论著

文章编号:1000-5404(2010)15-1598-04

p38MAPK基因RNAi慢病毒载体的构建及在MC3T3-E1细胞的表达

冯正平[1],邓华聪[1],姜 蓉[2],杜 佳[2],陈丹燕[1],梁小燕[2] (400016 重庆,重庆医科大学:附属第一医院内分泌科[1],干细胞与组织工程实验室[2])

【摘要】 目的 构建小鼠p38MAPK基因RNAi慢病毒载体,观察其对MC3T3-E1成骨细胞p38MAPK表达及细胞凋亡的影响。方法 设计并合成3对互补的针对小鼠p38MAPK mRNA的oligoDNA片段,退火形成双链DNA,与经*Hpa* Ⅰ酶切后的载体连接,PCR筛选阳性克隆,测序鉴定。重组质粒与慢病毒包装载体共转染293T细胞,包装产生慢病毒,流式细胞仪检测病毒滴度,p38MAPK-shRNA慢病毒载体转染体外培养MC3T3-E1细胞,荧光定量PCR检测MC3T3-E1细胞p38MAPK mRNA表达,进行p38MAPK干扰有效靶点的筛选。22.2 mol/L葡萄糖刺激培养MC3T3-E1细胞7 d,Western blot检测MC3T3-E1细胞p38MAPK蛋白的表达,流式细胞术检测MC3T3-E1细胞凋亡。结果 酶切和测序均证实各重组质粒核苷酸序列插入正确,所得质粒分别命名为p38MAPK-shRNA1、p38MAPK-shRNA2、p38MAPK-shRNA3,流式细胞仪测定病毒滴度分别为2.4×10^8、2.8×10^8、2.5×10^8 TU/ml。p38MAPK-shRNA转染MC3T3-E1细胞效率达到74%以上,RT-PCR检测结果显示,各p38MAPK-shRNA转染组MC3T3-E1细胞p38MAPK mRNA表达较正常对照组分别下降了78.8%、84.3%和60.2%($P<0.01$),其中以p38MAPK-shRNA2的干扰效率最高。Western blot检测结果显示,与正常对照组相比,高糖组、空载体转染组MC3T3-E1细胞p-p38MAPK蛋白表达明显增加($P<0.01$)。p38MAPK-shRNA慢病毒转染组MC3T3-E1细胞p-p38MAPK蛋白表达水平较高糖组明显下调($P<0.01$)。流式细胞仪检测结果显示,与正常对照组相比,高糖组MC3T3-E1细胞凋亡率显著增加($P<0.01$);p38MAPK-shRNA慢病毒转染组以及p38MAPK信号转导阻断剂组较高糖组MC3T3-E1细胞凋亡率明显减少($P<0.05$,$P<0.01$)。结论 成功构建了靶向p38MAPK基因RNAi慢病毒载体,其能有效抑制MC3T3-E1细胞p38MAPK基因表达,减少高糖诱导的MC3T3-E1细胞凋亡。

【关键词】 p38MAPK;成骨细胞;RNA干扰;慢病毒属

【中图法分类号】 R322.71;R394-33;R394.2 【文献标志码】 A

Construction of recombinant lentiviral vector of siRNA for p38MAPK gene and its expression in MC3T3-E1 cells

Feng Zhengping[1], Deng Huacong[1], Jiang Rong[2], Du Jia[2], Chen Danyan[1], Liang Xiaoyan[2] ([1]Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital, [2]Laboratory of Stem Cells and Tissue Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【Abstract】 Objective To construct the lentiviral vector of mouse p38MAPK gene RNAi and study its effect on p38MAPK expression and apoptosis of MC3T3-E1 cells. Methods Three complementary oligoDNA fragments of mouse p38MAPK gene were designed and synthesized. After phosphorylation and annealing, double-strand DNA was subcloned into *Hpa* Ⅰ sites of the siRNA expression vector PLL3.7. The inserted sequence was identified after screening and restriction enzyme digestion. 293T cells were co-transfected with lentiviral vector and recombinant plasmids. Viral titer was determined by flow cytometry (FCM). Recombinant lentivirus vector system was used to transfect the MC3T3-E1 cells. mRNA expression levels of p38MAPK were analyzed by real time PCR. MC3T3-E1 cells were collected in 7 d after culture in high glucose. Cell apoptosis was detected by FCM. Protein level in p-p38MAPK was measured by Western blotting. Results The lentiviral vector containing shRNAs targeting p38MAPK gene was successfully constructed and transfected into MC3T3-E1 cells. Recombinant plasmids were named p38MAPK-shRNA1, p38MAPK-shRNA2, and p38MAPK-shRNA3, respectively. Their viral titer was 2.4×10^8, 2.8×10^8 and 2.5×10^8 TU/ml, respectively. The expression of p38MAPK mRNA was 78.8%, 84.3% and 60.2%, and was significantly lower in MC3T3-E1 cells of different p38MAPK-shRNA-transfected groups than in control group ($P<0.01$). Western blot analysis showed that the p-p38MAPK protein expression level was significantly higher in MC3T3-E1 cells of high glucose group and non-

