

慢病毒载体介导的 shRNA 对小鼠 T 细胞 CD28 基因表达的影响

程娜娜¹, 桑威^{1,2}, 陈翀^{1,2}, 徐开林^{1,2*}

(1. 徐州医学院移植免疫实验室, 江苏 徐州 221002; 2. 徐州医学院附属医院血液科实验室, 江苏 徐州 221002)

摘要:目的 探讨编码针对小鼠 CD28 的短发卡状 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 的慢病毒载体对小鼠 T 细胞 CD28 基因表达的影响。方法 设计并合成 3 对靶向小鼠 CD28 的特异性干扰序列和 1 对非特异性干扰序列, 亚克隆入慢病毒载体 pLB 中, 构建出重组慢病毒干扰质粒, 行 PCR 鉴定并进一步测序证实。分别将重组质粒与慢病毒包装质粒共转染 293FT 细胞, 生产慢病毒颗粒, 并依据绿色荧光蛋白 (GFP) 表达水平检测病毒滴度。慢病毒感染小鼠脾淋巴细胞, 实时荧光定量 RT-PCR 和 Western blot 技术分别从 mRNA 水平和蛋白水平检测 CD28 的表达。结果 PCR 鉴定及测序结果证实 4 种重组慢病毒质粒均构建成功, 重组慢病毒滴度均达 1×10^{11} U/L。感染 T 细胞后, CD28 基因 mRNA 和蛋白表达量均有明显下降。结论 成功构建了 CD28 shRNA 慢病毒载体, 可有效下调小鼠 T 细胞 CD28 基因的表达, 其为进一步研究体内沉默 CD28 基因控制移植物抗宿主病奠定了基础。

关键词: shRNA; 慢病毒载体; CD28; 移植物抗宿主病

中图分类号: R392.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2065(2010)05-0309-05

The effects of lentiviral vector-mediated delivery of short hairpin RNA on CD28 expression in mouse T lymphocytes

CHENG Nana¹, SANG Wei^{1,2}, CHEN Chong^{1,2}, XU Kailin^{1,2*}

(1. Laboratory of Transplant Immunology, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China;

2. Laboratory of Department of Hematology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002)

Abstract: Objective To explore the effects of lentiviral vector-mediated delivery of short hairpin RNA on CD28 expression in mouse T lymphocytes. Methods Three pairs of specific interference sequences targeting CD28 gene and one pair of non-specific RNA interference sequences were designed and synthesized and were thereafter respectively inserted into lentiviral vector pLB downstream of U6 promoter so as to construct four recombinant plasmids. 293FT cells were co-transfected with CD28/shRNA transfer plasmid and two lentiviral packaging plasmids and the lentivirus titer was determined according to the expression level of green fluorescent protein (GFP). Mouse spleen lymphocytes were infected by three specific or one control lentivirus and then CD28 mRNA transcription and protein expression of these cells was detected by real-time RT-PCR and Western blot respectively. Results PCR analysis and DNA sequencing confirmed that the four recombinant lentiviral transfer plasmids were successfully constructed. The titer of recombinant lentivirus was above 1×10^{11} U/L. After CD28/shRNA virus infection, CD28 expression in mouse T lymphocytes were significantly downregulated at both mRNA and protein levels. Conclusion The lentiviral RNAi vector of CD28 gene have been successfully constructed, and they can effectively inhibit the expression of CD28 gene in mouse T lymphocytes. Thus it provides a basis for further study of CD28 gene-targeted gene therapy on graft-versus-host disease.

Key words: short hairpin RNA; lentiviral vector; CD28; graft-versus-host disease

异基因造血干细胞移植 (allo-HSCT) 是目前根治恶性血液病的有效方法, 但移植后随之而来的移植物抗宿主病 (GVHD) 在一定程度上限制了 allo-HSCT 的临床应用, 目前主要靠去除供者 T 细胞

或者用免疫抑制剂来防治 GVHD。前者减少了移植物抗白血病 (GVL) 效应, 使白血病复发增多; 后者增加了严重感染的机会。因此, 寻找控制 GVHD 的新途径一直是造血干细胞移植领域研究的热点问题

① 基金项目: 徐州市科技计划项目 (XM09B062)

* 通信作者, E-mail: lilm@163.com

题。CD28是 T细胞表面最重要的共刺激分子,其与抗原呈递细胞 (APC)表面的 B7分子结合提供 T细胞活化所必需的第二信号,这一过程是 GVHD发生的关键因素之一。文献报道抑制 CD28的表达,阻断共刺激通路,可诱导特异性免疫耐受^[1]。

