

· 基础研究 ·

利用逆转录病毒载体建立 SMAD2 稳定干扰的人胚胎干细胞系 *

孙 懿^{1,2,3} 卢光琇^{1,2,3} 林 戈^{1,2,3Δ}

(1 中南大学生殖与干细胞研究所 湖南 长沙 410078 2 人类干细胞国家工程研究中心 湖南 长沙 410078 ;

3 卫生部人类干细胞与生殖工程重点实验室 湖南 长沙 410078)

摘要 目的:建立 SMAD2 稳定干扰的人胚胎干细胞系。**方法** 利用包装细胞获得重组的逆转录病毒,感染人类胚胎干细胞,为干扰组 ShSMAD2、载体组 VECTOR 和野生型组 WT 经荧光筛选获得阳性克隆;Realtime-PCR 检测 SMAD2 mRNA 的表达。**结果** 带 GFP 荧光标记的 SMAD2 特异性 shRNA 逆转录病毒感染人类胚胎干细胞后,获得稳定干扰 SMAD2 表达的人胚胎干细胞系。经检测 shSMAD2 组 SMAD2 mRNA 表达较 VECTOR 和 WT 组明显降低,VECTOR 和 WT 组之间无明显差异。**结论** 通过 SMAD2 特异性 shRNA 逆转录病毒载体构建了稳定干扰 SMAD2 的人类胚胎干细胞。

关键词 人胚胎干细胞;RNA 干扰;SMAD2

中图分类号 Q291,Q813.1 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)15-2801-03

Establishing SMAD2-Knocked down Human Embryonic Stem Cells by ShRNA Retroviral Vector*

SUN Yi^{1,2,3}, LU Guang-xiu^{1,2,3}, LIN Ge^{1,2,3Δ}

(1 Institute of Reproductive and Stem Cell Engineering, Central South University, 410078, Changsha, China;

2 National Research and Engineering Center of Human Stem Cells, 410078, Changsha, China;

3 Key Laboratory of Human Stem Cells and Reproductive Engineering, Ministry of Health, 410078 Changsha, China)

ABSTRACT Objective: To establish stably SMAD2 shRNA interfered human embryonic stem cell line. **Methods:** SMAD2 shRNA expressed pRetroSuper-GFP-SMAD2 vector was made virus in packaging cell line. Human embryonic stem cells were infected, which were divided into interference group (ShSMAD2), VECTOR group and wild-type group (WT). Positive clones were selected by GFP Fluorescence. SMAD2 knocked down efficiency were evaluated by Real-time PCR analysis. **Results:** After human embryonic stem cells were infected with SMAD2-specific shRNA retrovirus labeled GFP fluorescence, stable interference of SMAD2 expression in human embryonic stem cell lines had been obtained, in which SMAD2 mRNA expression was significantly lower compared with the VECTOR and the WT group, while VECTOR group and WT group showed no significant difference. **Conclusion:** Retroviral vector-delivered shRNA resulted in effective and stable down-regulation of SMAD2 expression in human embryonic stem cells.

Key words: Human embryonic stem cells; RNAi; SMAD2

Chinese Library Classification: Q291, Q813.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)15-2801-03

前言

SMAD 蛋白是转化生长因子- β (TGF- β) 信号通路中关键的介质,其中 SMAD2 属于受体激活型 SMAD (R-SMAD),其活化后磷酸化,与 SMAD4 结合形成异三聚体进入胞核,激活下游基因转录^[1-2]。研究表明 SMAD2 信号对于 Activin A 信号诱导 DE 的发育至关重要^[3],Tremblay 等^[4]在小鼠胚胎研究中发现 SMAD2 是原条形成及内胚层特化的中介因子。Fei 等^[5]研究发现 Activin A/Nodal 信号通过 SMAD2/3 不同的转录调控网络对于鼠 ESCs 维持不分化以及向内胚层分化都是必需的。

James 等^[6]研究发现 TGF β /activin/nodal 通过信号转导因子 SMAD2/3 激活信号维持人胚胎干细胞 (hESC) 未分化状态。Jiang 等^[7]研究发现在 hESCs 中,TGF β /activin 信号通过 SMAD2/3 转录调控 Nanog 的表达。逆转录病毒载体 pSUPER RNAi 系统是个成熟、高效、特异的干扰基因表达系统,其转染范围广、效率高、转入的外源基因可完全整合、并可以长期表达^[8]。为了研究 SMAD2 对 hESCs 维持不分化和向内胚层分化的作用,及其与下游相关基因的联系,并探讨其可能的机制,我们利用 SMAD2 RNA 干扰逆转录病毒载体建立 SMAD2 稳定干扰 hESCs 系,为进一步研究建立细胞模型。

