

# 生长抑素 siRNA 的慢病毒包装及对生长抑素的抑制作用\*

郝林琳<sup>1</sup>, 刘松财<sup>1</sup>, 王楠<sup>2</sup>, 王博<sup>1</sup>, 曹锦艳<sup>3</sup>, 张永亮<sup>1,4\*\*</sup>

1. 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062; 2. 中国兽医药品监察所, 北京 100081; 3. 山东省军区物资采购办公室, 济南 250014; 4. 华南农业大学动物科学学院, 广州 510642

**摘要:** 采用慢病毒(LV)载体介导siRNA感染宿主细胞, 研究其对内源性生长抑素(Somatostatin, SS)的抑制作用。首先将筛选出的psh2与辅助质粒共转染293T细胞包装获得假病毒颗粒LV-sh2, 同时, 包装产生LV-sh0和LV-GFP作为阴性对照。超速离心, 梯度稀释法测定病毒滴度, 结果提示所构建的重组病毒滴度约为 $6 \times 10^7$  ifu/mL。病毒感染BHK-21细胞, 通过荧光显微镜观察到了GFP的高效表达, 在感染细胞的基因组中PCR检测到了病毒基因, 表明病毒感染获得了高效的基因转移和表达效率。荧光定量PCR和RIA检测表明, LV-sh2对内源性SS的mRNA和蛋白质水平均有显著的抑制作用(86.49%和78.80%,  $P < 0.05$ )。

**关键词:** 生长抑素; shRNA; 慢病毒载体; 基因沉默

中图分类号: Q575; S813.24 文献标识码: A 文章编号: 1000-5684(2011)

DOI:

网络出版地址:

## Packing of the Lentivirus Contained shRNA Targeting Somatostatin and its Inhibitory Effect

HAO Lin-lin<sup>1</sup> · LIU Song-cai<sup>1</sup> · WANG Nan<sup>2</sup> · WANG Bo<sup>1</sup> · CAO Jin-yan<sup>3</sup>, ZHANG Yong-liang<sup>1,4</sup> ·

1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China; 2. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China; 3. Supplies Purchasing Office of Shandong Provincial Military Command, Jinan 250014, China; 4. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

**Abstract:** Somatostatin(SS) acts to inhibit secretion on a diverse array. In our research, BHK-21 cells were infected by a Lentiviral-shRNA(Lv-shRNA) to examine whether the endogenous SS would be down-regulated by shRNA. First, the Lv-sh2 was packed by the co-transfection of the screened psh2 and the other three packing plasmids into 293T cells. Meanwhile, the Lv-sh0 and Lv-GFP were packed as the negative controls. Next, high-titer virus stocks ( $6 \times 10^7$  ifu/mL) obtained by ultracentrifugation were achieved routinely measuring by infecting BHK-21 cells in ten-fold serial dilutions. Finally, BHK-21 cells were infected with the concentrated viral stocks, and the high infection and expression efficiency were observed under the fluorescence. The shRNA gene was detected to integrate into the genomic DNA of infected cells by PCR analysis. Significant down-regulation of SS mRNA and protein level were detected by Real-time PCR (reduced by 86.5% relative to the control,  $P < 0.05$ ) and RIA technique (lower 75.4% than the control,  $P < 0.05$ ). The results may lay a basis on the studies of SS functions in the cell.

**Key words:** Somatostatin; shRNA; Lentiviral vector; gene silencing

生长抑素(Somatostatin, SS)是一种广泛分布于中枢神经系统和外周组织的环状多肽, 因其抑制腺垂体生长激素(Growth hormone, GH)的分泌而得名。SS是结构和生理功能相似的一类激素的总称, SS-14

和SS-28是体内SS的主要生物活性形式, 能有效的调节多种激素和神经递质的释放、抑制细胞增殖、参与认知、痛觉、行为等诸多功能的调节<sup>[1]</sup>。在对GH的调节中, SS可能起着关键作用, 但其分子机制尚不

\* 基金项目: 吉林大学农学部人才引进建设项目(4305050102J4)

作者简介: 郝林琳, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 基因表达调控。

收稿日期: 2010-11-19 网络出版时间:

