文章编号:1000-5404(2011)11-1099-04

论著

PRP基因RNAi重组慢病毒制备及PRP基因与睾丸间质细胞增殖和睾酮产生的关系

赵丽娜[1],郝 杰[2],胡建刚[3],吕自兰[1],王 琦[1],王丽敏[1],余秋波[1],王应雄[1],黎 刚[1] (400016 重庆,重庆医科大学:公共卫生学院卫生毒理教研室[1],附属第一医院实验研究中心[2];重庆 402360,大足县人民医院神经外科[3])

【摘要】 **目的** 制备PRP RNAi重组慢病毒,并对PRP基因功能进行初步研究。**方法** 采用miRNA方式抑制PRP基因表达,筛选最有效序列包装慢病毒,用于转染TM3睾丸间质细胞。转染实验分为TM3-negative对照组(阴性对照质粒组,转染pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR- neg control质粒)以及A、B、C 3个干扰质粒组(分别转染pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-PRP-A,B,C质粒);RT-PCR与Western blot方法检测慢病毒对PRP基因表达影响,MTT方法检测细胞增殖情况,ELISA方法检测细胞睾酮产生情况。**结果** 经测序鉴定,成功制备了PRP RNAi重组慢病毒;与阴性对照质粒组比较,转染pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR- PRP-A,B组可有效下调TM3细胞PRP mRNA和蛋白表达($P<0.01$,$P<0.05$)。MTT结果表明抑制PRP基因后,TM3细胞的增殖加快($P<0.01$)。此外,相较于对照组,下调PRP基因抑制促黄体生成素(luteinizing hormone,LH)刺激产生睾酮的效应($P<0.05$)。**结论** 成功制备了PRP RNAi重组慢病毒,对其功能初步研究显示,PRP不仅与睾丸间质细胞增殖有关,而且参与睾酮产生。

【关键词】 proliferin相关蛋白;慢病毒;睾酮;间质细胞
【中图法分类号】 R394-33;R394.2 **【文献标志码】** A

Preparation of proliferin related protein gene RNAi recombinant lentivirus and its biological function

Zhao Lina[1], Hao Jie[2], Hu Jiangang[3], Lu Zhilan[1], Wang Qi[1], Wang Limin[1], Yu Qiubo[1], Wang Yingxiong[3], Li Gang[1] ([1]Department of Toxicology, College of Public Health, [2]Center of Experimental Research, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [3]Department of Neurosurgery, Dazu People's Hospital, Chongqing, 402360, China)

【Abstract】 **Objective** To prepare the proliferin related protein (PRP) RNAi recombinant lentivirus and study the biological function of PRP gene. **Methods** Expression of PRP gene was inhibited with mRNA. Effectively packaged lentivirus was selected to transfect TM3 interstitial cells. Transfection experiments were divided into TM3-negative control group (transfected with pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR-negative control plasmid) and 3 plasmid-interfering groups (groups A, B and C transfected with pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-PRP-plasmids A, B and C). Effect of lentivirus on PRP gene expression was detected by RT-PCR and Western blotting, respectively. Proliferation of TM3 cells was assayed by MTT and production of testosterone in TM3 cells was detected by ELISA. **Results** PRP RNAi recombinant lentivirus was successfully prepared as confirmed by sequencing. The expression level of PRP mRNA and protein in TM3 cells was significantly lower in groups A and B than in control group ($P<0.05$). MTT assay showed that the proliferation of TM3 cells was faster when the expression of PRP gene was inhibited ($P<0.01$). In addition, down-regulation of PRP gene expression inhibited the LH-stimulated production of testosterone ($P<0.05$). **Conclusion** PRP RNAi recombinant lentivirus can be successfully prepared. PRP gene is not only related with the proliferation of interstitial cells but also participates in the production of testosterone.

