

## RagB 过表达慢病毒载体的构建及应用

欧翔<sup>1</sup>, 周志姣<sup>2</sup>, 皮银珍<sup>1</sup>

(1.长沙市第一医院内分泌科, 湖南省长沙市 410005; 2.中南大学湘雅三医院病理科, 湖南省长沙市 410013)

[关键词] 慢病毒载体; C2C12 细胞; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

[摘要] **目的** 构建含有 RagB 的重组慢病毒表达载体, 实现 RagB 基因在 C2C12 细胞中过表达, 并检测熊果酸对该细胞中哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 活性的调节作用。**方法** 使用 Flag pLJM1 RagB<sup>WT</sup>、Flag pLJM1 RagB<sup>54L</sup> 和 Flag pLJM1 RagB<sup>99L</sup> 慢病毒载体作为模板, PCR 扩增 Flag-RagB<sup>WT</sup>、Flag-RagB<sup>54L</sup> 和 Flag-RagB<sup>99L</sup>, 然后将其亚克隆到 pWPI 载体的 SmaI 酶切位点之中, 进行菌液 PCR 鉴定; 将克隆好的 pWPI-RagB<sup>WT</sup>、pWPI-RagB<sup>54L</sup> 和 pWPI-RagB<sup>99L</sup> 质粒和病毒包装质粒 psPAX2、pMD2.G 按相应的比例转染到 293T 细胞中, 48 h 后收集上清液感染 C2C12 细胞, 实现 RagB 基因在 C2C12 细胞中过表达; 使用亮氨酸和熊果酸单独或共同处理 RagB<sup>99L</sup> 过表达的 C2C12 细胞, Western blot 检测 mTOR 活性。**结果** 使用上清液感染 C2C12 细胞, 荧光显微镜显示感染效率接近 100%, Western blot 证实 RagB 蛋白表达明显增高; 熊果酸显著抑制 RagB<sup>99L</sup> 过表达细胞中 mTOR 活性。**结论** 通过构建慢病毒载体实现 RagB 基因在 C2C12 细胞中过表达, RagB 在熊果酸抑制 mTOR 活性中具有关键作用。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

### The Construction and Application of Lentivirus Vectors of Overexpression for RagB Gene

OU Xiang<sup>1</sup>, ZHOU Zhi-Jiao<sup>2</sup>, and PI Yin-Zhen<sup>1</sup>

(1. Department of Endocrinology, the First Hospital of Changsha, Changsha, Hunan 410005, China; 2. Department of Pathology, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410013, China)

[KEY WORDS] Lentivirus Expression Vector; C2C12 Cells; Mammalian Target of Rapamycin

[ABSTRACT] **Aim** To construct the lentivirus expression vector of overexpression for RagB gene, realize the overexpression of RagB gene in C2C12 cells, test the regulation of mammalian target of rapamycin (mTOR) activation mediated by Ursolic acid. **Methods** The lentivirus expression vectors, Flag pLJM1 RagB<sup>WT</sup>, Flag pLJM1 RagB<sup>54L</sup> and Flag pLJM1 RagB<sup>99L</sup> were employed in the experiment. Using PCR to amplify the full length of Flag-RagB<sup>WT</sup>, Flag-RagB<sup>54L</sup> and Flag-RagB<sup>99L</sup>, then they were subcloned into the pWPI lentivirus vector through SmaI restriction site and identified by bacteria liquid PCR. The cloned lentivirus vectors (pWPI-RagB<sup>WT</sup>, pWPI-RagB<sup>54L</sup> and pWPI-RagB<sup>99L</sup>) were packaged with packaging vectors (psPAX2 and pMD2.G) via specific ratio and transfected into 293T cells. 48 hours after the transfection, the media was collected and used to infect C2C12 cells. RagB<sup>99L</sup>-overexpressed C2C12 myoblasts were treated individually or jointly with leucine and ursolic acid, mTOR activation was detected by Western blot. **Results** The efficiency of infection observed by fluorescence microscope was almost 100%, the expression of RagB in C2C12 cells proved by Western blot was enhanced significantly in RagB overexpression group. Ursolic acid inhibited significantly mTOR activation in RagB<sup>99L</sup>-overexpressed C2C12 myoblasts. **Conclusion** The results indicate that RagB can be overexpressed in C2C12 cells by constructing the lentivirus expression vector, RagB plays a critical role in ursolic acid-inhibited mTOR activation.

