

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.26.005

甲酰肽受体 shRNA 稳定转染 U87 细胞系的构建^{*}

杨 华,刘学英,杨风琴,楚元奎[△]
(宁夏医科大学临床医学院医学检验学系,银川 750004)

[摘要] 目的 构建靶向甲酰肽受体(FPR)基因的 shRNA 慢病毒表达载体,建立稳定转染的 U87 细胞系。方法 设计并合成 FPR 基因特异性的 shRNA 序列,构建 PDS019_pL/shRNA/GFP/F-FPR 慢病毒载体,通过脂质体转染 293T 细胞包装成 FPR 慢病毒颗粒,感染 U87 细胞。荧光显微镜观察转染效果,实时荧光定量 PCR 及蛋白免疫印迹法(Western blot)法检测 FPR 干扰效率。结果 成功构建 FPR 基因 shRNA 慢病毒表达载体。稳定转染 U87 细胞后,荧光显微镜下可观察到绿色荧光蛋白。实时荧光定量 PCR 及 Western blot 证实 PDS019_pL/shRNA/GFP/F-FPR 慢病毒载体具有良好的干扰效果。结论 成功构建 FPR shRNA 稳定转染的 U87 细胞系。

[关键词] 慢病毒属;甲酰肽受体;短发夹 RNA;U87 细胞

[中图分类号] R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)26-3616-03

Construction of U87 cell line transfected by FPR shRNA^{*}
Yang Hua,Liu Xueying,Yang Fengqin,Chu Yuankui[△]

(Department of Laboratory Medicine,Clinical Medicine School of Ningxia Medical University,Yinchuan,Ningxia 750004,China)

[Abstract] **Objective** To construct shRNA lentiviral vector for FPR gene,and establish stable transfection of U87 cell lines.
Methods The shRNA sequences for FPR gene was synthesized and inserted into PDS019 lentiviral vector. Liposome was used to package PDS019 lentiviral particles into 293T cells and used to infect U87 cells. The green fluorescent protein (GFP) and the silencing effects of the recombinant vectors were detected with the fluorescence microscope and Q-PCR,Western blot. **Results** The recombinant vectors were successfully constructed. In the U87 cells transfected with the recombinant vectors,the expression of GFP were detected and the interference efficiency of the recombinant vectors were confirmed. **Conclusion** The constructed FPR shRNA lentiviral vectors could interfere the expression of FPR in U87 cells.

[Key words] lentivirus;FPR;shRNA;U87 cells

甲酰肽受体(formyl peptide receptor,FPR)属于 G-蛋白偶联受体家族,在机体的炎症反应和天然免疫进程中起重要的作用。N-甲酰化甲硫酰-亮氨酸-苯丙氨酸酰胺(N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine,fMLF)和来源于肿瘤细胞或其他宿主细胞线粒体的一些多肽,均能与 FPR 结合,进而介导恶性肿瘤细胞的迁移和增殖,在肿瘤的发生、演进和转移过程中可能起重要作用^[1-2]。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)可特异性地阻断靶基因表达,是研究基因功能的有效技术。本实验设计构建并鉴定表达 FPR 基因的 RNA 干扰靶点慢病毒载体,为进一步研究 FPR 在恶性肿瘤生物学行为中的影响及可能的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 PDS019_pL/shRNA/GFP 慢病毒载体购于上海诺百生物科技有限公司。EcoR I 内切酶、BsmB I 内切酶和 T4DNA ligase 均购自 Fermentas 公司。质粒抽提试剂盒及凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司。大肠埃希菌 STBL3 菌种购自 TaKaRa 公司。LipofactamineTM 2000 及包装质粒 Packaging Mix 购自 Invitrogen 公司。293FT 与 U87 细胞均由上海诺百生物科技有限公司提供。DMEM、胎牛血清(FBS)均购自 HyClone 公司。Opti-MEM 购自 Gibco 公司。Trizol Reagent、QuantScript RT Kit、RealMasterMix(SYBR Green)均购自天根生化科技(北京)有限公司等。

1.2 方法

1.2.1 shRNA 序列设计与合成 在 GenBank 中查找人类 FPR 的基因序列(NM_001193306.1),其序列全长为 1 371 bp,其编码序列(coding sequences,CDS)位于 147~1 199 bp。在线软件设计并合成 3 对参数最好的干扰靶序列(表 1)。