* 基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金新教师基金项目(200805331133) 国家"863"计划项目(2006AA02A102) 国家自然科学基金项目(81101510,30800659) 湖南省自然科学基金青年基金项目(09JJ4009) 中央高校基本科研业务费青年教师助推基金项目(201012200219)

作者简介:孙懿(1979),女,助理研究员,主要研究方向:干细胞与再生医学研究

Δ通讯作者:林戈,电话:0731-82355100-8428, E-mail: linggf36@yahoo.com.cn

(收稿日期:2012-02-27 接受日期:2012-03-23)

1 材料与方法

1.1 实验细胞和试剂

实验用人胚胎干细胞细胞系 chHES-8 由中南大学生殖与干细胞研究所在人源性饲养层上建立^[9],核型正常,建系后传代代数在第 20~第 50 代之间用于试验。DMEM、F12、替代血清、 β - 巯基乙醇、L- 谷氨酰胺、非必需氨基酸、成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor 2, FGF2)、胎牛血清、RPMI1640、DPBS 均为 Gibco 公司产品; Matrigel, BD 公司; mTeSR[®] 1, STEMCELL[™] 公司; 引物、TRIZOL, lipofectamine[™] 2000, Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒, Promega 公司; QTM SYBR[®] Green Supremix, BIO-RAD 公司; SMAD2 干扰质粒 pRetroSuper-GFP-SMAD2 来自 Addgene 荧光显微镜为日本 Nikon 公司产品。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 细胞培养 hESCs 按照常规方法培养在丝裂霉素处理的鼠成纤维细胞 (MEF) 制备的饲养层上, 培养基含有 DMEM/F12、体积分数 15% 的替代血清、0.1 mmol/L β - 巯基乙醇、2 mmol/L L- 谷氨酰胺、质量分数 1% 非必需氨基酸以及 4 ng/mL bFGF。MEF 更换新鲜人胚胎干细胞培养基后, 机械切割法将人胚胎干细胞按适当比例传到新制备的饲养层细胞上, 每隔 6 d 传代 1 次。

1.2.2 逆转录病毒颗粒的包装 逆转录病毒包装细胞 PA317 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37℃, 5% CO₂ 条件下培养。转染前将 PA317 传入 6 孔板, 第 2 天用脂质体 Lipofectamine[™] 2000 进行转染, 操作按照说明书进行。转染 18 h 后, 更换含 20% FBS DMEM 培养液。48 h 后收集含病毒的上清液, 2000 rpm 离心 5 min, 0.45 μ m 滤器 (millipore) 过滤上清, 超速离心浓缩病毒后, 立即用于感染。

1.2.3 感染人类胚胎干细胞 hESCs 传代至用 Matrigel 预铺皿的 6 孔培养板上, mTeSR[®] 1 培养基培养 2d 后, 取病毒原液, 加入 polybrene 8 μ g/mL, 病毒感染人类胚胎干细胞 chHES-8。实验设 SMAD2 干扰组 (ShSMAD2)、空载体组 VECTOR 和野生型组 WT。48 h 后用新鲜培养基换病毒感染液, 利用绿色荧光筛选阳性克隆。

1.2.4 实时荧光定量 RT-PCR 检测 shRNA 干扰效率 收集 2×10^5 个 ShSMAD2、VECTOR 和 WT 三组细胞, 按 Trizol 说明书提取总 RNA, 逆转录试剂盒合成 cDNA 进行实时荧光定量 (Real-time quantitative) PCR 分析。引物 SMAD2: 上游引物 5'-AACAGGACGATTAGATGAGC-3'、下游引物 5'-GACCTGGTTTGT TCAGAGAAGC-3'^[10]。实时定量 RT-PCR 反应体系^[11]包括 2 μ L cDNA, 2 μ L 的 SYBR[®] Green Supremix 混合染料, 0.5 μ L 的 10 μ mol/L PCR 上游引物, 0.5 μ L 的 10 μ mol/L PCR 下游引物, 和 14 μ L 去离子水。荧光 PCR 仪反应条件为 95℃ 变性 5 min, 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 重复 40~50 个循环; 60℃ 至 95℃ 绘制溶解曲线。实验结果自动以 CT 值给出, 相对表达量计算按照 Livak^[12] 等的方法进行计算。实验至少重复 3 次。