【Key words】 proliferin-related protein; lentivirus; testosterone; interstitial cells

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300422, 30772346, 30901062) and the Program of Educational Commission of Chongqing (KJ070320). Corresponding author: Li Gang, Tel: 86-23-68485778, E-mail: lg168sn@sina.com

【基金项目】 国家自然科学基金(30772346,30300422,30901062);重庆市教委科技项目(KJ070320)
【通信作者】 黎 刚,电话:(023)68485778,E-mail:lg168sn@sina.com

哺乳动物和灵长类胎盘产生大量激素,包括催乳素 prolactin(PRL)家族等[1-4]。Proliferin related protein(PRP)即是PRL家族成员之一,Linzer等[5]于1985年首次报道发现PRP表达于小鼠胎盘。以往的研究报道认为,睾丸、心、肝、肾脏等组织器官均无PRP基因表达。本课题组前期实验中偶然发现PRP表达于雄性睾丸,原位杂交、免疫组化结果表明PRP定位于睾丸间质细胞(另文发表),但其功能不明,是否与细胞增殖及间质细胞的主要功能—睾酮产生有关有待研究。因此,本研究拟制备慢病毒,通过miRNA RNAi方式下调TM3睾丸间质细胞株PRP基因表达,初步探讨PRP在睾丸间质细胞中扮演的角色。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

BLOCK-iT™ HiPerform™ Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System with EmGFP与Trizol试剂购于Invitrogen公司。胎牛血清、DMEM培养基购于Hyclone公司。抗PRP单克隆抗体购自Santa Cruz公司。Real-time PCR相关试剂购自TaKaRa公司。蛋白提取Kit, BeyoECL Plus Western blot检测kit购自碧云天公司。

1.2 细胞培养

293FT细胞(invitrogen)培养于含10% FBS DMEM培养基,TM3睾丸间质细胞株培养于含10% FBS F12-DMEM培养基。293FT与TM3细胞均置于37℃,含5% CO_2培养箱,每天换液1次。

1.3 RT-PCR

用Trizol试剂提取细胞RNA,并进行质量鉴定。用Primer 5软件进行引物设计,PRP(NM_011120)引物 sense:5′-CACCCATAAATGCCAGTGAGG-3′,antisense:5′-CTCCGTACTCTTGTGCAAATCT-3′,预期片段长度为179 bp;β-actin引物 sense:5′-TCGTGCGTGACATCAAAGAG-3′, antisense:5′-CAAGAAGGAAGGCTGGAAAA′,预期片段长度为177 bp。用PrimeScript® RT Enzyme(Takara)进行20 μl体系逆转录反应。取1 μl逆转录产物进行PCR反应(SYBR® PrimeScript® RT-PCR Kit),体系如下:12.5 μl SYBR® Premix Ex Taq™,0.5 μl上、下游引物(10 μmol/L),1 μl cDNA,加水至总体积为25 μl。反应条件如下:94 ℃,1 min;40个PCR循环:94 ℃ 10 s;58 ℃ 15 s;72 ℃ 15 s。

1.4 Western blot

采用蛋白质提取试剂盒提取培养细胞的总蛋白,用BCA蛋白定量检测试剂盒测定蛋白含量,取50 μg总蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转移至PVDF膜,奶粉封闭后加入1∶1 000稀释大鼠抗小鼠PRP mAb或兔抗鼠β-actin抗体4 ℃过夜,漂洗后1∶2 000辣根过氧化物酶标记羊抗鼠或羊抗兔二抗37 ℃ 1 h,BeyoECL Plus化学发光试剂显色,检测。

