

网络出版时间: 2019-8-12 17:30 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190812.1006.002.html>

慢病毒介导 shRNA 沉默大鼠肝 BRL-3A 细胞 PDZK1 对胆管侧膜 Bsep 表达的影响

杨方方¹, 刘萍², 程静², 彭偲偲², 雷亮², 吴涛², 宋红萍^{1,2}

摘要 目的 构建大鼠 PDZK1 基因 RNA 干扰慢病毒载体, 并观测其对大鼠 BRL-3A 细胞 PDZK1 的基因沉默效应与对胆管侧膜胆盐输出泵 (Bsep) 的影响。**方法** 针对大鼠 PDZK1 基因序列, 筛选 3 个干扰靶点, 合成其 3 对小干扰 RNA, 将各对 siRNA 分别转入 BRL-3A 细胞, 采用 PCR 和 Western blot 方法从中筛选出最佳 siRNA; 设计合成针对最佳 siRNA 序列的 shRNA, 与载体 LV3 (H1/GFP&Puro) 连接, 共转染 293T 细胞, 包装成介导 PDZK1 基因沉默的 LV3/PDZK1 shRNA 慢病毒载体; 感染 BRL-3A 细胞, 荧光显微镜下观察经感染的 BRL-3A 细胞的 GFP 表达情况, 在 mRNA 和蛋白水平检测重组慢病毒 LV3/PDZK1 shRNA 对 BRL-3A 细胞的 PDZK1 基因的沉默效应及对 Bsep 的影响。**结果** 筛选到 PDZK1 基因的最佳干扰靶序列。经酶切与测序结果证实, 构建 LV3/PDZK1 shRNA 慢病毒载体成功。BRL-3A 细胞经 LV3/PDZK1 shRNA 慢病毒感染 48 h 后, PCR 检测 PDZK1 基因表达极低, Bsep 表达较弱; WB 检测显示 PDZK1、Bsep 蛋白表达均极弱。**结论** 成功构建大鼠 PDZK1 基因 RNA 干扰慢病毒载体, 该载体能有效沉默 BRL3A 细胞的 PDZK1 基因, 并抑制胆管侧膜 Bsep 表达。

关键词 PDZK1; 胆盐输出泵; RNA 干扰; 慢病毒载体; BRL-3A

中图分类号 R 966

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)09-1338-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.09.002

2019-03-28 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81503146)

作者单位: ¹ 湖北中医药大学药学院, 武汉 430065

² 武汉市第四医院, 华中科技大学同济医学院附属普爱医院药学部, 武汉 430000

作者简介: 杨方方, 硕士研究生;

吴涛, 男, 博士, 副主任药师, 责任作者, E-mail: hydrinsk@sina.com;

宋红萍, 女, 主任药师, 责任作者, E-mail: goodgravity@foxmail.com

phorylation of JNK, ERK and AKT was reduced following TNC genes disruption in SGC7901 cells. ITGB7 was found to be decreased significantly in both mRNA and protein level in SGC7901^{TNC-/-} cells. **Conclusion** TNC is highly expressed in gastric cancer, particularly in SGC7901 cells and plays a necessary role in anchorage-independent growth of SGC7901 cells possibly via ITGB7 mediated signaling pathways.

