

· 医学与免疫生物技术 ·

慢病毒介导 CD36 基因沉默细胞株的构建及其对 caveolin-1 蛋白表达的影响

李敬达^{1,2}, 余承洁², 王仁军², 付常振², 修志龙¹, 刘庆平²

1 大连理工大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116024

2 大连大学 生命科学与技术学院 辽宁省糖脂代谢重点实验室, 辽宁 大连 116600

李敬达, 余承洁, 王仁军, 等. 慢病毒介导 CD36 基因沉默细胞株的构建及其对 caveolin-1 蛋白表达的影响. 生物工程学报, 2018, 34(1): 110-121.

Li JD, Yu CJ, Wang RJ, et al. Construction of CD36 gene silencing cell lines by lentivirus-mediated RNA interference and the effect on protein expression of caveolin-1. Chin J Biotech, 2018, 34(1): 110-121.

摘 要: CD36 作为重要的清道夫受体密切参与了巨噬细胞对氧化低密度脂蛋白的摄取作用, 为了进一步研究 CD36 的功能, 本文利用慢病毒介导的 shRNA 干扰技术, 构建了 CD36 基因沉默巨噬细胞 (J774A.1) 株, 并以此为模型分析了 CD36 在 caveolin-1 蛋白表达过程中的作用。首先, 针对 CD36 基因序列设计合成 5 条 shRNA 片段, 并构建得到 pLKO.1-CD36-shRNA 慢病毒干扰载体, 测序鉴定后与 psiCHECK-II-CD36 载体共转染入 293T 细胞中, 筛选出有效的 CD36-shRNA。将慢病毒干扰载体与病毒包装质粒共转染入 293T 细胞, 包装得到慢病毒颗粒, 之后感染 J774A.1 细胞, 经嘌呤霉素筛选后得到 CD36 基因沉默稳转细胞株。Western blotting 及激光共聚焦检测结果表明 CD36 基因沉默效率达 90%, 并且伴随着 CD36 的基因沉默, 与之结合的 DiI-oxLDL 也随之大幅降低, 证明构建成功具有良好生物学活性的 CD36 基因沉默细胞株。最后, 抑制剂处理及 oxLDL 给药刺激实验结果表明, CD36 的基因沉默能够显著降低 JNK 及 ERK 的磷酸化水平, 进而抑制了 caveolin-1 的蛋白表达, 表明 CD36 能够经由 JNK 及 ERK 信号传导调节 caveolin-1 的蛋白表达。

关键词: CD36 受体, shRNA 基因干扰, 氧化低密度脂蛋白, Caveolin-1, 巨噬细胞

Received: March 31, 2017; Accepted: April 20, 2017

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30971232).

Corresponding author: Qingping Liu. Tel: +86-411-87403139; E-mail: qingpingliu40@126.com

国家自然科学基金 (No. 30971232) 资助。

Construction of CD36 gene silencing cell lines by lentivirus-mediated RNA interference and the effect on protein expression of caveolin-1

Jingda Li^{1,2}, Chengjie Yu², Renjun Wang², Changzhen Fu², Zhilong Xiu¹, and Qingping Liu²

¹ School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China

² Key Laboratory of Glucolipid Metabolism in Liaoning Province & College of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian 116600, Liaoning, China

Abstract: CD36, the major scavenger receptor, is intimately involved in the uptake of oxLDL in macrophages. To further study the function of CD36 in macrophages, we constructed CD36 gene silence cell lines (J774A.1) by lentivirus-mediated RNA interference technique, and analyzed the effect of CD36 in caveolin-1 protein expression. At first, 5 shRNA fragments were designed and synthesized according to the coding sequence (CDS) region of CD36 gene. Next, the CD36-shRNA was inserted into lentiviral vector to yield pLKO.1-CD36-shRNA plasmid. After DNA sequencing, the pLKO.1-CD36-shRNA plasmid and psiCHECK-II-CD36 were co-transfected into the 293T cells to screen the efficient CD36-shRNA. The efficient CD36-shRNA plasmid and the helper plasmid were co-transfected into the 293T cells to package the lentivirus, and then infected the J774A.1 cells. After screening by puromycin, CD36 gene silence cell lines (J774A.1) was established. Western blotting and confocal fluorescence microscopy results showed that the CD36 silencing efficiency in the gene silence cell line was 90%. Accompanied by a decrease in CD36 protein on cell surface, oxLDL binding to CD36 was significantly inhibited, indicating that the CD36 gene silence cell line is successfully established. Finally, the oxLDL stimulation and inhibitor experiments results showed that the CD36 knockdown significantly suppresses the phosphorylation of JNK and ERK, thereby inhibiting the oxLDL-induced caveolin-1 protein expression, demonstrating that CD36 modulates the caveolin-1 protein expression through the JNK/ERK-mediated signaling transduction.

Keywords: CD36 receptor, shRNA gene silence, oxidized low density lipoprotein, caveolin-1, macrophage

近年来,动脉粥样硬化 (Atherosclerosis, AS) 所引发的心脑血管疾病已成为导致人类死亡的主要原因^[1-2]。脂类代谢紊乱与慢性炎症反应是动脉粥样硬化发病过程中的重要因素^[1,3-4], 与其相关的主要事件包括: 血管内皮损伤、单核细胞浸润入内皮下转变为巨噬细胞、泡沫细胞的形成、脂质沉积、血小板激活、平滑肌细胞迁移与增生等^[2], 其中独立致病因子氧化低密度脂蛋白 (Oxidized low density lipoprotein, oxLDL) 所诱发的巨噬细胞泡沫化在动脉粥样硬化发病机制中发挥了核心作用^[3-7]。在动脉粥样硬化发生的起始阶段, 单核细胞趋化而来的巨噬细胞能够通过其细胞膜表面的清道夫受体 CD36、SR-AI 等, 大量吞噬血管内膜空间中的 oxLDL, 并以胆固醇酯的形式存储于

细胞中。随着动脉粥样硬化环境的加深, 巨噬细胞摄取胆固醇的速度逐渐加快, 进而引起胆固醇在细胞中的过度积累, 最终导致了巨噬细胞的泡沫化和动脉粥样硬化斑块的形成^[3-7]。

CD36 作为巨噬细胞表面的主要清道夫受体, 介导了约 70% 的 oxLDL 摄取作用^[3-6]。研究显示, CD36 能够特异性识别并结合 oxLDL, 进而启动细胞内的 MAPK (Mitogen-activated protein kinase) 信号传导, 激活 JNK、ERK、p38 蛋白激酶活性, 导致胆固醇过量吞噬摄取以及泡沫细胞的形成^[7-9]。此外, 在 oxLDL 的作用下, CD36 还可经由蛋白激酶 C (Protein kinase C, PKC) 活化核转录因子 NF- κ B 的转录活性, 促进肿瘤坏死因子及白介素-6 等炎症因子的表达及释放, 最终引发血管炎症反应并加

