

TAGLN2 shRNA 慢病毒载体的构建及其稳定转染细胞系的建立

张育添^{1,2}, 吴海灵², 廖科棋², 梁淑铃¹, 李胜男^{1,2}, 李 友^{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:** 构建针对小鼠脑微血管内皮细胞系 bEnd.3 细胞肌动蛋白结合蛋白 2 (TAGLN2) 基因的慢病毒载体, 并鉴定其沉默作用。**方法:** 依据 TAGLN2 基因编码区设计短发夹 RNA (shRNA) 干扰靶点, 将其扩增产物连接至经 *EcoR* I 和 *Age* I 双酶切线性化的 GV493 慢病毒载体, 构建 GV493-TAGLN2-shRNA 重组慢病毒载体, PCR 法筛选阳性克隆并测序鉴定。将 GV493 对照慢病毒载体和 GV493-TAGLN2-shRNA 重组慢病毒载体分别转染至 HEK293T 细胞, 收集纯化上清并测定病毒滴度。以感染复数 (MOI) 为 100, 分别感染 bEnd.3 细胞, 感染 48 h 更换含 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 嘌呤霉素的完全培养基筛选培养 14 d。采用倒置荧光显微镜观察 2 组细胞中绿色荧光蛋白 (GFP) 表达情况, 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测 2 组细胞中 TAGLN2 mRNA 表达水平, Western blotting 法检测 2 组细胞中 TAGLN2 蛋白表达水平。**结果:** 荧光显微镜观察, 转染后的 HEK293T 细胞中有强烈的 GFP 荧光信号, 表明慢病毒包装体系构建成功。GV493 对照慢病毒的滴度为 $5\times 10^{11}\text{ TU}\cdot\text{L}^{-1}$, TAGLN2 干扰慢病毒滴度为 $6\times 10^{11}\text{ TU}\cdot\text{L}^{-1}$ 。转染后, 2 组 bEnd.3 细胞均呈现明显 GFP 荧光信号, 稳转细胞系构建成功。RT-qPCR 法, 与 GV493 对照组比较, GV493-TAGLN2-shRNA 组细胞中 TAGLN2 mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.01$)。Western blotting 法, 与 GV493 对照组比较, GV493-TAGLN2-shRNA 组细胞中 TAGLN2 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$)。**结论:** 成功构建靶向 bEnd.3 细胞 TAGLN2 基因的慢病毒载体, 其可高效沉默 TAGLN2 表达。

[关键词] 肌动蛋白结合蛋白 2; 稳定转染细胞系; 慢病毒; bEnd.3 细胞; 短发夹 RNA

[中图分类号] R392 **[文献标志码]** A

Construction of TAGLN2 shRNA lentiviral vector and establishment of its stably transfected cell line

ZHANG Yutian^{1,2}, WU Hailing², LIAO Keqi², LIANG Shuling¹, LI Shengnan^{1,2}, LI You^{1,2}

(1. Guangdong Provincial 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 a lentiviral vector targeting the transgelin-2 (TAGLN2) gene in the

[收稿日期] 2025-05-19 **[录用日期]** 2025-07-14

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81571157); 广东省卫健委医学科研基金项目 (A2022139, A2023193); 广东省湛江市科技局科技攻关计划项目 (2021B01370)

[作者简介] 张育添 (1999—), 男, 广东省梅州市人, 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)

©《吉林大学学报 (医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

mouse brain microvascular endothelial cell line bEnd.3 cells, and to identify its silencing effect.

Methods: Short hairpin RNA (shRNA) interference target sites were designed based on the coding region of the *TAGLN2* gene. The amplified products were ligated into the GV493 lentiviral vector linearized by double digestion with *EcoR* I and *Age* I to construct the GV493-TAGLN2-shRNA recombinant lentiviral vector. The positive clones were screened by PCR and identified by sequencing. The GV493 control lentiviral vector and the GV493-TAGLN2-shRNA recombinant lentiviral vector were respectively transfected into the HEK293T cells, and the supernatants were collected and purified, and the viral titers were determined. The bEnd.3 cells were infected with a multiplicity of infection (MOI) of 100. After 48 h of infection, the complete medium containing $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ puromycin was replaced for screening and culture for 14 d. An inverted fluorescence microscope was used to observe the expression of green fluorescence protein (GFP) in the cells in two groups; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of *TAGLN2* mRNA in cells in two groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of TAGLN2 protein in the cells in two groups.

