

## 胞质分裂作用因子4过表达慢病毒载体的构建和稳定转染 Neuro-2a细胞的建立

李胜男<sup>1,2</sup>, 何嘉文<sup>1,2</sup>, 廖科棋<sup>1,2</sup>, 李友<sup>1,2</sup>

(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:** 构建胞质分裂作用因子4 (DOCK4) 过表达慢病毒载体, 建立 DOCK4 稳定过表达的 Neuro-2a 细胞。**方法:** 在美国国家生物信息中心 (NCBI) 查找 DOCK4 的序列并设计合成引物, 采用聚合酶链式反应 (PCR) 法扩增获取 DOCK4 基因序列, 通过 *Bam*H I 和 *Age* I 限制性内切酶酶切后, 将其与酶切后的慢病毒载体 GV492 进行连接, 构建 GV492-DOCK4 过表达重组质粒, PCR 法鉴定筛选出与目的基因片段长度大小相近的阳性克隆。将 GV492-对照质粒和 GV492-DOCK4 过表达重组质粒分别转染至 HEK293T 细胞中, 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 GV492-对照组和 GV492-DOCK4 组, 分别采用 GV492-对照组慢病毒和 GV492-DOCK4 过表达慢病毒感染 Neuro-2a 细胞, 慢病毒感染复数 (MOI) 为 100, 感染 72 h 后采用嘌呤霉素 ( $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 筛选出成功感染 GV492-对照组慢病毒和 GV492-DOCK4 过表达慢病毒的 Neuro-2a 细胞, 荧光显微镜观察各组 Neuro-2a 细胞生长状态及绿色荧光蛋白表达情况; 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法和 Western blotting 法检测各组 Neuro-2a 细胞中 DOCK4 mRNA 和 DOCK4 蛋白表达水平。**结果:** PCR 检测, GV492-DOCK4 过表达重组质粒的基因片段长度约为 691 bp, 测序结果显示 GV492-DOCK4 过表达重组质粒基因序列与设计合成的 DOCK4 过表达序列一致; GV492-对照组和 GV492-DOCK4 过表达重组慢病毒的滴度分别为  $2.5\times 10^8\text{ TU}\cdot\text{mL}^{-1}$  和  $2.5\times 10^8\text{ TU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 荧光显微镜观察, 各组 Neuro-2a 细胞生长状态良好且存在绿色荧光蛋白表达; RT-qPCR 法检测, 与 GV492-对照组比较, GV492-DOCK4 组 Neuro-2a 细胞中 DOCK4 mRNA 表达水平明显升高 ( $P<0.01$ ); Western blotting 法检测, 各组细胞在相对分子质量 225 000 附近出现特异性条带, 与 GV492-对照组比较, GV492-DOCK4 组 Neuro-2a 细胞中 DOCK4 蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.01$ )。**结论:** 本研究成功构建 DOCK4 过表达慢病毒载体, 建立了稳定过表达 DOCK4 的 Neuro-2a 细胞。

**[关键词]** 胞质分裂作用因子4; 过表达慢病毒载体; Neuro-2a 细胞; 稳定转染; 过表达慢病毒

**[中图分类号]** R743.3 **[文献标志码]** A

**[收稿日期]** 2023-08-10

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (81571157); 广东省基础与应用基础研究基金委员会科研项目 (2023A1515012750); 广东省卫健委广东省医学科研基金项目 (A2022139, A2023193); 广东医科大学科技处 广东医科大学百项青年研究项目 (GDMUD2022010)

**[作者简介]** 李胜男 (1992—), 女, 安徽省淮北市人, 助理研究员, 医学博士, 主要从事脑血管病和阿尔茨海默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)

## Construction of dedicator of cytokinesis 4 over-expressed lentivirus vector and establishment of stable transfected Neuro-2a cells

LI Shengnan<sup>1,2</sup>, HE Jiawen<sup>1,2</sup>, LIAO Keqi<sup>1,2</sup>, LI You<sup>1,2</sup>

(1. Guangdong Key Laboratory of Age-Related Cardiac and Cerebral Diseases, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524002, China; 2. Institute of Neurology, Affiliated Hospital, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524002, China)

