

携带siSPK1重组腺病毒的构建及其对N2a细胞凋亡的影响

杨 阳¹ 马 嵘² 张 远¹ 吕冰洁³ 汪 敏¹ 孙圣刚¹ 黎 钢^{1*}

(¹华中科技大学同济医学院附属协和医院神经内科, 武汉 430022; ²华中科技大学同济医学院药理学系, 武汉 430030; ³华中科技大学同济医学院附属协和医院呼吸科, 武汉 430022)

摘要 应用AdMax腺病毒载体系统构建携带siSPK1基因的重组腺病毒, 进一步研究SPK1基因对N2a细胞凋亡的影响。设计可形成小发夹结构的SPK1-siRNA模板cDNA序列, 克隆至质粒pDC316-siRNA, 构建SPK1-siRNA穿梭质粒pDC316-SPK1, 经鉴定正确后, 将pDC316-SPK1与辅助包装质粒(pBHG lox ΔE1,3 Cre)共转染至HEK293细胞, 包装纯化并扩增重组腺病毒颗粒, 终点稀释法测定病毒滴度; 病毒感染N2a细胞, Western blot法检测SPK1蛋白的表达; Hoechst33258染色检测SPK1基因对N2a细胞凋亡的影响。酶切后PCR分析、测序鉴定表明, pDC316-SPK1构建成功, 病毒纯化后滴度为2.50E+10 PFU/mL; 重组病毒可在蛋白水平抑制SPK1的表达; SPK1基因抑制后, N2a细胞凋亡增加($P<0.001$)。上述结果表明, 含有SPK1-siRNA的重组腺病毒构建成功, 且具有抑制SPK1蛋白表达的功能, 该基因沉默后, N2a细胞凋亡增加。

关键词 SPK1基因; RNA干扰; 腺病毒载体

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种渐进性大脑退行性病变, 是最常见的成年痴呆类型, 其发病率随年龄增长逐渐升高。AD主要病理学特征是以β淀粉样蛋白(amyloid beta-protein, Aβ)沉积为核心的老年斑, 迄今确切的病因与发病机制尚未充分阐明, 尚无有效的根治良策。近年来, 神经鞘脂(sphingolipid)代谢异常与Aβ的神经毒性作用受到诸多研究者的关注, Gomez-Brouchet等^[1]发现, 在Aβ₂₅₋₃₅诱导SH-SY5Y细胞凋亡过程中鞘氨醇激酶-1(sphingosine kinase-1, SPK1)活性减低, 通过脂质体转染高表达人SPK1基因可以减轻Aβ毒性, 而且SPK1活性上调介导了IGF-1和TGF-β对Aβ神经毒性的保护作用。这些结果提示, SPK1活性降低参与了AD神经元变性死亡。野生型小鼠神经瘤细胞(N2a)和转入人类Swedish突变的APP695基因的N2a细胞(swe细胞)是目前研究AD较佳的细胞模型。我们在进行高表达SPK1的重组腺病毒感染swe细胞研究的同时, 为了从反面进一步证实沉默SPK1能否引起野生型N2a细胞的增殖或凋亡, 采用AdMax腺病毒载体系统构建携带siSPK1基因的重组腺病毒研究沉默SPK1后对野生型N2a细胞凋亡的影响, 并为进一步研究SPK1在AD发病机制中的作用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 腺病毒载体系统、菌种、细胞和主要试剂仪器

pDC316-siRNA(GENECHEM), pBHG lox ΔE1,3 Cre(microbix), 感受态大肠埃希菌DH5α(本室保存), N2a细胞(本室保存), HEK293细胞(ATCC), 1 Kb DNA ladder Marker(Fermentas), Age I, EcoR I, T4 DNA ligase, T4 DNA ligase buffer(NEB), Taq polymerase (TaKaRa), Primer由上海吉凯基因合成, Plasmid抽提试剂盒(QIAGEN), Lipofectamine 2000(Invitrogen), 细胞凋亡-Hoechst染色试剂盒(Beyotime), SPK1抗体(Abcam), β-actin(Sigma), HRP标记的羊抗兔二抗(Santa Cruz), 激光共聚焦显微镜(Olympus), 流式细胞仪(BD)。

