

- 16 康福新, 王瑞兰. 生物标志物在脓毒症诊断和危险分层中的临床价值探讨[J]. 临床外科杂志, 2011, 19(3): 164-166
- 17 张杨, 康秋红, 何川, 等. 缺氧时心房钠尿肽分泌及其机制的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(17): 4376-4379
- 18 李青, 刘玥, 耿斌, 等. 动态监测心房钠尿肽对脓毒症患者预后的评估价值[J]. 中国综合临床, 2014, 30(3): 257-260
- 19 Varghese B, Schwartz DN, Singh KS, et al. A distinguishing feature of procalcitonin elevation in sepsis due to presumed abdominal sources [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2014, 189(5): A3786 (收稿日期:2014-08-28) (修回日期:2014-09-10)
- 20 谈定玉, 曹鹏, 夏仲芳, 等. 急诊脓毒症死亡风险评估对急诊脓毒症患者危险分层的价值研究[J]. 中国急救医学, 2013, 33(3): 200-204
- 21 王海波, 徐丽娟, 李克鹏, 等. KDIGO 标准 APACHE II 与 SOFA 评分对脓毒症急性肾损伤患者的预后评估[J]. 中国急救医学, 2013, 33(6): 499-502

稳定敲低 MYH10 基因细胞株的建立

周晨辰 陆 琤 张鹏飞 张 璐

摘要 **目的** 构建稳定敲低 MYH10 基因的 COS-7 细胞株。**方法** 在 293TX 细胞中进行病毒的包装,用获得的高效价慢病毒感染 COS-7 细胞,通过免疫印迹和荧光显微镜,检测病毒感染后 COS-7 细胞 MYH10 蛋白表达的变化。**结果** 在构建的两种重组质粒中,MYH10-lentiviral shRNA-2 在转染后表现出明显的干扰作用,感染后能明显下调 COS-7 细胞的 MYH10 蛋白表达。**结论** 病毒感染的 COS-7 细胞可明显抑制 COS-7 细胞内源 MYH10 的表达,说明了稳定敲低 MYH10 基因的 COS-7 细胞株的建立,为进一步研究 MYH10 在相关疾病中的功能奠定了基础。

关键词 MYH10 基因 COS-7 细胞株 慢病毒感染

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.11.014

Establishment of Stable COS-7 Cell Strain with MYH10-knock-down. Zhou Chenchen, Lu Cheng, Zhang Pengfei, et al. Medical Engineering Department, The 307th Hospital of the PLA, Beijing 100071, China

Abstract Objective To establish COS-7 cell strain stable knockdown of MYH10 gene. **Methods** The lentiviral plasmids were transfected into 293TX cells to package into lentiviral particles. Then COS-7 cells was transduced with the lentiviral particles. Western blot and fluorescence microscope were carried out to analyze the suppression of MYH10 in COS-7 Cells. **Results** In the construction of two recombinant plasmid, MYH10-lentiviral shRNA-2 showed significant interference after transfection, and can obviously reduced expression of MYH10 in COS-7 cells. **Conclusion** Infected COS-7 cells can inhibit the expression of the MYH10 COS-7 cells, indicating that a stable COS-7 cell strain has been successively established.

Key words MYH10 gene; COS-7 cell strain; Lentivirus transfection

非肌肉肌球蛋白重链 10(nonmuscle myosin heavy chain II B, MYH10 或 NM II-B)是一种由人第 17 号染色体上的 MYH 10 基因编码的蛋白,存在于非肌细胞中如血小板、神经细胞、巨核细胞等^[1-4],在细胞黏附、迁移、胞质分裂及细胞趋药性等方面发挥着重要的作用,但有关以上作用的机制尚未得到有效阐明^[5-8]。为了进一步研究 MYH10 的作用机制,需要构建稳定敲低该基因表达的细胞株。

慢病毒包装质粒感染体系是目前常用的病毒体系。与其他反转录病毒相比,慢病毒载体的构建以及包装过程相对简单,且包装好的病毒可以感染分裂期和非分裂期的细胞,并能长时间、稳定表达导入的目的基因^[9]。此外在脊椎动物体内,大部分组织都同时含有非肌肉肌球蛋白 II(nonmuscle myosin II)的两个亚型:MYH 9 和 MYH 10,而 COS-7 细胞中不含有 MYH 9,且其 MYH 10 的含量高达 86% 左右^[10]。为防止 MYH 9 对实验结果的影响以及最大程度的表现 MYH 10 敲低后对细胞的影响,本实验选用 COS-7 细胞作为目标细胞,体外包装病毒后对 COS-7 细胞进行病毒感染,并结合嘌呤霉素筛选方法成功构建了稳定敲低 MYH10 的 COS-7 细胞株。