表 1 FPR-shRNA 引物序列

引物编号	引物序列
1	F:CACCGCTATCTCTTCCTGGATATC ACGAATGATATCCAGGAAGAGATAGC R:AAAAGCTATCTCTTCCTGGATATCA TTCGTGATATCCAGGAAGAGATAGC 靶向位置:62~82
2	F:CACCGCTGGTTCCTGTGCAAATT CGCGAACGAATTTGCACAGGAACCAGC R:AAAAGCTGGTTCCTGTGCAAATTC GTTCGCGAATTTGCACAGGAACCAGC 靶向位置:281~301
3	F:CACCGCATCATCCGGTTCATCATT GCGAACAAATGATGAACCGGATGATGC R:AAAAGCATCATCCGGTTCATCATTG TTCGCAATGATGAACCGGATGATGC 靶向位置:605~625

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81301499,81460324)。作者简介:杨华(1974—),副教授,博士,主要从事肿瘤发生的分子机制及临床作用研究。 [△] 通讯作者,E-mail:chuyuankui@163.com。

1.2.2 慢病毒表达载体的构建和鉴定 PDS019_Pi/shRNA/GFP 载体经 BsmI 和 EcoR I 两种内切酶双酶切后切胶回收,并将退火后的 3 对 shRNA 序列与胶回收产物进行连接,连接产物转化感受态细胞,对生长出的克隆用菌检 PCR 方法检测,然后挑取阳性克隆测序验证。

1.2.3 慢病毒载体的包装及滴度测定 将包装质粒 Packaging Mix 和 3 种慢病毒表达质粒加入 Opti-MEM 混匀后与 Lipofectamine™ 2 000 共转染 293T 细胞,48 h 后收集细胞培养上清液并浓缩,—80 ℃ 保存。浓缩上清液感染 HEK293 细胞,荧光显微镜下观察各孔中荧光细胞数量。取荧光细胞数最少的 2 个培养孔的平均数值,分别计算滴度后取其平均值即为该病毒液滴度。病毒滴度为表达荧光的细胞数/该孔稀释的病毒液相当于原病毒的体积。

1.2.4 实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR detecting system,RT-qPCR)检测慢病毒 FPR 基因干扰效率 病毒侵染 293 细胞 48 h 后,收集细胞。Trizol 提取各组细胞的总 RNA,紫外分光光度计测定其浓度和纯度,按试剂盒操作说明合成第 1 链 cDNA,最后以 cDNA 为模板进行 RT-qPCR 检测,分析干扰效果,并确定最优干扰慢病毒。引物序列为 FPR 上游引物:5'-GGG TGA TGG CTC TGC TCC TC -3';下游引物:5'-CGT TGG TCC AGG GCG AAA -3';β-actin 上游引物:5'-AGC GAG CAT CCC CCA AAG TT -3';下游引物:5'-GGG CAC GAA GGC TCA TCA TT -3'。

1.2.5 重组慢病毒感染 U87 细胞及稳转细胞系的筛选 培养 U87 细胞至对数生长期,按照孔 5×10^5 个细胞接种于 6 孔板,培养过夜后感染病毒。以合适的 MOI 的病毒液侵染靶细胞,培养 4~6 h 后更换新鲜的完全培养基,继续培养 24~72 h,根据细胞状态开始进行 BSD(浓度分别为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12 μg/mL)筛选,筛选 10 d,建立稳转细胞系。

1.2.6 RT-qPCR 及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测稳转细胞 FPR 基因的表达 收集筛选成功的稳转细胞,提取总 RNA 及总蛋白,RT-qPCR 及 Western blot 检测 FPR 基因在 U87 细胞中的表达情况。

