

大鼠 microRNA-145 慢病毒表达载体的构建及其对血管平滑肌细胞表型转化的影响

王泽慧¹, 边云飞¹, 卫娜¹, 车星星¹, 肖传实²

(山西医科大学 1. 第二医院, 2. 第一医院心内科, 山西省太原市 030001)

[关键词] microRNA-145; 慢病毒表达载体; 血管平滑肌细胞; 表型转化

[摘要] **目的** 构建针对 Rno-miR-145 的慢病毒表达载体并探讨其在血小板源生长因子(PDGF)诱导的血管平滑肌细胞(VSMC)表型转化中的作用。**方法** 人工合成含有酶切位点粘端 miR-145 shDNA 双链模板序列,克隆于 LV3 pGLV/H1/GFP + Puro-miRNA 慢病毒穿梭载体中,转染 293T 细胞,收获并浓缩慢病毒颗粒,感染大鼠原代 VSMC,倒置荧光显微镜下观察 VSMC 感染后的荧光表达情况,实时荧光定量 PCR 检测 miR-145 的表达情况;实验分为空白对照组、PDGF 组、PDGF + miR-145 组和细胞转染阴性慢病毒载体组(miR-NC 组);采用实时荧光定量 PCR 测定 miR-145 对 VSMC 增殖相关基因 PCNA、c-Jun 及分化相关基因 SM22α mRNA 表达水平的影响。**结果** 成功构建了 microRNA-145 慢病毒载体,测定病毒滴度为 1×10^9 TU/mL。倒置荧光显微镜下观察大鼠 microRNA-145 慢病毒表达载体感染成功,MOI 值为 50,感染 72 h 时感染率最高。实时荧光定量 PCR 结果显示 PDGF 可使 PCNA、c-Jun 表达增加,而使 SM22α 表达降低;miR-145 可使 PDGF 诱导的去分化型 VSMC 增殖相关基因 PCNA、c-Jun 表达降低,分化相关基因 SM22α 表达增加。**结论** miR-145 慢病毒载体可高效感染大鼠原代 VSMC。感染 miR-145 慢病毒后可抑制 VSMC 的表型转化。

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Construction of Recombinant Lentivirus Vector Expressing Rno-miR-145 and Its Influence on Vascular Smooth Muscle Cells Phenotype Transformation

WANG Ze-Hui, BIAN Yun-Fei, WEI Na, CHE Xing-Xing, and XIAO Chuan-Shi
(Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

[KEY WORDS] MicroRNA-145; Lentivirus Expression Plasmid; Vascular Smooth Muscle Cells(VSMC); Phenotype Transformation

[ABSTRACT] **Aim** To construct a lentivirus vector expressing microRNA (miRNA) Rno-miR-145 and probe function of the vector in platlet derived growth factor (PDGF) induced vascular smooth muscle cells(VSMC) phenotype transform. **Methods** The miR-145 shDNA double chain template sequence was synthesized artificially and put this template sequence clone LV3 pGLV/H1/GFP + Puro-miRNA Lentivirus plasmid. 293T cells were transfected. Lentivirus particles(virosome) were harvested and concentrated, then primary cultured VSMC of the rats were infected. Fluorescence expression infected with VSMC was observed by inverted fluorescence microscope. miR-145 expression condition was detected with real-time PCR. Blank control group, PDGF group, PDGF + miR-145 group and miR-NC group were divided in this test. Influence of miR-145 on related genes c-Jun, PCNA, SM22α expression level was observed with real-time PCR. **Results** microRNA-145 lentivirus plasmid was constructed successfully. The viral titer was 1×10^9 TU/mL. microRNA-145 lentivirus expression plasmid was infected successfully. The best transfection efficiency was on the 3th day when multiply infection(MOI) was 50. Real-time PCR results revealed PDGF increased PCNA, c-Jun expression level, but reduced SM22α expression; miR-145 made VSMC related genes PCNA, c-Jun expression reduce, but made SM22α expression increase. **Conclusion** MicroRNA-145 lentivirus plasmid may infect rat VSMC efficiently. VSMC phenotype transformation may be inhibited by microRNA-145.