Results: The fluorescence microscope observation results showed that there was a strong GFP fluorescence signal in the transfected HEK293T cells, indicating that the lentiviral packaging system was successfully constructed. The titer of the GV493 control lentivirus was $5 \times 10^{11} \text{ TU} \cdot \text{L}^{-1}$, and the titer of the *TAGLN2* interference lentivirus was $6 \times 10^{11} \text{ TU} \cdot \text{L}^{-1}$. After transfection, the bEnd.3 cells in two groups showed obvious GFP fluorescence signals, indicating that the stable transfected cell lines were successfully constructed. The RT-qPCR results showed that compared with GV493 control group, the expression level of *TAGLN2* mRNA in the cells in GV493-TAGLN2-shRNA group was significantly decreased ($P < 0.01$). The Western blotting results showed that compared with GV493 control group, the expression level of TAGLN2 protein in the cells in GV493-TAGLN2-shRNA group was significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** A lentiviral vector targeting the *TAGLN2* gene in bEnd.3 cells is successfully constructed, which can efficiently silence *TAGLN2* expression.

KEYWORDS Transgelin-2; Stably transfected cell line; Lentivirus; bEnd.3 cell; Short hairpin RNA

肌动蛋白结合蛋白 (transgelin, TAGLN) 2, 也称平滑肌蛋白 (smooth muscle protein, SM) 22- α , 是一种相对分子质量约为 22 000 的钙调蛋白家族成员^[1]。该家族包括 TAGLN1 (即 SM22)、TAGLN2^[2] 和 TAGLN3^[3]。TAGLN2 蛋白定位于细胞质, 其 N 端钙调蛋白样结构域与肌动蛋白微丝 F-actin 特异性结合, 从而参与调控细胞骨架和平滑肌收缩^[4]。

除在平滑肌细胞中高表达外, TAGLN2 也在多种非平滑肌细胞中表达。TAGLN1 和 TAGLN3 的表达则主要局限于平滑肌及脑神经元中^[5-6]。研究^[7-8]表明: TAGLN2 可作为潜在的癌症生物标志物, 其通过抑制肌动蛋白聚合从而抑制肿瘤细胞的运动能力; TAGLN2 下调可通过激活活性氧和核因子 κB (nuclear factor-kappa B, NF- κB) 信号传导途径促进乳腺癌细胞转移。研究^[9]显示: *TAGLN2* 基因参与相分离过程, 可与轴突导向因子 G2 (Netrin G2, *NTNG2*) 和胰岛素样生长因子 2 mRNA 结合蛋白 2 (insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2, *IGF2BP2*) 基因共同构

成预测脑胶质瘤预后的新模型。研究^[10]显示: 在胰腺导管腺癌中, 细胞外信号调节激酶 2 (extracellular signal-regulated kinase 2, ERK2) 与 TAGLN2 相互作用, 随后磷酸化 TAGLN2 的第 145 位丝氨酸残基, 该过程在肿瘤细胞增殖和肿瘤发生中起重要作用。研究^[11-12]显示: 人肺腺癌组织中 *TAGLN2* mRNA 和蛋白表达水平分别上调 14.3 倍及 7.0 倍, 在胰腺癌中其表达水平也明显上调。

目前 TAGLN2 在颅内动脉粥样硬化 (intracranial atherosclerosis, ICAS) 中的作用机制尚不明确。本研究构建 *TAGLN2* 的短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 慢病毒载体, 并建立 bEnd.3-TAGLN2-shRNA 稳定转染细胞系, 以期探讨 *TAGLN2* 在 ICAS 中的作用机制提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 细胞、质粒、主要试剂和仪器 小鼠脑微血管内皮细胞系 bEnd.3 细胞、人胚肾 HEK293T 细胞和感受态大肠杆菌 DH5 α 细胞均购自武汉普诺赛生