2 结果

2.1 感染人类胚胎干细胞

感染 pRetroSuper-GFP-SMAD2 重组病毒后, 利用 pRetroSuper-GFP-SMAD2 带有绿色荧光报告基因, 荧光筛选带 GFP 标记的 SMAD2 干扰细胞系 (图 1)。在倒置荧光显微镜下可以看到经过筛选后, 第 27D 可以看到带绿色荧光的人胚胎干细胞克隆, 继续培养得到稳定干扰 SMAD2 人类胚胎干细胞系, 经过 54D 筛选得到绿色荧光的人胚胎干细胞系, 表明细胞中有转染成功的外源性基因表达。

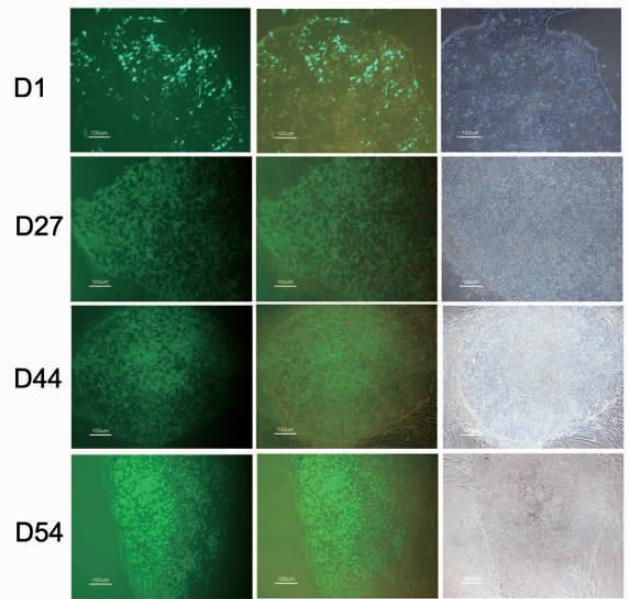


图 1 构建了稳定转染 pRetroSuper-GFP-siSMAD2 hESCs 细胞系 (200 $\times$)

Fig. 1 Establish a stable transfection pRetroSuper-GFP -siSMAD2 of hESCs lines (200 $\times$)

2.2 shRNA 干扰效率检测

收集 Sh[®] SMAD2、VECTOR 和 WT 三组细胞, 进行实时荧光定量 PCR 分析。Real-timePCR 的结果 (图 2) 显示: 与 VECTOR 和 WT 组相比较, SMAD2 干扰组 ShSMAD2 的 SMAD2 mRNA 表达明显降低, 转染干扰序列的稳定株的 SMAD2 表达仅为 WT 组的 (19.8 $\pm$ 8 %), 而载体转染组 VECTOR 和 WT 组之间无明显差异。

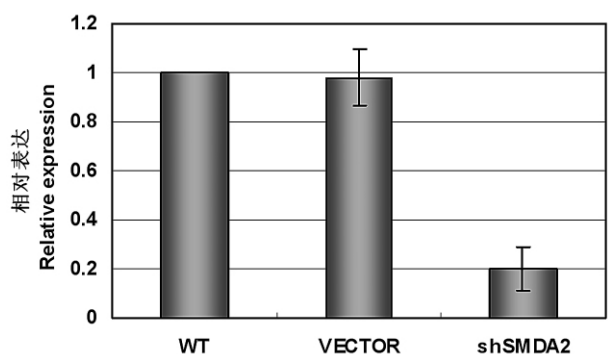


图 2 Real-time PCR 检测 SMAD2 基因干扰效率

Fig. 2 Real-time PCR analysis of the RNAi efficiency of SMAD2 gene

3 讨论

TGF- β 家族由一类结构和功能相关的多肽生长因子亚家族组成,在细胞的增殖与分化、胚胎发育、胞外基质形成、骨的形成和重建等方面都起着重要作用^[1]。TGF- β 先与细胞膜上的 TGF- β II 型受体结合,然后结合并激活 I 型受体,活化的 I 型受体磷酸化 R-SMAD 如 SMAD2、3,磷酸化的 R-SMADs 从受体上解离下来后与 SMAD4 结合转移到核内,激活下游基因的转录^[1-2]。SMAD2 蛋白是介导 TGF- β 信号转导通路,直接调控 Nanog 的表达,维持胚胎干细胞不分化的关键介质^[6-7]。而 Activin A/Nodal 信号通过 SMAD2/3 不同的转录调控网络,对于 hESCs 向内胚层分化都是必需的^[3-4],因此为进一步研究 hESCs 中 SMAD2 在 TGF- β 作用下启动的不同的信号转导机制,建立一 SMAD2 稳定干扰的细胞株是必要的。RNAi 技术高效、特异地沉默特定基因已经得到广泛应用^[8]。本研究利用带有 GFP 报告基因的逆转录病毒干扰质粒 pRetroSuper-GFP-SMAD2 建立稳定表达 shSMAD2 的 hESCs 细胞系,其有绿色荧光报告基因的表达,表明报告基因可以表达并具有活性。Real-time PCR 进一步验证了 SMAD2 的 mRNA 的表达情况,结果显示 SMAD2 mRNA 平均干扰效果达到 80%。

