

网络出版时间: 2019-9-19 10:05 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190917.1059.023.html>

IL28RA 真核表达载体的构建 和对 HaCaT 细胞迁移能力的影响

尹雪莉^{1,2}, 张胜权³, 张学军¹

摘要 目的 构建白介素 28 受体 α (IL28RA) 基因的真核表达载体,并转染 HaCaT 细胞,观察该基因对 HaCaT 细胞迁移能力的影响。方法 从 HepG2 细胞中提取总 RNA,逆转录后以其 cDNA 为模板 PCR 扩增 IL28RA 编码片段。将其插入质粒 pCMV6 构建 pCMV6-IL28RA 重组表达体;重组体经酶切分析及测序鉴定,将其转染至 HaCaT 细胞中,经 G418 筛选出稳定过表达 IL28RA 细胞株。为检测转染效率,反转录实时荧光定量多聚核苷酸链式反应 (RT-qPCR) 分析转染细胞中 IL28RA mRNA 相对表达水平。伤口愈合实验检测过表达 IL28RA 对 HaCaT 细胞迁移能力的影响。结果 IL28RA 基因成功构建并在 HaCaT 中表达,RT-qPCR 检测转染效率显示与对照细胞相比,过表达细胞中 IL28RA mRNA 相对表达水平显著升高。细胞伤口愈合实验检测显示与对照细胞相比,IL28RA 过表达抑制 HaCaT 细胞迁移能力。结论 IL28RA 基因过表达降低 HaCaT 细胞迁移能力。

关键词 IL28RA; 基因重组; HaCaT; 迁移

中图分类号 R 758.63

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)11-1776-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.11.023

银屑病 (psoriasis, Pso) 确切的病因和发病机制至今仍未完全阐明,是皮肤科领域亟待解决的难题之一^[1-3]。全基因组关联分析研究 (genome-wide association study, GWAS) 成为发现复杂疾病易感基因最常用的方法之一。GWAS 发现大量 Pso 易感基因,其中具有免疫功能的白介素 28 受体 α (IL-28 receptor α , IL28RA) 基因为中国汉族人 Pso 和系统性红斑狼疮共有易感基因,也是欧洲人群 Pso 的易感基因^[6-7]。IL28RA 在正常皮肤组织呈中度表达,在原代角质形成细胞和永生 HaCaT 角质形成细胞中

高表达^[8-9]。既然 IL28RA 是 Pso 易感基因,因此,IL28RA 基因可能在 Pso 发生发展中扮演很重要的角色。该研究通过构建 pCMV6-IL28RA 重组体并转染 HaCaT 细胞,建立 IL28RA 过表达细胞模型进而观察 IL28RA 对 HaCaT 细胞迁移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、质粒和细菌 pCMV6 质粒 (cat. no. PS100001) 购自美国 OriGene 公司; *E. coli* DH5 α 感受态细菌由本实验室保存; HaCaT 细胞购自中科院上海细胞库。

1.1.2 主要试剂 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自美国 Promega 公司; Lipofectamine 3000 Transfection Reagent 购自美国 Invitrogen 公司; 限制性内切核酸酶 Hind III、Xho I、T4 连接酶、Trizol 试剂、逆转录试剂盒、DNA Marker、SYBR Premix Ex Taq 试剂盒购自日本 Takara 公司; PCR 引物及 RT-qPCR 引物由上海生工生物公司合成; G418 购自美国 Sigma 公司; DMEM 培养基、胰酶和胎牛血清购自美国 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计和 HepG2 细胞培养及总 RNA 提取 根据 NCBI Genbank 序列提供的人 IL28RA mRNA 序列利用 premier 5.0 软件设计引物,上游引物: AGAATGTGACGCTGCTCTCC; 下游引物: GCCG-GCTCCACTTCAAAAAG。HepG2 细胞培养及总 RNA 提取: 复苏 HepG2 细胞,将细胞置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中用含 10% 胎牛血清和 1% 的青霉素、链霉素双抗培养基培养,待其融合 80%,弃培养基用 2 ml PBS 洗 3 次后加入 1 ml Trizol 试剂,放置于冰上裂解,提取细胞总 RNA。