命科技有限公司。辅助质粒由上海吉凯基因医学科技股份有限公司提供。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、杜尔贝科改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)和0.25%胰蛋白酶消化液均购自武汉普诺赛生命科技有限公司,限制性核酸内切酶*EcoR* I和*Age* I购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, Taq聚合酶购自上海雅酶生物医药科技有限公司,逆转录预混液购自湖南艾科瑞生物工程有限公司, TAGLN2抗体、 β -actin抗体和山羊抗兔IgG购自武汉三鹰生物技术有限公司,质粒小提试剂盒和胶回收试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司,PCR扩增试剂盒和一步法克隆试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司,嘌呤霉素、放射性免疫沉淀分析缓冲液(radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPA)蛋白裂解液、增强化学发光法(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂盒和蛋白酶抑制剂均购自上海碧云天生物技术股份有限公司, Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司, 反转录试剂盒和 TRIzol 试剂均购自日本 TaKaRa Bio 公司。可调式微量移液器购自德国艾本德股份公司,倒置光学显微镜和倒置荧光显微镜均购自日本 Olympus 公司,实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)仪购自瑞士 Roche 公司,电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司,高速冷冻离心机和凝胶成像仪器均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 细胞培养 bEnd.3 内皮细胞和 HEK293T 细胞均采用 DMEM 培养基(含 10%FBS 及 1%青霉素-链霉素)进行常规培养。细胞培养环境设定为 37℃恒温、5% CO₂饱和湿度的细胞培养箱,每 48 h 进行 1 次传代操作。当细胞生长至融合度达 85%~95% 或培养基颜色由桃红色转为橙黄色时,采用 0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)溶液进行消化处理约 2 min,并通过显微镜观察细胞形态趋于圆形后终止消化。

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)数据库查询 TAGLN2 (Gene ID: 12273)的基因信息。基于国际通用引物设计原则,设计针对 TAGLN2 基因的特异性 shRNA 干扰序列和 RT-qPCR 引物。引物和相应序列均由生工生物工程

(上海)股份有限公司制备。

1.4 TAGLN2 shRNA 慢病毒载体构建和鉴定

扩增 TAGLN2 基因的特异性片段。TAGLN2 shRNA 干扰序列为 F: 5'-GCATTAACACCACG-GACATCT-3', R: 5'-AGATGTCCGTGGTGT-TAATGC-3'。PCR 反应体系(50 μ L): 各取 2 μ L 正向和反向引物, 1 μ L cDNA 模板, 0.25 μ L Taq DNA 酶, 5 μ L 10 $\times$ Taq PCR 缓冲液, 1 μ L dNTP 混合液, 用无酶水补足至 50 μ L。PCR 反应程序: 94℃变性 30 s, 56℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 共 30 个循环。72℃下进行 2 min 的最终延伸步骤。扩增产物经过纯化后可于 4℃下短期保存。

采用 *EcoR* I 和 *Age* I 限制性内切酶对携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)/嘌呤霉素的慢病毒 GV493 载体进行酶切。酶切反应体系(50 μ L): 41 μ L 去离子水、5 μ L 10 $\times$ 酶缓冲液、2 μ L GV493 DNA (1 g $\cdot$ L⁻¹) 和 *EcoR* I 及 *Age* I 内切酶 (10⁶ U $\cdot$ L⁻¹) 各 1 μ L。按上述顺序依次加入各组分, 使用移液器轻柔吹打混匀后离心, 37℃下孵育 3 h 后过夜。酶切产物经琼脂糖凝胶电泳后, 采用酶切回收试剂盒回收线性化 GV493 载体片段。

采用一步法克隆试剂盒, 将 PCR 法扩增的 TAGLN2 shRNA 片段连接至上述线性化 GV493 载体。反应体系(10 μ L): 1 μ L 外切酶 II, 1 μ L TAGLN2 扩增片段, 2.5 μ L 线性化 GV493 DNA, 2 μ L 5 $\times$ 酶缓冲液, 加入去离子水补足至 10 μ L。吹打混匀后, 37℃下反应 30 min, 冰浴 5 min, 获得 GV493-TAGLN2 重组质粒。

