

网络出版时间: 2019-12-18 17:12 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20191217.1516.010.html>

lncRNA BC002811 慢病毒载体构建及对胃癌细胞增殖的影响

符伟玉, 林小聪, 陈小谊, 余华军, 兰柳波

摘要 目的 构建长链非编码 RNA (lncRNA) BC002811 慢病毒表达载体, 并探讨稳定表达 BC002811 对胃癌 HGC-27 细胞增殖的影响。方法 将 PCR 法扩增得到的 BC002811 全基因序列, 与 pLVX-EGFP-IRES-neo 载体连接, 经酶切鉴定和测序验证后, 与辅助包装质粒共转染 HEK293T 细胞, 包装成重组慢病毒颗粒, 再感染 HGC-27 细胞, 经有限稀释法筛选出稳定表达 BC002811 的细胞克隆并扩大培养。qPCR 法分析 BC002811 的表达水平, MTS 法检测细胞增殖能力。结果 双酶切和测序结果表明 BC002811 重组慢病毒载体构建成功, 经 HEK293T 细胞包装后, 测定其病毒滴度为 2.2×10^{11} TU/L。将此病毒感染 HGC-27 细胞, 显示可有效提高 BC002811 的表达水平 ($P < 0.05$)。MTS 法检测结果显示, 与对照组相比, BC002811 组的 HGC-27 细胞增殖能力增强 ($P < 0.05$)。结论 成功构建了 BC002811 重组慢病毒载体, 该载体能稳定感染 HGC-27 细胞, 使 BC002811 过表达并提高细胞的增殖能力。

关键词 胃癌; 长链非编码 RNA; 慢病毒; 增殖

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)01-0046-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.01.010

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类不编码蛋白质的内源性 RNA 转录本, 长度大于 200 个核苷酸, 可在转录及转录后水平调控基因表达, 广泛参与细胞增殖、分化、凋亡和衰老等重要的生物学过程^[1]。研究^[2]表明, lncRNA 在胃癌发生、发展、转移、耐药及预后中均具有重要作用, 可能成为胃癌诊断标志物及治疗靶点。

通过高通量的 lncRNA 芯片检测, 本研究已经从胃癌组织样本中筛选出多个差异表达的 lncRNA 分子; lncRNA BC002811 在芯片结果中呈明显的表

达上调^[3]。本研究通过构建 BC002811 重组慢病毒载体, 筛选出 BC002811 稳定表达的胃癌 HGC-27 细胞系, 并观察 BC002811 对 HGC-27 细胞增殖的影响, 为进一步探讨 BC002811 在胃癌中的作用及其分子机制提供有力的支持。

1 材料与方法

1.1 材料 BC002811 全长基因序列由苏州金唯智生物科技公司合成; pLVX-EGFP-IRES-neo 载体, pHelper 1.0 及 2.0 辅助包装质粒购自广州莱德联邦生物公司; 人胚肾 HEK293T 细胞和胃癌 HGC-27 细胞由本实验室保存; *DH5α* 感受态细胞为北京鼎国昌盛生物公司产品; RPMI-1640 和 DMEM 培养基以及胎牛血清均由美国 Hyclone 公司生产; Lipofectamine™ 2000、Opti-MEM 培养基、TRIzol 试剂和 qPCR 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; Xho I 和 Not I 限制性核酸内切酶为上海碧云天生物技术公司产品; T4 DNA 连接酶由日本 TaKaRa 公司生产; 高纯度质粒小量提取试剂盒及 DNA 凝胶回收试剂盒为广州东盛生物公司产品; M-MLV 逆转录酶和 MTS 试剂购自美国 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 BC002811 全基因序列的 PCR 扩增 根据 BC002811 全基因序列设计含有 Xho I 和 Not I 限制性内切酶切位点的引物, 并进行 PCR 扩增。正向引物序列: 5'-CCGCTCGAGGTGCAATTTTCAGCTCAC TGCAAC-3', 反向引物序列: 5'-ATAAGAATGCGGC-CGCTTTTTTTTTTTTTTTTGTACTTGATGG-3'。PCR 的反应条件为: 94℃ 预变性 3 min; 随后 98℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s 以及 68℃ 延伸 110 s, 重复 30 个循环; 68℃ 最后延伸 5 min。扩增片段经琼脂糖凝胶电泳分离并切胶回收。

