

[文章编号] 1671-587X(2024)03-0831-09

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240330

EIF4A3 shRNA 慢病毒载体的构建及其稳定转染细胞系的建立

何嘉文^{1,2}, 李友^{1,2}, 廖科棋², 李胜男^{1,2}

(1. 广东医科大学 广东省衰老相关心脑血管疾病重点实验室, 广东 湛江 524002; 2. 广东医科大学 附属医院神经病学研究所, 广东 湛江 524002)

[摘要] **目的:** 构建真核细胞翻译起始因子4A3 (EIF4A3)-短发夹RNA (shRNA) 慢病毒载体, 建立 Neuro-2a-EIF4A3-shRNA 稳定转染细胞系。**方法:** 通过美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库检索 EIF4A3 基因序列, 设计并合成 PCR 鉴定引物, 并将其连接至经 *EcoR* I 和 *Age* I 酶切的慢病毒 GV493 载体, 构建 GV493-EIF4A3-shRNA 慢病毒质粒, PCR 筛选阳性克隆并测序鉴定。将 GV493 空载质粒和 GV493-EIF4A3-shRNA 重组质粒分别转染至 HEK293T 细胞中, 分别为 GV493 对照慢病毒和 GV493-EIF4A3-shRNA 慢病毒, 转染 48 h 后收集慢病毒进行包装并测定病毒滴度。将 Neuro-2a 细胞分为空白组、GV493 对照组和 GV493-EIF4A3 shRNA 组, 空白组不作处理, GV493 对照组和 GV493-EIF4A3 shRNA 组分别采用相应慢病毒感染 Neuro-2a 细胞, 慢病毒感染复数 (MOI) 为 100, 使用 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 嘌呤霉素筛选成功感染慢病毒的 Neuro-2a 细胞, 荧光显微镜观察各组 Neuro-2a 细胞的生长状态和绿色荧光表达情况; 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法和 Western blotting 法检测各组 Neuro-2a 细胞中 EIF4A3 mRNA 及蛋白表达水平。**结果:** PCR 测序结果显示 GV493-EIF4A3-shRNA 重组质粒基因序列与设计合成的 EIF4A3-shRNA 序列一致, 成功构建 GV493-EIF4A3 慢病毒载体。荧光显微镜观察可见 HEK293T 细胞荧光表达强烈, 生长状态良好, 慢病毒包装成功。GV493-对照慢病毒和 GV493-EIF4A3-shRNA 慢病毒的滴度均为 $2\times 10^8\text{ TU}\cdot\text{mL}^{-1}$, GV493 对照组和 GV493-EIF4A3 shRNA 组 Neuro-2a 细胞生长状态良好且表达绿色荧光, 表明慢病毒感染稳定细胞系构建成功。RT-qPCR 法, 与空白组和 GV493 对照组比较, GV493-EIF4A3 shRNA 组 Neuro-2a 细胞 EIF4A3 mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.01$)。Western blotting 法, 各组在相对分子质量 49 000 处出现特异性条带, 提示 Neuro-2a 细胞中 EIF4A3 蛋白表达成功; 与空白组和 GV493 对照组比较, GV493-EIF4A3 shRNA 组 Neuro-2a 细胞中 EIF4A3 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$)。**结论:** 成功构建 GV493-EIF4A3-shRNA 慢病毒载体, 建立了 Neuro-2a-EIF4A3-shRNA 稳定转染细胞系, 为 EIF4A3 在颅内动脉粥样硬化的作用机制研究提供了参考。

[关键词] 真核细胞翻译起始因子4A3; 短发夹RNA; 慢病毒; 稳定转染细胞系; Neuro-2a细胞

[中图分类号] R392 **[文献标志码]** A

Construction of EIF4A3 shRNA lentiviral vector and establishment of its stable transfection cell line

HE Jiawen^{1,2}, LI You^{1,2}, LIAO Keqi², LI Shengnan^{1,2}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Age-Related Cardiac and Cerebral Diseases, Guangdong

[收稿日期] 2023-06-28

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81571157); 广东省卫生厅医学科研基金项目 (A2022139, A2023193); 湛江市科学技术局科技攻关计划项目 (2021B01370)

[作者简介] 何嘉文 (1998—), 男, 湖南省郴州市人, 在读硕士研究生, 主要从事脑血管疾病发病机制方面的研究。

[通信作者] 李友, 研究员, 硕士研究生导师 (E-mail: youli805@163.com);

李胜男, 助理研究员 (E-mail: nancylee@gdmu.edu.cn)

Medical University, Zhanjiang 524002, China; 2. Institute of Neurology, Affiliated Hospital, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524002, China)