将 10 μ L GV493-TAGLN2 重组质粒和 GV493 空载质粒分别加入至 100 μ L DH5 α 感受态细胞中, 将混合均匀的质粒置于冰上静置 30 min。随后恒定 42℃热激处理 90 s, 迅速转移到冰浴中冷却 2 min。随后将反应混合物转移至无菌 LB 液体培养基中, 于 37℃恒温振荡培养 1 h。培养结束后, 取适量菌液均匀涂布于含有氨苄西林(终浓度 100 mg $\cdot$ L⁻¹)的 LB 固体培养平板表面, 37℃倒置培养 12 h。次日, 从培养箱中拿出培养平板并挑选单菌落, 接种至 3 mL 含抗生素的 LB 液体培养基中, 37℃下摇床培养 12 h。

阳性克隆的 PCR 鉴定体系(20 μ L): 10 μ L 2 $\times$ Taq Master Mix (2 $\times$ Taq 酶预混液)、0.4 μ L Primer-F (上游引物)、0.4 μ L Primer-R (下游引物) 和 1 μ L 甘油菌液模板, 加入去离子水补足至

20 μL 。按顺序依次加入各组分至PCR管,轻弹管壁混匀并短暂离心,确保液体聚集于管底。反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min;循环扩增,共22个循环:94 $^{\circ}\text{C}$,30 s、55 $^{\circ}\text{C}$,30 s、72 $^{\circ}\text{C}$,30 s;最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min。反应结束后,将PCR产物于4 $^{\circ}\text{C}$ 短期保存或长期保存至-20 $^{\circ}\text{C}$ 。经琼脂糖凝胶电泳检测,若在目标基因片段(约22 bp)位置处出现特异性条带,则为携带重组质粒的阳性菌。挑取阳性克隆菌,送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序验证。

1.5 TAGLN2慢病毒包装和滴度测定 常规培养HEK293T细胞至融合度达80%~90%时进行转染操作。配制转染体系A:辅助质粒Helper 1.0型(5 μg)+Helper 2.0型(5 μg)+目标质粒(10 μg)+Opti-MEM无血清培养基(750 μL),室温静置5 min。配制转染体系B:Lipofectamine 2000+Opti-MEM无血清培养基(750 μL)。将2管体系混匀,避光孵育20 min后加入至培养皿中,更换无血清培养基,轻柔水平晃动培养皿3~5次,使复合物均匀分布。于培养箱中孵育4 h后,更换为10 mL DMEM完全培养基,继续培养48 h。于荧光显微镜下观察有绿色荧光的细胞比例超过90%时,收集上清液。于4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 g离心10 min后,经0.45 μm 滤膜过滤后离心,加入磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)重悬病毒沉淀,于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

于病毒转染前24 h,将HEK293T细胞以每孔 1×10^3 个细胞的密度接种至96孔细胞培养板。次日,去除旧培养基,设置3个梯度的病毒稀释倍数(10^{-3} 、 10^{-2} 和 10^{-1}),每孔分别加入100 μL 对应倍数的病毒稀释液(含 10^{-1} 、 10^0 和 10^1 μL 病毒原液),另设仅含培养基的对照孔,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育6~8 h。各孔更换100 μL 新鲜DMEM完全培养基,继续培养72 h。于荧光显微镜下观察各孔GFP荧光表达细胞数,计算病毒滴度。病毒滴度($\text{TU} \cdot \text{L}^{-1}$)=病毒稀释倍数 $\times$ GFP荧光细胞数量/病毒液体积。

1.6 TAGLN2 shRNA慢病毒稳定转染bEnd.3细胞系的建立 将bEnd.3细胞接种至12孔细胞培养板,待细胞融合度达到70%~80%时进行慢病毒感染实验。将bEnd.3细胞分为GV493对照组和GV493-TAGLN2-shRNA组。设定最佳感染复数(multiplicity of infection, MOI)为100,按照计算公式[病毒稀释液体积=(MOI $\times$ 细胞数)/病毒

滴度],计算各孔所需病毒稀释液体积,并向对应孔中加入病毒稀释液。感染24 h后,各孔更换新鲜完全培养基,继续培养48 h。各孔加入含嘌呤霉素($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)完全培养基筛选稳定转染细胞,24 h后更换含嘌呤霉素($5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)新鲜培养基,持续培养14 d。筛选结束后,于荧光显微镜下观察各组细胞GFP表达情况。若细胞生长状态良好且GFP阳性细胞比例超过90%,表明GV493-TAGLN2-shRNA慢病毒已成功整合至bEnd.3细胞基因组,稳定转染细胞系成功建立。