1.2.2 BC002811 重组慢病毒载体的构建及鉴定 使用限制性核酸内切酶 Xho I 和 Not I 双酶切 BC002811 全基因序列的 PCR 扩增产物以及 pLVX-EGFP-IRES-neo 载体, 经 T4 DNA 连接酶 16℃ 连接反应 2 h。连接产物随后转化 *DH5α* 感受态细胞, 收集转化后的菌液, 接种至 LB 琼脂培养基(含 100

2019-09-04 接收

基金项目: 广东省自然科学基金(编号: 2016A030313677); 广东医科大学博士学位人员和人才引进人员科研启动项目(编号: B2017002); 湛江市科技发展专项资金竞争性分配项目(编号: 2019A01010)

作者单位: 广东医科大学生物化学与分子生物学研究所, 湛江 524023

作者简介: 符伟玉, 女, 讲师;

林小聪, 男, 博士, 副教授, 责任作者, E-mail: cong-toulin750325@126.com

mg/L 氨苄青霉素), 37 °C 倒置培养 16 h。继而, 挑选抗性菌落转移至液体 LB 培养基中进行扩增培养, 提取质粒进行酶切鉴定和琼脂糖凝胶电泳检测。最后, 将酶切鉴定正确的质粒送测序验证。

1.2.3 慢病毒包装、浓缩及滴度测定 将重组慢病毒质粒 pLVX-BC002811-EGFP-IRES-neo 与 pHelper 1.0 及 pHelper 2.0 两种病毒辅助包装质粒经 Lipofectamine™ 2000 共转染 HEK293T 细胞。8 h 后, 以 DMEM 完全培养基更换旧的培养基, 继续培养 48 h。1 000 r/min 离心 5 min 收集病毒上清液, 0.45 μm 滤器过滤。再经 4 °C、53 125 r/min 高速离心和 0.22 μm 滤器过滤, 收集病毒浓缩液, 应用倍比稀释法测定病毒的滴度^[4]。

1.2.4 实时定量 PCR (qPCR) 检测 TRIzol 法提取细胞总 RNA; 参照逆转录酶 M-MLV 说明书合成 cDNA; 以 U6 snRNA 为内参照, qPCR 检测 BC002811 的表达水平。BC002811 正向引物序列: 5'-GATGAGAAAGCCAAGTTCCA-3', 反向引物序列: 5'-GGTTGACAATCACTATGGAC-3'; U6 snRNA 正向引物序列: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 反向引物序列: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。qPCR 反应条件为: 95 °C、10 min 预变性; 95 °C、10 s 变性, 60 °C、60 s 退火及延伸, 重复 40 个循环。参照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 BC002811 相对表达水平。

1.2.5 慢病毒感染 HGC-27 细胞 将 HGC-27 细胞接种于 96 孔板, 每孔加入 2×10^4 个细胞, 常规 37 °C、5% CO₂ 培养过夜。以 100 μl 完全培养基稀释的病毒液更换旧培养基, 再加入聚凝胺(终浓度为 6 mg/L), 混匀后继续常规培养。8 h 后, 弃旧培养基, 加入不含聚凝胺的完全培养基。72 h 后, 荧光显微镜观察病毒感染效率。1~2 周后, 可将细胞转至 6 cm 培养皿继续扩大培养, 然后构建 BC002811 稳定表达的细胞系。

1.2.6 稳定表达细胞系的构建 取重组病毒感染的 HGC-27 细胞, 胰酶消化后调整细胞数浓度为 $(5 \sim 6) \times 10^4$ /L, 以 100 μl 细胞悬液/孔接种于 96 孔板。有限稀释法筛选单个细胞并能表达 GFP 的阳性孔, 然后逐级扩大培养^[4]。在此基础上, qPCR 检测 BC002811 表达水平, 进一步验证稳定表达细胞系是否构建成功。

