

应用 RNA 干扰技术体外抑制脂蛋白脂肪酶基因的表达

刘明¹, 赵铁强¹, 洗勋德¹, 高松¹, 范江霖², 黄薇¹, 刘国庆¹

(1. 北京大学心血管研究所 分子心血管学教育部重点实验室, 北京市 100083;

2. 日本筑波大学医学院病理系心血管病研究室, 日本筑波 305-0031)

[关键词] 病理学与病理生理学; 脂蛋白脂肪酶基因的 RNA 干扰; RNA 干扰; 脂蛋白脂肪酶; 短发夹 RNA; 基因表达; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 给探讨脂蛋白脂肪酶基因作为动脉粥样硬化基因治疗靶点提供实验基础。方法 利用 RNA 干扰技术在细胞水平抑制脂蛋白脂肪酶基因的表达, 根据人脂蛋白脂肪酶基因设计靶序列短发夹 RNA, 构建重组干扰质粒 pSIREN-DNR-shRNA, 将干扰质粒与人脂蛋白脂肪酶真核表达质粒 pCDNA3-hLPL 以脂质体方法共转染 COS-7 细胞, 通过实时荧光定量聚合酶链反应、Western blot 和活性检测等方法判断脂蛋白脂肪酶基因抑制的效果。结果 转染干扰质粒的细胞中脂蛋白脂肪酶 mRNA、蛋白表达以及酶活性均明显降低, 抑制率可达 70% 以上。结论 所选靶序列可以有效抑制细胞中脂蛋白脂肪酶基因的表达, 为进一步的体内研究奠定了基础。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

In Vitro Inhibition of Lipoprotein Lipase Gene Expression by RNA Interference

LIU Ming¹, ZHAO Tie-Qiang¹, XIAN Xun-De¹, GAO Song¹, FAN Jiang-Lin², HUANG Wei¹, and LIU Guo-Qing¹

(1. Institute of Cardiovascular Science, Key Laboratory of Molecular Cardiology, Ministry of Education, Peking University, Beijing 100083, China; 2. Cardiovascular Disease Laboratory, Department of Pathology, Institute of Basic Medical Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8575, Japan)

[KEY WORDS] RNA Interference; Lipoprotein Lipase; Short Hairpin RNA; Gene Expression; Atherosclerosis; Polymerase Chain Reaction; Western Blot

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the potential inhibition of lipoprotein lipase (LPL), the rate limiting enzyme in hydrolyzing plasma triglyceride, in cultured cells by RNA interference technique, which would be further explored as a new way for intervention of atherosclerosis. **Methods** Two target sequences were designed according to human LPL sequence information and cloned into a plasmid expressing desirable small hairpin RNA (shRNA) in mammalian cells. This plasmid was co-transfected with LPL expressing plasmid into COS-7 cells. Real time polymerase chain reaction (PCR), Western blot and enzyme activity assay were carried out to determine the inhibition of LPL gene expression.

Results Compared with the control cells, more than 70% inhibition of LPL gene expression in cells co-transfected with shRNA was observed at the levels of mRNA, protein and enzymatic activity. **Conclusion** Expression of LPL gene can be efficiently inhibited in vitro by RNAi technique. These results are informative for further study in vivo.

脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)是血浆甘油三酯代谢的核心酶,其在动脉粥样硬化中的作用机制尚不完全清楚,但有研究表明动脉壁的脂蛋白脂肪酶高表达可促进动脉粥样硬化发展,因此有人提出抑制动脉壁脂蛋白脂肪酶作为动脉粥样硬化治疗的新靶点^[1]。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指双链 RNA 诱导同源 mRNA 降解从而导致基因表达抑制的现象。研究表明,用双链 RNA

或短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)导入真核细胞或动物体内能成功抑制相应基因的表达^[2-4]。由此我们设想,动脉壁的脂蛋白脂肪酶基因表达有可能通过 RNA 干扰技术抑制,从而减少动脉粥样硬化。本研究利用 shRNA 在细胞水平抑制脂蛋白脂肪酶基因的表达,以期在体内实验奠定基础。

1 材料与方法

1.1 短发夹 RNA 表达质粒的构建与转染

COS-7 细胞培养基为含 100 ku/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM 加 10% 胎牛血清,细胞在 5% CO₂、37℃条件下培养。

[收稿日期] 2004-04-09 [修回日期] 2005-01-10

[作者简介] 刘明,硕士研究生,研究方向为脂蛋白代谢相关基因的功能,电话为 010-82801589, E-mail 为 Michaelliu@vip.sohu.net。赵铁强,医学博士,主治医师,主要从事血脂和动脉硬化的研究,电话为 010-82801589, E-mail 为 tqzhao@bjmu.edu.cn。通讯作者刘国庆,长江学者特聘教授,研究方向为血脂和动脉粥样硬化的关系,联系电话为 010-82802769, E-mail 为 georgeliu@bjmu.edu.cn。