**ABSTRACT Objective:** To construct an over-expression lentiviral vector of the dedicator of cytokinesis 4 (DOCK4), and to establish DOCK4 stably over-expressing Neuro-2a cells. **Methods:** The DOCK4 sequence was searched in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and primers were designed and synthesized; polymerase chain reaction (PCR) method was used to amplify the DOCK4 gene sequences. After digestion with *Bam*H I and *Age* I restriction endonucleases, the DOCK4 gene sequences were ligated with the digested lentiviral vector GV492 to construct the GV492-DOCK4 over-expression recombinant plasmid. The positive clones with a similar length to the target gene fragment were screened and identified by PCR method. The GV492-control plasmid and GV492-DOCK4 over-expression recombinant plasmid were transfected into the HEK293T cells, and the lentivirus was collected and titered 48 h after transfection. The Neuro-2a cells were divided into GV492-control group and GV492-DOCK4 group, and the cells were infected with GV492-control lentivirus and GV492-DOCK4 over-expression lentivirus, respectively, and the multiplicity of infection (MOI) was 100. After 72 h of infection, the successfully infected Neuro-2a cells were screened by using puromycin ( $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ). The growth status of Neuro-2a cells and the expression of green fluorescent protein in various groups were observed under fluorescence microscope. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting methods were used to detect the expression levels of DOCK4 mRNA and DOCK4 protein in the Neuro-2a cells in various groups. **Results:** The PCR results showed that the gene fragment length of the GV492-DOCK4 over-expression recombinant plasmid was approximately 691 bp. The sequencing results showed that the gene sequence of the GV492-DOCK4 over-expression recombinant plasmid was consistent with the designed over-expression sequence of DOCK4. The titers of the lentiviruses in GV492-control group and GV492-DOCK4 over-expression group were  $2.5 \times 10^8 \text{ TU} \cdot \text{mL}^{-1}$  and  $2.5 \times 10^8 \text{ TU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively. The fluorescence microscope observation results showed that Neuro-2a cells in various groups grew well and expressed green fluorescent protein. The RT-qPCR results showed that compared with GV492-control group, the expression level of DOCK4 mRNA in the Neuro-2a cells in GV492-DOCK4 group was significantly increased ( $P < 0.01$ ). The Western blotting results showed the specific bands near the relative molecular mass of 225 000 in various groups. Compared with GV492-control group, the expression level of DOCK4 protein in the Neuro-2a cells in GV492-DOCK4 group was significantly increased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** This study successfully constructs the DOCK4 over-expression lentiviral vector and establishes the Neuro-2a cells stably over-expressing DOCK4.

**KEYWORDS** Dedicator of cytokinesis 4; Over-expression lentivirus vector; Neuro-2a cell; Stable transfection; Over-expression lentivirus

胞质分裂作用因子 (dedicator of cytokinesis, DOCK) 蛋白家族是一类进化上比较保守的非典型鸟苷酸交换因子, 其主要作用是激活 Rac 三磷酸鸟

苷水解酶 (Rac guanosine triphosphate hydrolases, Rac GTPases) 和 Cdc42 鸟苷酸结合蛋白 (Cdc42 guanosine triphosphate hydrolases, Cdc42

GTPases)<sup>[1-4]</sup>, DOCK蛋白分为DOCK-A、DOCK-B、DOCK-C和DOCK-D亚族<sup>[5-7]</sup>。DOCK4属于DOCK-B亚族<sup>[8-9]</sup>,是肿瘤发生过程中的缺失基因,已被证明是肿瘤抑制基因<sup>[10-12]</sup>。研究<sup>[8-9, 13]</sup>显示:DOCK4与孤独症、阅读障碍症和精神分裂症等神经精神疾病密切相关。DOCK4参与促进血管平滑肌细胞迁移<sup>[14]</sup>、血管发芽和小管重塑<sup>[15]</sup>。此外,DOCK4还能够通过激活小GTP结合蛋白Rac1驱动低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)与清道夫受体B类1型(scavenger receptor class B type 1, SR-B1)的结合,促进SR-B1内化和LDL转运<sup>[16]</sup>。与正常动脉比较,在病变形成之前,小鼠主动脉粥样硬化易发区域和人类粥样硬化动脉组织中SR-B1和DOCK4表达增加<sup>[16]</sup>。研究<sup>[21]</sup>显示:DOCK4 rs2074130突变与缺血性卒中(ischaemic stroke, IS)患者外周血中DOCK4水平较低和患者对IS的易感性较高有关<sup>[17-20]</sup>。下调微小RNA 181d(micro-RNA 181d, miR-181d)能够通过靶向DOCK4保护神经元免受缺血性损伤<sup>[18]</sup>,但DOCK4在IS中的具体作用机制尚不清楚。

本实验构建DOCK4过表达慢病毒载体并包装为DOCK4过表达慢病毒,通过体外感染Neuro-2a细胞和抗生素筛选获得稳定过表达DOCK4的细胞,为探讨DOCK4在IS发生发展中的作用机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、主要试剂和仪器

人胚胎肾HEK293T细胞和小鼠脑神经瘤细胞Neuro-2a购于武汉普诺赛生命科技有限公司,慢病毒载体质粒GV492(Ubi-MCS-3FLAG-CBh-gcGFP-IRES-puromycin)、辅助质粒Helper 1.0和Helper 2.0购于上海吉凯基因化学技术有限公司。大肠杆菌菌株DH5 $\alpha$ 购于北京索莱宝科技有限公司,限制性核酸内切酶BamHI及Age I、Taq DNA聚合酶、T4 DNA ligase和10 $\times$ T4 ligase Buffer购于美国New England Biolabs公司,反转录试剂盒和TRIzol购于日本TaKaRa公司,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)、高糖杜氏改良Eagle培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)、Opti-MEM减血清培养基、最低必需培养基(minimum essential medium, MEM)、0.25%胰蛋白酶、1%青-链霉素溶液(双抗)、胎牛血清(foetal bovine serum,

