

慢病毒载体介导 PAX6 沉默引起 HLE-B3 细胞凋亡

黄悦¹, 李志清¹, 马志伟², 孙慧敏¹

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No. 30973272)

作者单位:¹(300384) 中国天津市, 天津医科大学眼科中心;

²(20892) 美国马里兰州, 美国国立健康中心(NIH)

作者简介:黄悦, 博士, 副主任医师, 研究方向:角膜病、白内障。

通讯作者:孙慧敏, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向:白内障。doctorsunhuimin@yahoo.com.cn

收稿日期:2012-11-27 修回日期:2013-01-25

Lentiviral vector-mediated PAX6 silence induce human lens epithelial cell apoptosis

Yue Huang¹, Zhi-Qing Li¹, Zhi-Wei Ma², Hui-Min Sun¹

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 30973272)

¹Tianjin Medical University Eye Center, Tianjin 300384, China;

²National Institutes of Health Center (NIH), Maryland 20892, USA

Correspondence to: Hui-Min Sun, Tianjin Medical University Eye Center, Tianjin 300384, China. doctorsunhuimin@yahoo.com.cn

Received: 2012-11-27 Accepted: 2013-01-25

Abstract

• AIM: To observe human lens epithelial cells (HLE-B3) proliferation changes when the PAX6 gene has been knocked-down.

• METHODS: Four groups PAX6 shRNA lentiviral vectors and the control group lentiviral (pGCL-GFP-shRP1, 2, 3, 4, NC) infect B3 cells. Real Time PCR and Western blot analysis was used to determine PAX6 silence after infection 96 hours. Effective PAX6-silence pGCL-GFP-shRP4 was selected to infect B3 cells, MOI (Multiplicity of infection) = 10 and the changes were observed in the number of the cells. The B3 cells apoptosis was detect by flow cytometry after 48 hours in infection.

• RESULTS: RNAi-virus-infected B3 cells decreased in the number of cells with infection prolonged. The flow cytometry results showed that after knock-down the PAX6 for 48 hours, apoptotic peak appeared before the G₁/G₀ phase.

• CONCLUSION: Lentivirus-mediated RNA interference can effectively silence PAX6 expression in B3 cells. There is HLE-B3 apoptosis after PAX6 gene knock-down.

• KEYWORDS: lentivirus; PAX6; apoptosis

Citation: Huang Y, Li ZQ, MA ZW, et al. Lentiviral vector-mediated PAX6 silence induce human lens epithelial cell apoptosis.

Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci) 2013;13(2):256-259

摘要

目的:观察 PAX6 基因沉默后人晶状体上皮细胞系(HLE-B3)增殖的改变。

方法:分别将 4 组 PAX6 shRNA 慢病毒载体及对照组慢病毒(pGCL-GFP-shRP1, 2, 3, 4, NC)感染 B3 细胞;感染 96h 后,利用 Real-time PCR 和 Western-blot 检测 B3 细胞 PAX6 表达以确定 PAX6 沉默;选取有效沉默 PAX6 基因的 pGCL-GFP-shRP4 感染 B3 细胞, MOI = 10, 观察细胞数量变化。感染 48h 后采用流式细胞仪检测 B3 细胞凋亡情况。

结果:感染 RNAi 病毒组的 B3 细胞,随感染时间延长,细胞数量减少。流式细胞仪检测结果显示沉默 PAX6 48h 的 B3 细胞, G₁/G₀ 期前出现凋亡峰。

结论:慢病毒介导的 RNA 干扰能有效沉默 B3 细胞的 PAX6 表达;PAX6 基因沉默后 B3 细胞凋亡。

关键词:慢病毒; PAX6; 细胞凋亡

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.02.09

引用:黄悦,李志清,马志伟,等.慢病毒载体介导 PAX6 沉默引起 HLE-B3 细胞凋亡.国际眼科杂志 2013;13(2):256-259

0 引言

PAX6 基因是高度保守的转录调控因子, PAX6 蛋白在眼、鼻子、胰腺、垂体及中枢神经系统发育中表达^[1-3], 对它们的正常发育起重要作用。人类 PAX6 基因的杂合突变能引起无虹膜和其他先天性眼发育异常^[4,5], 中心凹发育不良、视神经发育不良等神经缺陷也比较普遍^[6,7]。约 50% ~ 80% 的患者伴发白内障, 并有进展倾向^[8]。本实验利用慢病毒作为载体, 将 shRNA (RNA-short hairpin RNAs, 短发夹 RNA) PAX6 转染至正常表达 PAX6 的人晶状体上皮细胞(HLE-B3), 观察 PAX6 沉默后 HLE-B3 细胞的增殖规律。