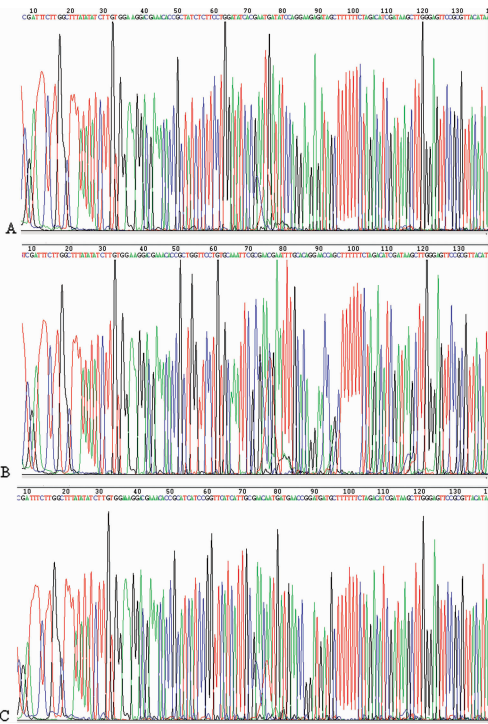
2 结 果

2.1 PDS019_Pi/shRNA/GFP-FPR 表达载体的序列鉴定 将阳性表达载体进行 DNA 序列测定,测序结果与实验设计的合成的 FPR 靶基因序列完全一致。结果表明,合成的寡核苷酸片段成功插入到慢病毒载体 PDS019_Pi/shRNA/GFP 中,PDS019_Pi/shRNA/GFP-FPR 表达载体构建成功(图 1)。

2.2 shRNA 慢病毒包装和滴度测定 3 种 PDS019_Pi/shRNA/GFP-FPR 慢病毒质粒转染 293FT 细胞 24 h 后,荧光显微镜下可见大部分细胞表达绿色荧光蛋白(图 2)。3 种 PDS019_Pi/shRNA/GFP-FPR 慢病毒滴度分别为 1.3×10^9 、 1.1×10^9 、 1.3×10^9 TU/mL。

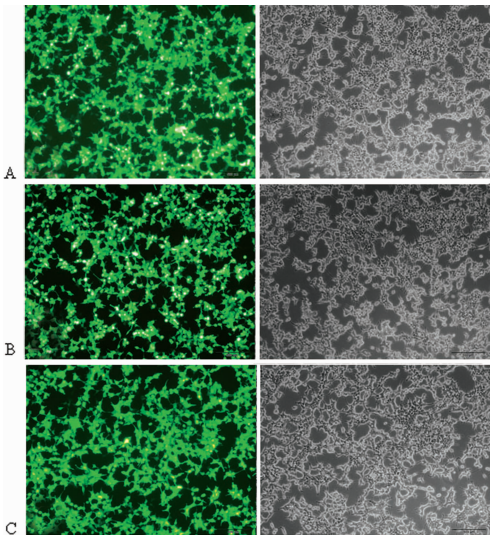
2.3 RT-qPCR 结果分析 RT-qPCR 数据结果显示慢病毒侵染 293T 细胞 48 h 后,干扰效果均大于 90%,PDS019_Pi/shRNA/GFP-FPR-1 慢病毒表达质粒的干扰效果最好。

2.4 稳转细胞系的构建与鉴定 感染时将病毒按不同 MOI 数加入到 U87 细胞中,MOI=30~60 时感染效率最好。用 4 μg/mL BSD 维持筛选建立稳转细胞系,荧光显微镜下可见荧光强度达 90% 以上(图 3)。提取细胞总 RNA 及总蛋白后行 Q-PCR 及 Western blot 检测。结果显示,干扰稳转细胞系中 FPR 基因及蛋白表达水平平均低于对照组(图 4),证明稳转细胞系构建成功。



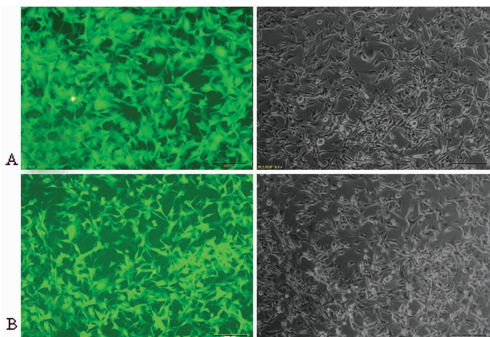
A: PDS019_Pi/shRNA/GFP-FPR-1 表达载体测序; B: PDS019_Pi/shRNA/GFP-FPR-2 表达载体测序; C: PDS019_Pi/shRNA/GFP-FPR-3 表达载体测序。