针对人脂蛋白脂肪酶 mRNA 设计 2 条靶序列: 5'-TGT ATG AGA GTT GGG TGC C-3' 和 5'-CAT TGG AGA AGC CAT CCG T-3'。参照文献[4], 针对增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP) 设计 1 条靶序列: 5'- CCA CTA CCT GAG CAC CCA G-3', 作为阴性对照和检验 RNA 干扰系统有效性的指标。根据以上靶序列, 合成 3 对 67 bp 的寡核苷酸双链, 包括两端的酶切位点、转录起始核苷酸 G、靶序列的正义和反义链、形成发夹的 9 个核苷酸以及转录终止信号 Poly T。将 3 对寡核苷酸双链用 T4DNA 连接酶分别连接到 pSIREN-DNR 形成 shRNA 重组质粒 pSIREN-DNR-shRNA1, 2, 3。电转 DH5 α E. Coli。在 LB+ampicillin 平板挑取单克隆菌落, 小提质粒 DNA 经酶切和测序验证, 用 QIAGEN plasmid Midi Kit 纯化用于转染 COS-7 细胞。表达人脂蛋白脂肪酶的质粒 pCDNA3-hLPL 和表达增强型绿色荧光蛋白的质粒 pCDNA3-EGFP 为我实验室构建, 纯化方法同上。

质粒转染: 分为 shRNA1、shRNA2 和 shRNA3 3 组, 每组 3 个样品, 分别表达脂蛋白脂肪酶的 2 个 shRNA 和增强型绿色荧光蛋白的 1 个 shRNA。在 12 孔板上用脂质体转染剂 lipofectamine 2 000(Invitrogen) 将目的基因表达质粒和 shRNA 表达质粒共转染 COS-7 细胞, 方法按照脂质体试剂说明书进行, 每孔两种质粒各 0.75 μ g。转染 48 h 后观察 EGFP 荧光或检测 LPL 基因表达。

1.2 实时荧光定量聚合酶链反应

刮取细胞用 TRizol 试剂 (Invitrogen) 提取总 RNA, 逆转录-聚合酶链反应逆转录成 cDNA。LPL 扩增的上游引物为 5'-GAG ATT TCT CTG TAT GGC ACC-3'; 下游引物为 5'-CTG CAA ATG AGA CAC TTT CTC-3'; 内对照基因为 GAPDH。

1.3 Western blot 检测

方法及溶液配制均参照文献[5]。细胞样品用 100 μ L 50% heparin-sepharose 4 $^{\circ}$ C 振荡孵育 2 h 后离心弃上清, 沉淀用样品缓冲液重悬, 95 $^{\circ}$ C 加热 5 min 后上样。使用 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 一抗为鼠抗人 LPL 单抗(1:2 000), 同时使用鼠抗人 GAPDH 单抗作为内对照(1:10 000), 二抗为辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠多抗, 发光采用 ECL 底物 LumiGLO(Sigma Aldrich)。

1.4 脂蛋白脂肪酶活性的测定

采用放射性同位素标记法测定脂蛋白脂肪酶活性, 具体操作参照文献[6]。

1.5 抑制率的计算

从 mRNA 水平、蛋白表达水平和酶活性 3 个层

次分析 LPL 基因的抑制效果, 每个指标的抑制率计算方法为: 抑制率 = (对照组 - 干扰组) / 对照组 \times 100%。增强型绿色荧光蛋白抑制率的计算公式相同, 观测指标是荧光显微镜下 20 个高倍视野的荧光细胞数。

1.6 统计学处理

数值采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 短发夹 RNA 对增强型绿色荧光蛋白基因的干扰效应

短发夹 RNA3 重组质粒和增强型绿色荧光蛋白表达质粒共转染后, 所获得的基因抑制效果如图 1(Figure 1) 所示。在荧光显微镜下计数后, 得出抑制效率为 80%, 说明本试验所用 RNA 干扰系统是有效的。

