

网络出版时间:2024-02-01 15:48:01 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240201.1117.029

采用慢病毒载体干扰 TRAF2 表达的 MH7A 细胞 稳转株的构建及意义

陈露颖,蒋励萍,王伟康,左书俊,蒯佳婕,马 旻,韩陈陈,魏 伟

摘要 **目的** 用慢病毒载体构建干扰肿瘤坏死因子受体相关因子 2 (TRAF2) 表达的类风湿关节炎 (RA) 患者滑膜细胞株 MH7A 细胞稳转株,研究 TNF- α -TRAF2 信号在 MH7A 异常增殖的作用。**方法** 根据人 TRAF2 的基因序列和 shRNA 序列设计原则,设计并合成 3 对 TRAF2-shRNA 干扰序列,通过 PCR 对引物进行退火,通过双酶切 PLKO.1-puro 获得线性载体,将线性化载体与退火后引物通过 Solution I 连接,连接产物导入感受态细胞,涂板,挑取阳性菌落进行测序。构建 3 种不同的 PLKO.1-TRAF2-shRNA 慢病毒重组质粒,借助慢病毒包装质粒对数生长期的 HEK 293T 细胞进行慢病毒包装,收集病毒液感染 MH7A 细胞,同时使用嘌呤霉素对 TRAF2 低表达的 MH7A 稳转株进行筛选。使用 CCK-8 法、Western blot、qPCR 检测 MH7A 中肿瘤坏死因子 TNF- α 诱导 TRAF2 低表达的 MH7A 增殖功能及下游信号 TRAF2、P65 蛋白表达和 mRNA 水平。**结果** 成功构建了 PLKO.1-TRAF2-shRNA(1)、PLKO.1-TRAF2-shRNA(2) 和 PLKO.1-TRAF2-shRNA(3) 慢病毒载体质粒和对照组慢病毒载体质粒 PLKO.1-puro,将 3 个 TRAF2-shRNA 慢病毒载体质粒和对照组慢病毒载体质粒 PLKO.1-puro 分别与慢病毒包装质粒导入 HEK 293T 获得病毒液,将病毒液感染 MH7A 细胞后,经嘌呤霉素 (2.00 μ g/ml) 筛选,2 d 得到 MH7A 稳转株;qPCR 和 Western blot 结果显示,PLKO.1-TRAF2-shRNA(1) MH7A 细胞稳转株中 TRAF2 mRNA 和蛋白的表达较阴性对照组明显下降;CCK-8 和 Western blot 结果表明,MH7A 中

TRAF2 敲低后,TNF- α 诱导的 TRAF2 低表达的 MH7A 细胞增殖和 P65 的磷酸化水平明显下降。**结论** 成功构建了 PLKO.1-TRAF2-shRNA(1) MH7A 细胞稳转株,研究 TNF- α -TRAF2 信号活化介导 RA 滑膜细胞异常增殖中的作用。

关键词 类风湿关节炎;MH7A;肿瘤坏死因子受体相关因子 2;慢病毒载体

中图分类号 R 34

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)02-0193-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.02.002

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性、侵蚀性疾病,具有高致残致畸的特点,病理特征为滑膜炎、关节破坏及血管翳的形成^[1],其中成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synovocyte, FLS) 的异常活化在 RA 的发展中发挥了关键作用^[2]。活化的 FLS 过度增殖会产生多种炎症因子、趋化因子和基质金属蛋白酶,如肿瘤坏死因子 (tumour necrosis factor, TNF)- α 、白细胞介素 (interleukin, IL)-6 等,造成关节的慢性炎症和持续性破坏^[3]。肿瘤坏死因子受体相关因子 2 (tumour necrosis factor receptor-associated factor 2, TRAF2) 是 TNF- α 信号转导的重要衔接蛋白,在 TNF- α 诱导的 TNFR1 和 TNFR2 信号活化中起着至关重要的作用,参与调控多种细胞内蛋白,包括 JNK、核因子 (nuclear factor, NF)- κ B 和 p38^[4]。其中,NF- κ B 信号的异常激活可引起持续的炎症,导致 IL-6 等多种炎症因子水平升高,诱发 RA 的发生,并在 FLS 的异常增殖中发挥了重要作用^[5]。该实验研究 TRAF2 低表达后 TNF- α 诱导 RA 患者滑膜细胞株 (MH7A) 增殖功能及下游信号的改变,旨在进一步研究 TRAF2 蛋白在 TNF- α 诱导的 MH7A 增殖中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞、菌株、载体 RA 患者滑膜细胞株 MH7A 购自北京金恒盛世科技有限公司;人胚肾 HEK 293T 细胞购自中国科学院上海细胞库;病毒质粒、TOP10 感受态细胞购自通用生物 (滁州) 公