1.2 重组腺病毒Ad-siSPK1的构建

1.2.1 SPK1特异性siRNA靶序列的选择及合成 利用NCBI GenBank检索SPK1基因mRNA的全长序列(GenBank编号NM_011451), 根据siRNA的设计原则, 在其开放阅读框区域选择AAG GGC AAG GCT CTG CAG CTC(180~200 bp)作为干涉靶序列, 并进

收稿日期: 2012-04-18 接受日期: 2012-05-29

国家自然科学基金(No.81070879)资助项目

*通讯作者。Tel: 027-85726668, E-mail: gangli2008@163.com

行BLAST同源性分析。设计编码发夹结构siRNA的正义链和反义链, 每条寡核苷酸链包括: 两端作为Age I和EcoR I酶切位点的序列, 作为RNA聚合酶III转录终止信号的TTTTT, 两个反向互补排列的20 nt特异性序列, 以及一个6 nt用于形成茎环结构的间区。由上海吉凯基因化学技术有限公司合成寡核苷酸序列, 正义链为: CCG GAA GGG CAA GGC TCT GCA GCT CCT CGA GGA GCT GCA GAG CCT TGC CCT TTT TTT G, 反义链为: AAT TCAAAA AAA GGG CAA GGC AGC TGC AGC TCC TCG AGG AGC TGC AGC CTT GCC CTT。设计一对不针对任何基因的无关序列作为阴性对照。

1.2.2 构建携带SPK1特异干扰序列的腺病毒穿梭质粒 将合成的单链寡核苷酸退火形成双链DNA。用Age I和EcoR I酶切载体pDC316-siRNA, 酶切产物用T4 DNA ligase连接线性化的载体与退火后的双链DNA(16 °C, 过夜), 转化DH5 α 感受态细菌, 在含有氨苄青霉素抗性的LB平板上培养过夜, 长出的克隆进行PCR鉴定并测序。

1.2.3 腺病毒的包装、扩增和纯化 采用AdMax腺病毒包装系统, 将携带特异干扰序列的腺病毒穿梭质粒与携带了腺病毒大部分基因组的辅助包装质粒共转染 HEK293细胞, 利用 Cre/loxP重组酶系统实现重组, 产生重组腺病毒。培养4~6 h更换含血清的DMEM, 24 h后观察细胞形态变化及绿色荧光表达情况。10~15 d后, 当>90%细胞出现细胞病变时收集细胞, 置-70 °C和37 °C反复冻融震荡3次, 于4 °C, 7 000 $\times$ g离心 5 min, 收集病毒上清于-70 °C保存。用收集的上清再感染HEK293细胞, 大量扩增重组腺病毒。收集的病毒液采用Adeno-X™ Virus Purification Kit纯化, 将纯化后的腺病毒分装, -70 °C保存。

1.3 腺病毒的滴度测定

病毒滴度的测定采用终点稀释法^[2]。按病毒滴度= $10^{(x+0.8)}$ (PFU/mL), $x=10^{-1}$ 到 10^{-13} 依次稀释度下CPE阳性率总和。

1.4 重组腺病毒Ad-siSPK1的鉴定

6孔板中接种N2a细胞, 待细胞融合率为60%~70%时进行下一步处理, 细胞分为三组: 第1组细胞培养液中不加入任何病毒作为空白对照, 第2组细胞培养液中加入siRNA阴性对照病毒, 第3组细胞培养液中加入重组腺病毒Ad-siSPK1, 感染72 h后在激光共聚焦显微镜下观察绿色荧光蛋白表达, 并

取5~10万细胞重悬于1 mL的PBS, 以流式细胞仪检测绿色荧光阳性细胞百分率, 并收集各组细胞, 用RIPA裂解液裂解细胞, 4 °C, 12 000 $\times$ g离心10 min后, 收集上清进行Western blot鉴定。第1抗体兔抗小鼠和人SPK1、兔抗小鼠 β -actin抗体的稀释度分别为1:200及1:6 000, HRP标记的羊抗兔第2抗体的稀释度为1:2 500。最后用ECL化学发光底物检测膜上的抗原-抗体复合物, 通过X光片显示结果, 灰度扫描分析软件计算各区带密度值。