速了动脉粥样硬化进程^[10-13]。

Caveolin-1 作为组成脂筏结构的主要蛋白,密切参与了胆固醇的摄取及细胞内运输作用^[14-18]。之前的研究结果表明,在 caveolin-1 基因敲除小鼠中,CD36 的蛋白表达显著下调,并且停留于细胞内高尔基复合体中,不能定向作用于细胞膜,暗示 caveolin-1 的表达可能是 CD36 到达膜表面发挥摄取功能所必需的因素^[19-20]。为了进一步研究 CD36 在巨噬细胞泡沫化过程中的作用及其与 caveolin-1 的关系,本文以小鼠巨噬细胞 J774A.1 为研究对象,通过慢病毒介导的 shRNA 干扰技术构建了稳定的 CD36 基因沉默细胞株,并以此为模型分析了 CD36 在 caveolin-1 蛋白表达过程中的作用,为后续研究 CD36 功能及巨噬细胞泡沫化的机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

小鼠巨噬细胞 (J774A.1) 和人胚肾细胞 (HEK293T, 后文简称 293T) 购于美国组织培养中心; Anti-CD36 (sc-9154) 抗体购于美国圣克鲁斯公司; Anti-caveolin-1 (610407) 抗体购于 BD 生物公司; Anti-ERK1/2(A0229)、Anti-p-ERK1/2 (AP0472)、Anti-JNK (A0288) 抗体购于 ABClonal 公司; Anti- β -actin (ab8226)、Anti-p-JNK (ab124956) 购于 Abcam 公司; 人源 LDL、DiI-oxLDL 及 DiI-LDL 购于北京协生生物科技有限公司; FITC 及 HRP 标记的山羊抗兔二抗购于 KPL 公司; ERK (PD98059) 及 JNK (SP600125) 生物学抑制剂购于 Calbiochem 公司; psiCHECKTM-II 质粒、双荧光素酶报告基因检测试剂盒及退火缓冲液购于 Promega 公司; pLKO.1 慢病毒 shRNA 表达载体、慢病毒包装载体 psPAX2 及 PMD2.G 购于 Addgene 公司; Lipofectamin 2000、DMEM medium 及 Opti-MEM medium 购于 Invitrogen 公司; RIPA 细胞裂解液、蛋白预染 marker、BCA 蛋白浓度检

测试剂盒及 ECL 显色液购于碧云天生物技术有限公司; JM109 克隆菌, pMD 19-T simple vector, LA Taq 酶, DNA 连接试剂盒, 限制性内切酶 *Xho* I、*Not* I、*Bam*H I, DNA marker DL 2000, DNA 凝胶回收试剂盒, RT-PCR 试剂盒, 质粒提取试剂盒均购自 TaKaRa 公司; 超滤管、PVDF 薄膜、Amp 抗生素及常用试剂均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; PCR 引物合成及 DNA 测序由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 小鼠源 CD36 的 cDNA 基因克隆

根据 GenBank 提供的小鼠源 CD36 的 cDNA 序列, 利用软件 Primer5.0 设计扩增引物。

上游引物 (引物 1): 5'-CCGCTCGAGATGGGCTGTGATCGGAACTG-3'。

下游引物 (引物 2): 5'-ATAGTTTAGCGGCCGCGCCAGTGTATATGTAGGCTCATCC-3'。

其中引物 1 中 5'端含有保护碱基 (斜体)、*Xho* I 酶切位点 (下划线) 以及 CD36 5'端部分氨基酸编码基因序列; 引物 2 中 5'端含有保护碱基 (斜体)、*Not* I 酶切位点 (下划线) 以及 CD36 3'端部分氨基酸编码基因的互补序列。

使用 Trizol 抽提法提取 J774A.1 细胞中的总 RNA, 之后通过 RT-PCR 试剂盒反转录为 cDNA, 并以此为模板, 使用引物 1、2 对 CD36 的 cDNA 基因序列进行 PCR 扩增。反应条件为: 95 °C 预变性 1 min, 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 共 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。PCR 产物经过 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后再由凝胶回收试剂盒回收目的基因, 并连接至 pMD19-T simple vector 中。将连接产物转化至 JM109 感受态菌, 涂布于含有 Ampicillin (50 μ g/mL) 抗性的 LB 平板, 获得的菌落进行 PCR 鉴定, 并挑选阳性克隆扩大培养后送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。测序结果与 GenBank 提供的小鼠 CD36 的 cDNA 序列比对, 鉴定序列正确后将

重组质粒命名为 pMD19-T-CD36。

1.2.2 psiCHECK-II-CD36 重组表达载体的构建及鉴定

将含有 pMD19-T-CD36 及 psiCHECK™-II 质粒的 JM109 克隆菌分别扩大培养并进行质粒提取,用 *Xho* I、*Not* I 对质粒进行双酶切。切胶回收酶切产物 CD36 片段和 psiCHECK™-II 载体片段。使用 DNA 连接试剂盒将二者按照 1:10 的摩尔比,16 °C 连接过夜。连接产物转化入 JM109 感受态细胞,培养过夜后挑选阳性菌落扩大培养并提取质粒,使用 *Xho* I、*Not* I 双酶切鉴定连接情况,将构建成功的重组质粒命名为 psiCHECK-II-CD36。

1.2.3 CD36-shRNA 序列设计及慢病毒干扰载体的构建

根据 GenBank 数据库中小鼠 CD36 基因编码

序列 (登录号: NM 001159558),按照 RNA 干扰序列设计原则使用 Invitrogen 公司在线 shRNA 序列分析设计软件,设计 5 对针对目的基因的 shRNA 干扰序列及一对 Scramble shRNA 对照序列 (表 1)。之后通过 BLAST 同源性搜索分析,确定干扰序列及对照序列的特异性,所设计的序列由生工生物工程 (上海) 股份有限公司负责合成。每对合成的互补 shRNA 序列溶于退火缓冲液中,沸水浴 5 min 后自然冷却到室温。之后通过 DNA 连接试剂盒将退火处理后带有黏性末端的双链干扰序列与经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切的线性化 pLKO.1 慢病毒载体进行连接,连接产物转化感受态细胞 JM109,挑选阳性克隆,进行测序鉴定。测序正确后根据干扰序列靶向位点将重组干扰载体分别命名为 355-shRNA、393-shRNA、992-shRNA、1 325-shRNA、1 329-shRNA 及 scramble-shRNA。

