞接种于 15 cm 细胞培养皿,37 °C、5%CO₂ 培养箱内培养。待细胞密度达 70%~80%时用于转染。转染前 2 h 将细胞培养基更换为无血清培养基。取 LV-ALR-shRNA 载体 20 μ g, pHelper1.0 载体 15 μ g 和 pHelper2.0 载体 10 μ g,与相应体积的 Opti-MEM 混合均匀,调整混合液总体积为 2.5 ml,按 Invitrogen 公司 Lipofectamine2000 使用说明书进行共转染包装细胞 293T 细胞,于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养。8 h 后倒去含有转染混合物的培养基,加入含 10%血清的细胞培养基 25 ml,继续培养。48 h 后收集含有慢病毒的上清液,离心获

得病毒浓缩液,分装后置-80 °C 冰箱中保存。

1.2.3 病毒滴度测定 采用逐孔稀释滴度测定法测定重组慢病毒滴度。测定前 1 d,取对数生长期 293T 细胞种于 96 孔板,每孔加入培养基 100 μ l。第 2 天吸去 90 μ l 培养基,分别加入提前以 10 倍梯度稀释好的病毒液 90 μ l,继续培养,24 h 后,加入完全培养基 100 μ l。72 h 后,观察荧光表达情况,病毒滴度为每孔表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的细胞数/病毒原液量。

1.2.4 重组慢病毒感染人肝癌细胞株 HepG2 和 QGY 取生长良好的 HepG2 细胞和 QGY 细胞,分为干扰组、阴性对照病毒组和空白对照组,每组以细胞数约 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板中,37 °C、5%CO₂ 培养箱培养。待细胞融合度达到约 30%时,干扰组、阴性对照病毒组根据预实验中测定的最适感染复数(multiplicity of infection, MOI)值进行转染,病毒加入 8 h 后观察细胞状态并更换为新鲜培养基。病毒感染后 24、48、72 h,荧光显微镜下观察 2 种细胞 GFP 表达情况。

1.2.5 Real-time PCR 检测人肝癌细胞株 HepG2 和 QGY 中 ALR mRNA 的表达 分别提取 2 种细胞的干扰组、阴性对照病毒组、空白对照组 3 组细胞总 RNA 进行 Real-time PCR 检测。扩增引物:GAPDH-F:5'-TGACTTCAACAGCGACACC-CA-3';GAPDH-R:5'-CACCTGTGCTGTAGCCAAA-3';ALR-F:5'-GACAGGAAGTCTTGGCG-3';ALR-R:5'-CCTCCTG-TTCCACCCTTA-3'。PCR 反应条件:95 °C 预变性 30 s,之后每一步 95 °C 变性 5 s、60 °C 退火延伸 31 s,共进行 40 个循环。

1.2.6 Western blot 法检测人肝癌细胞株 HepG2 和 QGY 中 ALR 蛋白的表达 分别收集干扰组、阴性对照病毒组、空白对照组 3 组细胞,加入 RAPI 裂解液提取细胞总蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳,经转膜、封闭后,一抗 4 °C 孵育过夜(内参为 β -actin),洗膜 3 次后室温下二抗孵育 1 h,再洗膜 3 次后进行 ECL 显色。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多样本均数比较采用单因素方差分析,其两两比较采用 LSD-*t* 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

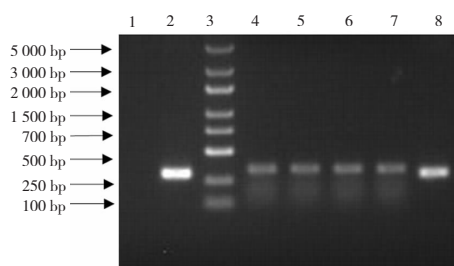
2 结果

2.1 阳性克隆的 PCR 鉴定

将挑取的 5 个重组克隆作 PCR 鉴定,已链接 shRNA 片段的阳性克隆 PCR 片段大小为 343 bp,没有连接 shRNA 片段的空载体克隆 PCR 片段大小为 307 bp。结果可见重组慢病毒质粒有 4 个克隆含有正确插入的片段(图 1),挑选阳性克隆送测序,测序结果表明:合成的 ALR shRNA 寡核苷酸链序列插入正确(图 2)。成功构建了 shRNA 慢病毒载体。

