

Reg3 β 干扰载体的构建及在 H9C2 心肌细胞中的鉴定

易 波 蔡玉立 李俊峰 包 艳 陈小琳 文重远

摘 要 **目的** 构建再生基因蛋白 3 β (regenerating islet - derived protein 3 beta, Reg3 β) 干扰载体,并在 H9C2 大鼠心肌细胞中优化转染条件,鉴定抑制效果,为深入探索 Reg3 β 在心血管疾病的作用提供有利的工具。**方法** 设计合成 Reg3 β 干扰序列,在 5'端加入一个 Sac I 的酶切位点,3'端加入 LOOP 环序列和反向互补序列,构建 pG1.2 - Reg3 β shRNA 沉默载体。接着分别用 Lipofectamine2000 和 Lipofectamine3000 优化摸索转染大鼠 H9C2 心肌细胞的效率,以 q - PCR 和 Western blot 法检测 H9C2 细胞内 Reg3 β 的表达量。**结果** 设计合成了 3 对 Reg3 β 干扰序列,从中筛选出抑制效率最高达 67.93% 的序列,酶切和测序结果证实成功构建了 pG1.2 - Reg3 β shRNA。经过优化比较发现,pG1.2 - Reg3 β shRNA 沉默载体 Lipofectamine3000 比例为 1 μ g:3 μ l 时,其转染效率最高(50% 以上)。q - PCR 和 Western blot 法检测结果显示,最佳干扰载体在最高转染条件下可使 H9C2 细胞 Reg3 β 表达量降低 50% 以上。**结论** 成功构建了 pG1.2 - Reg3 β shRNA 沉默载体,并在 H9C2 细胞中有效干扰 Reg3 β 的表达,可用于探讨 Reg3 β 在心血管疾病中的作用。

关键词 Reg3 β 基因 短发夹 RNA 载体构建 H9C2 心肌细胞

中图分类号 R54

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.08.007

Construction and Identification of Reg3 β shRNA in H9C2 Cells. Yi Bo, Cai Yuli, Li Junfeng, et al. Department of Endocrinology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract Objective To build and analyze the regenerating islet - derived protein 3 beta(Reg3 β) shRNA in rat H9C2 cells for studying the function of Reg3 β gene in cardiovascular disease. **Methods** The shRNAs target fragments of the rat Reg3 β gene were designed and synthesized. To construct the pG1.2 - Reg3 β shRNA, the restriction site of SacI was added at the 5' - end, while a LOOP sequence and a reverse complement sequence were added at the 3' - end. The pG1.2 - Reg3 β shRNA was transfected to H9C2 cells from Lipofectamine2000 and Lipofectamine3000. q - PCR and Western Blot were used to detect the expression of Reg3 β in H9C2 cells. **Results** From three pairs of Reg3 β shRNA, a vector with the highest interfering efficacy (67.93%) was a successful pG1.2 - Reg3 β shRNA. The relatively high transfection efficiency was found in the group with the ratio of shRNA / Lipofectamine3000 = 1 μ g:3 μ l. The relatively protein expression of Reg3 β was significantly decreased in H9C2 cells by pG1.2 - Reg3 β shRNA. **Conclusion** pG1.2 - Reg3 β shRNA was successfully builder and expressed in H9C2 cells, which provide a useful tool for investigating the potential protective role of Reg3 β in cardiovascular disease.

Key words Reg3 β gene;shRNA;Vector construction;H9C2 cells

心血管疾病是严重危害我国人民群众生命健康的慢性非传染性疾病之一,但目前仍缺乏有效的干预手段^[1]。再生基因蛋白 3 β (regenerating islet - derived protein 3 beta, Reg3 β)是新近发现具有抗炎和抗凋亡作用的分泌性蛋白,结构上属于 C 型凝集素家族,其基因序列具有保守性^[2~5]。在自身免疫性心肌炎、缺血性心脏病和心肌肥厚等动物模型中,Reg3 β 仅在心肌细胞中表达增多,而心脏组织非心肌细胞中