【基金项目】 国家自然科学基金(30570744)

【通信作者】 邓华聪,电话:(023)68700611,E-mail:deng-huacong@yahoo.com.cn

p38MAPK-transfected group than in those of control group ($P<0.01$) and was significantly lower in MC3T3-E1 cells of high glucose group and non-p38MAPK-transfected group than in those of control group after p38MAPK-shRNA transfection ($P<0.01$). FCM showed that the apoptosis rate of MC3T3-E1 cells was significantly higher in high glucose group than in control group ($P<0.01$) and significantly lower in high glucose group than in p38MAPK-shRNA transfection group ($P<0.01$). **Conclusion** The recombinant lentivirus vector of shRNA targeting p38MAPK gene constructed by our group can effectively inhibit the expression of p38MAPK in MC3T3-E1 cells, thus decreasing their apoptosis induced by high glucose.

[Key words] MAP kinase; osteoblast; RNA interference; lentivirus

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570744). Corresponding author: Deng Huacong, Tel: 86-23-68700611, E-mail: deng-huacong@yahoo.com.cn

p38 促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路是各种胞外信号刺激后细胞内信号传递的共同通路,p38MAPK 的活化介导了细胞的炎症反应、增殖、分化、凋亡等过程[1]。RNA 干扰(RNA interference,RNAi)技术是新兴的一种有效的基因沉默手段,能高效、特异地抑制细胞内基因的表达,已被广泛应用于基因功能、信号转导、抗肿瘤等的研究。在前期研究中,我们已经发现,高葡萄糖、糖基化终末产物均可作为独立刺激因素激活 p38MAPK 信号通路,从而诱导细胞凋亡[2,3]。为此,我们构建小鼠 p38MAPK 基因 RNAi 的慢病毒载体,并转染 MC3T3-E1 成骨细胞,观察其对 p38MAPK 表达及细胞凋亡的影响,旨在为后期研究 p38MAPK 在高糖诱导成骨细胞凋亡中的作用机制打下基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞株购自美国培养物保存中心(ATCC 号:CRL-1427),低糖型(D-葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L)α-MEM 培养基由 Gibco 公司生产,短发夹状 RNA(small hairp in RNA,shRNA)质粒载体 PLL3.7、制备感受态试剂盒购于重庆威斯腾生物中心,包装细胞 293T 细胞株购于中科院上海细胞所,Lipofectamine™2000 购于 Invitrogen 公司,质粒提取试剂盒购于 Omega 公司,连接试剂盒、总 RNA 提取试剂、cDNA 合成试剂盒购于 TaKaRa 公司,兔抗小鼠 p-p38MAPK 抗体购于 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 p38MAPK 的 shRNA 载体构建 根据 GenBank 中 p38MAPK 基因的核苷酸序列(NM_011951.2)和 shRNA 的设计原则,结合网上在线设计软件,对它们的共同序列筛选出 3 条干扰靶点序列,即 siRNA1 5′-CTCAGAGTCTGCAAGAAACTA-3′,siRNA2 5′-CCAACAATTCTGCTCTGGTTA-3′,siRNA3 5′-AGAGTCTGCAAGAAACTACAT-3′,同时设计出非特异性靶序列 5′-GACTTCATAAGGCGCATGC-3′。3 对 shRNA 载体模板序列:shRNA1:正义链 5′-TCTCAGAGTCTGCAAGAAACTATTCAAGAGATAGTTTCTTGCAGACTCTGAGTTTTTTC-3′;反义链 5′-TCGAGAAAAAACTCAGAGTCTGCAAGAAACTATCTCTTGAATAGTTTCTTGCAGACTCTGAGA-3′。shRNA2:正义链 5′-TCCAACAATTCTGCTCTGGTTATTCAAGAGATAACCAGAGCAGAATTGTTGGTTTTTTC-3′;反义链 5′-TCGAGAAAAAACCAACAATTCTGCTCTGGTTATCTCTTGAATAACCAGAGCAGAATTGTTGGA-3′。shRNA3:正义链 5′-TAGAGTCTGCAAGAAACTACATTTCAAGAGAATGTAGTTTCTTGCAGACTCTTTTTTTC-3′;反义链 5′-TCGAGAAAAAAAGAGTCTGCAAGAAACTACATTCTCTTGAAAT-GTAGTTTCTTGCAGACTCTA-3′。末端终止子为 TTTTT,并在末端设计 *Hpa* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ酶切位点,DNA 序列由重庆威斯腾生物中心合成。将化学合成的正义链和反义链退火,形成 shRNA 表达模板,与经 *Hpa* Ⅰ/*Xho* Ⅰ酶切后线性化的 PLL3.7 载体连接,经筛选、酶切鉴定后再进行测序鉴定。所得质粒命名为 p38MAPK-shRNA1、p38MAPK-shRNA2、p38MAPK-shRNA3。

