

慢病毒介导的shRNA干扰人HepG2.2.15细胞Akt2基因表达的研究

刘洋¹, 芦琳琳^{2,3}, 杜水仙¹, 宣世英^{1,2,4}, 辛永宁^{1,2,4} (1.青岛大学医学院附属青岛市市立医院, 山东 青岛 266011; 2.青岛市消化疾病重点实验室, 山东 青岛 266071; 3.青岛市市立医院 中心实验室, 山东 青岛 266071; 4.青岛市市立医院 消化内二科, 山东 青岛 266011.)

摘要: 目的 针对Akt2基因构建shRNA慢病毒干扰载体并评价慢病毒介导的RNA干扰在人HepG2.2.15中的基因沉默效应。方法 设计Akt2的RNAi寡聚核苷酸序列, 利用慢病毒载体构建Akt2的shRNA载体, 转染入大肠埃希菌并观察重组表达状况, 利用293T细胞包装得到重组腺病毒, 以绿色荧光蛋白(GFP)作为标记, 逐孔稀释法确定转染效率及滴度, 以实时荧光定量法比较各组对Akt2 mRNA的干扰效果。结果 筛选了所构建的3个Akt2靶向序列, 包装shRNA慢病毒后转染HepG2.2.15细胞, 慢病毒转染后的沉默效率可达85%, 比较得出沉默效率最高的靶序列和工作条件。结论 本研究成功构建并筛选了针对Akt2的shRNA慢病毒载体, 有效抑制HepG2.2.15细胞中Akt2 mRNA的表达。

关键词: Akt2; shRNA; 慢病毒; HepG2.2.15

Interference of shRNA on Akt2 in human HepG2.2.15 cell mediated by lentivirus

LIU Yang¹, LU Lin-lin^{2,3}, DU Shui-xian¹, XUAN Shi-ying^{1,2,4}, XIN Yong-ning^{1,2,4} (1.Qingdao Municipal Hospital, School of Medicine, Qingdao University, Qingdao 266011, Shandong Province, China; 2.Digestive Disease Key Laboratory of Qingdao, Qingdao 266071, Shandong Province, China; 3.Central Laboratories, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266071, Shandong Province, China; 4.Department of Gastroenterology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, Shandong Province, China).

Abstract: Objective To construct the shRNA interference lentivirus vector for Akt2 and evaluate its effects on human HepG2.2.15 cell mediated by lentivirus. **Methods** RNAi sequences for Akt2 were designed using bioinformatics methods. Lentiviral vectors, expressed in *E.coli* and packaged by 293T cells, were used to construct the Akt2 shRNA vectors. Dilution method was applied to measure the transfection efficiency and titer according to the green fluorescent protein (GFP) tracer. Real-time fluorescence quantitative method were used to measure the interference effects of target sequences. **Results** Three Akt2 targeting sequences were constructed and their corresponding shRNA lentiviral vectors were screened for efficiency. One Akt2 shRNA lentiviral vector was screened by transient transfection (interference efficiency reached 85%) as the best efficiency and its working condition was established as well. **Conclusion** Akt2 shRNA lentiviral vectors was successfully constructed and screened, which can inhibit the expression of Akt2 in human HepG2.2.15 cell effectively.

Key words: Akt2; shRNA; Lentivirus; HepG2.2.15

慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)是由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)引起的肝脏炎症, 中国是CHB高发国家, HBV携带者人数约1.2亿。目前治疗CHB的方法主要是抑制病毒复制, 无法从根本上清除及杀死病毒, 约25%未积极治疗的患者将发展为肝硬化和肝癌^[1,2]。由于HBV

基因组大小不到3.3 kb, 仅编码数个蛋白和非编码RNA, 潜在可供开发的药物靶点极其有限。因此, 仅基于HBV自身靶点的抗-HBV治疗研究存在极大的局限性^[3], 宿主因子将成为新型的有效抑制HBV的潜在作用靶点。

自噬(autophagy)是指吞噬自身细胞质蛋白或细胞器, 并使其进入囊泡, 与溶酶体结合, 最终降解内容物的过程。自噬作用与许多肿瘤的发生和发展有关, 如肝癌、肺癌、胰腺癌等^[4-6]。自噬作为与

