论著

文章编号:1000-5404(2008)14-1312-04

腺病毒载体介导的siRNA对3T3-L1细胞脂联素表达的影响

孟凡萍[1],杨刚毅[2],李 钶[2],李 伶[1],齐晓亚[2],刘建雷[1],李 荣[2] (重庆医科大学:[1]医学检验系临床生物化学教研室,临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆 400016,[2]附属第二医院内分泌科,重庆 400010)

摘 要:目的 构建携带小鼠脂联素(Acrp30)siRNA腺病毒载体,并检测其对小鼠脂肪细胞Acrp30表达的影响。**方法** 首先用*Kpn* Ⅰ+*Not* Ⅰ双酶切本课题组前期构建的质粒pSilencer1.0-U6-Acrp30-1和pSilencer1.0-U6-Acrp30-3,得到目的片段U6-Acrp30-1和U6-Acrp30-3,并将目的片段亚克隆入穿梭质粒pShuttle,用*Pme* Ⅰ线性化穿梭质粒pShuttle-U6-Acrp30-1和pShuttle-U6-Acrp30-3,并与pAdeasy-1在BJ5183内同源重组,筛选、鉴定、测序后,在XL10-Gold中扩增重组腺病毒质粒,最后在293细胞内包装扩增为重组腺病毒Ad-Acrp30-1和Ad-Acrp30-3。用此重组腺病毒感染3T3-L1脂肪细胞,用RT-PCR和ELISA检测其Acrp30 mRNA和蛋白表达。**结果** 设计并构建了小鼠Acrp30基因特异性siRNA腺病毒载体,该载体感染脂肪细胞后,能显著抑制其Acrp30 mRNA和蛋白表达。**结论** 构建的Acrp30基因特异性siRNA腺病毒载体能有效的抑制脂联素基因在3T3-L1脂肪细胞中的表达。

关键词: RNA干扰;腺病毒载体;脂联素;3T3-L1细胞
中图法分类号: R329.25;R394-33;R394.2 **文献标识码:** A

Effects of recombinant adenovirus-mediated siRNA on adiponectin expression in 3T3-L1 cells

MENG Fan-ping[1], YANG Gang-yi[2], LI Ke[2], LI Ling[1], QI Xiao-ya[2], LIU Jian-lei[1], LI Rong[2] ([1]Department of Clinical Biochemistry, Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing 400016; [2]Department of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To construct the RNA interfered adenovirus expression vector specific for Adiponectin (Acrp30) gene and observe its effect on the Acrp30 expression in 3T3-L1 cells. **Methods** Firstly, fragments U6-Acrp30-1 and U6-Acrp30-3 were obtained by using *Kpn*Ⅰ+*Not*Ⅰ to digest the plasmids pSilencer1.0-U6-Acrp30-1 and pSilencer1.0- U6-Acrp30-3. Two adenovirus vector plasmids, Ad-Acrp30-1 and Ad-Acrp30-3 were constructed according to a two-step transformation protocol. Two newly constructed plasmids were transfected into 293 packaging cells to produce adenovirus, which were further multiplied and purified. Then 3T3-L1 cells were infected with the 2 recombinant adenoviruses respectively. The mRNA expression and protein levels of Acrp30 in these cells were evaluated by semi-quantitative RT-PCR and ELISA. **Results** Two recombinant adenoviral plasmids Ad-Acrp30-1 and Ad-Acrp30-3 were successfully constructed. They - remarkably down-regulated the expression of Acrp30 at both the mRNA and protein levels in transfected 3T3-L1 cells. **Conclusion** The siRNA eukaryotic expression vectors against Acrp30 mRNA effectively inhibit the expression of Acrp30 in 3T3-L1 adipocytes.