\*\* 通讯作者

清楚。体内和体外实验均表明, SS主要由下丘脑合成并分泌, 以室周核含量最高, 具有广泛的抑制作用<sup>[2]</sup>。垂体是SS作用的主要靶腺, 通过与SSTR 1~5的结合发挥作用, 但其作用机制尚不完全清楚<sup>[3]</sup>。在畜牧生产上, 通过人工降低体内SS浓度的方法来调节动物生长, 以期提高动物生产性能是目前动物生产研究的热点<sup>[4-5]</sup>。将慢病毒载体和RNA干扰技术结合, 通过生产病毒感染宿主细胞, 能在哺乳动物各类细胞中特异性抑制同源基因的表达, 是基因功能研究和基因治疗的有力手段, 具有良好的发展和应用前景<sup>[6]</sup>。本研究采用慢病毒作为基因转移载体, 筛选出靶向SS的有效siRNA (sh2, 靶向SS 433-451)。以慢病毒介导的SS-shRNA作为基因阻断技术, 感染BHK-21细胞, 研究其抑制内源性SS基因表达的效应, 为进一步研究SS对细胞的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和仪器

慢病毒包装系统 pPACK Lentivector Packaging System 购于美国 SBI 公司, 该系统为 4 质粒共转染法即 1 个穿梭质粒 pshRNA-copGFP lentivector, 3 个包装质粒 pREV、pVsv-g 及 pGag-pol。人胚肾细胞 293T 购于美国 ATCC 细胞库。BHK-21 细胞为军事医学科学院扈荣良研究员赠送。EndoFree™ Plasmid Maxi Kits 为德国 QIAGEN 产品; 含谷氨酰胺的 D-MEM 培养基 (高糖) 为美国 Invitrogen 产品; 青链霉素等其他试剂均为国产。小鼠 SS 放免试剂盒购自第二军医大学神经生物学教研室, 测定在长春市吉林大学第三临床医院核医学实验室进行。

PRISM 7000 Real-time PCR 扩增仪 (ABI 公司), 高速冷冻离心机 (日本 KUBOTA 公司), CP100MX 型超速离心机 (日本 HITACHI 公司)。

### 1.2 细胞培养及病毒包装

293T 细胞株生长于含 L-谷氨酰胺的 D-MEM (10%FBS) 培养基中。BHK-21 细胞生长于 MEM(5%FBS)培养基中。细胞在 37℃、5% CO<sub>2</sub>饱和水汽的培养箱中培养。

使用 EndoFree™ Plasmid Maxi Kit 制备无内毒素 pGFP, psh0 (sh0 为阴性对照), psh2 (sh2 为吉林大学生物化学与分子生物学实验室筛选的靶向 SS 433-451 的有效 shRNA 序列) 及 3 个包装质粒 pPack A、pPack B 和 pPack C 并定量。采用共转染病毒穿梭质粒和 3 个包装质粒转染入 293T 细胞的方法进行病毒包装, 获得 LV-sh0, LV-sh2 及 LV-GFP 假病毒液。将收集到的病毒上清通过多轮超速离心 10 万 g 4℃, 90 min 浓缩病毒颗粒, 用小体积的 D-MEM 重悬含有假病毒颗粒的沉淀。用包装好的慢病毒假病毒颗粒感

染 BHK-21 细胞株, 采用梯度稀释法测定病毒滴度 (10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 μL 病毒液), 荧光显微镜对表达绿色荧光蛋白的细胞计数。

### 1.3 病毒感染细胞

BHK-21 细胞分组如下: ① 正常对照组: 正常 BHK-21 细胞; ② LV-GFP 组: 10 μL LV-GFP 假病毒液感染 BHK-21 细胞; ③ LV-sh0 组: 10 μL LV-sh0 假病毒液感染 BHK-21 细胞; ④ LV-sh2 组: 10 μL LV-sh2 假病毒液感染 BHK-21 细胞。细胞接种于 6 孔板内, 培养 24 h 后, 换以新鲜培养液, 根据分组分别加入 10 μL 假病毒液, 轻轻混匀, 培养 24 h 后, 换以新鲜培养液。继续培养 72 h 后, 观察荧光。

### 1.4 PCR 检测病毒基因

以 1 μL (50~100 ng) 制得的基因组 DNA 为模板, 10 倍 Taq Buffer 2.5 μL (含 Mg<sup>2+</sup>), dNTPs (25 mmol/L) 4 μL, 上下游引物 (以病毒载体上整合序列 5'LTR-3'LTR 内的两段序列 sh-P1: 5'-aatgtcttggattgggaatcttat-3'; sh-P2: 5'-tggtctaaccagagagaccagta-3' 为引物) 各 1 μL (10 pmol/μL), Taq DNA polymerase (5 U/μL) 0.25 μL, 加 ddH<sub>2</sub>O 15.25 μL, 总体积 25 μL。反应条件: 95℃ 预变性 2 min, 然后 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 2 min, 4℃ 保存。PCR 扩增获得病毒基因片段, 取 PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