FBS)、Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000转染试剂和二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒购于美国赛默飞世而科技公司,实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)染料预混液购于北京康润诚业生物科技有限公司,琼脂糖凝胶回收试剂盒、50 $\times$ TAE和质粒抽提试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司,胰蛋白胨、琼脂糖粉、酵母提取物、氯化钠和引物购于生工生物工程(上海)股份有限公司。抗DOCK4抗体和抗GAPDH抗体购于美国Abcam公司。EP离心管、移液管和细胞培养皿购于无锡耐思生命科技股份有限公司,倒置光学显微镜和倒置荧光显微镜购于日本奥林巴斯公司,RT-qPCR仪购于瑞士罗氏公司,电泳仪、转膜仪和转膜滤纸购于美国伯乐公司,0.45  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜购于美国密理博公司,凝胶成像系统购于美国Azure Biosystems公司。

### 1.2 HEK293T细胞和Neuro-2a细胞培养

HEK293T细胞采用高糖DMEM(含10%FBS和1%青-链霉素)培养,Neuro-2a细胞培养采用MEM(含非必需氨基酸、10%FBS和1%青-链霉素)培养,培养条件为含5%CO<sub>2</sub>的37 $^{\circ}$ C恒温细胞培养箱。当细胞密度约为80%时,移去细胞培养基,采用PBS缓冲液洗涤,弃去死细胞,再采用0.25%胰蛋白酶消化。细胞悬液以1:5的比例进行传代,正常条件下平均每隔2~3d传代1次。

### 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)搜索DOCK4(Gene ID: 9732)序列,结合引物设计原则和载体GV492阅读框克隆位点设计引物。DOCK4上游引物为5'-AGGTCGACTCTAGAGGATCCCGCCACCATGTGGATACCTACGGAGCACGAGAAATAC-3', DOCK4下游引物为5'-TCCTTGTAGTCCAT-ACCGGTTAGCTGAGACACCTTACGGGGCAGGGG-3'。设计合成PCR鉴定引物:PCR鉴定的正向引物5'-AATCCCACCCCTAGCAGCTG-3', PCR鉴定的反向引物5'-CCTTATAGTCCTTATCATC-GTC-3';设计并合成DOCK4的正向引物5'-GATAG-GAGAGGTGGATGGCAAG-3', DOCK4反向引物5'-CGCCTTGAGATGCAGATCGTAG-3'。上述引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

**1.4 DOCK4慢病毒载体构建** 将合成的DOCK4基因引物通过PCR扩增。PCR反应体系(20  $\mu\text{L}$ ): dd H<sub>2</sub>O 10.85  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ 缓冲液 2  $\mu\text{L}$ , DNA模板 1  $\mu\text{L}$ , 正向引物(5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , 反向引物(5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , dNTP(2.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , 高保真 Taq酶 PrimeSTAR HS DNA聚合酶 0.15  $\mu\text{L}$ 。PCR反应程序: 95  $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min; 95  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 55  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 35个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸 5 min。随后对GV492空载体进行酶切反应。其中GV492载体的酶切体系(20  $\mu\text{L}$ ): ddH<sub>2</sub>O 16  $\mu\text{L}$ , GV492 (1 g $\cdot\text{L}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ NEB Buffer 2  $\mu\text{L}$ , BamH I 限制性内切酶 0.5  $\mu\text{L}$ , Age I 限制性内切酶 0.5  $\mu\text{L}$ 。将上述体系所需试剂依次加入PCR管中, 混匀离心后置于37  $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱反应 6 h。随后, 将PCR扩增出的DOCK4基因连接到GV492载体上, 连接体系(15  $\mu\text{L}$ ): ddH<sub>2</sub>O 2.5  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ T4连接酶缓冲液 1.5  $\mu\text{L}$ , T4 DNA连接酶 1  $\mu\text{L}$ , DOCK4 DNA 8  $\mu\text{L}$ , GV492载体 2  $\mu\text{L}$ , 上述组分混合均匀后16  $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。次日将连接产物进行转化。随后进行酶切鉴定, 鉴定体系(10  $\mu\text{L}$ ): ddH<sub>2</sub>O 7.5  $\mu\text{L}$ , 质粒(1 g $\cdot\text{L}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ NEB缓冲液 1  $\mu\text{L}$ , BamH I 限制性内切酶 0.25  $\mu\text{L}$ , Age I 限制性内切酶 0.25  $\mu\text{L}$ 。酶切结束后进行验证, 若在基因片段长度为691 bp附近出现条带, 提示其为携带GV492-DOCK4过表达重组质粒的阳性克隆。质粒由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 测序成功的GV492-DOCK4过表达重组质粒即可用于后续实验。

