

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.45.024 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]
蒋文, 罗静, 刘林, 肖青, 杨泽松, 王利. RPS14 基因 RNAi 慢病毒载体构建及在 SKM-1 细胞中的表达[J].
中国组织工程研究, 2012, 16(45):8491-8495.

RPS14基因RNAi慢病毒载体构建及在SKM-1细胞中的表达*

蒋文, 罗静, 刘林, 肖青, 杨泽松, 王利

文章亮点: 选择慢病毒表达系统, 采用基因直接克隆连接的方法, 构建表达 RPS14siRNA 的慢病毒载体, 通过病毒包装产生重组病毒并扩增、感染细胞, 并观察 RPS14 蛋白在人骨髓增生异常综合征细胞株 SKM-1 细胞中的表达。

关键词: 骨髓增生异常综合征; RPS14; RNA 干扰; 慢病毒载体; SKM-1 细胞

摘要

背景: 有研究表明, 造血干/祖细胞内 RPS14 表达减少可导致造血细胞病态造血, 尤其是向红系分化受阻, 提示 RPS14 的正常表达有助于维持机体的正常造血。

目的: 构建 RPS14 基因 RNAi 慢病毒载体, 并观察该基因在人骨髓增生异常综合征细胞株 SKM-1 细胞中的表达。

方法: 针对已经筛选确定的 RPS14 基因 RNAi 有效靶序列, 构建 GC-shRPS14 慢病毒载体并测序鉴定。用 GC-shRPS14、pHelper 1.0 载体和 pHelper 2.0 载体共转染包装细胞 293T 细胞, 包装产生慢病毒, 测定病毒滴度; 并将获得的 RPS14shRNA 慢病毒载体 GC-shRPS14 转染人骨髓增生异常综合征细胞株 SKM-1, 用 Western Blot 检测靶细胞内 RPS14 蛋白的表达。

结果与结论: 经测序证实, 构建出了 RPS14shRNA 的慢病毒载体 GC-shRPS14。包装慢病毒, 浓缩病毒悬液的滴度为 2×10^9 TU/mL。荧光显微镜下能直接观察到转染组细胞的 GFP 表达, 转染效率为 75%, Western Blot 检测到转染后 RPS14 在靶细胞中表达明显被抑制。说明成功构建 RPS14 基因 RNAi 慢病毒载体, 转染人 SKM-1 细胞株后 RPS14 蛋白表达沉默。

重庆医科大学
附属第一医院血液
科, 重庆市
400016

蒋文, 女, 1979
年生, 重庆市人,
汉族, 2003 年成
都中医药大学毕
业, 主治医师, 主
要从事血液肿瘤
方面的研究。
jiangwen1108@
hotmail.com

通讯作者: 王利,
硕士, 副教授, 硕
士研究生导师, 重
庆医科大学附属
第一医院血液科,
重庆市 400016
liwangls@yahoo.
com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2012)45-08491-05

收稿日期: 2012-03-25
修回日期: 2012-05-23
(20111125001/D · C)

Construction of RNA interference lentiviral vector of ribosomal protein S14 gene and the expression in SKM-1 cells

Jiang Wen, Luo Jing, Liu Lin, Xiao Qing, Yang Ze-song, Wang Li

Abstract

BACKGROUND: Studies have shown that decreased expression of ribosome protein S14 (RPS14) gene in hematopoietic stem/progenitor cells can lead to the dysplasia of hematopoietic cells, in particular the blocked erythroid differentiation. Normal expression of RPS14 gene can help to maintain the normal hematopoiesis.

OBJECTIVE: To construct a RNA interference lentiviral vector of RPS14 gene, and to observe its expression in the human myelodysplastic syndrome cell line SKM-1 cells.

METHODS: The targeting sequence of RPS14 gene which effectively silenced in RNA inference was confirmed in our previous study. The GC-shRPS14 lentiviral vector was established and sequenced. The 293T cells were co-transfected with lentiviral vector GC-shRPS14, pHelper 1.0 and pHelper 2.0. The titer of virus was tested according to the expression level of GFP. The resulting S14shRNA lentiviral vector GC-shRPS14 was used to infect human myelodysplastic syndrome cell line SKM-1. And the RPS14 gene expression in the target cells was detected by Western Blot.