ABSTRACT Objective: To construct the eukaryotic cell translation initiation factor 4A3 (EIF4A3) short hairpin RNA (shRNA) lentiviral vector, and to establish the Neuro-2a-EIF4A3-shRNA stable transfection cell line. **Methods:** The EIF4A3 gene sequence was retrieved from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database; the PCR identification primers were designed and synthesized, and connected to the lentiviral GV493 vector digested with *EcoR* I and *Age* I enzymes to construct the GV493-EIF4A3-shRNA lentiviral plasmid; PCR method was used to screen the positive clones, which were sequenced for the identification; the GV493 empty plasmid and GV493-EIF4A3-shRNA recombinant plasmid were transfected into the HEK293T cells, regarded as GV493 control lentivirus and GV493-EIF4A3-shRNA lentivirus, respectively. After 48 h of transfection, the lentiviruses were collected for packaging and the viral titer was determined. The Neuro-2a cells were divided into blank group, GV493 control group, and GV493-EIF4A3 shRNA group. The Neuro-2a cells in blank group were untreated, and the Neuro-2a cells in GV493 control group and GV493-EIF4A3 shRNA group were infected with the respective lentiviruses at a multiplicity of infection (MOI) of 100. The infected Neuro-2a cells were selected by $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ puromycin, and the growth status and green fluorescence expression of the Neuro-2a cells in various groups were observed under fluorescence microscope; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting methods were used to detect the expression levels of EIF4A3 mRNA and protein in the Neuro-2a cells in various groups. **Results:** The PCR sequencing results showed that the gene sequence of the GV493-EIF4A3-shRNA recombinant plasmid was consistent with the designed EIF4A3-shRNA sequence, indicating successful construction of the GV493-EIF4A3 lentiviral vector. The fluorescence microscope observation results showed that there was strong fluorescence expression and good growth status in the HEK293T cells, confirming successful lentiviral packaging. The viral titers for GV493 control lentivirus and GV493-EIF4A3-shRNA lentivirus both were $2 \times 10^8 \text{ TU} \cdot \text{mL}^{-1}$. The growth status of the Neuro-2a cells in GV493 control group and GV493-EIF4A3 shRNA group was good, and they expressed green fluorescence, indicating successful construction of the stable transfection cell line. The RT-qPCR results showed that compared with blank group and GV493 control group, the expression level of EIF4A3 mRNA in the cells in GV493-EIF4A3 shRNA group was significantly decreased ($P < 0.01$). The Western blotting results showed that the specific bands was at a relative molecular mass of 49 000, indicating successful EIF4A3 protein expression in the Neuro-2a cells. Compared with blank group and GV493 control group, the expression level of EIF4A3 protein in the cells in GV493-EIF4A3 shRNA group was significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** The GV493-EIF4A3-shRNA lentiviral vector is successfully constructed, and the Neuro-2a-EIF4A3-shRNA stable transfection cell line is established; the results provide the reference for the study of the effect of EIF4A3 on the intracranial atherosclerosis.

KEYWORDS Eukaryotic translation initiation factor 4A3; Short hairpin RNA; Lentivirus; Stable transfection cell line; Neuro-2a cell

真核细胞翻译起始因子4A (eukaryotic translation initiation factor 4A, EIF4A) 3蛋白属于广泛的DEAD box RNA解旋酶家族,其成员凭借其RNA结合能力和三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)酶活性参与RNA代谢的多个方面。EIF4A蛋白主要有3个类型,EIF4A1和EIF4A2主要在脊椎动物细胞质中表达,而

EIF4A3则主要定位于细胞核。尽管3个类型高度相似,但在mRNA的生命周期中具有不同的作用,其特殊和多样的功能常被相互作用的伴侣蛋白调节及支配^[1]。EIF4A1和EIF4A2均参与翻译的起始过程。EIF4A3蛋白在RNA代谢中起重要作用,包括mRNA定位、导出及mRNA剪接和翻译的偶联^[2-4]。EIF4A3与EIF4A1和EIF4A2具有相同的