2023-09-13 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82104187、82173824、81973332);安徽省自然科学基金(编号:2108085QH382);中国博士后科学基金(编号:2021T140002、2021M700184);安徽省博士后基金(编号:2020B430)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所、抗炎免疫药物教育部重点实验室、抗炎免疫药物安徽省协同创新中心,合肥 230032

作者简介:陈露颖,女,硕士研究生;

马 旻,女,博士,副教授,责任作者,E-mail: mayang_ahmu@126.com;

韩陈陈,女,博士,校聘副教授,责任作者,E-mail: chenchenhan@ahmu.edu.cn;

魏 伟,男,博士,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

司。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、DMEM 培养基及 PBS 购自以色列 BI 公司; Solution I 连接酶、dNTP、6 × Loading Buffer、DNA Marker DL10000 均购自日本 TaKaRa 公司;限制性内切酶 Age I 和 EcoR I 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;嘌呤霉素购自优宁维生物科技有限公司;切胶回收试剂盒和质粒小提取试剂盒购自 TIANGEN 天根生化科技(北京)有限公司;兔源 TRAF2 购自艾博抗(上海)贸易有限公司; p-P65 和 P65 购自美国 Cell Signaling Technology; Jet PRIME transfection reagent 转染试剂购自法国 PolyPlus 公司; PVDF 膜购自美国 Millipore 公司;逆转录和 PCR 试剂盒购自莫纳生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器 T100 Thermal Cycler PCR 基因扩增仪(美国 Bio-Rad 公司); Tanon 1600 全自动数码凝胶成像系统(上海天能科技有限公司); Image Quant LAS 4000 荧光及化学发光成像系统(美国 GE 公司); Tanon EPS-300 琼脂糖凝胶电泳仪(苏州阿尔法生物实验器材有限公司); SIGMA1-16K 小型台式高速冷冻离心机(德国西格玛公司); ZWY-2102C 智诚恒温培养振荡器(上海智诚分析仪器制造有限公司);核酸电泳仪和 DYY-6C 型电泳系统(北京六一公司)。

1.2 PLKO.1-TRAF2-shRNA 质粒构建

1.2.1 设计 TRAF2-shRNA 的 PCR 引物 通过 <https://www.ncbi> 查找人 TRAF2 的基因序列(NM_021138.4),设计特异性靶向 TRAF2 基因的 3 对 shRNA 序列,引物的合成由北京擎科生物有限公司完成。见表 1。

表 1 3 对 TRAF2-shRNA 引物序列

干扰靶点	引物序列(5'-3')
TRAF2-shRNA(1)-a	CCGGGTGTTACGAGGGCATATATGGGATCCCATATATGCCCTCGTGAACACTTTTTG
TRAF2-shRNA(1)-b	AATTCAAAAAGTGTTCACGAGGGCATATATGGGATCCATATATGCCCTCGTGAACAC
TRAF2-shRNA(2)-a	CCGGCGAGACGGTAGAGGGTGAGAAGGATCCTTCTCACCCTCTACCGTCTCGTTTTTG
TRAF2-shRNA(2)-b	AATTCAAAAACGAGACGGTAGAGGGTGAGAAGGATCCTTCTCACCCTCTACCGTCTCG
TRAF2-shRNA(3)-a	CCGGCGACAGAAATAACCGGGAGCAGGATCCTGCTCCGGTTATCTGGTCTTTTTG
TRAF2-shRNA(3)-b	AATTCAAAAACGACAGAAATAACCGGGAGCAGGATCCTGCTCCGGTTATCTGGTCTG

1.2.2 TRAF2-shRNA 引物退火 将合成的

TRAF2-shRNA 引物稀释成终浓度为 10 mmol/l 的储藏液。将以上 3 对 TRAF2-shRNA 引物在 PCR 仪上进行退火形成双链 DNA, TRAF2-shRNA 的正向、反向引物各 5 μl, 梯度降温, 循环 30 次。4 ℃ 保存短暂保存退火产物。

1.2.3 准备线性化载体 使用限制性核酸内切酶 AgeI、EcoRI 及其配套试剂配制 50.0 μl 酶切反应体系[ddH₂O 31.0 μl, 10 × Cut Smart Buffer 5.0 μl, 纯化的质粒 DNA (PLKO.1-puro, 剂量为 0.5 μg/μl) 10.0 μl, Age I 和 EcoR I 各 2.0 μl], 依序加入试剂后轻轻吹打混匀, 室温下以相对离心力 280 r/min 短暂离心 15 s, 37 ℃ 水浴 2 h, 对载体酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳, 回收酶切产物, 回收线性载体并检测浓度。