RESULTS AND CONCLUSION: DAN sequencing demonstrated that the lentiviral vector GC-shRPS14 of RPS14 shRNA was constructed. The titer of concentrated virus was 2×10^9 Tu/ml. GFP expression could be seen in the transfected SKM-1 cells under fluorescence microscope, and the transfection efficiency was 75% Western Blot showed that. RPS14 expression was significantly inhibited in the target cells after transfection. The RNA interference lentiviral vector of RPS14 was constructed successfully, which is capable of delivering the target gene RPS14 into human myelodysplastic syndrome cell line SKM-1 for its silent expression.

Jiang W, Luo J, Liu L, Xiao Q, Yang ZS, Wang L. Construction of RNA interference lentiviral vector of ribosomal protein S14 gene and the expression in SKM-1 cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(45):8491-8495.

Department of
Hematology, the First
Affiliated Hospital of
Chongqing Medical
University,
Chongqing 400016,
China

Jiang Wen, Attending
physician,
Department of
Hematology, the First
Affiliated Hospital of
Chongqing Medical
University,
Chongqing 400016,
China
jiangwen1108@
hotmail.com

Corresponding
author: Wang Li,
Master, Associate
professor, Master's
supervisor,
Department of
Hematology, the First
Affiliated Hospital of
Chongqing Medical
University,
Chongqing 400016,
China
liwangls@yahoo.com

Supported by: Key
National Natural
Science Foundation
of China,
No.30971277*

Received: 2012-03-25
Accepted: 2012-05-23

0 引言

骨髓增生异常综合征是一组起源于多能造血干/祖细胞的异质性恶性血液疾病, 以高风险向急性白血病转化为其特征, 故又俗称白血病前期。目前本病的发病机制尚未阐明, 缺乏有效的治疗手段, 即使对高危组患者行异基因造血干细胞移植, 其疗效仍不理想, 平均生存期仅为5-12个月。因此探索骨髓增生异常综合征的发病机制, 寻找骨髓增生异常综合征的有效治疗手段具有重要意义。近几年随着分子生物学的发展, 人们对骨髓增生异常综合征的分子遗传学改变有了更清楚的认识。骨髓增生异常综合征的分子遗传学改变主要有如JAK2、TET2、ASLX1、TP53等基因的突变, RPS14、SPRAC、miR-145a、miR-146a等基因的单倍剂量不足, 表达量的下降, 而没有基因的突变^[1]。近几年认为, 单倍剂量不足可能成为恶性血液病发生的分子基础之一^[2]。骨髓增生异常综合征最常见的染色体缺失是5号染色体长臂的缺失, 所有伴有del(5q)的骨髓增生异常综合征患者染色体缺失区域均含有5q31-5q32区带, 称为共缺失区域。RPS14基因位于该区域中, 它的抑癌作用最近才被认识。有研究表明, 使造血干/祖细胞内RPS14表达减少, 可导致造血细胞病态造血, 尤其是向红系分化受阻, 提示RPS14的正常表达有助于维持机体的正常造血^[3]。RPS14在骨髓增生异常综合征患者中表达较健康对照显著降低, 推测RPS14在骨髓增生异常综合征发病过程中起着重要作用。本实验选择慢病毒表达系统, 采用基因直接克隆连接的方法, 构建表达RPS14siRNA的慢病毒载体, 通过病毒包装产生重组病毒并扩增、感染细胞; 并观察RPS14蛋白在人骨髓增生异常综合征细胞株SKM-1细胞中的表达, 以探讨RPS14基因在骨髓增生异常综合征发生发展中的作用, 为寻找骨髓增生异常综合征新的有效的治疗手段奠定基础。