1.2.2 慢病毒载体的包装与纯化 制备慢病毒穿梭质粒及其辅助包装原件载体质粒,4 种质粒载体分别进行高纯度无内毒素抽提,共转染 293T 细胞。转染后 8 h 更换为完全培养基,培养 48 h 后,收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液,浓缩后得到高滴度的慢病毒液,感染 HeLa 细胞,流式细胞仪检测病毒滴度。

1.2.3 MC3T3-E1 成骨细胞的培养和慢病毒转染 采用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的 α-MEM 低糖型培养基培养,常规换液传代。转染前常规消化收集细胞,将细胞接种于 6 孔板。待细胞生长至密度为 50% ~70% 时,用慢病毒液感染 MC3T3-E1 细胞。感染 72 h 后于倒置荧光显微镜下观察细胞强化绿色荧光蛋白(EGFP)表达情况。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测 MC3T3-E1 细胞 p38MAPK mRNA 表达 培养的 MC3T3-E1 成骨细胞分为正常对照组、阴性病毒对照组和 3 个干扰质粒组。待感染时间达到 5 d 后收集细胞抽提 RNA 进行 RQ-PCR,具体操作按试剂盒说明书。

1.2.5 Western blot 检测 MC3T3-E1 细胞 p38MAPK 蛋白表达 α-MEM 培养基培养的 MC3T3-E1 细胞分为:正常对照组(正常培养的成骨细胞,D-葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L)、高糖组(22.2 mmol/L 的 D-葡萄糖刺激培养)、p38MAPK-shRNA 慢病毒转染组(pshRNA-p38MAPK 转染细胞 24 h 后,再给予终浓度为 22.2 mmol/L 的 D-葡萄糖培养)、信号转导阻断剂组(20.0 μmol/L 的 p38MAPK 阻断剂 SB203580 预先培养 2 h,再给予终浓度为 22.2 mmol/L 的 D-葡萄糖培养)、空载体转染组(空载体转染细胞 24 h 后,再给予终浓度为 22.2 mmol/L 的

D-葡萄糖培养)。

收集细胞,提取蛋白,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,Western blot 检测 MC3T3-E1 细胞 p38MAPK 蛋白。

1.2.6 流式细胞术检测 MC3T3-E1 细胞凋亡 收集细胞,多次离心、洗涤,加入荧光(SA-FLOUS)溶液,4 ℃避光 20 min,流式细胞术检测 MC3T3-E1 细胞凋亡情况。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计学处理,组间差异行单因素方差分析。

