论著

文章编号:1000-5404(2011)21-2252-04

RPS14基因重组慢病毒载体的构建及其在MUTZ-8细胞中的表达

罗 静,蒋 文,刘 林,王 利 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院血液科)

[摘要] **目的** 构建携带人RPS14基因重组慢病毒载体获得稳定产毒的细胞,并观察其在人MDS细胞株MUTZ-8细胞中的表达。**方法** 通过反转录方法,获得目的基因RPS14;将目的基因克隆入慢病毒表达质粒pGC-FU Vector,构建含有RPS14基因的重组慢病毒载体pGC-FU RPS14,经PCR、酶切及测序鉴定其正确性;在Lipofectamine 2000介导下,将成功构建的质粒pGC-FU RPS14与慢病毒包装质粒pHelper 1.0、pHelper 2.0共转染293T细胞,通过实时定量PCR法测定病毒滴度,并将获得的重组慢病毒载体pGC-FU RPS14转染人MDS细胞株MUTZ-8,用流式细胞仪检测转染效率,RT-PCR检测靶细胞内RPS14 mRNA的表达。**结果** 含有RPS14基因的重组慢病毒载体经PCR、酶切和测序鉴定构建正确,且测定的病毒滴度为2.0×10^9 TU/ml。流式细胞仪检测其转染效率为68.41%,RT-PCR检测到转染后RPS14 mRNA在靶细胞中的稳定表达。**结论** 构建了携带人RPS14基因的慢病毒载体,转染人MUTZ-8细胞株后能够稳定表达RPS14基因。

[关键词] RPS14基因;慢病毒载体;骨髓增生异常综合征

[中图法分类号] R394-33; R394.3; R552.02 [文献标志码] A

Construction of RPS14 recombinant lentiviral vector and its expression in MUTZ-8 cells

Luo Jing, Jiang Wen, Liu Lin, Wang Li (Department of Hematology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct a recombinant lentiviral vector carrying RPS14 gene, establish a stable packaging 293T cell lines, and observe RPS14 expression in human MDS cell line MUTZ-8. **Methods** RPS14 was obtained using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Then the RPS14 gene was cloned into a lentiviral vector pGC-FU to construct a recombinant lentiviral vector carrying RPS14 gene named pGC-FU RPS14, which was confirmed by PCR, restriction enzyme digestion and DNA sequencing. With the help of Lipofectamine 2000, 293T cells were cotransfected with pGC-FU RPS14, pHelper 1.0 and pHelper 2.0. The titer of the virus was examined by real-time PCR. pGC-FU RPS14 was used to transfect human MDS cell line MUTZ-8. The transfection efficiency and RPS14 mRNA expression were detected by flow cytometry and RT-PCR, respectively. **Results** The recombinant lentiviral vector pGC-FU RPS14 was confirmed to be correctly constructed by PCR, restriction enzyme digestion and DNA sequencing; the assayed titer of virus was 2.0×10^9 Tu/ml. The transfection efficiency was 68.41%, and stable expression of RPS14 mRNA in MUTZ-8 cells was detected by RT-PCR. **Conclusion** A lentiviral vector carrying RPS14 gene is successfully constructed, which can deliver RPS14 gene into human MDS cell line MUTZ-8 for RPS14 stable expression.

[**Key words**] RPS14; lentiviral vector; myelodysplastic syndrome

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China(30971277). Corresponding author: Wang Li, Tel:86-23-89012014, E-mail: liwangls@yahoo.com

骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)是1组起源于多能造血干/祖细胞的异质性恶性血液病,以高风险向急性白血病转化为其特征。本病的发病机制尚未阐明,缺乏有效的治疗手段,即使对高危组患者行异基因造血干细胞移植,其疗效仍不理想,平均生存期仅5~12个月。因此探索MDS的发病机制,寻找MDS的有效治疗手段具有重要意义。