1 材料和方法

1.1 材料 人晶状体上皮细胞系 HLE-B3 (B3 细胞)由中山医科大学张振宁教授惠赠; 4 组 PAX6 shRNA 慢病毒载体及对照组慢病毒(pGCL-GFP-shRP1, 2, 3, 4, NC)均由天津医科大学眼科中心提供; 荧光显微镜(Olympus, 日本); Real-time PCR 仪器(BioRad 公司, iQ5); 流式细胞仪(BD Biosciences, 美国); Western-blot 试剂盒(Amersham 公司 ECL+plus™); 转移电泳装置(Bio-rad, Richmond, CA); SYBR Master Mixture (Takara 公司, 日本); DMEM、胰酶、谷氨酰胺(Hyclone 公司); 胎牛血清(Gibco 公司); 胰蛋白酶、DMSO (Sigma 公司); Anti-PAX6 (Chemicon 公司); Anti-Actin、二抗(Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染 细胞正常培养 24h, 细胞的融合度 30% ~ 40%。加入适宜量的病毒, 12h 后更换为正常培

培养基。感染 4~6d 后,以荧光显微镜观察报告基因 GFP 的表达情况,挑选感染效率大于 70% 的样品进入后续研究检测。

1.2.2 Real-time PCR 检测干扰效率 收集细胞,1000r/min 离心 5min,去上清,细胞沉淀中加入 1mL Trizol,轻轻吹打后室温静置 5min,然后转移至新的 1.5mL eppendorf 管中。加入 200 μ L 氯仿,颠倒混匀,室温静置 15min,离心,吸取上清,加入等体积-20 $^{\circ}$ C 预冷的异丙醇,混匀后-20 $^{\circ}$ C 沉淀 10min。离心去上清,以 750mL/L 乙醇洗涤沉淀,离心后,室温干燥。加入 RNase-free 水,至完全溶解,紫外分析测定所抽提 RNA 的浓度。提取的 RNA 经反转录处理,得到 cDNA。随后使用 SYBR Master Mixture,在 iQ5 上完成 Real-time PCR 检测。

1.2.3 Western-blot 检测 PAX6 蛋白表达 培养细胞除去培养基,加入适量预冷的 Lysis Buffer。预冷的刮刀将细胞刮下,冰上裂解细胞 10~15min。离心取上清,加入 6 \times loading 上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 煮 5~10min。取一定量蛋白总样品进行 SDS-PAGE 蛋白分离,使用转移电泳装置,将蛋白样品转移到 PVDF 膜上。用 TBST 室温封闭 PVDF 膜 1h 后,分别用稀释的 PAX6 或者内参 Actin 一抗孵育 2h。洗膜后,用与一抗相应的辣根过氧化物酶驴抗兔/小鼠二抗,于室温下孵育 2h。洗膜后,采用 Western-blot system 试剂盒进行显色反应。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 收集细胞,数目约 $(1\sim5)\times 10^6$ 个/mL,离心,弃去培养液。PBS 洗涤后,用 700mL/L 乙醇低温固定 2h,离心弃去固定液,PBS 重悬细胞。用 1mL PI 染液染色 30min,经流式细胞仪检测。

2 结果

2.1 PAX6 shRNA 病毒载体对 B3 细胞内源性 PAX6 表达的影响 根据预实验结果,确定以感染复数(MOI)=病毒数/细胞数=10 进行实验,B3 细胞 1,2,3,4,NC RNAi 病毒(pGCL-GFP-shRP1,2,3,4,NC)感染实验在 6 孔板中进行。