均无表达^[3,6,7]。研究发现,Reg3 β 不仅与心力衰竭患者的心功能分级和急性冠状动脉综合征(ACS)患者心肌炎性反应强度相关,还能预测心血管死亡风险,更能修复大鼠心脏功能、改善心肌梗死预后^[3,6,8]。提示 Reg3 β 不仅是心血管疾病的临床评估和预后的生物学标志物,还具有潜在的心肌保护功能,具有广阔的临床应用前景。

因此,本研究拟构建 Reg3 β 干扰载体,并在 H9C2 大鼠心肌细胞中优化转染条件,鉴定抑制效果,为深入探索 Reg3 β 在心血管疾病的作用提供有利的工具。

材料与方法

1. 实验材料:大鼠心肌细胞 H9C2 来源于武汉大

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81900749);中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2042017k0133);湖北省自然科学基金资助项目(2018CFB150)

作者单位:430060 武汉大学人民医院内分泌科

通讯作者:文重远,电子邮箱:wenzhywurm@163.com

学人民医院中心实验室。Reg3 β - shRNA 由上海吉玛公司合成,pG1.2 空白载体由武汉巴菲尔生物技术服务有限公司提供,该载体含有增强绿色荧光蛋白(EGFP)。感受态细胞大肠杆菌 DH5 α 及无内毒素质粒提取试剂盒来源于北京康为世纪生物科技有限公司。反转录 cDNA 试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。DNA 引物由上海吉玛公司合成;质粒测序由深圳华大基因研究院完成。Lipofectamine2000、Lipofectamine3000 转染试剂和 Opti - MEM 培养基均来源于美国 Invitrogen 公司。羊抗大鼠 Reg3 β 抗体购自美国 R&D 公司(货号 AF1996),抗鼠 β - actin 抗体、抗羊二抗、抗小鼠二抗均购自北京四正柏生物科技有限公司。

2. Reg3 β 干扰表达载体的设计与筛选:检索 GeneBank 以获取大鼠 Reg3 β mRNA 基因全序列(RefSeq ID:NM_053289.1;Gene ID:24618),从起始密码子 AUG 快开始寻找“AA”二连序列,以其 3'端的 19 个碱基序列为潜在的 siRNA 靶点。据此选出 3 条合适的目标序列及其抑制靶点和 1 条空白对照序列由上海吉玛公司合成基因片段。随后将合成的 siRNA 以脂质转染法转染至 H9C2 心肌细胞中,以实时荧光定量 PCR 检测 Reg3 β mRNA 表达量,以此计算 3 条干扰片段的抑制率[抑制率(%) = (1 - 各组 Reg3 β 变化倍数) $\times$ 100%],从而筛选合适的基因片段用于构建 shRNA(表 1)。

3. shRNA 表达载体的构建:根据 pG1.2 表达质粒的要求,在干扰片段 5'端加入一个 Sac I 的酶切位点(GAGCTC),3'端加入 LOOP 环序列(TTCAA-GACG),接着加入其反向互补序列,最后加上终止密码子序列 TTTTGTG、Sac I 酶切位点和 Bsa I 酶切位点。按照同样方法得到其反义链序列。随后将前述正义链和反义链于 94 $^{\circ}$ C 退火成双链 DNA,同时利用 Bsa I 酶切 pG1.2 质粒得到线性化载体,将两者在 T4 连接酶作用下进行连接反应。

4. shRNA 表达载体的验证:将 10 μ l 前述连接产物转化至感受态大肠杆菌 DH5 α ,并均匀涂布与含有卡那霉素的筛选培养板上,挑取数个单克隆菌落接种于 5ml 含卡那霉素抗性的 LB 培养液中扩增,提取质粒后使用 Sac I 酶切鉴定,并将酶切鉴定正确的质粒进行测序验证。

5. H9C2 大鼠心肌细胞培养:参考美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection,ATCC)建议,大鼠 H9C2 心肌细胞置于含 4.5g/L 葡萄糖和

10% 胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司)的 DMEM 培养基(美国 HyClone 公司)中,在 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO $_2$ 培养箱中培养,于细胞密度在 80% ~ 90% 时进行传代。取对数生长期且生长状态良好的 H9C2 细胞,以每孔 3×10^5 个细胞数接种于 6 孔板内,培养过夜后进行后续实验。