1.2.2 总 RNA 逆转录成 cDNA 和 PCR 扩增 IL28RA 利用逆转录试剂盒将上步总 RNA 逆转录成 cDNA。该方法分 2 步: ① 逆转录加入 0.5 μ l Oligo dT Primer, 0.5 μ l dNTP Mixture, 4 μ l RNA, 无 RNase 水 4 μ l, 70 °C 15 min 并迅速放置于冰上; ② 上述变性反应液中加入 5 $\times$ PrimeScript Buffer 2 μ l,

2019-07-16 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81130031)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院皮肤科,合肥 230022

²安徽医科大学机能实验中心,合肥 230032

³安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室,合肥 230032

作者简介: 尹雪莉,女,博士研究生;

张学军,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: ayzxj@vip.sina.com

RNase Inhibitor 0.25 μl , PrimeScript RTase 0.5 μl , 无 RNase 水 2.15 μl 。点动离心, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 、60 min, 70 $^{\circ}\text{C}$ 、15 min。待反应结束后将其放置在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。PCR 扩增 IL28RA: 依次加入 2 μl cDNA, 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μl , 0.5 μl 上游引物, 0.5 μl 下游引物, MgCl_2 1.5 μl , 2.5 μl dNTP Mixture, TaqDNA Polymerase 1 μl , 14.5 μl 去离子水。94 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 40 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、2 min, 进行 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳并利用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物。

1.2.3 真核表达载体构建 分别用限制性内切酶 Hind III、Xho I 将 IL28RA 的 PCR 片段和质粒 pCMV6 进行双酶切, 纯化回收、连接。琼脂糖凝胶电泳检测酶切实验结果并进行胶回收。回收的酶切产物按质粒 pCMV6 和 IL28RA PCR 产物 1:8 的比例加入 T4 连接酶体系, 在 15 $^{\circ}\text{C}$ 条件下连接过夜。将连接产物转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细菌中, 并涂布在固体 LB 平板(25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 卡那霉素)上生长, 观察平板菌落并挑取单克隆菌落接种于 LB 液体培养基中进行 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡过夜, 用基因组 DNA 提取试剂盒提取质粒 pCMV6-IL28RA, 并酶切, 电泳鉴定和采取 1.5 ml 细菌培养物送至上海生工生物公司测序。

1.2.4 重组质粒转染 HaCaT 细胞 待 HaCaT 细胞生长良好时, 将其种入 24 孔板, 每孔 1×10^5 个细胞。待其融合 80% 时先换成无抗生素无血清的 DMEM 并利用 LipofectamineTM 3000 Transfection Reagent 分别将对照 pCMV6 和重组 IL28RA 质粒转染 HaCaT 细胞, 6 h 后换成完全 DMEM 培养基。48 h 后加入终浓度为 400 ng/ml 的 G418 进行筛选, 每 2 d 换 1 次培养基, 4 周后可观察到空白对照组细胞全部死亡, 而转染对照质粒组、过表达组细胞瓶中仍有细胞存在, 说明稳定转染成功。细胞培养瓶中维持 400 ng/ml G418 培养转染成功的细胞。

1.2.5 RT-qPCR 法检测 IL28RA mRNA 相对表达水平 将 HaCaT 未转染细胞、转染对照质粒 pCMV6 和过表达质粒 pCMV6-IL28RA 的细胞分别接种 24 孔板(细胞接种密度为 1×10^5), 当细胞融合 70%~80% 时, 用 Trizol 试剂提取每种细胞总 RNA 测定总 RNA 浓度, 根据 RT-qPCR 说明书进行检测, 甘油醛磷酸脱氢酶(GAPDH)(上游引物: AGATCATCAG-CAATGCCTCCTG, 下游引物: ATGGCATGGACTGTG-GTCATG)作为内参对照。反应体系为 20 μl : 2 $\times$ SYBR Mix 10 μl , DEPC H₂O 8 μl , cDNA 1 μl , 上下

游引物分别各 0.5 μl 。于 7500 qPCR 系统: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min、95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 进行两组间 IL28RA mRNA 相对表达量计算。

1.2.6 伤口愈合法检测 IL28RA 对 HaCaT 细胞迁移能力影响 将 HaCaT 未转染细胞、转染对照质粒 pCMV6 细胞和过表达 pCMV6-IL28RA 的细胞分别种于 12 孔培养板中以 5000 细胞/ml 铺板两块。孵育细胞 24 h, 使用 10 μl 无菌移液管尖进行划痕, 产生汇合单层伤口, 形成伤口后分别在 0 h 和 48 h 拍摄照片。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 15.0 进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组均数比较采用单因素方差分析, 组间数据比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL28RA 基因编码序列的获得 从 HepG2 细胞中提取 RNA 进行逆转录, 然后利用引物扩增出 IL28RA 的编码序列, 全长 1 563 bp, 见图 1A。

