

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20170504

PC4 基因 RNAi 慢病毒载体的构建及有效靶序列鉴定

张真中, 杨春杰, 钱三立, 李冰玉, 邹云增*

复旦大学附属中山医院上海市心血管病研究所, 上海 200032

[摘要] **目的:**筛选慢病毒介导 PC4 RNA 干扰的有效靶序列。**方法:**通过数据库设计 3 条 PC4 干扰候选靶序列,将靶序列构建到慢病毒载体中,转入 HEK-293T 细胞后,感染 H9C2 心肌细胞。通过实时荧光定量 PCR 和蛋白免疫印迹法鉴定靶序列干扰 PC4 的效果。**结果:**成功构建 shPC4 慢病毒载体,获得高效感染心肌细胞的慢病毒;感染心肌细胞后实时荧光定量 PCR 和蛋白免疫印迹显示,shPC4-1 具有较高的干扰效果($P < 0.05$)。**结论:**成功筛选出高效的 PC4 RNAi 靶序列。

[关键词] PC4;慢病毒;RNA 干扰;心肌细胞

[中图分类号] R 393 **[文献标志码]** A

Construction and screening of effective sequences of lentiviral-mediated RNAi targeting PC4

ZHANG Zhen-zhong, YANG Chun-jie, QIAN San-li, LI Bing-yu, ZOU Yun-zeng*

Shanghai Institute of Cardiovascular Diseases, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

[Abstract] **Objective:** To screen the effective sequences of lentivirus-mediated RNAi targeting PC4. **Methods:** Three candidate target sequences of PC4 RNAi were designed and cloned into lentivirus vectors, packaged into HEK-293T cell line, and then transfected the H9C2 cell line. The interference effects of target sequences were evaluated by real-time PCR and Western blotting analysis. **Results:** The lentiviral vector of RNAi containing the sequences targeting PC4 were successfully constructed, and effectively cloned into the H9C2 cell line. Real-time PCR and Western blotting results showed that PC4 expression in H9C2 cell line was downregulated significantly by shPC4-1. **Conclusions:** Sequences of lentivirus-mediated RNAi of PC4 are successfully screened.

[Key Words] PC4; lentivirus; RNA interference; cardiomyocytes

以往认为,哺乳动物的心肌细胞是终末分化细胞,不可再生。然而,近年来一系列研究表明,哺乳动物的少量心肌细胞能够再生。根据大气层中(^{14}C)的变化,推测成人心肌细胞的年再生速率约为 1%^[1];出生 7 d 内的小鼠心脏在损伤后可以再生^[2-4]。在动物中发现的再生心肌细胞由心肌细胞增殖而来,而非干细胞或者心肌祖细胞的分化形成^[5]。然而,成熟心肌细胞再生的分子调控机制目前还不清楚。

本课题组前期研究发现,在通过二甲基亚砜(DMSO)定向诱导 P19CL6 细胞分化为心肌细胞的过程中,PC4 发挥重要作用^[6]。PC4 是一个高丰度核蛋白,在基因转录、复制、修复和细胞转化过程中扮演重要角色。研究^[7-8]报道,PC4 为转录共激活因子,为成肌细胞分化所必需^[7-8]。本研究采用慢病毒

载体介导的 RNA 干扰技术降低大鼠心房肌细胞 H9C2 中 PC4 基因的表达,筛选出了有效的 PC4 RNA 干扰序列,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 细胞株的来源及培养 H9C2 和 HEK-293T 细胞株购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,由上海心血管疾病研究所液氮保种。H9C2 细胞采用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养;HEK-293T 细胞采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养。DMEM/F12 培养基(11320-033)和 DMEM 培养基(11965-084)以及胎牛血清(10099-141)均购自 Gibco 公司。

1.2 候选干扰靶序列的设计及合成 通过 Bioinformatics & Research Computing 数据库

[收稿日期] 2017-06-13 **[接受日期]** 2018-05-09

[基金项目] 国家自然科学基金重大国际(地区)合作研究项目(81220108003)。Supported by Major International (Regional) Cooperation Projects of the National Natural Science Foundation of China(81220108003)。