1.2.7 MTS 法检测细胞增殖 取对照组和 BC002811 组的 HGC-27 细胞接种于 96 孔板, 每孔接种 1×10^4 个细胞, 常规培养 1、2、3、4、5 d 后分别加入 10 μl MTS, 继续孵育 4 h, 以酶标仪在 490 nm

波长处测定吸光度(A_{490}) 值。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 16.0 统计软件对实验数据进行统计学分析, 组间均值比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 扩增目的基因片段 以 BC002811 的全基因序列作为模板, 在引物中分别引入 Xho I 和 Not I 的酶切位点, 进行 PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳结果显示, 其 PCR 产物的条带位于 1 500 ~ 2 000 bp (见图 1), 大小与预期相符, 表明已成功获取了 BC002811 目的基因片段。

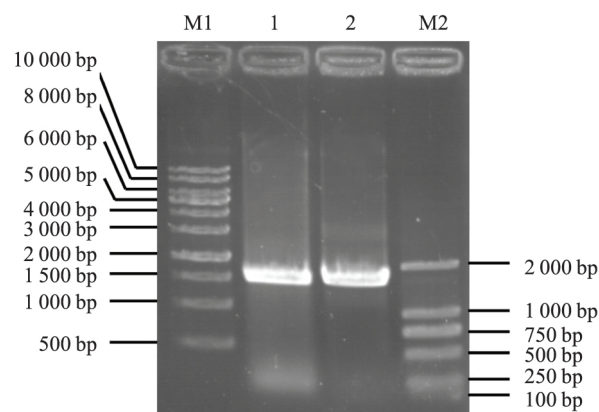


图 1 BC002811 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果

M1: 1 kb DNA 分子量标准; M2: DL2000 DNA 分子量标准; 1、2: BC002811 全基因序列的 PCR 产物

2.2 重组慢病毒质粒的鉴定 重组质粒 pLVX-BC002811-EGFP-IRES-neo 转化大肠杆菌 DH5 α 后, 挑取 4 个阳性克隆分别提取质粒进行 Xho I 和 Not I 双酶切鉴定。结果表明, 2 号和 3 号质粒酶切后均可观察到一条 1 500 ~ 2 000 bp 的目的条带 (见图 2), 电泳结果与理论值 1 686 bp 相符, 初步鉴定质粒正确。因此, 选取 2 号和 3 号重组质粒送测序验证。结果显示, 重组质粒中插入的目的片段与 BC002811 基因序列完全一致, 无碱基突变以及碱基插入、缺失等异常 (见图 3), 表明 BC002811 慢病毒表达载体构建成功。

2.3 慢病毒包装及病毒滴度测定 HEK293T 细胞经慢病毒包装三质粒系统共转染后 48 h, 荧光显微镜下可观察到细胞发出较强的绿色荧光 (见图 4), qPCR 检测显示 BC002811 组质粒在 HEK293T 细胞中的 BC002811 相对表达水平 ($1\,352.94 \pm 84.82$) 较对照组 (1.00 ± 0.05) 显著升高 ($t = 27.61$, 见图 5), 提示 BC002811 重组慢病毒质粒可在 HEK293T