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(31400739);北京市自然科学基金资助项目(5144033)

作者单位:100071 北京,中国人民解放军 307 医院医学工程科
通讯作者:张璐,电子信箱:marbleluo@126.com

材料与方 法

1. 实验材料:包装质粒 PMD、SPA、MYH10 - lentiviral shRNA - 1、MYH10 - lentiviral shRNA - 2、control shRNA 质粒、293TX 细胞和 COS - 7 细胞为本室保存。Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司;MYH10 抗体购自 Santa Cruz 公司。嘌呤霉素 (puromycin), MYH10 抗体购自 Santa Cruz 公司。蛋白质转印 NC 膜购自 Pall 公司。辣根过氧化物酶标记二抗购自 Jackson Immuno Research Inc 公司。ECL 显影试剂购于 Thermo 公司。

2. 试验方法:(1)细胞培养:293TX 细胞及 COS - 7 细胞:10% 胎牛血清,双抗,37℃ 细胞培养箱,5% CO₂ 293TX 细胞用 1640 培养基培养,COS - 7 细胞用 DMEM 培养。(2)病毒包装:293TX 包装细胞培养在含双抗和 10% FBS 的 1640 培养基中,于细胞对数生长期时接种,接种后不加抗生素的培养基培养。为避免脱靶现象引起的表型不确定,敲低目的基因的表达一般会同时选择两条不同的干涉序列,本实验中的两条不同的干涉序列为 MYH10 - lentiviral shRNA #1 (5' - AGCTAGTCTTGAGTCTCAA - 3'), MYH10 - lentiviral shRNA #2 (5' - CAACATTGAAACATACCTT - 3'), control shRNA (5' - TTCTCCGAACGTGTCACGT - 3')。以 60mm × 15mm 的培养皿为例,总质粒转染量为 9μg,分别为 PMD 1.5μg, SPA 3μg, MYH10 - lentiviral shRNA - 2 4.5μg。转染后 8h 或过夜更换无抗生素培养基,然后 36 ~ 48h 再补充 5ml 无抗生素培养基。转染后 72h 收上清,0.22μm 滤器过滤,-40℃ 保存或立刻使用。(3)COS - 7 细胞的感染及筛选:待感染的 COS - 7 细胞对数生长期时接种至 6 孔板中,接种细胞时感染,含病毒上清与完全培养基 1:1 使用。感染细胞的密度为 4 天后长满为宜。4 ~ 5 天可看见部分细胞发绿色荧光,此时使用嘌呤霉素 5μg/ml 处理 24h。然后换为新鲜的完全培养基以促进细胞生长。(4)免疫印迹检测:细胞用 TNE 裂解液 (50mmol/L Tris pH 7.4, 150mmol/L NaCl, 5mmol/L EDTA, 1% NP - 40, 加入蛋白酶和磷酸酶抑制剂)裂解,SDS - PAGE 电泳分离蛋白后电转移至 NC 膜。脱脂牛奶封闭液封闭 1h。加入一抗,室温温育 2h 或 4℃ 温育过夜。用 TBST 洗膜 3 次,每次 10min。加入相应的二抗,室温温育 1h。再用 TBST 洗膜 3 次,每次 10min。将 ECL 显色液加到膜上,用保鲜膜把膜包起来。暗室 X 线胶片曝光,显影、定影。X 线胶片流水冲洗,然后干燥保存。(5)显微镜观察:感染的 COS - 7 细胞长到 4 ~ 5 天后,取出在倒置荧光显微镜下观察其形态变化。且在激发光 (450 ~ 490nm 蓝光波长)照射下,观察 COS - 7 细胞感染情况,判定感染率。

结 果

1. MYH10 基因蛋白表达水平的检测: COS - 7 细胞分别感染对照病毒和 MYH10 干扰病毒,经嘌呤霉素筛选,传代后收细胞进行 Western 印迹,内源抗体检测。与对照组细胞相比,MYH10 干扰病毒感染的

COS - 7 细胞其 MYH10 的蛋白表达水平较对照组细胞明显降低,其中 MYH10 - lentiviral shRNA - 2 的干扰抑制作用最强,如图 1 所示,在 MYH10 - lentiviral shRNA - 2 感染后的 COS - 7 细胞中 MYH10 几乎不表达。这说明稳定敲低 MYH10 基因的 COS - 7 细胞株已经构建成功。