染色体缺失是血液系统肿瘤中最常见的遗传学改变,染色体的缺失的发生与一个或数个肿瘤抑制基因相关,这些抑癌基因通过单倍剂量不足导致肿瘤的发生[1]。近几年研究发现,单倍剂量不足是恶性血液病发生的分子基础之一[2]。MDS最常见的染色体缺失是5号染色体长臂的缺失,所有伴有del(5q)的MDS患者染色体缺失区域均含有5q31-5q32区带,称为共缺失区域(common delete region, CDR)。研究发现该区域没有基因突变,仅有数个基因及micro RNA表达量下降,提示这几个基因通过单倍剂量不足导致了

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30971277)

[通信作者] 王 利,电话:(023)89012014,E-mail:liwangls@yahoo.com

MDS的发生[3]。核糖体蛋白S14(ribosomal protein S14,RPS14)基因位于该区域,在MDS患者DNA中表达量降低,由此我们假设,RPS14单倍剂量不足与MDS发生、发展可能有关,尤其在伴del(5q)的MDS发生中起着重要作用。本实验旨在利用慢病毒载体系统成功构建携带RPS14基因的重组慢病毒,以探讨RPS14基因在MDS发生、发展中的作用,为寻找MDS新的有效的治疗手段奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

细菌、细胞和质粒:慢病毒载体系统由上海吉凯基因化学技术有限公司提供,由pGC-LV载体、pHelper 1.0载体和pHelper 2.0载体三质粒组成,大肠埃希菌DH5α、293T细胞本室保存,MUTZ-8细胞株由德国DMSZ研究所HG Drexler教授惠赠。主要试剂:限制性内切酶*Age* Ⅰ,上海吉凯基因化学技术有限公司;*Taq* polymerase, Sinobio; Primer,捷瑞生物; dNTP, TaKaRa; Plasmid抽提Kit, Qiagen公司; Lipofectamine 2000, Invitrogen公司; In-Fusion™ PCR Cloning Kit ,clontech公司;琼脂糖,赛百盛公司;DMEM,胎牛血清GIBCO公司。

1.2 方法

1.2.1 引物的合成引物的设计与合成 根据pGC-FU Vetcor的要求在目的基因引物中加入*Age* Ⅰ酶切位点ACCGGF:上游引物5′-GAGGATCCCCGGGTACCGGTCGCCACCATGGCACCTCGAAAGGGG-3′;下游引物R:5′-TCACCATGGTGGCGACCGGCAGACGGCGACCACGGCG-3′,产物大小为499bp;上述引物由上海生工生物技术有限公司合成。

1.2.2 重组慢病毒载体质粒的构建 采用PCR技术扩增目的基因RPS14,PCR反应条件:94 ℃预变性5 min后,94 ℃变性30 s,55 ℃退火30 s,72 ℃延伸1 min,共30个循环,最后再于72 ℃延伸10 min。用*Age* Ⅰ酶切载体pGC-FU-EGFP,琼脂糖电泳分离纯化。将PCR产物、酶切后的慢病毒载体,In Fusion交换酶及10×In Fusion交换酶缓冲液与ddH_2O加入反应体系,于25 ℃反应30 min,再于42 ℃反应15 min制备克隆交换液,转化DH5α。PCR鉴定细菌阳性克隆,所用的上游引物序列为:GGGTCAATATGTAATTTTCAGTG,下游引物序列:CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG,PCR反应条件:94 ℃预变性2 min;94 ℃变性30 s;60 ℃退火30 s;72 ℃延伸50 s,共30个循环;最后72 ℃延伸6 min。所构建载体送往上海生工生物技术有限公司测序。

1.2.3 慢病毒的包装 用LB培养液扩增转化菌DH5α,Plasmid抽提盒提取pGC-FU-RPS14、包装质粒pHelper 1.0、pHelper 2.0的DNA。转染前24 h,用胰蛋白酶消化对数生长期的293T细胞,以含体积分数10%血清的培养基调整细胞密度为6.0×10^8/L,重新接种15 cm细胞培养皿,37 ℃、体积分数5% CO_2培养箱内培养24 h,待细胞达70%~80%融合时即可用于转染。转染前24 h将细胞培养基更换为无血清培养基。应用pGC-FU-RPS14 20 μg,pHelper1.0载体15 μg,pHelper2.0载体10 μg,与相应体积的Opti-MEM混合均匀,调整总体积为2.5 ml,按Invitrogen公司Lipofectamine2000使用说明进行共转染包装细胞293T细胞,细胞转染后8 h更换为完全培养基,培养48 h后观察,出现强绿色荧光并有细胞融合现象时,收集含慢病毒颗粒的细胞上清液,对其浓缩后得到高浓度的慢病毒浓缩液,分装后保存在病毒管中,-80 ℃保存。