1.7 RT-qPCR法检测2组bEnd.3细胞中TAGLN2 mRNA表达水平 收集稳定转染慢病毒后的2组bEnd.3细胞,加入TRIzol试剂提取总RNA后逆转录合成cDNA后,进行RT-qPCR。反应体系:5 μL 含SYBR Green荧光染料预混液、上下游引物($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各0.2 μL 、1 μL cDNA模板,加入无酶水补足至10 μL 。反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火/延伸30 s,共40个循环。引物序列:TAGLN2 F:5'-ATGG-ACCCCATAGATAACAGCA-3', R:5'-GAGTAG-ATGATAAGGGCTGCAAC-3'; β -actin F:5'-AG-AAGATCTGGCACCACAC-C-3', R:5'-TACG-ACCAGAGGCATACAGG-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算2组细胞中TAGLN2 mRNA表达水平。

1.8 Western blotting法检测2组bEnd.3细胞中TAGLN2蛋白表达水平 收集2组bEnd.3细胞,使用含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液冰上裂解细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min,取上清液为总蛋白样本。按比例加入上样缓冲液后,100 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中煮沸5 min。随后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离蛋白(浓缩胶80 V,分离胶120 V),随后采用湿转法300 mA转膜90 min。将膜取出后,加入脱脂牛奶封闭60 min,用含吐温的Tris缓冲盐溶液(Tris-buffered saline with Tween, TBST)洗膜3次,每次5 min。加入 β -actin一抗(1:1 000稀释)和TAGLN2一抗(1:1 000稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜。次日回收一抗,用TBST洗膜3次,每次5 min。加入对应二抗,室温摇床孵育60 min, TBST洗膜3次,每次5 min。滴加ECL化学发光显影液,于凝胶成像系统中曝光显影。采用Image J软件分析目的蛋白条带灰度值,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 9.0 软件进行统计学分析。2 组 bEnd. 3 细胞中 *TAGLN2* mRNA 及蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间样本均数比较采用两独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *TAGLN2* shRNA 慢病毒载体的构建 经测

序鉴定, *TAGLN2* shRNA 干扰序列成功插入载体质粒, 且与设计序列完全一致, 无碱基缺失或错配。表明实验成功构建 GV493-*TAGLN2* 慢病毒载体。见图 1。

2.2 *TAGLN2* shRNA 慢病毒滴度测定 按“1.5”步骤中方法操作, 依次进行病毒梯度稀释和分组转染。转染后测定结果显示: GV493 对照慢病毒的滴度为 5×10^{11} TU $\cdot$ L $^{-1}$, GV493-*TAGLN2*-shRNA 慢病毒滴度为 6×10^{11} TU $\cdot$ L $^{-1}$ 。见图 2。