ATP酶活性, 但EIF4A3自身无解旋酶活性, 也不参与翻译的启动^[5]。EIF4A3在多种人类恶性肿瘤中表达。研究^[6]显示: EIF4A3刺激环状二磷酸腺苷核糖基化因子鸟苷酸激酶1 (circ adenosine diphosphate ribosylation factor guanylate kinase 1, ASAP1) 表达, 通过细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 信号通路促进胶质母细胞瘤的发展。在肝细胞癌中, EIF4A3沉默抑制细胞增殖、迁移和上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[7-8]。研究^[9]显示: 在上皮性卵巢癌细胞中, EIF4A3结合癌易感性候选基因2 (cancer susceptibility candidate 2, CASC2) 增强细胞活性和细胞凋亡、迁移及侵袭, EIF4A3敲低会增加细胞凋亡。在宫颈癌中, 人类环状RNA (human_circ RNA, hsa_circ)_0101119可促进细胞增殖、迁移和侵袭, 并通过与EIF4A3相互作用抑制宫颈癌的细胞凋亡, 以抑制转录延伸因子A样蛋白6 (transcription elongation factor A like 6, TCEAL6) 表达^[10-11]。在心血管疾病方面, EIF4A3诱导的环状B淋巴细胞瘤2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) /腺病毒E1B 19 kDa结合蛋白3 (Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3, BNIP3), 通过非编码单链微小RNA (micro RNA, miR)-27a-3p/BNIP3通路加剧低氧诱导的心肌细胞损伤^[12]。研究^[13]显示: hsa_circ_0030042通过抑制EIF4A3与重组人自噬效应蛋白1 (recombinant human autophagy-related protein, Beclin 1) 和人叉头框蛋白O1 (human forkhead Box protein O1, FOXO1) 结合, 加剧小鼠斑块的不稳定性。研究^[14]证实: EIF4A3诱导的环状RNA (circ RNA, circ)_0086296通过miR-576-3p/干扰素诱导蛋白与四肽重复1 (interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1, IFIT1) /信号转导与转录激活因子1 (signal transduction and activator of transcription 1, STAT1) 反馈回路增强人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, hUVECs) 的动脉粥样硬化病变表型。但目前EIF4A3在颅内动脉粥样硬化中的作用机制尚不明确。本研究构建EIF4A3-短发夹RNA (short hairpin RNA, shRNA) 慢病毒载体, 建立Neuro-2a-EIF4A3-shRNA稳定转染细胞系, 为探讨EIF4A3在颅内动脉粥样硬化中的作用机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 小鼠神经瘤母细胞系 (Neuro-2a) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 人胚肾细胞 (HEK293T) 购自中国科学院上海细胞所。慢病毒载体质粒GV493 (hU6-MCS-CBhgGFP-IRES-puromycin)、辅助质粒Helper1.0和辅助质粒Helper2.0均由上海吉凯基因公司提供, 大肠杆菌菌株DH5 α 购自北京Solarbio公司, 限制性核酸内切酶EcoR I和Age I购自美国NEB公司, Taq聚合酶购自北京SinoBio公司, 一步法克隆试剂盒购自美国Vazyme公司, 反转录试剂盒购自北京TaKaRa Bio公司, Lipofectamine 2000和TRIzol购自美国Invitrogen公司, 实时荧光定量PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 染料预混液购自北京GenStar公司, BCA蛋白定量试剂盒购自美国Thermo Scientific公司, DMEM、MEM和Opti-MEN培养基购自美国Gibco公司, 胶回收试剂盒、50 \times TAE和质粒抽提试剂盒由北京TIANGEN公司提供, 胰蛋白酶、琼脂糖粉、酵母提取物和氯化钠购自美国Vetec公司, 抗EIF4A3抗体和抗GAPDH抗体均购自英国Abcam公司。倒置光学显微镜和倒置荧光显微镜购自日本Olympus公司, 荧光定量PCR仪购自瑞士Roche公司, 电泳仪购自美国Bio-Rad公司, 化学发光检测仪购自美国Azure Biosystems公司。

1.2 细胞培养 HEK293T细胞常规培养于DMEM培养基 (含10%胎牛血清和1%青-链霉素), Neuro-2a细胞培养于MEM培养基 (含10%胎牛血清和1%青-链霉素), 置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱内培养, 隔2~3 d即可传代1次, 细胞状态良好且密度大于90%时用0.25%胰蛋白酶消化传代。

1.3 引物设计和合成 通过美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 数据库检索EIF4A3 (Gene ID: 9775) 序列, 结合引物设计原则和载体GV493阅读框克隆位点, 设计引物。设计并合成EIF4A3 PCR鉴定引物, 引物序列: 上游引物, 5'-ATGGAAATTTGATACTCTATG-3', 下游引物, 5'-CATAGAGTATCAAATTTCCAT-3'。设计并合成EIF4A3 RT-qPCR引物, 引物序列: 上游引物, 5'-GACCAAAGTGGAGTTCGAGACG-3', 下游引物, 5'-TGATAGCACGCTGCTGAATCGC-3'。

引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 EIF4A3慢病毒载体构建及鉴定 合成的基因引物经PCR扩增,获得DNA片段。PCR扩增反应体系(50 μL):上下游引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各1 μL ,DNA模板1 μL ,2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP 4 μL ,5 \times Buffer 10 μL ,Prime STAR HS DNA polymerase 0.5 μL ,ddH₂O 50 μL 。扩增程序:98 $^{\circ}\text{C}$,5 min;98 $^{\circ}\text{C}$,10 s;55 $^{\circ}\text{C}$,10 s;72 $^{\circ}\text{C}$,90 s,共30个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸8 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

采用EcoR I和Age I限制性内切酶对GV493进行酶切。酶切体系(50 μL)为10 \times 酶缓冲液5 μL ,GV493 DNA 2 μL ,EcoR I 1 μL ,Age I 1 μL ,ddH₂O加入总体积50 μL ,吹打、混匀和离心后,在37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应3 h后过夜。采用酶切回收试剂盒回收GV493载体质粒。

采用一步法克隆试剂盒将PCR扩增的EIF4A3引物连接至携gcGFP/Puromycin的慢病毒GV493载体,重组后载体见图1。反应体系(10 μL):5 \times 酶缓冲液2 μL ,酶切GV493 DNA 2.5 μL ,纯化的扩增产物片段1 μL ,外切酶II 1 μL ,总体积10 μL 加入ddH₂O;吹打离心后,在37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应30 min,冰浴冷却5 min。