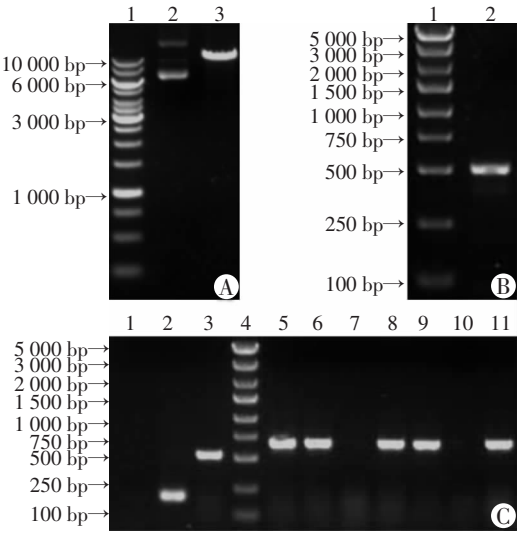
1.2.4 慢病毒的滴度测定 实时荧光定量PCR检测病毒滴度:病毒原液按倍比稀释后,转染293T细胞4d后,抽提细胞总RNA,反转录获cDNA,以GFP基因引物(F:5′-TGCTTCAGCCGCTACCC-3′,R:5′-AGTTCACCTTGATGCCGTTC-3′)Actin基因引物(F:5′-GTGGACATCCGCAAAGAC-3′, R:5′-AAAGGGTGTAACGCAACTA-3′)两步法行实时荧光定量,95 ℃预变性15 s,95 ℃预变性5 s,60 ℃退火延伸30 s,共40个循环,制作溶解曲线,通过比较实验组与对照组(actin)CT值的差异来判断滴度值。

1.2.5 重组慢病毒pGC-FU RPS14在人MDS细胞株MUTZ-8细胞中的表达 将人MDS细胞株MUTZ-8接种于24孔板培养24 h后,加入感染复数(MOI值)为100的pGC-FU RPS14(实验组),同时设立不加病毒的空白对照组和pGC-FU-EGFP空载体组。分别于转染后第3~6 d于流式细胞仪上测转染效率,RT-PCR测RPS14 mRNA的表达。

2 结果

2.1 载体酶切产物的鉴定

慢病毒载体pGC-FU-EGFP行酶切,酶切产物进行2%琼脂糖凝胶电泳,电泳结果见图1A,图示第3泳道为酶切产物,在9 943 kb处有特异条带,酶切结果与预期相符,可用于随后的连接反应。目的基因PCR产物电泳结果见图1B,499 kb处有特异条带,表明已成功提取RPS14基因。RPS14重组质粒阳性克隆PCR鉴定见图1C,琼脂糖电泳可见660 bp有特异条带,与酶切鉴定PCR产物大小一致,初步确认成功构建重组质粒。取阳性克隆进一步测序,测序结果显示,pGC-FU RPS14中的RPS14序列与GenBank中正常RPS14序列完全一致,证实其可获得正确表达产物。

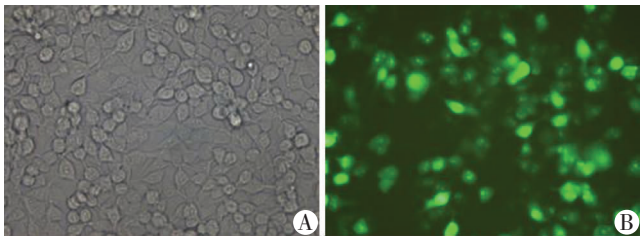


A:pGC-FU-EGFP载体酶切产物电泳结果(1:标准;2:载体;3:载体酶切产物);B:PCR获得目的基因RPS14片段电泳结果(1:标准;2:RPS14);C:PCR鉴定pGC-FU-RPS14重组阳性克隆(1:阴性对照;2:空载体对照;3:阳性对照;4:标准;5-11:RPS14转化子)