1.5 PRP RNAi重组慢病毒制备

1.5.1 RNAi慢病毒质粒载体的构建及测序 根据PRP基因信息,利用Invitrogen公司网站 www.rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress在线设计3对miRNA RNAi序列,分别针对PRP基因189~209bp、286~306 bp、494~514 bp(下划线处),以进行有效序列筛选,随后选择最有效序列进行病毒制备。序列如下:A-PRP-RNAi- up:5′-TGCTGAAACAAGTCCTTCAGATCACTGTTTTGGCCACTGACTGACAGTGATCTAGGACTTGTTT-3′,A-PRP- RNAi-down:5′-CCTGAAACAAGTCCTAGATCACTGTCAGTCAGTGGCCAAAACAGTGATCTGAAGGACTTGTTTC-3′;B-PRP-RNAi-up:5′-TGCTGTATTGAACGTCTCTGAAGAGAGTTTTGGCCACTGACTGACTCTCTTCAGACGTTCAATA-3′,B-PRP-RNAi-down:5′-CCTGTATTGAACGTCTGAAGAGAGTCAGTCAGTGGCCAAAACTCTCTTCAGAGACGTTCAATAC-3′; C-PRP-RNAi-up:5′-TGCTGCATTCTGGCAAAGCACTGAGTGTTTTGGCCACTGACTGACACTCAGTGTTGCCAGAATG-3′, C-PRP-RNAi-down:5′-CCTGCATTCTGGCAACACTGAGTGTCAGTCAGTGGCCAAAACACTCAGTGCTTTGCCAGAATGC-3′。序列由上海生工合成。合成的寡核苷酸95 ℃ 4 min,冷却到室温,退火形成双链核苷酸。随后室温下进行连接反应,在20 μl反应体系中,依次加入4 μl 5×连接缓冲液,2 μl pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR质粒,10 nmol/L双链核苷酸,1 μl T_4 DNA连接酶,9 μl去酶水。充分混匀后室温反应5 min后置于冰上。取2 μl反应产物转化TOP10感受态细胞,在含壮观霉素的LB固体培养皿中培养16 h后挑选阳性克隆,摇菌过夜。克隆菌液直接测序鉴定。

1.5.2 筛选有效的干扰序列 转染前1 d将TM3细胞接种到6孔细胞培养板中,每孔接种1×10^5个细胞,待细胞密度为80%~90%时进行转染实验。转染实验分为TM3-negative对照组:转染pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR- neg control质粒;以及A、B、C 3个干扰质粒组。按照Lipofectamine 2000转染试剂盒说明进行操作,转染48 h后分别收集细胞,提取RNA,RT-PCR检测PRP表达情况。

1.5.3 慢病毒包装 利用Gateway技术,将PRP- pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR质粒中PRP-miR RNAi cassette通过BP/LR反应转移到产毒质粒pLenti6.4/R4R2/V5-DEST,随后pLenti6.4/R4R2/V5-DEST-PRP-miR RNAi与辅助载体一起转染293FT细胞进行包装。将包装好的病毒颗粒超速离心收集,-80 ℃保存。培养293FT细胞于96孔板,加入梯度稀释后病毒颗粒,8 h后更换含10% FBS的培养液继续培养,倒置荧光显微镜下计数含GFP细胞,病毒滴度为表达GFP的细胞数乘以相应稀释倍数。miR RNAi阴性对照质粒同上进行慢病毒包装,产生miR RNAi阴性对照慢病毒。

1.5.4 慢病毒的RNA干扰效率检测 当TM3细胞密度为80%~90%,进行转染实验;分为TM3-NC对照组:转染miR-negative control慢病毒;TM3-PRP-RNAi组:转染PRP-miR-RNAi慢病毒组。每组加入培养基200 μl,再根据组别加入培养基或病毒液各50 μl(相当于MOI值为25),培养48 h后收集各孔细胞的RNA和总蛋白,测定PRP基因和蛋白表达情况。

1.6 MTT实验

TM3-NC组细胞与TM3-PRP-RNAi组细胞按1×10^4/孔接种于96孔板,加入0.1 ml培养液,于接种后24、48 h使用MTT法检测各组细胞的A570 nm值($n=3$),比较细胞增殖情况。

1.7 LH刺激对睾酮产生的影响

TM3-NC与TM3-PRP-RNAi细胞培养于6孔板,培养至48 h时收集培养上清,测定2组细胞基础睾酮分泌量。为研究

促黄体生成素(luteinizing hormone,LH)刺激对睾酮产生的影响,TM3-NC 与 TM3-PRP-RNAi 细胞至 36 h 时,加入 25 mg/L LH 继续培养 12 h,同前取培养上清。睾酮测定按照试剂盒说明进行。

1.8 统计学分析

运用 SAS 9.1 统计软件进行实验数据分析,2 组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 慢病毒质粒鉴定