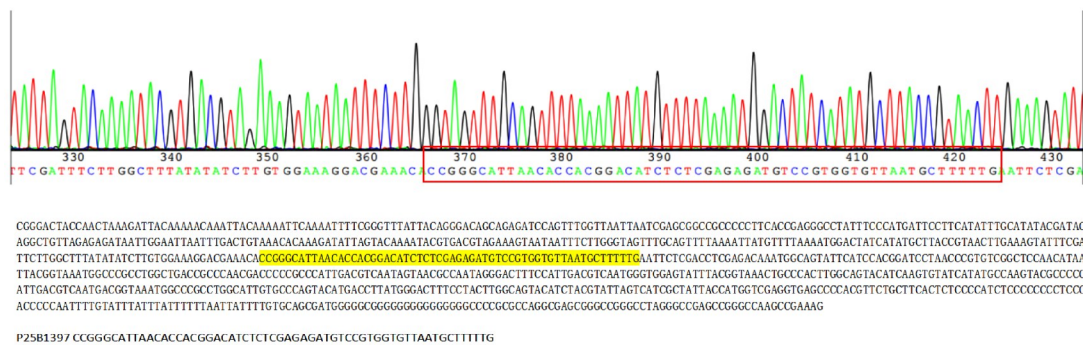


图1 GV493-*TAGLN2*-shRNA 慢病毒质粒测序图

Fig. 1 Sequencing map of GV493-*TAGLN2*-shRNA lentiviral plasmid

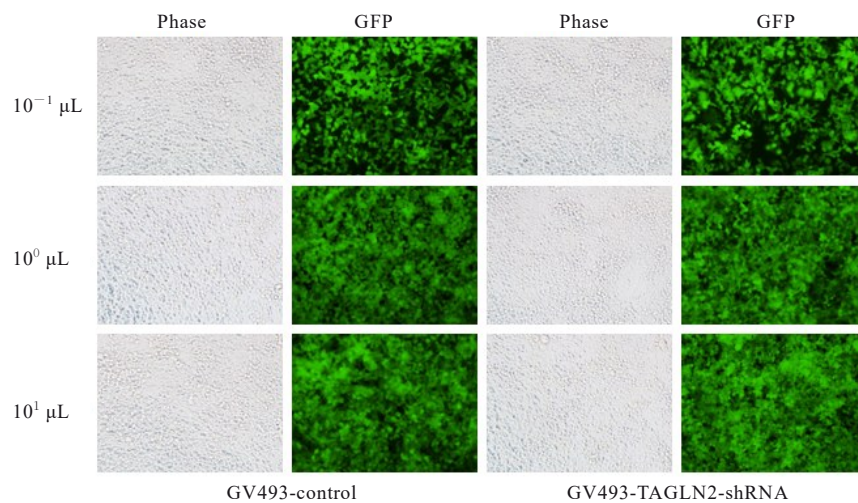


图2 荧光显微镜下各组 HEK293T 细胞中 GFP 表达情况($\times 10$)

Fig. 2 Expressions of GFP in HEK293T cells in various groups under fluorescence microscope($\times 10$)

2.3 2 组慢病毒稳定转染 bEnd. 3 细胞系建立 将 GV493 对照慢病毒和 GV494-*TAGLN2*-shRNA 慢病毒分别转染 bEnd. 3 细胞, 荧光显微镜结果显示: GV493 对照组和 GV493-*TAGLN2*-shRNA 组细胞中均出现较强的 GFP 荧光表达。见图 3。

2.4 2 组 bEnd. 3 细胞中 *TAGLN2* mRNA 表达水平 GV493 对照组细胞中 *TAGLN2* mRNA 表达

水平为 1.02 ± 0.24 , GV493-*TAGLN2*-shRNA 组细胞中 *TAGLN2* mRNA 表达水平为 0.18 ± 0.13 。与 GV493 对照组比较, GV493-*TAGLN2*-shRNA 组细胞中 *TAGLN2* mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.01$), *TAGLN2* 基因沉默效率为 82.4%。

2.5 2 组 bEnd. 3 细胞中 *TAGLN2* 蛋白表达水平 GV493 对照组细胞中 *TAGLN2* 蛋白表达水平为

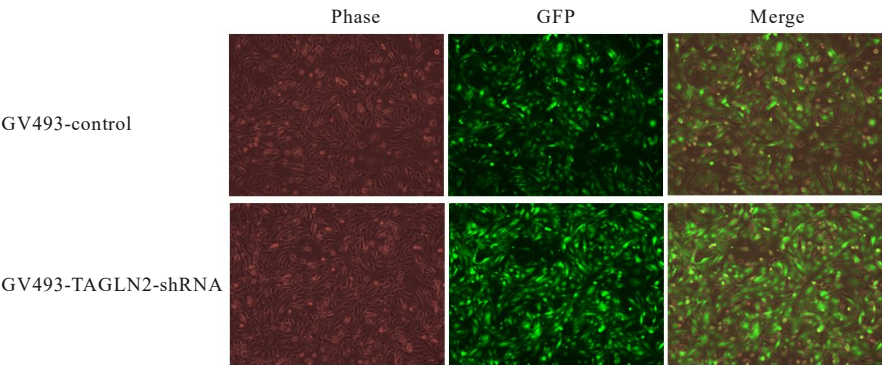
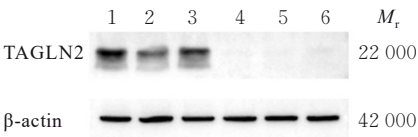


