

人胸腺素 β_4 RNA 干扰载体的构建及其对 293T 细胞目的基因表达的影响^{*}

黄似建 刘 畅 秦泽莲^{**} 陈 莉

(北京大学第三医院成形外科, 北京 100191)

【摘要】 目的 探讨人胸腺素 β_4 (thymosin β_4 , TMSB4) 基因 RNA 干扰慢病毒载体的构建, 观察病毒感染 293T 细胞后 TMSB4 mRNA 和蛋白表达, 为进一步研究 TMSB4 基因的功能提供基础。 **方法** 设计特异性干扰人 TMSB4 基因的小发卡 RNA 序列, 合成含有干扰序列的双链 DNA oligo, 与经 Age I 和 EcoR I 双酶切后的 pGCSIL-GFP 载体连接产生慢病毒载体。转化感受态大肠杆菌 DH5a 并对阳性克隆进行 PCR 扩增测序鉴定。慢病毒载体、包装系统质粒共转染包装细胞 293T 细胞, 产生慢病毒颗粒并测定病毒滴度。将获得的慢病毒感染 293T 细胞, 分别采用实时定量 PCR 和免疫细胞化学染色方法观察 TMSB4 mRNA 和蛋白的表达情况, 利用生成的 TMSB4 shRNA 慢病毒感染原代成纤维细胞。 **结果** 感染重组慢病毒的 293T 细胞与空病毒转染阴性对照细胞的 TMSB4 mRNA 表达分别为 0.56 ± 0.11 和 1.00 ± 0.06 ($P = 0.0006$), 实验组细胞的敲减率为 44%。实验组 TMSB4 蛋白表达水平 0.042 ± 0.007 比阴性对照组细胞 0.093 ± 0.009 的表达降低 55% ($H = 461.342, P < 0.001$)。感染重组慢病毒的原代培养的成纤维细胞与空病毒转染的对照细胞相比, TMSB4 蛋白表达水平亦明显降低。 **结论** TMSB4 基因干扰慢病毒构建成功并能显著降低 TMSB4 基因和蛋白在 293T 细胞中的表达, 成功感染原代成纤维细胞使其目的基因蛋白减少, 为进一步研究 TMSB4 基因的功能奠定研究基础。

【关键词】 Thymosin β_4 ; 293T 细胞; RNA 干扰; 慢病毒

中图分类号: R-33

文献标识: A

文章编号: 1009-6604(2009)07-0658-05

Construction of Thymosin β_4 Shrna Lentivirus and Its Effects on the Expression of Thymosin β_4 in 293T Cells Huang Sijian, Liu Chang, Qin Zelian, et al. Department of Plastic Surgery, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

【Abstract】 Objective To construct a recombinant lentiviral vector for human thymosin β_4 (TMSB4) and to test the mRNA and protein expression of TMSB4 in 293T cells after being infected by shRNA lentivirus. **Methods** We designed a specific sequence of small hair RNA targeting TMSB4 gene; the complementary DNA containing both sense and antisense oligo DNA of the targeting sequence was cloned into the pGCSIL-GFP vector to construct a lentiviral vector. The vector was converted into the competent DH5a coli, which confirmed by PCR and sequencing. Then the viral vector and the packed systemic vector were cotransfected 293T cells to get the lentivirus. The virus titer was determined. Afterwards, in the 293T cells infected with the lentivirus, the expression of TMSB4 was detected by real time PCR and immunocytochemistry. Similarly, a primary fibroblast was also infected with the lentivirus. **Results** Compared with negative control cells, the mRNA and protein levels of TMSB4 in 293T cells infected with the lentivirus were reduced by 44% (0.56 ± 0.11 vs 1.00 ± 0.06 , $F = 89.673$, $P < 0.01$) and 55% (0.042 ± 0.007 vs 0.093 ± 0.009 , $H = 461.342$, $P < 0.001$) respectively. The expression of TMSB4 was significantly reduced in the primary fibroblasts. **Conclusions** The expression of TMSB4 in 293T cells and primary fibroblasts is reduced after infection by lentiviral shRNA expression vector targeting human TMSB4, which will be a basis to the further function study of TMSB4.