1.5 细胞凋亡测定

六孔板培养细胞24 h后, 吸弃培养液, PBS冲洗, 40 g/L的多聚甲醛固定4 °C, 10 min, 去固定液, PBS洗2遍, 3 min/次, 加入Hoechst33258染色液0.5 mL, 染色5 min, 去染色液, PBS洗2遍, 3 min/次, 将孔中的盖玻片取出, 滴一滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上, 盖上贴有细胞的盖玻片, 让细胞接触封片液, 尽量避免气泡, 显微镜下观察并拍照。每组细胞随机选取5个视野, 分别计数正常细胞数(胞膜完整, 着均匀的蓝色), 凋亡细胞数(核染亮蓝色, 呈均匀的致密斑块或分叶状), 镜下计数细胞凋亡率。相同实验重复5次, 取检测结果的平均值。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用SPSS软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 穿梭质粒的鉴定

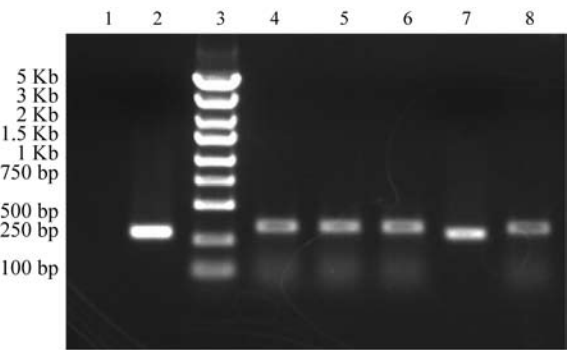
收集在青霉素抗性的LB平板上培养长出的克隆, 利用载体上的引物进行PCR鉴定, 引物序列为: Up(+)-5'-CCT ATT TCC CAT GAT TCC TTC ATA-3'; Down(-)-5'-GTA ATA CGG TTA TCC ACG CG-3'。电泳条带见图1, 阳性克隆PCR片段大小为: 366 bp, 空载体克隆PCR片段大小为: 307 bp。挑选阳性克隆送测序, 测序结果见图2。

2.2 腺病毒在HEK293的包装和扩增

腺病毒质粒转染HEK293细胞后24 h荧光显微镜下见细胞表达绿色荧光蛋白(图3), 病毒扩增后再感染HEK293细胞24 h后见绿色荧光蛋白表达, 7 d出现细胞病变, 主要表现为细胞变大变圆, 成串脱落(图3)。未同源重组者可以看见绿色荧光, 但是不会出现细胞病变。

2.3 病毒滴度测定

收集的病毒液采用Adeno-X™ Virus Purification



1: 阴性对照(ddH₂O); 2: 空载组; 3: marker; 4~6,8: 阳性克隆, 366 bp; 7: 空载体克隆: 307 bp。
1: negative control(ddH₂O); 2: empty vector; 3: marker; 4~6,8: positive clones, 366 bp; 7: empty vector, 307 bp.

图1 PCR鉴定SPK1腺病毒穿梭质粒
Fig.1 SPK1 siRNA adenovirus shuttle plasmid identified by PCR