图 1 PDS019_Pi/shRNA/GFP-FPR 表达载体测序结果



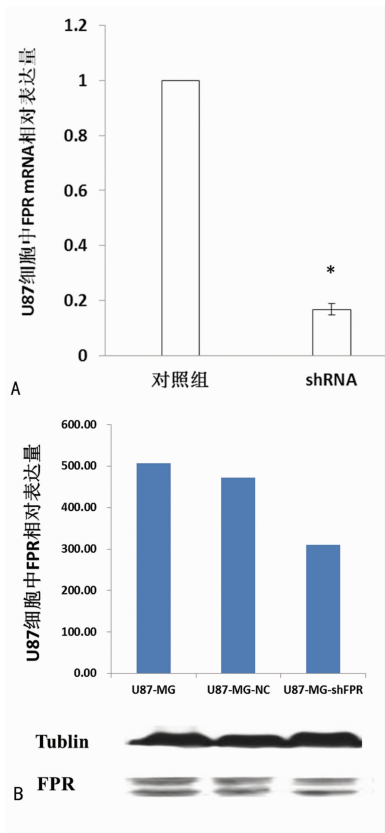
A: PDS019_Pi/shRNA/GFP-FPR-1; B: PDS019_Pi/shRNA/GFP-FPR-2; C: PDS019_Pi/shRNA/GFP-FPR-3。

图 2 荧光显微镜观察慢病毒包装(×100)



A: PDS019_Pi/shRNA/GFP-FPR; B: PDS019_Pi/shRNA/GFP-NC。

图 3 荧光检测 FPR 蛋白在 U87 细胞中的表达(×100)



A:RT-qPCR 检测 FPR 基因表达结果;B:Western blot 检测 FPR 蛋白表达结果。

图 4 FPR 在 U87 细胞中的表达

3 讨 论

甲酰胺受体属于 G-蛋白偶联受体家族,由 FPR1、FPR2 (FPRL1)和 FPR3 (FPRL2) 3 个成员组成^[3]。在氨基酸组成上,FPR1 与 FPR2 具有 69%的同源性,FPR1 与 FPR3 的同源性为 56%^[4]。FPR 作为 G-蛋白偶联受体家族,能够被不同结构的配体激活,包括肽、蛋白质和脂质。FPR 与激动剂结合后,能够触发胞内信号级联参与调节血管生成,细胞增殖,防止凋亡等^[5-6]。fMLF 是一种分泌的病原体相关分子模式(pathogen-associated-molecular patterns,PAMPs),在细胞损伤后,可以诱导中性粒细胞和单核细胞的趋化作用^[7]。fMLF 作为 FPR 的激动剂,能介导胶质瘤细胞的趋化移动^[8]。在神经胶质瘤中,FPRs 可能通过自分泌或旁分泌方式与局部刺激相互作用,在促进血管生成和肿瘤生长方面起到非常重要的作用^[9-10]。而且,FPR1 可以反式激活 EGFR,二者共同作用促进神经胶质母细胞瘤的恶性表型^[10-11]。膜联蛋白 1(annexin 1,AnxA1)是 FPR、FPRL1 和 FPRL2 3 种受体的激动剂^[12],可通过激活 FPRs 促进胶质母细胞瘤的生长^[13]、结肠直肠癌(SKCO-15 细胞)的浸润能力^[14]。Cheng 等^[15]的研究也表明,AnxA1 能够通过 FPR 激活 ERK/ITGB1BP1 通路促进胃癌细胞的侵袭。而且在 AnxA1 过表达的胃癌组织中 FPR1 的表达显著增加,是影响胃癌患者总体生存的独立危险因素^[16]。FPR 在恶性肿瘤发生、发展和转移中的作用越来越备受关注,有望成为肿瘤治疗的新靶点之一。

为进一步研究 FPR 在肿瘤发生、发展及转移中的作用,本实验以 FPR 基因为靶基因,应用 RNAi 技术,设计 3 种针对 FPR 基因的特异性 shRNA 序列,构建 3 对慢病毒干扰载体。经 PCR 鉴定阳性克隆及 DNA 测序证实合成的寡核苷酸片段