[作者简介] 张真中,技师。E-mail: zhang.zhenzhong@zs-hospital.sh.cn

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-54237969; E-mail: Zou.yunzeng@zs-hospital.sh.cn

(<http://sirna.wi.mit.edu/>)筛选 3 条潜在的 PC4 干扰靶序列,分别为 shPC4-1、shPC4-2 和 shPC4-3,具体位置见图 1。干扰靶序列(表 1)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

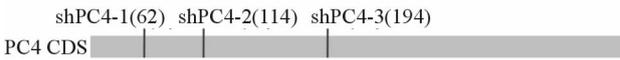


图 1 PC4 干扰靶序列设计示意图

表 1 PC4 干扰序列

名称	序列
shPC4-1F	5'-CTA GCA GAG ATG ATA ACA TGT TCC AGA CTC GAG TCT GGA ACA TGT TAT CAT CTC TGT TTT TG-3'
shPC4-1R	5'-AAT TCA AAA ACA GAG ATG ATA ACA TGT TCC AGA CTC GAG TCT GGA ACA TGT TAT CAT CTC TG-3'
shPC4-2F	5'-CCG GGG GCA TAT CAA GTC CAT TAT TCT CGA GTA ATG GAC TTG ATA TGC CCT TTT TTT G-3'
shPC4-2R	5'-AAT TCA AAA AGG GCA TAT CAA GTC CAT TAT TCT CGA GTA ATG GAC TTG ATA TGC CCT T-3'
shPC4-3F	5'-CTA GCC CAG ACT ACA TGG AGT CAA ATC TCG AGA TTT GAC TCC ATG TAG TCT GGG TTT TTG-3'
shPC4-3R	5'-AAT TCA AAA ACC CAG ACT ACA TGG AGT CAA ATC TCG AGA TTT GAC TCC ATG TAG TCT GGG-3'

1.3 慢病毒载体的构建、鉴定及转染效率的测定 使用二代慢病毒包装系统包装 PC4 慢病毒 shPC4,所用的载体均来源于 Addgene 数据库,分别为干扰载体 pLKO.1 puro、干扰对照载体 pLKO.1 puro GFP、包装载体 psPAX2 和 pMD2. G。使用 Age I (R0552)和 EcoR I (R0101)内切酶(NEB 公司)将 pLKO.1 puro 载体的多克隆位点进行双酶切,将干扰靶序列克隆到 pLKO.1 puro 载体上,PCR 鉴定结果。

将重组的 PC4-pLKO.1 puro,以及包装质粒和包膜质粒 PC4-psPAX2、PC4-pMD2. G 共同转染入 HEK-293T 细胞中,包装成慢病毒 shPC4;对照组用 pLKO.1 puro GFP 代替 PC4-pLKO.1 puro。H9C2 心肌细胞培养 48 h 后转染慢病毒,继续培养 48 h 后荧光显微镜下观察转染效率。

1.4 不同靶序列干扰效果的对比

1.4.1 qRT-PCR 检测 PC4 基因表达 取慢病毒感染 3 d 的 H9C2 心肌细胞,采用天根生化科技(北京)有限公司培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒 [DP430,天根生化科技(北京)有限公司]提取细胞

RNA,经反转录后使用 SYBR Premix EX Taq 试剂盒 (RR820A, TaKaRa 公司)进行荧光实时定量 PCR,引物信息见表 2。

表 2 qRT-PCR 引物信息

引物名称	序列
GAPDH_F	5'-CAA CTC CCT CAA GAT TGT CAG CAA-3'
GAPDH_R	5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA-3'
PC4_F	5'-GGC ATC CTC CAA GCA GAG TAG C-3'
PC4_R	5'-TTT TCT CCC TGG TTT CAT TTC A-3'