Kit纯化后, 经终点稀释法测定, 病毒滴度为 2.50E+10 PFU/mL。

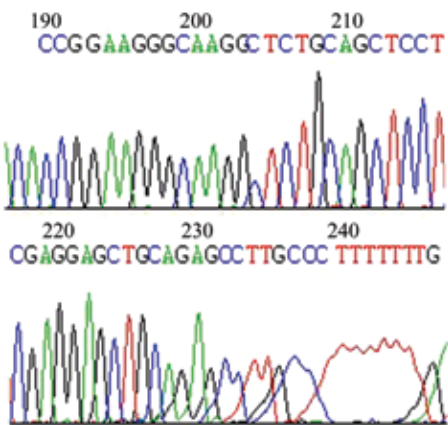
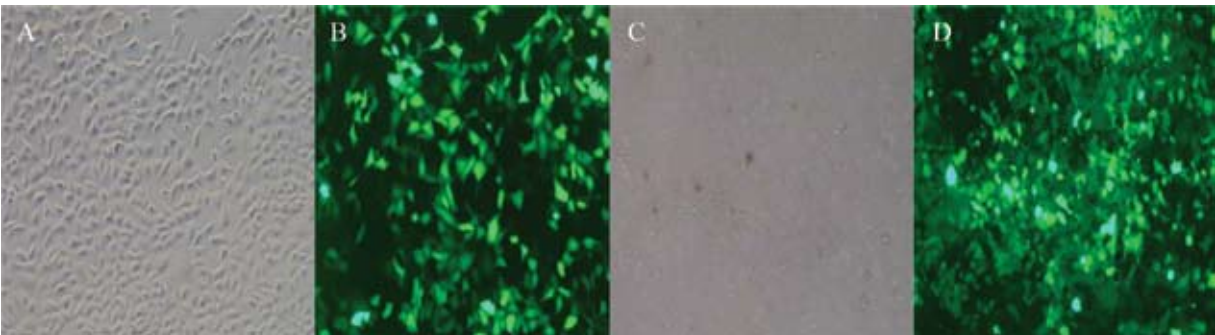


图2 测序鉴定SPK1 siRNA表达载体的插入序列
Fig.2 The insert sequencing results of the SPK1 siRNA

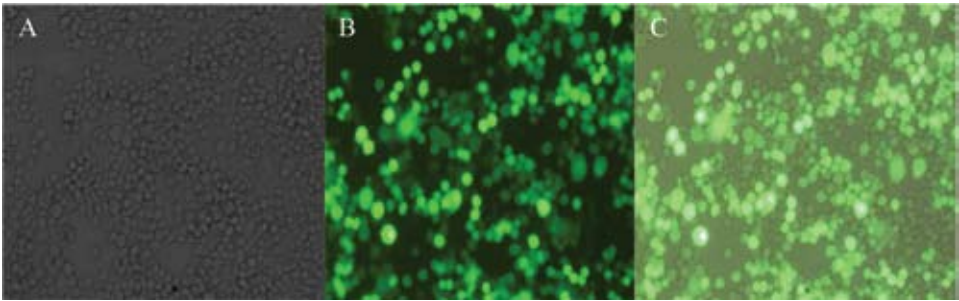
2.4 重组腺病毒Ad-siSPK1感染N2a细胞鉴定

以感染复数(multiplicity of infection, MOI) MOI= 25的重组腺病毒感染N2a细胞72 h后, 荧光显微镜观察绿色荧光蛋白表达(图4), 流式细胞仪检测感染



A: 24 h光镜图; B: 24 h荧光图; C: 7 d光镜图; D: 7 d荧光图。
A: ordinary microscope(24 h); B: fluorescence microscopy(24 h); C: ordinary microscope(7 d); D: fluorescence microscopy(7 d).

图3 SPK1 siRNA重组腺病毒包装和转导HEK293细胞(100×)
Fig.3 SPK1 siRNA recombinant adenovirus packaged and transduced in HEK293 cells(100×)



A: 光镜图; B: 荧光图; C: 叠加图。
A: ordinary microscope; B: fluorescence microscopy; C: merge.

图4 Ad-siSPK1感染N2a细胞72 h绿色荧光蛋白表达(100×)
Fig.4 Fluorescence microscopy analysis green fluorescent protein after N2a cells had been infected with SPK1 siRNA recombinant adenovirus(100×)

