

CLRs 过表达/siRNA 慢病毒载体的构建及其瞬时转染树突状细胞的研究

薛卓维 熊苗 蒋荣珍 李黎 滕银成

【摘要】 目的 构建 C 型凝集素受体 (C-type lectin receptor, CLRs) 过表达/siRNA 慢病毒载体, 并将其瞬时转染树突状细胞 (dendritic cell, DC)。方法 免疫磁珠分离、培养及鉴定胎盘和蜕膜来源的 DC; 构建 CLRs 过表达/siRNA 慢病毒载体并转染 DC; 抽提转染 CLRs 过表达/siRNA 慢病毒后的 DC 的总 RNA; RT-PCR 检测 DC 转染慢病毒前后 CLRs 基因 mRNA 表达量。结果 从胎盘分别纯化得到的 DC 经流式细胞术检测 DC 纯度为 (82.6±2.4)%; 根据 Genbank 数据库成功构建了过表达 CLRs 基因慢病毒及 CLRs 基因 siRNA 慢病毒, 病毒量为 1×10^{10} Unit; 将构建的两种慢病毒转染 DC 后, 在荧光倒置显微镜下可观察到被转染的阳性细胞有绿色荧光蛋白 (GFP) 表达, 通过流式细胞仪检测, 转染效率分别为 85% 及 82% 左右; RT-PCR 检测发现过表达 CLRs 基因慢病毒转染 DC 后 mRNA 相对含量为 (14.26±0.47)%, 较空白未转染的 DC 表达量 [(1.67±0.19)%] 明显上升 ($P < 0.01$); CLRs 基因 siRNA 慢病毒转染 DC 后 CLRs mRNA 相对含量为 (0.03±0.01)%, 较空白未转染的 DC 表达量明显下降 ($P < 0.01$)。结论 成功构建了表达人 CLRs-siRNA 的慢病毒载体, 它能有效沉默 CLRs 基因在胎盘 DC 中的表达并获得了其瞬时转染的 DC; 成功构建了过表达 CLRs 的慢病毒载体, 它能有效地在体内发挥基因过表达效应并获得了其瞬时转染的 DC。

【关键词】 RNA, 小分子干扰; 树突状细胞; 慢病毒载体; C 型凝集素受体

Construction of CLRs gene overexpressed/siRNA lentiviral vector and its transient transfection in dendritic cell
XUE Zhuo-wei, XIONG Miao, JIANG Rong-zhen, LI Li, TENG Yin-cheng. Department of Obstetrics and Gynecology, The Sixth People's Hospital of Shanghai, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Corresponding author: TENG Yin-cheng, Email: teng_yc@126.com

【Abstract】 Objective To construct CLRs gene overexpressed/CLRs siRNA lentiviral vector and use them to transiently transfect DC. **Methods** Immunomagnetic separation and purification of DC from decidua and placenta of normal pregnant women; To Construct CLRs gene overexpressed/siRNA lentiviral vector, then use them to transfect DC; Extraction of total RNA from DC transfected by CLRs overexpressed/siRNA lentivirus; The mRNA expression levels of CLRs gene were detected by RT-PCR in DC transfected by CLRs gene overexpressed lentiviral vector or CLRs siRNA lentiviral vector. **Results** The purity of DC isolated from placenta was (82.6±2.4)% which detected by FCM; We successfully constructed CLRs gene overexpressed/siRNA lentiviral vector, and the amount of virus(viral load) is 1×10^{10} Unit; Green fluorescence was observed in DC by means of an inverted fluorescence microscope and the transfection rate were respectively about 85% and 82% after transfected by CLRs gene overexpressed lentiviral vector and CLRs siRNA lentiviral vector. The CLRs mRNA in DC transfected by CLRs gene overexpressed lentiviral (14.26±0.47)% were higher than untransfected DC (1.67±0.19)% which were detected by RT-PCR ($P < 0.01$); in addition, the CLRs mRNA in DC transfected by CLRs siRNA lentiviral vector (0.03±0.01)% were obviously lower than untransfected DC ($P < 0.01$). **Conclusion** The CLRs siRNA lentiviral vector was constructed successfully and it can effectively silence the CLRs mRNA expression in DC; The CLRs gene overexpressed lentiviral vector was constructed successfully and it can effectively express the CLRs mRNA in DC.