Key words Tenascin-C; ITGB7; anchorage-independent growth

肝细胞依靠细胞膜上的药物转运体实现摄取和分泌胆汁的功能。在病理状态下, 肝细胞药物转运体发生显著改变, 参与诱导胆汁淤积性肝病发生^[1]。胆管侧膜 ABC 转运体(ATP-binding cassette transporter, ABC transporter) 表达异常、功能下降是胆汁淤积性肝病的重要分子基础^[2]。PDZK1 (NHERF3) 蛋白能够调控多种药物转运体的表达和功能^[3]。近年来发现, PDZK1 表达抑制或者缺失, 可以导致其靶蛋白(转运体)的亚细胞定位异常、表达和功能下降。该研究筛选 PDZK1 基因的 RNA 最佳干扰靶点, 构建其慢病毒干扰载体 LV3/PDZK1 shRNA, 体外检测慢病毒介导的 shRNA 对 BRL-3A 细胞 PDZK1 的沉默效应及对胆管侧膜胆盐输出泵 (Bsep) 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 BRL-3A 细胞株购自 ATCC; 3 个干扰靶点寡核苷酸序列及其对照序列的合成由武汉塞维尔生物提供; 质粒抽提试剂盒购自 Roche 公司; 限制性内切酶、DNA 内切酶、DNA 连接酶和 Taq 聚合酶购自加拿大 MBI Fermentas; 中量抽提试剂盒购自杭州爱思进生物技术有限公司; 凝胶回收试剂盒购自北京天根生化公司; LV3 (H1/GFP&Puro) 慢病毒载体购自上海吉玛公司; Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司; PDZK1、Bsep 抗体购自英国 Abcam 公司; 最佳干扰靶点 DNA oligo 使用 Designer 3.0 (Genepharma) 软件进行设计, 合成引物由苏州吉玛基因提供。

1.2 方法

1.2.1 PDZK1 最佳 siRNA 靶点的设计与筛选 分

别针对 3 个靶点设计干扰大鼠 PDZK1 的 siRNA 序列(914、797、1 075);以 5×10^4 个细胞/孔的细胞密度接种 BRL-3A 细胞在 6 孔板中,24 h 后,分别以 3 对 siRNA 转染细胞 6 h 后换液,48 h 后采用 RT-PCR 和 Western blot 方法检测 PDZK1 表达,筛选出最佳的 RNA 干扰靶点。大鼠 PDZK1 引物序列 F: 5'-CTACGGTTCTATCTGAGGGCG-3', R: 5'-AGGCAG TTCTTGACTTGGCAG-3'; Bsep 引物序列 F: 5'-CC CTCATACGGAATCCAAGA-3', R: 5'-GGCGATGGG CAACTGAGAT-3'; β -actin 引物序列 F: 5'-TGCTATG TTGCCCTAGACTTCG-3', R: 5'-GTTGGCATAGAG-GTC TTTACGG-3'。

1.2.2 PDZK1 shRNA 慢病毒载体的构建与鉴定 设计并合成针对最佳 siRNA 的 shRNA 靶序列; LV3-shRNA 模板中的 loop 结构选用了 TTCAAGAGA 以避免形成终止信号; 正义链模板的 5' 端添加了 GATCC, 与 BamH I 酶切后形成的粘端互补; 反义链模板的 5' 端添加了 AATTC, 与 EcoR I 酶切后形成的粘端互补。正义链: 5'-GATCC-(GN18)-(TTCAAGAGA)-(N18C)-TTTTTTG-3'; 反义链: 3'-G(CN18)-(AAGTTCTCT)-(N18G)-AAAAAACTTAA-5'; 退火, 将合成的 DNA 片段与带有绿色荧光蛋白(GFP)的载体 LV3(H1/GFP&Puro)质粒连接, 构建重组慢病毒载体 LV3/PDZK1 shRNA, 随即转入感受态的大肠杆菌; 将转化的大肠杆菌接种到含 Apm 抗性 LB 琼脂培养基, 培养 16 h, 挑取阳性克隆抽提质粒, 进行酶切筛选, 测序进一步鉴定。测序正确的菌株采用高纯度质粒中量抽提试剂盒抽提质粒。

1.2.3 PDZK1 shRNA 慢病毒包装及滴度测定 测序通过的质粒与 pHelper 1.0 载体、pHelper 2.0 载体共转染进 293T 慢病毒包装细胞,于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱内培养 48 h 后收集 293T 细胞上清液, 离心获得病毒浓缩液, 分装后置 -70 °C 冰箱中保存。采用倍比稀释法测定重组慢病毒滴度。取对数生长期 293T 细胞, 以 2×10^3 个细胞/孔接种至 96 孔板, 分 8 组, 每组设 3 个复孔, 每孔加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基 100 μl, 置 37 °C、5% CO₂ 孵箱下培养 24 h。准备 8 个无菌的 EP 管, 每管中加入 90 μl 的无血清培养基, 取待测病毒原液 10 μl 加入第 1 个管中, 混匀后, 取 10 μl 加入第 2 个管中, 以此操作直至最后一管。选取对应细胞孔, 弃掉 90 μl 培养基, 加入 90 μl 稀释好的病毒溶液, 于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱培养。各组加入病毒原液相当于 10、1、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} μl; 24 h 后补足完全