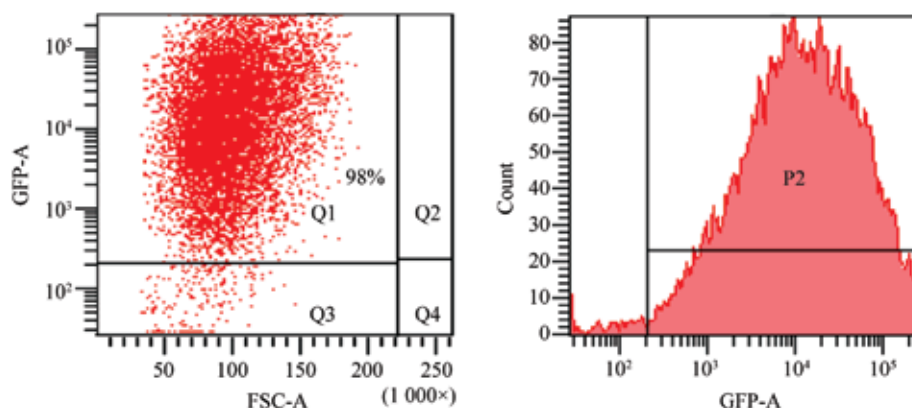
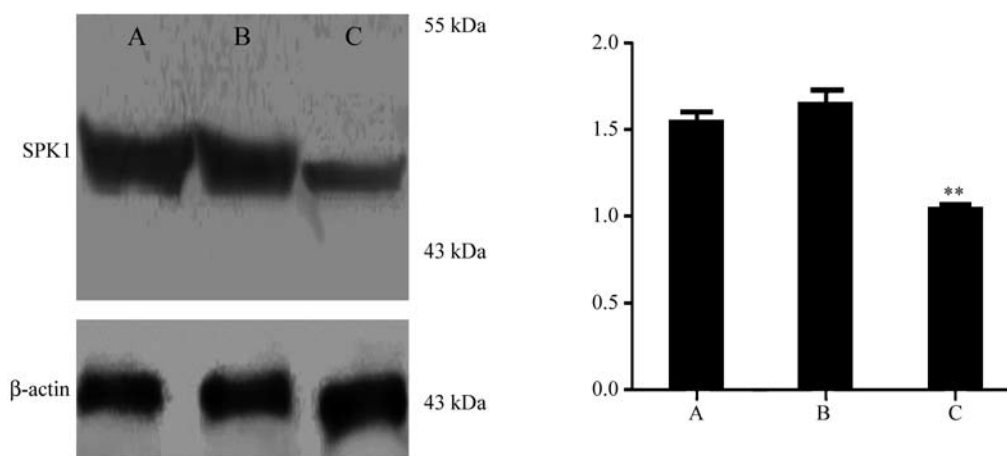


图5 Ad-siSPK1感染N2a细胞72 h后流式细胞仪检测感染效率

Fig.5 Flow cytometry analysis the transfection efficiency after N2a cells had been infected with *SPK1* siRNA recombinant adenovirus

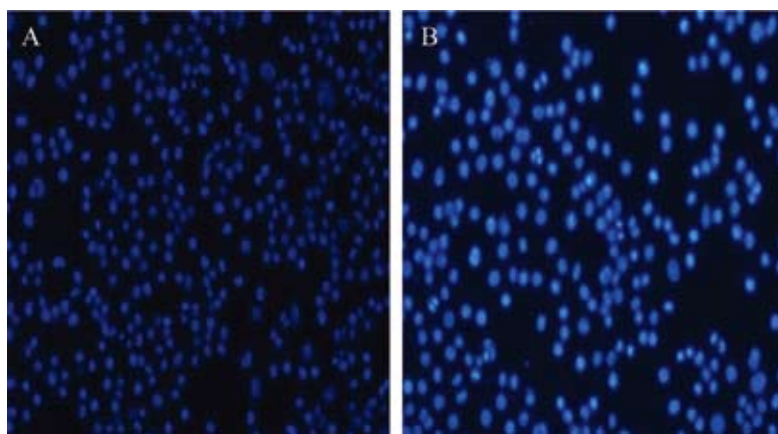


A: 未感染腺病毒的N2a细胞; B: siRNA阴性对照腺病毒感染N2a细胞; C: Ad-siSPK1病毒感染N2a细胞。 ** $P<0.01$ 。

A: un-infected N2a cells; B: N2a had been infected with Ad-scramble-siRNA; C: N2a had been infected with Ad-siSPK1. ** $P<0.01$.

图6 Western blot检测SPK1 siRNA和siRNA阴性对照腺病毒对SPK1蛋白的表达抑制

Fig.6 Western blot analysis the expression of SPK1 and β -Actin after N2a cells had been infected with *SPK1* siRNA and siRNA negative control recombinant adenovirus



A: siRNA 阴性对照腺病毒感染N2a细胞; B: Ad-siSPK1病毒感染N2a细胞。

A: N2a had been infected with Ad-scramble-siRNA; B: N2a had been infected with Ad-siSPK1.