2.2 慢病毒载体的包装及滴度测定

成功构建的有效重组载体 LV-ALR-shRNA 与慢病毒包装质粒共转染 293T 细胞,采用逐孔稀释法测定病毒滴度,在倒置显微镜下观察各孔中 GFP 表达量,测定滴度为 $8E+8$ TU/ml,表明有大量质粒转入 293T 细胞,病毒包装成功。



1. ddH₂O; 2. 空载体; 3. Marker; 4~7. 正确插入 shRNA 片段的阳性克隆 (343 bp); 8. 没有插入 shRNA 片段的空载体克隆 (307 bp)

图 1 siRNA 慢病毒载体质粒的鉴定

Fig.1 Identification of the siRNA lentiviral vector plasmids

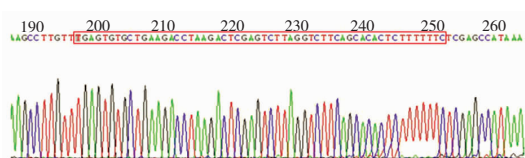


图 2 siRNA 慢病毒载体质粒 DNA 测序结果

Fig.2 DNA sequencing result of siRNA lentiviral vector plasmid

2.3 重组慢病毒感染人肝癌细胞株 HepG2 和 QGY

慢病毒感染人肝癌细胞株 HepG2 和 QGY 后 24 h, 细胞内即可见明显的绿色荧光, 病毒整合入细胞, 于 72 h 荧光强度最强, 细胞形态正常, 其感染效率达 80% 以上 (图 3、4)。

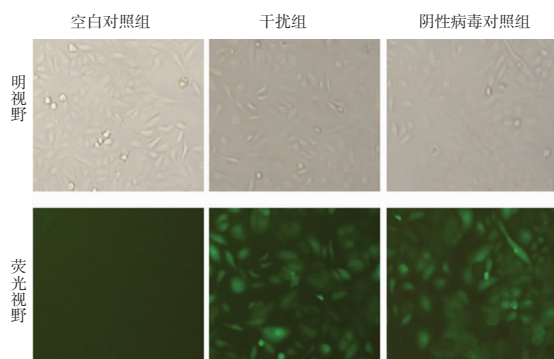


图 3 HepG2 感染后图片 (100 ×)

Fig.3 HepG2 cells infected with recombinant lentiviral vectors (100 ×)

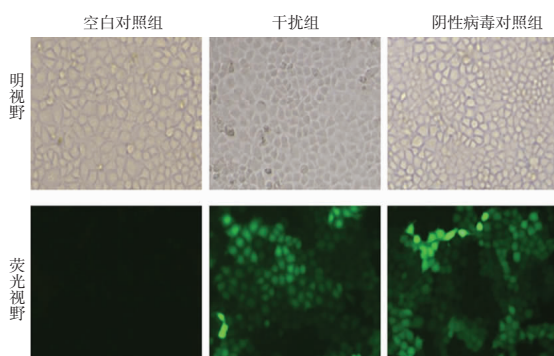


图 4 QGY 感染后图片 (100 ×)

Fig.4 QGY cells infected with recombinant lentiviral vectors (100 ×)