1 材料和方法

设计: 慢病毒载体的构建实验。

时间及地点: 于2010年4月至2011年10月在重庆医科大学眼科实验室完成。

材料:

细胞、试剂	来源
293T 细胞, 慢病毒载体系统 包括 pGCSIL-GFP (7 522 bp), pHelper1.0, pHelper2.0, MDS 细胞株 SKM-1 细胞	上海吉凯基因化学技术 有限公司
T ₄ DNA 连接酶、限制性内切酶	NEB 公司
DMEM 培养基、胎牛血清	GIBICO 公司
OptiMEM、Lipofectamine 2000	Invitrogen 公司
质粒小量抽提试剂盒	Qiagen 产品
核糖体蛋白 S14 抗体	Abcam 公司
羊抗兔 IgG 二抗	武汉博士德生物工程 有限公司

方法:

shRNA慢病毒载体的构建: 从Genebank中寻找RPS14的基因序列号, 根据Ambion公司提供的软件, 确定用于载体构建的干扰RPS14表达的引物, 正义引物: 5'CCg gGC TGA AGG AGA GAA TGT ATT TTT CAA GAG AAA ATA CAT TCT CTC CTT CAG CTT TTT g3'; 反应引物: 5' aat tca aaa aGC TGA AGG AGA GAA TG T ATT TTC TCT TGA AAA ATA CAT TCT CTC CTT CAG C 3'(内含Age I 和EcoR I 酶切位点), 由上海吉凯基因化学技术有限公司合成。退火形成双链DNA, 与Age I 和EcoR I 双酶切后的pGC-SIL-GFP载体连接、转化, 挑取重组阳性克隆行PCR及测序鉴定。PCR鉴定阳性克隆的引物: 上游引物: 5'CCT ATT TCC CAT GAT TCC TTC ATA 3', 下游引物: 5'GTA ATA CGG TTA TCC ACG CG3', 该质粒命名为GC-shRPS14。

慢病毒的包装: 用LB培养液扩增转化菌DH5 α , Plasmid 抽提 Kit提取GC-shRPS14、包装质粒pHelper 1.0、pHelper 2.0的DNA。转染前24 h, 用胰蛋白酶消化对数生长期的293T细胞, 以含体积分数10%血清的培养基调整细胞浓度为 $6.0 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 重新接种于15 cm细胞培养皿, 37 °C、体积分数5% CO₂培养箱内培养24 h, 待细胞达70%-80%融合时即可用于转染。转染前24 h 将细胞培养基更换为无血清培养基。应用GC-shRNA载体 20 μg , pHelper1.0载体15 μg , pHelper2.0载体10 μg , 与相应体积

的OptiMEM混合均匀, 调整总体积为2.5 mL, 按Invitrogen公司Lipofectamine 2000使用说明进行共转染包装细胞293T细胞, 细胞转染后8 h更换为完全培养基, 培养72 h后观察, 出现强绿色荧光并有细胞融合现象时, 收集含慢病毒颗粒的细胞上清液。于4 °C, 4 000 ×g离心10 min, 除去细胞碎片。以0.45 μm滤器过滤上清液于40 mL超速离心管中。把病毒粗提液样品加入到过滤杯中, 盖上盖子。将过滤杯插到滤液收集管中。组合好后, 做好平衡, 放在转头上。在4 000×g离心, 至需要的病毒浓缩体积, 时间为10–15 min。离心结束后, 取出离心装置, 将过滤杯和下面的滤液收集杯分开。将过滤杯倒扣在样品收集杯上。离心力不超过1 000×g, 时间为2 min。过高转速会导致样品损失。把过滤杯从样品收集杯上移开。样品收集杯中的即为病毒浓缩液。对其浓缩后得到高浓度的慢病毒浓缩液, 分装后保存在病毒管中, -80 °C保存。

病毒滴度测定: 予逐孔稀释法滴度测定法检测病毒滴度: 分别取10倍比稀释的病毒液100 μL加入96孔板, 8 h后换为新鲜培养基。3 d后, 观察荧光及生长状况, 并收取细胞进行后续滴度测定。