1.4.2 Western 印迹法检测 PC4 蛋白表达 取慢病毒感染 4 d 的 H9C2 心肌细胞,采用 RIPA 裂解液(P0013C,碧云天公司)提取慢病毒感染 4 d 的 H9C2 心肌细胞的总蛋白;用 Pierce BCA Protein Assay Kit (23225, Thermo 公司)测定总蛋白浓度。用 Western 印迹检测 PC4 的表达(将 GAPDH 作为对照)。PC4 抗体(11956-1-AP)购自 Proteintech 公司,GAPDH(ab9485)购自 Abcam 公司。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 慢病毒载体的构建、鉴定及包装 PC4 与 pLKO.1 puro、psPAX2、pMD2. G、pLKO.1 puro GFP 重组质粒经酶切、测序显示,构建成功(图 2)。pLKO.1 puro GFP、psPAX2、pMD2. G 重组质粒经 HEK-293T 细胞包装 24 h 后,发荧光的细胞比例占 90%,提示包装成功(图 3A)。

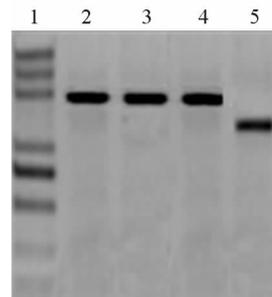


图 2 shPC4 慢病毒载体构建后酶切鉴定图

1. Marker; 2: shPC4-1 质粒酶切片段; 3: shPC4-2 质粒酶切片段; 4: shPC4-3 质粒酶切片段; 5: pLKO 质粒

2.2 shPC4 慢病毒干扰效果 H9C2 心肌细胞转染慢病毒 shPC4,同时使用 pLKO.1 puro GFP 慢病毒作为阴性对照。pLKO.1 puro GFP 慢病毒感染心肌细胞 72 h 后,绿色荧光的细胞占 85%以上

(图 3B),说明包装出来的慢病毒能够有效感染心肌细胞。

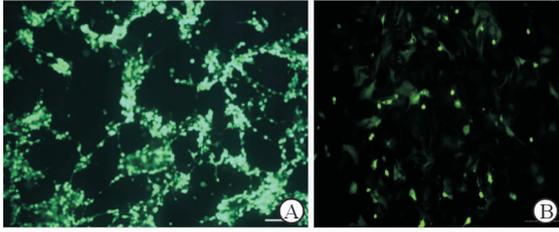


图 3 荧光显微镜下慢病毒载体的包装及转染细胞表现

A: HEK-293T 细胞转染重组质粒 24 后; B: H9C2 心肌细胞转染慢病毒后。Original magnification: $\times 200$

2.3 不同靶序列 shPC4 慢病毒干扰效果对比 将慢病毒感染 3、4 d 的心肌细胞提取 RNA 和蛋白,从转录水平和蛋白水平分别检测 3 条候选靶序列对心肌细胞的 PC4 基因干扰效率。qRT-PCR 结果表明:shPC4-1 可使心肌细胞中 PC4 基因的表达水平下降 60%,其抑制效率最高($P < 0.05$,图 4A);蛋白免疫印迹表明:shPC4-1 慢病毒质粒转染后抑制效率最高($P < 0.05$,图 4B)。