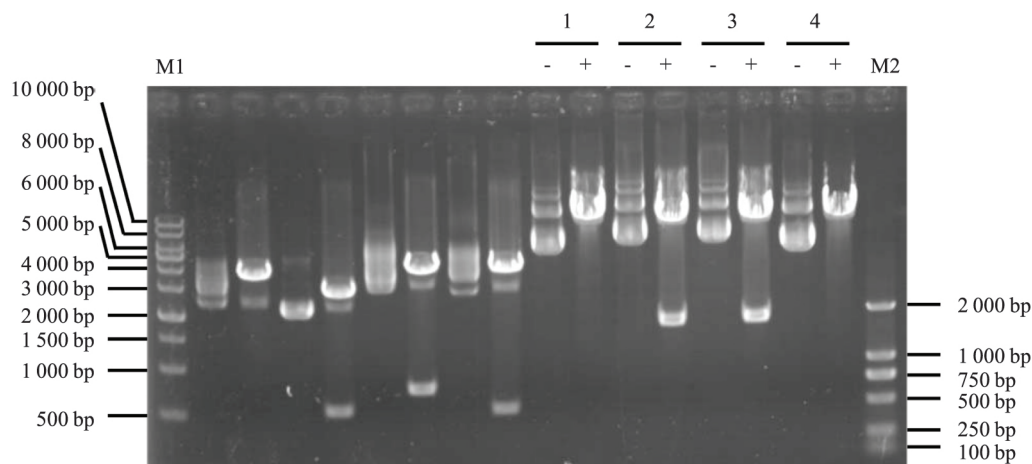


图2 重组质粒的 Xho I 和 Not I 双酶切鉴定

M1: 1 kb DNA 分子量标准; M2: DL2000 DNA 分子量标准; 1、2、3、4: 1 号、2 号、3 号、4 号阳性克隆菌落提取的重组质粒; -: 酶切前的质粒; +: 质粒经 Xho I 和 Not I 双酶切后的产物

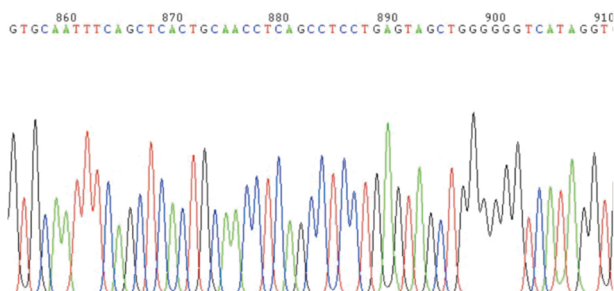
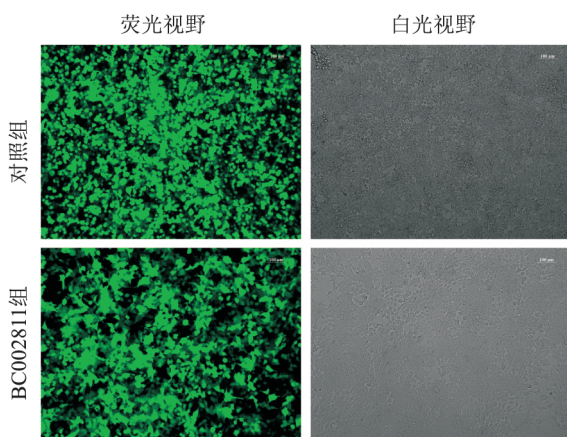


图3 重组慢病毒质粒中 BC002811 插入片段的部分测序图谱

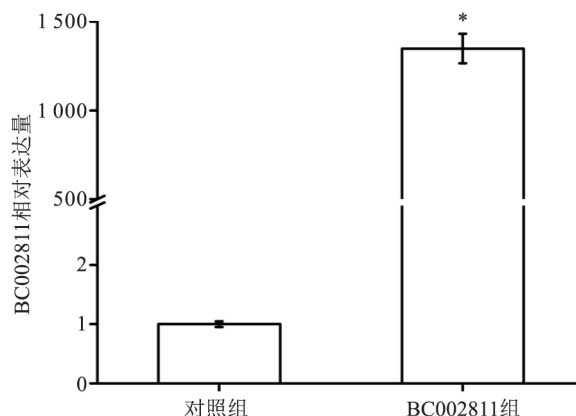
图4 荧光显微镜下观察 HEK293T 细胞 $\times 100$

细胞中实现 BC002811 的高效表达。采用逐孔倍比稀释法测定其病毒滴度为 2.2×10^{11} TU/L, 表明慢病毒已包装成功。

2.4 建立稳定表达 BC002811 的 HGC-27 胃癌细胞系 经有限稀释法筛选, 本项目组得到了稳定表达 BC002811 的单克隆 HGC-27 细胞系。该细胞系