6. shRNA 表达载体的转染条件优化:转染前 2h 将细胞培养液换成无血清 DMEM 培养基。用 opti - MEM 培养基分别稀释质粒和 Lipofectamine2000 或 Lipofectamine3000,混匀后室温静置 5min。Lipofectamine2000 和 Lipofectamine3000 转染试剂均以质粒:转染试剂 = 1 μ g:2 μ l 和 1 μ g:3 μ l 的比例配置配制质粒 - 脂质体复合物 250 μ l,静置 20min 后加入 H9C2 细胞内轻轻混匀。6h 后吸出复合物,换入正常培养基进行培养,48h 后于倒置显微镜下观察 EGFP 自发荧光强度以明确转染效率。

7. H9C2 细胞内干扰效果鉴定:转染共分成 3 组,即空白组、pG1.2 - Reg3 β shRNA 组和 shRNA 对照组,每组 3 个复孔。6 孔板中接种 H9C2 细胞后,按 shRNA 最优转染条件,依次加入无血清培养基 250 μ l、pG1.2 - Reg3 β shRNA 混合物 250 μ l、pG1.2 空白载体混合物 250 μ l。继续培养 48h 后提取细胞进行 Reg3 β mRNA 和蛋白检测。

8. q - PCR 检测 Reg3 β mRNA 表达量:以 Trizol 法(美国 Ambion 公司)提取细胞总 RNA 并检测其浓度后反转录成 cDNA,以 SYBR Green Master Mix 进行 PCR 扩增得到各种 Ct 值,反应条件为 50 $^{\circ}$ C 2min,95 $^{\circ}$ C 预变性 10min,95 $^{\circ}$ C 变性 30s,60 $^{\circ}$ C 退火 30s,共 40 个循环。大鼠 β - actin 引物序列为上游引物:5' - CACGATGGAGGGGCCGACTCATC - 3';下游引物:5' - TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT - 3',大鼠 Reg3 β 引物序列为上游引物:5' - GCTCCTACTGCTATGCCCTGTT - 3';下游引物:5' - TTACTCCACTCCCATC - CACCTC - 3'。以 β - actin 为内参,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组 Reg3 β mRNA 表达量相对于对照组表达量的变化倍数即为 Reg3 β mRNA 相对表达量。

9. Western blot 法检测 Reg3 β 蛋白表达量:以 RIPA 裂解液常规提取细胞总蛋白,加入 5 $\times$ SDS 上样缓冲液后于 100 $^{\circ}$ C 变性蛋白。上样后经 15% 分离胶和浓缩胶进行 SDS - PAGE 电泳,并将蛋白转移至 0.22 μ m PVDF 膜,加入 5% 脱脂奶粉室温封闭 1h,依次加入 Reg3 β 和 β - actin 一抗(稀释比均为 1:1000)及相应二抗进行孵育,以超敏 ECL 法进行显色。

10. 统计学方法:采用 SPSS 20.0 统计学软件对数据进行统计分析;多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间比较采用 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 靶向 Reg3 β mRNA 的干扰片段筛选:如表 1 所

示,设计的 3 条 shRNA 分别针对 Reg3 β mRNA 第 159 ~ 178 位碱基、第 195 ~ 214 位碱基和第 284 ~ 303 位碱基,其抑制率分别位 67.93%、28.14% 和 36.19%。因此,选择抑制率最高的第一条干扰序列(即 Reg3 β shRNA-1)为基础构建 shRNA。

表 1 Reg3 β shRNA 基因片段序列、靶点及抑制率

基因	shRNA 序列(5'→3')	靶点	抑制率(%)
阴性对照(NC)	上游引物:UUUCUCCGAACGUGUCACGUTT 下游引物:ACGUGACACGUUCGGAGAATT	-	9.11
Reg3 β shRNA-1	上游引物:CCCUCUGCACGCAUUAGUUTT 下游引物:AACUAAUGCGUGCAGAGGGTT	159~178	67.93
Reg3 β shRNA-2	上游引物:GCAUAUGGCUCCUACUGCUTT 下游引物:AGCAGUAGGAGCCAUAUGCTT	195~214	28.14
Reg3 β shRNA-3	上游引物:CCUUGUAUCUGGCUCAAUTT 下游引物:AUUGAGCACAGAUACAAGGTT	284~303	36.19