感染重组慢病毒 96h 后,以 Real-time PCR 和 Western-blot 分别检测每孔细胞 PAX6 的表达情况。经两种方法检测结果均显示 1,2,3,4 重组慢病毒对目的基因 PAX6 具有一定沉默作用。但 pGCL-GFP-shRP1,2,4 作用更明显(图 1)。后续实验中使用干扰效率较高的 pGCL-GFP-shRP4 进行。

2.2 荧光显微镜观察细胞生长状态和感染效率 选取干扰效率较高的 pGCL-GFP-shRP4 组病毒感染细胞,处理 24h 后,以荧光显微镜观察细胞生长状态和感染效率,结果表明,细胞经处理 24h 后生长良好,并有绿色荧光蛋白表达(图 2),感染效率达到 90% 以上,可以进行后续实验。

2.3 PAX6 shRNA 病毒载体对 B3 细胞增殖的影响

2.3.1 细胞培养实时观测结果 选择有效靶位点 pGCL-GFP-shRP4 作为 RNA 干扰靶点,使用 pGCL-GFP-shRP1-4 感染 B3 细胞,以 pGCL-GFP-shRP1-NC 作为阴性对照。结果显示:感染 RNAi 病毒组的 B3 细胞,随感染时间延长,细胞数量减少。而感染 NC 病毒组的 B3 细胞,未发生明显改变(图 3)。

2.3.2 流式细胞仪检测结果 借助流式细胞仪检测 PAX6 RNAi 干扰 B3 细胞增殖的作用,干扰 48h 后,收集细胞进行流式细胞仪检测,结果显示敲减 PAX6 48h 以后

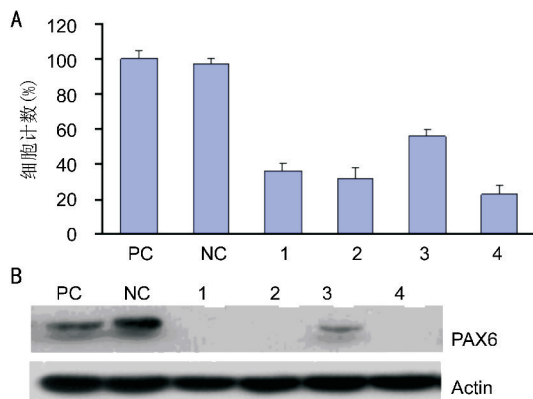


图 1 重组病毒感染细胞 96h 后,检测干扰效率 A:重组病毒感染后 96h,利用 Real-time PCR 检测 PAX6 基因表达水平;B:重组病毒感染后 96h 的 PAX6 蛋白检测。PC:空细胞组;NC:加 NC 干扰载体组;1:pGCL-GFP-shRP1 组;2:pGCL-GFP-shRP2 组;3:pGCL-GFP-shRP3 组;4:pGCL-GFP-shRP4 组。

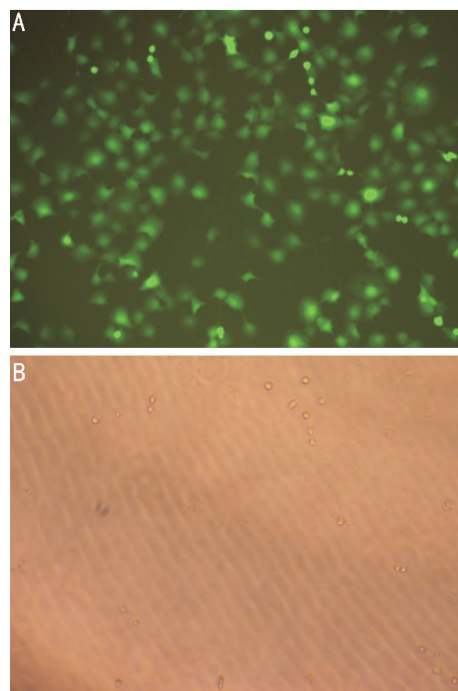


图 2 B3 细胞感染病毒后 24h 的显微观察结果($\times 100$) A:荧光显微镜观察结果;B:显微镜明场观察结果。

的 B3 细胞组, G_1/G_0 期前出现一亚二倍体峰,即凋亡峰,而正常细胞和 NC 组没有这个峰(图 4)。沉默 PAX6 48h 以后的 B3 细胞组的 G_2/M 期比例和 NC 组差别不大,显示出在干扰初期,PAX6 不影响细胞分裂增殖能力。因此,流式细胞仪检测结果表明,PAX6 抑制细胞增殖是通过诱导细胞凋亡导致的。