与未经处理的正常 HGC-27 细胞在形态学上无明显的差异, 且能稳定表达绿色荧光(见图 6)。qPCR 结果表明, BC002811 组细胞的 BC002811 相对表达水平 (49.78 ± 4.55) 较对照组 (1.00 ± 0.07) 明显上调 ($t = 18.57$, 见图 7), 提示稳定表达 BC002811 的 HGC-27 胃癌细胞系构建成功。

2.5 稳定表达 BC002811 对 HGC-27 细胞增殖的影响 由图 8 可见, 1、2、3、4、5 d, 对照组细胞所测定的 A_{490} 值分别为 (0.58 ± 0.02)、(0.90 ± 0.02)、(1.35 ± 0.15)、(1.81 ± 0.13)、(2.12 ± 0.17), 而 BC002811 组细胞的 A_{490} 值分别为 (0.66 ± 0.02)、(1.11 ± 0.11)、(1.79 ± 0.14)、(2.54 ± 0.29)、(3.02 ± 0.32), BC002811 组细胞的 A_{490} 值均高于对照组 ($P < 0.05$), 即上调 BC002811 表达可提高 HGC-27 细胞的增殖能力。

图5 qPCR 检测 HEK293T 细胞中 BC002811 的表达水平
与对照组比较: * $P < 0.05$

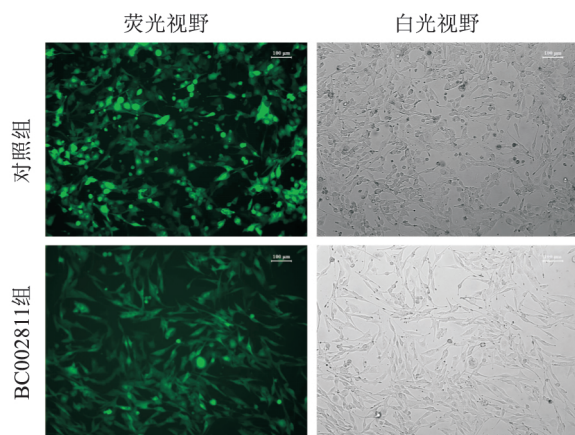


图6 荧光显微镜下观察稳定表达 BC002811 的 HGC-27 胃癌细胞系 ×100

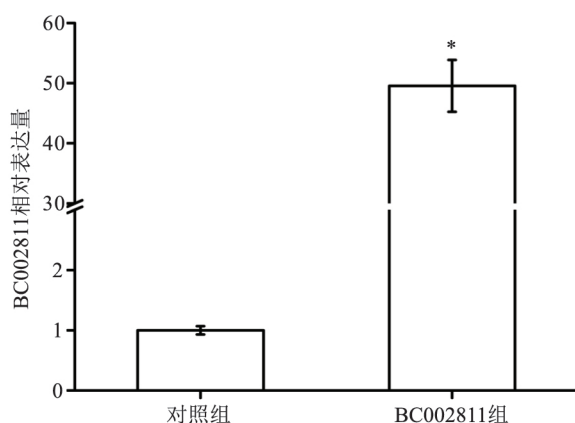


图7 qPCR 检测胃癌 HGC-27 稳定表达细胞系中 BC002811 的表达水平
与对照组比较: * $P < 0.05$

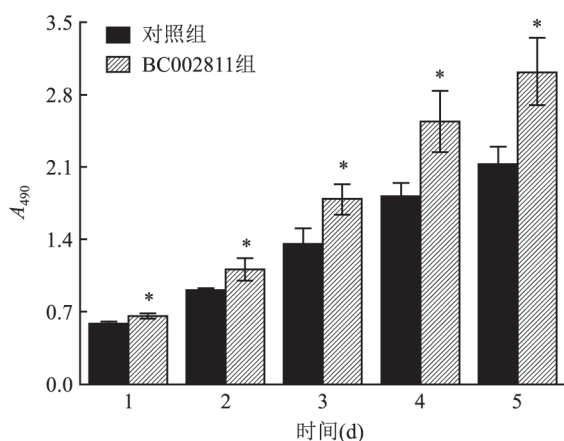


图8 MTS 法检测稳定表达 BC002811 对 HGC-27 细胞增殖的影响
与对照组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