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 是一种在调节蛋白质和脂质合

[收稿日期] 2016-04-21

[修回日期] 2016-05-30

[作者简介] 欧翔, 博士, 主治医师, 研究方向为 2 型糖尿病心血管病并发症的发病机制, E-mail 为 xou168@163.com。周志姣, 博士, 医师, 研究方向为鼻咽癌发病机制, E-mail 为 zjzhou5790@163.com。皮银珍, 硕士, 主任医师, 研究方向为 2 型糖尿病发病机制, E-mail 为 yinzhenni@126.com。

成、自噬、线粒体代谢和生物合成等方面起重要作用的丝氨酸/苏氨酸激酶<sup>[1-2]</sup>。mTOR 激活可导致胰岛素抵抗和肥胖相关疾病如 2 型糖尿病和心血管疾病的发生<sup>[3]</sup>。mTOR 激活的主要下游效应是引起 S6K 和 4E-BP1 的磷酸化,因此通常通过检测 S6K 的磷酸化水平来反映 mTOR 活性<sup>[4]</sup>。

Ras 相关的 GTP 酶 (Ras-related GTPase, Rag) 是带有一个规则的 N 端 Ras 样 GTP 结构域和一个独特的 C 端 RagA 保守区域的 GTP 酶家族成员<sup>[5]</sup>, 哺乳动物细胞存在 4 种 Rag 蛋白, 分别是 RagA、RagB、RagC 和 RagD<sup>[6]</sup>。组成性激活突变的 Rag 过表达增强氨基酸饥饿的哺乳动物细胞 TORC1 活性, 而失活性突变的 Rag 过表达减弱氨基酸对 TORC1 的刺激效果<sup>[7]</sup>。因此, RagB 介导 mTOR 信号途径的激活对 2 型糖尿病和心血管疾病的发生发展具有重要作用。我们拟在骨骼肌前体细胞中过表达 RagB<sup>99L</sup> 蛋白, 探讨 RagB 在熊果酸调节 mTOR 活性中的作用。我们在预实验中使用传统转染方法未能实现 RagB 在 C2C12 细胞中过表达, 由于慢病毒载体感染效率高, 能将外源基因有效地整合到细胞中, 从而实现持久表达。因此本研究以 pWPI 为载体构建 RagB 基因过表达慢病毒载体, 观察 RagB 蛋白在 C2C12 细胞中的表达情况, 此载体的构建将为深入研究 RagB 调节 mTOR 信号途径的分子机制提供方便。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒和细胞

C2C12 骨骼肌细胞株购自 ATCC 公司, 293T 细胞为实验室所有, 含 RagB 的质粒 Flag pLJM1 RagB<sup>WT</sup> (Plasmid # 19313)、Flag pLJM1 RagB<sup>54L</sup> (Plasmid #19314) 和 Flag pLJM1 RagB<sup>99L</sup> (Plasmid # 19315)、慢病毒载体 pWPI (Plasmid #12254)、慢病毒包装质粒 pCMV-VSV-G (Plasmid #8454)、pCMV-dR8.2 dvpr (Plasmid # 8455)、pMD2. G (Plasmid # 12259) 和 psPAX2 (Plasmid #12260) 均购自 Addgene 公司。其中 RagB<sup>WT</sup> 指 RagB 基因, RagB<sup>54L</sup> 指 RagB 的 54 位苏氨酸突变为亮氨酸, 其过表达可抑制 mTOR 活性, RagB<sup>99L</sup> 指 RagB 的第 99 位谷氨酰胺突变为亮氨酸, 其过表达可增强 mTOR 活性。

### 1.2 主要试剂和耗材

SwaI 内切酶购自 Biolab 公司, 5XIn-Fusion HD Enzyme Premix 购自 TaKaRa 生物学技术公司, 少量快速质粒提取试剂盒购自 Omega 公司, DMEM 培

养基、血清购自 ATCC 和 Gibco 公司, 抗 Flag 抗体购自 Sigma 公司, 抗 S6K 和 p-S6K 抗体购自 Cell Signaling 公司。