2. Reg3 β -shRNA 表达载体的酶切和测序鉴定:因 pG1.2 质粒里面只有一个 Sac I 的酶切位点,因此在构建 Reg3 β -shRNA 时于干扰片段前加入另一个 Sac I 的酶切位点,当质粒被 Sac I 酶切出一条约 600bp DNA 条带时,说明退火片段连接到 pG1.2 载体里。酶切结果显示 Reg3 β -shRNA 经 Sac I 酶切后与预期结果一样出现 600bp 的条带(图 1)。测序结构证实构建的 Reg3 β -shRNA 与实验设计序列一致,且干扰片段前有 Sac I 酶切位点(GAGCTC),详见图 2。

3. H9C2 心肌细胞转染条件优化:将两种转染试剂和 Reg3 β shRNA 以不同比例混匀,48h 后用倒置荧光显微镜观察,结果发现 Lipofectamine3000 (1 μ g:3 μ l)的转染效率最高可达 50%,而 Lipofectamine2000 的转染效率均不足 10%(图 3)。

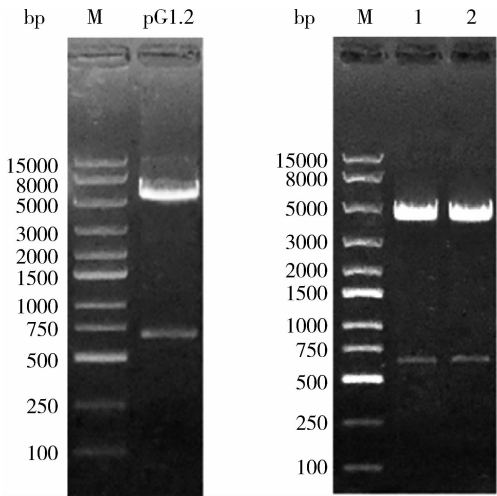


图 1 pG1.2-Reg3 β shRNA 酶切验证
M. marker;pG1.2. 空白载体;1 和 2 均代表 Reg3 β shRNA-1 (即 pG1.2-Reg3 β shRNA)