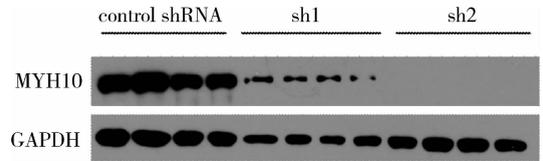


图 1 免疫印迹检测 COS - 7 细胞中 MYH10 表达
sh1. MYH10 - lentiviral shRNA - 1 感染的 COS - 7 细胞; sh2. MYH10 - lentiviral shRNA - 2 感染的 COS - 7 细胞

2. MYH10 敲低后对 COS - 7 细胞形态的影响: 构建的慢病毒表达载体含有水母绿色荧光蛋白完整编码框,使得所表达的融合蛋白具有绿色荧光蛋白的特征。GFP 荧光极其稳定,在激发光照射下产生荧光,用其感染细胞 4 ~ 5 天后均可见绿色荧光蛋白的表达。由图 2 可见,细胞感染后 MYH10 - lentiviral shRNA - 2 组细胞与对照组细胞相比出现了明显的区别,其细胞轮廓丧失,细胞骨架塌陷,无一致的细胞形态,并且在激发光照射下,荧光发生率较高,荧光较强;而 MYH10 - lentiviral shRNA - 1 组和对照组的细胞形态基本一致,少量细胞出现丧失细胞轮廓,细胞骨架塌陷的现象,且其荧光发生率较低,荧光强度较弱。

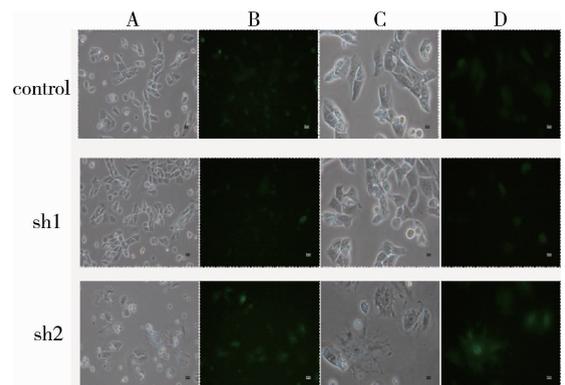


图 2 荧光显微镜观察 MYH10 敲低后对 COS - 7 细胞形态的影响

control. control shRNA 感染的 COS - 7 细胞; sh1. MYH10 - lentiviral shRNA - 1 感染的 COS - 7 细胞; sh2. MYH10 - lentiviral shRNA - 2 感染的 COS - 7 细胞。A. ×20 物镜下的明场图; B. ×20 物镜下的暗场图; C. ×40 物镜下的明场图; D. ×40 物镜下的暗场图

讨 论

非肌肉细胞中存在的肌球蛋白 II 称为非肌肉肌球蛋白 II (non - muscle myosin II ,NM II),与肌肉中肌球蛋白 II 具有类似的化学结构,其活性受自身轻链和重链磷酸化水平调节。除了作为一种分子马达为细胞内各种分子运动提供动力外,NM II 还参与囊泡转移、基因转录、信号调节等各种生理活动^[11]。像肌肉中肌球蛋白一样,NM II 是由两条重链、两条调节轻链和两条必须轻链组成,根据重链的不同可以将 NM II 分成 3 个亚型:NM II - A、B、C。其中 NM II - B 由基因肌球蛋白重链 10 编码^[1]。MYH10 作为超家族蛋白质编码基因之一在癌症扩散、血液疾病、心肌症和大脑发育等方面有着重要的意义和价值^[12-16]。本研究以 COS - 7 细胞为研究对象,通过慢病毒介导的方法,获得了稳定敲低 MYH10 基因的 COS - 7 细胞株。结果显示 COS - 7 细胞中 MYH10 的表达能力得到了有效抑制,这一细胞株的建立将为进一步研究 MYH10 基因在相关病理生理过程中的作用及机制研究提供基础。