通过测序,合成的核苷酸片段连入 pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR 载体,序列正确,没有碱基缺失、替换等,质粒构建成功。

2.2 miRNA RNA 干扰序列的筛选

pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR 慢病毒质粒 1~3 转染 TM3 细胞后,RT-PCR 检测 PRP,3 组干扰效率分别为约 35.5%,47.9%,80.6%,其中 pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR- PRP-A 干扰效果最佳,用于后续慢病毒制备。

2.3 慢病毒的生产和鉴定

重组慢病毒质粒 pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-PRP-A 和慢病毒包装质粒混合物共转染 293FT 细胞 24~48 h 呈现高强度荧光,表明病毒包装成功(图 1),病毒液过滤、浓缩后测定病毒滴度为 1.5×10^7 TU/ml,可用于后续实验研究。

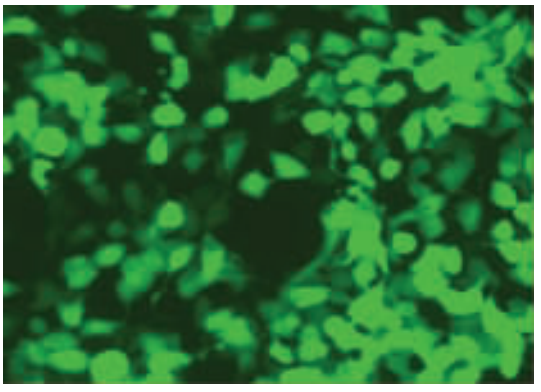


图 1 转染后 48 h 293FT 细胞包装产生 PRP RNAi 慢病毒情况 (荧光显微镜 ×100)

2.4 慢病毒干扰效率测定

慢病毒转染 TM3 后(图 2),RT-PCR 和 Western blot 检测 TM3-NC 与 TM3-PRP-RNAi 组细胞 PRP 表达,以 TM3-NC 组为 100%,TM3-PRP-RNAi 组 mRNA 相对表达量为(4.22 ± 1.63)%,蛋白表达量为(17.00 ± 4.58)%。可见 PRP-RNAi 组细胞 PRP mRNA 与蛋白,特别是 mRNA 表达受到明显抑制($P<0.01$)(图 3)。

2.5 下调 PRP 表达促进细胞增殖

MTT 结果显示,在 24 h 与 48 h 时检测,TM3-NC 组在 24、48 h 的细胞存活率为 100%,24、48 h 时,TM3-PRP-RNAi 组的细胞存活率分别为(135.44 ± 4.88)%、(150.41 ± 9.86)%。TM3-PRP-RNAi 组细胞增殖活性均明显高于 TM3-NC 组细胞($P<0.01$),提示下调 PRP 后,TM3 增殖速度加快,也即 PRP 具有抑制细胞生长的作用。

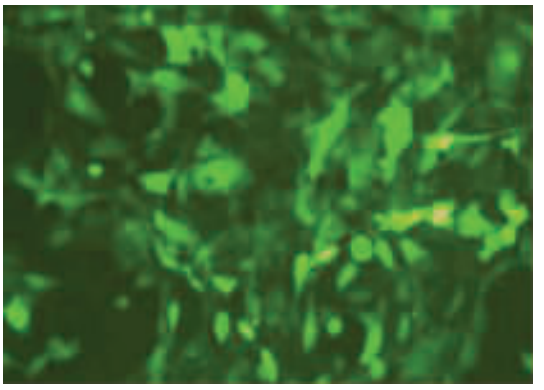
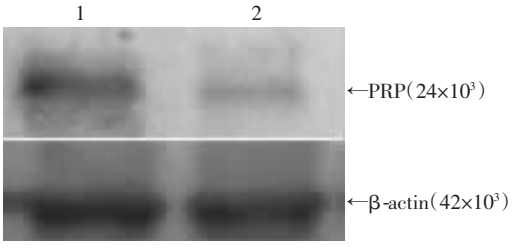


图 2 转染后 48h PRP RNAi 重组慢病毒转染 TM3 细胞的情况 (荧光显微镜 ×100)