### 1.3 pWPI-RagB<sup>WT</sup>、pWPI-RagB<sup>54L</sup> 和 pWPI-RagB<sup>99L</sup> 质粒的构建

用 PCR 方法从 Flag pLJM1 RagB<sup>WT</sup>、Flag pLJM1 RagB<sup>54L</sup> 和 Flag pLJM1 RagB<sup>99L</sup> 三质粒中扩增 Flag-RagB<sup>WT</sup>、Flag-RagB<sup>54L</sup> 和 Flag-RagB<sup>99L</sup>, 在 PCR 引物前后分别加上 SwaI 酶切位点及相连的 15 个碱基, 引物序列: 上游 5'-GGA ATT TCG ACA TTT ATG GAC TAC AAG GAT GAC GAT GAC AAG-3'; 下游 5'-AGA TTA ATT AAA TTT TTA GCG CAT GAG AAG ACA CTG CTT T-3'。经 PCR 扩增后目的片段大小约 1200 bp, 凝胶回收后测序。用 SwaI 酶将 pWPI 慢病毒质粒进行酶切, 回收凝胶。将经酶切的 pWPI 质粒分别与扩增得到的 Flag-RagB<sup>WT</sup>、Flag-RagB<sup>54L</sup> 和 Flag-RagB<sup>99L</sup> 片段在常温下混合, 加入 Infusion 酶, 55°C 水浴 15 min, 将此混合液转化 DH5a 感受态, 冰浴 30 min, 42°C 水浴热激 90 s, 冰上 2 min, 在每管中加入无抗生素的 LB 培养基, 将各管分别涂布于氨苄抗性的 LB 培养皿上, 37°C 过夜, 次日上午各挑选 10 个单克隆, 摇菌后进行菌液 PCR 鉴定。

### 1.4 慢病毒的包装

使用包含青-链霉素双抗和新生牛血清的 DMEM 培养基培养 293T 细胞, 将 293T 细胞接种于 100 mm 培养皿中, 当细胞汇合率达 80% 后, 把慢病毒包装质粒 pCMV-VSV-G、pCMV-dR8.2 dvpr 与 Flag pLJM1 RagB<sup>99L</sup> 进行预混, 按 Lipofectamine 的使用说明转染 293T 细胞。另将 psPAX2、pMD2. G 分别与 pWPI-RagB<sup>WT</sup>、pWPI-RagB<sup>54L</sup> 和 pWPI-RagB<sup>99L</sup> 进行预混, 按 Lipofectamine 的使用说明转染 293T 细胞。6 h 后换液, 转染后 2~3 天于倒置荧光显微镜下观察 293T 细胞中 GFP 的荧光表达情况。转染后 72 h 收集培养液, 2000 r/min 离心 30 min, 取上清, 即为病毒提取液, -80°C 分装保存。

### 1.5 慢病毒感染和免疫印迹鉴定

使用包含青-链霉素双抗和新生牛血清的 DMEM 培养基培养 293T 细胞和 C2C12 细胞, 用 Flag-pLJM1-RagB 包装的重组慢病毒、pWPI-RagB 包装的重组慢病毒分别感染 293T 细胞和 C2C12 细胞, 72 h 后将载有感染细胞的 6 孔板置于荧光显微镜下, 在 450~490 nm 的激发光下观察细胞, 拍摄同一个视野下白光和绿色荧光照片, 计算感染效率。RagB<sup>99L</sup> 过表达细胞分别经亮氨酸和/或熊果酸处理后, 收集细胞, 提取蛋白质, 10% SDS-PAGE 电泳, 电

转移至硝酸纤维素膜上,经 5%BSA 常温封闭 2 h, 孵育 Flag 抗体,4℃孵育过夜,10 mmol/L PBS(pH 7.4) 洗涤后,二抗常温孵育 2 h,ECL 显影,以  $\beta$ -actin 为内参照。

## 2 结果

### 2.1 经 Flag pLJM1 RagB<sup>99L</sup> 包装的慢病毒未实现 RagB 基因在 C2C12 细胞中表达

将慢病毒包装质粒 pCMV-VSV-G、pCMV-dR8.2 dvpr 分别与 Flag pLJM1 RagB<sup>99L</sup> 及空质粒预混,转染 293T 细胞后包装病毒并收集病毒液,分别感染 C2C12 细胞和 293T 细胞,Western blot 检测 Flag-RagB 表达。Western blot 结果显示,经 Flag pLJM1 RagB<sup>99L</sup> 包装的慢病毒感染的 293T 细胞中 Flag-RagB 有较强的表达,但 C2C12 细胞中未见 Flag-RagB 的表达(图 1)。