图1 载体酶切产物及pGC-FU-RPS14重组阳性克隆的鉴定结果

2.2 包装细胞293T细胞转导pGC-FU RPS14质粒后绿色荧光蛋白(EGFP)的表达

将pGC-FU RPS14质粒转染入293T细胞后,观察其荧光表达。见图2。



A:293T细胞(倒置相差显微镜 ×400);B:转染了pGC-FU RPS14的293T细胞(倒置荧光显微镜 ×400)

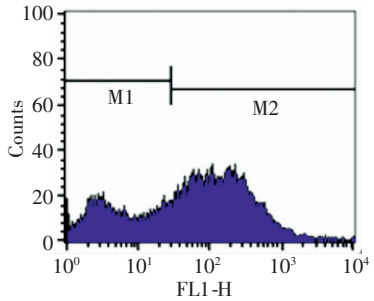
图2 pGC-FU RPS14质粒转染293T细胞24 h后EGFP表达

2.3 携带重组慢病毒的包装和病毒滴度

将构建好的质粒共转染293T细胞,成功包装表达RPS14基因和EGFP基因的慢病毒pGC-FU RPS14,经收集、浓缩病毒后实时荧光定量PCR法测定其滴度为2×10^9 Tu/ml。

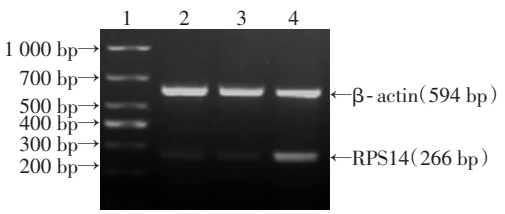
2.4 重组慢病毒载体pGC-FU RPS14成功转染人MDS细胞株MUTZ-8并持续表达

流式细胞仪检测慢病毒载体pGC-FU RPS14转染MUTZ-8后第6天转染效率为68.41%(图3)。RT-PCR检测到慢病毒载体pGC-FU RPS14转染MUTZ-8后第6天RPS14 mRNA表达量明显高于空白对照组及空载体组(图4)。



M1:无EGFP表达的细胞比例(31.68%);M2:有EGFP表达的细胞比例(68.41%)

图3 流式细胞术检测pGC-FU RPS14转染MUTZ-8细胞后第6天EGFP表达



1:标准;2:空白对照组;3:空载体pGC-FU-EGFP转染组;4:pGC-FU RPS14转染组

图4 RT-PCR检测pGC-FU RPS14转染MUTZ-8细胞后第6天RPS14 mRNA表达

3 讨论

RPS14基因是核糖体蛋白基因超家族的一员,又名核糖体蛋白S14,位于18S rRNA的3′末端,是构成核糖体40S亚基复合体的重要组成部分。RPS14基因由5个外显子和4个内含子组成,在18S rRNA的成熟及40S亚单位形成过程中起重要作用。若将RPS14基因敲除,可使18S rRNA减少,导致核糖体生物合成及蛋白翻译能力下降[4]。可见,RPS14基因核糖体形成过程中起重要作用。核糖体对维持细胞生长尤其重要,细胞的生长、增殖,对遗传毒性的反应都有赖于核糖体的正常生物活性。核糖体合成缺陷与骨髓衰竭密切相关[5]。最近斑马鱼模型研究发现,包括RPS14基因在内的多种核糖体蛋白基因,由于单倍剂量不足导致表达减少,可促进肿瘤的发生,且低水平的RPS14可增加肿瘤细胞对化疗药物的耐药性,表明RPS14基因是单倍剂量减少的抑癌基因[6]。最初引起研究者关注RPS14基因在血液系统疾病发生中的作用,是通过对RP家族中的另一成员RPS19基因的作用的阐明。RPS19基因已被公认是先天性纯红细胞再生障碍性贫血(diamond-blackfan anaemia, DBA)。RPS19基因表达减少导致造血干/祖细胞向红系分化受阻,并增加向急性白血病转变的风险[7]。RPS14基因与RPS19共属于核糖体蛋白家族,有类似作用。我们前期实验研究发现,RPS14在MDS患者中表达较健康对照组显著降低,Ceibere等[8]亦报道存在RPS14低表达的MDS患者其预后相对较好。因此,我们推测RPS14可能与MDS的发病密切相关,RPS14基因的表达量可以作为判断MDS预后的独立指标。