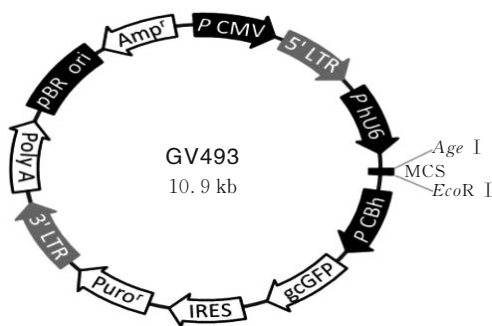


图1 EIF4A3 shRNA慢病毒载体构建图

Fig. 1 Construction map of EIF4A3 shRNA lentivirus vector

将10 μL GV493空质粒和GV493-EIF4A3 shRNA重组质粒分别加入100 μL 感受态细胞DH5 α 中,混合均匀;冰上反应30 min,42 $^{\circ}\text{C}$ 热激1.5 min,冰浴2 min;37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养60 min,含500 μL LB液。取培养后的菌液适量,均匀涂布于含100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氨苄西林的LB培养板上,倒置培养板37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养12 h;次日,在平板上培养菌落,在含有100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氨苄西林的3 mL LB培养基播

床上取适量的细菌,37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜,吸附适量的细菌溶液,并用甘油保菌,其余的细菌溶液经PCR和酶切鉴定。鉴定体系(20 μL):2 \times Taq聚合酶10 μL ,扩增鉴定上游引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.4 μL ,扩增鉴定下游引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.4 μL ,适量甘油菌液,加入ddH₂O至总体积为20 μL ,反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性3 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,共22个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。如在基因片段57 bp附近出现条带,则表明该重组菌是携带重组GV493-EIF4A3 shRNA的阳性菌。对鉴定出的阳性菌进行克隆,送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序成功,则可用于后续实验。

1.5 EIF4A3慢病毒包装及滴度测定 转染前1 d,将生长状况良好的HEK293T细胞接种于100 mm细胞培养皿中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂孵箱培养。当细胞密度达到80%时,采用EIF4A3慢病毒转染细胞。转染体系分为Mixture A和Mixture B。Mixture A:10 μg GV493空载质粒或GV493-EIF4A3-shRNA重组质粒+5 μg 辅助质粒Helper 1.0型+5 μg 辅助质粒Helper 2.0型+750 μL Opti-MEM;Mixture B:15 μL Lipofactamine 2000+750 μL Opti-MEM。Mixture A和Mixture B体系各自混匀,室温避光放置5 min,后2个体系相互混匀,室温孵育20 min。将Mixture A和Mixture B的混合物加入3 mL Opti-MEM至100 mm培养皿中,轻轻摇动混合,在37 $^{\circ}\text{C}$ 的细胞培养箱中培养4 h。待转染结束后,将100 mm培养皿中的培养液更换为正常生长的培养液,培养48 h。在荧光显微镜下,当细胞转染效率约90%时,收集培养皿上清液,采用0.45 μm 滤膜过滤,低温超高速离心法去除上清液,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)溶解沉淀。GV493空载质粒转染后收集的慢病毒为GV493对照慢病毒,GV493-EIF4A3 shRNA重组质粒转染后收集的慢病毒为GV493-EIF4A3 shRNA慢病毒,将收集的病毒溶液进行滴度测定。

慢病毒滴度测定前1 d,将HEK293T细胞铺入96孔细胞培养板,每孔4 \times 10⁴个细胞。分别在3个EP管中采用90 μL 无血清培养基培养病毒,分别标记为1E+1 μL 组(含10 μL 病毒溶液)、1E+0 μL 组(1E-1 μL 组病毒溶液10倍稀释)和1E-1 μL 组(1E+0 μL 组病毒溶液10倍稀释)。荧光显微镜下观察病毒转染后HEK293T细胞荧光表达

情况。

1.6 EIF4A3 shRNA 慢病毒感染 Neuro-2a 细胞及稳定转染细胞系构建 将 Neuro-2a 细胞铺于 12 孔细胞培养板, 待细胞密度达到 70%~80% 时, 按最佳慢病毒感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 100, 取相应病毒量进行慢病毒感染实验。将 Neuro-2a 细胞分为空白组、GV493 对照组和 GV493-EIF4A3 shRNA 组。空白组不做处理, GV493 对照组和 GV493-EIF4A3 shRNA 组分别采用 GV493 对照慢病毒和 GV493-EIF4A3 shRNA 慢病毒感染 Neuro-2a 细胞, 慢病毒感染 24 h 后换液, 继续培养 48 h, 加入嘌呤霉素 ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 进行筛选, 1 d 后换液, 之后维持嘌呤霉素浓度在 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 培养 2 周。在荧光显微镜下观察 Neuro-2a 细胞, 若细胞生长状态良好且表达绿色荧光, 则提示慢病毒感染稳定细胞系构建成功。

1.7 RT-qPCR 法检测各组 Neuro-2a 细胞中 EIF4A3 mRNA 表达水平 采用 TRIzol 法提取各组 RNA, 测纯度和浓度后, 取 1 000 ng RNA 逆转录合成 cDNA。采用 2 \times 增强型染料 RT-qPCR 预混液进行 RT-qPCR 法检测, EIF4A3 PCR 引物: 上游引物, 5'-GACCAAAGTGGAGTTCGAGACG-3'; 下游引物, 5'-TGATAGCACGCTGCTGAATCGC-3'。反应体系 ($10 \mu\text{L}$): 染料预混液 $5 \mu\text{L}$, PCR 引物 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $0.2 \mu\text{L}$, cDNA $1 \mu\text{L}$, 加 ddH₂O 至 $10 \mu\text{L}$ 。扩增条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 、10 s, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 、20 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 、15 s, 共 40 个循环。溶解条件: $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 、60 s, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 、1 s。以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各组 Neuro-2a 细胞中 EIF4A3 mRNA 表达水平。