培养基至 200 μl; 48 ~ 72 h 后, 观察绿色荧光表达情况。病毒滴度为每孔 GFP 阳性细胞数/病毒原液量。

1.2.4 BRL-3A 细胞的 LV3/PDZK1 shRNA 重组慢病毒感染 转染前 1 d, 取 $(2 \sim 3) \times 10^5$ 个细胞/孔的 BRL-3A 细胞接种在 6 孔板上, 培养 24 h 后将原有培养基弃去, 加入 2 ml 的细胞完全培养基; 置于 5% CO₂ 的培养箱中, 于 37 °C 培养至细胞汇合达到 40% ~ 60%; 细胞换液, 将病毒液与终浓度 5 μg/ml polybrene 加入新鲜培养基中, 经空病毒感染或未感染的 BRL-3A 细胞作为对照; 8 ~ 12 h 后观察细胞状态, 若细胞状态无明显病变, 继续培养, 24 h 后更换新鲜培养基。BRL-3A 细胞选用 MOI = 20 进行病毒转染, 病毒用量(μl) = (细胞数 × MOI 值/病毒原液滴度) × 10³; 24 ~ 48 h 观察 GFP 的表达情况并拍照。

1.2.5 LV3/PDZK1 shRNA 慢病毒对 BRL-3A 细胞 PDZK1 和胆管侧膜 Bsep 基因表达的影响 收集经慢病毒感染 48 h 的 BRL-3A 细胞, 使用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA, 采用 RT-PCR 法检测 PDZK1、Bsep 基因的 mRNA 表达水平, 以空病毒感染的 BRL-3A 细胞的同样检测作为对照, 以 β -actin 基因作为内参。大鼠 PDZK1、Bsep 特异检测引物见 1.2.1。

1.2.6 LV3/PDZK1 shRNA 慢病毒对 BRL-3A 细胞 PDZK1 和胆管侧膜 Bsep 蛋白表达的影响 采用 Western blot 法将经慢病毒感染 48 h 的 BRL-3A 细胞总蛋白以及膜蛋白分别提取、转移至硝酸纤维膜, 再浸于含 PDZK1 一抗(1 : 500)与 Bsep 一抗(1 : 500)的封闭液中, 4 °C 过夜; 加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1 : 3 000), 室温孵育 0.5 h, 用 TBST 在室温下脱色摇床上洗 3 次, 每次 5 min; 随后与混合好的 ECL 溶液结合 1 ~ 2 min, 显色拍照, 以 β -actin 作为内参。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多个样本间均数比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PDZK1 最佳 siRNA 靶点的筛选 采用 RT-PCR 法和 Western blot 方法从 3 对 siRNA 中筛选出最佳 RNA 干扰序列(表 1、图 1), 结果选定 Pdzk1-rat-914 对应的序列进行病毒包装。