2.2 IL28RA 真核表达载体的构建及鉴定 获取 IL28RA 基因全长后, 经酶切、连接、转化。挑取单克隆菌落进行 PCR 及扩大培养后进行酶切并测序。酶切质粒得到 5 000 bp 左右 pCMV6 条带及 1 563 bp 左右的 IL28RA 条带, 见图 1B。经 NCBI blast 比对证明质粒测序结果正确, 见图 1C。

2.3 RT-qPCR 法分析转染后 IL28RA mRNA 在 HaCaT 中表达情况及分析其对 HaCaT 细胞迁移能力影响 将未转染 HaCaT 细胞、转染对照质粒 pCMV6 细胞和过表达 pCMV6-IL28RA 的细胞接种 12 孔板, 至 90% 融合时, 收集细胞并提取细胞 RNA, 结果显示与对照组 pCMV6 相比, 过表达组 IL28RA mRNA 相对表达水平(0.7517 ± 0.0507) 高于 pCMV6 对照组(4.4420 ± 0.6211), 差异有统计学意义($t = 4.032, P < 0.05$)。细胞伤口愈合实验表明, 过表达 IL28RA 组(68.5433 ± 3.9461) 48 h 细胞迁移未愈合面积百分比大于 pCMV6 组(42.7867 ± 2.0497) 和 HaCaT 组(50.9133 ± 2.4136), 差异有统计学意义($F = 79.01, P < 0.01$), 同时也表明 IL28RA 基因过表达使得 HaCaT 细胞迁移减慢。见图 2。

3 讨论

Pso 是一种以表皮角质形成细胞过度增殖为特

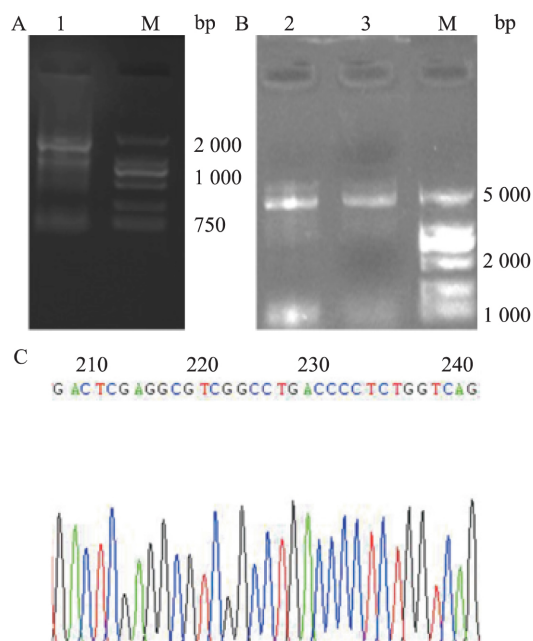


图1 IL28RA 基因的扩增及重组质粒构建与鉴定

A: IL28RA 基因 PCR 扩增图; B: IL28RA 基因重组质粒酶切鉴定图; C: 重组质粒部分测序结果; M: DNA Marker; 1: IL28RA 基因全长 PCR 产物; 2: 双酶切 IL28RA 重组质粒; 3: 双酶切 pCMV6 质粒

征的慢性炎症性皮肤病,影响世界总人口数 2% 左右^[14]。GWAS 发现 IL28RA 是中国汉族人 Pso 易感基因,但该基因在 Pso 中发病机制尚不明确^[15]。IL28RA 基因的蛋白质产物属于 II 类细胞因子受体