1.8 Western blotting 法检测各组 Neuro-2a 细胞中 EIF4A3 蛋白表达水平 收集各组 Neuro-2a 细胞, 采用 BCA 法进行蛋白定量, 恒压 60 V、30 min, 恒压 100 V、90 min 电泳。采用湿法转膜, 转膜条件为恒压 100 V、90 min。快速封闭液封闭膜 30 min, 用 TBST 溶液清洗膜 3 次, 每次 10 min。加入一抗, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜, 第 2 天回收一抗, 洗膜 3 次, 二抗室温孵育 60 min, 洗膜 3 次, 采用化学发光试剂显影。于相对分子质量 49 000 处出现一条特异性条带, 表明 EIF4A3 蛋白在 Neuro-2a 细胞中成功表达。采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 以 β -actin 为内参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平 = 目的蛋白条带灰度值/ β -actin 蛋白条带灰度值。

1.9 统计学分析 采用 Graphpad Prism 6.0 统计软件进行统计学分析。各组细胞中 EIF4A3 mRNA 和蛋白表达水平符合正态分布, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EIF4A3 shRNA 慢病毒载体的构建 将测序成功的 DNA 序列与设计的 EIF4A3 序列比较, 二者 DNA 序列完全匹配, 表明 EIF4A3 序列成功连接至 GV493 载体中, 测序结果提示成功构建 GV493-EIF4A3 慢病毒载体。见图 2。

2.2 EIF4A3 shRNA 慢病毒感染 Neuro-2a 细胞并建立稳定转染细胞系 将 GV493 空载质粒和 GV493-EIF4A3 shRNA 重组质粒分别与辅助质粒共同转染 HEK293T 细胞, 荧光显微镜下观察可见 HEK293T 细胞荧光表达强烈, 生长状态良好, 慢病毒包装成功。见图 3 和 4。

GV493 对照慢病毒和 GV493-EIF4A3-shRNA 慢病毒滴度均为 $2\times 10^8 \text{ TU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。荧光显微镜下观察可见 GV493 对照组和 GV493-EIF4A3 shRNA 组 Neuro-2a 细胞生长状态良好且表达绿色荧光, 表明慢病毒感染稳定细胞系构建成功。见图 5。

2.3 各组 Neuro-2a 细胞中 EIF4A3 mRNA 表达水平 与空白组 (1.00 ± 0.09) 和 GV493 对照组 (0.78 ± 0.08) 比较, GV493-EIF4A3 shRNA 组 Neuro-2a 细胞中 EIF4A3 mRNA 表达水平 (0.49 ± 0.10) 明显降低 ($P<0.01$)。

2.4 各组 Neuro-2a 细胞中 EIF4A3 蛋白表达水平 Western blotting 法检测结果显示: 各组在相对分子质量 49 000 处均出现特异性条带, 提示 Neuro-2a 细胞中 EIF4A3 蛋白表达成功。与空白组 (1.05 ± 0.11) 和 GV493 对照组 (0.78 ± 0.07) 比较, GV493-EIF4A3 shRNA 组 Neuro-2a 细胞中 EIF4A3 蛋白表达水平 (0.35 ± 0.09) 明显降低 ($P<0.01$)。见图 6。

3 讨论

颅内动脉粥样硬化是全身动脉粥样硬化的一部分, 可引起暂时性脑缺血发作、脑卒中和血管性痴呆等脑血管疾病。尽管不同部位的动脉粥样硬化病变程度并不平行, 但晚期颅内动脉粥样硬化的病变程度与颅外动脉粥样硬化的病变程度相似^[15]。颅