**1.5 DOCK4慢病毒包装和滴度测定** HEK 293T细胞转染体系分为2个, 体系1: 在750  $\mu\text{L}$  Opti-MEM中, 加入15  $\mu\text{L}$  Lipofactamine<sup>TM</sup> 2000, 轻轻混匀后, 室温放置 5 min; 体系2: 在750  $\mu\text{L}$  Opti-MEM中加入7.5  $\mu\text{g}$  GV492-对照质粒或3.75  $\mu\text{g}$  pHelper 1.0和3.75  $\mu\text{g}$  pHelper 2.0 GV492-DOCK4质粒。将体系2转移至体系1中混匀, 室温静置 20 min。随后将混合物轻柔滴加到细胞中, 放回培养箱中继续培养 4 h, 换成正常培养基后再培养 48 h, 即可收集细胞培养基进行病毒浓缩。

慢病毒滴度测定 1 d前, 将HEK293T细胞铺至96孔细胞培养板中, 每孔 $5\times 10^4$ 个细胞。分别在5个EP管加入90  $\mu\text{L}$ 无血清培养基。第1个EP管中加入10  $\mu\text{L}$ 病毒原液, 标为1E+1  $\mu\text{L}$ ; 并从中吸取10  $\mu\text{L}$ 加入第2个EP管中, 标为1E+0  $\mu\text{L}$ 。

再从第2个EP管中吸取10  $\mu\text{L}$ 加入第3个EP管中, 标为1E-1  $\mu\text{L}$ , 继续相同的操作直到第5个EP管。弃去96孔细胞培养板中培养基, 在对应孔中加入上述EP管含病毒的培养基, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养 24 h。加入100  $\mu\text{L}$ 完全培养基, 4 d后在荧光显微镜下观察细胞中绿色荧光表达情况, 表达强烈说明GV492-对照组慢病毒和GV492-DOCK4重组过表达慢病毒包装成功。

**1.6 DOCK4过表达慢病毒感染 Neuro-2a 细胞和稳定细胞构建** Neuro-2a细胞均匀铺在12孔细胞培养板中, 次日待细胞密度达到75%时, 选择感染复数(multiplicity of infection, MOI) 10、50和100进行慢病毒感染Neuro-2a细胞实验。将Neuro-2a细胞分为GV492-对照组和GV492-DOCK4组, 分别将GV492-对照慢病毒和GV492-DOCK4过表达慢病毒加入新鲜配制的Neuro-2a生长培养基中。慢病毒感染 24 h后更换为Neuro-2a生长培养基, 继续培养 48 h, 期间在荧光显微镜下观察慢病毒的感染效率和细胞生长状态。48 h后将原有细胞培养基移除, 分别加入含嘌呤霉素(5 mg $\cdot\text{L}^{-1}$ )的新鲜配制的Neuro-2a生长培养基进行筛选, 1 d后将细胞培养基更换为含嘌呤霉素(5 mg $\cdot\text{L}^{-1}$ )的Neuro-2a生长培养基继续进行为期2周的细胞筛选。荧光显微镜下观察Neuro-2a细胞生长状态, 若细胞生长状态良好且表达绿色荧光, 则提示稳定GV492-对照组慢病毒细胞和GV492-DOCK4过表达慢病毒细胞初步筛选成功。

**1.7 RT-qPCR法检测各组 Neuro-2a 细胞中 DOCK4 mRNA 表达水平** 收集各组细胞, 采用TRIzol法分别提取RNA, 测定RNA浓度, 再取1  $\mu\text{g}$  RNA进行逆转录合成cDNA。反应体系如下: 8  $\mu\text{L}$ 焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)-H<sub>2</sub>O, 1  $\mu\text{L}$  oligo-dT, 1  $\mu\text{g}$  RNA, 70  $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 之后迅速将PCR管置于冰上冷却; 5 $\times$ 反应缓冲液 4  $\mu\text{L}$ , 2.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP混合溶液 4  $\mu\text{L}$ , RNase抑制剂 1  $\mu\text{L}$ , 逆转录酶 1  $\mu\text{L}$ , 将上述溶液分装至含RNA的PCR管中, 轻轻吹打混匀后, 将PCR管置于PCR仪上, 42  $^{\circ}\text{C}$ 、1 h, 70  $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min。取出cDNA置于冰上, 随后进行RT-qPCR反应, 反应体系(20  $\mu\text{L}$ ): ddH<sub>2</sub>O 5  $\mu\text{L}$ , 2 $\times$ 反应缓冲液 10  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物(混合) 4  $\mu\text{L}$ , cDNA 1  $\mu\text{L}$ 。RT-qPCR反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 60  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 共40个循环。以甘油醛-3-磷酸

脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法检测Neuro-2a细胞中DOCK4 mRNA表达水平,实验重复3次。