### 2.2 pWPI-RagB 载体的构建与鉴定

由于 Flag-pLJM1-RagB 慢病毒不能介导 RagB 基因在 C2C12 细胞中表达,将 RagB 片段克隆至

pWPI 载体,构建 pWPI-RagB<sup>WT</sup>、pWPI-RagB<sup>54L</sup> 和 pWPI-RagB<sup>99L</sup> 质粒。以 Flag pLJM1 RagB<sup>WT</sup>、Flag pLJM1 RagB<sup>54L</sup> 和 Flag pLJM1 RagB<sup>99L</sup> 作为模板,设计引物扩增 RagB<sup>WT</sup>、RagB<sup>54L</sup> 和 RagB<sup>99L</sup>,经琼脂糖凝胶电泳后在 1200 bp 左右位置可见清晰条带(图 2A),凝胶回收后测序正确。用 SmaI 酶酶切 pWPI,凝胶电泳后在 11000 bp 左右可见一清晰条带,比未酶切 pWPI 质粒电泳位置稍高,表明酶切成功(图 2B)。在 Infusion 酶的作用下,将目的片段 RagB<sup>WT</sup>、RagB<sup>54L</sup> 和 RagB<sup>99L</sup> 直接定向克隆至线性化的 pWPI 载体中,转化大肠杆菌后,涂板,各挑 10 个单克隆摇菌,取菌液作为模板,设计引物对 RagB 基因进行 PCR 扩增,凝胶电泳后发现所有经 pWPI-RagB<sup>WT</sup> 单克隆扩增后的片段条带位置正确,8 个经 pWPI-RagB<sup>54L</sup> 单克隆扩增后的片段条带位置正确,余 2 个扩增出引物二聚体,6 个经 pWPI-RagB<sup>99L</sup> 单克隆扩增后的片段条带位置正确,余 4 个扩增出引物二聚体(图 2C)。从 pWPI-RagB<sup>WT</sup>、pWPI-RagB<sup>54L</sup> 和 pWPI-RagB<sup>99L</sup> 三组中各挑选 3 个阳性克隆进行摇菌,抽提质粒,测序结果完全正确,表明载体构建成功。

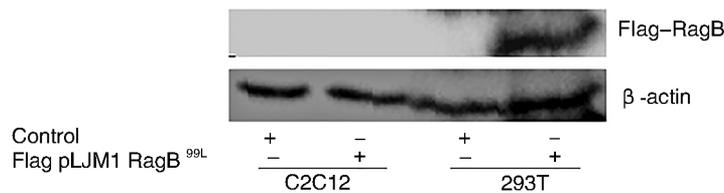


图 1. Western blot 检测 pLJM1 包装的慢病毒介导 RagB<sup>99L</sup> 在 C2C12 细胞和 293T 细胞中的表达

Figure 1. Analysis of RagB<sup>99L</sup> expression mediated by pLJM1-packaged lentivirus in C2C12 cells and 293T cells with Western blot