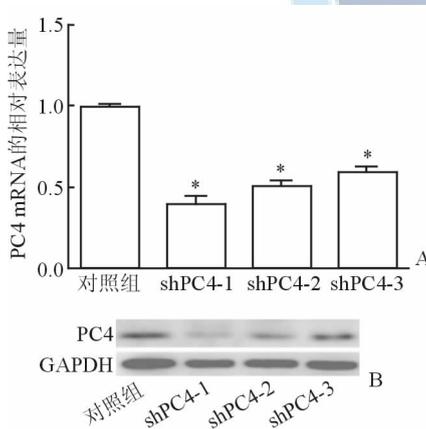


图 4 慢病毒转染心肌细胞后 PC4 基因(A)及蛋白(B)的表达

* $P < 0.05$ 与对照组相比; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

PC4 蛋白是只有 127 个氨基酸组成的细胞核冗余蛋白,首先在 HeLa 细胞系的核提取物中被发现。体外发现其 N 端具有增强转录的活性;C 端能分别结合单链 DNA 和双链 DNA,特别是对没有配对的 DNA 具有强亲和力^[9]。此外,PC4 能够与多个转录因子直接相互作用,从而增强其活性,如 VP16、GAL4、AP2、SP1、TAT、TFIIB、p53 等^[9-11]。PC4 与不同的转录因子作用位点不同。其能够结合在 VP16、GAL4、AP2 的活性区,TAT 的 RNA 结合区,SP1 和 p53 的 DNA 结合区,p53 的 C 端调控区。

这表明 PC4 在介导不同转录因子时作用机制不同。

PC4 蛋白存在翻译后修饰,主要包括磷酸化修饰和乙酰化修饰。研究^[12]发现,酪蛋白激酶 2 (casein kinase II, CK II) 可磷酸化 PC4;PC4 的 N 端有一段富含丝氨酸的氨基酸序列(3~22),CK II 能同时磷酸化该区域的 7~8 个丝氨酸,从而抑制 PC4 的共激活功能。研究^[13]发现,PC4 能够被另一个转录共激活子 p300 乙酰化,从而促进 PC4 结合双链 DNA 的能力。此外,PC4 磷酸化能抑制 PC4 乙酰化,而 PC4 乙酰化对其磷酸化没有影响^[13]。

在世界范围内,心血管疾病正逐渐成为发病率和致死率的首要原因。哺乳动物心脏损伤后不能再生可能是心血管疾病患者死亡率高的原因。本研究首次报道用慢病毒载体系统介导的 RNA 干扰技术建立心肌细胞 PC4 敲除模型。慢病毒载体系统介导的 RNA 干扰技术可以作为一种快速、有效降低目的基因表达的研究手段。本研究成功构建了 PC4 RNA 干扰慢病毒表达载体 PC4-pLKO.1 puro,经 HEK-293T 细胞包装后转染心肌细胞,感染效率达 85%。qRT-PCR 和 Western 印迹检测显示,3 对干扰靶序列能不同程度降低 PC4 基因的表达量,第 1 对靶序列的干扰作用最明显。本结果为后期进一步研究 PC4 基因在心脏中的作用机制奠定了基础。

参考文献

- [1] BERGMANN O, BHARDWAJ R D, BERNARD S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans[J]. Science, 2009, 324(5923):98-102.
- [2] PORRELLO E R, MAHMOUD A I, SIMPSON E, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart [J]. Science, 2011, 331(6020):1078-1080.
- [3] PORRELLO E R, MAHMOUD A I, SIMPSON E, et al. Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(1):187-192.
- [4] STRUNGS E G, ONGSTAD E L, O'QUINN M P, et al. Cryoinjury models of the adult and neonatal mouse heart for studies of scarring and regeneration[J]. Methods Mol Biol, 2013, 1037:343-353.
- [5] GUPTA V, POSS K D. Clonally dominant cardiomyocytes direct heart morphogenesis [J]. Nature, 2012, 484(7395):479-484.
- [6] LI L, GONG H, YU H, et al. Knockdown of nucleosome assembly protein 1-like 1 promotes dimethylsulfoxide-induced differentiation of P19CL6 cells into cardiomyocytes[J]. J Cell

Biochem, 2012, 113(12):3788-3796.

- [7] WANG J Y, SARKER A H, COOPER P K, et al. The single-strand DNA binding activity of human PC4 prevents mutagenesis and killing by oxidative DNA damage[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24 (13) : 6084-6093.
- [8] DAS C, HIZUME K, BATTI K, et al. Transcriptional coactivator PC4, a chromatin-associated protein, induces chromatin condensation[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(22): 8303-8315.
- [9] PAN Z Q, GE H, AMIN A A, et al. Transcription-positive cofactor 4 forms complexes with HSSB (RPA) on single-stranded DNA and influences HSSB-dependent enzymatic synthesis of simian virus 40 DNA[J]. J Biol Chem, 1996, 271 (36) : 22111-22116.
- [10] KRETZSCHMAR M, KAISER K, LOTTSCHEIDT F, et al. A novel mediator of class II gene transcription with homology

to viral immediate-early transcriptional regulators[J]. Cell, 1994, 78(3) : 525-534.