Key words: RNA interference; adenovirus vector; adiponectin; 3T3-L1 cell

---

基金项目: 国家自然科学基金(30771037,30270631,30370671);国家教育部"春晖计划"(2003-56);美国NIH基金(R01 HL073267,DK 066003)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771037,30270631,30370671), the "Sunshine in Spring" Projects of the Ministry of Education of the People's Republic of China (2003-56) and American NIH grant (R01 HL073267,DK 066003)

作者简介: 孟凡萍,女,河北省张家口市人,硕士研究生,主要从事脂代谢和胰岛素抵抗方面的研究。E-mail:mengfei2132@yahoo.com.cn
通信作者: 李 伶,电话:(023)68485006,E-mail:lingli31@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-06-27;**修回日期:** 2007-11-27

脂联素(Acrp30)是由脂肪组织分泌的活性多肽,它是人体血浆中含量最高的脂肪细胞因子。已有研究表明,脂联素在抗动脉粥样硬化、抗炎作用、调节糖脂代谢、增加胰岛素敏感性等方面具有广泛的生理功能,并与糖尿病、肥胖、心血管疾病等的发生和发展具有密切的关系[1-3]。但目前对脂联素作用的认识并不全面,尤其是对其信号转导通路的研究尚处于起步阶段。为此,本研究构建高效的 Acrp30-siRNA 腺病毒载体,并观察其对 3T3-L1 脂肪细胞脂联素表达和分泌的抑制作用,旨在为进一步研究脂联素的生理功能及其信号转导通路建立一个经济、高效的技术平台。

1　材料与方法

1.1　材料

携带脂联素 siRNA 的质粒 pSilencer1.0-U6-Acrp30-1,pSilencer1.0-U6-Acrp30-3 和 RNA 干扰阴性对照质粒 pSilencer1.0-U6-GFP 由本课题组前期构建[4]。AdEasy™ X L 毒载体系统(Stratagene 公司);PCR 试剂盒(TaKaRa 公司);DH5α、AD293 细胞和 3T3-L1 前脂肪细胞株为本课题组留存;限制性内切酶、T_4 DNA 连接酶、*Taq* 酶(New England Biolabs 公司);质粒小抽试剂盒、胶回收试剂盒(华舜公司);质粒大抽试剂盒(Axygene 公司);胎牛血清(杭州四季青公司);小鼠脂联素 ELISA 检测试剂盒(Phoenix 公司); Lipfectamin2000(Invitrogen 公司);卡那霉素、酶解酪蛋白、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMX)、胰岛素(Insulin)、地塞米松(DEX) (Sigma 公司);序列分析(上海鼎安生物科技公司)。

1.2　方法

1.2.1　Acrp30-siRNA 穿梭质粒的构建　　用 *Kpn* Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切 pSilencer1.0-U6-Acrp30-1,pSilencer1.0-U6-Acrp30-3,和 pSilencer1.0-U6-GFP 质粒以及穿梭质粒 pShuttle,胶回收 U6 + Acrp30 cDNA(412 bp)和 pShuttle(6.6 kb)片段,用 T_4 DNA 连接酶 16 ℃连接过夜,转化 DH5α 感受态细胞,经 LB 卡那霉素抗性平板筛选阳性菌落后,小量抽提质粒,酶切并测序鉴定阳性克隆,得到的重组子命名为 pShuttle-U6-Acrp30-1, pShuttle-U6-Acrp30-3 和 pShuttle-U6-GFP。

1.2.2　重组腺病毒质粒的构建　　用 *Pme* Ⅰ酶切构建好的穿梭质粒使其线性化,胶回收后,分别电穿孔转入 BJ5183-Adeasy-1 电转感受态细胞(电压 2.5 kV,电容 2.5 μF,电阻 200 Ω),LB 卡那霉素抗性筛选阳性菌落,小量提取质粒,*Pac* Ⅰ酶切鉴定阳性克隆后,将重组子转化入 XL10-Gold 超感受态细胞扩增,再次小量提取质粒, 经 *Pac* Ⅰ酶切、PCR 和测序鉴定后,大量提取质粒。得到的重组子命名为 pAd-Acrp30-1, pAd-Acrp30-3 和 pAd-GFP。