表 1 CD36 的 shRNA 干扰序列设计

Table 1 The design of shRNA sequences for CD36 gene

Start site	GC%	shRNA sequence (DNA)
shRNA-355	52.39	Sense strand: 5'- <u>GATCCGGAGCCATCTTTGAGCCTTCAGAGTACTG</u> TGAAGGCTCAAAGATGGCTCCTTTTTTC-3' Antisense strand: 3'-GCCTCGGTAGAACTCGGAAGTCTCATGAC ACTTCCGAGTTTCTACCGAGGAAAAAAGAGCT-5'
shRNA-393	42.86	Sense strand: 5'- <u>GATCCGGATGACAACCTTCACAGTTCTGAGTACTG</u> AGAACTGTGAAGTTGTCATCCTTTTTTC-3' Antisense strand: 3'-GCCTACTGTTGAAGTGTCAAGACTCATGAC TCTTGACACTTCAACAGTAGGAAAAAAGAGCT-5'
shRNA-992	42.86	Sense strand: 5'- <u>GATCCGCAAATGCAAAGAAGGAAAGCGAGTACTG</u> GCTTTCCTTCTTTGCATTTGCTTTTTTC-3' Antisense strand: 3'-GCGTTTACGTTTCTTCCTTTCGCTCATGAC CGAAAGGAAGAAACGTAAACGAAAAAAGAGCT-5'
shRNA-1 325	52.39	Sense strand: 5'- <u>GATCCGCATGGTAGAGATGGCCTTACGAGTACTG</u> GTAAGGCCATCTCTACCATGCTTTTTTC-3' Antisense strand: 3'-GCGTACCATCTCTACCGGAATGCTCATGAC CATTCCGGTAGAGATGGTACGAAAAAAGAGCT-5'
shRNA-1 329	52.39	Sense strand: 5'- <u>GATCCGGTAGAGATGGCCTTACTTGGGAGTACTG</u> CCAAGTAAGGCCATCTCTACCTTTTTTC-3' Antisense strand: 3'-GCCATCTCTACCGGAATGAACCTCATGAC GGTTCATTCCGGTAGAGATGGAAAAAAGAGCT-5'
shRNA-scramble	52.39	Sense strand: 5'- <u>GATCCGGCCTATTTGGACGAAGAGTGGAGTACTG</u> CACTCTTCGTCCAAATAGGCCTTTTTTC-3' Antisense strand: 3'-GCCGGATAAACCTGCTTCTCACCTCATGAC GTGAGAAGCAGGTTTATCCGAAAAAAGAGCT-5'

1.2.4 有效 CD36-shRNA 序列的筛选

293T 细胞 37 °C、5% CO₂ 条件下贴壁培养于含有 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中。转染前 24 h, 将处于生长对数期的 293T 细胞以每孔 2×10^5 个细胞的密度接种于 24 孔板中。培养过夜后, 待细胞生长至 80%–90% 融合度时, 将 5 种干扰质粒及对照质粒 (Scramble-shRNA) 分别与 psiCHECK- II -CD36 质粒共转染入 293T 细胞中, 转染操作方法参照 Lipofectamin 2000 transfection reagent 使用说明书。转染 48 h 后收集细胞, 使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒及多功能酶标仪测定细胞裂解液中化学发光强度。以单独转染 psiCHECK- II -CD36 质粒作为阴性对照并规定干扰效率为零, 计算其他 shRNA 的干扰效率。

1.2.5 慢病毒的包装与纯化

将处于对数生长期的 293T 细胞以每孔 1×10^6 个细胞的密度接种于 6 孔板中, 培养过夜后, 待细胞融合度为 80%–90% 时, 参照 Lipofectamin 2000 transfection reagent 使用说明书将筛选得到的干扰载体及对照载体 (Scramble-shRNA) 分别与辅助包装载体 psPAX2、pMD2.G 共转染入 293T 细胞中。转染 48 h 后, 离心收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液。上清液经 0.45 μ m 滤膜过滤去除细胞碎片后, 使用 100K 孔径的超滤管, 4 000 r/min 离心 30 min 对毒液进行浓缩。病毒浓缩液分装至 EP 管中, -80 °C 保存备用。

1.2.6 慢病毒感染及 CD36 稳定沉默细胞株的建立

J774A.1 细胞 37 °C、5% CO₂ 条件下贴壁培养于含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中 (另外含有 100 IU/mL 的青霉素、0.1 mg/mL 链霉素 10 mmol/L 碳酸氢钠和 1 mmol/L 丙酮酸钠)。将处于对数生长期的 J774A.1 细胞以每孔 1×10^6 个细胞的密度接种于 6 孔板中。培养 24 h 后, 弃去孔中原有培养基, 向孔中加入 1 mL 含有溴化己二甲胺 (终浓度 8 μ g/mL)

的培养基及 100 μ L CD36-shRNA 病毒浓缩液 (对照细胞组中加入 scramble-shRNA 病毒浓缩液)。由于所选用的 pLKO.1 慢病毒干扰载体的骨架中含有嘌呤霉素抗性基因 (载体基因图谱如图 2 所示), 因此病毒感染 12 h 后, 各孔更换为含有嘌呤霉素抗性 (终浓度 3 μ g/mL) 的培养基对被感染细胞进行筛选。此后每隔 1 d 更换嘌呤霉素抗性培养基继续培养。待细胞生长至 80%–90% 融合度时, 将细胞转接至培养瓶中, 并使用嘌呤霉素抗性培养基持续培养。嘌呤霉素筛选 30 d 后, 采用 Western blotting 及激光共聚焦显微镜对稳转细胞株中 CD36 基因沉默效果进行测定。

1.2.7 Western blotting 分析 CD36 基因沉默效果

使用 RIPA 裂解液分别提取三组细胞 (NCr: 野生型 J774A.1 细胞组; shRNACD36: CD36-shRNA 慢病毒感染细胞组; SCr: Scramble-shRNA 慢病毒感染细胞组) 的全蛋白, 并用 BCA 蛋白检测试剂盒测定各组样品中总蛋白浓度。以每孔 80 μ g 的蛋白量上样, 12% SDS-PAGE 胶对样品进行电泳分离。转膜、封闭后, 抗 CD36 抗体 (1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜。TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min, 之后室温条件下孵育山羊抗兔的二抗稀释液 (1 : 1 000) 1 h。TBST 洗膜后, ECL 显色, 化学发光成像系统分析检测结果。