【Key Words】 Thymosin β_4 ; 293T cell; RNA interference; Lentivirus

在临床实践中, 手术和创伤是增生性瘢痕和瘢痕疙瘩形成的最主要诱因, 这 2 种过度增生性瘢痕除了影响患者的外貌外, 严重还会影响患者的功能和心理。两者的发病机制目前还不十分清楚。成

纤维细胞过度增殖及细胞外基质过度沉积是其共同的特征。浸润生长、复发及部分存在的家族遗传倾向是瘢痕疙瘩与增生性瘢痕的不同之处。为了研究瘢痕过度增生的机理, 我们前期建立了瘢痕疙瘩和

* 国家自然科学基金资助课题(30471793)

** 通讯作者

增生性瘢痕差异表达基因 cDNA 文库^[1],从中筛选出的 BM005698 号基因片断与胸腺素 β_4 (thymosin β_4 , TMSB4) 基因部分序列高度同源。通过表达验证,证明在瘢痕疙瘩、增生性瘢痕和正常皮肤组织及其成纤维细胞中 TMSB4 表达存在差异^[2]。

TMSB4 是 1981 年从胸腺提取液中利用色谱分析和凝胶过滤法分离得到的水溶性、含有 43 个氨基酸、分子量为 4964Da 的高保守多肽^[3]。作为人体内广泛存在的一种多肽,TMSB4 参与调节免疫功能、神经发育、创伤愈合和肌动蛋白功能等细胞和机体的功能呈现多样性^[4]。因此,推测它是一个多功能的多肽。TMSB4 能加速伤口的愈合,抑制炎症介质的释放,加速细胞外基质沉积^[5,6]。结合我们的前期工作结果,我们推测 TMSB4 在瘢痕的形成和发展中可能发挥重要作用。本实验构建 TMSB4 的小发卡 RNA (shRNA) 序列慢病毒载体,包装产生慢病毒后利用产生的慢病毒感染 293T 细胞和原代成纤维细胞,观察 TMSB4 的 mRNA 和蛋白表达情况,为今后进一步研究 TMSB4 的功能及其对瘢痕等细胞的影响奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

PCR 用引物由上海吉凯基因技术有限公司合成,dsDNA oligo 由上海生物工程技术有限公司合成,慢病毒载体 pGCSIL-GFP、293T 细胞购于上海吉凯基因技术有限公司,质粒提取试剂盒、逆转录试剂盒、切胶回收试剂盒购自 Qiagen,转染试剂脂质体 2000 (Lipofectamine 2000)、RNA 抽提试剂 Trizol 购自 Invitrogen, M-MLV 逆转录酶和 dNTP 购自 PROMEGA 公司。Oligo dT 购自上海生物工程技术有限公司。无 RNA 酶的物品都购自 Axygen。Age I、EcoR I 和 T4 DNA 连接酶、T4 DNA 连接酶缓冲液购自 NEB, DNA 聚合酶购于 Takara, polybrene、Opti-MEM 培养基购于 Sigma,免疫组化 TMSB4 抗体购于 Abcam, PV6001 免疫组织化学试剂盒和 DAB (二氨基联苯胺) 显色试剂盒购于北京中杉金桥生物有限公司,实时定量 PCR (real time PCR) 试剂盒购于 TAKARA,血清购于 Hyclone。

1.2 方法

1.2.1 人 TMSB4 基因 RNA 干扰慢病毒载体的构建和鉴定 据 TMSB4 (NM_021109) 的基因信息,设计特异性针对目的基因的 shRNA 序列,同时设计一条序列作为阴性对照,通过 BLAST 验证该序列对于任何基因无干扰效应。合成、退火形成 shRNA DNA 双链,与经 Age I 和 EcoR I 双酶切后的 pGCSIL-GFP 载体连接,转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,挑选重

组阳性菌落进行 PCR 并进行测序鉴定(上海美季生物技术有限公司),证实 LV-sh-TMSB4 慢病毒载体构建成功。

病毒载体构建框架构建成功,shRNA 序列为 AaGAGGTTGGATCAAGTTTAA。阳性克隆的 PCR 鉴定引物为:上游:5' - CC - TATTTCCCATGATTCCTTCATA - 3',下游:5' - GTAATACGGTTATCCACGCG - 3'。阳性重组慢病毒命名为 LV-sh TMSB4,阴性重组慢病毒(即对照慢病毒)命名为 NC。