1.2.3　重组腺病毒的包装、扩增及滴度测定　　用含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基培养 AD293 细胞。按 5×10^5/孔接种于无菌 6 孔板中,50 ml/L CO_2,37 ℃饱和湿度条件下培养。*Pac* Ⅰ消化重组腺病毒质粒后,按 Lipfectamine2000 推荐的优化条件转染 293 细胞,5 ~ 7 d 出现细胞病变反应(CPE)后,收集病毒,命名为 Ad-Acrp30-1, Ad-Acrp30-3 和 Ad-GFP。腺病毒滴度测定采用空斑形成实验(plaque assay):将 AD293 细胞接种于 6 孔板上,待细胞达到 80% ~ 90% 融合时,加入不同倍数稀释的病毒上清 500 μl,50 ml/L CO_2,37℃饱和湿度条件下培养 10 d 后,加入中性红溶液,37 ℃培养 2 h 后统计空斑数量,根据病毒滴度 = 空斑数量/稀释因子 × 病毒稀释液体积,计算病毒滴度。

1.2.4　重组腺病毒感染脂肪细胞　　将 3T3-L1 前脂肪细胞接种于 6 孔板,待细胞生长汇合至单层 2 d 后开始诱导。分别以 IBMX + DEX + 胰岛素和胰岛素诱导 2 d 后,维持培养至 8 ~ 10 d,油红染色鉴定脂肪细胞。

分别以腺病毒载体 Ad-Acrp30-1、Ad-Acrp30-3 和 Ad-GFP 感染脂肪细胞,并以未感染病毒的脂肪细胞为阴性对照,以未分化的 3T3-L1 前脂肪细胞为空白对照, 72 h 后收集细胞上清和裂解细胞分别做 ELISA 和 RT-PCR 检测。

1.2.5　RT-PCR 法检测 Acrp30 mRNA 表达水平　　提取细胞 RNA,用 RT-PCR 检测 ACRP30 mRNA 表达水平,Acrp30 引物正义链:5′-CTCTTAATCCTGCCCAGTCAT-3′,反义链:5′-GAGGCT-CACCTTCACATCTTT-3′;GAPDH 正义链:5′-TGCCCA-GAACAT-CATCCCT-3′,反义链:5′-TGAAGTCGCAGGAG-ACAACC-3′。

1.2.6　ELISA 法检测脂联素表达水平　　按照脂联素 ELISA 试剂盒说明书测定标准品及各孔细胞培养上清液中脂联素蛋白含量。以系列浓度脂联素标准品绘制 $D(450)$ 标准曲线。

$$\text{抑制率}(\%)=\frac{\text{RNAi 阴性对照组}-\text{处理组}}{\text{RNAi 阴性对照组}}\times100\%$$

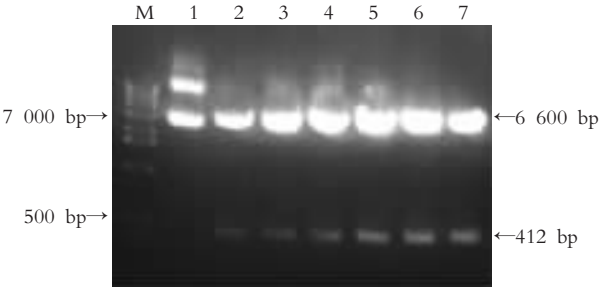
1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　Acrp30-siRNA 穿梭质粒的构建

采用限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ + *Not* Ⅰ双酶切 pShuttle-U6-Acrp30-1,3、GFP 质粒 DNA。结果显示酶切条带为 6 600 bp 和 412 bp 的 2 个片段,分别代表 pShuttle 质粒和插入目的片段,与预期结果完全一致。说明 Acrp30-siRNA 表达框已经正确地克隆到 pShuttle 载体上(图 1),DNA 序列分析也进一步证实了 Acrp30-siRNA 表达框的正确插入。



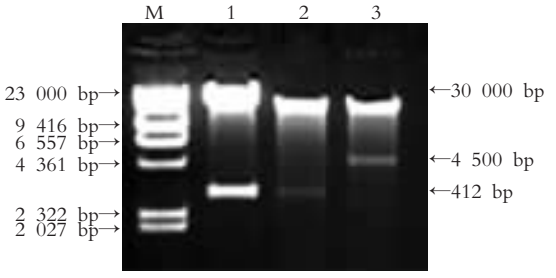
M: DNA 标准; 1:重组质粒酶切前;2,3: *Kpn* Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切 pShuttle-U6-Acrp30-1;4,5: *Kpn* Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切 pShuttle-U6-Acrp30-3; 6,7:*Kpn* Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切 pShuttle-U6-GFP