- [11] KANNAN P, TAINSKY M A. Coactivator PC4 mediates AP-2 transcriptional activity and suppresses ras-induced transformation dependent on AP-2 transcriptional interference [J]. Mol Cell Biol, 1999, 19 (1) : 899-908.
- [12] JONKER H R, WECHSELBERGER R W, PINKSE M, et al. Gradual phosphorylation regulates PC4 coactivator function[J]. FEBS J, 2006, 273(7):1430-1444.
- [13] KUMAR B R, SWAMINATHAN V, BANERJEE S, et al. P300-mediated acetylation of human transcriptional coactivator PC4 is inhibited by phosphorylation[J]. J Biol Chem, 2001, 276(20):16804-16809.

[本文编辑] 姬静芳

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20170809

· 短篇论著 ·

2010至2015年南通地区人群戊型肝炎病毒感染的血清流行病学调查

顾宇峰, 谭晓慧, 杨婷, 邰伯军, 汤伟*

南通大学附属医院感染科, 南通 226001

[摘要] **目的:**探讨2010至2015年南通市人群戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)的感染状况及流行特点,为戊型肝炎病毒性肝炎(简称戊肝)防治提供依据。**方法:**选择南通大学附属医院2010年1月1日至2015年12月31日收诊并作HEV血清学检测的病例6772例。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)诊断试剂盒检测血清抗HEV抗体(IgM、IgG)。对不同年度、年龄、性别人群的HEV感染率进行统计分析,并对戊肝发病率进行分析。**结果:**6年间,6772例受试者抗HEV抗体(IgM/IgG)总阳性率为3.35%(227例);2010至2015年各年度人群血清HEV抗体阳性率分别为6.92%、1.74%、3.53%、0.90%、3.50%、2.13%。20岁以下、20~29岁、30~39岁、40~49岁和50~59岁年龄段人群血清HEV抗体阳性率随年龄增加而升高($P=0.001$);59岁以后各年龄段人群血清HEV抗体阳性率逐步下降。男性抗HEV抗体阳性率明显高于女性($P=0.001$)。227例血清抗HEV抗体阳性者中,显性感染率为72.25%;其中,急性黄疸型肝炎发病率显著高于急性无黄疸型肝炎发病率($P=0.001$)。HEV感染者中,HBV-HEV重叠感染率为21.15%,HCV-HEV重叠感染率为0.88%;HAV-HEV重叠感染率为0.44%。HBV-HEV重叠感染的戊肝组患者血清丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶、总胆红素水平与单纯戊肝组患者差异无统计学意义,凝血酶原活动度、血清白蛋白水平均低于单纯戊肝组($P<0.01$)。**结论:**2010年南通市人群HEV感染率为6.92%,此后5年HEV感染率维持在较低水平(0.90%~3.53%)。男性较女性更易感染HEV;40~59岁人群具有相对较高的HEV感染风险,应引起高度重视。HEV感染后,多数表现为急性黄疸型肝炎;慢性HBV感染重叠HEV感染可致肝损伤加重。

[关键词] 戊型肝炎病毒;感染率;血清流行病学;凝血酶原活动度;白蛋白

[中图分类号] R 512.6 **[文献标志码]** A

Seroepidemiological survey of hepatitis E virus infection in Nantong City during 2010-2015

GU Yu-feng, TAN Xiao-hui, YANG Ting, TAI Bo-jun, TANG Wei*

Department of Infectious Disease, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the infection status of hepatitis E virus (HEV) in the population of Nantong city

[收稿日期] 2017-09-19 **[接受日期]** 2018-04-26

[作者简介] 顾宇峰,主治医师。E-mail: gyf062@163.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 0513-85052493; E-mail: tdfy16302@163.com