### 1.5 Real time PCR 检测转染 BHK-21 细胞内 SS 的 mRNA 表达丰度

4 个组别的 BHK-21 细胞病毒感染后 96 h, 胰蛋白酶消化细胞, 进行细胞计数, 取相同数量的细胞提取总 RNA, 以提取的总 RNA 为模板, 以随机引物 pd (N) 6 为引物进行 RT 反应。再以等量的 RT 反应产物为模板, 进行 Real time PCR 反应, 同时以 β-actin 做内参照, 一个样本 3 个平行孔, 重复 3 次。

### 1.6 RIA 检测转染 BHK-21 细胞内 SS 的蛋白质表达丰度

4 个组别的 BHK-21 细胞病毒感染后 96 h, 裂解细胞, 测定裂解液中总蛋白的浓度, RIA 法检测 SS 浓度。

### 1.7 数据分析

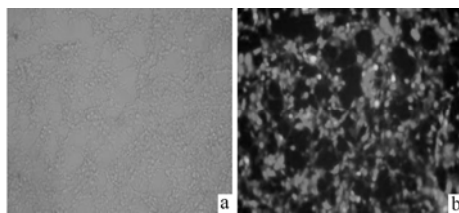
各组数据均表示为 mean±SE, 采用 SPSS12.0 软件对测定数据做平均值和单向方差分析, 方差齐性检验并 LSD 多重比较, 显著性水准为 0.05。

## 2 结果与讨论

### 2.1 LV-sh0, LV-sh2 及 LV-GFP 病毒包装

采用无内毒素质粒提取试剂盒提取和纯化慢病毒穿梭质粒及包装质粒, 共转染入 293T 细胞进行病毒包装, 转染后 48 h 的荧光照片见图 1, 收集此时的

细胞上清。



a.可见光视野 Visible-light observations; b.荧光视野 Fluorescence observations

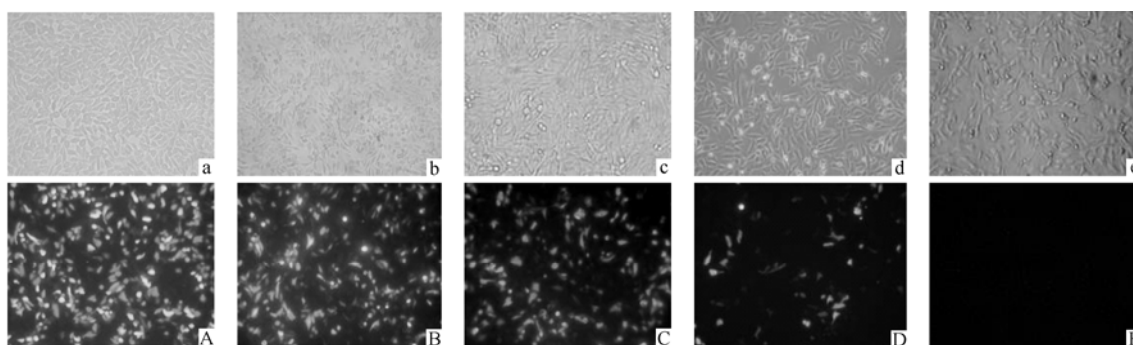
图 1 共转染 293T 细胞 48 h 的荧光显微镜观察

Fig.1. Fluorescence observation of 293T cells at 48 h post co-transfection

## 2.2 病毒滴度测定

将包装产生的假病毒液超速离心浓缩后，采用梯度稀释法进行滴度测定。通过加入不同体积的病毒液

感染BHK-21 细胞后，对 5~10 个随机视野中带绿色荧光的细胞计数，求平均值，计算出病毒滴度约为  $6 \times 10^7$  ifu/mL (图 2)。



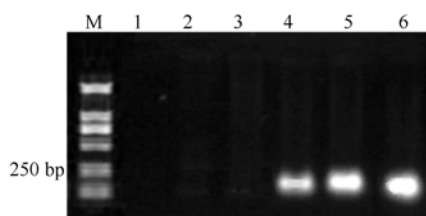
a~e, A~ E. 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001  $\mu$ L 病毒浓缩液感染细胞的可见光及荧光观察 Observation of cells infected with 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001  $\mu$ L of the concentrated virus solution under visible light and fluorescence

