

慢病毒感染稳定敲减 eIF4E 基因的鼻咽癌 CNE2 细胞系的建立*

赵 毅, 王 燕, 胡新荣[△] (广东医学院基础医学院, 广东东莞 523808)

【摘要】 目的 构建稳定干扰真核起始因子 4E(eIF4E)基因的鼻咽癌 CNE2 细胞系。**方法** 设计针对 eIF4E 基因 mRNA 序列的 RNA 干扰序列,以慢病毒载体 pGC-LV 为基础构建感染体系。慢病毒感染 CNE2 细胞后,经嘌呤霉素压力筛选稳定敲减 eIF4E 基因的 CNE2 细胞株。采用定量聚合酶链反应和免疫印迹法检测 eIF4E mRNA 和蛋白的表达水平;采用细胞增殖和迁徙实验验证 eIF4E 敲减对 CNE2 细胞的影响。**结果** 成功构建并筛选获得带有 eIF4E 特异性短发夹 RNA 的慢病毒颗粒;将慢病毒颗粒转入 CNE2 细胞,经抗菌药物压力筛选获得稳定敲减 eIF4E 基因的 CNE2 细胞(CNE2siEp)及阴性对照细胞(CNE2siNC)。与 CNE2siNC 细胞相比,CNE2siEp 细胞 eIF4E mRNA 表达水平下调 76.0%,蛋白表达水平下调 50.0%,细胞增殖活性下调 85.0%,运动活性下调 59.0%。**结论** 成功构建稳定敲减 eIF4E 的 CNE2 细胞系,其 eIF4E 基因表达水平与功能明显受抑。

【关键词】 真核起始因子 4E; 敲减; 慢病毒感染; RNA 干扰

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.07.005 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)07-0888-03

Construction of stable eIF4E knockdown nasopharyngeal carcinoma CNE2 cell line by lentivirus infection* ZHAO Yi, WANG Yan, HU Xin-rong[△] (Basic Medical School, Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong 523808, China)

【Abstract】 Objective To establish a nasopharyngeal carcinoma CNE2 cell line with stable interference of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) gene. **Methods** The interference sequences, targeting eIF4E gene sequence, were designed, coated and transfected into CNE2 cells, by using lentiviral vector infection system based on pGC-LV. The cells containing stable transformants were screened by the ability of resistance to puromycin. The expression of eIF4E was assayed by real-time polymerase chain reaction and Western Blot. The effects of eIF4E knockdown on proliferation and migration of CNE2 cells were tested. **Results** The lentivirus particles with short hairpin shRNA targeting eIF4E gene were constructed and screened successfully. CNE2 cells were transfected and anti-pure positive cell, which was named CNE2siEp cell, were obtained by antibiotic screening. Compared with negative control cells (CNE2siNC), the expression of eIF4E mRNA and protein in CNE2siEp cells were significantly decreased by 76.0% and 50.0% respectively. The proliferation and migration of CNE2siEp cells were also decreased by 85.0% and 59.0% respectively. **Conclusion** The stable eIF4E knockdown cell line (CNE2siEp) was constructed successfully, in which the expression and functions of eIF4E gene were inhibited significantly.

【Key words】 eukaryotic initiation factor 4E; knockdown; lentivirus infection; RNA interference

真核起始因子 4E(eIF4E)是真核生物细胞蛋白质合成步骤中生成翻译起始复合物的必需因子之一^[1]。已有研究发现,eIF4E 在肺癌、乳腺癌、食管癌等多种肿瘤组织中表达水平升高,并与肿瘤转移、治疗后复发等存在一定的关系^[2-3]。有研究显示,eIF4E 过表达与鼻咽癌的转移和患者预后密切相关,但其作用机制尚未完全明确^[4-5]。为研究 eIF4E 在鼻咽癌增殖、转移中的作用机制,探寻调控鼻咽癌早期转移的分子靶点,需要构建稳定干扰基因表达的鼻咽癌细胞系。慢病毒感染体系是目前常用的能够较为稳定地转染基因克隆的病毒体系之一^[6]。慢病毒感染体系感染分裂细胞或非分裂细胞后,可以在细胞内长期表达且安全性较高^[7];结合抗菌药物压力筛选方法,则可用于构建稳定基因过表达与敲减细胞系^[8]。构建稳定敲减 eIF4E 基因的鼻咽癌细胞系有助于更好地探寻 eIF4E 在鼻咽癌细胞中的作用,分析其参与调控鼻咽癌转移的具体机