1.2.4 退火产物与酶切载体连接 将以上得到的退火产物及双酶切线性化的载体通过 Solution I 连接酶进行连接, 50 ℃ 下连接 15 min, 得到连接产物。

1.2.5 重组质粒的转化扩增及测序 将 10.0 μl 连接产物加入到 TOP10 感受态细胞中, 轻弹管壁数下混匀, 冰上放置 30 min。42 ℃ 热激 90 s, 冰水浴孵育 2 min。加入无抗性的溶菌肉汤(Luria-Bertani, LB)培养基 500.0 μl, 置于 37 ℃ 摇床振荡培养 1 h。取适量菌液均匀涂布在含有氨苄抗性的 LB 固体琼脂培养基上, 在恒温培养箱中倒置培养 12 ~ 16 h, 挑取平板上的单个菌落于 3 ml 的含有氨苄抗性的 LB 培养液中, 摇菌 12 ~ 16 h, 利用质粒小抽提取试剂盒提取质粒, 将提取出的质粒进行 DNA 序列测序。

1.3 慢病毒包装感染 MH7A 构建稳转株

1.3.1 慢病毒包装体系 人 HEK 293T 细胞以每孔 1×10^6 细胞接种于 6 孔板中, 10% DMEM 培养液培养, 置于 37 ℃、5% CO₂ 箱中孵育 24 h, 至细胞达到对数增长长期更换新鲜培养基, 进行转染。将 PLKO.1-TRAF2-shRNA 质粒与慢病毒包装质粒共转入 HEK 293T 细胞中: ① 制备转染复合物: 取无菌 1.5 ml EP 管, 加入 200 μl 的 jet PRIME buffer, 再加入 2 μg DNA 混合物, 快速涡旋 10 s, 混匀后, 加入 4 μl 的 jet PRIME reagent 转染试剂, 快速涡旋 10 s, 混匀后室温静置 10 min。② 转染: 将 6 孔板中培养基弃去, 加入 2 ml 10% DMEM, 将转染复合物加入孔中, 置于 37 ℃、5% CO₂ 孵箱内培养 48 h 后培养基变黄, 收集上清溶液至无菌离心管中, 4 000 r/min 离心 5 min。使用 0.45 μm 过滤器过滤, 分装到无菌离心管中于 -80 ℃ 保存。

1.3.2 嘌呤霉素筛选最佳浓度的确定 提前 1 d 接种 0.5×10^5 个细胞/孔至 24 孔板中,加入 0.5 ml 含血清培养基,37 ℃、5% CO₂ 培养至 MH7A 细胞生长密度达到 40% ~ 50%,加入嘌呤霉素浓度分别为 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 μg/ml 的含 10% 血清的 DMEM 培养基,每隔 1 d 换新鲜含嘌呤霉素的溶液(浓度不变)。37 ℃、5% CO₂ 培养 3 d,显微镜下观察细胞的死亡情况。细胞处理 0、24、48、72 h 后细胞死亡情况,使 MH7A 细胞全部死亡的嘌呤霉素浓度即为筛选浓度。

1.3.3 病毒液感染和稳转细胞的筛选 按照每孔 1×10^6 的细胞密度铺板 6 孔板,观察细胞长势;当密度在 50% ~ 70%,将 PLKO.1 空载体及 PLKO.1-TRAF2-shRNA 慢病毒病毒液感染 MH7A 细胞,加入最适筛选浓度的嘌呤霉素,维持嘌呤霉素浓度,每日观察细胞状态,约 2 ~ 3 d 后筛选出 TRAF2 敲低的 MH7A 稳转株,更换新鲜筛选培养基,继续培养 TRAF2 敲低的 MH7A 稳转株。

1.4 qRT-PCR 检测 使用 TRIzol 收取细胞 RNA 裂解液,按照说明书提取 RNA,测定 RNA 浓度,逆转录 RNA 成 cDNA 后进行 qRT-PCR 检测,TRAF2 正向引物:5'-CTGCGGCAAGAAGA AGATCC-3',反向引物:5'-AATCTGCAAGGGACTCG ACA-3';内参基因 GAPDH 正向引物:5'-ACCCA GAAGACTGTG-GATGG-3',反向引物:5'-TCAGCT CAGGGATGAC-CTTG-3',使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 算法处理原始 CT 数值。