RNA 干扰 (RNA interference RNAi)是一种序列特异性的、与靶基因同源的双链 RNA (dsRNA)所诱导的转录后基因沉默 (post-transcriptional gene silencing PTGS)现象^[2]。近年来对 RNAi的研究有了突飞猛进的发展,因其具有特异性强、高效性等优点而在抗肿瘤、抗病毒、基因治疗等领域展示了巨大的潜力。在前期研究中,我们发现短发卡状 RNA (short hairpin RNA, shRNA)能够下调 CD28 mRNA的表达水平,同时发现质粒转染可能存在效率低且不稳定的缺点,限制了其在体内的长期研究^[3]。慢病毒载体既可感染分裂细胞又可感染非分裂细胞,还可整合入宿主细胞的染色体基因组中,长时间、稳定地引发基因沉默或表达抑制,并且还具有免疫原性低的特点^[4]。为了解决抗排斥反应的需要,本研究构建了含小鼠 CD28基因的 shRNA 干扰序列的慢病毒载体,以期获得长期稳定抑制 CD28表达的效应,抑制 T细胞增殖活化,为在活体内研究其对 GVHD的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 雄性 C57BL/6小鼠,8~12周龄,无特定病原体 (SPF)级,购自徐州医学院实验动物中心。慢病毒包装细胞系 293FT细胞,购自美国 Invitrogen

公司。大肠埃希菌菌株 DH5 α 由本实验室保存。含有 U6启动子和绿色荧光蛋白 (GFP)的慢病毒转移质粒 pLB由美国麻省理工学院 Kissler博士惠赠,包装质粒 pCMV Δ 8.91及包膜蛋白质粒 pMD.G为本实验室保存。限制性内切酶 HpaI 和 XhoI、T₄ DNA 连接酶购自美国 New England Biolabs公司。胎牛血清 (FBS)、DMEM 培养基、RPMI 1640培养基、Opti-MEM 培养基购自美国 Invitrogen公司。质粒 DNA 中量提取试剂盒、转染试剂 Lipofectamine 2000购自 Invitrogen公司。琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自 Promega公司。抗小鼠 CD28单克隆抗体购自 Santa Cruz Biotechnology,碱性磷酸酶标记山羊抗大鼠 IgG 购自北京中杉金桥公司。Purified anti-mouse CD3 ϵ 购自 Biolegend公司。聚凝胺购自德国 Fluka公司。鼠 IL-2购自美国 R&D公司。小鼠 CD28基因荧光定量 PCR 试剂盒购自广州达晖生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 双链 DNA 的设计及合成 根据 Genebank 公布的小鼠 CD28基因的序列 (NM 007642),设计 3对 shRNA 干扰序列及 1对非特异性干扰序列 (表 1)。经 BLAST 同源性检索确认与 CD28以外的小鼠已知基因序列无同源性。每条 Oligo DNA 由 19n 的寡核苷酸序列以正反向组合,中间添加 Loop 结构 (TTCAAGAGA),使寡核苷酸可以形成发夹结构,每对寡核苷酸两端分别带有 HpaI 和 XhoI 酶切位点,转录终止信号 (TTTTT)位于 Oligo DNA 3'末端。以上 Oligo DNA 由 Invitrogen 公司合成。

表 1 插入慢病毒载体 Oligo DNA 的序列

序列	5'端	正向序列	Loop结构	反向序列	3'端
shRNA1	T	GGTATTCCTACAACCTTCT	TTCAAGAGA	AGAAGGTTGTAGGAATACC	TTTTTTC
	TCGAGAAAAAA	GGTATTCCTACAACCTTCT	TCTCTTGAA	AGAAGGTTGTAGGAATACC	A
shRNA2	T	GGAGCAATGGAACATTAT	TTCAAGAGA	ATAATAGTTCCATTGCTCC	TTTTTTC
	TCGAGAAAAAA	GGAGCAATGGAACATTAT	TCTCTTGAA	ATAATAGTTCCATTGCTCC	A
shRNA3	T	GGACAAATAGTAGAAGGAA	TTCAAGAGA	TTCCTTCTACTATTTGTCC	TTTTTTC
	TCGAGAAAAAA	GGACAAATAGTAGAAGGAA	TCTCTTGAA	TTCCTTCTACTATTTGTCC	A
shRNA4	T	GAAACGAGTAGGCTATTTA	TTCAAGAGA	TAAATAGCCTACTCGTTTC	TTTTTTC
	TCGAGAAAAAA	GAAACGAGTAGGCTATTTA	TCTCTTGAA	TAAATAGCCTACTCGTTTC	A