2 结果

2.1 p38MAPK-shRNA 载体构建

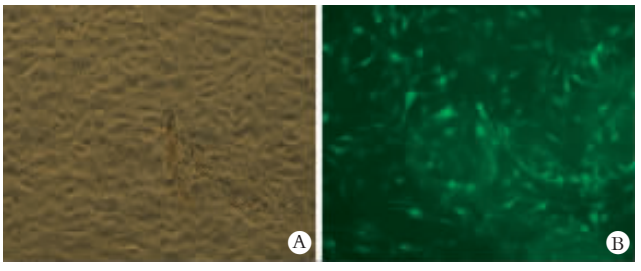
测序结果表明合成的 p38MAPK 的 shRNA 寡核苷酸链序列插入正确。

2.2 慢病毒载体的包装及滴度测定

流式细胞仪检测测定的阴性病毒对照组、p38MAPK-shRNA1、p38MAPK-shRNA2、p38MAPK-shRNA3 病毒滴度分别为 2.9×10^8、2.4×10^8、2.8×10^8、2.5×10^8 TU/ml。

2.3 p38MAPK-shRNA 转染 MC3T3-E1 细胞的效果

各组 EGFP 的表达明显增强,均有超过 70% 的细胞发出绿色荧光,且 p38MAPK-shRNA2 转染组明显强于 p38MAPK-shRNA1、p38MAPK-shRNA3 转染组。阴性病毒对照组、p38MAPK-shRNA1、p38MAPK-shRNA2、p38MAPK-shRNA3 转染组感染效率分别为 76%、74%、84%、80%。见图 1。



A:正常 MC3T3-E1 细胞(倒置相差显微镜);B:转染了 p38MAPK-shRNA2 的 MC3T3-E1 细胞(倒置荧光显微镜)

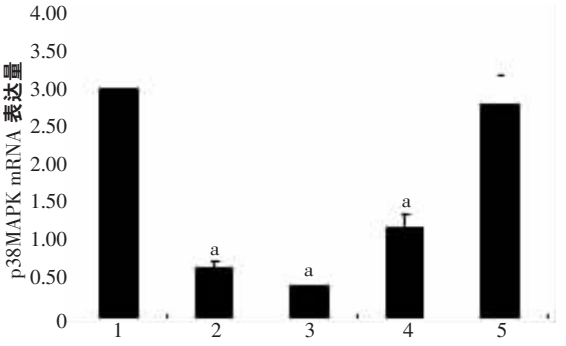
图 1 p38MAPK-shRNA 转染 MC3T3-E1 细胞 72 h 后 EGFP 的表达变化 (×200)

2.4 p38MAPK-shRNA 转染 MC3T3-E1 细胞抑制效率

荧光定量 PCR 的结果显示,3 个干扰片段都有不同程度的干扰效果。与正常对照组、阴性病毒对照组相比,p38MAPK-shRNA 转染组细胞 p38MAPK mRNA 表达水平分别下降了 78.8%、84.3% 和 60.2% ($P<0.01$),其中以 p38MAPK-shRNA2 的干扰效率最高。见图 2。

2.5 p38MAPK-shRNA 转染 MC3T3-E1 细胞后 p-p38MAPK 蛋白表达

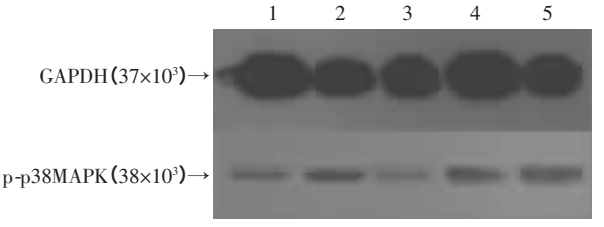
Western blot 检测结果显示,和正常对照组相比,高糖组、空载体转染组 MC3T3-E1 细胞 p-p38MAPK 蛋白表达明显增加 ($P<0.01$)。p38MAPK-shRNA 慢病毒转染组 MC3T3-E1 细胞 p-p38MAPK 蛋白表达水平较高糖组明显下调 ($P<0.01$)。见图 3。