1.2.2 LV-sh TMSB4 的包装、收获及浓缩 LV-sh TMSB4 的包装、收获及浓缩参照文献^[7]进行,简而言之,pGC-LV 载体 20 μ g, pHelper 1.0 载体 15 μ g, pHelper 2.0 载体 10 μ g 用脂质体 2000 共转染 293T 细胞,8 h 后换成新鲜的含 10% 血清的培养基,继续培养 48 h,48 h 后收集细胞上清液,过滤,分装,-80 $^{\circ}$ C 长期保存备用,利用逐孔稀释法测定病毒滴度。

1.2.3 慢病毒感染 293T 细胞 感染前一天,293T 细胞用无青链霉素的含 10% 血清的培养基铺板于 6 孔板中,每孔 1×10^5 个细胞,根据测定的病毒滴度,在 MOI = 50 的情况下进行感染。感染分为实验组、阴性对照组及空白对照组。12 h 后换成含 10% 胎牛血清的培养基继续培养。根据细胞是否表达绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 判断细胞转染是否成功,以表达 GFP 的细胞占全部细胞的百分比确定细胞转染率。

1.2.4 病毒感染后 293T 细胞中 TMSB4 基因 mRNA 检测 293T 细胞病毒感染 5 d 后,根据 Invitrogen 公司的 Trizol 操作说明书进行细胞总 RNA 提取。根据 Promega 公司的 M-MLV 操作说明书使 RNA 逆转录获得 cDNA。按下列比例配置 PCR 反应体系:SYBR premixture 10 μ l;上游引物 (5 μ mol/ml) 0.5 μ l;下游引物 (5 μ mol/ml) 0.5 μ l; cDNA 1.0 μ l;双蒸水 8.0 μ l。其中内参 Actin 的上下游引物分别是 5' - GGCGGCACCACCATGTACCCT-3' 和 5' - AGGGGCCGGACTCGTCATACT - 3' (PCR 产物长度为 202 bp),TMSB4 的上下游引物分别是 5' - AAGAAACGATTGAACAGGAGAAG - 3' 和 5' - AGATAGATAGACAGATGGGAAAGG - 3' (PCR 产物长度为 232 bp)。实时定量 PCR 仪 (ABI 型号,美国) 上机设定程序为两步法 Real-Time PCR:预变性 95 $^{\circ}$ C, 15 s;之后每一步变性 95 $^{\circ}$ C, 5 s;退火延伸 60 $^{\circ}$ C, 30 s;共进行 45 个循环。每次在延伸阶段读取吸光值。PCR 结束后,95 $^{\circ}$ C 变性 1 min,然后冷却至 55 $^{\circ}$ C,使 DNA 双链充分结合。从 55 $^{\circ}$ C 开始到 95 $^{\circ}$ C,每一步增加 0.5 $^{\circ}$ C,保持 30 s,同时读取吸光值,用以制作溶解曲线。

1.2.5 病毒感染后 293T 细胞中 TMSB4 基因蛋白水平的检测 试验分成实验组 (感染 LV-sh TMSB4), 空白对照组 (未做处理对照), 阴性对照组 (感染对照慢病毒, NC)。各组细胞分别进行铺板。实验前一天细胞铺于盖玻片上, 使第 2 天细胞密度约为 80%。实验参照 TMSB4 抗体和 PV6001 试剂盒的说明进行操作。DAB 显色 5 min, 脱水, 封片。显微镜 (Olympus SH2, 日本) 镜下观察, 每张在 400 倍下随意取 5 个视野, 应用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件对平均光密度进行测量。

1.2.6 慢病毒感染原代成纤维细胞 人正常皮肤成纤维细胞源自美容手术废弃的皮肤, 以组织块培养法原代培养并传代, 所用皮肤标本是在患者知情同意下从北医三院成形外科门诊取材。取 1 例第 6 代成纤维细胞进行病毒感染。感染的过程如 1.2.3。荧光显微镜 (Nikon TE300, 日本) 镜下观察 GFP 的表达情况判断细胞转染率。感染 2 周后, 采用流式细胞仪 (MOFLO, 美国) 分选绿色荧光蛋白表达阳性的细胞并扩大培养。免疫组化染色检测成纤维细胞中 TMSB4 蛋白的表达, 步骤同 1.2.5。