制。因此,本研究以针对 eIF4E 基因 mRNA 的小干扰 RNA (siRNA)序列为基础构建了慢病毒感染体系,在对低分化鼻咽癌细胞系 CNE2 细胞进行感染后分析了 eIF4E 敲减对鼻咽癌细胞增殖、迁徙活性的影响。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 慢病毒包装质粒 pGC-LV、pHelper1.0、pHelper2.0 及靶向 eIF4E 的 siRNA 片段由上海吉凯基因技术有限公司设计、合成。限制性核酸内切酶及 T4 连接酶购自美国 NEB 公司。大肠埃希菌 DH5 α 株及质粒提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司。人胚肾细胞 293T 及人肺腺癌细胞 H1299 购自美国模式培养物集存库(ATCC)。CNE2 细胞由本实验室保存。trizol 试剂和莫洛尼鼠白血病病毒第一链合成试剂购自美国 Life Technology 公司,转染试剂 LipofectamineTM 2000 购自美国 Invitrogen 公司,定量聚合酶链反应(PCR)检测试剂

* 基金项目:广东省卫生厅医学科研基金项目(B2013291)。

作者简介:赵毅,男,讲师,博士研究生,主要从事肿瘤免疫学研究。 [△] 通讯作者,E-mail:chz020@163.com。

FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) 购自德国 Roche 公司。放射免疫沉淀裂解缓冲液系统(RIPA Lysis Buffer System)、鼠抗人 eIF4E 单克隆抗体、鼠抗人 β -actin 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记二抗购自美国 Santa Cruz 公司。细胞增殖活性检测 CCK8 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。Transwell 小室($8\ \mu\text{m}$)购自美国 Corning 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人胚肾细胞 293T、人肺腺癌细胞 H1299、鼻咽癌低分化细胞 CNE2 均采用 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清及双抗), $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养。所有细胞学实验均在细胞传代 12 代以内进行。

1.2.2 短发夹 RNA(shRNA)干扰质粒的构建 参考文献[9]及前期实验结果, 针对 eIF4E 基因 3 个转录本(NM_001968.3、NM_001130679.1、NM_001130678.1)的同源序列设计靶点, 共设计 4 个 RNA 干扰靶点序列, 包括 KD1: 5'-AAG GAT GGT ATT GAG CCT ATG-3'; KD2: 5'-GAG GAC GAT GGC TAA TTA CAT-3'; KD3: 5'-CGG CTG ATC TCC AAG TTT GAT-3'; KD4: 5'-CCA CTC TGT AAT AGT TCA GTA-3'。化学合成序列, 退火、冷却后与经限制性核酸内切酶 Age I 和 EcoR I 处理的 pGCL-GFP 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细胞, 抗性培养基培养后挑选单克隆菌落, 经 PCR 鉴定并测序明确插入序列的方向及完整性, 即为干扰质粒 pGCLV-eIF4E-shRNA(编号 #1~4)。

1.2.3 慢病毒包装 将病毒包装细胞 293T 以浓度 6×10^5 个/毫升接种于 15 cm 细胞培养皿中, 待细胞融合度达 70%~80% 时用于转染。转染步骤参照试剂说明书。转染 8 h 后更换新鲜的完全培养基; 常规培养 48 h 后收集含有病毒的细胞培养上清, 用 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤器去除细胞碎片, 离心浓缩用于病毒感染。

1.2.4 慢病毒感染及最佳靶点筛选 选取对数生长期 H1299 细胞, 以浓度 5×10^4 个/孔接种六孔板, 设置空白对照组、阴性对照组和 4 个带有干扰序列的病毒干预组(KD1~4), 每组包括 3 个复孔。常规培养至细胞融合度达到约 30%。向病毒干预组和阴性对照组中加入制备好的 4 组 eIF4E-RNAi-LV 病毒及阴性对照病毒, 空白对照组不加入病毒。感染 12 h 后更换培养基, 感染 5 d 后提取各组细胞 RNA, 采用定量 PCR 检测 eIF4E 基因表达相对水平, 筛选最佳干扰靶点。