图 1　穿梭质粒 pShuttle-U6-Acrp30-1,3 的酶切鉴定

2.2 重组腺病毒载体的构建

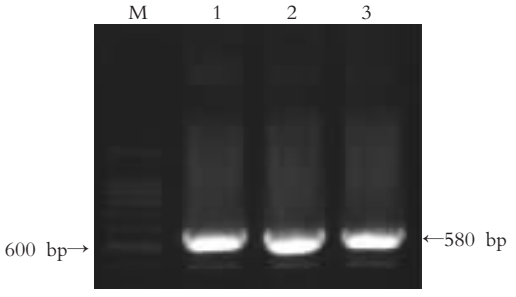
对3种重组腺病毒质粒DNA(pAd-Acrp30-1,pAd-Acrp30-3和pAd-GFP)采用*Pac* Ⅰ酶切后,所形成30 kb和3.0 kb两个片段代表重组发生在左臂,另外30 kb和4.5 kb 2个片段代表重组发生在复制起始区(图2)。

对3种重组腺病毒质粒以引物P1:5′-GAAGTGAAATCTGAATAATTTTGTG-3′, P2: 5′-CAAAACTACATAAGACCCCCAC-3′,扩增出580 bp片段(图3),并经测序证实插入正确。



M: 标准(λ-*Hind* Ⅲ digest); 1: *Pac* Ⅰ酶切pAd-Acrp30-1; 2: *Pac* Ⅰ酶切pAd-Acrp30-3; 3: *Pac* Ⅰ酶切pAd-GFP

图2 重组腺病毒质粒(pAd-Acrp30-siRNA)的酶切鉴定

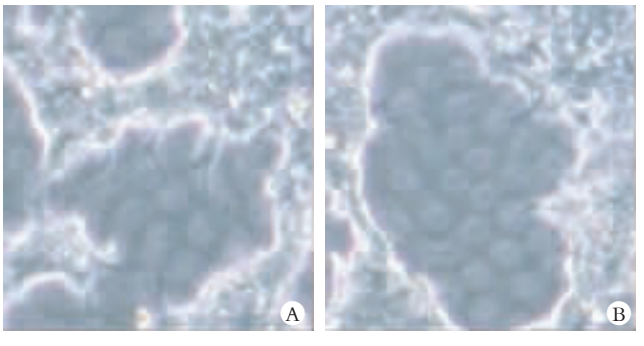


M: 标准(λ-*Hind* Ⅲ digest); 1: pAd-Acrp30-1 PCR扩增产物; 2: pAd-Acrp30-3 PCR扩增产物; 3: pAd-GFP PCR扩增产物

图3 重组腺病毒质粒PCR鉴定

2.3 重组腺病毒的包装和扩增及滴度测定

腺病毒质粒转染AD293细胞5~7 d后时即可见明显特征性的细胞病变(CPE)。细胞变大变圆,折光性增强,随后出现串珠样改变直至葡萄簇样改变并从细胞培养板上脱落。正常AD293细胞未见上述变化(图4)。用空斑形成实验(plaque assay)测定腺病毒滴度:Ad-Acrp30-1为4.5×10^8 PFU/ml,Ad-Acrp30-3为3.7×10^8 PFU/ml,Ad-GFP为5.6×10^8 PFU/ml。

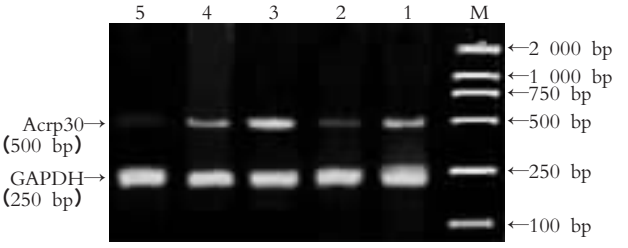


A: AD-Acrp30-1; B: AD-Acrp30-3

图4 不同腺病毒质粒转染AD293细胞的细胞病变 (×100)