作为一种在非编码 RNA 转录本中片段长度最

大的 RNA 分子, lncRNA 具有基因表达调控的功能。与 miRNA 相比, lncRNA 的序列更长, 携带的遗传信息更为丰富, 核苷酸分子通过折叠形成更为复杂的空间结构, 可提供较大的空间位置与 DNA、mRNA、miRNA 以及蛋白质等多种分子结合, 故其分子调控机制也更加多样化^[3]。lncRNA 与胃癌关系密切, 在胃癌患者组织以及血浆标本中均发现 lncRNA 的表达失调^[4]。H19、HOTAIR、LINC00152、GAS5、MEG3 等多种 lncRNA 具有致癌或抑癌活性, 在胃癌发生、发展过程均具有重要作用^[2,4]。但目前对于 lncRNA 在胃癌中的作用及其分子机制的研究还比较少。由于基因组中 lncRNA 的数量庞大、调控方式多样, 因此绝大多数与胃癌相关的 lncRNA 其功能和作用机制仍不清楚, 有待进一步研究。既往本项目组应用 lncRNA 芯片技术对胃癌患者的 lncRNA 表达谱进行了探讨, 发现 lncRNA BC002811 在胃癌组织中呈明显的表达上调^[5]。BC002811 是一种片段长度为 1 686 bp 的 lncRNA, 其基因在染色体上定位于 17q25.1。近来的研究表明, BC002811 表达水平与胃癌淋巴结转移及微血管密度呈正相关^[6]。但目前尚无相关研究报道慢病毒所介导的 BC002811 过表达效应及其对胃癌细胞生物学行为的影响。

慢病毒是在人类免疫缺陷 I 型 (HIV-I) 病毒基础上改造而成的一类病毒载体, 属于逆转录病毒科; 其可将自身的病毒 RNA 通过逆转录转变为 DNA, 然后整合到宿主细胞染色体, 从而实现目的基因在宿主细胞内长期而稳定地表达^[7]。与质粒以及腺病毒等其他病毒载体相比, 慢病毒可感染分裂期及非分裂期细胞, 具有感染效率高、转移基因片段容量大 (可容纳 10 kb 左右的外源基因)、免疫原性弱和细胞毒性低等诸多优点, 是携带目的基因的理想载体^[8]。为此, 本研究选用慢病毒作为载体来携带 BC002811 基因, 以实现 BC002811 在胃癌细胞内持续稳定地表达。HGC-27 细胞来源于未分化胃腺癌组织, 可分泌黏液素, 恶性程度高, 具有较强的体外增殖活性以及高侵袭、高转移能力, 是研究胃癌很好的细胞模型^[9]。因此, 本项目组选择 HGC-27 细胞作为慢病毒感染的受体细胞来筛选稳定表达 BC002811 的细胞系。

最近, 本项目组的研究发现, 通过慢病毒所介导的 BC002811 shRNA 载体靶向干扰 BC002811 表达, 可抑制胃癌 SGC-7901 细胞增殖; 提示 BC002811 具有潜在的促进胃癌细胞增殖的功能^[10]。为了验证这一结果, 本项目组应用慢病毒所介导的基因过表

达技术在另一胃癌细胞系 HGC-27 中观察了 BC002811 对细胞增殖的影响。结果表明, BC002811 过表达可提高 HGC-27 细胞的增殖活性, 与上述研究结果相符。

综上所述, 本研究成功构建了 BC002811 的重组慢病毒载体, 并建立了 BC002811 稳定表达的 HGC-27 胃癌细胞系。BC002811 过表达后, HGC-27 细胞的增殖能力增强。因此, 本研究为后续进一步探讨 BC002811 在胃癌中的生物学功能及其作用机制奠定了基础。