1.5 Western blot 在 6 孔板中每孔接入 1×10^6 个 MH7A 和 TRAF2 低表达的 MH7A 细胞,小心弃去上清培养基,使用冷 PBS 清洗 2 次,将细胞使用已加蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液 RIPA 刮下收集在 1.5 ml EP 管中,冰上裂解 30 min,4 ℃ 离心取上清液使用 BCA 浓度定量试剂盒进行定量,加入 $5 \times$ SDS loading buffer,95 ℃、10 min 进行蛋白变性,随后使用 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)进行电泳,5% 脱脂牛奶封闭 2 h,1:1 000 比例稀释一抗抗体 4 ℃ 孵育过夜,次日 TPBS 洗涤 3 次后,1:50 000 比例稀释二抗抗体,室温孵育 2 h,TPBS 洗涤 3 次,ECL 化学发光显影,以 GAPDH 作为内参。

1.6 CCK-8 法检测细胞增殖 在 96 孔培养板中分别加入 1×10^4 个 MH7A 和 TRAF2 低表达的 MH7A 细胞悬液 100 μl,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h。提前 4 h 分别将培养基更换为 90 μl DMEM 完全培养基和 10 μl CCK-8 混合液,继续孵

育 30 min,用酶标仪分别检测 450 nm 处的光密度(optical density, OD),实验重复 3 次。

1.7 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验比较两组间差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PLKO.1-TRAF2-shRNA 敲低质粒构建与鉴定 查找人源 TRAF2 基因,通过 shRNA 设计网址设计 TRAF2-shRNA 引物对,合成 TRAF2-shRNA (1)、TRAF2-shRNA (2) 和 TRAF2-shRNA (3) 引物对,通过 PCR 进行引物对退火,同时双酶切 PLKO.1-puro 载体,将获得的线性 PLKO.1-puro 片段进行 1% 琼脂糖电泳,回收酶切产物。通过连接酶连接 TRAF2-shRNA 引物对和线性 PLKO.1-puro 片段,将连接产物进行转化,挑选阳性克隆质粒 PLKO.1-TRAF2-shRNA (1) (图 1A)、PLKO.1-TRAF2-shRNA (2) (图 1B) 和 PLKO.1-TRAF2-shRNA (3) (图 1C),进行 DNA 测序和比对分析,测序结果与目的基因序列完全一致,成功构建 3 种 PLKO.1-TRAF2-shRNA 慢病毒载体质粒。

2.2 MH7A 细胞进行嘌呤霉素浓度筛选 MH7A 分别加入 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 μg/ml 嘌呤霉素培养 24、48、72 h。结果表明,培养 48 h 后,嘌呤霉素浓度为 2.0、2.5 μg/ml 作用所有的细胞均全部死亡,故确定嘌呤霉素作用时间为 48 h,筛选浓度为 2.0 μg/ml (图 2)。

2.3 PLKO.1-TRAF2-shRNA 慢病毒感染 MH7A 对 TRAF2 mRNA 的影响 3 种 PLKO.1-TRAF2-shRNA 慢病毒载体质粒分别和慢病毒包装质粒共转入 HEK 293T 细胞,培养 48 h,收集病毒液,通过病毒液感染 MH7A,加入 2 μg/ml 嘌呤霉素,筛选 TRAF2 低表达的 MH7A 稳转株,通过 3 次独立 qPCR 实验检测 MH7A 中 TRAF2 的表达情况,结果表明,与 PLKO.1-puro 阴性对照 MH7A 稳转株相比,只有 PLKO.1-TRAF2-shRNA (1) 可以显著下调 MH7A 的 TRAF2 mRNA 水平($t = 5.015, P < 0.01$),提示 TRAF2 低表达的 MH7A 稳转株构建成功(图 3)。

2.4 PLKO.1-TRAF2-shRNA 慢病毒感染 MH7A 对 TRAF2 蛋白表达的影响 进一步通过 Western blot 检测 PLKO.1-TRAF2-shRNA 慢病毒感染 MH7A 对 TRAF2 蛋白的抑制效果。结果显示,与 PLKO.1-



图1 3种 PLKO.1-TRAF2-shRNA 慢病毒载体质粒的部分测序结果

A: PLKO.1-TRAF2-shRNA(1)慢病毒载体质粒; B: PLKO.1-TRAF2-shRNA(2)慢病毒载体质粒; C: PLKO.1-TRAF2-shRNA(3)慢病毒载体质粒

puro 阴性对照 MH7A 稳转株相比,只有 PLKO.1-TRAF2-shRNA(1) 可以显著下调 MH7A 的 TRAF2 蛋白水平 ($t = 8.847, P < 0.01$),进一步证明了 TRAF2 低表达的 MH7A 稳转株构建成功(图 4)。