2.4 重组慢病毒 RNAi 对人肝癌细胞株 HepG2 和 QGY ALR mRNA 表达的影响

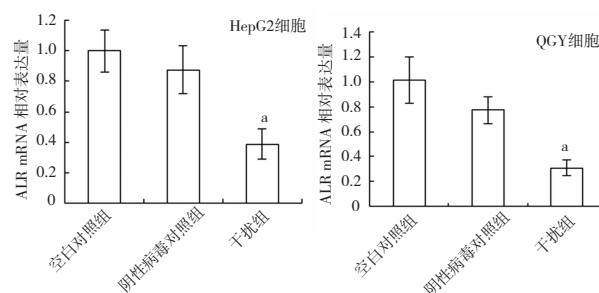
Real-time PCR 方法检测重组慢病毒载体对 HepG2 和 QGY 2 种细胞的 ALR mRNA 的干扰效果, 结果显示 2 种细胞的干扰组 ALR mRNA 表达较阴性对照组及空白对照组均明显降低, 差异有统计学意义 ($P=0.004$, $P=0.001$; $P=0.005$, $P=0.001$), 阴性对照组与空白对照组比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$) (表 1, 图 5)。因此, 实验中构建的重组慢病毒对 ALR 基因 mRNA 的表达有明显降低作用。

表 1 HepG 和 QGY 细胞中 ALRmRNA 相对表达量

Tab.1 Relative expression of ALR mRNA in HepG2 and QGY

分组	HepG2 表达量	QGY 表达量
空白对照组	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.19
阴性病毒对照组	0.88 ± 0.16	0.77 ± 0.11
干扰组	0.39 ± 0.10	0.31 ± 0.06
F 值	17.611	23.111
P 值	0.003	0.002

注: HepG2 细胞中, 阴性病毒对照组与空白对照组比, $P=0.279$; 干扰组与空白对照组比, $P=0.001$; 干扰组与阴性病毒对照组比, $P=0.004$ 。QGY 细胞中, 阴性病毒对照组与空白对照组比, $P=0.063$; 干扰组与空白对照组比, $P=0.001$; 干扰组与阴性病毒对照组比, $P=0.005$



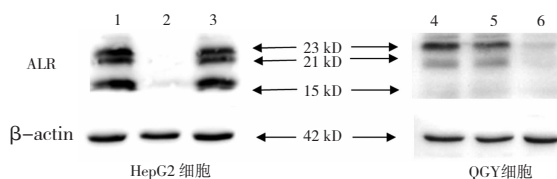
a. 与空白对照组及阴性病毒对照组相比, $P<0.01$, 有统计学差异

图 5 PCR 检测 ALR mRNA 的表达

Fig.5 ALR mRNA expression analyzed by real-time PCR

2.5 重组慢病毒 RNAi 对人肝癌细胞株 HepG2 和 QGY ALR 蛋白表达的影响

以 β -actin 蛋白为内参, 2 种细胞的 Western blot 结果显示: LV-ALR-shRNA 重组慢病毒载体对目的基因 ALR 的表达有显著敲减作用 (图 6)。



1、4. 空白对照组; 2、6. 干扰组; 3、5. 阴性病毒对照组

图 6 Western blot 检测 ALR 在 HepG2 和 QGY 中的表达

Fig.6 ALR protein expression in HepG2 and QGY cells analyzed by Western blot

3 讨 论

肝再生增强因子,属于 ALR/ERV1 基因家族成员,具有高度保守的 C' 末端序列,含有黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide,FAD)结合域和氧化还原中心。由于存在选择性剪接,ALR 包括 3 个亚型,相对分子量为 23、21、15 kD^[3]。它是一种促进肝细胞再生的细胞因子,在肝脏发育、再生和损伤修复的调节以及免疫抑制调节中具有重要作用^[4]。它在体外能够刺激肝癌细胞增殖,并呈剂量依赖性,但其对原代肝细胞却无刺激增殖的作用,将人 ALR 表达质粒转入肝癌细胞不仅可以明显促进肝癌细胞增殖,还能够增强其抗损伤能力,而阻断人 ALR 的表达则能够明显抑制肿瘤细胞增殖^[5-6]。并且在肝癌组织细胞中 ALR 的表达量明显高于正常的肝组织细胞^[7]。这些都提示 ALR 在肝癌的发生、发展中起了重要作用。