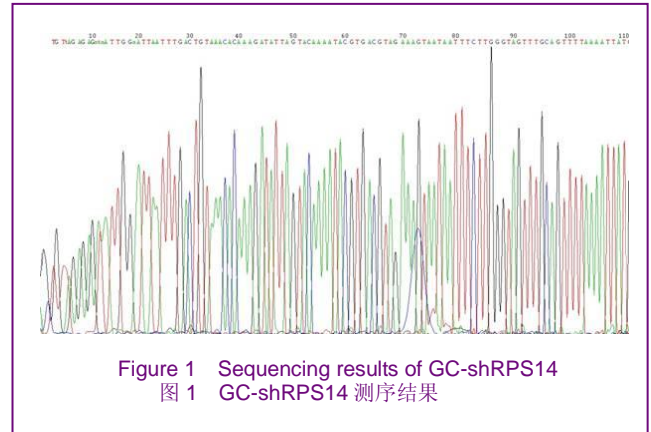
RPS14shRNA慢病毒载体GC-shRPS14在人骨髓增生异常综合征细胞株SKM-1细胞中的表达: 将人骨髓增生异常综合征细胞株SKM-1接种于24孔板培养24 h后, 加入感染复数(MOI值)为100的GC-shRPS14(实验组), 同时设立不加病毒的空白对照组和GC-shRPS14空载体组。于转染后第6天用Western Blot法检测RPS14蛋白的表达。实验重复3次, 采用quantity one分析软件对目的蛋白条带进行吸光度扫描, 对GC-sh RPS14转染对SKM-1细胞RPS14蛋白表达进行定量分析。

主要观察指标: ①观察重组慢病毒载体GC-sh RPS14可否高效率转染血液悬浮肿瘤细胞SKM-1。②观察转染后靶细胞中目的基因的表达是否成功被抑制。

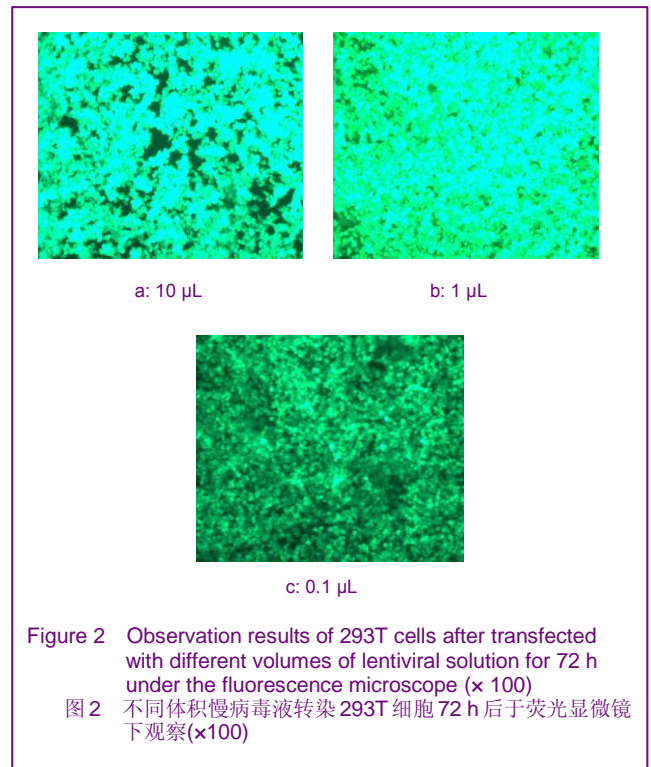
统计学分析: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 17.0统计软件对数据进行分析。组间差异行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 测序结果 将重组阳性克隆送上海生工有限公司测序, 结果见图1, 显示合成的GC-shRPS14核苷酸链序列插入正确, 无序列突变。



2.2 慢病毒载体的包装与滴度测定 构建出的重组载体与慢病毒包装质粒共转染293T细胞, 产生的病毒液转染293T细胞。在荧光显微镜下观察计数各孔中表达GFP的细胞数。测定滴度为 2×10^9 TU/mL, 见图2。