2.4 Acrp30-siRNA重组腺病毒转染对3T3-L1脂肪细胞Acrp30表达的抑制

分别以重组腺病毒载体Ad-Acrp30-1、Ad-Acrp30-3和Ad-GFP感染诱导分化成熟的3T3-L1脂肪细胞,用RT-PCR分析Acrp30 mRNA表达水平。结果表明,构建的Acrp30 siRNA腺病毒载体能显著抑制脂肪细胞Acrp30基因的表达(图5)。



M: DNA标准(DL 2000); 1: Ad-Acrp30-1; 2: Ad-Acrp30- 3; 3: Ad-GFP; 4: 空白对照; 5: 阴性对照

图5 重组腺病毒载体转染3T3-L1脂肪细胞Acrp30 mRNA表达

ELISA测定细胞上清液中Acrp30蛋白含量结果提示被不同Acrp30 siRNA重组腺病毒转染的脂肪细胞脂联素分泌显著低于正常对照组($P<0.05$),见表1,抑制率分别为61%(Ad-Acrp30-1)和49%(Ad-Acrp30-3)。

表1 不同处理组细胞上清液中脂联素浓度($n=5,\bar{x}\pm s$)

组别	脂联素浓度[D(450)]	抑制率
Ad-Acrp30-1感染组	3.58±0.13[a]	61%
Ad-Acrp30-3感染组	3.92±0.14[a]	49%
RNAi阴性对照组	6.52±0.14	-
正常对照组	5.93±0.14	-
空白对照组	4.34±0.14	-

a: $P<0.05$,与正常对照组比较

3 讨论

人类在新世纪后基因组时代面临的主要挑战是解读大量编码基因的功能并研究基因调控的分子机制。基因打靶和基因剔除技术被公认为是研究基因功能和作用机制的重要工具。然而,它也存在着一些不足之处,如动物模型建立周期长,技术难度高且耗资巨大。同时,不能实现定时、定位的基因表达变化,并存在胚胎性致死和不育的可能等。这种缺陷对研究2型糖尿病、心血管疾病等后天性疾病极为不利。RNAi技术是分子生物学中继单克隆抗体技术、基因重组和基因剔除等重大发明之后,新发展起来的分子生物学高科技手段。作为新兴的基因阻断技术,RNAi已成为后基因组时代研究基因功能和疾病的分子生物学机制,以及基因治疗的最直接和最有效的方法。它不同于传统的在DNA水平的基因敲除,而是通过RNA干扰,实现转录后的基因沉默,即在mRNA水平达到基因敲除的效果。因此,在基因功能研究上有其独特的优点,如整个流程设计简便,且作用迅速,效果明显,使大量基因功

能可以快速经济地进行检测,并能实现基因的定时表达缺陷[5,6],这对于研究有遗传和环境因素共同参与疾病的发病机制具有重要意义。

本课题组在前期研究中,根据 siRNAs 的设计原则[7-9],设计了 3 个编码小鼠 Acrp30 基因的特异性 siRNA 寡核苷酸插入片段,利用 pSilencer1.0-U6 载体构建了 3 个相应的表达质粒,将上述表达质粒转染入诱导分化后的 3T3-L1 脂肪细胞,筛选出两条抑制脂联素表达最有效 siRNA 寡核苷酸片段,将其质粒载体命名为 pSilencer1.0-U6-Acrp30-1 和 pSilencer1.0-U6-Acrp30-3[4]。在此基础上,本研究用 *Kpn* Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切上述 2 个质粒,将其亚克隆入穿梭质粒 pShuttle,用 *Pme* Ⅰ酶切线性化穿梭质粒,并与骨架质粒 pAdeasy-1 在 BJ5183 细胞内同源重组,最后在 293 细胞内包装为重组腺病毒。