【Key words】 RNA, small interfering; Dendritic cells; Lentiviral vector; C-type lectin receptor

树突状细胞(dendritic cell, DC)是免疫系统中最重要抗原递呈细胞,它具有强大的抗原处理和递呈能力,由于其分布广泛,可以第一时间发现并处理外来抗原,然后把信号递呈至T细胞,诱导免疫应答或者免疫耐受^[1]。DC功能的介导与其表面大量的免疫分子密切相关,研究表明DC表面两种模式识别受体C型凝集素受体(C-type lectin receptor, CLRs)和Toll样受体(TLRs)之间的平衡在免疫耐受与免疫活化的调节中扮演着重要角色^[2-3], CLRs单独识别自身抗原可诱导免疫抑制,而当TLRs和CLRs同时识别的病原体或自身抗原而均被激活时,则可诱导免疫活化^[4-5]。子痫前期患者的免疫状态表现为母胎免疫耐受失衡,而我们的前期研究已发现在重度子痫前期患者体内存在CLRs/TLRs平衡向TLRs偏离的现象^[6],那么CLRs/TLRs平衡失调是通过何种机制参与子痫前期的发生与发展,而利用基因手段逆转这种平衡失调是否可以为子痫前期提供一条新的诊疗途径?基于以上工作基础,可通过构建CLRs过表达/siRNA慢病毒载体,然后转染胎盘来源的DC,来进一步探讨其对滋养细胞侵袭力、黏附力及凋亡率的影响。而DC的培养、慢病毒载体的构建及其成功转染DC是关键的技术步骤。本研究将基因过表达技术与基因沉默技术相结合,并且利用DC作为基因工程载体,通过对目的基因的克隆与敲低,为DC表面CLRs/TLRs平衡与子痫前期之间后续的研究奠定基础。

材料与方 法

一、主要试剂和仪器

低温离心机、流式细胞仪、超净工作台CA-92-3、Napco 6300型CO₂培养箱Olympus BX50生物显微镜、稳压稳流电泳仪、PCR扩增仪Ficoll试剂、抗CD1a磁珠抗体、总RNA提取试剂盒、过表达CLRs基因慢病毒CLRs基因siRNA慢病毒。

二、方 法

1. 分离、培养及鉴定蜕膜和胎盘的DC^[7-8]:选取新鲜蜕膜和胎盘组织, PBS洗涤三次,加入0.9%氯化钠溶液用眼科剪仔细将标本剪成1 mm³大小,反复冲洗,静置待大块组织沉淀后,将上部溶液使用Ficoll试剂500×g离心30 min进行密度梯度分离,小心吸取中间云雾层细胞,用含20%胎牛血清的DMEM培养基洗涤三次;分别加入针对DC细胞的CD1a磁珠体,4℃孵育1 h,缓慢将培养混合液通过在磁场中的分离柱, PBS洗涤。移除磁场,用DMEM将吸附在分离柱上的细胞轻轻洗涤下来,转移至培养皿中备用。

2. 构建及鉴定过表达CLRs基因慢病毒及CLRs基因siRNA慢病毒:过表达CLRs基因慢病毒及CLRs基因siRNA慢病毒构建和鉴定交由上海吉凯基因化学科技有限公司完成。

3. 过表达CLRs基因慢病毒及CLRs基因siRNA慢病毒转染DC:将DC以每孔5×10⁴个的浓度接种到24孔板中,并用DMEM调节终体积到500 μl,加入Polybrene,浓度调节至1 μg/ml,用Enhance Solution将慢病毒溶液稀释为1×10⁸,每孔加入30 μl,其MOI值为50;37℃、5% CO₂培养24 h,2000 r/min离心,去上清液,加入新鲜培养基继续培养48 h,备用。