图 2 梯度稀释法测定病毒滴度

Fig.2. Detection of virus titer by gradient dilution method

## 2.3 慢病毒介导的 SS-shRNA 对 BHK-21 细胞的作用

2.3.1 病毒基因检测 感染后 96 h，提取各组细胞基因组 DNA，利用载体上病毒基因整合序列设计引物，由于 LV-sh0 和 LV-sh2 含有插入的 siRNA 序列，因此获得目的片段大小约为 160 bp (图 3，泳道 4 和 5)，而 LV-GFP 由于没有合成的 siRNA 序列的插入，获得目的片段大小约为 100 bp (图 3，泳道 6)。而正常 BHK-21 细胞未见条带，表明病毒基因组整合入了宿主细胞的基因组中。



M.DL2000 Marker; 1.阴性对照 Negative control ;2,3. 未感染 BHK-21 细胞 non-transduced BHK-21 cells; 4 .LV-GFP 感染细胞 LV-GFP infected cells; 5.LV-sh0 感染细胞 LV-sh0 infected cells ;6 LV-sh2 感染细胞 LV-sh2 infected cells

图 3 重组病毒的目的基因的 PCR 鉴定

Fig.3.Detection of Lentivirus gene by PCR

2.3.2 Real time PCR 检测各组细胞 SS mRNA 水平表达变化 病毒感染后 96 h，以等量的 RT 反应产物为模板，进行 SS 的 Real time PCR 反应。结果如图 4，各组  $\beta$ -actin 的初始 DNA 量平均值无显著性差异 ( $P>0.05$ )。LV-sh2 组 BHK-21 细胞内的 SS 表达量收到了显著的抑制，是正常 BHK-21 细胞的 ( $13.52 \pm 11.22$ )% ( $P<0.05$ )，沉默效率为 86.49%。LV-GFP 组细胞与正常 BHK-21 细胞内 SS 表达量无显著性差异 ( $P>0.05$ )，表明慢病毒感染细胞不会引起细胞的 SS 表达量变化；同时，LV-sh0 组 BHK-21 细胞内 SS 表达量未见变化 ( $P>0.05$ )，表明 SS 表达量的沉默作用是由特异的 shRNA 序列的靶向干扰作用引起的，而不是无关 shRNA 的非特异性基因沉默作用。“\*”表示与对照 BHK 细胞组差异显著 ( $P<0.05$ )。

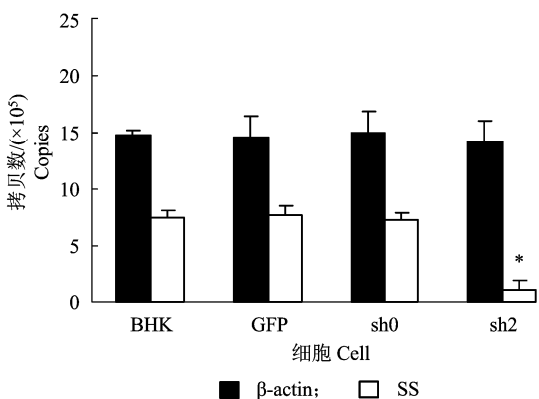


图4 病毒感染后96 h BHK-21 细胞 SS 的 Real time PCR 结果分析

Fig.4. Analysis of Real time PCR amplification results of SS in BHK-21 cells at 96 h post-transduction

2.3.3 RIA 检测各组细胞 SS 蛋白水平表达变化  
 各组细胞感染后 96 h, 收集并裂解细胞, 测定细胞裂解液总蛋白浓度, RIA 检测细胞裂解液中 SS 的浓度。以各组细胞内 SS 占总蛋白的比率为纵坐标 (pg/g) 绘制柱形图 (图 5), 结果显示, LV-sh0 和 LV-GFP 组 BHK-21 细胞内 SS 蛋白表达水平与正常 BHK-21 细胞差异不显著 ( $P>0.05$ ); 而 LV-sh2 组 BHK-21 细胞内 SS 蛋白表达受到了显著的抑制作用, 是未转染 BHK-21 细胞的 (21.20±8.14) % ( $P<0.05$ ), 抑制效率为 78.80%。 “\*” 表示与对照 BHK 细胞组差异显著 ( $P<0.05$ )。