1.3 统计学分析

以上实验每组设 3 个重复, 每一实验重复 3 次。实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用 SPSS 13.0 版统计软件进行统计学数据处理。实时定量 PCR 数值分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析法^[8], 采用单因素方差分析, 数据两两比较采用 LSD 法; 细胞免疫化学检测数据进行非参数秩和检验, 数据两两比较采用 Nemenyi test 法; $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DH5 α 大肠杆菌 TMSB4 shRNA 转化阳性克隆的 PCR 鉴定

TMSB4 基因的 shRNA 载体转化大肠杆菌, 挑选阳性克隆菌落行 PCR 扩增和测序。插入 TMSB4 基因干扰序列的重组阳性菌落经 PCR 扩增后的产物片段长为 343 bp (从载体中酶切掉 24 bp, 插入片段长为 61 bp), 以双酶切后 pGCSIL-GFP 空载体的 PCR 扩增产物 (长为 306 bp) 为对照, 鉴定结果和预期的一致 (图 1)。测序结果表明, 合成的 TMSB4 shRNA 核苷酸序列插入正确。

2.2 LV-sh TMSB4 慢病毒的滴度测定

将慢病毒包装质粒混合物和重组 TMSB4 基因慢病毒载体包装慢病毒后, 收集病毒上清液测定的病毒滴度为 4×10^8 U/mL。

2.3 LV-sh TMSB4 感染 293T 细胞的 TMSB4 mRNA 的表达变化情况

镜下可见 293T 细胞为铺路石样 (图 2)。病毒感

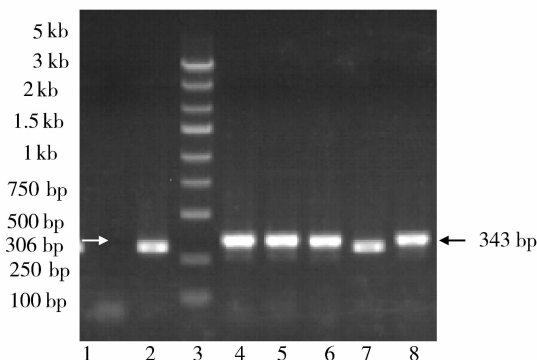


图 1 DH5 α 大肠杆菌转化克隆 PCR 产物的凝胶电泳图
1. 阴性对照 (ddH₂O) 2. pGCSIL - GFP 空载体
3. DNA 分子量标准 4~8. LV - sh TMSB4 重组菌样品

染 293T 细胞后, 在荧光显微镜下观察, 感染 LV-sh TMSB4 和阴性对照组都能够表达 GFP, 显示较强的绿色荧光, 5 d 左右荧光最亮, 感染效率达 85% 以上。

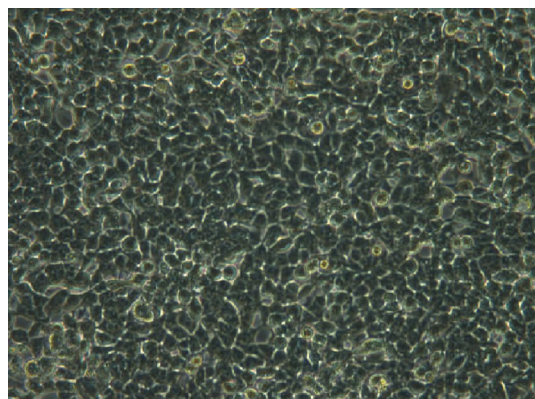


图 2 倒置显微镜观察 293T 细胞 $\times 200$

实时定量 PCR 的熔解曲线表现为单一峰, 说明是特异性扩增。实验组、空白对照组、阴性对照组的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 结果分别为 0.56 ± 0.11 、 1.22 ± 0.13 、 1.00 ± 0.06 ($n = 9$, $F = 89.673$, $P = 0.0007$)。实验组与阴性对照组相比明显下降 ($P = 0.0006$), 敲减率为 44%。