2.2 PDZK1 shRNA 慢病毒载体的构建与鉴定 重组慢病毒载体 LV3/PDZK1 shRNA 经限制性酶切

表1 siRNA 序列信息

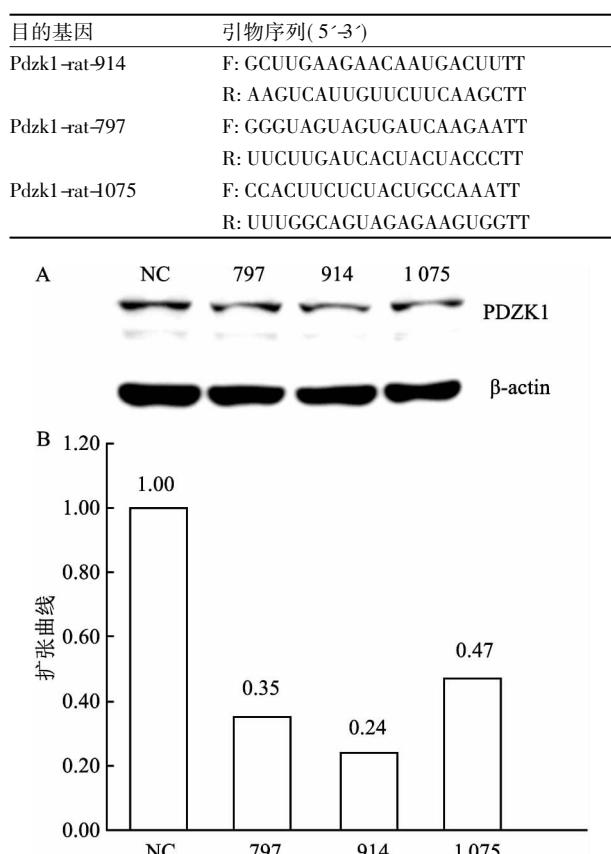


图1 BRL-3A 细胞转染 PDZK1 siRNA 进行筛选

A: Western blot 筛选结果; B: RT-PCR 筛选结果

酶 BamH I 与 EcoR I 酶切, 酶切结果表明, 被 EcoR I 切开的可能是阳性克隆(图2)。将阳性克隆进行测序鉴定证实, 携带 PDZK1 shRNA 的重组慢病毒载体 LV3/PDZK1 shRNA 得以成功构建。

2.3 PDZK1 shRNA 慢病毒重组体的包装及其滴度测定

Lipofectamine2000 基因转染试剂介导

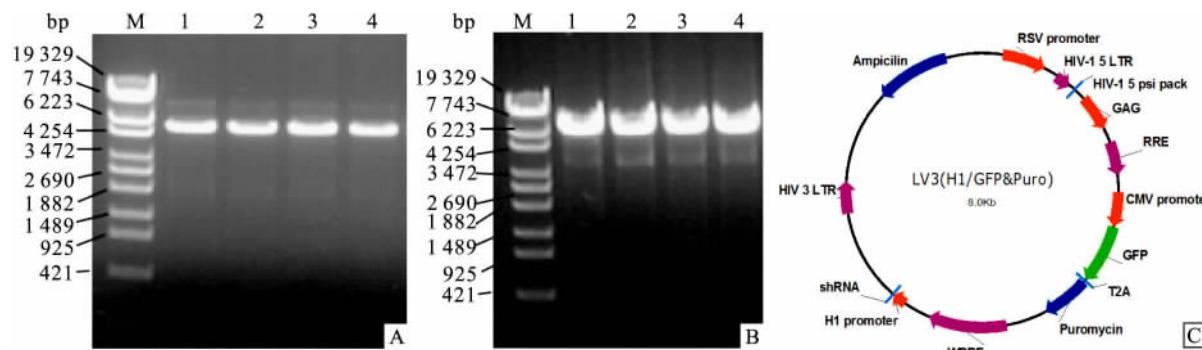


图2 PDZK1 shRNA 慢病毒载体的构建示意图

A: 重组载体质粒图; B: 重组载体的酶切鉴定图; C: LV3 穿梭质粒; M: DNA 标准; 1~4: 质粒 1~4

LV3/PDZK1 shRNA 慢病毒质粒 DNA 转染 293T 细胞, 培养 72 h, 荧光显微镜下观察, 可见 GFP 强表达(图3)。以倍比稀释方法检测其病毒滴度为: 1×10^9 TU/ml。

2.4 BRL-3A 细胞的 LV3/PDZK1 shRNA 慢病毒感染

未经 LV3/PDZK1 shRNA 慢病毒感染的 BRL-3A 细胞不表达 GFP(图3C) , 经 LV3/PDZK1 shRNA 慢病毒感染的 BRL-3A 细胞, 荧光显微镜观察可见明显 GFP 表达(图3D)。