图3 荧光显微镜下慢病毒感染后2组细胞中GFP表达情况(×10)

Fig. 3 Expressions of GFP in cells in two groups after lentivirus infection under fluorecence microscope (×10)

1.00±0.19, GV493-TAGLN2-shRNA 组细胞中 TAGLN2 蛋白表达水平为 0.26±0.19。与 GV493 对照组比较, GV493-TAGLN2-shRNA 组细胞中 TAGLN2 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$)。见图 4。



Lane 1—3:GV493 control group; Lane 4—6:GV493-TAGLN2-shRNA group.

图4 2组细胞中TAGLN2蛋白表达电泳图

Fig. 4 Electrophoregram of expression of TAGLN2 protein in cells in two groups

3 讨论

ICAS 是一种严重威胁脑血管健康的慢性疾病, 是全球范围内缺血性卒中的核心致病因素。ICAS 病理演变过程涉及多重病理生理机制, 包括血管内皮功能失调、持续炎症反应、氧化应激失衡及细胞程序性死亡等环节, 这些过程相互交织, 共同驱动疾病的进展^[13]。ICAS 与血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 之间存在紧密的病理关联。在 ICAS 进展中, 血管内皮细胞功能受损, 细胞间紧密连接结构遭到破坏, 导致 BBB 通透性增加, 屏障功能削弱。这使得血液循环中的大分子物质、炎性介质和免疫活性细胞得以透过 BBB 异常渗透至脑实质, 引发级联神经炎症反应, 并最终导致神经元结构与功能的不可逆损伤^[14]。

TAGLN2 在心血管方面的作用也有相关报道。研究^[15]表明: TAGLN2 可通过磷酸化肌球蛋白轻

链相关机制参与洛伐他汀诱导的内皮细胞抗血管生成作用, 为理解血管生成提供了新的途径。研究^[16]显示: 微小 RNA-133a (micro RNA-133a, *miR-133a*) 直接与 TAGLN2 mRNA 的 3'非翻译区 (3'-untranslated region, 3'-UTR) 结合, 并在转录和翻译水平抑制其表达; 通过 TAGLN2 敲除揭示其通过 Caspase-8 凋亡途径调节缺氧诱导的细胞凋亡。临床研究^[17]表明: 与健康受试者比较, 急性冠状动脉综合征患者血小板中 TAGLN2 水平升高 2 倍以上。近期组学分析研究^[18]还确定了 TAGLN2 是早期脑卒中复发相关的蛋白质标志物之一。

bEnd. 3 细胞是构建体外 BBB 模型的常用细胞, 可用于模拟 BBB 在不同病理状态下的变化, 从而探讨相关因素对其通透性的影响及机制^[19-20]。目前, TAGLN2 在 bEnd. 3 细胞中未有缺血和缺氧疾病模型的构建及相关报道, 故本实验选用 bEnd. 3 细胞进行慢病毒感染及后续观测。

本研究测序结果证实了 GV493-TAGLN2 慢病毒表达载体的成功构建。感染 bEnd. 3 细胞后, 荧光显微镜下可见明显荧光信号。RT-qPCR 法和 Western blotting 法结果显示: 与 GV493 对照组比较, GV493-TAGLN2-shRNA 组 bEnd. 3 细胞中 TAGLN2 mRNA 和蛋白表达水平均明显降低, 提示所构建的慢病毒干扰载体可对 TAGLN2 实现高效的靶向干扰作用。

综上所述, 本研究成功构建了 GV493-TAGLN2-shRNA 慢病毒载体, 建立了稳定低表达 TAGLN2 的 bEnd. 3 细胞模型, 为后续深入探讨 TAGLN2 在 ICAS 中的作用机制和潜在治疗靶点提供了实验基础。

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:

张育添参与研究设计、论文撰写和修改, 吴海灵、廖科棋和梁淑铃参与实验操作及数据分析, 李胜男和李友参与实验设计及论文审阅。

[参考文献]