图7 沉默SPK1的表达增加N2a细胞凋亡(Hoechst33258染色, 100 $\times$)

Fig.7 Knock-down *SPK1* increased N2a cells apoptosis(by Hoechst33258 staining, 100 $\times$)

效率高达(98.03±0.72)%(图5), Western blot检测结果表明, 各组细胞中均表达SPK1蛋白, 但表达量不同。Ad-siSPK1组细胞SPK1蛋白的表达较Ad-scramble-siRNA组、未感染病毒组明显减少($P<0.01$, $n=3$), 而Ad-scramble-siRNA组、未感染病毒组相比SPK1的表达无统计学差异(图6)。

2.5 沉默SPK1基因对N2a细胞凋亡的影响

重组腺病毒Ad-siSPK1感染N2a细胞后, siRNA阴性对照组凋亡率(14.40±3.00)%, siSPK1组凋亡率(35.70±4.00)%, 较对照组明显升高($P<0.001$)(图7)。

3 讨论

阿尔茨海默病是病因不明的大脑退行性疾病, 是痴呆最常见的病因。因此, 探究AD的发病机制, 寻求针对AD靶向治疗的手段和方法将具有重要的意义。

神经鞘脂代谢产物包括神经酰胺(ceramide, Cer)、鞘氨醇(sphingosine, Sph)和1-磷酸鞘氨醇(sphingosine 1-phosphate, S1P)等多种代谢产物, 目前证明这些磷脂的代谢产物参与细胞的增殖与凋亡的调控。Cer和Sph是细胞增殖负调控因子, 能够抑制细胞生长, 促进细胞凋亡; 而进一步的代谢产物S1P则刺激细胞生长, 抑制细胞凋亡^[3]。细胞内的Cer、Sph、S1P的水平通过酶促反应维持动态平衡, 从而维持细胞的生理功能。有人将Cer、Sph和S1P共同构成的动态体系形象地称为“鞘磷脂变阻器”^[3]。鞘氨醇激酶(sphingosine kinase, SPK)是“鞘磷脂变阻器”的关键调节因子, SPK将Sph转化为S1P, 不仅能够增加促生长抗凋亡的信号分子S1P水平, 而且能够减少促凋亡的Cer和Sph的水平。因此SPK是维持细胞内上述物质平衡的重要限速酶, 也是细胞增殖及存活的重要调控因子^[4]。目前, SPK家族共有7个同工酶被克隆和鉴定, 其中SPK1和SPK2源自人类和小鼠^[5], SPK1主要分布在脑、肺、心、脾和肝, SPK2比SPK1多200个氨基酸, 主要分布在肝和心^[6]。SPK1/S1P在抗细胞凋亡中具有最要地位, Olivera等^[7]发现, SPK1在NIH3T3、HEK293及Jurkat T细胞的表达导致细胞内S1P增加4~8倍, 从而抑制血清培养和Cer诱导的细胞凋亡。SPK1/S1P在神经系统变性病如AD中的地位也日益受到重视, Gomez-Brouchet等^[1]发现, 在A β 25-35诱导SH-SY5Y细胞凋亡过程中SPK1活性

减低, 推测SPK1活性的下降可能参与AD发病机制。

腺病毒siRNA表达载体既可感染增殖期细胞也可感染非增殖细胞, 感染效率高, 病毒颗粒易于包装产生, 而且滴度高, 抑制效果明显强于普通质粒载体, 因此非常适用于基因功能的研究和基因治疗。腺病毒不整合到染色体中, 故无插入致突变性。这些优点使腺病毒siRNA表达载体的应用越来越受到人们的重视。