1.2.8 激光共聚焦显微镜观察细胞膜表面 CD36 基因沉默效果

将处于对数生长期的 3 组细胞 (野生型 J774A.1 细胞组、CD36-shRNA 慢病毒感染细胞组、Scramble-shRNA 慢病毒感染细胞组) 分别以每皿 2.5×10^5 个细胞的密度接种于激光共聚焦小皿中。培养过夜后, 弃去原有培养基, 向小皿中央加入 200 μ L 含有 DiI-oxLDL 或 DiI-LDL (终浓度为 20 μ g/mL) 的新鲜培养基, 37 °C 继续培养 1 h。PBS 清洗细胞 3 次后, 使用 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min, 并用 1% gelatin 与抗 CD16/CD32 抗

体 (1:100) 的混合液封闭细胞 1 h。PBS 洗 3 次后, 加入抗 CD36 抗体 (1:100)。37 °C 孵育 2 h 后, 使用 FITC 标记的抗兔二抗 (1:100), 37 °C 条件下孵育细胞 1 h。孵育结束后 PBS 洗去非特异性结合的二抗, 最后上机检测。

1.2.9 JNK 与 EKR 的特异性抑制剂对 caveolin-1 蛋白表达的影响

将处于对数生长期的 J774A.1 细胞以 1×10^6 个/孔的密度接种于六孔板。过夜培养后, 使用 JNK 或 EKR 的特异性抑制剂 SP600125 (10 $\mu\text{mol/L}$)、PD98059 (10 $\mu\text{mol/L}$) 预处理细胞 30 min, 之后更换含有 oxLDL (终浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$) 的新鲜培养基刺激细胞 12 h。Western blotting 检测抑制剂对 caveolin-1 蛋白表达的影响情况。

1.2.10 Western blotting 检测 CD36 基因沉默对 caveolin-1 蛋白表达的影响

将处于对数生长期的各组细胞 (野生型 J774A.1 细胞组、CD36-shRNA 慢病毒感染细胞组、Scramble-shRNA 慢病毒感染细胞组), 以 1×10^6 个/孔的密度接种于六孔板。过夜培养后, 将各孔中原有培养基更换为含有相应浓度 oxLDL 的培养基, 进行给药刺激处理 (oxLDL 浓度及刺激时间如结果图中所示)。待刺激处理结束后消化收集细胞并提取细胞总蛋白, 之后对样品进行 Western blotting 检测分析。

1.2.11 统计学分析

实验数据均来自至少 3 次重复实验的平均值和标准差 (SE), 所有实验数据两组间比较均经 Student's-test 检验, $**P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠源 CD36 的 cDNA 基因克隆及 psiCHECK-II-CD36 重组表达载体的构建

PCR 扩增得到 CD36 的 cDNA 基因片段经琼

脂糖凝胶电泳分析, 其条带大小与 GenBank 数据库中一致 (图 1A)。将 PCR 产物回收后连接于 pMD19-T simple vector, 并送交生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序, 使用 Sequencer 软件对测序结果进行比对分析, 结果显示目的片段无突变。

将构建成功的 pMD19-T-CD36 载体及 psiCHECK-II 载体分别进行 *Xho* I、*Not* I 双酶切, 之后将目的基因片段连接至载体酶切片段并转化入 JM109 克隆菌中, 涂布于 Ampicillin 抗性平板。挑选平板上阳性菌落扩大培养, 并提取重组质粒进行 *Xho* I、*Not* I 双酶切鉴定。经琼脂糖凝胶电泳分析, 发现酶切片段大小与预期一致 (图 1B), 证明 CD36 的 cDNA 基因片段已克隆至 psiCHECK-II 载体中, 获得 psiCHECK-II-CD36 重组表达载体。

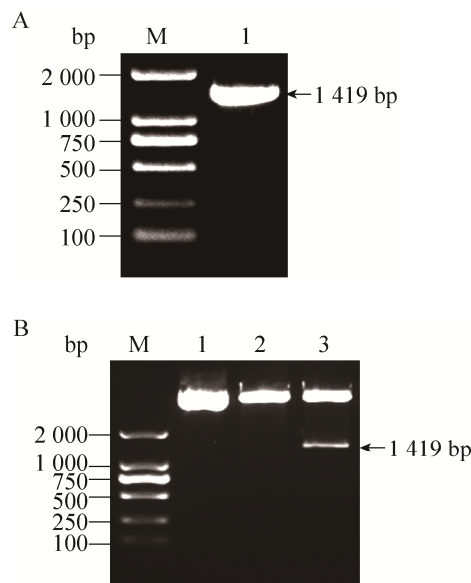


图 1 psiCHECK-II-CD36 载体的构建

Fig. 1 Construction of psiCHECK-II-CD36 vector. (A) Analysis of PCR product of CD36 by agarose gel electrophoresis. M: DL2000 marker; 1: PCR product of CD36 (1 419 bp). (B) Analysis of psiCHECK-II-CD36 vector by restriction enzyme digestion. M: DL2000 marker; 1: psiCHECK-II-CD36 plasmid; 2: digestion of psiCHECK-II-CD36 plasmid by *Xho* I; 3: digestion of psiCHECK-II-CD36 plasmid by *Xho* I and *Not* I.

2.2 CD36-shRNA 慢病毒干扰载体的构建

将设计合成的干扰序列及对照序列进行退火处理,所形成的双链 DNA 片段连接至含有嘌呤霉素抗性的 pLKO.1 载体中(图 2),并转化入 JM109 菌株。挑取阳性克隆菌送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序鉴定。测序结果(略)显示插入序列无碱基突变,证明 CD36-shRNA 慢病毒干扰载体构建成功。

2.3 有效 CD36-shRNA 序列的筛选

由于 J774A.1 细胞为难转染型细胞,因此很难通过瞬时转染的方法筛选获得有效 shRNA。为此,本文使用 Promega 公司的 siCHECK™ 系统对 shRNA 进行筛选。该系统的筛选原理是:psiCHECK™-II 载体同时含有萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶报告基因,当目的基因插入到海肾荧光素酶基因下游多克隆位点时,能够形成海肾荧光素酶基因与目的基因的融合序列。将含有目的基因的 psiCHECK™-II 重组载体与 shRNA 干扰载体共转染入 293T 细胞后,萤火虫荧光素酶基因及融合序列得以转录。如果设计的 shRNA 为无效序列,则融合序列中海肾荧光素酶可被翻译。