1.2.5 抗菌药物筛选与感染细胞培养 以感染 H1299 细胞

的方法感染 CNE2 细胞, 病毒干预组采用经干扰靶点筛选后确定的 eIF4E-RNAi-LV-#2 病毒, 阴性对照组采用阴性对照病毒。感染 5 d 后更换培养基(含浓度为 $1.0\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的嘌呤霉素), 持续观察细胞, 每 3 天更换 1 次培养基(含新鲜嘌呤霉素的 DMEM 培养基), 7 d 后扩大培养, 直至感染后 29 d; 挑取单克隆细胞, 移至新培养皿中扩大培养。eIF4E 稳定干扰细胞株命名为 CNE2siEp 细胞, 阴性对照病毒感染细胞命名为 CNE2siNC 细胞。

1.2.6 eIF4E 表达水平检测 采用定量 PCR 方法检测细胞 eIF4E mRNA 表达水平, 采用免疫印迹法(Western Blot)检测 eIF4E 蛋白表达水平。

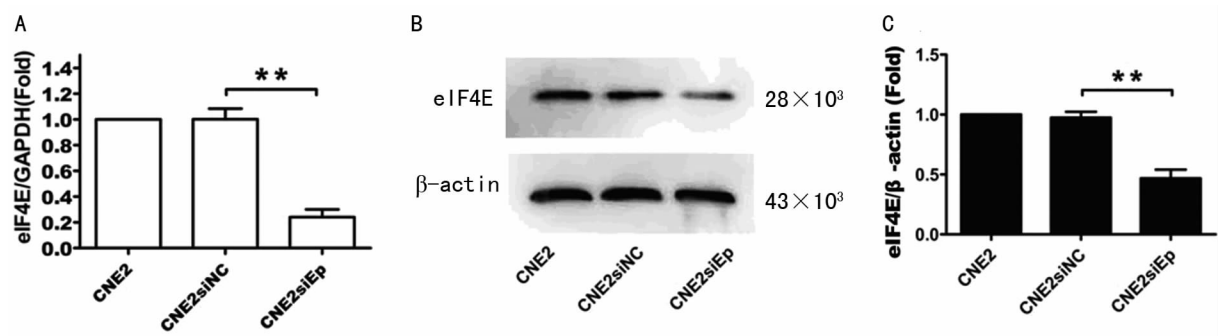
1.2.7 细胞生长周期、增殖活性及迁徙活性检测 采用 CCK8 试剂盒检测 CNE2siEp、CNE2siNC、CNE2 细胞生长水平及增殖活性, 采用细胞运动实验检测细胞迁徙活性。

1.3 统计学处理 采用 Microsoft Excel 2003 软件进行数据处理, 采用 SPSS17.0 统计学软件进行统计学分析。计量资料组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 eIF4E-RNAi-LV 慢病毒颗粒最佳干扰靶点筛选 采用 4 个带有干扰序列的病毒对 H1299 细胞进行感染, 其中 KD2 (eIF4E-RNAi-LV-#2)、KD3 (eIF4E-RNAi-LV-#3) 对目的基因 eIF4E 表达的干扰作用较阴性对照组升高超过 85.0%, 其中 KD2 为最有效靶点。因此, 采用 eIF4E-RNAi-LV-#2 病毒进行验证实验。在以 CNE2 细胞作为靶细胞的病毒感染干扰实验中, KD2 组(eIF4E-RNAi-LV-#2 病毒干扰)对目的基因 eIF4E 表达的干扰作用较阴性对照组升高超过 70.0%。因此, 以 eIF4E-RNAi-LV-#2 病毒进行后续实验, 并将病毒命名为 eIF4E-RNAi-LV 病毒。

2.2 eIF4E-RNAi-LV 病毒感染 CNE2 细胞对 eIF4E 表达的影响 CNE2siNC 细胞、CNE2 细胞 eIF4E mRNA 相对表达水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$); CNE2siEp 细胞 eIF4E mRNA 表达水平较 CNE2siNC 降低 76.0%, 组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 1A。CNE2 细胞、CNE2siNC 细胞 eIF4E 蛋白表达水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$); CNE2siEp 细胞 eIF4E 蛋白表达水平较 CNE2siNC 细胞降低 50.0%, 组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)有统计学意义, 见图 1B、C。CNE2siEp 细胞 eIF4E 基因的表达被明显沉默, 可用于后续实验。



注: A 为各组间 eIF4E mRNA 相对表达水平比较; B 为各研究组 eIF4E 蛋白 Western Blot 检测结果; C 为各组间 eIF4E 蛋白相对表达水平比较; * 表示组间比较 $P < 0.05$ 。