2.5 LV3/PDZK1 shRNA 慢病毒对 BRL-3A 细胞的 PDZK1、Bsep 基因表达的影响 提取未经感染的 BRL-3A 细胞(blank) 、空载病毒感染 48 h 的 BRL-3A 细胞(NC) 、LV3/PDZK1 shRNA 慢病毒感染 48 h 的 BRL-3A 细胞(shRNA) 总 RNA 为模板, 进行 RT-PCR 检测, 结果显示 shRNA 组 PDZK1、Bsep 基因的 mRNA 相对表达水平为: (0.17 ± 0.02) 、 (0.43 ± 0.07) ; NC 组 PDZK1、Bsep 基因的 mRNA 相对表达水平为: (0.97 ± 0.06) , (0.94 ± 0.25) ; 与 NC 组比较, shRNA 组 PDZK1、Bsep 基因的 mRNA 相对表达水平显著抑制($P < 0.01$) , 见图4。由此提示, 重组慢病毒 LV3/PDZK1 shRNA 能在 mRNA 水平有效沉默 BRL-3A 细胞的 PDZK1、Bsep 基因的表达。

2.6 LV3/PDZK1 shRNA 慢病毒对 BRL-3A 细胞 PDZK1 及 Bsep 蛋白表达的影响 Western blot 检测 blank、NC、shRNA 这 3 个组 BRL-3A 细胞的 PDZK1 及 Bsep 蛋白表达情况。结果显示与 blank 组和 NC 组比较, shRNA 组的 PDZK1 和 Bsep 蛋白表达均显著降低($P < 0.01$) , 见图5。由此提示, 在 RNA 水平沉默 BRL-3A 细胞 PDZK1 基因可有效抑制其 PDZK1 及 Bsep 蛋白表达。