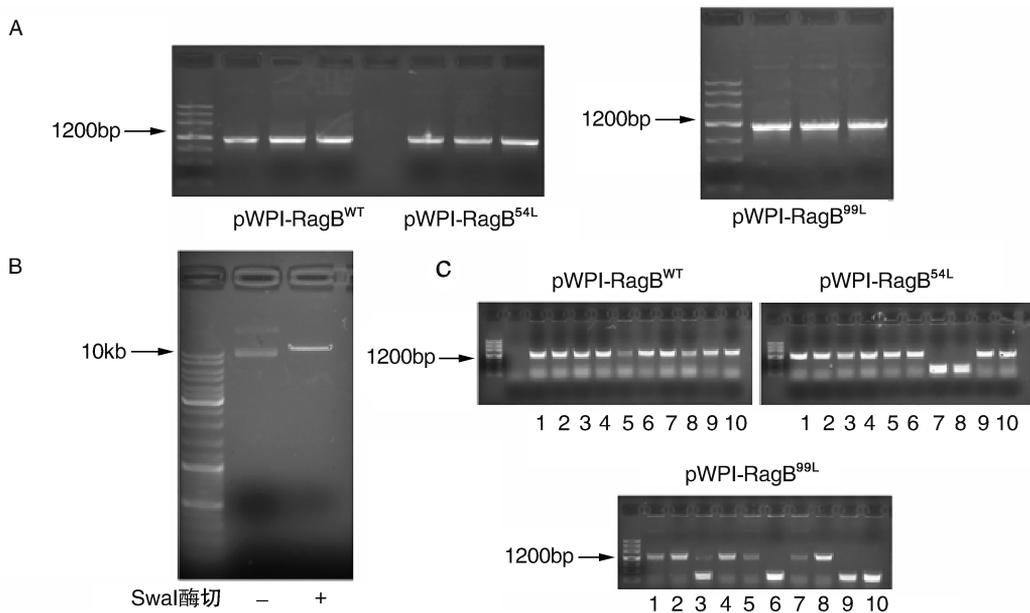


图 2. pWPI-RagB<sup>WT</sup>、pWPI-RagB<sup>54L</sup> 和 pWPI-RagB<sup>99L</sup> 载体的构建和鉴定

1-10 代表 RagB<sup>WT</sup>、RagB<sup>54L</sup> 和 RagB<sup>99L</sup> 克隆至 pWPI 载体中,转化大肠杆菌涂板后选取的 10 个单克隆菌落。

Figure 2. The construction and identification of pWPI-RagB<sup>WT</sup>, pWPI-RagB<sup>54L</sup> and pWPI-RagB<sup>99L</sup>

### 2.3 pWPI-RagB<sup>WT</sup>、pWPI-RagB<sup>54L</sup> 和 pWPI-RagB<sup>99L</sup> 包装的慢病毒在 C2C12 细胞中的表达

使用三种慢病毒感染 C2C12 细胞,48 h 后可见

较强的荧光表达,感染后的 C2C12 细胞形态完整,没有因感染慢病毒而出现死亡的现象,转染效率接近 100%(图 3)。

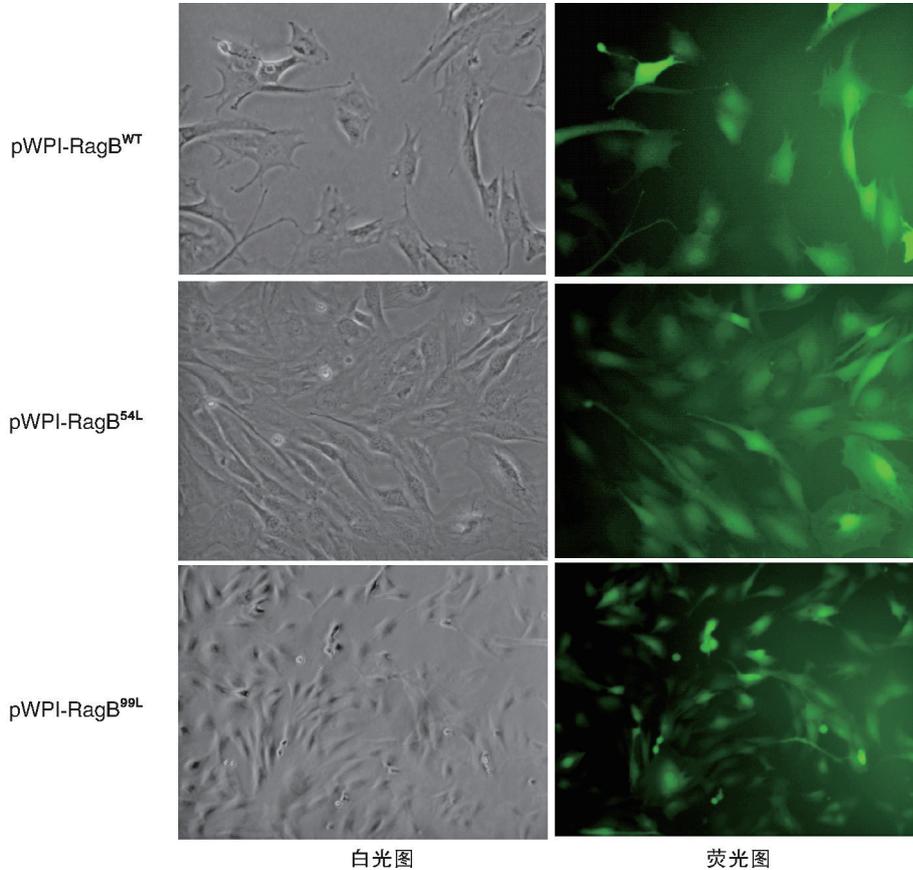


图 3. 荧光倒置显微镜检测 pWPI 包装的慢病毒介导 RagB<sup>WT</sup>、RagB<sup>54L</sup> 和 RagB<sup>99L</sup> 在 C2C12 细胞中的表达(200×)