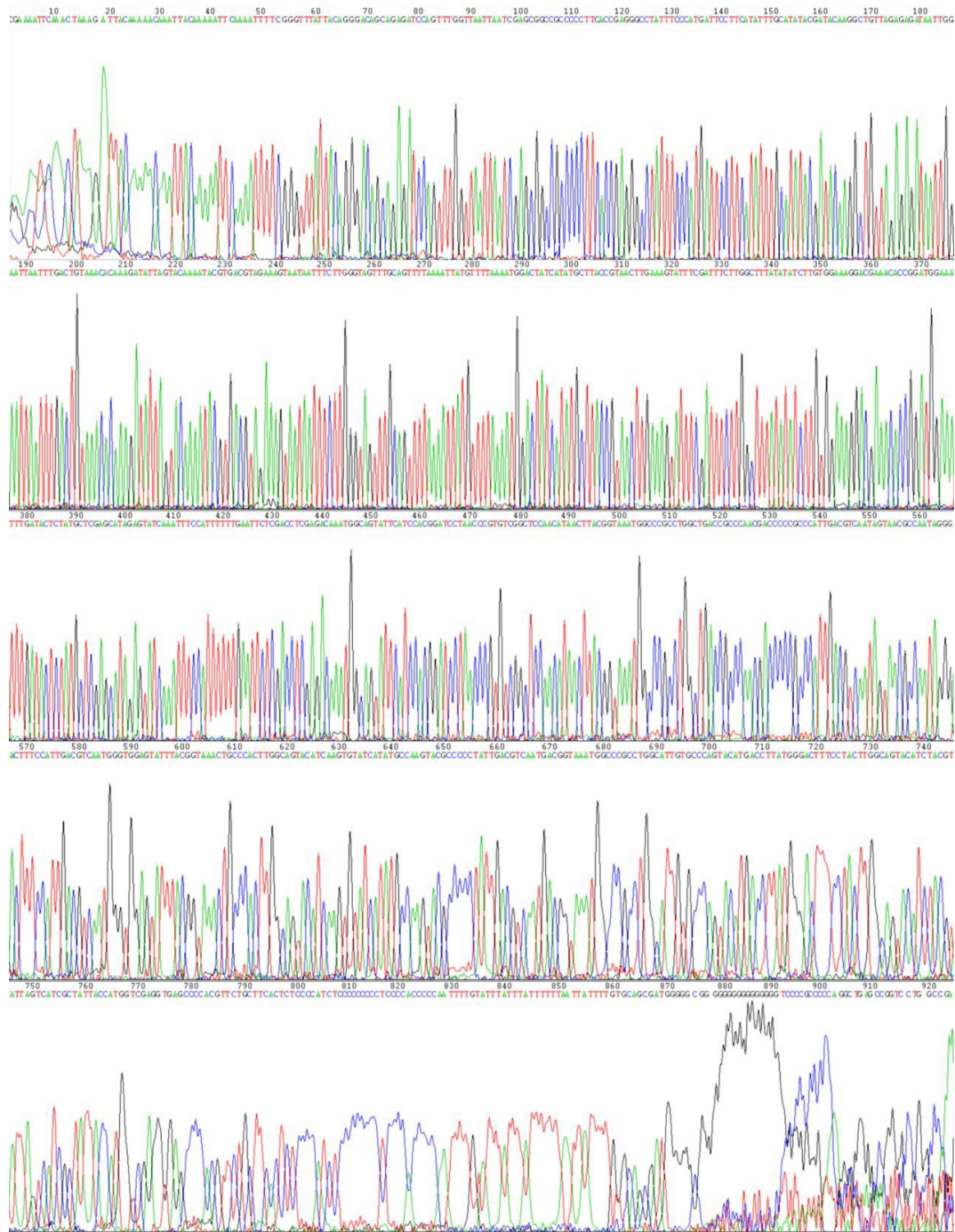


图2 GV493-EIF4A3 shRNA慢病毒质粒测序图

Fig. 2 Sequencing map of GV493-EIF4A3 shRNA lentivirus plasmid

内动脉粥样硬化是一种终生全身性和进行性疾病，是全世界缺血性卒中发生的主要原因。颅内动脉粥样硬化的发生发展涉及内皮功能障碍、炎症、氧化应激和细胞凋亡等多种机制^[16]。

研究^[17-18]显示：EIF4A3与动脉粥样硬化疾病的发生发展密切相关。hsa_circ_0030042通过靶向EIF4A3调节异常自噬并保护动脉粥样硬化斑块稳

定性^[13]。环状泛素特异性肽酶9×-连锁基因（circ-ubiquitin specific peptidase 9×-linked gene, circ-*USP9*×）可与细胞质中的EIF4A3蛋白结合，并与其相互作用。此外，EIF4A3的过表达消除了circ-*USP9*×敲低诱导的氧化修饰低密度脂蛋白（oxidized low density lipoprotein, ox-LDL）处理的hUVECs焦亡。研究^[17]显示：circ-*USP9*×通过海

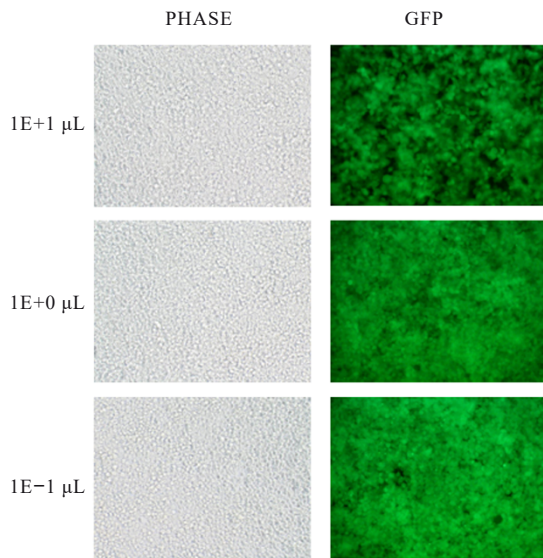


图3 荧光显微镜下慢病毒感染后GV493-对照组HEK293T细胞形态表现及荧光表达情况($\times 10$)

Fig. 3 Morphology and fluorescence expression of HEK293T cells in GV493-control group after transfected with lentivirus under fluorescence microscope($\times 10$)