1.2.2 慢病毒载体的构建及鉴定 设计并合成好的 Oligo DNA 退火形成双链 DNA,与经 HpaI 和 XhoI 酶切后胶回收的 pLB 线性化片段连接,连接后的重组质粒命名为 pLB-CD28/shRNA,包括特异性干扰质粒 pLB-CD28/shRNA1、2、3 和非特异性干扰质粒

pLB-CD28/shRNA4。使用载体多克隆位点两端的引物进行 PCR 扩增并于琼脂糖凝胶电泳鉴定。引物根据 Primer Premier 5.0 软件设计,上游引物: 5'-AAA GGA AAC TCA CCC TAA CTG T-3',下游引物: 5'-TGG AAT CTC GTG AAG CGA G-3'。预期

片段大小为 171 bp 挑选 PCR 鉴定与预期相符的重组阳性克隆菌液送 Invitrogen 公司进一步测序鉴定。

1.2.3 慢病毒载体的包装及滴度测定 将包装细胞 293FT 细胞接种于 10 cm 培养皿, 采用 Lipofectamine 2000 将 pLB-CD28/shRNA、pCMV Δ 8.91、pMD-G 三质粒进行共转染, 转染后 24、48 h 用荧光显微镜观察转染效率。收集 48、72 h 病毒上清, 4℃ 70 000 g 离心 2 h 分装后置 -80℃ 保存。采用有限稀释法荧光显微镜下观察 GFP 表达并计算病毒滴度, 公式为: 病毒滴度 = (GFP 阳性细胞个数 \times 稀释倍数) / ml

1.2.4 慢病毒感染脾细胞并分选 GFP 阳性细胞 取 C57BL/6 小鼠脾脏单个核细胞, 制成细胞密度为 1.5×10^9 /L 的细胞悬液, 在含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基 (含 rhIL-2 1×10^5 U/L、anti-mouse CD3e 5 mg/L) 中培养 24 h 以感染复数 (MOI) 为 5 的病毒浓缩液感染脾细胞, 同时加入终浓度为 8 mg/L 的聚凝胺及 5×10^4 U/L 的 rhIL-2, 37℃ 1200 r/min 离心 90 min, 感染 6 h 后换液, 72 h 荧光显微镜下观察感染情况。应用荧光激活的细胞分选技术 (FACS) 分选 GFP 阳性细胞, 置 -80℃ 冰箱保存。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测小鼠 CD28 mRNA 表达 用 Trizol 提取细胞总 RNA, 经反转录获得 cDNA, 以 GAPDH 作为内参照, 采用实时荧光定量 PCR 法检测 CD28 mRNA 的表达情况。CD28 基因上、下游引物序列分别为 5'-ATA TCT ACT TGG TTT GCT CTT ACT TCC-3', 5'-AAT AAA ACA AGG CAT GGA GAC AGG-3'; Taqman 探针序列为 5'-TTT GCC CAA ATG CCA CCT TCA ACT GTA GTT-3'; GAPDH 上、下游引物分别为: 5'-CGT GTT CCT ACC CCC AAT GT-3', 5'-TGT CAT CAT ACT TGG CAG GTT TCT-3'; Taqman 探针序列为 5'-TCG TGG ATC TGA CGT GCC GCC-3'。以上序列由中山大学达晖生物技术有限公司设计并合成, 实验操作按试剂盒说明书进行。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示 CD28 的相对表达量, 其中 $\Delta\Delta Ct = [目的基因的平均 Ct 值 (样本组) - 管家基因的平均 Ct 值 (样本组)] - [目的基因的平均 Ct 值 (校正组) - 管家基因的平均 Ct 值 (校正组)]$ 。PCR 反应采用美国 ABI 公司 7300 型荧光定量 PCR 仪完成。