如果 shRNA 为有效序列,则能够启动干扰机制降解融合序列,导致融合序列中海肾荧光素酶基因无法翻译,降低海肾荧光素酶的活性,从而达到筛选有效 shRNA 的目的(有关 shRNA 筛选的详细原理、方法及步骤参照 Promega 公司 siCHECK™ vectors 及 Dual-Luciferase® reporter assay system 产品说明书)。本文中将 5 条 CD36-shRNA 慢病毒干扰载体及对照载体分别与 psiCHECK™-II-CD36 质粒共转染入 293T 细胞中。转染 48 h 后,收集细胞,使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒及多功能酶标仪测定化学发光并计算干扰效率。结果如图 3 所示,与 Blank 对照(未经转染的 293T 细胞)及 SCr 对照(转染 scramble-shRNA 的 293T 细胞)相比,1325-shRNA 干扰效果最好,CD36 的 mRNA 表达水平降低了 97%,可作为有效 CD36 基因沉默干扰序列。

2.4 CD36 基因沉默细胞株的鉴定

使用制备好的 CD36-shRNA 及 scramble-shRNA 慢病毒颗粒分别感染 J774A.1 细胞。之后通过嘌呤霉素筛选出具有抗性的 CD36 基因沉默细胞株及对照细胞株(Scramble-shRNA),并通

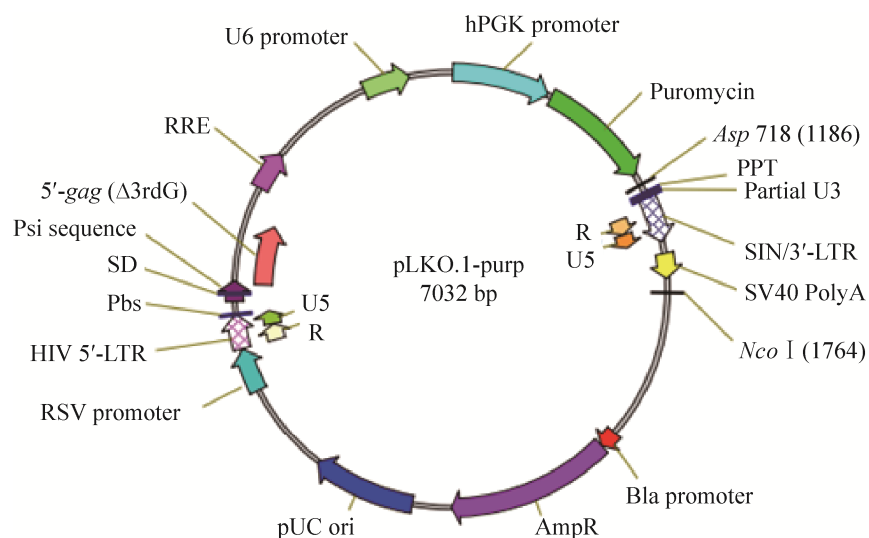


图 2 pLKO.1 载体基因图谱

Fig. 2 Map of the pLKO.1 vector.

过 Western blotting 检测各组细胞中 CD36 蛋白表达水平。结果如图 4A 所示, 与野生型 J774A.1 细胞 (NCr) 及 scramble-shRNA 对照细胞 (SCr) 相比, CD36 基因沉默细胞 (shCD36) 中 CD36 蛋白表达水平大幅降低。进一步的激光共聚焦结果显示 (图 4B), 基因沉默细胞株细胞膜表面上的 CD36 (绿色) 及结合的 DiI-oxLDL (红色) 含量较野生型 J774A.1 细胞及 scramble-shRNA 对照细胞明显减少, 并且随着 CD36 的基因沉默, 与 CD36 相结合的 DiI-oxLDL (黄色) 的数量也大幅降低。上述结果表明成功构建了具有生物学活性的 CD36 基因沉默巨噬细胞株。

2.5 oxLDL 刺激作用对 caveolin-1 蛋白表达的影响

Caveolin-1 作为脂筏结构中的主要蛋白, 在

巨噬细胞对 oxLDL 的摄取及细胞内胆固醇的转运过程中发挥了关键作用^[14-18]。研究显示, 在巨噬细胞中 caveolin-1 的蛋白表达受 MAPK 蛋白激

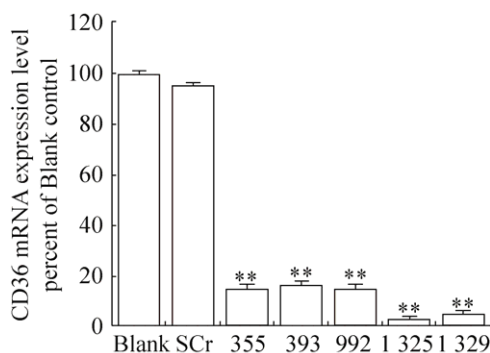


图 3 有效 shRNA 的筛选

Fig. 3 The screening of efficient shRNA. ** $P < 0.01$ versus the Blank control group.