[收稿日期] 2011-12-05

[作者简介] 王泽慧, 硕士研究生, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail wangzehui085@sina.com。边云飞, 博士, 硕士研究生导师, 主要研究方向为冠心病基础与临床, E-mail yunfeibian@sina.com。通讯作者肖传实, 博士, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病基础与临床, E-mail ganxibaozhongxin@sina.com。

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 表型转化在动脉粥样硬化和血管再狭窄等血管重塑性疾病的发生发展中起重要作用。研究发现, miRNAs 是一种调节新生内膜形成的新的 RNA, miRNAs 可能成为血管增殖性疾病的一个新的治疗靶点^[1]。血小板源生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF) 是一种较强的有丝分裂因子, 能够促进平滑肌细胞向合成表型的转变^[2]。miR-145 在许多癌症中的表达下调, 能够抑制癌细胞增殖, 是一种新发现的抑癌基因^[3,4]。然而 miR-145 在 VSMC 表型转化中的作用机制国内外报道不多。因此, 本研究构建了 miR-145 慢病毒表达载体, 将其感染大鼠原代 VSMC, PDGF 诱导 VSMC 发生表型转化, 观察 miR-145 能否抑制 VSMC 的表型转化。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

SD 大鼠由山西医科大学动物中心提供; DMEM 细胞培养基、胎牛血清购自 Hyclone 公司; QIAquick Gel Extraction Kit 购自 QIAGEN; 质粒小提试剂盒购自 TIANGEN 公司; dNTP Mix, GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, BamH I、EcoR I 和 Taq DNA Polymerase 购自 Fermentas 公司; T4 DNA Ligase 购自 TAKARA 公司; 5 × Annealing Buffer for DNA Oligos 购自 Beyotime 公司; DNA oligo 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成; Lipofectamin 2000 转染试剂及 Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司; 293T 细胞购自上海生科院细胞库; Reverse Transcriptase (MMLV Reverse Transcriptase RNaseH-, 200 U/μL) 购自 Promega 公司; Real-time PCR Universal Reagent, miRNA 检测试剂盒及 pGLV3 购自上海吉玛制药技术有限公司; PCR 仪购自美国 BIO-RAD 公司; OLYMPUS 荧光倒置显微镜。所用引物由上海吉玛基因技术有限公司根据设计合成 (表 1)。

表 1. 引物序列

Table 1. Sequences of primers

Gene name	Primer sequence	Product
Rat GAPDH	F: 5'-GATGACATCAAGAAGGTGGTGA-3' R: 5'-ACCCTGTTGCTGTAGCCATATTC-3'	194 bp
U6 snRNA	F: 5'- ATTTGAACGATACAGAGAAGATT-3' R: 5'-GGAACGCTTCACGAATTTG-3'	70 bp
Rno-miR-145	F: 5'- ATTATATTGTCCAGTTTCCCAGG-3' R: 5'- AAAGGTTGTCTCCACTCTCTCTC-3'	84 bp
Rat c-Jun	F: 5'- CATCGACATGGAGTCTCAGGAGC-3' R: 5'- TTTCCTCTAGCCGGCGCATC-3'	116 bp
Rat PCNA	F: 5'-TCCAGACAAGCAATGTTGATAAAG-3'	61 bp

1.2 miR-145 慢病毒载体的构建

搜索 mirbase 数据库 (<http://www.mirbase.org>), 得到 Rno-miR-145 成熟体序列, Rno-miR-145: GTC-CAGTTTTCCCAGGAATCCCT, 利用 DNA START 6.0 软件设计含有酶切位点粘端 miR-145 shDNA 双链模板序列。将合成好的含有酶切位点粘端 miR-145 shDNA 单链退火连接到 LV3 pGLV/H1/GFP + Puro-miRNA 慢病毒穿梭载体中, 转化, 挑单克隆菌落, 摇菌抽质粒, 同时以相同方法, 通过 NCBI 数据库比对后, 建立无关序列阴性对照 (Scramble-NC: TTCTC-CGAACGTGTCACGT), 送上海生工用 3730DNA 测序仪测序。