1.2.6 Western blot 检测小鼠 CD28 蛋白表达 常规提取感染 72 h 后的小鼠 T 细胞总蛋白, 采用改良的 Lowry 法测定总蛋白浓度, 调整浓度为 3.33 mg/L 每

次取 100 μ g 总蛋白上样, 进行 SDS-PAGE 电泳, 半干转进行蛋白电泳转移, 选用 NBT/BCIP 显色, 双蒸水冲洗干燥保存, 条带扫描后使用 Image J 分析软件对蛋白条带的扫描图像进行灰度分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件, 行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD28/shRNA 重组载体的构建与鉴定 CD28 基因 shRNA 的 Oligo DNA, 经退火形成双链 DNA, 与经 HpaI 和 XhoI 双酶切后形成的 pLB 线性载体连接, 连接产物转化大肠埃希菌菌株 DH5 α , 挑取重组阳性克隆行 PCR 鉴定, 鉴定结果与预期相符 (图 1)。测序结果表明合成的 CD28 shRNA 的 Oligo DNA 序列正确插入 pLB 载体中 (图 2)。

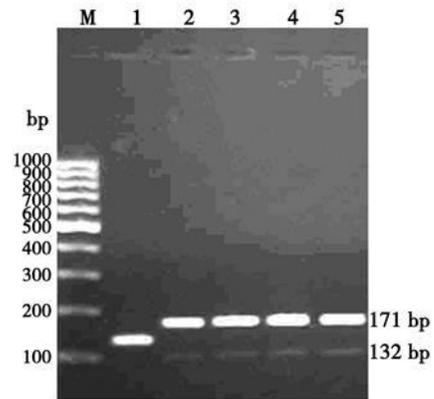


图 1 重组慢病毒载体阳性克隆的 PCR 鉴定

M. 100 bp DNA Ladder; 1. 空质粒 pLB; 2~5. 重组质粒 pLB-CD28/shRNA 1、2、3、4

2.2 重组慢病毒载体的包装与滴度测定 将慢病毒包装质粒、包膜质粒分别与构建好的 4 个慢病毒表达载体混合后共转染 293FT 细胞, 转染后 24、48 h 荧光显微镜下可见强烈的 GFP 表达, 细胞生长良好 (图 3); 转染后 48、72 h 收集病毒上清, 浓缩后进行病毒滴度测定, pLB-CD28/shRNA 1、2、3、4 及空载体 pLB 病毒滴度分别为 $(1.98 \pm 0.23) \times 10^{11}$ 、 $(2.21 \pm 0.56) \times 10^{11}$ 、 $(2.09 \pm 0.33) \times 10^{11}$ 、 $(1.86 \pm 0.28) \times 10^{11}$ 、 $(2.02 \pm 0.38) \times 10^{11}$ U/L。

2.3 感染后观察 各组重组慢病毒颗粒感染小鼠脾淋巴细胞, 感染后第 3 天荧光显微镜下观察 GFP 阳性细胞约占 10%。经 FACS 分选后 GFP 阳性细胞 $> 95\%$ 。

2.4 实时荧光定量 PCR 检测小鼠 CD28 mRNA 表达 经实时定量 PCR 检测, 特异性干扰质粒 pLB-

CD28/shRNA 1、2、3感染小鼠 T细胞后 CD28 mRNA 表达与正常对照组相比均有下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 其中 CD28/shRNA 3 基因沉默效应最明显, 表达量下降了 94.5%, 而非特异性干扰组、空载体组与正常对照组相比均无统计学差异 ($P > 0.05$) (图 4)。

2.5 Western blot检测小鼠 CD28 蛋白表达 结果

与实时荧光定量 PCR 基本一致 (图 5)。各组慢病毒颗粒感染小鼠 T细胞后, CD28/shRNA 1、2、3 感染组 CD28 蛋白的表达与正常对照组相比均有下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 其中 CD28/shRNA 3 基因沉默效果最明显, 蛋白表达量下降了 70.0%, 而非特异性干扰组、空载体组与正常对照组相比均无统计学差异 ($P > 0.05$)。

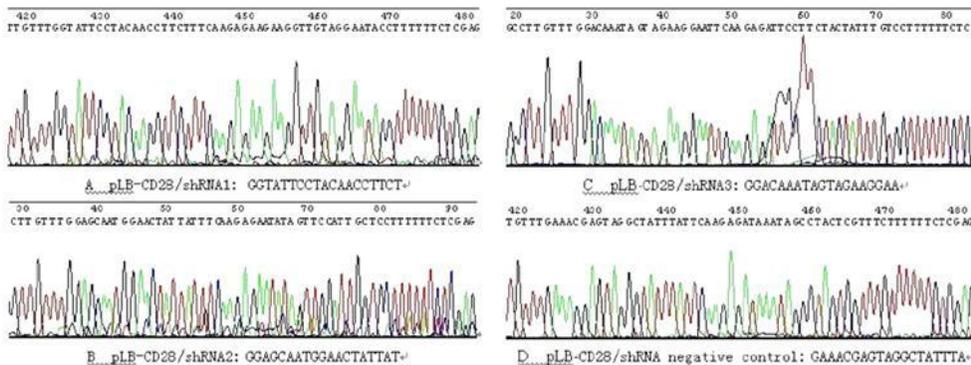


图 2 重组慢病毒载体阳性克隆的 DNA 测序鉴定 (部分)