**1.8 Western blotting法检测各组Neuro-2a细胞中DOCK4蛋白表达水平** 采用放射免疫沉淀法(含蛋白酶抑制剂)裂解细胞收集细胞上清进行BCA蛋白定量。取GV492-对照组和GV492-DOCK4组20  $\mu\text{g}$ 蛋白样品,Western blotting法检测2组Neuro-2a细胞中DOCK4蛋白表达水平。电泳条件:蛋白上样后上层浓缩胶恒压50 V、30 min,下层分离胶恒压100 V、120 min。随后去除胶采用湿转法将胶上的蛋白转移至PVDF膜上,转膜条件:250 mA、4  $^{\circ}\text{C}$ 转膜120 min。转膜完成后采用快速封闭液室温封闭3 min,30 min后采用含吐温-20三乙醇胺缓冲液(tris-buffered saline with Tween-20, TBST)洗膜3次,每次10 min。加入对应DOCK4或GAPDH一抗后于4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日回收一抗,采用TBST洗膜3次,每次10 min,室温孵育二抗60 min,采用TBST洗膜3次,每次10 min,采用化学发光剂使条带显影。若在相对分子质量225 000处出现特异性条带,则提示Neuro-2a细胞中DOCK4蛋白表达成功。以GAPDH为内参,采用Image J软件对条带进行灰度值分析,计算Neuro-2a细胞中DOCK4蛋白表达水平。DOCK4蛋白表达水平=DOCK4蛋白条带灰度值/GAPDH蛋白条带灰度值,实验重复3次。

**1.9 统计学分析** 采用Graphpad Prism 8.0统计软件进行统计学分析。各组细胞中DOCK4 mRNA和蛋白表达水平以 $\bar{x}\pm s$ 表示,所得数据均符合正态分布,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SNK- $q$ 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 DOCK4过表达慢病毒载体构建** 通过NCBI中搜索DOCK4(Gene ID: 9732)序列设计引物,在载体GV492多克隆位点处选择2个核酸限制性内切酶BamH I和Age I的酶切位点进行双酶切,将PCR扩增的DOCK4基因连接至携带gcGFP/嘌呤霉素的慢病毒GV492载体上,见图1A。GV492-DOCK4过表达重组质粒的基因片段长度约为691 bp,与预期结果一致,见图1B。对GV492-DOCK4质粒进行测序,将测序成功的DNA序列与设计的DOCK4

序列进行对比,两者的DNA序列完全匹配,表明DOCK4序列成功克隆至GV492载体中,PCR鉴定和测序结果提示GV492-DOCK4慢病毒载体构建成功,见图1C。

**2.2 慢病毒感染和DOCK4过表达Neuro-2a细胞构建** GV492-对照组慢病毒和GV492-DOCK4过表达慢病毒的滴度分别为 $2.5\times 10^8\text{ TU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $2.5\times 10^8\text{ TU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;根据 $\text{MOI}=100$ ,取相应病毒量感染Neuro-2a细胞,72 h后加入嘌呤霉素( $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )筛选24 h,随后采用半量嘌呤霉素( $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )对细胞继续筛选2周,在荧光显微镜下观察到GV492-对照组慢病毒和GV492-DOCK4过表达慢病毒感染的Neuro-2a细胞生长状态良好且表达绿色荧光,表明稳定转染的GV492-对照组细胞和GV492-DOCK4过表达细胞构建成功。见图2。