1:正常对照组;2:p38MAPK-shRNA1 组;3:p38MAPK-shRNA2 组;4:p38MAPK-shRNA3 组;5:阴性病毒对照组

a:$P<0.01$,与正常对照组比较

图 2 p38MAPK-shRNA 转染对 MC3T3-E1 细胞 p38MAPK mRNA 表达的影响

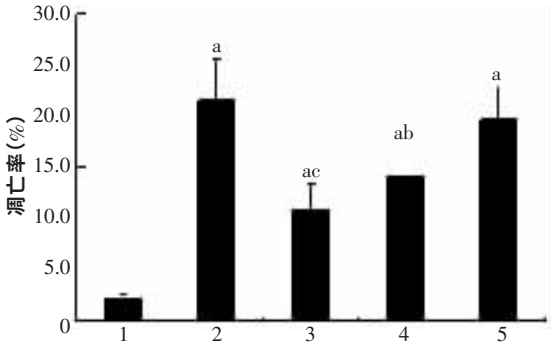


1:正常对照组;2:高糖组;3:p38MAPK-shRNA 慢病毒转染组;4:信号转导阻断剂组;5:空载体转染组

图 3 p38MAPK-shRNA 转染对 MC3T3-E1 细胞 p-p38MAPK 蛋白表达的影响

2.6 p38MAPK-shRNA 对 MC3T3-E1 细胞凋亡的影响

和正常对照组相比,高糖组 MC3T3-E1 细胞凋亡率显著增加 ($P<0.01$);p38MAPK-shRNA 慢病毒转染组以及 p38MAPK 信号转导阻断剂组较高糖组 MC3T3-E1 细胞凋亡率明显减少 ($P<0.05$,$P<0.01$)。见图 4。



1:正常对照组;2:高糖组;3:p38MAPK-shRNA 慢病毒转染组;4:信号转导阻断剂组;5:空载体转染组

a:$P<0.01$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与高糖组比较

图 4 p38MAPK-shRNA 对 MC3T3-E1 细胞凋亡的影响

3 讨论

p38MAPK 作为细胞内的一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,存在于大多数细胞内,其信号转导途径是细胞外信号引起细胞内反应的通道之一,其可被多种刺激因

子激活，通过影响基因的转录和调控，进而影响细胞的生物学行为，如细胞的炎症反应、增殖、分化、凋亡等过程[4,5]。成骨细胞凋亡增加是糖尿病低骨量的重要原因之一。诱导凋亡的因素如应激、高渗、炎症因子、过氧化等均可激活 p38MAPK。在骨细胞相关信号调节的研究中，已经发现，p38MAPK 与骨细胞的分化、凋亡密切相关[6-8]，p38MAPK 可通过影响 osterix 信号分子从而调节成骨细胞的分化，p38MAPK 还可通过激活转录因子而诱导 IL-1、TNF-α 等在骨质疏松症发病中起重要作用的细胞因子的表达。既往的研究[9-11]已显示，高糖或糖基化终末产物可通过激活 p38MAPK 通路，诱导 MC3T3-E1 成骨细胞凋亡，以 p38MAPK 抑制剂 SB203580 干预后，MC3T3-E1 成骨细胞凋亡明显减轻，提示 p38MAPK 活化与 MC3T3-E1 成骨细胞凋亡密切相关。

慢病毒载体是一种复制缺陷型逆转录病毒载体，具有可感染分裂期与非分裂期细胞、转移基因片段容量大、目的基因长时间稳定表达、不易诱发宿主免疫反应、安全性较好等优点，因此成为携带干扰 RNA 的理想载体[12-14]。近年来，有关慢病毒载体介导 RNAi 的研究[15]已显示了该技术在内源性基因功能研究和基因治疗领域的重大作用。基于下一步动物活体 RNAi 实验的需要，本研究成功构建了小鼠 p38MAPK 的 siRNA 慢病毒载体，并转染小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞，结果发现，p38MAPK-shRNA2 的干扰效率是最高的，其明显下调了 MC3T3-E1 成骨细胞 p38MAPK mRNA 和蛋白表达，与正常对照组和高糖诱导组之间均存在着明显的差异（$P<0.01$）；且测定病毒滴度为 2.8×10^8TU /ml，也满足了下一步实验的需要。同时，流式细胞术结果显示，针对 p38MAPK 靶向性的 siRNA 有效减少了经高糖处理后的 MC3T3-E1 细胞凋亡率，且与高糖诱导组之间存在着明显的差异（$P<0.01$）。这一结果说明，慢病毒介导的靶向 p38MAPK 的 siRNA 有效抑制了小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞 p38MAPK 基因的表达，进而减少高糖所诱导的细胞凋亡。