宿主相关的细胞因子,与病毒感染及其引发的免疫反应密切相关^[7,8]。细胞中许多蛋白激酶是自噬调控蛋白,Akt2(又称RAC-beta serine/threonine protein kinase, PKB β),是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在细胞内信号转导系统中位于P13K的下游^[9]。本研究通过采用慢病毒表达载体介导的RNA干扰技术,靶向抑制Akt2基因在HepG2.2.15细胞株中的表达,获得能稳定抑制Akt2表达的HepG2.2.15细胞株,为进一步研究Akt2基因与CHB发生发展的关系及具体作用的机制奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 HepG2.2.15细胞购自天津赛尔生物技术有限公司;慢病毒载体GV248、大肠埃希菌DH 5 α 感受态细胞、293T细胞、慢病毒载体系统购自上海吉凯基因技术有限公司;Age I、EcoR I、T4 DNA连接酶、质粒提取试剂盒、SYBR Green、胶回收试剂盒购自宝生物工程有限公司;Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司;shRNA、引物序列合成及基因测序由上海吉凯基因技术有限公司完成;DMEM培养基购自美国Hyclon公司;胎牛血清购自美国Gibco公司;兔抗人Akt2多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG抗体购自Abcam公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 HepG2.2.15细胞株、293T储存于-80℃超低温冰箱内,将细胞株复苏后接种于含10%胎牛血清、0.04% G418、1%抗生素(青霉素、链霉素)的高糖DMEM培养液中,培养于37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中。当细胞融合度达80%~90%时使用1 ml胰蛋白酶-EDTA溶液消化贴壁细胞,进行传代培养。实验时将消化好的HepG2.2.15细胞悬液传代至6孔培养板(约3×10⁵个/孔),继续上述培养,当细胞融合度达80%~90%时,进行细胞转染。

1.2.2 shRNA慢病毒载体重组质粒构建 根据siRNA序列设计原则,筛选出3条针对人Akt2基因特异性沉默位点。

1.2.3 重组慢病毒载体的构建 将双链DNA Oligo(即shRNA模板)和GV248慢病毒载体进行Age I和EcoR I双酶切,收集及连接片段,将连接后的产物转入感受态大肠埃希菌(DH 5 α)中并培养过夜,使用GV248通用引物进行菌落PCR鉴定。

1.2.4 慢病毒载体的包装及滴度测定 慢病毒质粒及两种辅助包装原件载体质粒的提取使用质粒提取试剂盒,根据Lipofectamine 2000说明书中的要求将3种质粒转入293T细胞,8小时后更换培养基,于24小时后

在倒置荧光显微镜下观察荧光表达,72小时后收集293T细胞上清液,离心过滤后获得慢病毒浓缩液,分装后保存于病毒管中,-80℃长期保存。各取10 μ l病毒原液,采用10倍孔稀释法转染293T细胞,根据各孔中GFP阳性细胞表达情况计算病毒滴度。

1.2.5 shRNA慢病毒转染HepG2.2.15细胞 使用胰酶消化HepG2.2.15细胞株,加入完全培养基后吹打至细胞均匀分布,将细胞分成3组接种于6孔板(细胞数:5×10⁴/孔)中,分别为慢病毒感染组、阴性对照组和空白对照组。培养12小时后转染慢病毒。按感染复数(multiplicity of infection, MOI)值50计算加入的干扰病毒、空病毒及聚凝胺的量,感染增强液混匀放入培养箱中继续培养。12小时后3组均更换为含15%胎牛血清的完全培养基。培养72小时后在荧光显微镜下观察细胞荧光表达情况。96小时后在慢病毒感染组、阴性对照组中更换含2.5 μ g/ml嘌呤霉素的培养基筛选出转染慢病毒的细胞。继续培养最终获得稳定转染细胞株。

1.2.6 Real-time PCR检测HepG2.2.15细胞Akt2表达水平 分别收集上述3组细胞,细胞数约为5×10⁶个,提取细胞中Akt2 RNA并逆转录为cDNA。以GAPDH为内参,进行Real-time PCR实验。使用ABI 7500 Real-time PCR系统,扩增程序为95℃ 15秒,95℃ 5秒,60℃ 15秒,72℃ 35秒,40个循环。实验重复3次,实验结果以CT值表示,以GAPDH为内参计算2^{- $\Delta\Delta C_t$} Akt2基因的相对表达量。