综上所述,逆转录病毒载体的 RNA 干扰系统对人类胚胎干细胞具有良好的感染效果,并能有效地发挥 RNA 干扰的作用。建立的稳定 SMAD2 干扰人胚胎干细胞系将为进一步探讨 SMAD2 对于 TGF- β 信号在人胚胎干细胞维持不分化和向内胚层分化不同的信号转导机制的研究奠定良好的基础。

参考文献(References)

- [1] Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling[J]. Nature, 2003, 425(6958): 577-584
- [2] Ross S, Hill CS. How the Smads regulate transcription [J]. Int J Biochem Cell Biol. 2008, 40(3):383-408
- [3] Brown S, Teo A, Pauklin S, et al. Activin/Nodal signaling controls divergent transcriptional networks in human embryonic stem cells and in endoderm progenitors[J]. Stem Cells, 2011, 29(8):1176-1185
- [4] Tremblay KD, Hoodless PA, Bikoff EK, et al. Formation of the definitive endoderm in mouse is a Smad2-dependent process [J]. Development, 2000,127:3079-3090
- [5] Fei T, Zhu S, Xia K, et al. Smad2 mediates Activin/Nodal signaling in mesendoderm differentiation of mouse embryonic stem cells [J]. Cell Res, 2010, 20(12):1306-1318
- [6] James D, Levine AJ, Besser D, et al. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells[J]. Development, 2005, 132(6):1273-1282
- [7] Jiang J, Ng HH. TGFbeta and SMADs talk to NANOG in human embryonic stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2008, 3(2):127-128
- [8] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. Science, 2002, 296(5567):550-553
- [9] Lin G, Xie YB, OuYang Q, et al. HLA matching potential of an established human embryonic stem cell bank in China [J]. Cell stem cell, 2009, 5(5): 461-465
- [10] Coutts SM, Childs AJ, Fulton N, et al. Activin signals via SMAD2/3 between germ and somatic cells in the human fetal ovary and regulates kit ligand expression[J]. Dev Biol, 2008, 314(1):189-199
- [11] Sun Y, Yi H, Zhang PF, et al. Identification of Differential Proteins in Nasopharyngeal Carcinoma Cells with p53 Silence by Proteome Analysis [J]. FEBS LETTERS, 2007, 581(1): 131-139
- [12] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C_T} (T) [J]. Methods, 2001, 25: 402-408
- [10] 刘莎,向佳梅,王立明. DNA 甲基化与乳腺癌的关系研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2009,9 (5) :960-963
Liu Sha, Xiang Jia-mei, Wang Li-ming. Progress on Relationship between DNA Methylation and Breast Cancer [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009,9 (5) :960-963(In Chinese)
- [11] Jones, P.A. and S.B. Baylin, The fundamental role of epigenetic events in cancer [J]. Nat Rev Genet, 2002, 3(6): 415-428
- [12] 王震凯. DNA 甲基化与肿瘤 [J]. 医学研究生学报, 2011,24(6): 641-645
Wang Zhen-kai. DNA methylation and tumor [J]. J Med Postgra, 2011,24(6):641-645(In Chinese)
- [13] 李洪艳,佟少明,李艳. 癌症与 DNA 甲基化异常 [J]. 辽宁大学学报, 2011,3(38):219-223
Li Hong-yan, Tong Shao-ming, Li Yan. DNA aberrant methylation and cancer [J]. Journal of liaoning university, 2011,3(38):219-223(In Chinese)
- [14] Jones, P.A., S.B. Baylin. The epigenomics of cancer [J]. Cell, 2007, 128(4):683-692
- [15] Baylin, S.B. DNA methylation and gene silencing in cancer [J]. Nat Clin Pract Oncol, 2005,2 Suppl 1: S4-11
- [16] Wiesenhofer, B. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and its receptor (GFR-alpha 1) are strongly expressed in human gliomas [J]. Acta Neuropathol, 2000,99(2): 131-137
- [17] Suter-Crazzolara, C, Baecker, P.A. Characterization of a human GDNF gene promoter [J]. Neurosci, 1997,23:90
- [18] Baecker, P.A. Characterization of a promoter for the human glial cell line-derived neurotrophic factor gene [J]. Brain Res Mol Brain Res, 1999,69(2):209-222

(上接第 2821 页)