

- [7] Ghibaudi M, Boido M, Vercelli A. Functional integration of complex miRNA networks in central and peripheral lesion and axonal regeneration[J]. *Prog Neurobiol*, 2017, 158: 69-93.
- [8] Li PX, Xu Y, Wang BP, et al. miR-34a-5p and miR-125b-5p attenuate A β -induced neurotoxicity through targeting BACE1[J]. *J Neurol Sci*, 2020, 413: 116793.
- [9] Zhang LY, Dong H, Si YW, et al. miR-125b promotes tau phosphorylation by targeting the neural cell adhesion molecule in neuropathological progression[J]. *Neurobiol Aging*, 2019, 73: 41-49.
- [10] Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, et al. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat[J]. *Brain Res*, 1981, 211(1): 67-77.
- [11] 贾颜锋, 陈伟. 羟基积雪草苷对大鼠创伤性颅脑损伤后神经功能障碍的改善作用及机制研究[J]. *创伤外科杂志*, 2021, 23(7): 546-550.
- [12] Hannah W, Sriram B, Sarah S, et al. Restoring miR-132 expression rescues adult hippocampal neurogenesis and memory deficits in Alzheimer's disease[J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(10): 1805-1821.
- [13] Huang Sh, Ge XT, Yu JW, et al. Increased miR-124-3p in microglial exosomes following traumatic brain injury inhibits neuronal inflammation and contributes to neurite outgrowth via their transfer into neurons[J]. *FASEB J*, 2018, 32(1): 512-528.
- [14] Hu ZhH, Yu DN, Camila A-S, et al. Expression of miRNAs and their cooperative regulation of the pathophysiology in traumatic brain injury[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): 39357-39367.
- [15] Xiong J, Wang HJ, Mu F, et al. MiR-125b-5p inhibitor might protect against sevoflurane-induced cognitive impairments by targeting LIMK1[J]. *Curr Neurovasc Res*, 2019, 16(4): 382-391.
- [16] Zhang XJ, Ma LZ, Zhang Ch, et al. Silencing LncRNA-DANCR attenuates inflammation and DSS-induced endothelial injury through miR-125b-5p[J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2021, 44(9): 644-653.
- [17] 朱责梅, 阳际花, 杨丝丝, 等. 二氢杨梅素对2型糖尿病小鼠认知功能障碍的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2017, 33(4): 323-328.
- [18] Wang YZh, Zhang LP, Wei N, et al. Silencing LINC00482 inhibits tumor-associated inflammation and angiogenesis through down-regulation of MMP-15 via FOXA1 in bladder cancer[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 13(2): 2264-2278.
- [19] Minta K, Brinkmalm G, Faiez AN, et al. Dynamics of cerebrospinal fluid levels of matrix metalloproteinases in human traumatic brain injury[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 18075-18085.
- [20] 周建光, 单连标, 周颖奇, 等. 快速减压失事对大鼠血脑屏障及MMP-9 mRNA表达的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2021, 37(3): 324-326.

大鼠海马神经细胞 VDAC1 基因 shRNA 慢病毒表达载体的构建及干扰效果评价*

郑刘晔^{1,2}, 奚用勇³, 张 晗^{1,4}, 蒋与刚^{1Δ}

(1. 军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所, 天津 300050; 2. 蚌埠医学院, 蚌埠 233000; 3. 杭州医学院临床学院, 杭州 310000; 4. 郑州大学, 郑州 450001)

【摘要】 目的: 构建线粒体电压依赖性阴离子通道(VDAC1)短发卡样RNA重组慢病毒(LV)载体, 沉默海马神经细胞VDAC1基因表达, 观察所构建的慢病毒载体对海马神经细胞的干扰效果。方法: 根据基因库提供的大鼠VDAC1基因的核苷酸序列(序列号为: AB039662.1), 设计合成3条LV3-VDAC1-shRNA及1条无义的阴性表达载体; 将构建好的慢病毒载体感染到海马神经细胞, 按照不同的转染条件对细胞分为空载组、对照(NC)组、病毒组, 分别在病毒感染复数(MOI)值在100和10的条件下进行转染; 采用荧光定量PCR和Western blot的方法分别检测VDAC1基因在mRNA水平和蛋白水平的表达。结果: 与空载组相比, 慢病毒感染组的扩增倍数均大于1, VDAC1基因在mRNA水平与蛋白水平表达均明显升高($P < 0.05$); 与对照组相比, 病毒感染复数(MOI) = 10与MOI = 100之间没有显著差异($P > 0.05$); PCR结果与Western blot结果综合来看, VDAC1转录水平表达越高, 蛋白水平表达越低, 呈现反向关联的状态。结论: 三种慢病毒对海马神经细胞都有干扰效果, VDAC1基因的mRNA表达和蛋白表达是一种反向关联的状态。