图 1 各研究组细胞 eIF4E mRNA 及蛋白相对表达水平比较

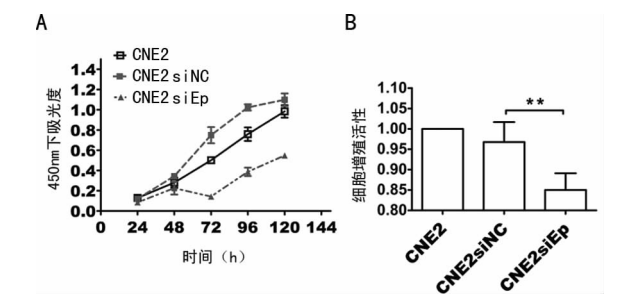
2.3 eIF4E 敲减对 CNE2 细胞生长周期和增殖活性的影响

CNE2 细胞、CNE2siNC 细胞生长速度比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与 CNE2siNC 细胞比较, CNE2siEp 细胞生长速度在培养前 5 d 明显被抑制, 细胞生长速度组间比较差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见图 2A。病毒感染 48 h 后, CNE2 细胞、CNE2siNC 细胞增殖活性比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与 CNE2siNC 细胞比较, CNE2siEp 细胞增殖活性降低 85.0%, 细胞增殖活性组间比较差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见图 2B。

2.3 eIF4E 敲减对 CNE2 细胞迁徙活性的影响

各研究组细胞运动实验染色检测结果见图 3。CNE2 细胞、CNE2siNC 细胞的穿膜细胞数比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与 CNE2siNC 细胞比较, CNE2siEp 细胞的穿膜细胞数降低

59.0%, 穿膜细胞数组间比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。



注: A 为各研究组细胞生长曲线; B 为各研究组细胞感染 48 h 后增殖活性比较; * 表示组间比较 $P<0.05$ 。

图 2 eIF4E 敲减对 CNE2 细胞生长周期和增殖活性的影响

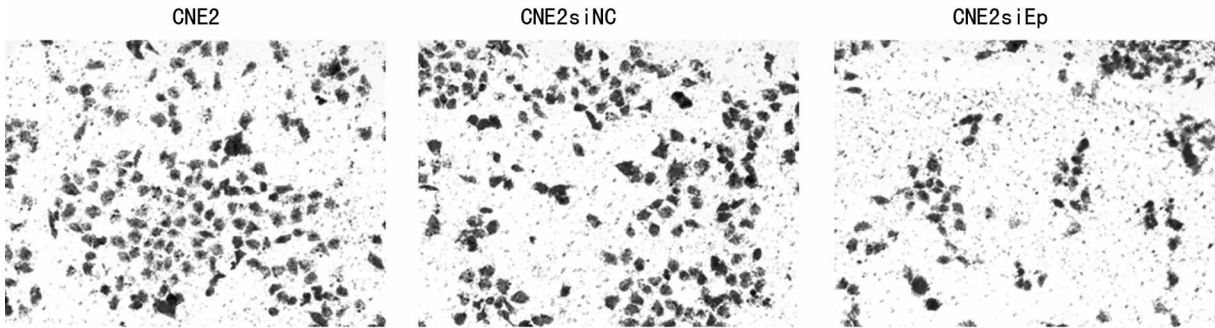


图 3 各研究组细胞运动实验染色检测结果

3 讨 论

RNA 干扰是机体抵御外来基因和病毒感染的基因调控方式之一, 可通过双链 RNA 降解同源 mRNA, 进而在 RNA 水平抑制基因的表达。RNA 干扰具有特异性和高效性的特点, 可在核酸水平调控细胞基因的表达^[10]。本研究所使用的 pGC-LV 慢病毒系统以“自杀性改造”为基础, 采用三质粒包装构建获得, 安全性高、操作简单、感染效率较高, 而且能够在体外合成构建 siRNA 的表达载体 shRNA, 进而在专用工程细胞 293T 中结合辅助质粒, 表达并包被。经荧光筛选获得可产生 shRNA 的高滴度慢病毒颗粒, 再转移至细胞内转录加工, 即可生成 siRNA。本研究采用 eIF4E-RNAi-LV 转染 H1299、CNE2 细胞, 证实了可高效敲减 eIF4E 表达的 siRNA 靶点序列。此外, 本研究结合抗菌药物压力筛选, 成功在相对较短的时间内获得了高纯度的稳定敲减 eIF4E 的 CNE2siEp 细胞及其对照细胞 CNE2siNC, 为进一步研究相关基因功能和细胞生物学行为奠定了基础。