2.3 GC-shRPS14感染SKM-1细胞后RPS14蛋白含量的变化 荧光显微镜下观察到慢病毒载体GC-sh RPS14转染人骨髓增生异常综合征细胞株SKM-1后GFP表达逐渐增强, 培养第6天GFP表达结果, 见图3。

Western blot检测到转染6 d后实验组RPS14蛋白表达水平下降。含GC-shRPS14病毒的SKM-1细胞RPS14蛋白的表达明显被抑制, 抑制率达78.72% ($P < 0.01$)。而空白对照组与空载体转染组比较, 差异无显著性意义, 见图4, 表1。

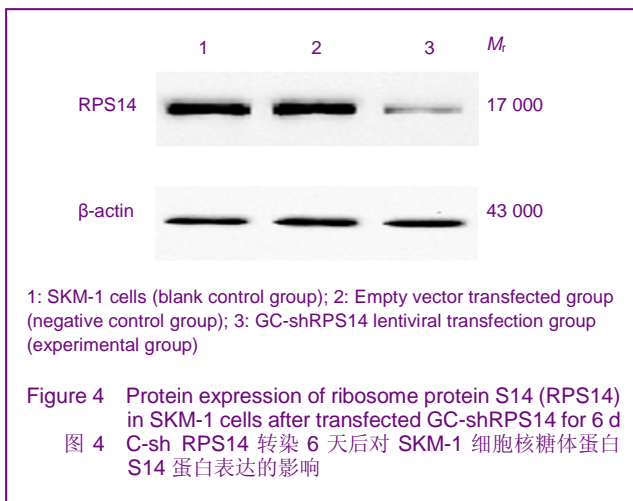
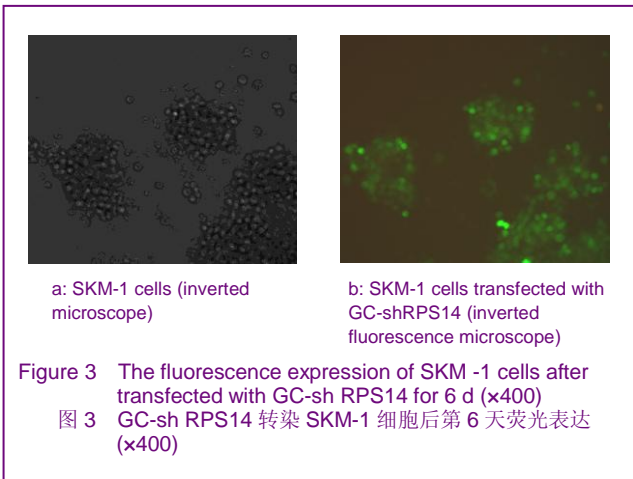


表 1 GC-shRPS14 转染对 SKM-1 细胞核糖体蛋白 S14 蛋白表达的定量分析
Table 1 Quantitative analysis of ribosome protein S14 (RPS14) protein expression in SKM-1 cells after GC-shRPS14 transfection (x±s)

Group	Absorbance value of RPS14	Absorbance value of β-actin	Ratio of absorbance value
Blank control	44.55±2.21	31.48±1.37	1.41±0.01
Negative control	43.12±1.84	31.29±1.28	1.39±0.02
Experimental	9.46±0.54 ^a	31.17±0.94 ^a	0.30±0.01 ^a

^aP < 0.01, vs. blank control group

3 讨论

基因靶向治疗是目前使肿瘤得以缓解或治愈的最有效方法之一,其成功实施的先决条件在于对肿瘤分子发病机制及细胞遗传学改变的深入理解与充分认识。因此,研究与肿瘤相关的分子生物学改变显得尤为重要。RPS14 处于骨髓增生异常综合征患者 5 号染色体的共缺失区域,它的抑癌作用最近才被认识。RPS14 基因是 RP 基因超家族的一员。位于 18S rRNA 的 3' 末端,是