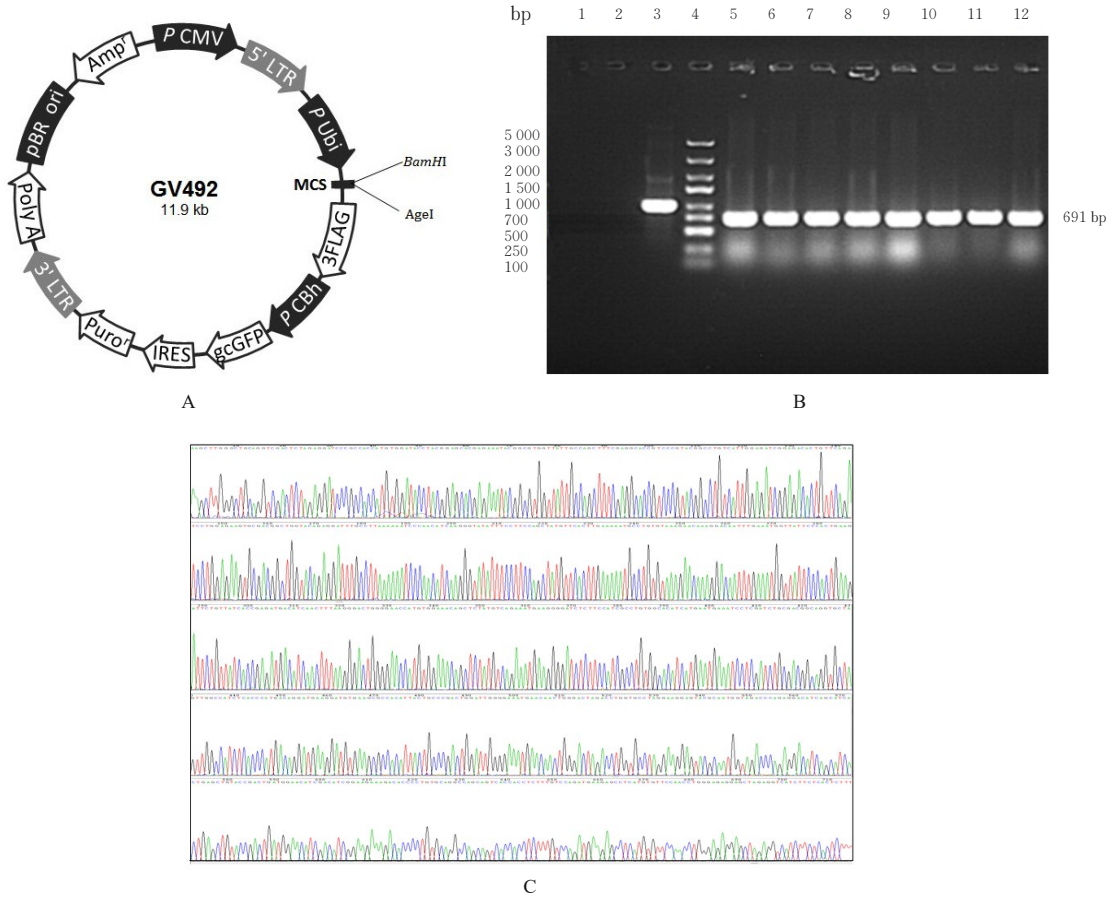
**2.3 2组Neuro-2a细胞中DOCK4 mRNA表达水平** 与GV492-对照组( $1.07\pm 0.13$ )比较,GV492-DOCK4组Neuro-2a细胞中DOCK4 mRNA表达水平( $2.26\pm 0.27$ )明显升高( $P<0.01$ )。见图3。

**2.4 2组Neuro-2a细胞中DOCK4蛋白表达水平** 2组细胞在相对分子质量225 000处出现特异性条带,提示Neuro-2a细胞中DOCK4蛋白表达成功。与GV492-对照组( $1.12\pm 0.14$ )比较,GV492-DOCK4组Neuro-2a细胞中DOCK4蛋白表达水平( $2.17\pm 0.19$ )明显升高( $P<0.01$ )。见图4。

## 3 讨论

IS发病机制复杂,具有高发病率、高复发率和高致残率的特点<sup>[18]</sup>。IS的治疗方法主要是溶栓和取栓,形成再灌注过程,恢复血液流通。目前国际上通用的溶栓药物是重组组织型纤溶酶原激活剂,其治疗黄金时间窗是发病4.5 h以内,许多患者会错过最佳治疗时间,从而发生脑出血或脑缺血再灌注损伤<sup>[19-20]</sup>。再灌注损伤会诱发兴奋性氨基酸介导的钙超载、炎症、线粒体功能障碍和氧化应激损伤,最终导致神经元凋亡和坏死<sup>[21]</sup>。深入研究脑缺血再灌注损伤调节的作用机制,找到IS的治疗靶点至关重要。

DOCK4能够有效调节血管平滑肌细胞迁移,其表达通过血小板衍生因子信号增强<sup>[22]</sup>。研究<sup>[16]</sup>显示:人类动脉粥样硬化组织中DOCK4和SR-B1



A : Construction of DOCK4 over-expression lentivirus vectors; B : PCR identification electrophoregram ; C : GV492-DOCK4 over-expression lentivirus plasmid sequencing diagrams. Lane 1: Blank (ddH<sub>2</sub>O) ; Lane 2: Negative control (GV492 empty plasmid) ; Lane 3: Positive control(GAPDH); Lane 4: Marker; Lane 5-12: GV492-DOCK4 over-expression recombinant plasmids.

图1 DOCK4过表达慢病毒载体的构建和鉴定

Fig. 1 Construction and identification of DOCK4 over-expression lentiviral vectors