1.3 miR-145 慢病毒载体的包装及病毒滴度测定

将构建好的 LV3 pGLV-miR-145 与慢病毒包装辅助质粒 (pGLV3/helper-1、pGLV3/helper-2、pGLV3/helper-3) 共转染细胞密度在 70% ~ 80% 的 293T 细胞。将转染慢病毒质粒的 293T 细胞系正常培养 60 ~ 72 h 后, 收集细胞上清, 于 4 ℃ 离心 10 min, 除去细胞碎片。将过滤后的液体进行超速离心浓缩, 用无血清培养基或 PBS 进行溶解。通过荧光显微镜计数荧光细胞, 结合稀释倍数计算病毒滴度, 荧光细胞数 × 有效稀释倍数 = 病毒滴度 (TU/mL)。

1.4 感染复数 (multiply of infection, MOI) 值测定

采用组织块贴壁法培养大鼠原代 VSMC, 5 ~ 12 天后可见 VSMC 自组织块周围长出。传代后对 VSMC 进行抗 α-SM-actin 免疫细胞化学染色鉴定。选择 3 ~ 8 代进行实验, 以 2 × 10⁹ 个/L 的密度接种至 24 孔板, 培养 2 天至细胞融合度达到 30% ~ 50%。分为 5 个不同梯度的 MOI 值。在完全培养基中加入含有 miR-145 和 miR-NC (阴性对照慢病毒) 的慢病毒载体上清, 对照组加入仅含 miR-NC 的阴性对照慢病毒载体上清, 两组均加上终浓度为 5 mg/L 的凝聚胺。共感染 24 h, 换新鲜培养基。感染后每天倒置荧光显微镜下观察各组细胞 GFP 表达情况, 并计数 GFP 阳性细胞的百分比。

1.5 大鼠原代 VSMC 感染及感染后 miR-145 表达情况

将生长良好的细胞按照每孔 10 × 10⁵ 个细胞接种于 6 孔板中, 以最适 MOI 值感染大鼠原代 VSMC, 取同一 MOI 值的阴性慢病毒感染阴性对照组, 置于孵箱中孵育 24 ~ 72 h, 同时设立空白对照组, 在倒置荧光显微镜下观察感染后 24、48、72 h 和 96 h GFP 荧光表达情况, 评价细胞感染效率。

利用 Trizol Reagent RNA 抽提试剂盒, 按照使用手册, 提取感染后 72 h 和 96 h 的空白细胞、阴性细

胞、阳性细胞总 RNA，采用分光光度法测定 RNA 的浓度和纯度。其后取 5 μL RNA 按照反转录试剂盒制备 cDNA 后，以 U6 snRNA 为内参，通过 SYBR Green 实时定量 PCR 的方法检测经慢病毒载体感染 VSMC 细胞后的 miR-145 变化。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测 miR-145 过表达后对 c-Jun、PCNA 及 SM22α mRNA 水平的影响

培养大鼠原代 VSMC，实验分为 4 组，空白对照组不进行感染。PDGF 组：加入 10 ng/mL 的 PDGF-BB。PDGF-BB + miR-145 组：细胞转染 miR-145 慢病毒载体 72 h 后加入终浓度为 10 ng/mL 的 PDGF-BB。miR-NC 组：细胞转染阴性慢病毒载体。同样也采用 SYBR Green 法实时 PCR 检测，反应体系为 20 μL，包含上游、下游引物、DNA 模板、Taq DNA 聚合酶和 dd

H₂O。定量反应条件：95℃ 3 min，然后以 95℃ 30 s、62℃ 40 s 进行 40 个循环。各组 PCR 均重复 3 次。mRNA 的相对表达量用 2^{-ΔΔCt} 方法来表示，其中 ΔCt = Ct_{目标mRNA} - Ct_{GAPDH}，ΔΔCt = ΔCt_{处理} - ΔCt_{对照}。