eIF4E 可选择性翻译癌基因 mRNA, 并参与癌蛋白的表达, 对细胞转化及肿瘤细胞增殖、侵袭、转移均可能存在影响^[1]。然而, eIF4E 在鼻咽癌细胞中的表达水平和功能, 特别是其参与癌基因表达调控的分子机制尚未完全明确。笔者在前期实验中发现 eIF4E 蛋白与鼻咽癌细胞增殖、转移密切相关, 可能参与了肿瘤上皮介质转化和复发。因此, 本研究构建了 eIF4E 稳定敲减的鼻咽癌低分化细胞系 CNE2siEp 细胞及其对照细胞。初步细胞生物学行为检测发现, eIF4E 稳定敲减的 CNE2siEp 细胞与未经感染处理的 CNE2 细胞、阴性对照 CNE2siNC 细胞相比, 增殖活性下降, 生长周期异常, 迁徙活性明显降低, 提示 CNE2 细胞内的 eIF4E 敲减明显影响了细胞的

生物学行为, 也说明 eIF4E 基因在鼻咽癌发生、发展中具有重要作用, 为进一步研究其在基因表达调控中的作用和分子机制奠定了良好的基础。

参考文献

[1] Fischer PM. Cap in hand: targeting eIF4E[J]. Cell Cycle, 2009, 8(16): 2535-2541.

[2] 王忠辉, 苏树英. eIF4E 与肿瘤研究进展[J]. 医学综述, 2008, 14(8): 1178-1180.

[3] 万雷, 朱成楚, 张健, 等. 真核转录起始因子 4E 在食管癌中的表达及其与微淋巴管密度的关系[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(23): 4252-4254.

[4] Wu M, Liu Y, Di X, et al. eIF4E over-expresses and enhances cell proliferation and cell cycle progression in nasopharyngeal carcinoma[J]. Med Oncol, 2013, 30(1): 400-409.

[5] Zheng J, Li J, Xu L, et al. Phosphorylated Mnk1 and eIF4E are associated with lymph node metastasis and poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma [J/OL]. PLoS One, 2014-02-14 [2014-10-25], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24551240>.

[6] 邓海燕, 曾俊义, 魏云峰. 大鼠 miR-1 慢病毒表达载体的构建与鉴定[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(2): 137-139.

[7] 丁治国, 何蓓, 陈晓珩, 等. VEGF 干扰慢病毒载体的构建及其在 MHCC97L 细胞中的表达[J]. 中国医药导报, 2012, 9(35): 11-13.

[8] 陈媛, 巩伟丽, 韩秋影, 等. 逆转录病毒感(下转第 894 页)

时,本研究发现相比参考序列,P3 体系扩增的目的片段多出了含有 16 个碱基的片段,提示在该区域可能存在基因多态性,如引物位于该区域,有可能导致扩增失败,因此根据实际测序结果适当调整引物设计位点也是必要的。

相关研究报道,DMSO、甘油、甜菜碱等物质有助于高 GC 模板解链,从而促进 PCR 的有效扩增,有助于扩增高 GC 片段的成功率和特异性^[6-9]。另有研究显示,PCR 反应体系中含有浓度为 5% 的 DMSO 有助于高 GC 片段的扩增^[10]。本研究结果显示,在 P1、P2 体系中加入 DMSO 并未提高扩增的成功率和特异性,但在 P3 体系中,加入 DMSO 并使其终浓度达到 1%,是目的片段成功、特异扩增的必需条件。然而随着 DMSO 终浓度的增加,表现出对 PCR 反应的抑制效应。以上结果提示在 PCR 反应体系中加入 DMSO 仅可提高部分高 GC 片段的扩增效率和特异性,考虑可能与目的片段是否具有二级结构有关。此外,本研究结果所显示的 DMSO 最佳终浓度(1%)与其他研究报道存在一定的差异,可能与使用的 DNA 聚合酶及反应体系设置不同有关。因此,在设计优化的高 GC 片段扩增体系时,必须结合自身实验条件。

Bachmann 等^[3]利用 Slow-down PCR 成功扩增了 GC 含量大于 83% 的目的片段,并发现其扩增效果优于降落 PCR。本研究也利用两种方法扩增了 TCRP1 基因启动子区的 CpG 岛,结果显示采用降落 PCR 反应条件可促进 P3 体系(DMSO 终浓度 1%)的扩增效率和特异性,但在其他体系中未观测到相关效应。降温速率 66% 的 Slow-down PCR 反应条件促进了 P3 体系的扩增效率,但并未促进其特异性。在其他反应体系中,Slow-down PCR 未体现出促进 PCR 扩增效率和特异性的功能。分析其原因可能是由于反应条件仅为保证 PCR 成功扩增高 GC 片段的重要条件之一,不同的反应条件需与不同的引物对、反应体系及添加物相配合,方能提高 PCR 的扩增效率和特异性。