1.2.7 Western blot检测HepG2.2.15细胞Akt2蛋白表达水平 当阴性对照组及慢病毒转染组(Akt2 mRNA抑制最显著的一组)的HepG2.2.15细胞生长至90%融合度时,吸尽培养液并冲洗,每组加入预冷蛋白质抽提试剂,轻轻摇动5分钟。混匀后转移到离心管中,冰浴下摇动15分钟裂解。裂解液放入预冷的离心机中14000×g离心15分钟,吸取上清液保存。使用BCA蛋白质定量试剂盒进行定量检测,应用SDS-PAGE凝胶电泳80~100 V电泳1~2小时后分离出蛋白,并将其转移到硝酸纤维素膜上,用封闭液4℃封闭过夜,PBST洗膜,加入一抗,4℃封闭过夜。洗膜3次后,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(1:1000)及内参GAPDH(1:5000),37℃孵育膜1小时,回收二抗并洗膜3次,最后ECL显色。

1.3 数据分析 使用SPSS 19.0软件对Akt2 mRNA的表达量进行统计学分析,数据用均数±标准差表示,组间比较使用t检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒载体的构建及鉴定 根据靶基

因cDNA的碱基序列，设计3条siRNA靶点序列（表1）和一条无义阴性对照序列（5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'）。GV248质粒感染感受态大肠埃希菌后，经37℃过夜培养后挑取菌落，使用PCR技术对Akt2-RNAi转化子进行酶切鉴定。PCR反应体系为：上游引物：5'-CCATGATTCCTTCATATTTGC-3'，下游引物：5'-ATGTCCTTCTGCTGATACTGGG-3'。PCR凝胶电泳图如图1，4~8泳道表示阳性克隆组，其PCR产物大小约为542 bp，大于2泳道空载体对照组（约508 bp），其中24 bp从载体中切除，说明外源片段已成功插入质粒中。

2.2 慢病毒载体的包装测定 按照Lipofectamine 2000三质粒系统使用说明包装慢病毒，共转染293T细胞：将GV248-shAkt2-GFP载体和阴性对照载体分

别感染239T细胞株，48小时后荧光显微镜下观察细胞荧光表达情况，绿色荧光表达率> 95%，细胞生长状态良好，表明重组慢病毒包装成功，见图2。

2.3 筛选稳定干扰Akt2表达的细胞株 重组慢病毒感染HepG2.2.15细胞株72小时后，荧光显微镜下观察，绿色荧光蛋白阳性率为80%，经嘌呤霉素筛选后，绿色荧光蛋白阳性率可达95%以上，感染后细胞状态良好，提示能稳定干扰Akt2基因表达的HepG2.2.15细胞株构建成功，见图3。

2.4 在HepG2.2.15细胞中评价重组慢病毒载体的干扰活性

2.4.1 Real-time PCR检测HepG2.2.15细胞Akt2 mRNA表达水平 慢病毒转染组中Akt2-RNAi-1约为4.7%、Akt2-RNAi-2组中Akt2基因表达量降为对照组的38%、Akt2-RNAi-3约降为15%。阴性对照和空白对照组中Akt基因的mRNA表达量无显著性差异。3组慢病毒转染组较阴性对照组和空白对照组Akt2表达量显著降低，Akt2-RNAi-1组、Akt2-RNAi-2组、Akt2-RNAi-3组与阴性对照组相比差异均有统计学意义（*t*值分别为106.5、49.2、68.0，*P*均< 0.01）；Akt2-RNAi-1组、Akt2-RNAi-2组、Akt2-RNAi-3组与空白对照组相比，各组差异亦有统计学意义（*t*值分别为128.2、64.1、83.1，*P*均< 0.01）。其中Akt2-RNAi-1组Akt2 mRNA表达水平下降效率最高，较阴性对照组约降低91.2%（图4）。

2.4.2 Western blot检测HepG2.2.15细胞Akt2蛋白表达水平 使用β-actin作内参，将阴性对照组和Akt2-

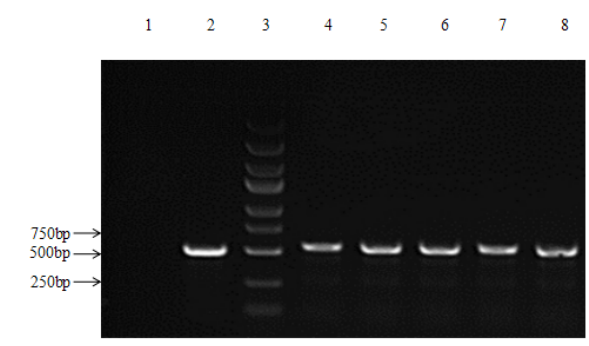


图1 Akt2-RNAi 转化子的酶切鉴定
注：1：阴性对照（ddH₂O）；2：阴性对照（空载自连对照组）；3：相对分子质量标准；4~8：Akt2-RNAi-1 转化子鉴定