2.5 TRAF2 低表达对 TNF- α 诱导的 MH7A 细胞增殖的影响 分别将 PLKO.1-puro 阴性对照 MH7A 稳转株和 PLKO.1-TRAF2-shRNA(1) MH7A 稳转株接入 96 孔板中,分别给予 TNF- α (20 ng/ml) 作用,48 h 后,采用 CCK-8 法检测 MH7A 细胞增殖能力。结果表明,在阴性对照 MH7A 稳转株中,给予 TNF- α 作用可以促进其异常增殖 ($t = 20.00, P < 0.01$);在 TRAF2 低表达的 MH7A 稳转株中,给予 TNF- α 作用未促进 TRAF2 低表达的 MH7A 稳转株增殖 ($t = 1.731, P > 0.05$),提示低表达 TRAF2 可以减弱 TNF- α 诱导的 MH7A 增殖能力(图 5)。

2.6 TRAF2 低表达对 TNF- α 诱导的 MH7A 细胞中 P65 磷酸化的影响 分别将 PLKO.1-puro 阴性对照 MH7A 稳转株和 PLKO.1-TRAF2-shRNA(1) MH7A 稳转株接入 6 孔板中,分别给予 TNF- α (20

ng/ml) 作用,作用 48 h 后,通过 Western blot 检测 TRAF2 下游信号 P65 和 p-P65 的表达。结果表明,在阴性对照 MH7A 稳转株中,给予 TNF- α 作用可以显著促进其 p-P65 的表达 ($t = 29.20, P < 0.01$);在 TRAF2 低表达的 MH7A 稳转株中,给予 TNF- α 作用未显著促进 TRAF2 低表达的 MH7A 稳转株中 p-P65 的表达;提示低表达 TRAF2 可以降低 TNF- α 诱导的 MH7A 中 P65 磷酸化水平(图 6)。

3 讨论

TNF- α 作为一种重要的炎症因子,在 RA 患者血清及关节滑膜中水平升高,研究^[6]表明抑制 TNF- α 的作用能显著改善 RA 患者的临床症状,提高生活质量。TRAF2 作为 TNF- α 信号下游的一种重要衔接蛋白,TNF- α 刺激条件下,TRAF2 与 TAK1 发生泛素化,促进 NF- κ B 活化,促进滑膜细胞增殖以及促炎因子的释放。TRAF2 可以激活 IKK,IKK 使 I κ B 磷酸化,释放 NF- κ B 二聚体,并迁移到细胞核。这些二聚体结合特定的 DNA 序列并激活各种 NF- κ B