【关键词】 VDAC1; 慢病毒; 转染; 海马神经细胞; 大鼠

【KEY WORDS】 VDAC1; lentivirus; transfection; hippocampus neuron; rats

【中图分类号】 R365

【文献标识码】 A

【文章编号】 1000-6834(2024)01-046-004

【DOI】 10.12047/j.cjap.6308.2022.080

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种迟发性、进行性、年龄相关的神经退行性疾病, 其主要特征包括进行性记忆减退、认知功能降低和行为的改变^[1]。海马区为实现学习、记忆和认知调节等功能提供了生理基础, 与 AD 的发生发展密切相关^[2]。

线粒体电压依赖性阴离子通道 (voltage-dependent anion channels, VDACs) 经常被用作真核生物中存在的孔蛋白^[3]。其三种亚型在大多数组织中均有表达, 其中 VDAC1 的表达能力具有较为明显优势, 而 VDAC2 和 VDAC3 的表达水平普遍较低^[4]。现有证据表明, VDAC1 在 AD 发病中起重要的作用, 提示 VDAC1 可能成为 AD 治疗新的药物靶点。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是在 mRNA 水平关闭相应序列基因表达或使其沉默的过程^[5,6]。RNAi 的发现开辟了一个新的研究领域, 有望抑制植物、动物和人类的有害基因, 并抑制病毒性遗传变异的影响^[7]。目前已被广泛应用研究基因功能以及肿瘤、传染病等疾病的基因治疗领域^[8]。

本研究采用原代培养的大鼠海马神经细胞作为研究对象, 拟应用慢病毒载体 shRNA 介导的 RNAi 技术, 构建能使大鼠海马神经细胞中 VDAC1 基因沉默表达的细胞模型, 利用荧光定量 PCR 和 Western blot 技术评价慢病毒介导的 VDAC1 基因对海马神经细胞的干扰效果, 以期寻找阿尔茨海默病防治新靶标提供思路。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

实验材料: 慢病毒 pGLV3/H1/GFP/Puro 载体、包装质粒 PLVE2709/PLVE2710/PLVE2711 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。Wistar 大鼠的乳鼠购于北京维通利华公司。多聚赖氨酸 (Polylysine, >30 万), Hepes, 双抗青-链霉素, PBS, 阿糖胞苷 (Ara-c, Sigma 公司); 胎牛血清, DMEM 高糖培养基, 胰蛋白酶, N2 添加剂, B27 添加剂 (Gibco 公司); 羊抗大鼠 VDAC1 抗体 (巴傲得, 中国); HRP 标记兔抗羊 IgG (巴傲得, 中国)。

主要仪器: 超净工作台 (TBD 生物仪器厂, 中国), 二氧化碳培养箱 (Thermo 公司, 美国), 紫外分光光度计 (U-2001), 倒置显微镜 (Olympus 公司, 日本), 荧光定量 PCR 仪 (ABI), 凝胶成像仪 (上海天能科技有限公司), 冷冻高速离心机 (Thermo 公司, 美国)。

1.2 shRNA 慢病毒表达载体的构建

根据基因库提供的大鼠 VDAC1 基因的核苷酸序列 (序列号为: AB039662.1), 设计合成 3 条 LV3-VDAC1-shRNA 慢病毒表达载体 (表 1)。所制备的慢病毒经过载体包装后, 转染至 293T 细胞中, 用定量 PCR 的方法检验其病毒滴度。PLVE2709 慢病毒滴度为 6.16×10^8 TU/ml, PLVE2710 慢病毒

滴度为 3.83×10^8 TU/ml, PLVE2711 慢病毒滴度为 7.84×10^8 TU/ml, 无义的阴性表达载体的慢病毒滴度为 1.70×10^9 TU/ml。滴度 (integration units per ml, IU/ml) 的计算公式如为: $IU/ml = (C \times N \times D \times 1000) / V$, 其中: C = 平均每基因组整合的病毒拷贝数; N = 感染时细胞的数目 (约为 1×10^5); D = 病毒载体的稀释倍数; V = 加入的稀释病毒的体积数。