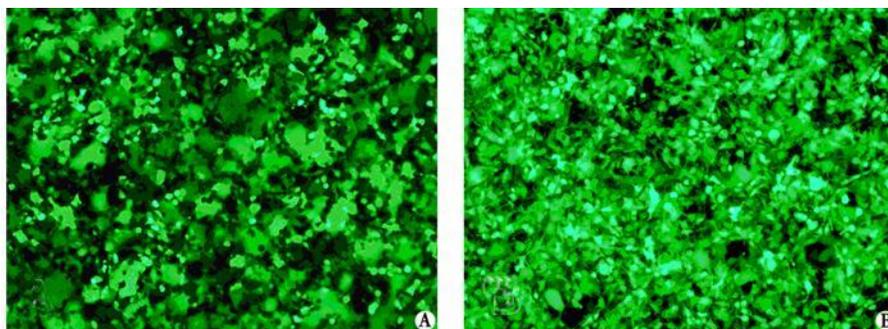


图 3 293FT 细胞转染后 GFP 表达 ($\times 100$)

A. 转染后 24 h; B. 转染后 48 h

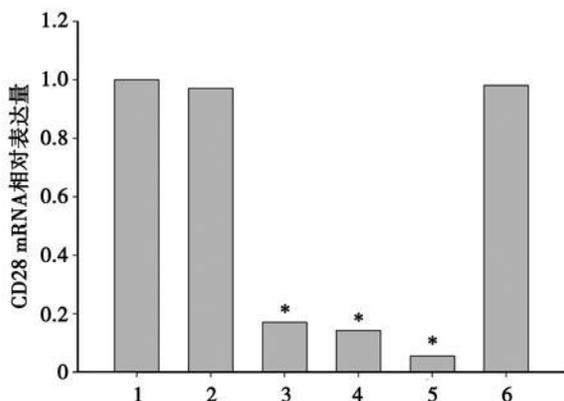


图 4 重组慢病毒感染 T 细胞后 CD28 mRNA 的表达

1. 正常对照组; 2. 空载体组; 3. CD28/shRNA 1; 4. CD28/shRNA 2; 5. CD28/shRNA 3; 6. CD28/shRNA 4

与正常对照组相比: * $P < 0.05$

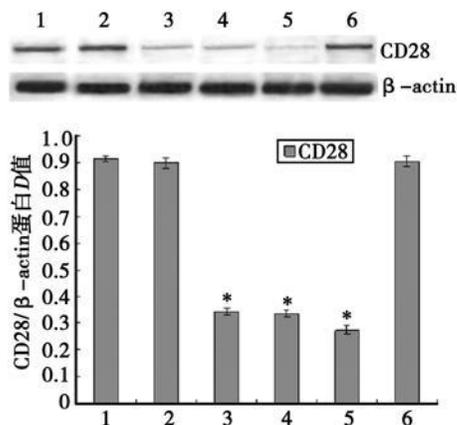


图 5 重组慢病毒感染 T 细胞后 CD28 蛋白的表达

1. 正常对照组; 2. 空载体组; 3. CD28/shRNA 1; 4. CD28/shRNA 2; 5. CD28/shRNA 3; 6. CD28/shRNA 4

与正常对照组相比: * $P < 0.05$

3 讨论

在移植排斥反应及移植物抗宿主病的发生过程中, T细胞作为主要的效应细胞, 在此过程中起着重要的作用^[5]。CD28作为 T细胞表面的抗原分子, 与配体结合后产生的 CD28/B7共刺激信号是 T细胞活化和增殖所必需的。如果阻断这一环节, T细胞增殖及排斥反应的发生将得到有效遏制, 从而诱导抗原特异性的免疫耐受。文献报道应用 CD28单克隆抗体可以减轻小鼠 GVHD的发生^[6]。