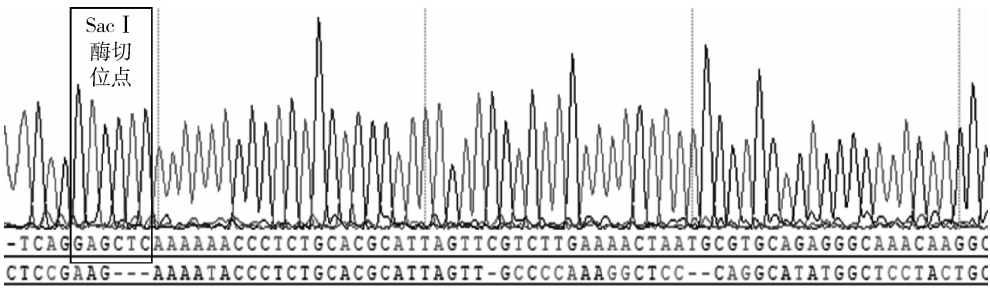


图 2 pG1.2-Reg3 β shRNA 测序验证

4. H9C2 细胞内 Reg3 β 干扰效果评估:将 Reg3 β shRNA 按最优条件转染至 H9C2 细胞,48h 后以 q-

PCR 和 Western blot 法鉴定干扰效果(图 4)。与空白组比较,Reg3 β shRNA 可使 mRNA 相对表达量下降

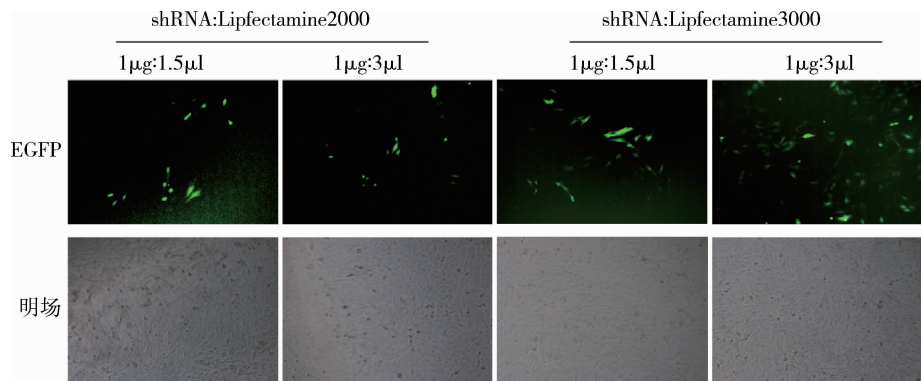


图 3 不同条件下 pG1.2 - Reg3β shRNA 转染 H9C2 的荧光显微镜图 (×40)
EGFP, 增强型荧光蛋白

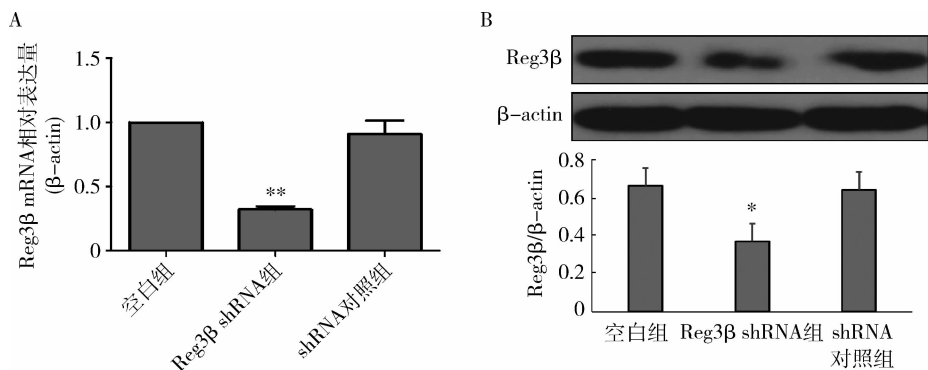


图 4 q - PCR 和 Westem blot 法评估 pG1.2 - Reg3β shRNA 抑制效果
A. q - PCR 检测结果, B. Westem blot 法检测结果。与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

60% 以上 ($P < 0.01$), Reg3β 蛋白表达量下降 50% 左右 ($P < 0.05$), 而 shRNA 对照组不抑制 Reg3β 表达 ($P > 0.05$)。

讨 论

随着人们饮食结构及生活方式的改变, 糖尿病、肥胖、高脂血症、高血压等心血管疾病高危因素流行趋势明显, 在今后较长的时间内, 心血管疾病患病人数将会急剧增加^[1, 9]。因此, 及时针对心血管疾病开展发病机制、诊断、干预治疗的相关研究, 有助于提高患者生命质量, 有着重要的临床价值和社会意义。

Reg3β 是具有进化保守性分泌蛋白。大鼠 Reg3β 位于 4q33 (NC_005103.4), 含 6 个外显子, 共编码 188 个氨基酸; 小鼠 Reg3β 位于 6C3 (NC_000072.6), 含 6 个外显子编码 175 个氨基酸。在人体中该蛋白又称为 Reg3A (再生基因蛋白 3A, Regenerating Islet - Derived Protein 3 - Alpha), 位于 2p12 (NC_000002.12), 含 6 个外显子, 编码 175 个氨基酸。人 Reg3β 与大鼠 Reg3β 具有 72.99% 的基因序列一致性, 与小鼠 Reg3β 的基因序列一致性为