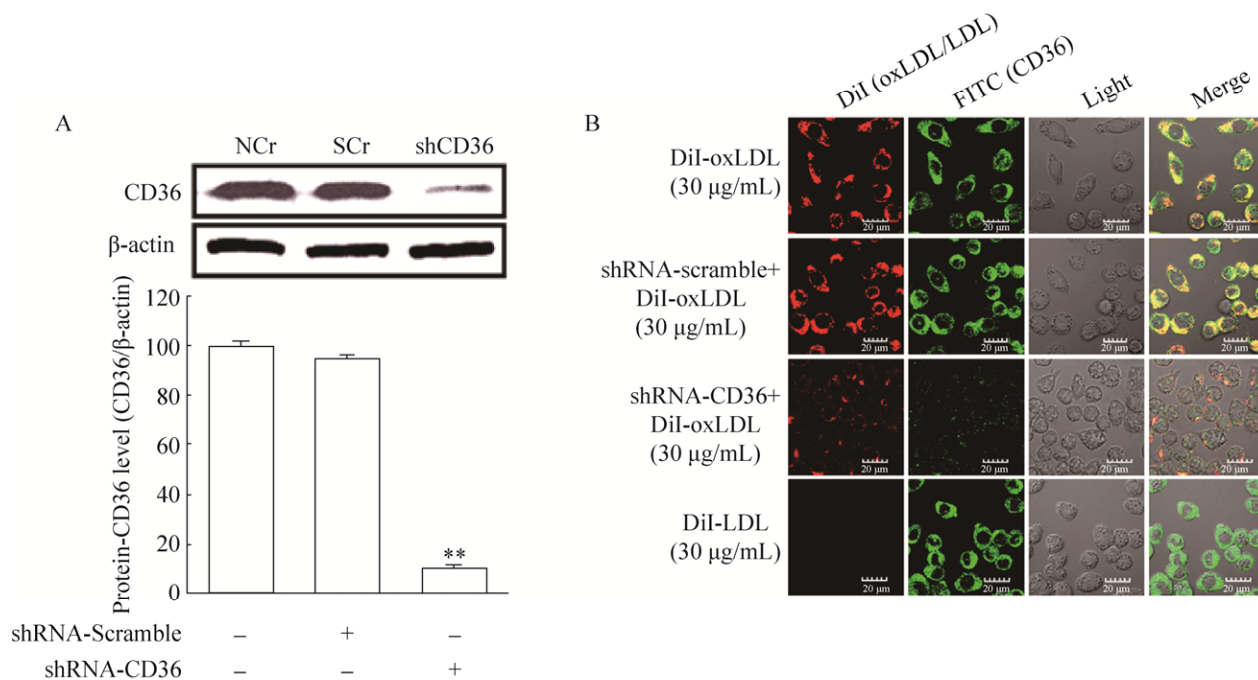


图 4 CD36 基因沉默效率分析

Fig. 4 CD36 silencing efficiency assays. (A) The CD36 silencing efficiency assays by Western blotting (NCr: wild J774A.1 cells; SCr: scramble-shRNA infection control; shCD36: CD36-shRNA infection control, ** $P < 0.01$ versus the SCr control group). (B) The CD36 silencing efficiency assays by confocal microscopy.

酶家族成员 JNK 及 ERK 的调控^[21]。本文以 J774A.1 巨噬细胞为研究对象,观察了 oxLDL 的刺激作用对巨噬细胞 caveolin-1 蛋白表达的影响。结果如图 5A-B 所示,在不同浓度及不同时间的 oxLDL 刺激下, J774A.1 巨噬细胞中 caveolin-1 蛋白表达显著上调,且上调作用呈浓度及作用时间依赖性。当使用 30 $\mu\text{g/mL}$ oxLDL 刺激细胞 12 h 后, caveolin-1 的蛋白表达水平达到顶峰,较未刺激组升高 3.25 倍 (** $P<0.01$)。此外, oxLDL 的刺激作用能够明显上调蛋白激酶 JNK 及 ERK 的磷酸化水平 (图 6A)。进一步的抑制剂实验结果显示,使用 SP600125 (JNK) 与 PD98059 (ERK) 抑制剂预处理 J774A.1 细胞能够显著抑制 oxLDL 诱导的 caveolin-1 蛋白表达上调作用 (图 6B)。与对照组相比, SP600125 组、PD98059 组及联合处理组的 caveolin-1 蛋白表达分别下调了 60%、45% 和 70% (** $P<0.01$)。以上结果表明 oxLDL 能够通过 JNK/ERK 信号传导上调 caveolin-1 的表达。

2.6 CD36 基因沉默对 caveolin-1 蛋白表达的影响

为了进一步研究 CD36 基因沉默对 caveolin-1 蛋白表达的影响,我们使用 30 $\mu\text{g/mL}$ oxLDL 分别刺激野生型 J774A.1 细胞 (NCr)、scramble-shRNA 对照细胞 (SCr) 及 CD36 沉默细胞 (shCD36) 12 h。Western blotting 结果显示 (图 7A), CD36 的基因沉默能够显著性抑制 oxLDL 诱导的 caveolin-1 蛋白表达。与 NCr 对照组 (野生型 J774A.1 细胞) 及 SCr 对照组 (Scramble-shRNA 感染细胞) 相比, CD36 基因沉默细胞中 oxLDL 诱导的 caveolin-1 蛋白表达降低了 70% (** $P<0.01$)。此外,使用 30 $\mu\text{g/mL}$ oxLDL 分别刺激处理各组细胞 30 min 后发现, CD36 的基因沉默能够明显抑制 oxLDL 诱导的 MAPK 蛋白激酶 JNK 及 ERK 的磷酸化作用 (图 7B)。以上结果表明,在 oxLDL 的刺激作用下, CD36 能够激活巨噬细胞内 MAPK 蛋白激酶 JNK 及 ERK 的磷酸化,从而上调了 caveolin-1 的蛋白表达。

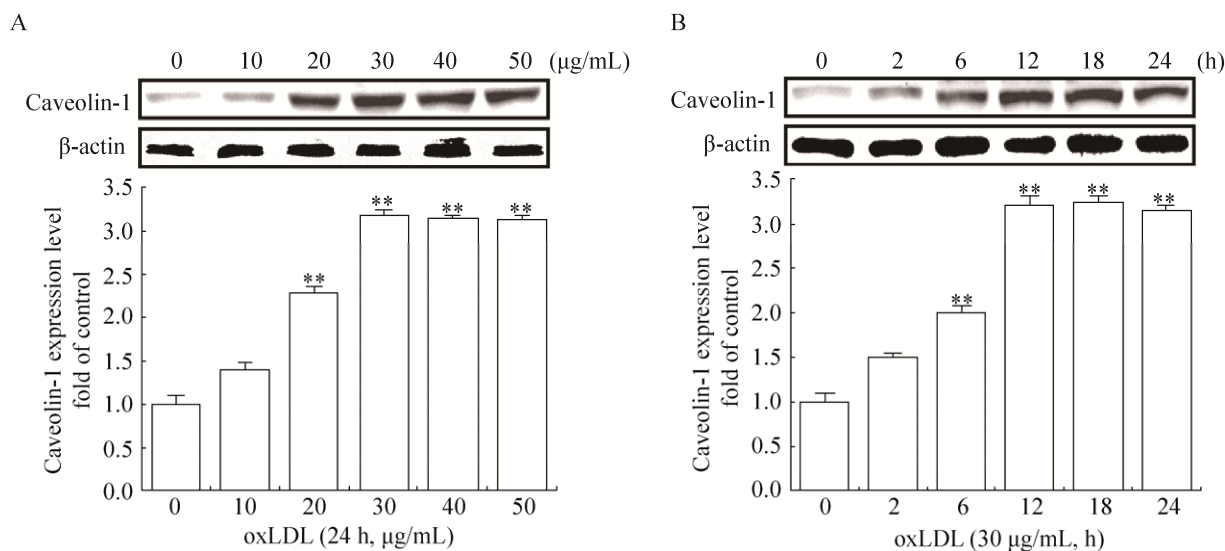


图 5 oxLDL 浓度及时间梯度作用对 caveolin-1 蛋白表达的影响

Fig. 5 The dose-dependent and time-dependent effects of oxLDL in caveolin-1 protein expression. (A) The dose-dependent effect of oxLDL in caveolin-1 protein expression. (B) The time-dependent effects of oxLDL in caveolin-1 protein expression (** $P<0.01$ versus the untreated group).