RNA i现象由 Fire等^[7]发现于秀丽杆线虫, 是一种转录后基因沉默现象, 后来发现此现象也存在于哺乳动物, 因其具有快速、有效、容易操作、序列特异性强等优点, 已被广泛应用于基因功能分析、信号转导通路和基因治疗的研究^[8-10]。最初的 RNA i实验采用体外合成小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA)的方法, 但存在费用昂贵、容易降解、干扰时间短等缺点。目前常用的是含有 RNA 聚合酶 III (如 U6或 H1)或聚合酶 II 启动子的载体, U6和 H1启动子可在哺乳细胞内有效表达, 与其连接的核酸可被加工成与相应双链 RNA (dsRNA) 同源的 shRNA, shRNA在 Dicer酶作用下被加工成具有沉默效应的 siRNA。为了提高转染效率, 研究者设计了含有 U6或 H1启动子的病毒载体, 包括腺病毒、逆转录病毒和慢病毒载体。慢病毒载体因其具有可感染分裂期与非分裂期细胞^[11]、感染效率高、转移基因片段容量较大等优势而被广泛应用。尤其是其遗传物质能够整合到宿主的基因组, 可进行长时间的稳定表达, 适用于体内 RNA i的研究, 是携带干扰 RNA 的理想载体^[12-13], 同时也扩大了载体感染细胞的范围^[14]。

本研究采用三质粒包装系统, 由 pLB、pCMVΔ8 91和 pMD-G组成。其中 pLB为慢病毒转移质粒, 含有 U6启动子, 能在宿主细胞中持续转录成 shRNA, 再生成有干扰作用的 siRNA, 同时该质粒能表达有 CMV启动子驱动的 GFP, 用于检测病毒包装的转染效率及感染目的细胞的感染效率。pCMVΔ8 91质粒中含有 HIV病毒的 gag, pol和 rev基因。其中, gag编码病毒主要的结构蛋白, pol编码病毒特异性的酶, rev编码的蛋白调节 gag和 pol的表达水平。pMD-G质粒中含有水疱状口炎病毒的 G糖蛋白 (VSV-G)基因, 使病毒颗粒能够结合于靶细胞上。293FT细胞作为病毒包装细胞, 在包装后能够产生高滴度的病毒颗粒, 同时表达报告基

因。

本研究设计了 3个 CD28基因的干扰靶点, 成功构建了含有 GFP报告基因的 CD28 shRNA慢病毒表达载体, 能有效抑制 T细胞表面 CD28的表达, 其为进一步研究体内沉默 CD28基因控制 GVHD的作用奠定了基础。

参考文献:

- [1] Frauwirth KA, Thompson CB. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation [J]. *J Clin Invest* 2002, 109(3): 295-299.
- [2] Hannon GJ. RNA interference [J]. *Nature* 2002, 418 (6894): 244-251.
- [3] 桑威, 徐开林, 潘秀英, 等. shRNA介导的 RNA干扰对小鼠 T细胞 CD28基因的沉默效应 [J]. *中华血液学杂志*, 2007, 28(12): 808-812.
- [4] Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, et al. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference [J]. *Nat Genet* 2003, 33 (3): 401-406.
- [5] Anderson BE, Taylor PA, McNiff JM, et al. Effects of donor T-cell trafficking and priming site on graft-versus-host disease induction by naive and memory phenotype CD4 T cells [J]. *Blood* 2008, 111(10): 5242-5251.
- [6] Yu XZ, Birkwell SJ, Martin PJ, et al. CD28-specific antibody prevents graft-versus-host disease in mice [J]. *J Immunol* 2000, 164(9): 4564-4568.
- [7] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature* 1998, 391(6669): 806-811.
- [8] Rossi JJ. Expression strategies for short hairpin RNA interference triggers [J]. *Hum Gene Ther* 2008, 19(4): 313-317.
- [9] Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe [J]. *Nat Rev Genet* 2009, 10(2): 94-108.
- [10] Bummelkamp TR, Bernards R, Agami R, et al. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference [J]. *Cancer Cell* 2002, 2(3): 243-247.
- [11] Nakdini L, Blomer U, Gally B, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector [J]. *Science* 1996, 272(5259): 263-267.
- [12] Follenzi A, Santambrogio L, Annoni A. Immune responses to lentiviral vectors [J]. *Curr Gene Ther* 2007, 7(5): 306-315.
- [13] Cockrell AS, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors [J]. *Mol Biotechnol* 2007, 36(3): 184-204.
- [14] Perletti G, Osti D, Marras E, et al. Generation of VSV-G pseudotyped lentiviral particles in 293T cells [J]. *J Cell Mol Med* 2004, 8 (1): 142-143.

收稿日期: 2010-03-04 修回日期: 2010-05-11

本文编辑: 李昕