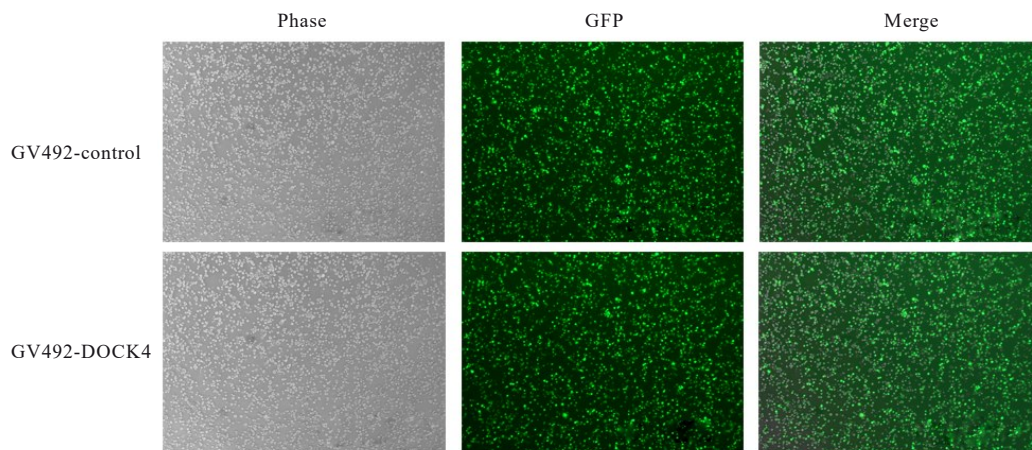
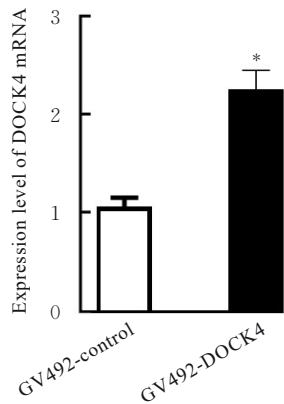


图2 荧光显微镜下观察慢病毒感染后 Neuro-2a 细胞的生长状态和细胞中荧光表达情况(×4)

Fig. 2 Growth status and fluorescence expressions of Neuro-2a cells after lentivirus infection observed under fluorescence microscope(×4)

水平较高, DOCK4能够通过增强 LDL 与 SR-B1 的结合来激活 Ras 相关 C3 肉毒毒素底物 1, 进而促进

SR-B1 内化和 LDL 转运。同时, miR-181d 能够通过靶向 DOCK4 促进糖氧剥夺处理的 Neuro-2a 细胞凋



\* $P < 0.01$  compared with GV942-control group.

图3 RT-qPCR法检测2组 Neuro-2a 细胞中 DOCK4 mRNA 表达水平

Fig. 3 Expression levels of DOCK4 mRNA in Neuro-2a cells in two groups detected by RT-qPCR method

亡<sup>[17]</sup>。上调 DOCK4 表达可以减少氧化应激和细胞死亡, 增强细胞损伤的完全生存能力<sup>[17]</sup>。此外, DOCK4 过表达减轻了 miR-181d 上调引起的活性氧产生增加和细胞死亡, 且 DOCK4 rs2074130 突变与 IS 的疾病易感位点密切相关<sup>[18]</sup>。因此, 根据上述研究证据可推测 DOCK4 在 IS 的发生发展中起重要作用。

Neuro-2a 细胞具有神经细胞特性, 生长繁殖速度快, 被广泛用作 IS 等神经系统疾病的细胞模型构建。本实验选用 Neuro-2a 细胞作为慢病毒感染对象, 并进一步筛选稳定感染的细胞株, 以便于后续采用 GV492-DOCK4 慢病毒稳转细胞系进行 IS 的研究。本研究结果证实: GV492-DOCK4 过表

达慢病毒载体构建成功, 慢病毒感染 Neuro-2a 细胞后可在荧光显微镜下观察到荧光表达, Neuro-2a 细胞中 DOCK4 mRNA 和蛋白成功表达。本研究成功构建了 GV492-DOCK4 慢病毒表达载体, 建立了稳定过表达 GV492-DOCK4 的 Neuro-2a 细胞, 为进一步探讨 DOCK4 在 IS 中的作用机制提供了依据。

#### 利益冲突声明:

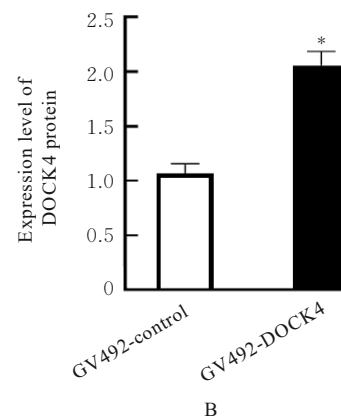
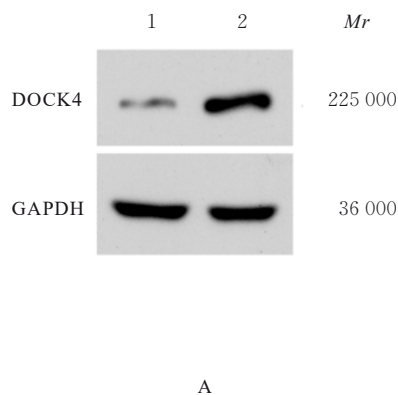
所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

李胜男参与论文撰写, 李胜男、何嘉文和廖科棋参与研究的具体实验, 李友参与研究的整体设计。

#### [参考文献]

- [1] GUO D J, PENG Y H, WANG L J, et al. Autism-like social deficit generated by Dock4 deficiency is rescued by restoration of Rac1 activity and NMDA receptor function[J]. Mol Psychiatry, 2021, 26(5): 1505-1519.
- [2] YAZBECK P, CULLERE X, BENNETT P, et al. DOCK4 regulation of rho GTPases mediates pulmonary vascular barrier function[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2022, 42(7): 886-902.
- [3] ZHANG B, ZHONG X L, SAUANE M, et al. Modulation of the pol II CTD phosphorylation code by Rac1 and Cdc42 small GTPases in cultured human cancer cells and its implication for developing a synthetic-lethal cancer therapy[J]. Cells, 2020, 9(3): 621.
- [4] ABRAHAM S, SCARCIA M, BAGSHAW R D, et al. A Rac/Cdc42 exchange factor complex promotes



Lane 1: GV942-control group; Lane 2: GV942-DOCK4 group. \* $P < 0.01$  compared with GV942-control group.