4. 抽提转染CLRs过表达/siRNA慢病毒前后的DC的总RNA:DC转染72 h后,离心收集各组细胞,冷冻离心,冷PBS洗涤二次;加入500 μl Trizol裂解细胞,加入200 μl 氯仿,激烈振荡15 s,4℃,12 000 r/min离心10 min;小心吸出水层加入Eppendorf管中,再加入二倍体积的异丙醇(约600 μl),混匀,置于一20℃冰箱,30 min,4℃,10 000 r/min,离心10 min;弃上清留沉淀用650 μl 75%乙醇洗涤沉淀,4℃,8000 r/min,离心5 min;弃上清留沉淀重复一遍,充分吸尽残留液打开管盖,干式恒温器65℃,5~10 min,烘干;20 μl DEPC处理水溶解RNA,-20℃冰箱,保存,待用。

5. Real-time PCR检测转染DC前后CLRs基因mRNA表达量:反转录体系:5×逆转录buffer 4 μl、oligo(dT) 0.5 μl、dNTPs 0.5 μl、逆转录酶MMLV 1 μl、DEPC处理水10 μl、RNA模板4 μl、总体积20 μl、反应条件:37℃,1 h;95℃,5 min。灭活MMLV;Real-time PCR反应体系如下:SYBR Green Mix 32.5 μl、上游引物1.5 μl、下游引物1.5 μl、ddH₂O 12.5 μl、cDNA模板2 μl、总体积50 μl;扩增条件:50℃ 2 min,95℃ 5 min,95℃ 15 s,60℃ 45 s,循环40次;数据采用仪器自带软件分析:ABI Prism 7500 SDS Software [mRNA相对表达量=2^{-ΔCt}×100%,ΔCt=目标基因Ct值-内参(GAPDH)Ct值]。

三、统计学方法

采用SPSS 13.0软件包进行数据分析,结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用t检验,P<0.05表示差异有统计学意义。

结 果

1. 蜕膜和胎盘来源的DC的分离、培养及鉴定结果:通过密度梯度分离以及磁珠分选法从胎盘分别纯

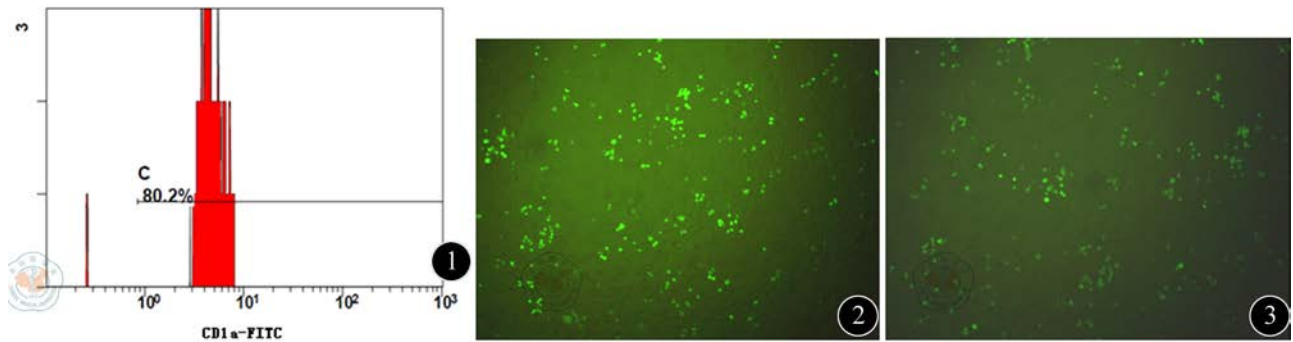


图1 流式细胞仪鉴定分离、培养得到的DC的纯度 图2 过表达CLRs基因慢病毒转染DC (MOI=50) 的荧光照片 图3 CLRs siRNA慢病毒转染DC (MOI=50) 的荧光照片

化得到 DC, 经流式细胞术检测 DC 纯度为 (82.6 ± 2.4) %, 见图 1。

2. 成功构建过表达 CLRs 基因慢病毒及 CLRs 基因 siRNA 慢病毒: CLRs 基因慢病毒过表达载体和 siRNA 载体由上海吉凯基因化学科技有限公司根据 Genbank 数据库构建, 同时构建阴性对照载体, 病毒量为 1 × 10¹⁰ Unit。