构成核糖体 40S 亚基复合体的重要组成部分。RPS14 基因由 5 个外显子和 4 个内含子组成,在 18S pre-rRNA 的成熟以及 40S 亚单位形成过程中起重要作用。若将 RPS14 基因敲除,则可减缓 18S pre-rRNA 的合成,使 18S rRNA 减少,导致核糖体生物合成及蛋白翻译能力下降^[3]。可见 RPS14 的正常表达是 18S rRNA 执行正常翻译功能的前提。此外,RP 基因家族另一成员 RPS19 基因已被公认是先天性纯红细胞再生障碍性贫血的致病基因,该基因编码核糖体 40S 亚基的另一组分。RPS19 基因表达减少导致造血干/祖细胞向红系分化受阻,并增加向白血病转变的风险^[4]。而先天性纯红细胞再生障碍性贫血与骨髓增生异常综合征都具有红系分化受阻其易转化为白血病的特点。故假设二者具有相似的分子发病机制。有研究表明,使造血干/祖细胞内 RPS14 表达减少,可导致造血细胞病态造血,尤其是向红系分化受阻,提示 RPS14 的正常表达有助于维持机体的正常造血^[3]。最近斑马鱼模型研究发现,包括 RPS14 在内的多种 RP 基因,由于单倍剂量不足导致表达减少,可促进肿瘤生成,表明 RP 基因是单倍剂量减少的抑癌基因^[5]。其抑癌机制尚未阐明,除 RP 基因本身具有抑癌效应外,推测其正常表达可维持某些抑癌基因的正常功能,当 RP 基因表达降低,可致关键抑癌基因表达下降,凋亡及分化调节蛋白表达变化,正常抑癌作用解除,导致肿瘤生成^[3]。而课题组最新实验结果表明,RPS14 在骨髓增生异常综合征患者中表达较健康对照显著降低,推测 RPS14 在骨髓增生异常综合征发病过程中起着重要作用。但是 RPS14 抗肿瘤的作用及分子调控机制,将对血液肿瘤的分子靶向治疗提供重要理论依据。

骨髓增生异常综合征是造血干细胞恶性克隆性疾病,近几年该病发病率呈上升趋势,严重威胁人类健康。但目前该病尚缺乏有效治疗手段,有效的分子靶向治疗药物少。进一步深入探讨 RPS14 基因能否作为骨髓增生异常综合征分子靶向治疗的靶标很有必要。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)1998 年由 Fire 首次发现并命名,主要通过内、外源性双链 RNA,触发同源性 mRNA 降解,从而使目的基因表达沉默。目前 RNAi 作为一种研究手段被用于特异性抑制相关基因的表达,可成为肿瘤基因治疗的新途径^[6-7]。RNAi 常用的病毒载体有腺病毒、逆转录病毒及慢病毒载体。但前两种载体系统均存在一定局限性。腺病毒载体不能长期稳定表达目的基因,逆转录病毒虽然具有长期表达的特点,但是只能感染分裂期细胞,不能感染未分裂细胞。相对于

传统病毒载体, 慢病毒载体系统具有其明显优点^[8]。慢病毒载体是以人类免疫缺陷型病毒(HIV)为基础发展起来的基因治疗载体, 它对分裂细胞、非分裂细胞均有感染能力, 并可在体内较长期的表达。且慢病毒经过包装后, 可用于转染传统试剂难于转染的细胞如: 悬浮细胞、原代细胞等^[9]。慢病毒载体转移基因片段具有容量较大、目的基因表达时间长、不易诱发宿主免疫反应等优点, 进而达到研究宿主细胞一系列细胞生物学行为, 以及目的蛋白上下游分子的变化目的。因此成为携带siRNA的理想载体, 目前已广泛应用于基因表达调控、基因治疗等领域^[10-11]。本实验选择慢病毒载体感染悬浮细胞SKM-1。SKM-1细胞系是取骨髓增生异常综合征转化为急性单核细胞白血病患者的肿瘤细胞建系而成, Nakagawa等^[12]发现该患者在骨髓增生异常综合征阶段有一些原癌基因的突变, 但转变成单核细胞白血病后这些突变消失, 取而代之的是新的染色体异常, 但并没有共缺失区域的缺失, 故SKM-1是研究骨髓增生异常综合征发病及向白血病转化机制的理想模型。