- [1] YE Y S, JIA Y Y, LI W. TAGLN: a stiffness-driven prognostic biomarker for metastatic colorectal cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2025, 26(1): 54.
- [2] YAN X L, WU J J, TI H B, et al. Decoding TAGLN2 in cancer: the molecular linchpin bridging actin remodeling, immune dysregulation and therapeutic challenges[J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 321(Pt 2): 146062.
- [3] ARNAUD L, BENECH P, GREETHAM L, et al. APOE4 drives inflammation in human astrocytes *via* TAGLN3 repression and NF- κ B activation[J]. *Cell Rep*, 2022, 40(7): 111200.
- [4] MENG T, LIU L C, HAO R F, et al. Transgelin-2: a potential oncogenic factor[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(6): 101042831770265.
- [5] CAMORETTI-MERCADO B, FORSYTHE S M, LEBEAU M M, et al. Expression and cytogenetic localization of the human SM22 gene (*TAGLN*) [J]. *Genomics*, 1998, 49(3): 452-457.
- [6] MORI K, MUTO Y, KOKUZAWA J, et al. Neuronal protein NP25 interacts with F-actin[J]. *Neurosci Res*, 2004, 48(4): 439-446.
- [7] LEUNG W K C, CHING A K K, CHAN A W H, et al. A novel interplay between oncogenic PFTK1 protein kinase and tumor suppressor TAGLN2 in the control of liver cancer cell motility[J]. *Oncogene*, 2011, 30(44): 4464-4475.
- [8] YANG L, HONG Q, XU S G, et al. Downregulation of transgelin 2 promotes breast cancer metastasis by activating the reactive oxygen species/nuclear factor- κ B signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(5): 4045-4258.
- [9] LV L, ZHANG X, LIU Y J, et al. Three liquid-liquid phase separation-related genes associated with prognosis in glioma [J]. *Pharmgenomics Pers Med*, 2024, 17: 171-181.
- [10] KIM I G, LEE J H, KIM S Y, et al. Hypoxia-inducible transgelin 2 selects epithelial-to-mesenchymal transition and γ -radiation-resistant subtypes by focal adhesion kinase-associated insulin-like growth factor 1 receptor activation in non-small-cell lung cancer cells[J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(11): 3519-3531.
- [11] RHO J H, ROEHRL M H A, WANG J Y. Tissue proteomics reveals differential and compartment-specific expression of the homologs transgelin and transgelin-2 in lung adenocarcinoma and its stroma[J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(12): 5610-5618.
- [12] SUN Y, HE W W, LUO M, et al. Role of transgelin-2 in diabetes-associated pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(30): 49592-49604.
- [13] WANG Y, MENG R, LIU G, et al. Intracranial atherosclerotic disease [J]. *Neurobiol Dis*, 2019, 124: 118-132.
- [14] RITZ K, DENSWIL N P, STAM O C G, et al. Cause and mechanisms of intracranial atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2014, 130(16): 1407-1414.
- [15] XIAO Y, LI Y H, HAN J, et al. Transgelin 2 participates in lovastatin-induced anti-angiogenic effects in endothelial cells through a phosphorylated myosin light chain-related mechanism[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e46510.
- [16] LI A Y, YANG Q, YANG K. miR-133a mediates the hypoxia-induced apoptosis by inhibiting TAGLN2 expression in cardiac myocytes[J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 400(1): 173-181.
- [17] SZELENBERGER R, JÓŹWIAK P, KACPRZAK M, et al. Variations in blood platelet proteome and transcriptome revealed altered expression of transgelin-2 in acute coronary syndrome patients[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(11): 6340.
- [18] ZHANG C Y, LIU Y, ZHU H M, et al. Potential protein signatures for recurrence prediction of ischemic stroke[J]. *J Am Heart Assoc*, 2024, 13(5): e032840.
- [19] XIE Y Y, LU Y W, YU G R. The protective effects of hyperoside on Ang II-mediated apoptosis of bEnd.3 cells and injury of blood-brain barrier model *in vitro* [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2022, 22(1): 157.
- [20] HELMS H C, ABBOTT N J, BUREK M, et al. *In vitro* models of the blood-brain barrier: an overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2016, 36(5): 862-890.