3. 过表达 CLRs 基因慢病毒及 CLRs 基因 siRNA 慢病毒转染 DC 的鉴定结果: 过表达 CLRs 慢病毒以 MOI=50 转染 DC 后 48 h 在荧光倒置显微镜下可观察到被转染的阳性细胞有绿色荧光蛋白 (GFP) 表达 (图 2), 通过流式细胞仪检测, 转染效率为 85% 左右。

CLRs siRNA 慢病毒以 MOI=50 转染 DC 后 48 h 在荧光倒置显微镜下可观察到被转染的阳性细胞有 GFP 表达 (图 3), 通过流式细胞仪检测, 转染效率为 82% 左右。

4. 转染 CLRs 过表达/siRNA 慢病毒的 DC 细胞抽提总 RNA 的结果: 通过微量核酸检测仪测定 DC 细胞抽提总 RNA 为 10⁴ μg/μl。

5. RT-PCR 检测慢病毒转染 DC 前后 CLRs 基因 mRNA 表达量: 过表达 CLRs 基因慢病毒转染 DC 后 mRNA 相对含量为 (14.26 ± 0.47) %, 较未转染的 DC 表达量 [(1.67 ± 0.19) %] 明显上升 (P < 0.01)。

CLRs 基因 siRNA 慢病毒转染 DC 后 CLRs mRNA 相对含量均值为 (0.03 ± 0.01) %, 较空白未转染的 DC 表达量明显下降 (P < 0.01)。见表 1。

表 1 CLRs 过表达/siRNA 慢病毒转染 DC 后 CLRs 基因 mRNA 表达量

组别	mRNA(%)
未转染 DC 组	1.67 ± 0.19
CLRs 过表达慢病毒转染 DC 组	14.26 ± 0.47
CLR siRNA 慢病毒转染 DC 组	0.03 ± 0.01

注: 未转染 DC 组 vs. CLRs 过表达慢病毒转染 DC 组, P < 0.01; 未转染 DC 组 vs. CLR siRNA 慢病毒转染 DC 组, P < 0.01, CLRs 过表达慢病毒转染 DC 组 vs. CLR siRNA 慢病毒转染 DC 组, P < 0.01

讨 论

小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 是一种小 RNA 分子(21~25 个核苷酸), 由 Dicer(RNAase III 家族中对双链 RNA 具有特异性的酶) 加工而成。SiRNA 是小干扰沉默复合体 (siRISC) 的主要成员, 激发与之互补的目标 mRNA 的沉默。siRNA 作为与 RNA 干扰现象紧密相连的非编码 RNA 之一, 是后基因组时代的重要研究工具^[9-10], 其作用机制首先是进入 RNA 介导的 siRNA 双链解开, 引导链 (指 siRNA 反义链) 进入 RNA 介导的沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC), 并切断具有序列特异性的 mRNA, 切断部位大约在与反义链配对序列的中部, 然后靶 mRNA 进一步降解。将慢病毒载体和 RNA 干扰技术结合, 通过病毒转染宿主细胞, 能在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^[11-12], 具有良好的发展和应用前景, 本研究采用慢病毒作为基因转载体, 以慢病毒介导的 CLRs siRNA 作为基因阻断技术, 转染 DC, 研究其抑制 CLRs 基因表达的效应, 为进一步研究 DC 表面 CLRs 与子痫前期的关系奠定基础。我们的研究发现 CLRs siRNA 慢病毒转染 DC 后, CLRs mRNA 的表达水平明显下降, 目的基因有明显抑制, 提示 CLRs 特异的 siRNA 慢病毒载体能在体内表达而发挥基因沉默效应, 为进一步研究 DC 表面 CLRs 与 TLRs 的关系提供了前期准备, 为防治子痫前期提供了新的思路。

cDNA 过度表达称为基因敲除的“合理逆转”, siRNA 是让基因沉默, 以确定基因下游的效应, 而 cDNA 引入许多目标基因的复制样本, 引起基因及其下游产物都超表达^[13-14], 采用 siRNA 方法, 必须确定短寡聚核苷酸序列, 该方法可以最佳方式敲除目标基因, 但并非所有寡聚物都能发挥效应, 因此, 就无法做到把所有基因的反应都准确预测出来, 采用 cDNA 会出现过表达现象, 这样就可以提供足够的目标基因