1:TM3 细胞转染 miR RNAi 阴性对照慢病毒 48 h 组 2:TM3 细胞转染 PRP miR RNAi 慢病毒 48 h 组

图 3 重组 PRP miR RNAi 慢病毒显著抑制 TM3 细胞 PRP 蛋白表达的 Western blot 检测结果

2.6 下调 PRP 基因不影响睾酮基础水平,但减弱 LH 诱导的睾酮产生

通过测定 TM3-PRP-RNAi 组与 TM3-NC 组细胞基础睾酮水平,发现二者差异无统计学意义。TM3 细胞表达 LHR,可以在 LH 刺激下产生睾酮,因此我们通过 25 mg/L LH 刺激 12 h 后,发现 TM3-NC 组与 TM3-PRP-RNAi 组细胞睾酮水平均增加,LH 刺激前,TM3-NC 组和 TM3-PRP-RNAi 组睾酮水平分别为(0.57 ± 0.07)、(0.60 ± 0.05) ng/10^6 细胞,LH 刺激后,两组睾酮水平增加到(1.13 ± 0.66)、(0.91 ± 0.08) ng/10^6 细胞,但前者增加幅度更大。

3 讨论

本研究采用 BLOCK-iT™ HiPerform™ Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System with EmGFP(Invitrogen),以 miRNA 方式干扰 PRP 基因表达。miRNA 干扰技术是合成有茎环结构的 miRNA 前体(pre-miRNA),通过转染细胞后,由细胞自身的 Dicer 酶进行切割,形成成熟 miRNA。该技术干扰效率较 siRNA 方式要高,有效沉默序列的筛选量要少一些。我们设计了 3 对针对 PRP 基因的 miR RNAi 序列,成功构建了 3 个慢病毒质粒,干扰效率分别为约 35.5%、47.9%、80.6%,也证实了通过 miRNA 方式进行基因干扰的有效性。其中 pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-PRP-A 干扰效果最佳,用于后续慢病毒制备。通过包装、浓缩,病毒滴度

可达 1.5×10^7TU/ml。

慢病毒颗粒随后被用于TM3间质细胞转染，Real-time PCR和Western blot检测PRP基因其表达，结果显示其受到明显抑制，干扰效率远高于常规质粒转染，表明慢病毒介导RNAi的高效性。鉴于慢病毒载体具有免疫反应小，能感染非分裂细胞和分裂细胞，细胞转导效率高等优点[6-9]，PRP RNAi慢病毒颗粒成功制备为深入研究间质细胞PRP基因功能提供了一个良好的平台。

目前已知的PRP主要功能是调控妊娠过程。哺乳动物胎盘形成的共同形式是具侵袭能力的滋养层细胞侵袭入母体，并与母体血液循环建立直接的对话。这些滋养层细胞表达与其侵袭功能相适应的激素、蛋白酶、黏附分子和生长因子等，使其侵袭适度，否则因侵袭不足或侵袭过度可能导致流产、先兆子痫、宫内胎儿生长迟缓等。PRP是调控滋养层适度侵袭的重要因素之一，被认为是强抗血管生成的激素[10-11]。高表达于妊娠后期，和妊娠后期胎盘生理功能相对应[5,12]。由于PRP被认为表达仅存在于雌性胎盘，因此，尽管此基因发现至今已有20多年，但一直被排除在雄性之外，直接的实验研究仅见于几篇文献报道[5,10-14]。而PRP表达于雄性睾丸提示PRP不仅在雌性妊娠中发挥效应，在雄性生殖中可能也具有重要作用。因此，在成功制备PRP RNAi慢病毒基础上，我们首先利用MTT实验分析了24、48 h细胞增殖情况，结果显示PRP表达抑制的TM3细胞增殖活性高于阴性慢病毒对照处理组，说明PRP具有抗细胞增殖的作用，并可能参与到睾丸间质细胞的增殖过程。