75.1%, 氨基酸序列一致性为 70%, 与小鼠 Reg3α、Reg3γ、Reg3δ 等其他家族成员的氨基酸序列一致性低至 50%^[10]。研究表明, 针对重组人 Reg3β 蛋白设计的抗体能与小鼠 Reg3β 具有交叉反应, 证实 Reg3β 在不同物种中可能具有类似的分子结构基础^[4, 10]。因此, 研究大鼠 Reg3β 的功能有助于深入理解该蛋白在人体中的潜在作用。

Reg3β 虽然在体内许多组织和细胞均有表达, 但在心血管疾病中仅特异性表达于心肌细胞, 具有潜在的心肌保护作用。生理状态下, Reg3β 仅表达于小肠、胰岛 α 细胞、分泌生长激素的细胞、子宫等组织。在某些疾病时许多组织会高表达 Reg3β 蛋白, 例如急性胰腺炎时的胰腺组织、糖尿病大鼠胰岛组织、再生的胰岛 β 细胞、肿瘤组织、受损的神经组织等^[4]。在自身免疫性心肌炎、缺血性心脏病和心肌梗死等动物模型中, Reg3β 仅在心肌细胞中表达增多, 而心脏组织非心肌细胞中均无表达^[3, 6, 7]。研究发现, Reg3β 能诱导巨噬细胞向心肌受损部位浸润以清除中性粒细胞残骸, 进而修复心脏功能, 提高小鼠梗死后存活

率^[3]。虽然既往研究证实 Reg3 β 既能减少 TNF- α 、IL-1 β 和细胞黏附分子的表达,又能抑制 β 细胞和胰腺癌的凋亡,但其是否通过抗炎和抗凋亡作用而保护心肌细胞仍有待深入研究^[2,4,5,11]。

目前研究 Reg3 β 功能及机制的常用方法是外源性 Reg3 β 蛋白干预、Reg3 β 全身敲减小鼠、Reg3 β 过表达小鼠、以及下游 gp130/JAK2/STAT3 信号通路抑制剂等^[3-5,12]。RNA 干扰技术可介导细胞内序列特异的靶基因表达沉默,产生相应的功能表型缺失的现象,为探索 Reg3 β 功能及机制提供了新的维度。因此,本实验采用 pG1.2 干扰表达载体,带有 EGFP 绿色荧光标记和 CCDB 基因,其中 EGFP 用于细胞内观察 shRNA 表达情况,CCDB 基因可用于筛选线性化的载体。本研究利用设计的 3 条 Reg3 β siRNA,筛选出抑制效率最高达到 67.93% 的抑制序列,进而成功构建了 pG1.2-Reg3 β shRNA 沉默载体,既能瞬时转染细胞以短暂的降低 Reg3 β 的表达,也希望包装成病毒表达载体感染细胞以获得稳定表达株。

大鼠 H9C2 细胞是研究心肌细胞功能的常用细胞株之一,既能用于研究心力衰竭相关基因如基质金属蛋白酶-2 的作用,还能用于心肌细胞凋亡和细胞毒性研究^[13]。此外,在 H9C2 细胞中,高浓度葡萄糖能诱导凋亡和炎症反应,并能够观察到降糖药物二甲双胍和肠促胰素样肽(GLP-1)受体激动剂的心肌保护作用^[14,15]。但早期研究发现,在阳离子脂质转染体模型下,H9C2 细胞转染效率远低于 HEK293 细胞,影响了该细胞的科研应用^[13]。因此,为获得高效无毒的 H9C2 细胞转染方法,笔者优化摸索两种常用阳离子脂质体 Lipofectamine2000 和 Lipofectamine3000 的转染条件,结果发现 pG1.2-Reg3 β shRNA 沉默载体:Lipofectamine3000 比例为 1 μ g:3 μ l 时,其转染效率可达到 50%,明显高于其他转染模式。倪银芸等^[13]研究发现,Lipofectamine3000 细胞毒性小,转染 EGFP-LC2 质粒的效率也显著高于 Lipofectamine2000、FuGen HD 和 DNA-In CRISPR 等 3 种转染方法,推荐用于 H9C2 细胞的转染。