2.4 LV-sh TMSB4 病毒感染 293T 细胞 TMSB4 蛋白的表达变化

细胞免疫化学染色结果显示, 在空白对照和阴性对照细胞中, 细胞核、细胞浆均呈现深染的棕黄色阳性信号, 不同细胞深棕色、咖啡色着色不等。与前两组相比, LV-sh TMSB4 组细胞胞质、胞核染色程度明显浅染 (图 3)。感染病毒以后, LV-sh TMSB4 组、阴性对照组和空白对照组的平均光密度分别为 0.042 ± 0.007 、 0.093 ± 0.009 、 0.090 ± 0.010 , 293T 细胞 TMSB4 蛋白表达比阴性对照组明显减少 55% ($n = 9$, $H = 461.342$, $P < 0.001$)。

2.5 LV-sh TMSB4 感染原代成纤维细胞的 TMSB4

蛋白表达变化

原代成纤维细胞在镜下呈长梭形有突起。原代成纤维细胞感染病毒经流式细胞仪分选后,与对照组相比细胞形态未见明显改变,胞体较大,细胞绿色

荧光蛋白表达的阳性率达 99% (图 4)。细胞免疫化学染色结果显示,在细胞浆及细胞核中均有棕黄色阳性颗粒表达,实验组成纤维细胞的 TMSB4 染色阳性信号明显比 2 个对照组减弱(图 5)。

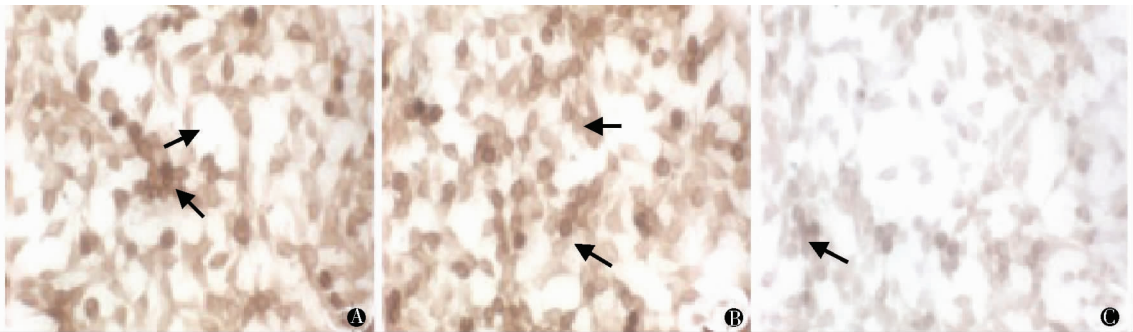


图 3 293T 细胞感染 LV-sh TMSB4 后 TMSB4 蛋白的表达变化 DAB 染色 ×200
A. 空白对照;B. 阴性对照;C. LV-sh TMSB4;↑TMSB4 蛋白表达阳性的细胞

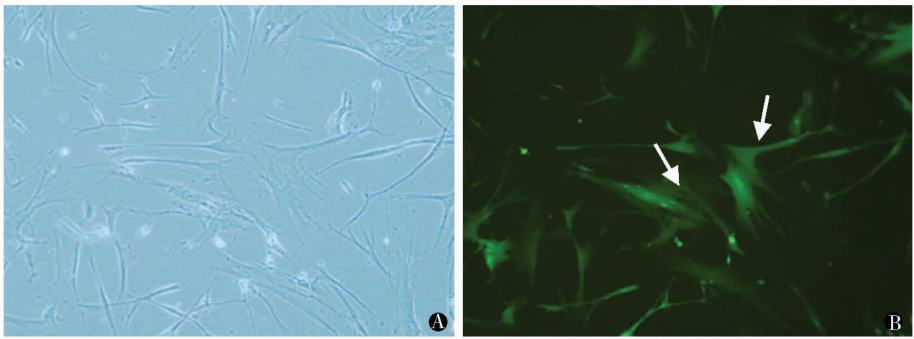


图 4 LV-sh TMSB4 感染的人成纤维细胞(流式细胞仪分选 ×200)
A. 普通光显微镜下;B. 荧光显微镜下;白箭头:表达绿色荧光蛋白阳性的转染 LV-sh TMSB4 成功的成纤维细胞