成功插入 PDS019_PI/shRNA/GFP,且插入片段与设计的靶序列一致,因此确定本实验成功构建了 3 种针对 FPR 基因 RNA 干扰靶点慢病毒载体。慢病毒包装后可成功转染至 293T 细胞中,通过 RT-qPCR 证实,设计包装的 3 种序列的慢病毒载体均可明显干扰 293T 细胞中的 FPR 基因表达,其中 PDS019_PI/shRNA/GFP-FPR-1 序列沉默表达效果最佳。本研究成功构建 FPR 基因慢病毒干扰载体,并建立了 FPR shRNA 稳定转染的 U87 细胞系,为进一步研究 FPR 在人胶质瘤中的作用及作用机制奠定了实验基础。

参考文献

[1] Chen K, Liu M, Liu Y, et al. Formylpeptide receptor-2 contributes to colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis[J]. J Clin Invest, 2013, 123(4): 1694-1704.

[2] Huang J, Chen K, Chen J, et al. The G-protein-coupled formylpeptide receptor FPR confers a more invasive phenotype on human glioblastoma cells[J]. Br J Cancer, 2010, 102(6): 1052-1060.

[3] Ye RD, Boulay F, Wang JM, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family[J]. Pharmacol Rev, 2009, 61(2): 119-161.

[4] Gao JL, Chen H, Filie JD, et al. Differential expansion of the N-formylpeptide receptor gene cluster in human and mouse[J]. Genomics, 1998, 51(2): 270-276.

[5] Cattaneo F, Guerra G, Ammendola R. Expression and signaling of formyl-peptide receptors in the brain[J]. Neurochem Res, 2010, 35(12): 2018-2026.

[6] Li Y, Cai L, Wang H, et al. Pleiotropic regulation of macrophage polarization and tumorigenesis by formyl peptide receptor-2[J]. Oncogene, 2011, 30(36): 3887-3899.

[7] Zhang Q, Raoof M, Chen Y, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury[J]. Nature, 2010, 464(7285): 104-107.

[8] Le Y, Hu J, Gong W, et al. Expression of functional formyl peptide receptors by human astrocytoma cell lines[J]. J Neuroimmunol, 2000, 111(1/2): 102-108.

[9] Zhou Y, Bian X, Le Y, et al. Formylpeptide receptor FPR and the rapid growth of malignant human gliomas[J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(11): 823-835.

[10] Liu M, Zhao J, Chen K, et al. G protein-coupled receptor FPR1 as a pharmacologic target in inflammation and human glioblastoma[J]. Int Immunopharmacol, 2012, 14(3): 283-288.

[11] Huang J, Hu J, Bian X, et al. Transactivation of the epidermal growth factor receptor by formylpeptide receptor exacerbates the malignant behavior of human glioblastoma cells[J]. Cancer Res, 2007, 67(12): 5906-5913.

[12] Ernst S, Lange C, Wilbers A, et al. An annexin 1 N-terminal peptide activates leukocytes by triggering different members of the formyl peptide receptor family[J]. J Immunol, 2004, 172(12): 7669-7676.

[13] Yang Y, Liu Y, Yao X, et al. Annexin 1(下转第 3621 页)

究结果提示,仅 ICSI 组的 48 h 的评分显著低于 24 h 的评分,表明冰帽具有治疗时间窗较广,降温设备需求低的优势,但是存在脑深部降温效果差、降温不均匀和速度不可控的缺陷。与全身低温和冰帽相比较,ICSI 可明显改善神经功能缺损,可能与以下原因有关:(1)ICSI 除了低温效果,还具有对梗死区局部血管的冲洗作用^[10];(2)ICSI 的降温速度较快,而全身低温可能延误治疗的最佳时机。由此可见,脑梗死患者急性病情加重、死亡的重要原因为脑组织水肿的加剧,进而形成颅内压升高继发脑疝形成^[11]。ICSI 可以明显减轻脑细胞的组织水肿,有效改善脑缺血急性期的神经功能,预防神经变性、坏死,从而最大程度提高脑梗死的预后^[12]。

NSE 主要在神经内分泌源细胞和神经元细胞,正常状态下在血清中只有微量,当颅脑组织受到损伤时,神经胶质细胞和神经元细胞出现坏死,则释放出大量 NSE,同时脑缺血后引起的血脑屏障损伤能释放出 MMP-9。有研究表明,血清 NSE 可以反映中枢神经系统的损伤程度,同时也能在某种程度上预示疾病的进展;MMP-9 可以反映血脑屏障的损伤程度。本研究的结果表明,ICSI 组中的 MMP-9 表达水平虽然下降,但是差异无统计学意义($P>0.05$)。而 ICSI 可以明显地降低血清 NSE 的表达,可见 ICSI 对于神经胶质细胞和神经元细胞有保护作用。