在此基础上,本研究以最优转染条件将成功构建的 pG1.2-Reg3 β shRNA 沉默载体转入 H9C2 细胞,PCR 和 Western blot 法检测结果显示,Reg3 β 表达的抑制率可达到 50% 以上。但本研究也存在一定的局限性,如 pG1.2-Reg3 β shRNA 抑制效果仅为 50% 以上,酶切验证时未能将同时将空白载体和 pG1.2-Reg3 β shRNA 放在一起进行验证,细胞转染条件需要

进一步优化,亦未能在病理条件下(如高血糖)观察该载体的抑制效果。无论如何,本实验成功构建的 pG1.2-Reg3 β shRNA 有望为后续深入探讨 Reg3 β 在心血管疾病中的作用奠定了基础。

参考文献

- Bragg F, Holmes MV, Iona A, *et al.* Association between diabetes and cause-specific mortality in rural and urban areas of China [J]. JAMA, 2017, 317(3): 280-289
- Luo C, Yu LT, Yang MQ, *et al.* Recombinant Reg3beta protein protects against streptozotocin-induced beta-cell damage and diabetes [J]. Sci Rep, 2016, 6: 35640
- Lorchner H, Poling J, Gajawada P, *et al.* Myocardial healing requires Reg3beta-dependent accumulation of macrophages in the ischemic heart [J]. Nat Med, 2015, 21(4): 353-362
- Loncle C, Bonjoch L, Folch-Puy E, *et al.* IL17 functions through the novel REG3beta-JAK2-STAT3 inflammatory pathway to promote the transition from chronic pancreatitis to pancreatic cancer [J]. Cancer Res, 2015, 75(22): 4852-4862
- Xiong X, Wang X, Li B, *et al.* Pancreatic islet-specific overexpression of Reg3beta protein induced the expression of pro-islet genes and protected the mice against streptozotocin-induced diabetes mellitus [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011, 300(4): E669-680
- Fitzgibbons TP, Paolino J, Dagorn JC, *et al.* Usefulness of pancreatitis-associated protein, a novel biomarker, to predict severity of disease in ambulatory patients with heart failure [J]. Am J Cardiol, 2014, 113(1): 123-126
- Watanabe R, Hanawa H, Yoshida T, *et al.* Gene expression profiles of cardiomyocytes in rat autoimmune myocarditis by DNA microarray and increase of regenerating gene family [J]. Transl Res, 2008, 152(3): 119-127
- Lorchner H, Widera C, Hou Y, *et al.* Reg3beta is associated with cardiac inflammation and provides prognostic information in patients with acute coronary syndrome [J]. Int J Cardiol, 2018, 258: 7-13
- Wang L, Gao P, Zhang M, *et al.* Prevalence and ethnic pattern of diabetes and prediabetes in China in 2013 [J]. JAMA, 2017, 317(24): 2515-2523
- Loncle C, Bonjoch L, Folch-Puy E, *et al.* REG3beta plays a key role in IL17RA protumoral effect-response [J]. Cancer Res, 2016, 76(7): 2051
- Folch-Puy E, Granell S, Dagorn JC, *et al.* Pancreatitis-associated protein I suppresses NF-kappa B activation through a JAK/STAT-mediated mechanism in epithelial cells [J]. J Immunol, 2006, 176(6): 3774-3779
- Gironella M, Calvo C, Fernandez A, *et al.* Reg3beta deficiency impairs pancreatic tumor growth by skewing macrophage polarization [J]. Cancer Res, 2013, 73(18): 5682-5694
- 倪银芸,丁雨,吴思思. 四种转染试剂对 H9C2 细胞转染效率的比较 [J]. 华西医学, 2017, 32(7): 1024-1028
- Yi B, Hu X, Wen Z, *et al.* Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, inhibits hyperglycemia-induced apoptosis in myocytes by suppressing receptor for advanced glycation end products expression [J]. Exp Ther Med, 2014, 8(4): 1185-1190
- Zhang T, Hu X, Cai Y, *et al.* Metformin protects against hyperglycemia-induced cardiomyocytes injury by inhibiting the expressions of receptor for advanced glycation end products and high mobility group box 1 protein [J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(3): 1335-1340

(收稿日期:2020-01-31)

(修回日期:2020-03-04)