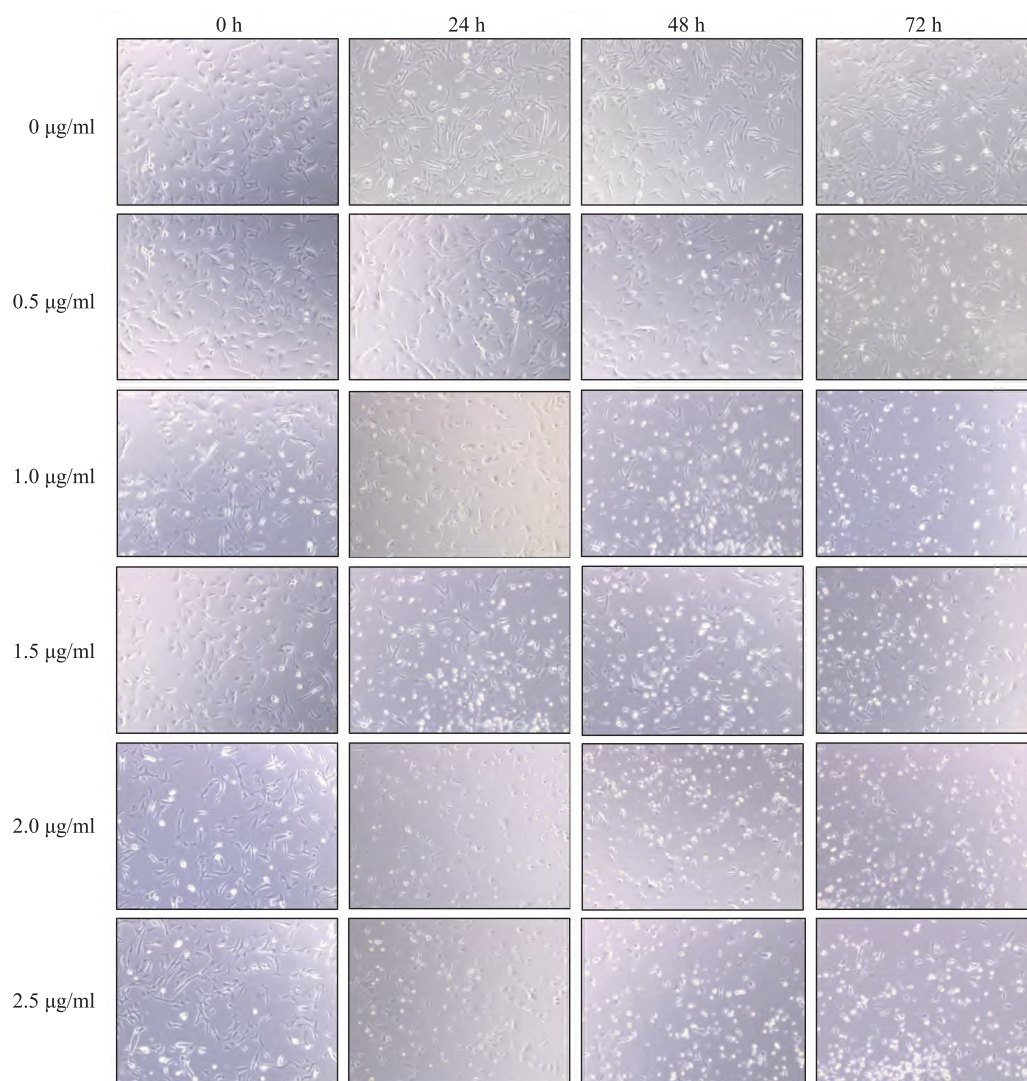


图2 不同浓度嘌呤霉素培养不同时间对 MH7A 细胞的影响 ×10

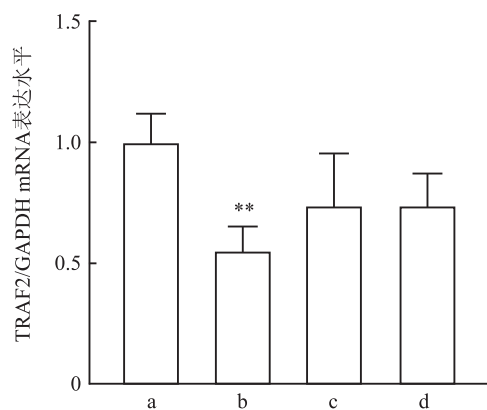


图3 qPCR 检测 MH7A 细胞中 TRAF2 mRNA 的表达情况

a: PLKO. 1-puro; b: PLKO. 1-TRAF2-shRNA (1); c: PLKO. 1-TRAF2-shRNA (2); d: PLKO. 1-TRAF2-shRNA (3); 与 PLKO. 1-puro 比较: ** $P < 0.01$

的靶基因,促进促炎细胞因子 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 和 MMP 的转录和分泌。在 RA 的滑膜细胞异常增殖中起着重要作用^[7-8]。

本实验利用慢病毒载体系统,构建 TRAF2 低表达的滑膜细胞稳转株,为探索 TRAF2 调控 RA 滑膜细胞异常增殖的机制提供了实验方法^[9]。常用病毒载体包括腺病毒、逆转录病毒和慢病毒。腺病毒一般不能整合到染色体上,适用于瞬时感染;逆转录病毒载体只能感染分裂期细胞,而且容量有限;而慢病毒载体可以将外源基因或外源的 shRNA 有效地整合到宿主染色体上,从而达到持久性表达目的序列的效果。较腺病毒而言,慢病毒载体可以长期表达且能产生表达 shRNA 的高滴度慢病毒;较逆转录病毒载体而言,慢病毒载体具有更广的宿主范围,可以感染非分裂期细胞、容纳外源性基因片段大。慢病

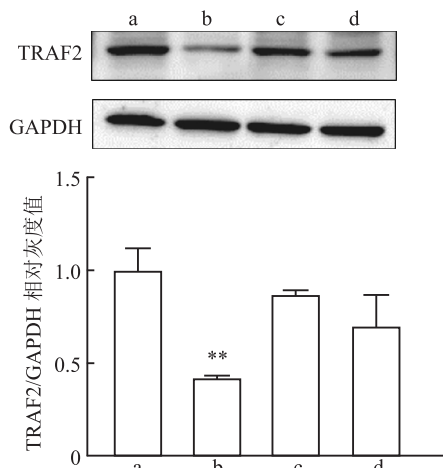


图4 Western blot 检测 MH7A 细胞中 TRAF2 蛋白的表达

a: PLKO. 1-puro; b: PLKO. 1-TRAF2-shRNA (1); c: PLKO. 1-TRAF2-shRNA (2); d: PLKO. 1-TRAF2-shRNA (3); 与 PLKO. 1-puro 比较: ** $P < 0.01$