3 讨论

PAX6 基因的一个基本特征就是出现剂量依赖性的表现型,如果杂合突变存在,就伴随频发的显性性状,被影响的器官可表现为体积减小,人类可出现无虹膜;而纯合突变存在时,则表现为器官缺失^[9];PAX6 在转基因鼠中过度表达也引起了小眼型和光受体的丢失。提示对于眼的正常发育,PAX6 的表达水平是被严格控制的^[10]。我们的实验利用 PAX6 shRNA 慢病毒载体系统,抑制 B3 细胞表达 PAX6,探讨 PAX6 沉默后 B3 细胞的增殖改变。

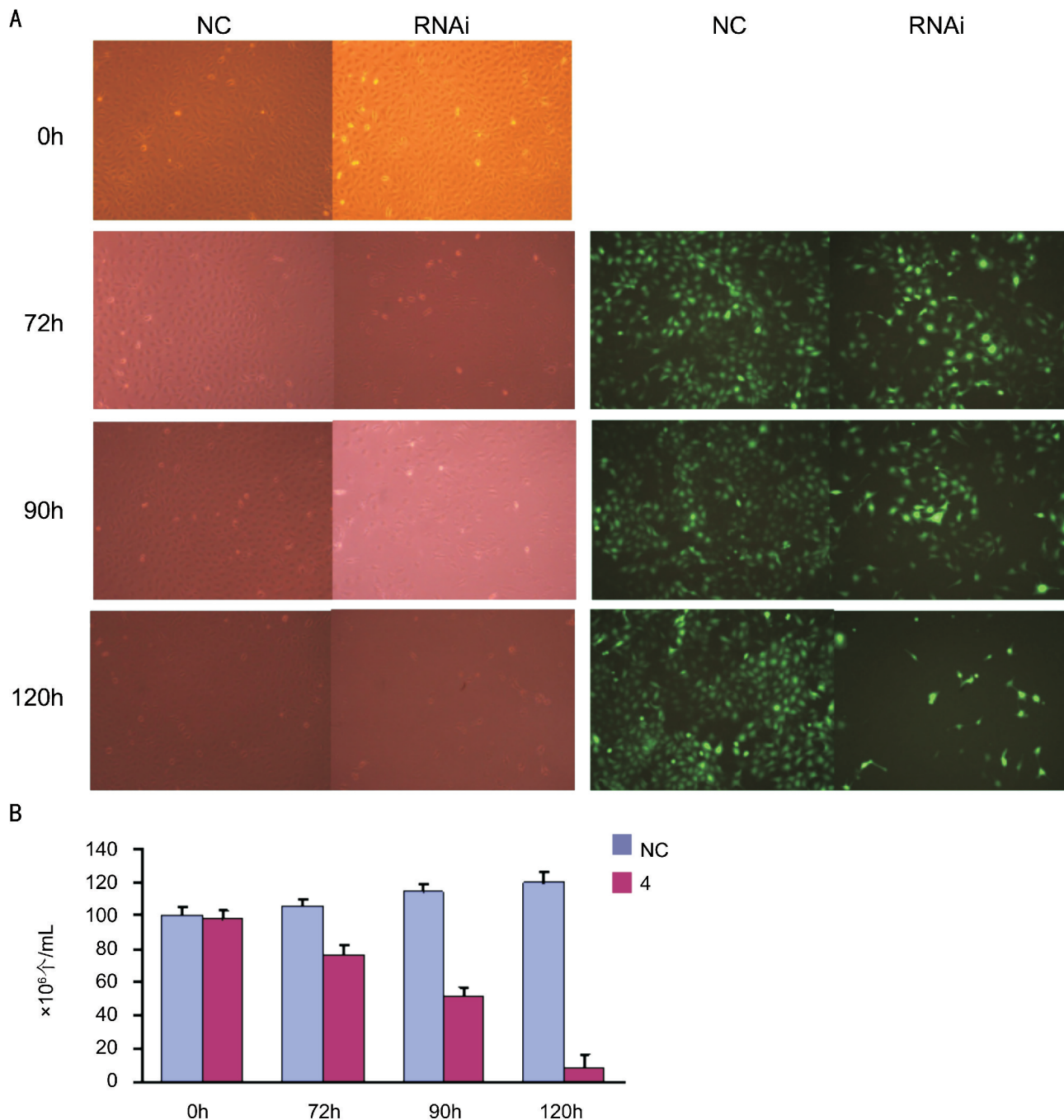


图3 经病毒处理后细胞计数结果 A:细胞处理后在不同时间点显微镜观察结果;B:分别选取5个不同视野进行细胞计数的统计结果。NC:加NC干扰载体组;4:pGCL-GFP-shRP4组。

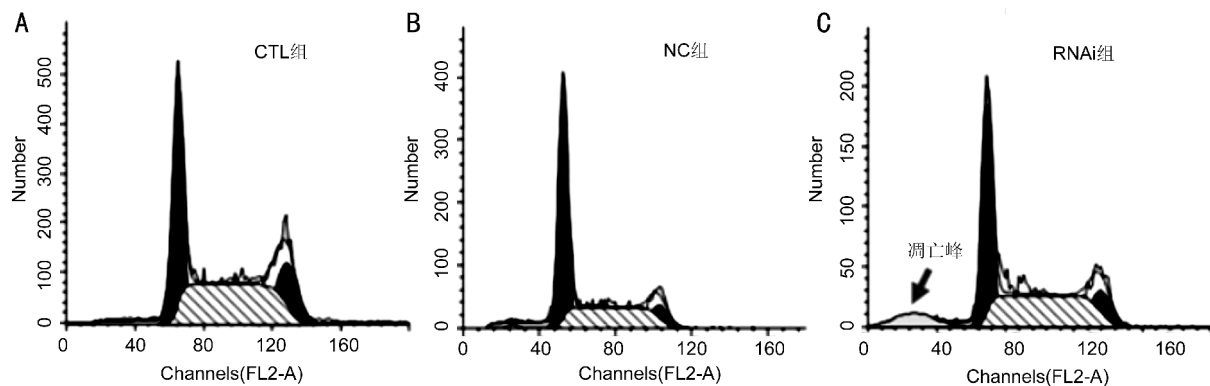


图4 流式细胞仪检测PAX6 RNAi干扰B3细胞48h的分析结果 A:CTL组(空B3细胞组);B:NC组(阴性对照NC慢病毒组);C:RNAi组(加入干扰慢病毒组)。

针对四个候选靶点的 PAX6 RNAi 慢病毒,我们首先对 PAX6 RNAi 有效靶点进行筛选。B3 细胞来源于接受早产儿视网膜病变手术的 5~12 月龄患儿的晶状体上皮细胞,60% 融合率的第 3 代细胞用 AD12-SV40 感染得到 B3 细胞系,该细胞系在培养条件下能传 76 代以上,没有降低增殖能力。PAX6 在增殖的晶状体上皮细胞中高度表达^[9,10]。

我们的研究结果显示,通过 Western-blot 检测,针对不同目标序列选取的 4 个 shRNA 干扰病毒均对 B3 细胞的 PAX6 表达有干扰作用,尤其针对 pGCL-GFP-shRP1, 2, 4 的干扰更是明显,基本完全不表达。Real-time PCR 结果与 Western-blot 结果一致,表明使用 pGCL-GFP-shRP1, 2, 4 可有效沉默 PAX6,而 pGCL-GFP-shRP4 效果更明显。因此选用 pGCL-GFP-shRP4 作为进一步干扰实验的工具。在 B3 细胞感染后的 24h,荧光显微镜观察到绿色荧光,说明慢病毒感染 B3 细胞的效率很高。