家族^[11]。人类 IL28RA 在膀胱癌、白血病、乳腺癌、头颈癌和肺癌组织等中表达,在人类的免疫系统呈中度表达^[8]。Meta 分析 IL28RA 基因在癌症的预后价值,研究^[12]显示 IL28RA 在癌症中表达越低,患者预后越差。IL-29、IL-28A、IL-28B 结合到该受体上,能诱导构象变化促使其与另一个受体 IL10R2 形成受体配体复合物,激活激酶/信号转导与转录因子信号通路,发挥干扰素 λ 抗病毒、抗增殖功效^[9]。Dumontier et al^[13] 研究显示 IL-29 抗增殖及抗病毒作用取决于 IL28RA 酪氨酸 343 和 517 两个位点,当受体两位点处酪氨酸突变为苯丙氨酸,IL-29 抗增殖及抗病毒作用消失。因此,IL28RA 在 IL-29 抗病毒和抗增殖中起着决定性作用。由此可见,IL28RA 可能对细胞的功能有重要的调控作用(如增殖、分化、凋亡等),还可能参与机体的免疫活动调节。

本研究旨在通过构建 IL28RA 基因真核表达载体,转染使其在人永生皮肤角质形成细胞 HaCaT 中过表达,观察过表达 IL28RA 基因对 HaCaT 细胞迁移能力影响。首先利用基因重组技术将 IL28RA 基因编码区插入质粒 pCMV6 中,并用 RT-qPCR 检测转染后 IL28RA 基因在 HaCaT 细胞中的 mRNA 相对表达量,结果显示过表达 IL28RA 成功转染 HaCaT 细胞;随后用细胞伤口愈合实验检测 IL28RA 基因过表达对细胞迁移的影响,结果发现过表达 IL28RA