表1 Akt 基因 shRNA 干扰序列及阴性对照序列

名称	shRNA 干扰序列
Akt2-RNAi-1	5'-CCGGACAAGGTACTTCGATGATGAAGTTCATCATCGAAGTACCTTGTTTTTTTG-3'
Akt2-RNAi-2	5'-CCGGCCCTTAAACAACCTCTCCGTACTCGAGTACGGAGAAGTTGTTTAAGGGTTTTTG-3'
Akt2-RNAi-3	5'-CCGGGAACAGGTTCTTCCTCAGCATCTCGAGATGCTGAGGAAGAACCTGTGCTTTTTTG-3'
GV112-NC-1	5'-CCGGTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCCGGAGAATTTTTTG-3'

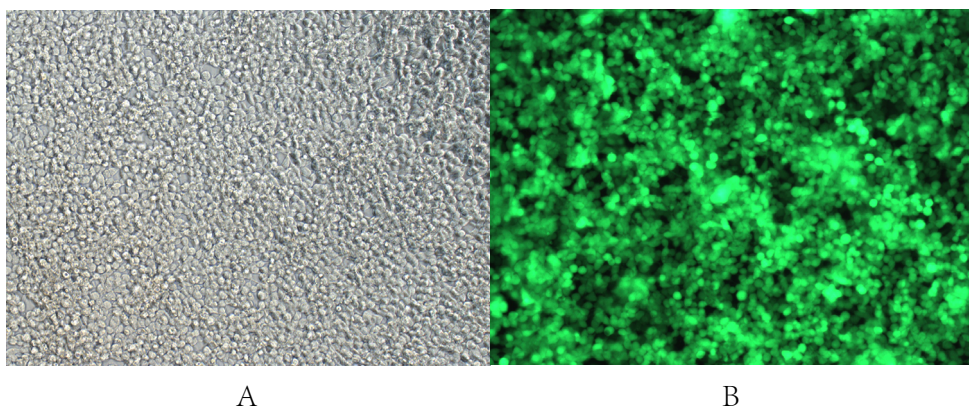


图2 病毒包装系统转染 293T 细胞 48 小时后的荧光照片（× 40）

注：A 图为白光照片；B 图为同一视野荧光照片

RNAi-1组抽提总蛋白,进行Western blot检测,并统计两组条带的灰度值,比较Akt2蛋白在两组细胞中的表达水平。Akt2-RNAi-1组中Akt2的蛋白表达量较阴性对照组明显受到抑制($P = 0.003$),蛋白表达抑制率约为93.38%,提示Akt2-RNAi-1组细胞Akt2蛋白表达被明显抑制,如图5所示。

3 讨论

乙型肝炎的治疗现仍是全球性难题,传统的治疗方法只能抑制HBV的活性和HBV DNA的复制,无法从根本上杀死病毒。研究发现,血清HBV DNA水平可反映HBV的生物学活性和复制水平,病毒载量与肝脏炎症发生及向肝纤维化进展的程度密切相关^[10,11],因此,降低血清HBV DNA水平是治疗CHB及改善CHB预后的主要方法。

研究表明,自噬对细胞活性起保护作用。自噬可通过对长寿命蛋白质及细胞器的降解和再利用调节细胞活性。Sir等^[12]发现,自噬作用对HBV DNA的复制及分泌有促进作用。Tian等^[13]研究表明,敲除小鼠的*Atg5*基因(对自噬的启动起决定作用)后,不仅血清中HBV DNA水平降低90%以上,

HBV DNA复制的中间产物水平也显著降低。

*Akt2*基因定位于人类染色体的19q13.1-q13.2,编码丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。PI3K/Akt/mTOR信号通路的激活可促进肿瘤(如肝癌、胰腺癌、结直肠癌、卵巢癌、甲状腺癌等)的发生和发展^[14-17]。研究发现,作为Akt的下游因子,mTOR是细胞自噬启动阶段的关键调节因子,其活化后可抑制自噬的发生^[18]。而PI3K/Akt/mTOR信号通路与CHB发生发展的关系及其具体作用机制尚未见报道,本研究拟通过制备有效干扰*Akt2*基因的重组慢病毒载体并转入HepG2.2.15细胞株,得到能稳定干扰*Akt2*基因的HepG2.2.15细胞株,为后续研究*Akt2*与乙型肝炎的相关性及作用机制奠定基础。