2 结果

2.1 载体构建测序结果

将合成好的含有酶切位点粘端 miR-145 shDNA 单链退火连接到 LV3 pGLV/H1/GFP + Puro-miRNA 慢病毒穿梭载体中，测序证明得到的序列与 mirbase 数据库中的 Rno-miR-145 序列完全一致。（图 1）。

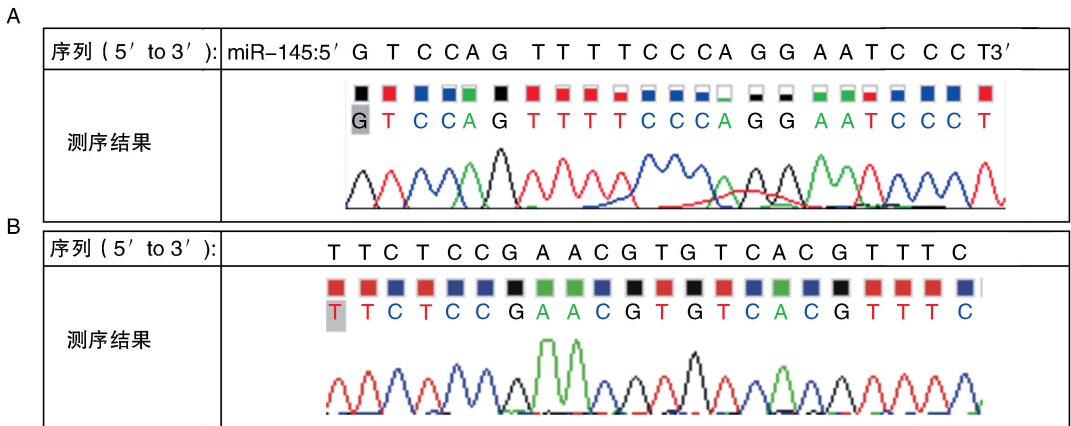


图 1. LV3-miR-145 及 Scramble-NC 测序结果 A 为 LV3-miR-145,B 为 Scramble-NC。

Figure 1. Sequencing results of LV3-miR-145 and Scramble-NC

2.2 病毒收集与滴度鉴定

在 96 孔细胞培养板中十倍稀释后行滴度鉴定。将浓缩病毒分别梯度稀释，分别感染 293T 细胞 48 和 72 h。通过以上病毒十倍梯度稀释滴度鉴定结果，

稀释到可以数清荧光细胞数,认为一个荧光细胞被一个有效病毒侵染,初步计数病毒滴度:250 个荧光细胞 ×4 个视野 ×10⁴ ×100 = 10⁹ TU/mL(图 2)。

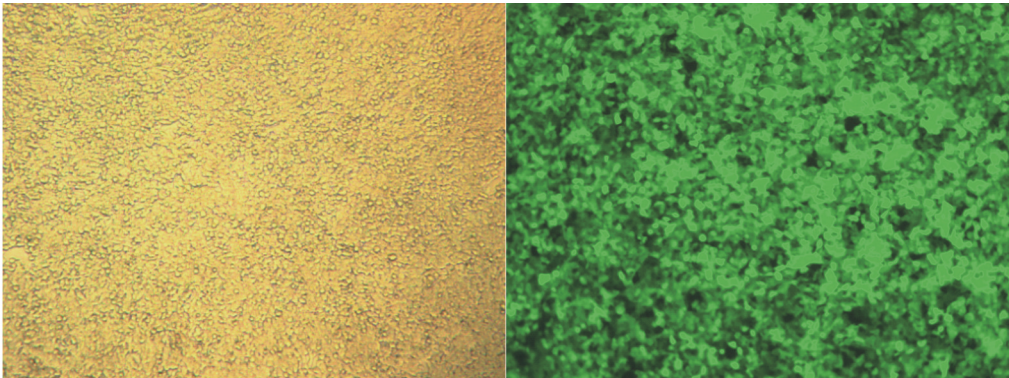


图 2. 病毒原液稀释 10 倍滴度结果 (×200) 左图为白背景,右图为荧光背景。

Figure 2. The results of virus stock solution was diluted 10-fold titer (×200)