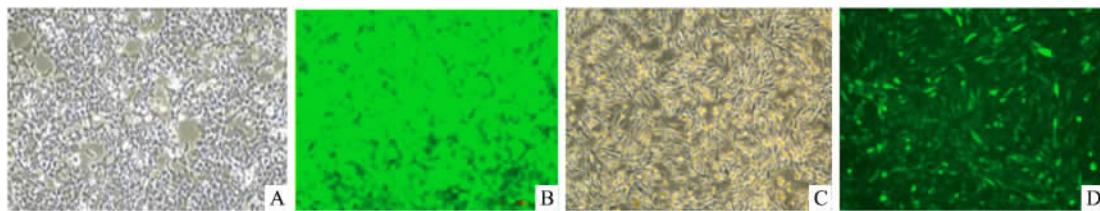


图3 LV3/PDZK1 shRNA慢病毒感染的细胞 ×100

A: 未感染的293T细胞；B: 慢病毒感染的293T细胞；C: 未感染的BRL-3A细胞；D: 慢病毒感染的BRL-3A细胞

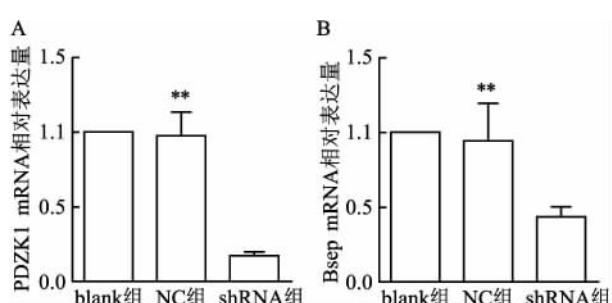


图4 BRL-3A细胞中PDZK1及Bsep基因表达

A: PDZK1 基因表达情况；B: Bsep 基因表达情况,以 actin 为内参;与 shRNA 组比较: ** $P < 0.01$

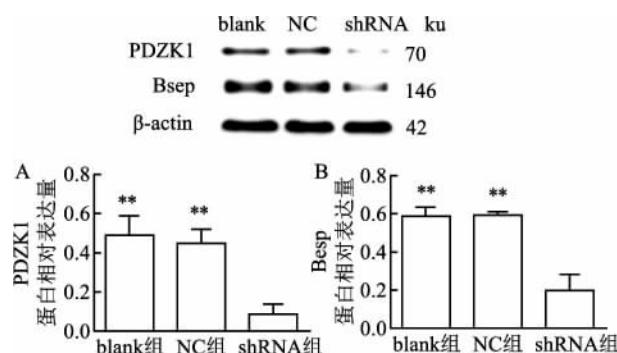


图5 BRL-3A细胞中PDZK1及Bsep蛋白表达

A: PDZK1 蛋白表达情况；B: Bsep 蛋白表达情况；与 shRNA 组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

近年来,PDZK1对药物转运体的调控作用逐渐引起重视。PDZK1具有PDZ结构域,可以特异性识别并结合转运体C末端大约5个氨基酸长度的特定序列模块的肽类(PDZ结合域)。PDZK1大量分布在肝、肾、小肠,与多数转运体的分布一致。机体病理状态通过诱导PDZK1表达改变,继而引起某些转运体表达和功能异常。例如慢性肾病(CKD)大鼠的肾脏上皮细胞和肠道上皮细胞PDZK1表达受到显著抑制,导致转运体(Mrp4和OCTN1)定位紊

乱和功能下降。因此,PDZK1已被视为转运体相关疾病的新的治疗靶点^[4]。

炎症诱导肝细胞胆管侧膜ABC转运体的表达与功能改变,是造成胆汁生成和排泌受阻的直接原因^[5]。 α -萘异硫氰酸酯(ANIT)能够诱导肝脏炎性细胞浸润并且明显影响肝脏转运体(Bsep、NTCP),促进胆汁淤积形成^[6]。内毒素诱导胆汁淤积大鼠的胆管侧膜Bsep表达下调亦与肝组织炎症程度紧密相关^[7]。然而,炎症影响ABC转运体的机制尚不清楚。有报道^[8]发现炎症因子能够抑制PDZK1蛋白表达。最新研究^[9]显示炎症性肝损伤能够引起PDZK1、胆管侧膜Bsep和Mrp2表达均显著下调。上述研究提示炎症很可能通过PDZK1这一中介对胆管侧膜ABC转运体实现调控。

因此,运用RNA干扰技术,针对大鼠PDZK1基因序列,设计与筛选出PDZK1基因的3个干扰靶点。从3个干扰靶点中筛选到PDZK1基因的最佳干扰靶点。设计并合成针对最佳干扰靶点的shRNA靶序列,连入LV3载体,成功构建了LV3/PDZK1 shRNA慢病毒载体,实现了该慢病毒载体对大鼠BRL-3A肝细胞的有效感染。RT-PCR与Western blot检测证实,LV3/PDZK1 shRNA慢病毒载体能够介导PDZK1 shRNA有效沉默BRL-3A细胞的PDZK1表达,同时下调胆管侧膜Bsep的表达,提示PDZK1 shRNA可能通过沉默BRL-3A细胞的PDZK1,使BRL-3A细胞胆管侧膜Bsep表达减少。而PDZK1下调引起Bsep表达降低的机制可能与Bsep定位紊乱和发生降解有关。文献^[10]报道,转运体(Oap1a1)需要PDZK1协同招募驱动蛋白kinesin-1,才能正确地运输至肝细胞膜;敲除PDZK1可导致Oap1a1堆积在细胞内并大量降解。另一项研究^[11]发现,人肾上皮HEK293细胞的PDZK1过表达能够明显上调转运体(MRP4)表达水平,可能与PDZK1减少MRP4降解有关。综上所述,PDZK1可能扮演着一个在细胞内协助运输转运体分子至细胞顶侧