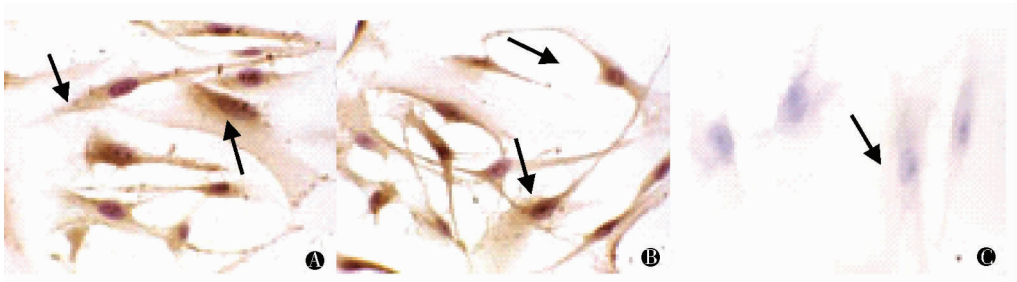


图 5 感染 LV-sh TMSB4 的人原代成纤维细胞 TMSB4 的蛋白表达变化 DAB 染色 ×400
A. 空白对照;B. 阴性对照;C. LV - sh TMSB4;↑TMSB4 染色阳性的成纤维细胞

3 讨论

TMSB4 蛋白广泛存在于各种组织、器官和细胞中,脾脏、胸腺、肺和腹膜巨噬细胞含量最高,在脑、肝、肾脏、睾丸、心脏表达其次,同时,在成肌细胞、成纤维细胞中也有表达^[9,10],在创伤的伤口液中 TMSB4 的含量可高达 14 μg/ml^[11]。研究表明, TMSB4 能促进皮肤创伤的愈合, Malinda 等^[12]首次

在大鼠皮肤全层损伤模型中研究 TMSB4 促进皮肤创伤愈合的作用,证实其促进角质细胞的分化、迁移进而再上皮化。局部敷用及腹腔注射 TMSB4 均观察到明显的再上皮化,同时 TMSB4 可以直接促进损伤边缘正常皮肤的角质细胞向损伤中心迁移,最终均促进伤口的再上皮化,表现为伤口的收缩,损伤面积的减小,伤口愈合;TMSB4 还能通过促进胶原纤维重排与基膜重建,在组织的再生、重塑、创伤组织

的愈合修复中发挥重要作用。

RNAi 技术是当今生命科学的一大热点,是在基因转录后水平的干扰,是抑制基因表达的强有力工具,能特异性降低目的基因的表达量,进而有效的研究该基因在生物体内的作用。与直接转染 siRNA 序列相比,质粒或病毒载体有更多优势:在体内不容易被降解,能形成稳定、长时间的表达^[13]。慢病毒是逆转录病毒一种,因其基因组中 CpG 岛更少,能更加有效的抵抗宿主细胞的抗性,更大程度地避免干扰片段的脱靶效应,更好地发挥基因沉默作用。慢病毒构建的载体能感染分裂和非分裂细胞,感染后即整合到细胞的基因组中稳定表达,扩大了慢病毒感染细胞的范围,可用于感染传统转染试剂难以转染的细胞如原代细胞、悬浮细胞等。近年来,用慢病毒载体介导 RNAi 的一些体内外研究^[14,15]即显示了该技术策略在内源性基因功能研究和基因治疗前沿领域的重大意义。

目前,尚无将 RNAi 技术构建慢病毒应用于成纤维细胞 TMSB4 的研究报道。我们通过前期筛选出来的 TMSB4 基因 RNAi 有效靶序列,利用 pGC-LV 载体,病毒包装系统 pHelper 1.0 载体和 pHelper 2.0 载体构建 TMSB4 shRNA 慢病毒载体。其中 pGC-LV 质粒含有 U6 启动子,能在宿主细胞中持续表达 siRNA,同时该质粒能表达由 CMV 启动子驱动的 GFP,可用于病毒包装时转染效率及感染目的细胞的感染效率的检测。pHelper 1.0 质粒中含有 HIV 病毒的 Gag 基因,为编码病毒主要的结构蛋白;Pol 基因,为编码病毒特异性的酶。pHelper 2.0 质粒中含有单纯疱疹病毒来源的 VSVG 基因,提供病毒包装所需要的衣壳蛋白。293T 细胞是 293 细胞的一种,作为包装细胞,在包装后产生高滴度的病毒颗粒,同时表达报告基因绿色荧光蛋白,能在荧光显微镜下直接观察细胞转导的效率,使实验更加直观,有利问题的及时发现和解决。