目前常用的病毒载体有反转录病毒、腺病毒及慢病毒载体系统。但前2种载体系统均存在一定局限性:①反转录病毒虽然具有长期表达的特点,但是只能感染分裂期细胞,不能感染未分裂细胞;②腺病毒载体不能长期稳定表达目的基因,且有较高的免疫原性。较之于前两者,慢病毒载体系统具有其明显优点[9]。慢病毒载体是以人类免疫缺陷型病毒(HIV)为基础发展起来的基因治疗载体,它对分裂细胞、非分裂细胞均有感染能力,并可在体内较长期的表达,目前已经广泛应用于基因表达调控、基因治疗等领域。且慢病毒经过包装后,可用于转染传统试剂难于转染的细胞如:悬浮细胞、原代细胞等,并能长时间的稳定表达[10]。因此本实验选择慢病毒载体感染悬浮细胞。慢病毒载体对悬浮细胞有较高的转染效率,使其在血液疾病的基因治疗方面有很好的应用前景。本实验所选用的细胞株MUTZ-8来源于1例63岁的老年女性AML-M4患者的外周血,该患者转化为白血病之前有25年的MDS病史[11]。细胞遗传学分析提示该细胞系具有5q31缺失、-7等分子生物学改变,因此MUTZ-8是我们研究血液肿瘤发生、发展机制的理想细胞模型。

本研究成功构建了含有RPS14的慢病毒载体,并

在293T细胞中检测到了其正确表达,成功感染了人MDS细胞株MUTZ-8且能稳定的表达,国内外尚少见相关报道。为进一步研究RPS14基因在MDS发病发展过程中的作用奠定了良好的实验基础,为寻找MDS新的治疗手段开拓了新思路。

参考文献:

[1] Ebert B L. Genetic deletions in AML and MDS[J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2010, 23(4): 457-461.
[2] Wong J C, Le-Beau M M, Shannon K. Tumor suppressor gene inactivation in myeloid malignancies[J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2008, 21(4): 601-614.
[3] Jadersten M, Hellstrom-Lindberg E. New clues to the molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes[J]. Exp Cell Res, 2010, 316(8): 1390-1396.
[4] Ebert B L, Pretz J, Bosco J, *et al*. Identification of RPS14 as 5q- syndrome gene by RNA interference screen[J]. Nature, 2008, 451(7176): 335-339.
[5] Danilova N, Sakamoto K M, Lin S. Ribosomal protein S19 deficiency in zebrafish leads to developmental abnormalities and defective erythropoiesis through activation of p53 protein family[J]. Blood, 2008, 112(13): 5528-5237.
[6] Lai K, Amsterdam A, Farrington S, *et al*. Many ribosomal protein mutations are associated with growth impairment and tumor predisposition in zebrafish[J]. Dev Dyn, 2009, 238(1): 76-85.
[7] Morimoto K, Lin S, Sakamoto K. The functions of RPS19 and their relationship to Diamond-Blackfan anemia: a review[J]. Mol Genet Metab, 2007, 90(4): 358-362.
[8] Czibere A, Bruns I, Junge B, *et al*. Low RPS14 expression is common in myelodysplastic syndromes without 5q- aberration and defines a subgroup of patients with prolonged survival[J]. Haematologica, 2009, 94(10): 1453-1455.
[9] 钟扬, 李靖, 黄小兵, 等. 慢病毒载体介导的人肝癌HepG2细胞BC047440基因沉默[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(8): 744-748.
[10] Matrai J, Chuah M K, VandenDriessche T. Recent Advances in Lentiviral Vector Development and Applications[J]. Mol Ther, 2010, 18(3): 477-490.
[11] Hu Z B, MacLeod R A, Meyer C, *et al*. New acute myeloid leukemia-derived cell line: MUTZ-8 with 5q-[J]. Leukemia, 2002, 16(8): 1556-1561.