参考文献

- [1] 路畅, 黄银花. 动物长链非编码 RNA 研究进展 [J]. 遗传, 2017, 39(11): 1054-65.
- [2] Yu H, Rong L. Emerging role of long non-coding RNA in the development of gastric cancer [J]. World J Gastrointest Oncol, 2018, 10(9): 260-70.
- [3] Lin X C, Zhu Y, Chen W B, et al. Integrated analysis of long non-coding RNAs and mRNA expression profiles reveals the potential role of lncRNAs in gastric cancer pathogenesis [J]. Int J Oncol, 2014, 45(2): 619-28.
- [4] 李健, 胡后立, 徐凌, 等. 慢病毒 shRNA 靶向干扰 RegIV 基因胰腺癌细胞株的构建 [J]. 复旦学报(医学版), 2016, 43(2): 147-53.
- [5] 荆玉明, 罗杰, 张艳玲, 等. p38 丝裂原激活蛋白激酶基因重组慢病毒载体的构建及其在建立人前列腺癌稳定细胞株中的应用 [J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(3): 317-21.
- [6] Fang X Y, Pan H F, Leng R X, et al. Long noncoding RNAs: novel insights into gastric cancer [J]. Cancer Lett, 2015, 356(2 Pt B): 357-66.
- [7] 杨襄蓉, 魏春山, 刘婵, 等. 胃癌中 lncRNA BC002811 表达与微血管密度和淋巴结转移的关系及其临床意义 [J]. 实用癌症杂志, 2017, 32(5): 706-9.
- [8] 陈彩云, 刘亚京, 牛忠英. 慢病毒载体的研究进展及应用 [J]. 口腔颌面修复学杂志, 2012, 13(2): 117-20.
- [9] 孟凡荣, 陈琛, 万海粟, 等. 慢病毒载体及其研究进展 [J]. 中国肺癌杂志, 2014, 17(12): 870-6.
- [10] 贺雄辉, 邹科见, 叶木林, 等. 胃癌细胞 HGC-27 与 SGC-7901 中基质金属蛋白酶基因表达水平和细胞迁移能力比较 [J]. 山东医药, 2018, 58(2): 28-30.
- [11] 林小聪, 陈小谊, 余华军, 等. 稳定靶向干扰长链非编码 RNA BC002811 胃癌 SGC-7901 细胞株的构建 [J]. 医学研究生学报, 2019, 32(4): 364-8.

Construction of lncRNA BC002811 lentiviral vector and its effect on proliferation of gastric cancer cells

Fu Weiyu, Lin Xiaocong, Chen Xiaoyi, et al

(Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023)

Abstract Objective To construct a lentiviral vector of long non-coding RNA (lncRNA) BC002811 and investigate the effect of stable BC002811 up-regulation on proliferation of gastric cancer HGC-27 cells. **Methods** BC002811 gene sequence was amplified by PCR, and was ligated with the pLVX-EGFP-IRES-neo vector. After being identified by double enzyme digestion and sequencing analysis, the recombinant vector was co-transfected into HEK293T cell line with packaging plasmids to produce the lentiviral particles. Lentivirus was used to infect HGC-27 cells, and the cells with stably expressing BC002811 after selection with limiting dilution analysis were amplified and cultured. The expression level of BC002811 was detected by qPCR, and the cell proliferation capacity was determined by MTS. **Results** The BC002811 recombinant lentivirus plasmid was successfully constructed, which was confirmed by double enzyme digestion and DNA sequencing. The recombinant lentiviral vector was packaged in HEK293T cells and the titer of concentrated virus was 2.2×10^{11} TU/L. HGC-27 cells infected with the lentivirus, the expression level of BC002811 was enhanced significantly ($P < 0.05$). MTS assay results showed that the proliferation ability of HGC-27 cells in the BC002811 group was increased as compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The BC002811 recombinant lentiviral vector was successfully constructed, which could stably transfect HGC-27 cells to yield sustained over-expression of BC002811 and promoted cell proliferation.

Key words gastric cancer; long non-coding RNA; lentivirus; proliferation