本研究还利用错位设计模式将各测序引物的 3' 端设计在扩增引物的 3' 端内侧,以此提高测序反应的特异性。因此,虽然 P1-2、P2-2 体系的 PCR 扩增产物中存在非特异性条带,但在测序时仅目的片段的序列可被检测,由此提高了测序反应的特异性。

在本研究中,H460 细胞未能被 P3 体系成功检测,同时在 P3 体系检出的细胞和组织样品中,TCRP1 基因 CpG 岛的上游也存在多态性现象,提示 P3 体系的上游扩增引物可能位于多态性区域,从而导致 H460 细胞检测失败。虽然 P1-2、P2 体系均可检出所有细胞与组织样品,但 P2-1 联合 P1-2 方案却是检出率最高且所覆盖的 CpG 岛范围最为完整的方案,因此该联合检测方案可作为 TCRP1 基因启动子区 CpG 岛扩增、测序的优选方案。但本研究所检测的细胞种类和组织样品例数相对较少,有待后续更大规模的实验验证。

综上所述,在对 TCRP1 基因启动子区 CpG 岛进行测序

时,可通过合理设计引物、选择添加物和优化反应条件实现目的片段的扩增、提高扩增反应的特异性,而提高测序反应的特异性需要设计 3' 端内移的特异性测序引物。本研究成功建立了 TCRP1 基因启动子区 CpG 岛扩增、测序体系,其中以 P2-1 联合 P1-2 检测方案为优选方案。

参考文献

[1] 郑国涛,易思思,贾小婷,等. C-myc 上调 TCRP1 表达与舌癌细胞对顺铂耐受相关[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2014,30(3):272-278.

[2] 易思思. 舌癌耐药相关基因 TCRP1 启动子克隆及转录调控研究[D]. 长沙:中南大学,2011.

[3] Bachmann HS, Siffert W, Frey UH. Successful amplification of extremely GC-rich promoter regions using a novel 'slowdown PCR' technique[J]. Pharmacogenetics, 2003, 13 (12):759-766.

[4] Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription[J]. Genes Dev, 2011, 25(10):1010-1022.

[5] Pratyush D, Tiwari S, Kumar A, et al. A new approach to touch down method using betaine as co-solvent for increased specificity and intensity of GC rich gene amplification[J]. Gene, 2012, 497(2):269-272.

[6] Strien J, Sanft J, Mall G. Enhancement of PCR amplification of moderate GC-containing and highly GC-rich DNA sequences[J]. Mol Biotechnol, 2013, 54(3):1048-1054.

[7] Farell EM, Alexandre G. Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates [J/OL]. BMC Res Notes, 2012-05-24 [2014-12-10], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22624992>.

[8] Jensen MA, Fukushima M, Davis RW. DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis[J/OL]. PLoS One, 2010-06-11 [2014-12-10], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883997/>.

[9] Wei M, Deng J, Feng K, et al. Universal method facilitating the amplification of extremely GC-rich DNA fragments from genomic DNA[J]. Anal Chem, 2010, 82(14):6303-6307.

[10] Obradovic J, Jurisic V, Tosic N, et al. Optimization of PCR Conditions for Amplification of GC-Rich EGFR Promoter Sequence[J]. J Clin Labor Anal, 2013, 27(6):487-493.

(收稿日期:2014-11-05 修回日期:2014-12-22)

(上接第 890 页)

染结合流式细胞分选方法构建稳定过表达 CUEDC2 的 MCF-10A 细胞系[J]. 科学技术与工程, 2012, 12(24):6148-6151.

[9] Moussavi M, Moshgabadi N, Fazli L, et al. Fibroblast growth factor and ornithine decarboxylase 5'UTRs enable preferential expression in human prostate cancer cells and in prostate

tumors of PTEN(-/-) transgenic mice[J]. Cancer Gene Ther, 2012, 19(1):19-29.

[10] 刘建军,张茂雷,朱芳芳. 实时荧光定量 PCR 筛选有效 RNA 干扰方法的建立[J]. 检验医学与临床, 2010, 7 (10):903-905.

(收稿日期:2014-11-22 修回日期:2014-12-28)