2.3 靶细胞慢病毒感染

本研究采用含有绿色荧光报告基因标记的病毒载体观察、评估感染效率。倒置荧光显微镜观察感染 24 h,可以观察到部分绿色荧光,感染 3 天时绿色荧光报告基因表达最理想,感染组和阴性对照组绿色荧光报告基因感染率差异无显著性(图 3 和表 2)。

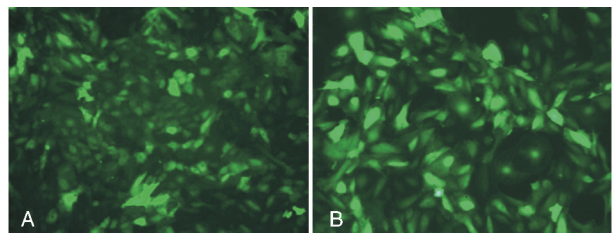


图 3. 慢病毒感染 72 h 细胞感染率(×200) A 为 miR-NC 组,B 为 miR-145 组。

Figure 3. The cell infection rate 72 h after transfection(×200)

表 2. 慢病毒感染 72 h 细胞感染率($\bar{x} \pm s$)

分 组	感染率
空白对照组	0.0%
miR-NC 组	93.5% ± 3.35%
miR-145 组	94.6% ± 5.16%

2.4 VSMC 感染慢病毒后 miR-145 的表达情况

将各组总 RNA 分别用各基因的反向引物作为特异性逆转录引物进行逆转录反应,得到的相应的逆转录产物 cDNA。取一定量的 cDNA(2 μL)利用 miR-145 特异性引物,通过 SYBR Green 实时定量 PCR 的方法检测经慢病毒载体导入到 VSMC 细胞,miR-145 变化结果说明设计的引物能够特异性扩增目的基因(图 4)。构建的 miR-145 过表达慢病毒载体在侵染目的细胞 72 h 后较空白细胞或阴性对照细胞表达丰度增加 72.5 倍($P < 0.01$;图 5)。

2.5 Real-time PCR 检测 miR-145 过表达后相关基因 mRNA 的表达

miR-145 过表达 72 h 后 c-Jun、PCNA、SM22α 的变化情况,结果发现与空白对照组比较,miR-NC 组 PCNA、c-Jun 及 SM22α mRNA 的表达无显著差异($P > 0.05$);与空白对照组比较,PDGF 组 PCNA、c-Jun mRNA 的表达分别上调 37% ($P < 0.05$) 和 168% ($P < 0.01$),而 SM22α mRNA 的表达下调 80% ($P < 0.01$)。提示 PDGF 可促进 VSMC 增殖抑制 VSMC

分化;与 PDGF-BB 组比较,PDGF-BB + miR-145 组 PCNA、c-Jun mRNA 的表达分别下调 66% 和 77% ($P < 0.01$),而 SM22α mRNA 的表达上调 335% ($P < 0.01$)。提示 miR-145 可抑制 PDGF 诱导的 VSMC 增殖而促进 VSMC 分化(图 6)。

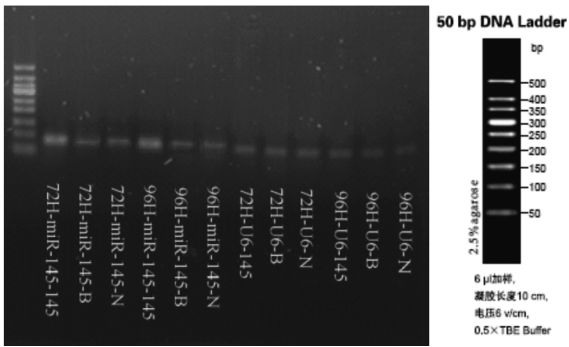


图 4. QRT-PCR 电泳质检图 左图为 PCR 电泳结果,右图为标准 DNA Marker。-145 代表 miR-145 组,-B 代表空白对照组,-N 代表 miR-NC 组(阴性慢病毒组)。