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是一种转录后基因沉默,可功能性沉默特定基因,近几年来广泛应用于多学科领域。RNAi的制备方法可分为化学合成、体内表达和体外转录3种。其中体外转录应用最为广泛^[19]。慢病毒载体感染特定细胞的方法是体外转录的一种,有高稳定性和高靶向性等优点。慢病毒载体以人类免疫缺陷型病毒(human

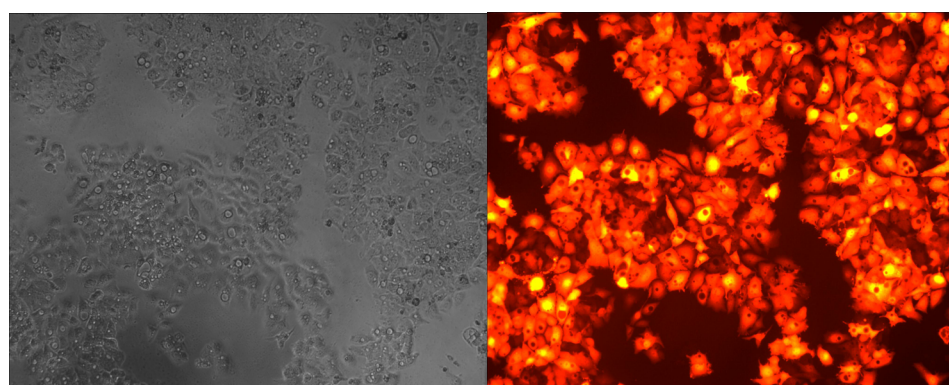


图3 病毒感染 HepG2.2.15 细胞 72 h 后的荧光照片 ($\times 100$)

注: A 图为白光照片; B 图为同一视野荧光照片

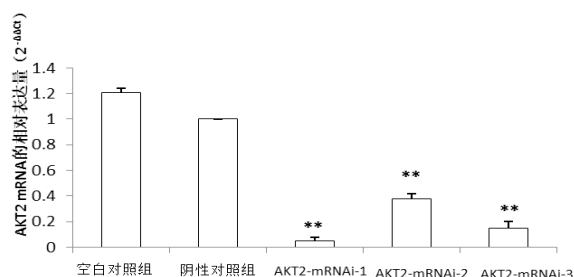


图4 RT-PCR 检测各组 Akt2mRNA 的相对表达量

注: “**”表示3组慢病毒转染组与阴性对照组和空白对照组比较, $P < 0.000$, 差异有统计学意义

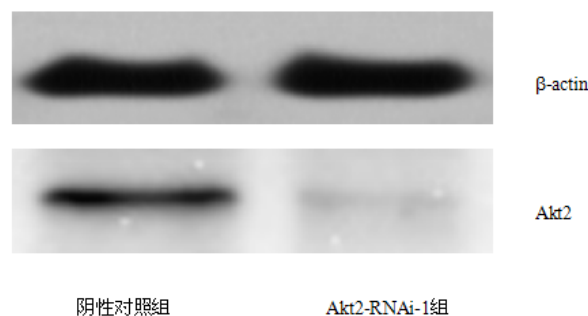


图5 Western blot 检测两组 Akt2 蛋白表达量

immunodeficiency virus, HIV)为基础发展起来。作为一种基因治疗载体,慢病毒载体的主要作用机制是:病毒基因感染到宿主细胞内,其所携带的外源基因整合到宿主细胞基因组,随着细胞的转录作用,外源基因转录出若干dsRNA。宿主细胞质中存在一种核酸内切酶Dicer,这种内切酶可将dsRNA切割成多个siRNA。siRNA具有特定的长度及结构,并可解链形成正义链和反义链。其中反义siRNA可与细胞内的某些酶结合成一种沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)^[20]。该复合物具有核酸酶的功能,可诱导RNA,其机制是与特定mRNA的互补区域特异结合,利用其核酸酶作用将mRNA切割,断裂的mRNA很快被细胞降解,从而达到明显降低特定基因表达的目的。

本研究通过慢病毒转染HepG2.2.15细胞株的方法,功能性沉默细胞中的*Akt2*基因,抑制其表达,最终RT-PCR的结果显示,3个慢病毒转染组*Akt2* mRNA的相对表达量较阴性对照组均降低超过85%,其中*Akt2*-RNAi-1组*Akt2* mRNA相对表达量降低最显著,较阴性对照组降低91.2%,且该组*Akt2*蛋白表达量也显著降低,较阴性对照组降低93.38%。说明所构建的慢病毒载体在HepG2.2.15细胞内能高效、稳定、特异地干扰*Akt2*基因表达,为后续研究*Akt2*对慢性乙型肝炎发生发展的影响及作用机制奠定了技术基础,也为乙型肝炎的基因治疗开拓了新道路。