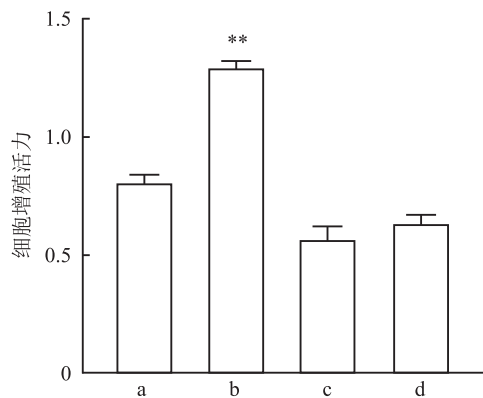


图5 CCK-8 法检测 TRAF2 敲低对 MH7A 细胞增殖能力的影响

a: PLKO. 1-puro; b: PLKO. 1-puro + TNF- α (20 ng/ml); c: PLKO. 1-TRAF2-shRNA (1); d: PLKO. 1-TRAF2-shRNA (1) + TNF- α (20 ng/ml); 与 PLKO. 1-puro 比较: ** $P < 0.01$

毒载体介导的转基因表达能持续数月,且不产生任何有效的细胞免疫应答,可作为一种体外基因运输的工具^[6, 10-11]。慢病毒包装系统由慢病毒表达载体和慢病毒包装载体组成。

本研究通过双酶切慢病毒表达载体 PLKO. 1-puro, 设计 TRAF2-shRNA 引物, 成功构建了 PLKO. 1-TRAF2-shRNA 慢病毒载体质粒。将慢病毒包装载体与 PLKO. 1-TRAF2-shRNA 慢病毒载体质粒通过脂质体转染试剂转染 HEK 293T 细胞, 获得病毒液后感染 MH7A, 经过嘌呤霉素筛选、qPCR 和 Western blot 验证, 成功构建了 TRAF2 敲低的 MH7A 细胞稳转株。将筛选的 TRAF2 敲低的 MH7A 细胞稳转株进行功能验证, CCK-8 检测细胞增殖, 结果表明 TRAF2 敲低后抑制 TNF- α 诱导的 MH7A 异常增殖能力, Western blot 结果表明 TRAF2 敲低后会明

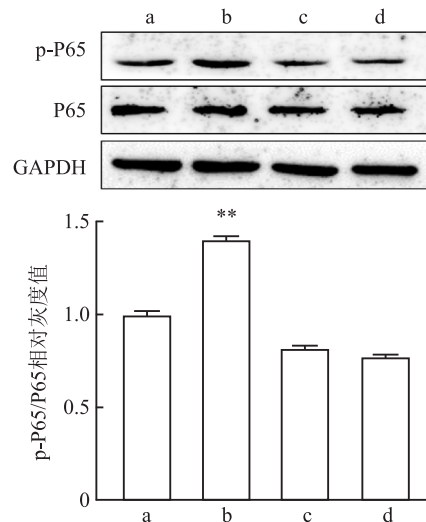


图6 Western blot 检测 TRAF2 敲低对 MH7A 细胞中 P65 磷酸化水平的影响

a: PLKO. 1-puro; b: PLKO. 1-puro + TNF- α (20 ng/ml); c: PLKO. 1-TRAF2-shRNA (1); d: PLKO. 1-TRAF2-shRNA (1) + TNF- α (20 ng/ml); 与 PLKO. 1-puro 比较: ** $P < 0.01$

显下调 TNF- α 诱导的 MH7A 中 p-P65 的表达, 因为 TRAF2 是 NF- κ B 下游的关键蛋白, 敲低 TRAF2 抑制下游 p-p65 的磷酸化水平。为后续进一步研究 TNF- α -TRAF2 信号介导 RA 滑膜细胞异常增殖的机制提供初步的实验基础。