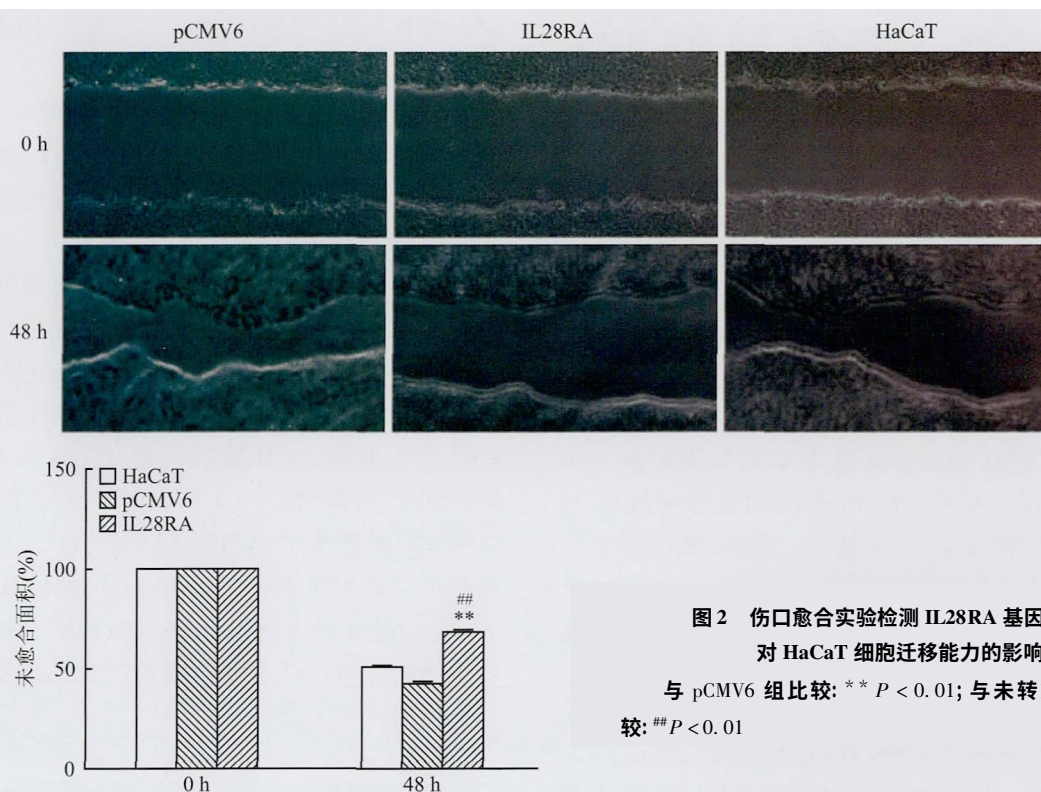


图2 伤口愈合实验检测 IL28RA 基因过表达对 HaCaT 细胞迁移能力的影响

与 pCMV6 组比较: ** $P < 0.01$; 与未转染 HaCaT 组比较: ## $P < 0.01$

细胞,48 h 后细胞迁移未愈合面积百分比大于 pC-MV6 组和 HaCaT 组即与对照细胞相比,过表达 IL28RA 能抑制 HaCaT 细胞迁移。本研究中 IL28RA 作为细胞膜上受体,需要相应的配体刺激(如 IL-29)进而发挥其功能。然而在伤口愈合实验中,加入终浓度为 100 ng/ml IL-29 处理细胞,同时增加 IL-29 浓度和作用时间(图 2),但是 IL-29 加入并未改变 IL28RA 对伤口愈合面积的影响,其中具体机制还需要进一步研究。本研究为进一步探讨 IL28RA 生物学功能及其在 PsO 中发病机制研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 张学军,何春涛,陆洪光. 皮肤性病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社,2008: 141-4.
- [2] Boehncke W H, Schön M P. Psoriasis [J]. *Lancet*, 2015, 386(9997): 983-94.
- [3] Nestle F O, Kaplan D H, Barker J. Psoriasis [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(5): 496-509.
- [4] Schön M P, Boehncke W H. Psoriasis [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(18): 1899-912.
- [5] Griffiths C E, Barker J N. Pathogenesis and clinical features of psoriasis [J]. *Lancet*, 2007, 370(9583): 263-71.
- [6] Strange A, Capon F, Spencer C C, et al. A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1 [J]. *Nat Genet*, 2010, 42(11): 985-90.
- [7] Li Y, Cheng H, Zuo X B, et al. Association analyses identifying two common susceptibility loci shared by psoriasis and systemic lupus erythematosus in the Chinese Han population [J]. *J Med Genet*, 2013, 50(12): 812-8.
- [8] Witte K, Gruetz G, Volk H D, et al. Despite IFN- λ receptor expression, blood immune cells, but not keratinocytes or melanocytes, have an impaired response to type III interferons: implications for therapeutic applications of these cytokines [J]. *Genes Immun*, 2009, 10(8): 702-14.
- [9] Maher S G, Sheikh F, Scarzello A J, et al. IFN- α and IFN- λ differ in their antiproliferative effects and duration of JAK/STAT signaling activity [J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7(7): 1109-115.
- [10] Lowes M A, Bowcock A M, Krueger J G. Pathogenesis and therapy of psoriasis [J]. *Nature*, 2007, 445(7130): 866-73.
- [11] Kotenko S V, Gallagher G, Baurin V V, et al. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(1): 69-77.
- [12] Yang L, Luo Y, Wei J, et al. Integrative genomic analyses on IL28RA, the common receptor of interferon-lambda1, -lambda2 and -lambda3 [J]. *Int J Mol Med*, 2010, 25(5): 807-12.
- [13] Dumoutier L, Tounsi A, Michiels T, et al. Role of the interleukin (IL) -28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon-lambda I: similarities with type I interferon signaling [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(31): 32269-74.

Construction of eukaryotic expression vector of IL28RA gene and its effects on the migration ability of HaCaT cells

Yin Xueli^{1,2}, Zhang Shengquan³, Zhang Xuejun¹

(¹Dept of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022; ²Functional Center, Anhui Medical University, Hefei 230032; ³Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To construct an eukaryotic expression vector of interleukin 28 receptor α (IL28RA) and then transfect it into HaCaT cells to examine its effect on the migration ability of HaCaT cells. **Methods** Total RNA was extracted from HepG2 cells and CDS of human IL28RA gene was amplified by PCR with HepG2's cDNA as the template. The recombinant expression vector of pCMV6-IL28RA was constructed by inserting the CDS of IL28RA into pCMV6 plasmid. After identification by restriction enzyme digestion and sequencing, the recombinant was transfected into HaCaT cells and screened by G418 to get overexpressed cells. To testify the efficacy of transfection, the relative expression mRNA level of IL28RA gene was detected by RT-qPCR. The effect of IL28RA on the migration ability of HaCaT cells was detected by wound healing. **Results** The eukaryotic expression vector of pCMV6-IL28RA was constructed successfully and expressed in HaCaT cells. The relative expression level of IL28RA in transfected HaCaT cells was significantly higher than the control cells examining by RT-qPCR. Meanwhile, compared with the control cells, overexpression of IL28RA inhibiting the migration ability of HaCaT cells was detected by wound healing assay. **Conclusion** Overexpression of IL28RA can decrease the migration ability of HaCaT cells. **Key words** IL28RA; recombination; HaCaT; migration