睾丸间质细胞的主要功能是产生睾酮，与性功能维持、精子发生与成熟等生理过程密切相关[15]。间质细胞的睾酮产生功能受到体内、体外诸多因素的调控。LH可以刺激睾酮产生，其机制包括调节LHR表达，上调睾酮合成限速步骤StAR基因表达等[16-17]。PRP是否影响LH刺激睾酮产生值得研究。我们测定了不同处理条件下PRP表达情况，结果表明下调PRP不改变TM3细胞基础睾酮水平，LH均能刺激TM3-NC细胞与TM3-PRP-RNAi细胞睾酮产生增加，但前者增加幅度更大，说明下调PRP减弱LH刺激TM3细胞睾酮产生的效应。综合这些结果说明PRP同睾酮产生存在关联，可以改变外界刺激间质细胞的睾酮产生功能。

综上，本研究采用慢病毒介导RNAi方式，成功制备重组慢病毒，为进一步深入研究PRP基因奠定了基础。对其功能研究显示，PRP基因参与细胞增殖分化，并且参与LH调节睾酮产生过程。对PRP在睾丸间质细胞中功能的研究，将予雄性生殖内分泌以新的信息。

参考文献：

[1] Bachelot A, Binart N. Reproductive role of prolactin[J]. Reproduction, 2007, 133(2): 361-369.

[2] Soares M J, Konno T, Alam S M. The prolactin family: effectors of pregnancy-dependent adaptations[J]. Trends Endocrinol Metab, 2007, 18(3): 114-121.

[3] Ben-Jonathan N, LaPensee C R, LaPensee E W. What can we learn from rodents about prolactin in humans?[J]. Endocr Rev, 2008, 29(1): 1-41.

[4] Haig D. Placental growth hormone-related proteins and prolactin-related proteins[J]. Placenta, 2008, 29 Suppl A: S36-S41.

[5] Linzer D I, Nathans D. A new member of the prolactin-growth hormone gene family expressed in mouse placenta[J]. EMBO J, 1985, 4(6): 1419-1423.

[6] Nanou A, Azzouz M. Gene therapy for neurodegenerative diseases based on lentiviral vectors[J]. Prog Brain Res, 2009, 175: 187-200.

[7] Dissen G A, Lomniczi A, Neff T L, *et al*. In vivo manipulation of gene expression in non-human primates using lentiviral vectors as delivery vehicles[J]. Methods, 2009, 49(1): 70-77.

[8] Manjunath N, Wu H, Subramanya S, *et al*. Lentiviral delivery of short hairpin RNAs[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2009, 61(9): 732-745.

[9] 庞浩，刘昌峨，刘勤，等. 慢病毒介导的CYP3A11基因knock-down小鼠的建立[J]. 第三军医大学学报，2010，32(5)：422-426.

[10] Jackson D, Volpert O V, Bouck N, *et al*. Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein[J]. Science, 1994, 266(5190): 1581-1584.

[11] Bengtson N W, Linzer D I. Inhibition of tumor growth by the antiangiogenic placental hormone, proliferin-related protein[J]. Mol Endocrinol, 2000, 14(12): 1934-1943.

[12] Colosi P, Swiergiel J J, Wilder E L, *et al*. Characterization of proliferin-related protein[J]. Mol Endocrinol, 1988, 2(6): 579-586.

[13] Toft D J, Linzer D I. Identification of three prolactin-related hormones as markers of invasive trophoblasts in the rat[J]. Biol Reprod, 2000, 63(2): 519-525.

[14] Yamaguchi M, Imai T, Maeda T, *et al*. Cyclic adenosine 3′,5′-monophosphate stimulation of placental proliferin and proliferin-related protein secretion[J]. Endocrinology, 1995, 136(5): 2040-2046.

[15] Walker W H. Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis[J]. Steroids, 2009, 74(7): 602-607.

[16] Ma X, Dong Y, Matzuk M M, *et al*. Targeted disruption of luteinizing hormone beta-subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(49): 17294-17299.

[17] Manna P R, Chandrala S P, Jo Y, *et al*. cAMP-independent signaling regulates steroidogenesis in mouse Leydig cells in the absence of StAR phosphorylation[J]. J Mol Endocrinol, 2006, 37(1): 81-95.

（收稿 2010-11-03 修回 2010-11-28）

（编辑 王 红）