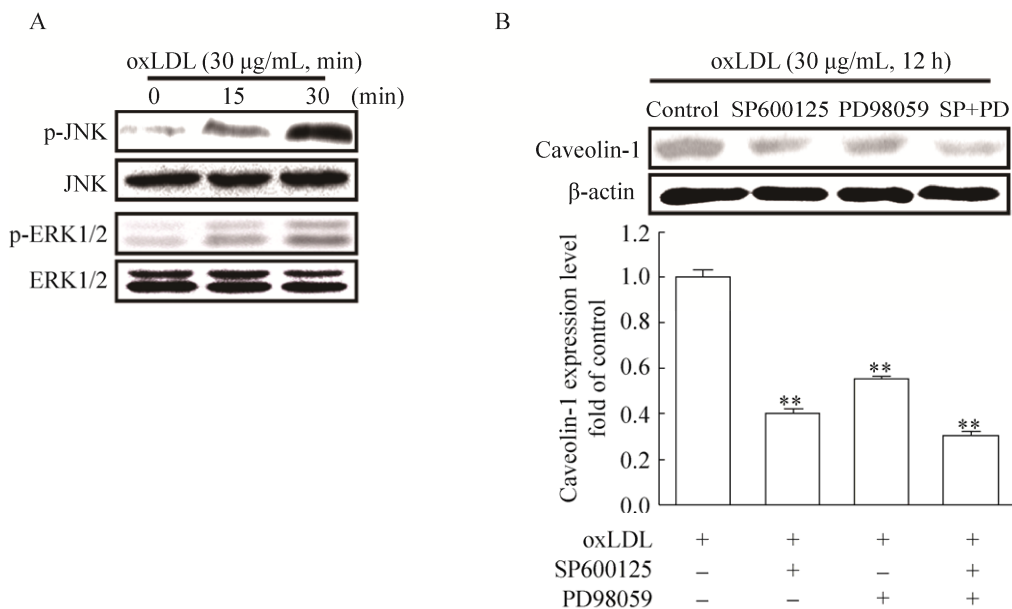


图 6 oxLDL 经由 JNK 及 ERK 信号通路上调 caveolin-1 的蛋白表达

Fig. 6 oxLDL upregulate caveolin-1 protein expression through the JNK/ERK-mediated signal pathway. (A) oxLDL upregulate the phosphorylation level of JNK and ERK. (B) The effects of the inhibitors for JNK and ERK in caveolin-1 protein expression (** $P<0.01$ versus the untreated control group).

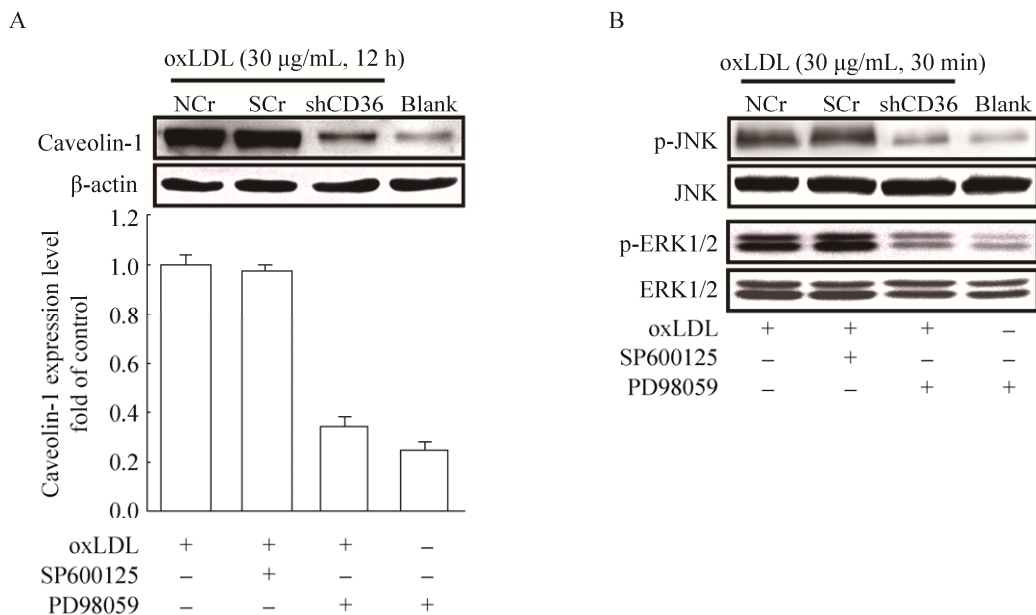


图 7 CD36 经由 JNK/ERK 信号通路调控 caveolin-1 的蛋白表达

Fig. 7 CD36 modulates the caveolin-1 protein expression through the JNK/ERK-mediated signal pathway. (A) The effect of CD36 in the oxLDL-induced caveolin-1 protein expression. (B) The effect of CD36 in the oxLDL-induced JNK and ERK phosphorylation (NCr: wild J774A.1 cells; SCr: scramble-shRNA infection control; shCD36: CD36-shRNA infection control; Blank: the CD36-shRNA infection cell without oxLDL stimulation, ** $P<0.01$ versus the SCr control group).

3 讨论

巨噬细胞的泡沫化是动脉粥样硬化发生与发展的核心环节,目前认为巨噬细胞泡沫化的主要机制包括:胆固醇摄入过多,细胞内胆固醇转运异常、胆固醇过度堆积和胆固醇流出受阻等^[4-6]。清道夫受体 CD36 密切参与了巨噬细胞的泡沫化过程,贡献了大约 60%–70%的胆固醇酯聚集^[3-6]。Rahaman 等的研究结果显示,CD36 能够启动细胞内 MAPK 信号传导通路,活化蛋白激酶 JNK 及 ERK,促进胆固醇的摄入作用^[7-8]。此外,CD36 还能够通过 PKC 及 p38 等蛋白激酶激活过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (Peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) 的转录活性,上调胆固醇酰基转移酶 1 (Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 1, ACAT1)及自身的蛋白表达,加速了胆固醇的脂化及积累作用,最终导致巨噬细胞泡沫化的形成^[1,4]。综上所述,CD36 所介导的细胞信号传导通路,在巨噬细胞泡沫化过程中发挥了至关重要的作用。

Caveolin-1 作为构成脂筏结构的关键蛋白,协同参与了 CD36 介导的胆固醇摄取过程。研究发现,CD36 受体蛋白在细胞膜表面主要定位于由 caveolin-1 参与组成的胞膜窖 (Caveolea) 结构中,而 caveolin-1 的基因沉默能够显著阻止 CD36 由高尔基复合体向细胞膜的运输作用,进而抑制了由 CD36 介导的胆固醇摄取作用及相关信号传导的发生^[20,22]。同时,在 caveolin-1 基因敲除小鼠中,动脉粥样硬化的程度明显减弱,表明 caveolin-1 的表达能够明显促进动脉粥样硬化的发生^[19]。