参考文献

- 1 Tullio AN, Accili D, Ferrans VJ, *et al.* Nonmuscle myosin II - B is required for normal development of the mouse heart [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(23): 12407 - 12412
- 2 Antony - Debre I, Bluteau D, Itzykson R, *et al.* MYH10 protein expression in platelets as a biomarker of RUNX1 and FLI1 alterations [J]. *Blood*, 2012, 120(13): 2719 - 2722
- 3 Ma X, Bao J, Adelstein RS. Loss of cell adhesion causes hydrocephalus in nonmuscle myosin II - B - ablated and mutated mice [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2007, 18(6): 2305 - 2312
- 4 Lordier L, Bluteau D, Jalil A, *et al.* RUNX1 - induced silencing of non - muscle myosin heavy chain II B contributes to megakaryocyte polyploidization [J]. *Nature Communications*, 2012, 3(717): 1 - 10
- 5 Miyake Y, Inoue N, Nishimura K, *et al.* Actomyosin tension is required for correct recruitment of adherens junction components and

- zonula occludens formation [J]. *Experimental Cell Research*, 2006, 312(9): 1637 - 1650
- 6 Jacobs K, Van gele M, Forsyth R, *et al.* P - cadherin counteracts myosin II - B function: implications in melanoma progression [J]. *Molecular Cancer*, 2010, 9(255): 1 - 12
- 7 Wu Q, Sahasrabudhe RM, Luo LZ, *et al.* Deficiency in myosin light - chain phosphorylation causes cytokinesis failure and multipolarity in cancer cells [J]. *Oncogene*, 2010, 29(29): 4183 - 4193
- 8 Even - Faitelson L, Rosenberg M, Ravid S. PAK1 regulates myosin II - B phosphorylation, filament assembly, localization and cell chemotaxis [J]. *Cellular Signalling*, 2005, 17(9): 1137 - 1148
- 9 巩伟丽, 徐广, 韩秋影, 等. 慢病毒感染方法构建稳定干涉 PDRG1 的 HeLa 细胞系 [J]. *科学技术与工程*, 2013, 13(22): 6385 - 6388
- 10 Ma X, Jana SS, Conti MA, *et al.* Ablation of nonmuscle myosin II - B and II - C reveals a role for nonmuscle myosin II in cardiac myocyte karyokinesis [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2010, 21(22): 3952 - 3962
- 11 张洪峰, 彭军. 非肌肉肌球蛋白研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(1): 5 - 8
- 12 Betapudi V, Licate LS, Egelhoff TT. Distinct roles of nonmuscle myosin II isoforms in the regulation of MDA - MB - 231 breast cancer cell spreading and migration [J]. *Cancer Research*, 2006, 66(9): 4725 - 4733
- 13 Ubukawa K, Guo YM, Takahashi M, *et al.* Enuclation of human erythroblasts involves non - muscle myosin II B [J]. *Blood*, 2012, 119(4): 1036 - 1044
- 14 Ma X, Takeda K, Singh A, *et al.* Conditional ablation of nonmuscle myosin II - B delineates heart defects in adult mice [J]. *Circulation Research*, 2009, 105(11): 1102 - 1109
- 15 Bao J, Ma X, Liu C, *et al.* Replacement of Nonmuscle Myosin II - B with II - A Rescues Brain but Not Cardiac Defects in Mice [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(30): 22102 - 22111
- 16 Ma X, Kawamoto S, Hara Y, *et al.* A point mutation in the motor domain of nonmuscle myosin II - B impairs migration of distinct groups of neurons [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2004, 15(6): 2568 - 2579

(收稿日期:2015 - 03 - 29)
(修回日期:2015 - 04 - 15)

欢迎订阅 2016 年《医学研究杂志》

《医学研究杂志》(原名《医学研究通讯》)于 1972 年创刊,是由国家卫生和计划生育委员会(原卫生部)主管、中国医学科学院主办的国家级医学学术期刊。本杂志为“中国精品科技期刊”以及“领跑者 F5000——中国精品科技期刊顶尖论文”来源期刊,中国科技论文统计源期刊,中国科技核心期刊,世界卫生组织西太区医学索引(WRPIM)收录期刊。月刊。CN11 - 5453/R,ISSN1673 - 548X。

本杂志信息量大,装帧精美。每册定价 10 元,全年 120 元(含邮费)。国内外公开发售。邮发代号:2 - 590。编辑部电话:010 - 52328677,52328678,52328679;传真:010 - 65230946。E - mail:xyxjzz@imicams.ac.cn。投稿网址:http://www.xyxjzz.cn。编辑部地址:北京市朝阳区雅宝路 3 号(邮编:100020)。