实验成功构建了RPS14基因RNAi慢病毒载体, 在293T细胞中检测到了其正确表达, 并成功感染了人骨髓增生异常综合征细胞株SKM-1且能有效抑制RPS14蛋白在SKM-1细胞中的表达, 国内外尚少见相关报道。为实验进一步研究RPS14基因在骨髓增生异常综合征发病中的作用及探讨其作为分子靶标的可行性奠定了良好基础。

致谢: 感谢重庆医科大学眼科实验室全体老师和同学在实验中给予的指导和帮助。

4 参考文献

- [1] Davids MS, Steensma DP. The molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Cancer Biol Ther.* 2010; 10(4): 309-319.
- [2] Wong JC, Le Beau MM, Shannon K. Tumor suppressor gene inactivation in myeloid malignancies. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2008; 21(4): 601-614.
- [3] Ebert BL, Pretz J, Bosco J, et al. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature.* 2008; 451(7176): 335-339.
- [4] Morimoto K, Lin S, Sakamoto K. The functions of RPS19 and their relationship to Diamond-Blackfan anemia: a review. *Mol Genet Metab.* 2007; 90(4): 358-362.
- [5] Lai K, Amsterdam A, Farrington S, et al. Many ribosomal protein mutations are associated with growth impairment and tumor predisposition in zebrafish. *Dev Dyn.* 2009; 238(1): 76-85.
- [6] Kamath RS, Fraser AG, Dong Y, et al. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature.* 2003; 421(6920): 231-237.
- [7] Takei Y, Kadomatsu K, Yuzawa Y, et al. A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics. *Cancer Res.* 2004; 64(10): 3365-3370.
- [8] Zhong Y, Li J, Huang XB, et al. Disan Junyi Daxue Xuebao. 2010; 32(8): 744-748.
钟扬, 李靖, 黄小兵, 等. 慢病毒载体介导的人肝癌HepG2细胞BC047440基因沉默[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(8): 744-748.
- [9] Mátrai J, Chuah MK, VandenDriessche T. Recent advances in lentiviral vector development and applications. *Mol Ther.* 2010; 18(3): 477-490.
- [10] Scherr M, Eder M. Gene transfer into hematopoietic stem cells using lentiviral vectors. *Curr Gene Ther.* 2002; 2(1): 45-55.
- [11] Nishitsuji H, Ikeda T, Miyoshi H, et al. Expression of small hairpin RNA by lentivirus-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary non-dividing cells. *Microbes Infect.* 2004; 6(1): 76-85.
- [12] Nakagawa T, Matozaki S. The SKM-1 leukemic cell line established from a patient with progression to myelomonocytic leukemia in myelodysplastic syndrome (MDS)-contribution to better understanding of MDS. *Leuk Lymphoma.* 1995; 17(3-4): 335-339.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 国家自然科学基金面上项目(30971277)。

作者贡献: 王利进行实验设计, 蒋文进行实施, 肖青进行实验评估, 资料收集为罗静、杨泽松, 蒋文成文, 刘林审校, 王利对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 因本文为体外实验, 属基础研究, 未涉及伦理问题, 故未申请伦理委员会批注。

本文创新性: 实验成功构建了 RPS14 基因 RNAi 慢病毒载体, 在 293T 细胞中检测到了其正确表达, 并成功感染了人骨髓增生异常综合征细胞株 SKM-1 且能有效抑制 RPS14 蛋白在 SKM-1 细胞中的表达, 国内外尚未见相关报道。为实验进一步研究 RPS14 基因在骨髓增生异常综合征发病中的作用及探讨其作为分子靶标的可行性奠定了良好基础。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。