(**收稿**:2011-06-14;**修回**:2011-08-31)
(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2011)21-2255-01

个案与短篇

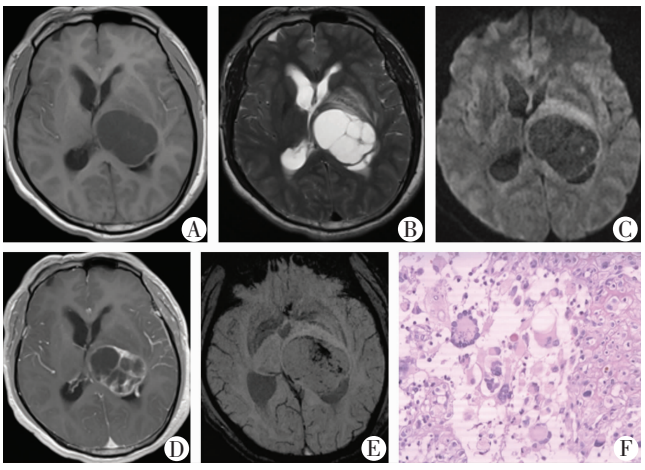
MRI诊断丘脑巨细胞型胶质母细胞瘤1例

牟忠亮[1],康厚艺[1],罗清雅[2],张伟国[1] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所:放射科[1],病理科[2])

[**关键词**] 巨细胞型胶质母细胞瘤;MRI;丘脑;诊断
[**中图法分类号**] R739.41; R445.2 [**文献标志码**] B

1 临床资料

患者,男性,41岁。因"头昏、右侧肢体无力1周"入我院。近1周出现右下肢无力,头昏、痛,呈胀痛,无眩晕、恶心、呕吐,3 d前出现行走跛行步态。体征:伸舌左偏,右侧下肢远端肌力Ⅳ+级。实验室检查未见异常。MRI检查:左侧丘脑囊实性肿块,以囊性成分为主,囊内见多发分隔,病变境界清楚,边缘尚光滑,大小约5.5 cm×4.9 cm×4.2 cm,左侧基底节区轻度水肿,左侧侧脑室及三脑室受压、变窄,中线结构向右侧移位。信号特点:T_1WI呈等低信号,T_2WI及flair像呈等高信号,DWI示囊壁为等高信号,囊液为低信号,其内见零星点状高信号显示;SWI像肿块内可见小条片状低信号,提示增生血管团;增强扫描囊壁、分隔及壁结节均明显强化。由于病变囊变明显,与侧脑室关系密切且周围水肿较轻,MR诊断为室管膜瘤。入院后第5天在全麻下行左侧三角区入路脑肿瘤切除术,术中所见:肿瘤与脑室及丘脑关系密切,囊性,肿瘤包膜完整,呈白色,切开肿瘤后见其质地较软,易吸除,有部分血供,打开囊腔后见淡黄色囊液流出,行肿瘤大部分切除。术后患者神志清楚,四肢肌力较术前明显好转。病理结果:巨细胞型胶质母细胞瘤(WHO Ⅳ级)(图1)。



A: T_1WI; B: T_2WI; C: DWI; D: 增强扫描; E: SWI; F: 肿瘤组织的光镜观察 (HE ×40)

图1 丘脑巨细胞型胶质母细胞瘤的影像学表现与病理变化

2 讨论

巨细胞型胶质母细胞瘤(giant cell glioblastoma, GC)为胶质

(下转2264页)

[**通信作者**] 张伟国,电话:(023)68757621