Figure 3. Observation of the expression of RagB<sup>WT</sup>、RagB<sup>54L</sup> and RagB<sup>99L</sup> mediated by pWPI-packaged lentivirus in C2C12 cells with fluorescence microscopy(200×)

### 2.4 慢病毒介导的 RagB 在 C2C12 细胞中的表达

为了确定所构建的慢病毒能否介导 RagB 在 C2C12 细胞中表达,使用包装的病毒液感染 C2C12 细胞。提取总蛋白后用 Flag 一抗和羊抗鼠二抗检测。Western blot 结果显示,经 pWPI-RagB 包装的病毒感染的 C2C12 细胞中检测到 RagB 特异性条带,而感染阴性对照慢病毒的细胞中未检测到该条带(图 4)。

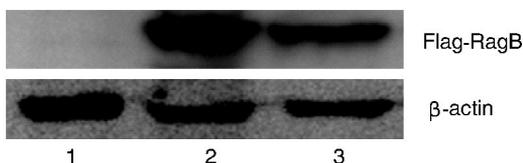


图 4. Western blot 检测 pWPI 包装的慢病毒介导 RagB 在 C2C12 细胞中的表达 1 为阴性对照,2 为 pWPI-RagB 包装的病毒感染 293T 细胞,3 为 pWPI-RagB 包装的病毒感染 C2C12 细胞。

Figure 4. Analysis of RagB expression mediated by pWPI-packaged lentivirus in C2C12 cells with Western blot

### 2.5 熊果酸抑制 RagB<sup>99L</sup> 过表达细胞中 mTOR 活性

由于 mTOR 活性可通过 S6K 磷酸化水平来反映,使用慢病毒载体实现 RagB<sup>99L</sup> 在 C2C12 细胞中过表达,将亮氨酸和熊果酸单独处理或共处理细胞后检测 S6K 磷酸化水平。结果显示:RagB<sup>99L</sup> 过表达细胞中 S6K 磷酸化水平明显增强,亮氨酸没有进一步增强 S6K 磷酸化水平,熊果酸明显抑制 RagB<sup>99L</sup> 过表达细胞中 mTOR 活性,这表明 RagB 在熊果酸抑制 mTOR 活性中发挥重要作用(图 5)。

## 3 讨论

骨骼肌胰岛素抵抗是导致 2 型糖尿病和心血管疾病的关键因素<sup>[8]</sup>。从分子生物学的角度去阐述胰岛素抵抗分子机制已成为目前研究工作的热点。氨基酸、生长因子等通过激活 mTOR 途径而激活其

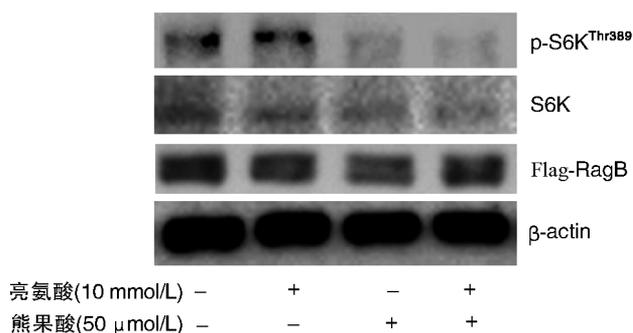


图 5. 熊果酸抑制 RagB<sup>99L</sup> 过表达细胞中 mTOR 活性  
**Figure 5. Ursolic acid inhibits mTOR activation in RagB<sup>99L</sup>-overexpressed cells**