参考文献

- [1] Sparks J A. Rheumatoid arthritis[J]. Ann Intern Med, 2019, 170(1): ITC1-6.
- [2] Vomero M, Manganelli V, Barbati C, et al. Reduction of autophagy and increase in apoptosis correlates with a favorable clinical outcome in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF drugs[J]. Arthritis Res Ther, 2019, 21(1): 39.
- [3] Nygaard G, Firestein G S. Restoring synovial homeostasis in rheumatoid arthritis by targeting fibroblast-like synoviocytes[J]. Nat Rev Rheumatol, 2020, 16(6): 316-33.
- [4] Tai Y, Huang B, Guo P P, et al. TNF-alpha impairs EP4 signaling through the association of TRAF2-GRK2 in primary fibroblast-like synoviocytes[J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43(2): 401-16.
- [5] Varfolomeev E, Vucic D. Intracellular regulation of TNF activity in health and disease[J]. Cytokine, 2018, 101: 26-32.
- [6] Joo J H, Wang X, Singh S, et al. Intraosseous delivery of platelet-targeted factor VIII lentiviral vector in humanized NBSGW mice[J]. Blood Adv, 2022, 6(19): 5556-69.
- [7] Borghi A, Verstrepen L, Beyaert R. TRAF2 multitasking in TNF receptor-induced signaling to NF-kappaB, MAP kinases and cell death[J]. Biochem Pharmacol, 2016, 116: 1-10.
- [8] Li J, Zhang J, Zhang Y, et al. TRAF2 protects against cerebral ischemia-induced brain injury by suppressing necroptosis[J]. Cell

- Death Dis, 2019, 10(5): 328.
- [9] 李晓娟,王珏,何建萍,等. HOTAIR 过表达慢病毒载体的构建及稳定细胞株的建立[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(5): 683-7.
- [10] Yew C T, Gurumoorthy N, Nordin F, et al. Integrase deficient lentiviral vector: prospects for safe clinical applications [J]. PeerJ, 2022, 10: e13704.
- [11] Shi R, Jia S, Liu H, et al. Clinical grade lentiviral vector purification and quality control requirements[J]. J Sep Sci, 2022, 45(12): 2093-101.

Significance and successful construction of stable transfection of MH7A cells with lower TRAF2 expression using lentiviral vector

Chen Luying, Jiang Liping, Wang Weikang, Zuo Shujun, Kuai Jiajie, Ma Yang, Han Chenchen, Wei Wei
(Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Drugs of the Ministry of Education, Anhui Collaborative Innovation Center for Anti-inflammatory and Immune Drugs, Hefei 230032)

Abstract Objective To construct a stable synovial cell line MH7A from rheumatoid arthritis (RA) patients using lentiviral vectors that interfere with the expression of tumor necrosis factor receptor associated factor 2 (TRAF2), and to study the role of TNF- α -TRAF2 signaling in MH7A abnormal proliferation. **Methods** Based on the design principles of human TRAF2 gene sequence and shRNA sequence, three pairs of TRAF2 shRNA interference sequences were designed and synthesized. The primers were annealed by PCR, and a linear vector was obtained by double enzyme digestion PLKO. 1-puro. The linearized vector was connected to the annealed primers through Solution I, and the connected products were introduced into receptive cells. The plates were coated, and positive colonies were selected for sequencing. Three different recombinant plasmids of PLKO. 1-TRAF2-shRNA lentivirus were constructed, and lentivirus packaging plasmids was used to package logarithmic growth phase HEK 293T cells. Virus solution was collected to infect MH7A cells. At the same time, puromycin was used to screen MH7A stable transgenic strains with low TRAF2 expression. CCK-8 method, Western blot, and qPCR were used to detect the proliferation function of MH7A induced by TNF- α and low expression of TRAF2, as well as downstream signal TRAF2, P65 protein expression and mRNA levels. **Results** PLKO. 1-TRAF2-shRNA(1), PLKO. 1-TRAF2-shRNA(2), and PLKO. 1-TRAF2-shRNA(3) lentivirus vector plasmids and control group lentivirus vector plasmids PLKO. 1-puro were successfully constructed. The three TRAF2-shRNA lentivirus vector plasmids and control group lentivirus vector plasmids PLKO. 1-puro were respectively introduced into the lentivirus packaging plasmid of HEK 293T to obtain virus solution. After infecting MH7A cells with the virus solution, they were treated with puromycin (2.00 μ G/mL) screening and obtaining MH7A stable transgenic plants after 2 days. Through qPCR and Western blot results, it was found that the expression of TRAF2 mRNA and protein in PLKO. 1-TRAF2-shRNA(1) MH7A stably transfected cells was significantly reduced compared to the negative control group. The results of CCK-8 and Western blot showed that after knocking down TRAF2 in MH7A, the proliferation of MH7A cells with low TRAF2 expression induced by TNF- α and the phosphorylation level of P65 were significantly reduced. **Conclusion** A stable transgenic strain of PLKO. 1-TRAF2-shRNA(1) MH7A cells was successfully constructed to investigate the role of TNF- α -TRAF2 signal activation in mediating abnormal proliferation of RA synovial cells.

Key words rheumatoid arthritis; MH7A; tumor necrosis factor receptor related factor 2; lentivirus vector