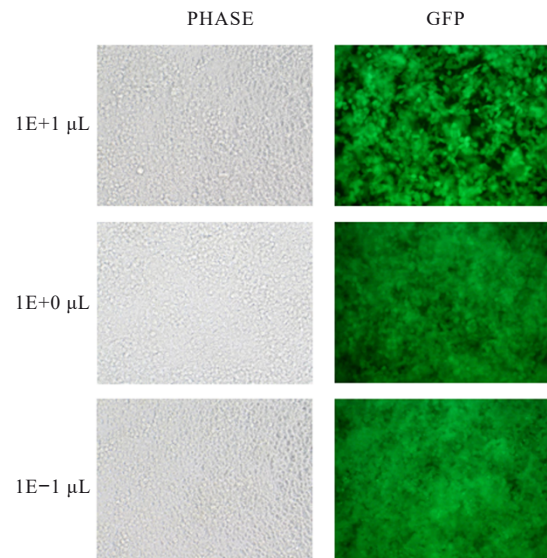


图4 荧光显微镜下慢病毒感染后GV493-EIF4A3-shRNA组HEK293T细胞形态表现及荧光表达情况($\times 10$)

Fig. 4 Morphology and fluorescence expression of HEK293T cells in GV493-EIF4A3-shRNA group after transfected with lentivirus under fluorescence microscope($\times 10$)

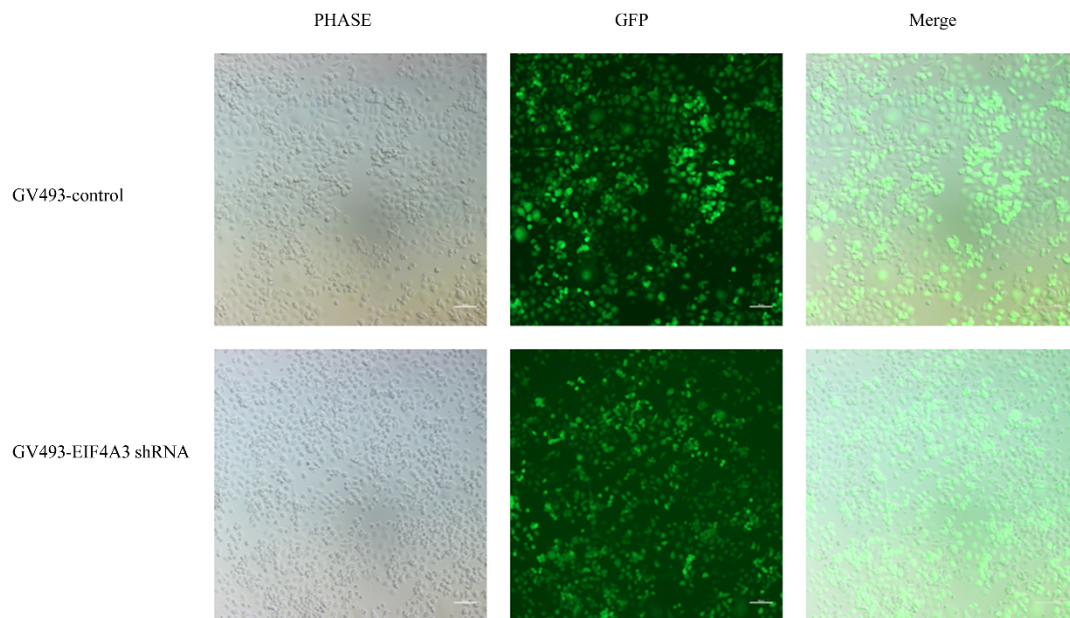
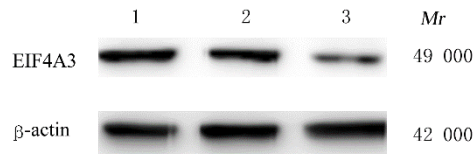


图5 荧光显微镜下慢病毒感染后各组Neuro-2a细胞形态表现及荧光表达情况($\times 10$)

Fig. 5 Morphology and fluorescence expression of Neuro-2a cells in various groups after transfected with lentivirus under fluorescence microscope($\times 10$)

绵作用抑制EIF4A3的功能从而促进内皮细胞焦亡。细胞焦亡是一种炎症性细胞死亡。与细胞凋亡和坏死不同,细胞焦亡的特征是细胞膜破裂,导致细胞内容物释放,从而激活炎症反应。内皮焦亡也是动脉粥样硬化的重要病理机制^[18]。研究^[15]证

实: EIF4A3蛋白诱导的circ_0086296通过miR-576-3p/IFIT1/STAT1通路反馈回路加重了hUVECs的动脉粥样硬化病变表型。因此,EIF4A3可能是动脉粥样硬化治疗的靶标。提示EIF4A3可能在颅内动脉粥样硬化形成和发生发展



Lane 1: Blank group; Lane 2: GV493-control group; Lane 3: GV493-EIF4A3 shRNA group.