Tab. 1 Primer sequences

Gene	Primer sequences (5'-3')
PLVE2709-1	CCGGGCCTCCACATATGCT-GATCTCTCGAGAGATCAGCATATGTGG-GAGGCTTTTTT
PLVE2709-2	aattcaaaaaGCCCTCCACATATGCT-GATCTCTCGAGAGATCAGCATATGTGG-GAGGC
PLVE2710-1	CCGGGGTGGCCACAAGCTTGTT-TACTCGAGTAAACCAAGCTTGTGGCCACCTTTTTT
PLVE2710-2	aattcaaaaaGTTGCGCCACAAGCTTG-GTTTACTCGAGTAAACCAAGCTTGTGGCCACC
PLVE2711-1	CCGGGCTACGGCTTTGGCTTAATA-ACTCGAGTATTAAGCCAAAGCCG-TAGCTTTTTT
PLVE2711-2	aattcaaaaaGCTACGGCTTTGGCTTAA-TAATCGAGTATTAAGCCAAAGCCGTAGC

1.3 原代海马神经细胞培养

新生 Wistar 乳鼠, 取脑海马组织, 置于含解剖液的 Ep 管中, 剪碎, 按照 1:1 的量加入胰蛋白酶于 37℃ 恒温培养箱中消化 30 min; 取出 Ep 管, 用一次性滴管吸出成粘性的组织碎块放入含 10% 胎牛血清的完全培养基中; 吹打混匀后静置, 取上清, 剩余沉淀再用新的 10% 完全培养基吹散混匀, 静置; 再取其上清, 与之前的上清细胞液充分混匀, 血球计数板计数 (取 10 ~ 20 μ l 细胞计数, 余下细胞放置冰上), 六孔板每孔所需细胞数 0.1×10^6 个; 将细胞稀释后接种到包被过的六孔板中; 放入 37℃ 的培养箱中培养 24 h。待神经细胞长出树突后换液, 向六孔板每孔中加入 2 ml 现配制的细胞培养液, 完成后放入 37℃ 的培养箱中培养 48 h。显微镜下观察细胞形态变化, 再按照同样方法换液, 此次换液向细胞培养液中加入 10 μ mol/L 的 Ara-c, 用于抑制胶质细胞的生长。换液后放入 37℃ 的培养箱中培养 48 h。从培养箱中取出细胞板, 在不破坏细胞的情况下将细胞板内的培养液吸尽, 然后用 PBS 清洗两遍, 加入事先配置好的无血清培养液, 放入 37℃ 的培养箱中培养。即可用于后续实验。

1.4 慢病毒转染海马神经细胞

按照不同的转染条件进行分组, 分为空载组 (DMEM 高糖培养基, 无抗, 无血清)、对照组 (NC+DMEM 高糖培养基, 无抗, 无血清) 和病毒组 (PLVE2709/PLVE2710/PLVE2711+DMEM 高糖培养基, 无抗, 无血清), 分别在病毒感染复数 (MOI) 值在 100 和 10 的条件下进行转染, 需保证所有操作在冰上进行。

转染时每孔 1 ml 无血清饲养液 (含聚凝胺 polybrene, 6 mg/ml), 放入 37℃ 培养箱孵育 4 h, 然后再向每孔中加入 2 ml 无血清细胞培养液, 37℃ 孵育 24 h 后, PBS 清洗一遍, 换成不含病毒液的无血清细胞培养液, 培养 24 h。(1) MOI = 100 组: 空载组、对照组、2709 组、2710 组、2711 组, 每组设 3

*【基金项目】国家自然科学基金 (81872606)

【收稿日期】2022-03-17 【修回日期】2022-08-15

△【通讯作者】Tel: 13920770716; E-mail: jyg1967@126.com

个复孔;(2) MOI=10 组:空载组、对照组、2709 组、2710 组、2711 组,每组设 3 个复孔;将已转染的海马神经细胞用 PBS 清洗一遍,往每孔(六孔板)中加入 300 μ l 的 PBS,使用细胞刮刀刮下细胞,放入 Ep 管中;再向每组的第一个孔中加入 300 μ l 的 PBS,细胞刮刀刮取后,加入第二个孔,刮取,再加入第三个孔,最后收集到 Ep 管中;再按照前一步方法用 300 μ l PBS 吹打每个孔收集细胞;低温离心机离心,取细胞沉淀,-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.5 RT-PCR 检测海马神经细胞中 VDAC1 mRNA 表达

将经慢病毒感染后的海马神经细胞样本,提取总 RNA 进行反转录,采用荧光定量 PCR 的方法,检测所抽提 RNA 的浓度与质量,内参基因为 GAPDH 和 β -actin,目的基因表达采用 Ct 值法,即根据各样品基因扩增过程中荧光信号强度达到临界阈值所需要的循环数(threshold cycle, Ct)来比较各样品目的基因 mRNA 表达的丰度。