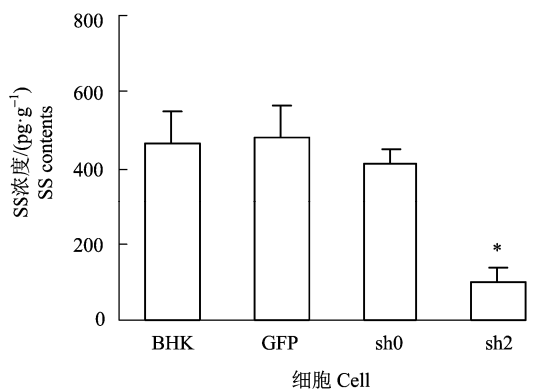


图 5 RIA 检测细胞裂解液中 SS 的浓度

Fig.5. RIA analysis of SS protein in the cell lysates normalized by the total protein concentration

### 3 讨论

通常认为, 动物生长受 GHRH、SS—GH—IGF-1 生长轴调控, 其中 GH—IGF-1 是其调控中心。下丘脑分泌的 GHRH、SS 是垂体 GH 调控的主要因素, 因此, 研究 SS 的合成、分泌及其与相关激素、受体的相互关系, 对于动物促生长方面的技术具有理论指导意义

[7]。GHRH、SS 和 GH 是决定体内血液中 GH 水平的三个相互作用、相互影响的因素, 其中, SS 起着关键的作用 [8]。通过人工调节方式来降低动物体内 SS 含量, 以提高 GH 和 IGF-1 等的水平, 从而促进动物生长, 提高生产性能的技术已日益受到人们的广泛关注。SS 在促进动物生长方面的应用就是利用各种办法抑制和消除动物体内 SS 的作用, 目前的研究主要通过 SS 的化学耗竭剂、主动免疫、被动免疫及基因工程疫苗等途径来抑制和消除动物体内的 SS。虽然取得了一定成绩, 但仍存在一些难以解决的问题。鉴于 RNA 干扰技术在基因阻断方面取得的可喜成绩, 本研究选择了在动物生长调控中起重要作用的负性调控因子—SS 作为靶基因, 设计并筛选出了有效的 siRNA, 包装获得了 shRNA 的慢病毒假病毒液, 本试验通过荧光显微镜观察, 慢病毒可以高效感染 BHK-21 细胞, LV-sh2 感染组细胞内源性 SS mRNA 和蛋白质表达水平均受到了明显的抑制, 获得了明显高于质粒转染的抑制率 (mRNA 水平 86.49% vs 59.30%, 蛋白质水平 78.80% vs 55.6%) [9]。同时, PCR 检测到了病毒基因的整合, 获得了不同于质粒转染的稳定的沉默效果。本试验研究了 SS 对细胞的作用, 而且为降低 SS 在动物体内的分泌, 相应提高 GH 的浓度, 促进动物生长的研究奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] Krantic S. Peptides as regulators of the immune system: emphasis on somatostatin [J]. Peptides, 2000, 21(12): 1941-1964.
- [2] 向正华, 蔡文琴, 孟琳, 等. 下丘脑生长抑素神经元的发生 [J]. 解剖学杂志, 1996, 19 (1): 25-30.
- [3] Patel YC. Somatostatin and its receptor family [J]. Front Neuroendocrinol, 1999, 20: 157-198.
- [4] Van Kessel AG, Laarveld B. Effect of passive immunization against somatostatin using a high-affinity antiserum on growth, IGF-1 and thyroid hormone levels in neonatal lambs reared under warm or cold environmental conditions [J]. Can J Anim Sci, 1994, 74: 23-27.
- [5] 杜念兴, 杨宏, 吉传义, 等. 生长抑素基因工程苗活载体疫苗田间试验总结初报 [J]. 畜牧与兽医, 2001, 33 (2): 23-24.
- [6] Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D et al. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells [J]. RNA, 2003, 9: 493-501.
- [7] 杨连玉, 王哲. 铜与下丘脑促生长调控机能的关系 [J]. 吉林农业大学学报, 2003, 25 (1): 86-90.
- [8] Plotsky PM, Vale W. Patterns of growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion into the hypophysial-portal circulation of the rat [J]. Science, 1985, 230(4724): 461-463.
- [9] 郝琳琳, 刘松财, 王楠, 等. 慢病毒介导的小鼠生长抑素 shRNA 序列的设计和筛选 [J]. 中国兽医学报, 2011, 31 (1): 65-69.