膜，并且使其稳定表达的伴侣蛋白的角色。

参考文献

- [1] 王鹤鹏,孙鹏远,刘克辛.肝脏转运体表达和功能的变化对肝疾病的影响[J].世界华人消化杂志,2017,25(16):1427-37.
- [2] Cuperus F J, Claudel T, Gautherot J, et al. The role of canalicular ABC transporters in cholestasis [J]. Drug Metab Dispos, 2014, 42 (4): 546-60.
- [3] 吴涛,张程亮,刘东. PDZK1 蛋白对药物转运体的调控[J].中国新药杂志,2013,22(5):60-4.
- [4] Isaka Y. Adaptor protein is a new therapeutic target in chronic kidney disease [J]. Kidney Int, 2017, 92 (6): 1312-4.
- [5] 高晓光,刘克辛,孟强. 转运体和代谢酶在胆汁淤积性肝损伤中的作用机制[J]. 药物评价研究,2017,40(9):1210-5.
- [6] 曹璐,李俊,黄成,等. 桔子柏皮汤对α-萘异硫氰酸酯诱导的肝内胆汁淤积大鼠的保护作用[J]. 安徽医科大学学报, 2013,48(3):257-62.
- [7] Xiong X, Ren Y, Cui Y, et al. Obeticholic acid protects mice against lipopolysaccharide-induced liver injury and inflammation [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 96: 1292-8.
- [8] Luo M, Yeruva S, Liu Y, et al. IL-4β-induced downregulation of the multifunctional PDZ adaptor PDZK1 is attenuated by ERK inhibition, RXRα, or PPARα stimulation in enterocytes [J]. Front Physiol, 2017, 8: 61.
- [9] Wu T, Li J, Li Y, et al. Antioxidant and hepatoprotective effect of swertiamarin on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity via the Nrf2/HO-1 pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 41 (6): 2242-54.
- [10] Wang W J, Murray J W, Wolkoff A W. Oatp1a1 requires PDZK1 to traffic to the plasma membrane by selective recruitment of microtubule-based motor proteins [J]. Drug Metab Dispos, 2014, 42 (1): 62-9.
- [11] Park J, Kwak J O, Riederer B, et al. Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 3 is critical for multidrug resistance protein 4-mediated drug efflux in the kidney [J]. J Am Soc Nephrol, 2014, 25(4):726-36.

Lentiviral vector-mediated shRNA suppresses the expression of PDZK1 and its effect on Bsep in rat liver BRL-3A cells

Yang Fangfang¹, Liu Ping², Cheng Jing², et al

(¹*Faculty of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065;*

²*Dept of Pharmacy, Wuhan NO. 4 Hospital, Puai Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430000)*

Abstract Objective To investigate the effect of PDZK1 silencing on cell viability and canalicular Bsep expression in rats hepatocyte. **Methods** Three RNAi sites of PDZK1 gene were chosen according to its mRNA sequence. Three pairs siRNA of the three RNAi sites were synthesized and transfected into BRL-3A cells to identify the optimal siRNA sequence by RT-PCR. Then the siRNA oligonucleotide targeting the optimal siRNA sequence was designed, synthesized and annealed for double-strand formation. The annealed oligonucleotide fragment was subcloned into the LV3 (H1/GFP&Puro) plasmid to form LV3/PDZK1 shRNA lentiviral vector. After identified by restriction enzymes digestion and sequencing, the LV3/PDZK1 shRNA plasmid was transfected into 293T cells to produce lentiviral particles. The lentiviral vector particles were transfected into BRL-3A cells, and the expression of GFP, PDZK1 and canalicular Bsep in the transfected cells were observed under inverted microscope and assayed by RT-PCR and Western blot, respectively. **Results** The optimal siRNA sequence was confirmed. Digestion and sequencing identified that lentiviral vector LV3/PDZK1 shRNA was constructed successfully. In 48 h after the lentiviral vector transfection, no expression of PDZK1 and mild expression of Bsep was seen in BRL-3A cells by RT-PCR and Western blot. **Conclusion** The lentiviral RNAi vector targeting PDZK1 is constructed successfully. This vector can efficaciously silence PDZK1 gene and inhibited the expression of canalicular Bsep in BRL-3A cells. It has an active significance in drug transporter regulation studying.

Key words PDZK1; Bsep; small interference RNA; lentiviral vector; BRL-3A