综上所述,颈内动脉间断灌注冷生理盐水是一种快速、高效、安全的实施选择性脑部低温方法,可显著减少梗死体积、减轻脑水肿、改善神经功能和血清学指标,并且其效果优于全身低温和冰帽。

参考文献

[1] Kim JH, Lee YW, Park KA, et al. Agmatine attenuates brain edema through reducing the expression of aquaporin-1 after cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2010, 30(5): 943-949.

[2] González-Ibarra FP, Varon J, López-Meza EG. Therapeutic hypothermia: critical review of the molecular mechanisms of action[J]. Front Neurol, 2011(2): 4.

[3] 赵沃华, 吉训明, 凌锋, 等. 大鼠动脉内局部低温脑梗死模型的建立和特点[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2010,

39(1): 109-112.

[4] 吴达荣, 陈世文, 曾志芬, 等. 亚低温对急性脑梗死大鼠溶栓治疗时间窗的影响[J]. 山东医药, 2013, 53(41): 27-29.

[5] Zhao WH, Ji XM, Ling F, et al. Local mild hypothermia induced by intra-arterial cold saline infusion prolongs the time window of onset of reperfusion injury after transient focal ischemia in rats[J]. Neurol Res, 2009, 31(1): 43-51.

[6] Choi JH, Marshall RS, Neimark MA, et al. Selective brain cooling with endovascular intracarotid infusion of cold saline: a pilot feasibility study[J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2010, 31(5): 928-934.

[7] 冀雅彬, 吴永明, 姬仲, 等. 不同低温诱导方式对大鼠脑梗死急性期的治疗效果比较[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(1): 89-92, 100.

[8] Chen J, Ji X, Ding Y, et al. A novel approach to reduce hemorrhagic transformation after interventional management of acute stroke: catheter-based selective hypothermia[J]. Med Hypotheses, 2009, 72(1): 62-63.

[9] Schwartz AE, Finck AD, Stone JG, et al. Delayed selective cerebral hypothermia decreases infarct volume after reperfused stroke in baboons [J]. J Neurosurg Anesthesiol, 2011, 23(2): 124-130.

[10] Doshi M, Kuwatori Y, Ishii Y, et al. Hypothermia during ischemia protects against neuronal death but not acute brain edema following transient forebrain ischemia in mice [J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(12): 1957-1961.

[11] Horstmann S, Koziol JA, Martinez-Torres F, et al. Sonographic monitoring of mass effect in stroke patients treated with hypothermia. Correlation with intracranial pressure and matrix metalloproteinase 2 and 9 expression[J]. J Neurol Sci, 2009, 276(1/2): 75-78.

[12] 万勇, 陈东. 颈动脉内等体温与冷 0.9% 氯化钠注射液灌注在大鼠脑梗死中的比较研究[J]. 山西医药杂志, 2015, 44(12): 1352-1354.

(收稿日期: 2016-02-18 修回日期: 2016-04-06)

(上接第 3618 页)

released by necrotic human glioblastoma cells stimulates tumor cell growth through the formyl peptide receptor 1 [J]. Am J Pathol, 2011, 179(3): 1504-1512.

[14] Babbitt BA, Lee WY, Parkos CA, et al. Annexin I regulates SKCO-15 cell invasion by signaling through formyl peptide receptors[J]. J Biol Chem, 2006, 281(28): 19588-19599.

[15] Cheng TY, Wu MS, Lin JT, et al. Annexin A1 is associated with gastric Cancer survival and promotes gastric

Cancer cell invasiveness through the formyl peptide receptor/extracellular signal-regulated kinase/integrin beta-1-binding protein 1 pathway[J]. Cancer, 2012, 118(23): 5757-5767.

[16] Cheng TY, Wu MS, Lin JT, et al. Formyl peptide receptor 1 expression is associated with tumor progression and survival in gastric Cancer[J]. Anticancer Res, 2014, 34(5): 2223-2229.

(收稿日期: 2016-02-14 修回日期: 2016-04-06)