本实验成功构建了含有 GFP 报告基因的 p38MAPK 基因 shRNA 慢病毒载体，并转染小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞，得到有效抑制 p38MAPK 基因表达的稳定细胞株，为进一步研究 p38MAPK 基因在高糖诱导成骨细胞凋亡中的作用机制和后续基因治疗奠定了基础。本研究分别以生理性 5.5 mmol/L 和高浓度 22.2 mmol/L 葡萄糖刺激 MC3T3-E1 细胞，观察高糖对成骨细胞凋亡的影响及 p38MAPK 在高糖诱导成骨细胞凋亡中的作用，其葡萄糖浓度选择是参考国内外大多数文献，不足之处在于未选择低浓度葡萄糖刺激，在今后工作改进，下一步研究将在糖尿病动物体内，慢病毒载体介导靶向 p38MAPK 基因沉默对骨形成功能的影响。

参考文献：

[1] Jameel N M, Thirunavukkarasu C, Wu T, *et al*. p38-MAPK-and caspase-3-mediated superoxide-induced apoptosis of rat hepatic stellate cells: reversal by retinoic acid[J]. J Cell Physiol, 2009, 218(1): 157-166.

[2] 李艳波，邓华聪，郑丹，等. 高糖刺激人脐静脉内皮细胞丝裂素活化蛋白激酶 p38 的表达[J]. 哈尔滨医科大学学报，2002，36(6)：433-435.

[3] Alikhani M, Maclellan C M, Raptis M, *et al*. Advanced glycation end products induce apoptosis in fibroblasts through activation of ROS, MAP kinases, and the FOXO1 transcription factor[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 292(2): C850-C856.

[4] Tsuchiya T, Tsuno N H, Asakage M, *et al*. Apoptosis induction by p38MAPK inhibitor in human colon cancer cells[J]. Hepatogastroenterology, 2008, 55(84): 930-935.

[5] Gaitanaki C, Mastri M, Aggeli I K, *et al*. Differential roles of p38-MAPK and JNKs in mediating early protection or apoptosis in the hyperthermic perfused amphibian heart[J]. J Exp Biol, 2008, 211(Pt 15): 2524-2532.

[6] Wang X, Goh C H, Li B. p38 mitogen-activated protein kinase regulates osteoblast differentiation through osterix[J]. Endocrinology, 2007, 148(4): 1629-1637.

[7] Wei L, Sun X J, Wang Z, *et al*. CD95-induced osteoarthritic chondrocyte apoptosis and necrosis: dependency on p38 mitogen-activated protein kinase[J]. Arthritis Res Ther, 2006, 8(2): 37-41.

[8] Tanaka Y, Nakayamada S, Fujimoto H, *et al*. H-Ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibits integrin-mediated adhesion and induces apoptosis in osteoblasts[J]. J Biol Chem, 2002, 277(24): 21446-21452.

[9] Alikhani M, Alikhani Z, Boyd C, *et al*. Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis *via* the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways[J]. Bone, 2007, 40(2): 345-353.

[10] Qi J S, Li Y N, Zhang B S, *et al*. Peroxynitrite mediates high glucose-induced osteoblast apoptosis[J]. J Endocrinol Invest, 2008, 31(4): 314-320.

[11] Botolin S, McCabe L R. Chronic hyperglycemia modulates osteoblast gene expression through osmotic and non-osmotic pathways[J]. J Cell Biochem, 2006, 99(2): 411-424.

[12] Singer O, Marr R A, Rockenstein E, *et al*. Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model[J]. Nat Neurosci, 2005, 8(10): 1343-1349.

[13] Wiznerowicz M, Trono D. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference[J]. J Virol, 2003, 77(16): 8957-8961.

[14] Neschadim A, McCart J A, Keating A, *et al*. A roadmap to safe, efficient, and stable lentivirus-mediated gene therapy with hematopoietic cell transplantation[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2007, 13(12): 1407-1416.

[15] Hui E K, Yap E M, An D S, *et al*. Inhibition of influenza virus matrix (M1) protein expression and virus replication by U6 promoter-driven and lentivirus-mediated delivery of siRNA[J]. J Gen Virol, 2004, 85(Pt 7): 1877-1884.

（收稿 2010-01-19 修回 2010-03-30）
（编辑 吴培红）