用于插入,而且,把目标基因与绿色荧光蛋白相融合,可以直接观察到在活细胞中产生的蛋白质及其分布位置^[15]。因此,除了采用 siRNA 技术敲除 DC 表面 CLRs 基因的表达外,本研究还成功构建了 CLRs 过表达慢病毒载体,并将其转染 DC,结果发现转染 72 h 后在荧光倒置显微镜下可观察到被转染的阳性细胞有 GTP,通过流式细胞仪检测,转染效率为 85% 左右,另外 RT-PCR 检测结果也显示 CLRs 过表达慢病毒转染 DC 后,CLRs mRNA 的表达水平明显增高,目的基因有明显的过度表达,提示 CLRs 特异的过表达慢病毒载体能在体内发挥基因过表达效应,同样为进一步研究子痫前期患者 DC 表面 CLRs 与 TLRs 的关系提供了实验基础。

参 考 文 献

- [1] van Vliet SJ, den Dunnen J, Gringhuis SI, et al. Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19: 435-440.
- [2] Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Engering A, et al. Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22: 33-54.
- [3] Chen CH, Floyd H, Olson NE, et al. Dendritic-cell-associated C-type lectin 2 (DCAL-2) alters dendritic-cell maturation and cytokine production. *Blood*, 2006, 107: 1459-1467.
- [4] van Vliet SJ, García-Vallejo JJ, van Kooyk Y. Dendritic cells and C-type lectin receptors: coupling innate to adaptive immune responses. *Immunol Cell Biol*, 2008, 86: 580-587.
- [5] Ferwerda G, Netea MG, Joosten LA, et al. The role of Toll-like receptors and C-type lectins for vaccination against *Candida albicans*. *Vaccine*, 2010, 28: 614-622.
- [6] 李黎,徐亮,滕银成. C 型凝集素受体和 Toll 样受体在子前期重度患者胎盘中的表达. *上海交通大学学报: 医学版*, 2011, 8: 1145-1149.
- [7] Xiong M, Lu J, Zhao A, et al. Therapy with FasL-gene-modified dendritic cells confers a protective microenvironment in murin pregnancy. *Fertil Steril*, 2010, 93: 2767-2769.
- [8] Zhao A, Xiong M, Zhang Y, et al. Adoptive transfer of mFas ligand into dendritic cells influences the spontaneous resorption rate in the CBA/J x DBA/2 mouse model. *Fertil Steril*, 2010, 93: 1700-1705.
- [9] Morris KV, Rossi JJ. Lentiviral-mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy. *Gene Ther*, 2006, 13: 553-558.
- [10] Scherr M, Battmer K, Ganser A, et al. Modulation of gene expression by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA. *Cell Cycle*, 2003, 2: 251-257.
- [11] Dreyer JL. Lentiviral vector-mediated gene transfer and RNA silencing technology in neuronal dysfunctions. *Methods Mol Biol*, 2010, 614: 3-35.
- [12] Richard E, Douillard-Guilloux G, Caillaud C. Lentiviral vector delivery of shRNA into cultured primary myogenic cells: a tool for therapeutic target validation. *Methods Mol Biol*, 2011, 709: 223-235.
- [13] Sun T, Luo J, Jia M, et al. Small interfering RNA-mediated knockdown of NF- κ Bp65 attenuates neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. *Eur J Pharmacol*, 2012, 682: 79-85.
- [14] Qiu T, Zhu HC, Liu XH, et al. Lentiviral-mediated shRNA against RelB induces the generation of tolerogenic dendritic cells. *Int Immunopharmacol*, 2012, 12: 501-509.
- [15] Atkinson BJ, Griesel BA, King CD, et al. Moderate GLUT4 overexpression improves insulin sensitivity and fasting triglyceridemia in high fat fed transgenic mice. *Diabetes*, 2013.

(收稿日期: 2013-09-26)

(本文编辑: 戚红丹)

薛卓维,熊苗,蒋荣珍,等. CLRs 过表达/siRNA 慢病毒载体的构建及其瞬时转染树状细胞的研究 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7(22): 10140-10143.

中 华 临 床 医 师 杂 志