Figure 4. miR-145/U6 Electrophoresis of PCR products

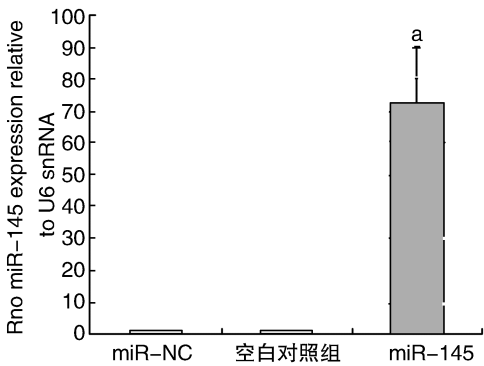


图 5. 以 U6 snRNA 为内参,检测大鼠 miR-145 表达情况 a 为 $P < 0.01$,与其余组比较。

Figure 5. Rno-miR-145 expression relative to U6 snRNA

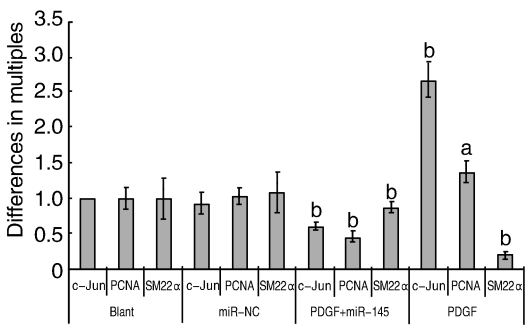


图 6. miR-145 过表达后,c-Jun、PCNA、SM22α 表达检测 a 为 $P < 0.05$,b 为 $P < 0.01$,与空白对照组比较。

Figure 6. c-Jun,PCNA,SM22α gene mRNA expression

3 讨 论

慢病毒是一种免疫缺陷病毒,感染宿主细胞后,病毒 DNA 可以整合到宿主细胞的染色体上并长期稳定表达。与其它逆转录病毒相比,慢病毒不仅能感染分裂细胞,而且还能感染非分裂细胞,并且还具有容纳外源性目的基因片段大、免疫反应小等特点,因此成为基因治疗研究的重要工具^[5-7]。最近有研究表明,miR-145 是正常动脉中含量最丰富的 miRNA,且主要聚集在 VSMC。miR-145 在 VSMC 的表型转化中起重要作用,在原代培养的 VSMC 中含量最丰富而在去分化的 VSMC 中的表达是下调的。并且,miR-145 对 VSMC 增殖及新生内膜形成有重要作用^[8-11]。据此本研究采用三质粒表达系统即 pGC - LV 载体、pHelper 1.0 载体和 pHelper 2.0 载体来构建慢病毒载体,建立 microRNA-145 增强体外模型,并探讨其在 VSMC 表型转化中的作用。

VSMC 分为分化型和去分化型两种表型。分化型 VSMC 主要通过表达一系列特异的收缩蛋白和骨架蛋白来维持其收缩及调节血管张力的功能,α-SM-actin、平滑肌肌球蛋白重链(SM-MHC)、Calponin 和 SM22α 表达是分化型 VSMC 表型的重要标志^[12]。PCNA 又称周期蛋白,是一种与细胞增殖周期有关的核内糖蛋白,是 DNA 复制的必须成分,其表达与细胞增殖活性有关^[13],故目前将其作为去分化型 VSMC 的重要标志。c-Jun 是早期原癌基因,编码的核蛋白(P39)可通过结构中的亮氨酸拉链与 c-Fos 结合形成异源二聚体,构成 AP-1(activating protein-1)转录因子。在血管损伤诱导的 VSMC 增殖过程中,存在 AP-1 的激活现象,并调节增殖相关基因的转录^[14],故目前将其作为去分化型 VSMC 的重要标志。VSMC 由分化表型向去分化表型转化是 VSMC 增殖与迁移的关键性起始步骤^[15],这是许多增生性血管疾病(如 PTCA 术后再狭窄、动脉粥样硬化、高血压病、移植性血管病)的共同病理基础。