图6 各组Neuro-2a细胞中EIF4A3蛋白表达电泳图

Fig. 6 Electrophoretogram of expressions of EIF4A3 protein in Neuro-2a cells in various groups

过程中发挥重要作用。

Neuro-2a细胞具有神经细胞特性,生长繁殖速度快,被广泛用于神经系统疾病方面的研究^[19-20]。但目前尚未见EIF4A3蛋白在Neuro-2a细胞系中构建缺血缺氧疾病模型报道,因此本研究选用Neuro-2a细胞作为病毒感染和观察的研究对象。本研究结果显示:GV493-EIF4A3慢病毒表达载体成功构建,并成功感染Neuro-2a细胞,Neuro-2a细胞中EIF4A3 mRNA和蛋白成功表达。

综上所述,本研究成功构建GV493-EIF4A3慢病毒表达载体,建立了稳定感染shRNA GV493-EIF4A3慢病毒的Neuro-2a细胞系,为EIF4A3在颅内动脉粥样硬化中的作用机制研究提供了参考。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

何嘉文参与论文设计、撰写和修改,廖科棋参与实验数据的获取和分析,李友和李胜男参与实验设计。

[参考文献]

- [1] MCMAHON J J, MILLER E E, SILVER D L. The exon junction complex in neural development and neurodevelopmental disease [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2016, 55: 117-123.
- [2] MAZLOOMIAN A, ARAKI S, OHORI M, et al. Pharmacological systems analysis defines EIF4A3 functions in cell-cycle and RNA stress granule formation[J]. *Commun Biol*, 2019, 2: 165.
- [3] FERRAIUOLO M A, LEE C S, LER L W, et al. A nuclear translation-like factor eIF4A III is recruited to the mRNA during splicing and functions in nonsense-mediated decay [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(12): 4118-4123.
- [4] FUKAO A, MISHIMA Y, TAKIZAWA N, et al. MicroRNAs trigger dissociation of eIF4A I and eIF4A II from target mRNAs in humans[J]. *Mol Cell*, 2014, 56(1): 79-89.
- [5] GALICIA-VÁZQUEZ G, CHU J, PELLETIER J. eIF4A II is dispensable for miRNA-mediated gene silencing[J]. *RNA*, 2015, 21(10): 1826-1833.
- [6] WEI Y T, LU C F, ZHOU P, et al. EIF4A3-induced circular RNA ASAP1 promotes tumorigenesis and temozolomide resistance of glioblastoma via NRAS/MEK1/ERK1-2 signaling[J]. *Neuro Oncol*, 2021, 23(4): 611-624.
- [7] YANG C J, HAWKINS K E, DORÉ S, et al. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 316(2): C135-C153.
- [8] LIU Y C, SONG J, ZHANG H W, et al. EIF4A3-induced circTOLLIP promotes the progression of hepatocellular carcinoma via the miR-516a-5p/PBX3/EMT pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 164.
- [9] ZHANG S X, LENG T Y, ZHANG Q, et al. Sanguinarine inhibits epithelial ovarian cancer development via regulating long non-coding RNA CASC2-EIF4A3 axis and/or inhibiting NF- κ B signaling or PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 102: 302-308.
- [10] SUI X Z, WANG Y C, LIU H. hsa_circ_0101119 facilitates the progression of cervical cancer via an interaction with EIF4A3 to inhibit TCEAL6 expression[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(3): 654.
- [11] LAFFONT I, TAKAHASHI M, SHIBUKAWA Y, et al. Apolipoprotein E activates Akt pathway in neuro-2a in an isoform-specific manner[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 292(1): 83-87.
- [12] LI Y S, REN S H, XIA J W, et al. EIF4A3-induced circ-BNIP3 aggravated hypoxia-induced injury of H9c2 cells by targeting miR-27a-3p/BNIP3 [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 19: 533-545.
- [13] YU F P, ZHANG Y, WANG Z Z, et al. Hsa_circ_0030042 regulates abnormal autophagy and protects atherosclerotic plaque stability by targeting eIF4A3[J]. *Theranostics*, 2021, 11(11): 5404-5417.
- [14] ZHANG M, ZHU Y Q, ZHU J, et al. circ_0086296 induced atherosclerotic lesions via the IFIT1/STAT1 feedback loop by sponging miR-576-3p [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2022, 27(1): 80.
- [15] RITZ K, DENSWIL N P, STAM O C G, et al. Cause and mechanisms of intracranial atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2014, 130(16): 1407-1414.

- [16] WANG Y, MENG R, LIU G, et al. Intracranial atherosclerotic disease [J]. *Neurobiol Dis*, 2019, 124: 118-132.
- [17] XU S K, GE Y S, WANG X B, et al. Circ-USP9X interacts with EIF4A3 to promote endothelial cell pyroptosis by regulating GSDMD stability in atherosclerosis[J]. *Clin Exp Hypertens*, 2023, 45(1): 2186319.
- [18] YANG H Z, YANG W C, DAI W Q, et al. LINC00667 promotes the proliferation, migration, and pathological angiogenesis in non-small cell lung cancer through stabilizing VEGFA by EIF4A3 [J]. *Cell Biol Int*, 2020, 44(8): 1671-1680.
- [19] LAM M, SANOSAKA T, LUNDIN A, et al. Single-cell study of neural stem cells derived from human iPSCs reveals distinct progenitor populations with neurogenic and gliogenic potential[J]. *Genes Cells*, 2019, 24(12): 836-847.
- [20] MATSUI T K, TSURU Y, HASEGAWA K, et al. Vascularization of human brain organoids [J]. *Stem Cells*, 2021, 39(8): 1017-1024.