内参使用 GAPDH 和 β -actin,其引物序列分别为,GAPDH:上 5'-CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG-3';下 5'-GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT-3'; β -actin:上 5'-TGCTATGTTGCCCTAGACTTCG-3';5'-GTTGGCATAGAGGTCTTTACGG-3')。目标基因 VDAC1 的引物序列为:上 5'-ATGTCTTCACCAAGGGCTACG-3';下 5'-CAGCCCATACTCGGTCCATCT-3'。上述引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.6 Western blot 检测海马神经细胞中 VDAC1 蛋白表达

取经慢病毒感染后的海马神经细胞样本,加入细胞裂解液提取总蛋白,进行蛋白定量;然后制胶、上样、SDS-PAGE、湿法电转印;转印完成后,取出 PVDF 膜,TBS 洗膜 5 min,加入含 3% BSA 的 TBST 封闭液,置摇床上室温振荡封闭 2 h 或者 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜;TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,羊抗大鼠 VDAC1 抗体(1:1 000)孵育 2 h;TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,HRP 标记的兔抗羊二抗(1:2 000)孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,TBS 洗膜 5 min;加 ECL 发光底物,曝光,VDS 成像系统拍照后采用 ImageMaster TL v2003 软件分析蛋白条带的灰度,以 β -actin 为内参,计算 VDAC1/ β -actin 的比值,得到各组 VDAC1 蛋白表达的相对水平。

1.7 统计学处理

数据以均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS 23.0 统计软

件进行分析。多组比较用单因素方差分析,均数间的两两比较用 q 检验。

2 结果

2.1 海马神经细胞的培养

取新生 24 h 的 Wistar 大鼠培养海马神经元,可以看出细胞生长状况良好,可以进行后续实验(图 1,图 2)。

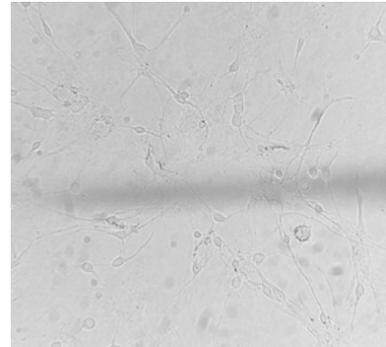


Fig. 1 Neonatal rat hippocampal neurons(HE \times 40)

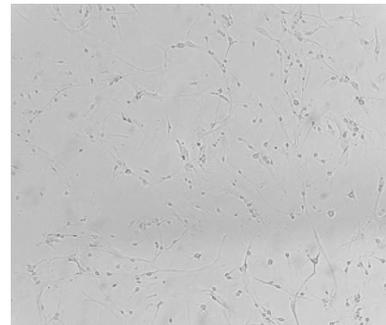


Fig. 2 Neonatal rat hippocampal neurons(HE \times 10)

2.2 RT-PCR 检测结果

不同转染组的 VDAC1 基因在 mRNA 水平上均有表达,对细胞都有干扰效果。同一种慢病毒表达载体相互之间比较,MOI=10 与 MOI=100 之间没有显著性差异($P>0.05$);与 NC 组相比较,除 2710 MOI=100 无显著变化外,其他组 VDAC1 mRNA 表达水平均显著升高($P<0.05$)。其中 2711 MOI=10 组的变化具有极显著差异($P<0.01$,表 2)。

Tab. 2 mRNA expressions of VDAC1 gene in different transfection groups($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Group	No-load	NC	2709	2710	2711
MOI=10	1.00	1.37 \pm 0.04*	1.25 \pm 0.07*	1.30 \pm 0.11*	1.54 \pm 0.02**
MOI=100	1.00	1.38 \pm 0.07*	1.29 \pm 0.17*	1.21 \pm 0.06	1.40 \pm 0.03*

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs NC group

2.3 Western blot 检测结果

VDAC1 基因转染进海马神经细胞,与空载组相比在蛋白水平上的表达均高于空载组,与 NC 组相比慢病毒 2710

MOI=100 时具有统计学意义($P<0.05$)。同一种慢病毒表达载体相互之间比较,MOI=10 与 MOI=100 之间没有显著性差异($P>0.05$,表 3)。

Tab. 3 Protein expressions of VDAC1 gene in different transfection groups($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Group	No-load	NC	2709	2710	2711
MOI=10	0.20	0.42 \pm 0.06	0.57 \pm 0.13	0.62 \pm 0.10	0.56 \pm 0.15
MOI=100	0.20	0.43 \pm 0.06	0.56 \pm 0.16	0.70 \pm 0.27*	0.60 \pm 0.25