本实验采用的 AdEasy™ XL 腺病毒载体系统是目前基因治疗中应用最广泛的一种载体系统,具有许多优点,如转染效率高,感染的宿主范围广,可以有效地转染分裂和静止期细胞,载体容量大,插入外源基因片段长,目的基因的蛋白在哺乳动物细胞中的表达水平较高,而且携带基因不整合到宿主细胞基因组中,对机体的安全性较高[10,11]。本研究中,我们先将腺病毒质粒载体转化大肠杆菌,再将获得的转化细菌制成感受态细胞,作为重组穿梭质粒载体转化的宿主菌,大大提高了同源重组的效率,在空斑形成实验中测定到了较高的病毒滴度。最后,将上述带有 Acrp30-siRNA 表达框的 2 个重组腺病毒(Ad-Acrp30-1 和 Ad-Acrp30-3)转染入诱导分化后的 3T3-L1 脂肪细胞,并观察了其对脂联素表达的抑制效应。结果表明脂肪细胞脂联素 mRNA 和蛋白表达均受到明显抑制,其抑制率分别为 61%(Ad-Acrp30-1)和 49%(Ad-Acrp30-3),提示本研究设计的 Acrp30-siRNA 寡核苷酸片段能有效阻断 3T3-L1 脂肪细胞脂联素基因的表达。因此,可以认为 Acrp30-siRNA 重组腺病毒载体质粒的构建为研究脂联素与肥胖和胰岛素抵抗的发病机制之间的关系提供了一个高效、经济的技术平台。

参考文献:

[1] Rajala M W, Scherer P E. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis[J]. Endocrinology, 2003, 144(9): 3765-3773.

[2] Trayhurn P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat[J]. Acta Physiol Scand, 2005, 184(4): 285-293.

[3] 刘　楼, 许建娟. 妊娠期糖尿病孕妇血清脂联素表达的相关性研究[J]. 实用临床医药杂志, 2007, 11(1): 89-90.

[4] 李　钶, 杨刚毅, 李　伶, 等. RNA 干扰对脂联素在 3T3-L1 脂肪细胞中表达的影响[J]. 中国糖尿病杂志, 2007, 15(10): 589-590.

[5] Yin J Q, Wan Y. RNA-mediated gene regulation system: now and the future (Review)[J]. Int J Mol Med, 2002, 10(4): 355-365.

[6] Zamore P D. Ancient pathways programmed by small RNAs[J]. Science, 2002, 296(5571): 1265-1269.

[7] Harborth J, Elbashir S M, Vandenburgh K, *et al*. Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing[J]. Antisense Nucleic Acid Durg Dev, 2003, 13(2): 83-105.

[8] Semizarov D, Frost L, Sarthy A, *et al*. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures[J]. Proc Nutl Acad Sci USA, 2003, 100(11): 6347-6352.

[9] Jackson A L, Bartz S R, Schelter J, *et al*. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi[J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(6): 635-637.

[10] 孙学刚, 宋　革, 刘靖华, 等. 带 Tat 标记质粒载体的构建及其转导融合蛋白进入细胞的研究[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 19(3): 354-358.

[11] 刘斌剑, 王建民, 陈　林, 等. Bek 腺病毒表达载体的构建及其在哺乳类动物细胞中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(2): 144-146.

(编辑　王小寒)

《第三军医大学学报》2008 年第 15 期重点内容(关节镜临床治疗专题)预告

关注膝关节镜热点与争议问题 …… 吴海山
重视"三基"训练, 树立微创理念, 立志成为一名合格关节外科医师 …… 杨　柳
关节镜下六股自体胭绳肌肌腱双隧道重建膝前交叉韧带 …… 李卫平, 黄建荣, 沈慧勇, 等
关节镜微创手术治疗膝骨性关节病伴 Baker's 囊肿的价值 …… 刘玉杰, 薛　静, 周　密, 等
54 例关节镜下盘状软骨成形手术的中期随访 …… 祝云利, 吴宇黎, 吴海山
MRI 诊断半月板损伤类型的对比研究 …… 段小军, 杨　柳, 文亚名, 等
关节镜手术治疗髌骨脱位 17 例疗效分析 …… 徐　虎, 张春礼, 范宏斌, 等
6 例膝关节骨滑膜血管瘤的关节镜下诊断及治疗 …… 李　棋, 曹　畅, 李智尧, 等
关节镜下治疗 31 例运动员髌下脂肪垫撞击综合征 …… 覃　健, 侯之启, 郑民庆, 等
应用改良的关节镜下带垫片的空心螺钉内固定技术治疗儿童前交叉韧带胫骨止点撕脱性骨折 …… 胡　勇, 程松苗, 唐　杰
关节镜手术治疗 29 例症状性膝关节外侧盘状半月板 …… 何爱珊, 傅　明, 杨子波, 等