巨噬细胞中 caveolin-1 的蛋白表达受 MAPK 蛋白激酶 JNK 及 ERK 的调节^[21],而 CD36 能够调节 JNK 与 ERK 的活性,暗示 CD36 受体与 caveolin-1 的蛋白表达可能存在着密切的调控关系。为了进一步研究 CD36 的功能及其在调控 caveolin-1 蛋白表达过程中的作用,我们构建了

CD36 基因沉默巨噬细胞模型。由于 J774A.1 巨噬细胞为难转染型细胞,因此通过普通的瞬时转染技术很难获得高效稳定的基因沉默细胞株。鉴于慢病毒系统在实际应用过程中的优势,本文选择使用慢病毒介导的 shRNA 干扰技术进行 CD36 基因沉默细胞模型的构建。首先我们设计合成了 5 条针对 CD36 的 shRNA 干扰序列,并将其构建入慢病毒干扰载体中,之后使用 Promega 公司的 siCHECKTM 系统筛选得到有效的 CD36-shRNA 干扰序列。将慢病毒干扰载体与病毒包装质粒共转染入 293T 细胞,包装得到慢病毒颗粒。慢病毒感染 J774A.1 细胞后,经嘌呤霉素筛选获得稳定的 CD36 基因沉默细胞株。Western blotting 检测证实 CD36 基因沉默细胞株中 CD36 的干扰效率可达 90%,进一步的激光共聚焦结果显示,基因沉默细胞株表面上的 CD36 含量显著减少,并且随着 CD36 的基因沉默,与之相结合的 DiI-oxLDL 数量也大幅降低,证明构建得到的 CD36 基因沉默巨噬细胞株具有良好的生物学活性。之后我们以此为平台研究了 CD36 在 caveolin-1 蛋白表达过程中的作用。我们的结果显示,CD36 的基因沉默显著降低 caveolin-1 上游的 MAPK 蛋白激酶 JNK 及 ERK 的磷酸化水平,进而抑制了 caveolin-1 的蛋白表达,证明 CD36 能够经由 JNK 及 ERK 信号传导调节 caveolin-1 的蛋白表达。考虑到 caveolin-1 在巨噬细胞泡沫化过程中的促进作用,结合本研究的结果,我们推测 CD36 作为巨噬细胞表面重要的受体分子,除能够直接参与 oxLDL 的摄取作用外,还可通过启动细胞内 MAPK 细胞信号传导上调 caveolin-1 的蛋白表达,进一步加速细胞泡沫化的进程。本研究首次揭示了 CD36 在 oxLDL 诱导的 caveolin-1 蛋白表达过程中的作用,为全面了解巨噬细胞脂代谢通路以及今后以此为靶点研究治疗动脉粥样硬化的策略奠定了理论基础。

REFERENCES

- [1] Yu XH, Fu YC, Zhang DW, et al. Foam cells in atherosclerosis. *Clin Chim Acta*, 2013, 424: 45–252.
- [2] Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*, 2011, 17(11): 1410–1422.
- [3] Collot-Teixeira S, Martin J, McDermott-Roe C, et al. CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, 2007, 75(3): 468–477.
- [4] Chistiakov DA, Bobryshev YV, Orekhov AN. Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(1): 17–28.
- [5] Nicholson AC, Hajjar DP. CD36, oxidized LDL and PPAR γ : pathological interactions in macrophages and atherosclerosis. *Vasc Pharmacol*, 2004, 41(4/5): 139–146.
- [6] Nicholson AC. Expression of CD36 in macrophages and atherosclerosis the role of lipid regulation of PPAR γ signaling. *Trends Cardiovasc Med*, 2004, 14(1): 8–12.
- [7] Rahaman SO, Lennon DJ, Febbraio M, et al. A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab*, 2006, 4(3): 211–221.
- [8] Li WZ, Wang D, Chi Y, et al. 7-Ketocholesteryl-9-carboxynonanoate enhances the expression of ATP-binding cassette transporter A1 via CD36. *Atherosclerosis*, 2013, 226(1): 102–109.
- [9] Feng JW, Han JH, Pearce SFA, et al. Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR- γ . *J Lipid Res*, 2000, 41(5): 688–696.
- [10] Park YM. CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Exp Mol Med*, 2014, 46(6): e99.
- [11] Kunz A, Abe T, Hochrainer K, et al. Nuclear factor- κ B activation and postischemic inflammation are suppressed in CD36-null mice after middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci*, 2008, 28(7): 1649–1658.
- [12] Xie CH, Ng H, Nagarajan S. OxLDL or TLR2-induced cytokine response is enhanced by oxLDL-independent novel domain on mouse CD36. *Immunol Lett*, 2011, 137(1/2): 15–27.
- [13] Zhao M, Liu YW, Wang XF, et al. Activation of the p38 MAP kinase pathway is required for foam cell formation from macrophages exposed to oxidized LDL. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*, 2002, 110(6): 458–468.
- [14] Auriac A, Willemetz A, Canonne-Hergaux F. Lipid raft-dependent endocytosis: a new route for hepcidin-mediated regulation of ferroportin in macrophages. *Haematologica*, 2010, 95(8): 1269–1277.
- [15] Sowa G. Caveolae, caveolins, cavins, and endothelial cell function: new insights. *Front Physiol*, 2012, 2: 120.
- [16] Frank PG, Cheung MWC, Pavlides S, et al. Caveolin-1 and regulation of cellular cholesterol homeostasis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291(2): H677–H686.
- [17] Ikonen E, Parton RG. Caveolins and cellular cholesterol balance. *Traffic*, 2000, 1(3): 212–217.
- [18] Gargalovic P, Dory L. Caveolins and macrophage lipid metabolism. *J Lipid Res*, 2003, 44(1): 11–21.
- [19] Frank PG, Marcel YL, Connelly MA, et al. Stabilization of caveolin-1 by cellular cholesterol and scavenger receptor class B type I. *Biochemistry*, 2002, 41(39): 11931–11940.
- [20] Frank PG, Lee H, Park DS, et al. Genetic ablation of caveolin-1 confers protection against atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(1): 98–105.
- [21] Wu CC, Wang SH, Kuan II, et al. OxLDL upregulates caveolin-1 expression in macrophages: role for caveolin-1 in the adhesion of oxLDL-treated macrophages to endothelium. *J Cell Biochem*, 2009, 107(3): 460–472.
- [22] Eyre NS, Cleland LG, Tandon NN, et al. Importance of the carboxyl terminus of FAT/CD36 for plasma membrane localization and function in long-chain fatty acid uptake. *J Lipid Res*, 2007, 48(3): 528–542.

(本文责编 陈宏宇)