我们将重组慢病毒载体与 B3 细胞共培养,B3 细胞增殖受抑制,流式细胞仪结果显示干扰组与对照组对 B3 细胞的分裂能力并没有过多抑制,但是触发了 B3 细胞凋亡,表明 PAX6 沉默会诱导永生化的晶状体上皮细胞凋亡。分析原因,可能是晶状体上皮细胞表达晶状体蛋白,而多种晶状体蛋白基因是 PAX6 的靶基因^[11]。这些基因上有多个 PAX6 的结合位点,PAX6 与其他转录因子如 CREB 或 Ets 共同作用,可调节晶状体蛋白在晶状体中特异表达,由于 PAX6 基因的沉默,从而导致晶状体蛋白的表达异常,而晶状体蛋白的数量降低,一方面不能给细胞本身提供更好的保护(如 α -晶状体蛋白)^[12-14],另一方面还可引发了细胞凋亡程序的发动(如 α B-晶状体蛋白)^[15]。

该研究结果显示 PAX6 的正常表达对于维持 B3 细胞的增殖是必要的,PAX6 表达降低可能导致人眼晶状体细胞增殖异常。提示 PAX6 基因异常可能是无虹膜综合征中晶状体上皮细胞异常进而引起白内障的原因之一,当然这还需要更多的研究工作进一步来证实。由于 PAX6 调控的基因以及调控晶状体蛋白的基因众多,且对其调控机

制尚未彻底阐明,究竟 PAX6 基因的沉默是如何引发 B3 细胞凋亡程序的,还需要作深入研究。

参考文献

- Gehring WJ, Ikeo K. Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet* 1999;15(9):371-377
- Graw J. Eye development. *Curr Top Dev Biol* 2010;90:343-386
- Dansault A, David G, Schwartz C, et al. Three new PAX6 mutations including one causing an unusual ophthalmic phenotype associated with neurodevelopmental abnormalities. *Mol Vis* 2007;13:511-523
- Hanson IM. PAX6 and Congenital Eye Malformations. *Pediatr Res* 2003;54(6):791-796
- Chien YH, Huang HP, Hwu WL, et al. Eye anomalies and neurological manifestations in patients with PAX6 mutations. *Mol Vis* 2009;15:2139-2145
- Kumar K, Tanwar M, Naithani P, et al. PAX6 gene analysis in irido-fundal coloboma. *Mol Vis* 2011;17:1414-1419
- Kokotas H, Petersen MB. Clinical and molecular aspects of aniridia. *Clin Genet* 2010;77:409-420
- Ramaesh K, Ramaesh T, Dutton GN, et al. Evolving concepts on pathogenic mechanisms of aniridia related keratopathy. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37(3): 547-557
- Vincent MC, Pujo AL, Olivier D, et al. Screening for PAX6 gene mutations is consistent with haploinsufficiency as the main mechanism leading to various ocular defects. *Eur J Hum Genet* 2003;11(2):163-169
- Ioanna T, Ian MSW, Isabel MH. PAX6 mutations: genotype - phenotype correlations. *BMC Genetics* 2005; 6(1):27
- Cvekl A, Yang Y, Chauhan BK, et al. Regulation of gene expression by PAX6 in ocular cells: a case of tissue - preferred expression of crystallins in lens. *Int J Dev Biol* 2004;48(8-9):829-844
- Graw J. Genetics of crystallins: cataract and beyond. *Exp Eye Res* 2009;88:173-189
- Bhat SP. Crystallins, genes and cataract. *Prog Drug Res* 2003;60:205-262
- Alge CS, Priglinger SG, Neubauer AS, et al. Retinal pigment epithelium is protected against apoptosis by α B - crystallin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(11):3575-3582
- Pasupuleti N, Matsuyama S, Voss O, et al. The anti - apoptotic function of human α A - crystallin is directly related to its chaperone activity. *Cell Death Dis* 2010;1(3):e31