RNAi 技术是将与靶基因的转录产物 mRNA 同源互补的内源性或外源性双链 RNA 导入细胞,特异地降解靶基因 mRNA,从而实现其功能阻断的技术^[8]。慢病毒载体是一种携带干扰 RNA 的理想载体,其来源于人类免疫缺陷病毒^[9],既能感染分裂期细胞,又能感染分裂缓慢或非分裂期的细胞,可以使目的基因整合到宿主细胞染色体中,具备转染效率高、容载外源性基因片段大、在细胞内长期稳定表达以及对宿主细胞的毒性小等优点^[10-11]。

为了进一步研究 ALR 影响肝癌发生、发展的机制,本实验构建了包含 ALR shRNA 序列的慢病毒载体 LV-ALR-shRNA,经 293T 细胞包装产生高滴度病毒颗粒并感染人肝癌细胞株 HepG2 和 QGY,通过观察细胞内所发出的绿色荧光来检测转染效率,结果表明 LV-ALR-shRNA 重组慢病毒能够有效转染 HepG2 和 QGY 细胞。并且利用 real time-PCR 及 Western blot 方法在 HepG2 和 QGY 2 种肝癌细胞中验证重组慢病毒载体对 ALR 在基因及蛋白水平表达的影响。2 种细胞的 real time-PCR 结果均显示相对阴性对照病毒组及空白对照组,LV-ALR-shRNA 重组慢病毒感染的干扰组对目的基因 ALR mRNA 的表达有显著的敲减效果,阴性对照病毒组

与空白对照组相比较差异无统计学意义;Western blot 结果也显示,LV-ALR-shRNA 重组慢病毒载体对 ALR 蛋白表达具有明显的敲减作用,且重组慢病毒载体对 HepG2 和 QGY 细胞的 β -actin 均无影响,说明干扰序列具有特异性。总之,本实验成功构建了靶向 ALR 基因的 RNAi 慢病毒表达载体,并能有效抑制人肝癌细胞株 HepG2 和 QGY 中 ALR 的表达,为后续研究 ALR 在肝癌的发生和发展过程中的作用机制奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Michio H, Antonio F, Lorenzo P, et al. Cloning and sequence analysis of the rat augmenter of liver regeneration (ALR) gene; expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(17): 8142-8146.
- [2] Tiemann K, Rossi JJ. RNAi-based therapeutics—current status challenges and prospects [J]. EMBO Mol Med, 2009, 1(3): 142-151.
- [3] Dayoub R, Wagner H, Bataille F, et al. Liver regeneration associated protein (ALR) exhibits antimetastatic potential in hepatocellular carcinoma[J]. Mol Med, 2011, 17(3-4): 221-228.
- [4] 吴贻琛, 辛绍杰. 肝再生增强因子研究进展[J]. 传染病信息, 2012, 25(1): 61-64.
- [5] 梁 珊, 孙 航, 王新国等. 阻断肝再生增强因子表达对 HepG2 细胞转化生长因子- α 及表皮生长因子受体表达的影响[J]. 中国病原生物学杂志, 2009, 4(6): 401-404.
- [6] Tang L, Sun H, Zhang L, et al. Effects of the augmenter of liver regeneration on the biological behavior of hepatocellular carcinoma[J]. Saudi Med J, 2009, 30(8): 1001-1009.
- [7] Yu HY, Xiang DR, Huang HJ, et al. Expression level of augmenter of liver regeneration in patients with hepatic failure and hepatocellular carcinoma[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2010, 9(5): 492-498.
- [8] 田瑞敏, 鄢佳程, 王含彦, 等. RNA 干扰技术在肿瘤基因治疗中的现状研究[J]. 重庆医学, 2013, 42(7): 811-814.
- [9] Lee CL, Dang J, Joo KI, et al. Engineered lentiviral vectors pseudotyped with a CD4 receptor and a fusogenic protein can target cells expressing HIV-1 envelope proteins[J]. Virus Res, 2011, 160(1-2): 340-350.
- [10] Sakuma, Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational[J]. Biochem J, 2012, 443(3): 603-618.
- [11] Dreyer JL. Lentiviral vector-mediated gene transfer and RNA silencing technology in neuronal dysfunctions[J]. Mlo Biotechnol, 2011, 47(2): 169-187.

(责任编辑:唐宗顺)