* $P<0.05$ vs NC group

3 讨论

研究资料表明,VDAC1 在 AD 的发生发展中起到重要的作用,但其作用机制尚未阐明,VDAC1 能否作为治疗阿尔茨海默病新的药物靶点逐渐被重视。

VDAC1 通道在不同状态时对离子的选择通过性不同,在高通透状态,即完全开放状态下,VDAC1 对阴离子选择通过的特性对于其作为代谢产物的通道而言极其重要^[9];它的变化将直接导致线粒体功能障碍,而线粒体功能的紊乱是 AD 的早起改变之一^[10]。

用慢病毒介导的基因进行感染,是相对于脂质体等转染方法而言,此方法对于多数细胞均有较高的感染效率^[11]。Polybrene 是一种阳离子聚合物,可以促进慢病毒包膜与细胞膜的相互作用,协助慢病毒对细胞膜的感染过程^[12],本实验在聚凝胺(Polybrene,1 种阳离子聚合物,可增强慢病毒转染效果)协助下以 MOI=10 和 MOI=100 进行用慢病毒介导的 VDAC1 基因感染海马神经细胞,通过荧光定量 PCR 和 Western blot 的方法检测病毒感染 24 h 后,VDAC1 基因在海马神经细胞内 mRNA 和蛋白质的表达。

使用慢病毒感染细胞后,RT-PCR 实验及 Western blot 实验结果表明,三种慢病毒对海马神经细胞都有干扰效果;又有相关研究表明^[13],在感染的海马神经细胞中,其 mRNA 水平与蛋白水平的基因表达呈现一个反向关联的状态。

由此可见,用慢病毒介导的 VDAC1 基因感染海马神经细胞实验是成功的,其 mRNA 的表达与蛋白表达存在一种反向关联的状态。通过上述研究,期望对 VDAC1 是否能作为治疗阿尔茨海默病新的药物靶点提供更多的实验依据,关于 VDAC1 在 AD 中的作用机制尚未完全清楚,有待进一步深入研究。

【参考文献】

[1] Reddy PH. Is the mitochondrial outer membrane protein VDAC1 therapeutic target for Alzheimer's disease [J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 2013, 1832(1): 67-75.

- [2] 吴思,庆宏,梁建华. 促海马区成体神经发生药物的研究进展[J]. *药学学报*, 2016(7): 1025-1031.
- [3] 田绍泽,刘思禹,等. 植物线粒体电压依赖性阴离子通道蛋白 VDACs 综述[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(22): 7401-7407.
- [4] 王志桐,王晓良. 线粒体阴离子通道 VDAC1 作为阿尔茨海默病潜在药物靶标的研究进展[J]. *药学学报*, 2018, 53(8): 1250-1258.
- [5] 杜静,梁晓燕. RNA 干扰的基础研究和临床应用前景[J]. *国外医学(计划生育/生殖健康分册)*, 2006(6): 307-310.
- [6] 于志军,姚占祥,刘伟. RNA 干扰技术的研究概述[J]. *生物学教学*, 2020, 45(4): 4-6.
- [7] 栗挺,刘爱玲,陈信波. RNA 干扰载体构建方法的研究进展[J]. *湖南农业科学*, 2011(19): 1-4.
- [8] 万春鹏,周寿然,左爱仁. RNA 干扰机制及其应用研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2008(2): 372-375.
- [9] 奚用勇,蒋与刚,卢豪. 线粒体电压依赖性阴离子通道 1 在阿尔茨海默病发生机制中的作用[J]. *生理科学进展*, 2014, 45(4): 318-321.
- [10] Zhu X, Perry G, Smith MA, *et al.* Abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *JAD*, 2013, 33 Suppl 1: S253-62.
- [11] 刘永敏,段萍,黄春田,等. 慢病毒 Tet-On 系统调控 Notch1-EGFP 融合蛋白在 PC12 细胞中表达的研究[J]. *中国应用生理学杂志*, 2013, 29(3): 232-237.
- [12] 卢娜,李成长,等. Beclin-1 shRNA 对低氧诱导的 SH-SY5Y 细胞自噬的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2018, 34(5): 464-469.
- [13] Jiang YG, Fang HY, Pang W, *et al.* Depressed hippocampal MEK/ERK phosphorylation correlates with impaired cognitive and synaptic function in zinc-deficient rats. [J]. *Nutr Neurosci*, 2011, 14(2): 45-50.