本实验 LV-sh TMSB4 感染 293T 细胞后,能有效的抑制 293T 细胞中 TMSB4 基因的表达,从而验证了构建的慢病毒载体的有效性。原代培养细胞,尤其是原代培养的皮肤成纤维细胞是转染极为困难的一类细胞,采用一般质粒转染其转染效率基本不到 7%。利用 LV-sh TMSB4 感染原代成纤维细胞,能较大地提高转导效率,感染效率约为 30%。为收获绿色荧光蛋白阳性的成纤维细胞,我们采用流式细胞仪分选细胞,扩大培养,成功地纯化出感染成功的原代成纤维细胞。细胞通过细胞免疫化学染色初步验证了实验的有效性。

通过构建 LV-sh TMSB4 载体和采用流式细胞

仪分选技术,我们得到了有效抑制 TMSB4 表达的稳定细胞。这一方法的建立为进一步研究成纤维细胞中 TMSB4 的作用机制及其对瘢痕等细胞过度增生的影响奠定了实验基础。

参考文献

- 1 秦泽莲,刘刚,聂兴举,等.“瘢痕疙瘩和增生性瘢痕组织差异表达基因文库及其构建方法”.国家发明专利(03136990.1),2007.
- 2 聂芳菲,吴江群,秦泽莲.瘢痕疙瘩和增生性瘢痕中胸腺素 β_4 基因表达变化及其意义.中国危重病急救医学,2005,17(2):80-83.
- 3 Low TL, Hu SK, Goldstein AL. Complete amino acid sequence of bovine thymosin beta 4: a thymic hormone that induces terminal deoxynucleotidyl transferase activity in thymocyte populations. Proc Natl Acad Sci USA,1981,78:1162-1166.
- 4 王先远,朱晓颖.胸腺素 β_4 研究概况及展望.国外医学·预防、诊断、治疗用生物制品分册,2002,25(3):126-129.
- 5 Sosne G, Chan CC, Thai K. Thymosin β_4 promotes corneal heal wound healing and modulates inflammatory mediators in vivo. Exp Eye Res,2001,72:605-608.
- 6 Sosne G, Xu L, Prach L, et al. Thymosin beta 4 stimulates laminin-5 production independent of TGF-beta. Exp Cell Res,2004,293:175-183.
- 7 窦立萍,达万明,王畅,等. Klr2ds4 基因 RNAi 慢病毒载体的构建与鉴定.中国实验血液学杂志,2008,16(3):663-666.
- 8 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ method. Methods, 2001,25:402-408.
- 9 Xu GJ, Hannappel E, Morgan J, et al. Synthesis of thymosin beta 4 by peritoneal macrophages and adherent spleen cells. Proc Natl Acad Sci USA,1982,79:4006-4009.
- 10 Gómez-Márquez J, Dosil M, Segade F, et al. Thymosin-beta 4 gene: Preliminary characterization and expression in tissues, thymic cells, and lymphocytes. J Immunol,1989,143:2740-2744.
- 11 Frohm M, Gunne H, Bergman AC, et al. Biochemical and antibacterial analysis of human wound and blister fluid. Eur J Biochem, 1996,237:86-89.
- 12 Malinda KM, Sidhu GS, Mani H, et al. Thymosin beta 4 accelerates wound healing. J Invest Dermatol,1999,113:364-368.
- 13 Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. Nat Rev Genet,2003,4:346-358.
- 14 Singer O, Marr RA, Rockenstein E, et al. Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. Nat Neurosci,2005,8:1343-1349.
- 15 Wiznerowicz M, Trono D. Conditional suppression of cellular genes: Lentivirus vector mediated drug inducible RNA interference. J Virol, 2003,77:8957-8951.

(收稿日期:2009-04-27)

(修回日期:2009-05-11)

(责任编辑:李贺琼)