下游靶点 S6K<sup>[9]</sup>, mTOR/S6K 信号途径在肥胖相关胰岛素抵抗的发生中发挥关键作用,其信号的持续激活促进胰岛素抵抗<sup>[10]</sup>,因此,mTOR 活性的调节对糖尿病心血管并发症的防治非常必要<sup>[11]</sup>。

mTOR 信号依赖于 Rag GTP 酶的活性<sup>[12-13]</sup>。本研究中,我们通过构建慢病毒载体,首次实现 RagB 在 C2C12 骨骼肌细胞中稳定表达。慢病毒的一个重要应用是实现某基因在人或动物细胞中持续表达<sup>[14]</sup>。慢病毒感染具有多种特性,包括高效感染分化和未分化细胞、长期稳定表达转基因及低免疫原性。使用 Flag pLJM1 RagB<sup>99L</sup> 质粒包装慢病毒仅实现 RagB<sup>99L</sup> 在 293T 细胞中表达,未能实现 RagB<sup>99L</sup> 在 C2C12 细胞中过表达,因此我们设计引物将 RagB<sup>WT</sup>、RagB<sup>54L</sup> 和 RagB<sup>99L</sup> 进行扩增,并通过 Infusion 酶将此三个片段整合至慢病毒载体 pWPI 中,从而成功构建 pWPI-RagB<sup>WT</sup>、pWPI-RagB<sup>54L</sup> 和 pWPI-RagB<sup>99L</sup> 三质粒,再将包装的病毒液分别感染 C2C12 细胞,发现细胞中表达出绿色荧光,说明慢病毒成功介导外源片段在 C2C12 细胞中表达,Western blot 结果显示目的片段位置正确,表明 RagB 蛋白在 C2C12 细胞中成功表达。实验证实 RagB 在熊果酸抑制 mTOR 激活中发挥重要作用,RagB 慢病毒载体的构建为进一步研究 RagB 在 C2C12 细胞中的生物学效应、分子机制以及 RagB 在 2 型糖尿病和心血管疾病的发生发展中发挥的分子作用机制打下了坚实的基础。

#### [参考文献]

- [1] Ou X, Liu M, Luo HR, et al. Ursolic acid inhibits leucine-stimulated mTORC1 signaling by suppressing mTOR localization to lysosome [J]. Plos One, 2014, 9 (4) : e95393.
- [2] Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism [J]. Cell, 2006, 124: 471-484.
- [3] Jia G, Aroor AR, Martinez-Lemus LA, et al. Overnutrition, mTOR signaling, and cardiovascular diseases [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2014, 307 (10) : 1 198-206.
- [4] Hatanaka M, Maier B, Sims EK, et al. Palmitate induces mRNA translation and increases ER protein load in islet β-cells via activation of the mammalian target of rapamycin pathway [J]. Diabetes, 2014, 63 (10) : 3 404-415.
- [5] Sancak Y, Sabatini DM. Rag proteins regulate amino-acid-induced mTORC1 signalling [J]. Biochem Soc Trans, 2009, 37 (1) : 289-290.
- [6] Valbuena N, Guan KL, Moreno S. The Vam6 and Gtr1-Gtr2 pathway activates TORC1 in response to amino acids in fission yeast [J]. J Cell Sci, 2012, 125 (8) : 1 920-928.
- [7] Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, et al. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response [J]. Nat Cell Biol, 2008, 10 (8) : 935-945.
- [8] Smith GI, Yoshino J, Stromsdorfer KL, et al. Protein ingestion induces muscle insulin resistance independent of leucine-mediated mTOR activation [J]. Diabetes, 2015, 64 (5) : 1 555-563.
- [9] Kenji U, Tetsuya Y, Yasushi I. A hepatic amino acid/mTOR/S6K-dependent signalling pathway modulates systemic lipid metabolism via neuronal signals [J]. Nat Commun, 2015, 6: 7940.
- [10] Yang P, Zhao Y, Zhao L, et al. Paradoxical effect of rapamycin on inflammatory stress-induced insulin resistance in vitro and in vivo [J]. Sci Rep, 2015, 5: 14959.
- [11] Chong ZZ, Maiese K. Mammalian target of rapamycin signaling in diabetic cardiovascular disease [J]. Cardiovasc Diabetol, 2012, 11: 45.
- [12] Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, et al. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1 [J]. Science, 2008, 320: 1 496-501.
- [13] Oshiro N, Rapley J, Avruch J. Amino acids activate mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 1 without changing Rag GTPase guanyl nucleotide charging [J]. J Biol Chem, 2014, 289 (5) : 2 658-674.
- [14] Shi Q, Wilcox DA, Fahs SA, et al. Lentivirus-mediated platelet-derived factor VIII gene therapy in murine haemophilia A [J]. J Thromb Haemost, 2007, 5 (2) : 352-361.

(此文编辑 文玉珊)