本实验成功构建了 miR-145 慢病毒表达载体,感染大鼠原代 VSMC 后 RT-PCR 检测 miR-145 过表达;PDGF 可使原代 VSMC 转变为去分化型 VSMC 而获得增殖能力,在此基础上选择 VSMC 表型转化的三个标志基因,观察细胞感染 miR-145 慢病毒后能否抑制 VSMC 的表型转化。研究发现 VSMC 感染慢病毒后 miR-145 的表达较阴性对照细胞增加了 72.5 倍;同时发现与 PDGF 组促进 VSMC 表型转化相比,miR-145 过表达后可上调 VSMC 分化相关基因 SM22α 的表达 335%,而下调增殖相关基因 PCNA、c-Jun 的表达分别

为 66% 和 77%。提示 miR-145 可能抑制 VSMC 的表型转化。

[参考文献]

[1] Ruirui Ji, Yunhui Cheng, Junming Yue, et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of microRNA in vascular neointimal lesion formation[J]. Circ Res, 2007, 100: 1 579-588.

[2] 庞玲品, 黄石安. 血管平滑肌细胞表型转化相关因素及机制的研究进展[J]. 广东医学院学报, 2010, 28 (3): 312-314.

[3] 李新华, 张桂英. miRNAs 在不同亚型胃癌组织中的表达差异分析[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21 (26): 3 232-236.

[4] Cho WC, Chow AS, Au JS. Restoration of tumour suppressor hsa-miR-145 inhibits cancer cell growth in lung adenocarcinoma patients with epidermal growth factor receptor mutation[J]. Eur J Cancer, 2009, 45: 2 197-206.

[5] 潘松, 付勇, 刘强, 等. Math1 基因重组慢病毒的构建及其在 293T 细胞中的表达[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21 (4): 412-417.

[6] Wu LC, Sun CW, Ryan TM, et al. Correction of sickle cell disease by homologous recombination in embryonic stem cells[J]. Blood, 2006, 108 (4): 1 183-188.

[7] Yip PK, Wong L-F, Pattison D, et al. Lentiviral vector expressing retinoic acid receptor beta2 promotes recovery of function after corticospinal tract injury in the adult rat spinal cord[J]. Hum Mol Genet, 2006, 15 (21): 3 107-118.

[8] Cheng Y, Liu X, Yang J, et al. MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation[J]. Circ Res, 2009, 105 (2): 158-166.

[9] Chunxiang Zhang. MicroRNA-145 in vascular smooth muscle cell biology A new therapeutic target for vascular disease[J]. Cell Cycle, 2009, 8(21): 3 469-473.

[10] Mei Xin, Small EM, Sutherland LB, et al. MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury[J]. Genes & Dev, 2009, 23 (18): 2 166-178.

[11] Chunxiang Zhang. MicroRNA and vascular smooth muscle cell phenotype: new therapy for atherosclerosis? [J]. Genome Medicine, 2009, 1: 85.

[12] Owens, GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells[J]. Physiol Rev, 1995, 75 (3): 487-517.

[13] 耿雷, 刘国男. 碱性成纤维细胞生长因子在烟草烟雾诱导大鼠血管平滑肌细胞增殖中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18 (5): 345-350.

[14] Katz JP, Perreault N, Goldstein BG, et al. Loss of Klf4 in mice causes altered proliferation and differentiation and precancerous changes in the adult stomach[J]. Gastroenterology, 2005, 128 (4): 935-945.

[15] 方立, 陈晓彬. 降钙素基因相关肽介导内皮祖细胞抑制血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞表型转化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(2): 99-104.

(此文编辑 李小玲)