同期研究中, 我们采用swe细胞作为AD的细胞模型, 本研究中采用野生N2a细胞作为研究对象, 以便形成对照, 我们构建Ad-siSPK1腺病毒载体, 通过腺病毒感染N2a沉默SPK1观察其对N2a细胞生存的影响, 从反方面证实SPK1活性的下降会影响细胞的生存。构建的重组腺病毒, 经过扩增后滴度为2.50E+10 PFU/mL, Ad-siSPK1感染N2a细胞, Western blot检测细胞内的SPK1蛋白表达强度下降, 说明Ad-siSPK1可抑制细胞内基因的表达, 通过Hoechst33258染色检测凋亡说明抑制SPK1基因的表达增加细胞的凋亡率, 显示SPK1与N2a细胞的凋亡密切相关。上述实验结果为进一步研究siSPK1是如何引起细胞凋亡的分子机制研究以及研究SPK1与AD的关系提供了重要的实验基础。

参考文献 (References)

- 1 Gomez-Brouchet A, Pchejetski D, Brizuela L, Garcia V, Altie MF, Maddelein ML, *et al.* Critical role for sphingosine kinase-1 in regulating survival of neuroblastoma cells exposed to amyloid-beta peptide. *Mol Pharmacol* 2007; 72(2): 341-9.
- 2 Darling AJ, Boose JA, Spaltro J. Virus assay methods: Accuracy and validation. *Biologicals* 1998; 26(2): 105-10.
- 3 Singh IN, Hall ED. Multifaceted roles of sphingosinephosphate How does this bioactive sphingolipid fit with acute neurological injury. *J Neurosci Res* 2008; 86(7): 1419-33.
- 4 Okada T, Kajimoto T, Jahangeer S, Nakamura S. Sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate signaling in central nervous system. *Cell Signal* 2009; 21(1): 7-13.
- 5 Kohama T, Olivera A, Edsall L, Nagiec MM, Dickson R, Spiegel S. Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J Biol Chem* 1998; 273(37): 23722-8.
- 6 Nagiec MM, Skrzypek M, Nagiec EE, Lester RL, Dickson RC. The LCB4(YOR171c) and LCB5(YCR260w) genes of *Saccharomyces* encode sphingoid long chain base kinase. *J Biol Chem* 1998; 273(31): 19437-42.
- 7 Olivera A, Kohama T, Edsall L, Nava V, Cuvillier O, Poulton S, *et al.* Sphingosine kinase expression increase intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J Cell Biol* 1999; 147(3): 545-58.

Construction of Recombinant Adenovirus with siSPK1 Gene and Its Effect on Apoptosis of N2a Cells

Yang Yang¹, Ma Rong², Zhang Yuan¹, Lü Bingjie³, Wang Min¹, Sun Shenggang¹, Li Gang^{1*}

(¹Department of Neurology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China; ²Department of Pharmacology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; ³Department of Respiratory, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract To construct recombinant adenovirus with siSPK1 gene using AdMax system, and to investigate the effect of SPK1 gene on the apoptosis of N2a cell, a SPK1-siRNA template DNA sequence, capable of forming a small hairpin structure, was designed. After renaturation, it was cloned into the vector pDC316-siRNA to construct the SPK1-siRNA expression vector pDC316-SPK1. After verification, the pDC316-SPK1 vector was co-transfected with pBHG lox ΔE1,3 Cre into HEK293 cells where they were packed as the recombinant adenovirus. Recombinant adenovirus was abundantly amplified and then virus titer was evaluated. The recombinant adenovirus was used to infect the N2a cells. Western blot was used to detect the SPK1 protein expression in N2a cells. Hoechst33258 staining was used to detect apoptosis. PCR and sequencing analyses showed that pDC316-SPK1 was constructed successfully. The titer of virus is 2.50E+10 PFU/mL. Western blot indicated that the expression of SPK1 protein was greatly inhibited after infection in N2a cells with recombinant adenovirus particles. Hoechst33258 staining indicated that N2a cell proliferation was decreased significantly by gene silencing ($P<0.001$). In conclusion, the recombinant adenovirus vector containing the SPK1-siRNA gene was successfully constructed, which can silence SPK1 gene and increase the apoptosis of N2a cells *in vitro*.

Key words SPK1 gene; RNA interference; adenovirus vector

Received: April 18, 2012 Accepted: May 29, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81070879)

*Corresponding author. Tel: 86-27-85726668, E-mail: gangli2008@163.com