图4 Western blotting法检测2组 Neuro-2a 细胞中 DOCK4 蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 4 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of DOCK4 protein in Neuro-2a cells into two groups detected by Western blotting method

- formation of lateral filopodia and blood vessel lumen morphogenesis[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7286.
- [5] BOLAND A, CÔTÉ J F, BARFORD D. Structural biology of DOCK-family guanine nucleotide exchange factors[J]. *FEBS Lett*, 2023, 597(6): 794-810.
- [6] KUNIMURA K, URUNO T, FUKUI Y. DOCK family proteins: key players in immune surveillance mechanisms[J]. *Int Immunol*, 2020, 32(1): 5-15.
- [7] THOMPSON A P, BITSINA C, GRAY J L, et al. RHO to the DOCK for GDP disembarking: Structural insights into the DOCK GTPase nucleotide exchange factors[J]. *J Biol Chem*, 2021, 296: 100521.
- [8] GUO D J, YANG X M, GAO M, et al. Deficiency of autism-related gene Dock4 leads to impaired spatial memory and hippocampal function in mice at late middle age[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2023, 43(3): 1129-1146.
- [9] HUANG M Q, LIANG C M, LI S N, et al. Two autism/dyslexia linked variations of *DOCK4* disrupt the gene function on Rac1/Rap1 activation, neurite outgrowth, and synapse development [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 577.
- [10] QIN T F, YANG J, HUANG D Y, et al. DOCK4 stimulates MUC<sub>2</sub> production through its effect on goblet cell differentiation[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(9): 6507-6519.
- [11] LU Y, YU J X, DONG Q P, et al. DOCK4 as a potential biomarker associated with immune infiltration in stomach adenocarcinoma; a database analysis [J]. *Int J Gen Med*, 2022, 15: 6127-6143.
- [12] ALADOWICZ E, GRANIERI L, MAROCCHI F, et al. ShcD binds DOCK4, promotes ameoid motility and metastasis dissemination, predicting poor prognosis in melanoma[J]. *Cancers*, 2020, 12(11): 3366.
- [13] XU X S, HE B, ZENG J Q, et al. Genetic variations in DOCK4 contribute to schizophrenia susceptibility in a Chinese cohort: a genetic neuroimaging study[J]. *Behav Brain Res*, 2023, 443: 114353.
- [14] PARK N, KANG H. BMP-induced microRNA-101 expression regulates vascular smooth muscle cell migration[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(13): 4764.
- [15] BENSON C E, SOUTHGATE L. The DOCK protein family in vascular development and disease [J]. *Angiogenesis*, 2021, 24(3): 417-433.
- [16] HUANG L Z, CHAMBLISS K L, GAO X F, et al. SR-B1 drives endothelial cell LDL transcytosis *via* DOCK4 to promote atherosclerosis [J]. *Nature*, 2019, 569(7757): 565-569.
- [17] LI S N, CHEN S F, WANG Y J, et al. Direct targeting of DOCK4 by miRNA-181d in oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-mediated neuronal injury [J]. *Lipids Health Dis*, 2023, 22(1): 34.
- [18] DELONG J H, OHASHI S N, O'CONNOR K C, et al. Inflammatory responses after ischemic stroke [J]. *Semin Immunopathol*, 2022, 44(5): 625-648.
- [19] ZHU A N, RAJENDRAM P, TSENG E, et al. Alteplase or tenecteplase for thrombolysis in ischemic stroke: an illustrated review [J]. *Res Pract Thromb Haemost*, 2022, 6(6): e12795.
- [20] VAN MOORSEL M V A, DE MAAT S, VERCRUYSSSE K, et al. VWF-targeted thrombolysis to overcome rh-tPA resistance in experimental murine ischemic stroke models [J]. *Blood*, 2022, 140(26): 2844-2848.
- [21] PRAG H A, AKSENTIJEVIC D, DANNHORN A, et al. Ischemia-selective cardioprotection by malonate for ischemia/reperfusion injury [J]. *Circ Res*, 2022, 131(6): 528-541.
- [22] KANG H, DAVIS-DUSENBERY B N, NGUYEN P H, et al. Bone morphogenetic protein 4 promotes vascular smooth muscle contractility by activating microRNA-21 (miR-21), which down-regulates expression of family of dedicator of cytokinesis (DOCK) proteins [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(6): 3976-3986.