参考文献

- [1] ZHANG X, ZHAI L, RONG C, et al. Association of ghrelin gene polymorphisms and serum ghrelin levels with the risk of hepatitis B virus-related liver diseases in a Chinese Population[J]. PLoS One, 2015, 10: e0143069.
- [2] NIU JX, MENG XK, REN JJ, et al. Studied microRNA gene expression in human hepatocellular carcinoma by microRNA microarray techniques[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21: 12605-12611.
- [3] 唐红, 陈恩强. 慢性乙型肝炎联合抗病毒治疗存在的问题和局限性[J]. 中华肝脏病杂志, 2011, 19: 82-83.
- [4] SHI YM, YANG L, GENG YD, et al. Polyphyllin I induced-apoptosis is enhanced by inhibition of autophagy in human hepatocellular carcinoma cells[J]. Phytomedicine, 2015, 22: 1139-1149.
- [5] XIE WY, ZHOU XD, LI Q, et al. Acid-induced autophagy protects human lung cancer cells from apoptosis by activating ER stress[J]. Exp Cell Res, 2015, 339: 270-279.
- [6] Mukai S, Moriya S, Hiramoto M, et al. Macrolides sensitize EGFR-TKI-induced non-apoptotic cell death via blocking autophagy flux in pancreatic cancer cell lines[J]. Int J Oncol, 2016, 48: 45-54.
- [7] Schmid D, Dengjel J, Schoor O, et al. Autophagy in innate and adaptive immunity against intracellular pathogens[J]. J Mol Med (Berl), 2006, 84: 194-202.
- [8] Jordan TX, Randall G. Manipulation or capitulation: virus interactions with autophagy[J]. Microbes Infect, 2012, 14: 126-139.
- [9] Singh SS, Yap WN, Arfuso F, et al. Targeting the PI3K/Akt signaling pathway in gastric carcinoma: A reality for personalized medicine?[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21: 12261-12273.
- [10] JIN BX, ZHANG YH, JIN WJ, et al. MicroRNA panels as disease biomarkers distinguishing hepatitis B virus infection caused hepatitis and liver cirrhosis[J]. Sci Rep, 2015, 5: 15026.
- [11] Sinn DH, Lee J, Goo J, et al. Hepatocellular carcinoma risk in chronic hepatitis B virus-infected compensated cirrhosis patients with low viral load[J]. Hepatology, 2015, 62: 694-701.
- [12] Sir D, Chen WL, Choi J, et al. Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response[J]. Hepatology, 2008, 48: 1054-1061.
- [13] Tian Y, Sir D, Kuo CF, et al. Autophagy required for hepatitis B virus replication in transgenic mice[J]. J Virol, 2011, 85: 13453-13456.
- [14] TANG H, LI RP, LIANG P, et al. miR-125a inhibits the migration and invasion of liver cancer cells via suppression of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. Oncol Lett, 2015, 10: 681-686.
- [15] WANG F, RUAN XJ, ZHANG HY. BDE-99 (2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether) triggers epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells via PI3K/Akt/Snail signaling pathway[J]. Tumori, 2015, 101: 238-245.
- [16] LIU X, LI G. MicroRNA-133b inhibits proliferation and invasion of ovarian cancer cells through Akt and Erk1/2 inactivation by targeting epidermal growth factor receptor[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8: 10605-10614.
- [17] SUN D, ZHOU R, LIU H, et al. SASH1 inhibits proliferation and invasion of thyroid cancer cells through PI3K/Akt signaling pathway[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8: 12276-12283.
- [18] YANG H, FU Q, LIU C, et al. Hepatitis B virus promotes autophagic degradation but not replication in autophagosome[J]. Biosci Trends, 2015, 9: 111-116.
- [19] LI G, MA S, SUN C. RNA interference-based therapeutics for inherited long QT syndrome[J]. Exp Ther Med, 2015, 10: 395-400.
- [20] Ku SH, Jo SD, Lee YK, et al. Chemical and structural modifications of RNAi therapeutics[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2015, doi: 10.1016/j.addr.2015.10.015. [Epub ahead of print].

收稿日期: 2016-01-07