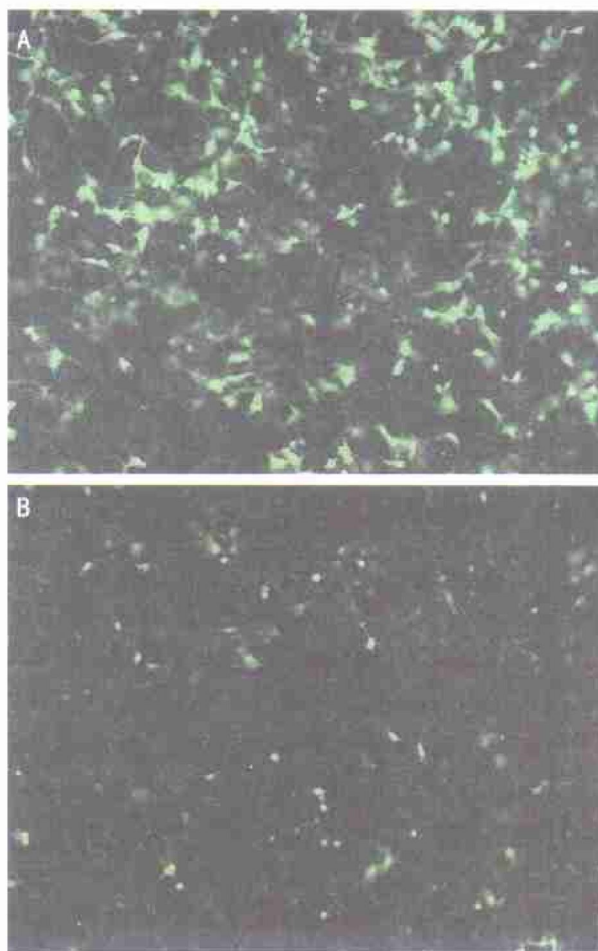


图 1. 短发夹 RNA 抑制增强型绿色荧光蛋白基因的表达

A 为对照组细胞, B 为共转染 pCDNA3-EGFP 和 pSIREN-DNR-shRNA3 质粒细胞。

Figure 1. Enhanced green fluorescent protein expression inhibited by short hairpin RNA

2.2 短发夹 RNA 对脂蛋白脂肪酶基因的干扰效应

通过对 mRNA 的定量分析发现, shRNA1 和 shRNA2 组的 mRNA 水平分别是对照组的 33% 和 27%, 显著低于对照组 ($P < 0.05$), 说明 LPL mRNA 表达受到抑制, 抑制率分别为 67% 和 73%。实验采用 GAPDH 作为参照以确定上样量的均一, 结果显示 shRNA1 和 shRNA2 两个组的蛋白表达量分别是对照组的 42% 和 31%, 其抑制率分别为 58% 和 69% (图 2, Figure 2)。

脂蛋白脂肪酶活性在 shRNA1 和 shRNA2 组分别是 12.8 ± 1.1 u/L 和 10.2 ± 0.9 u/L, 对照组是 36.6 ± 2.7 u/L, 抑制率分别为 65% 和 72%。

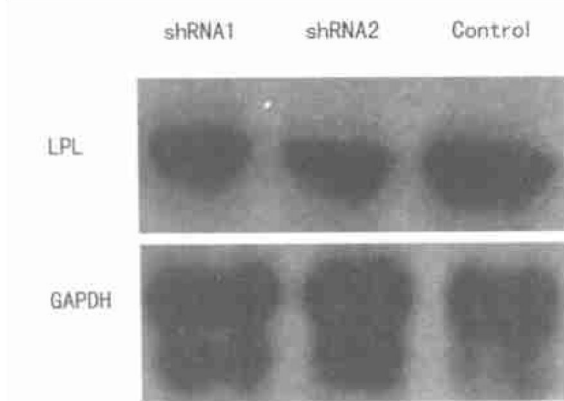


图 2. 短发夹 RNAs 对脂蛋白脂肪酶蛋白表达的抑制

Figure 2. Inhibition of lipoprotein lipase protein expression by short hairpin RNA

3 讨论

已经有众多证据表明, 存在于动脉壁内膜下的脂蛋白脂肪酶能够促进低密度脂蛋白及氧化型低密度脂蛋白与内皮下基质结合, 从而促进动脉粥样硬化的发生和发展^[7,8]; 而肌肉和脂肪组织中的脂蛋白脂肪酶能够水解极低密度脂蛋白和乳糜微粒中的甘油三酯, 并促进高密度脂蛋白生成, 表现出抗动脉粥样硬化作用^[1,9]。因而选择性地抑制动脉壁中脂蛋白脂肪酶的水平, 将有可能成为动脉粥样硬化治疗的一个新靶点。根据这一思路, 我们设想利用 RNA 干扰技术抑制脂蛋白脂肪酶 基因的 表达。RNA 干扰的机制目前还不完全清楚, 其核心是外源的双链 RNA 被切割成 21~23 个核苷酸的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA), siRNA 与核酶复合物结合到靶基因的 mRNA 上, 切割降解 mRNA。早期的 RNA 干扰研究是利用化学合成的方法产生 siRNA, 成本比较高。后来的研究发现, 模仿体内 RNA 的结构, 以质粒为载体能在细胞内表

达具有发夹结构的类似 siRNA 的分子, 即短发夹 RNA (shRNA), 也能导致特异的 RNA 干扰效应^[3]。本研究就是用表达载体来产生 shRNA, 诱导目的基因的抑制, 通过 EGFP 阳性对照和脂蛋白脂肪酶基因抑制的结果来看, 所用的方法是成功的。本实验共设计了 4 条针对脂蛋白脂肪酶 mRNA 的靶序列, 其中两条没有抑制效果(结果未给出)。从功能角度分析, 最有效的靶序列获得了 72% 的脂蛋白脂肪酶基因抑制效果。

根据目前对 RNA 干扰的认识, 还不能预知针对哪一段基因会产生最大的基因抑制效果, 因此不论是化学合成法还是体外转录法, 都需要设计多条靶序列, 通过试验来筛选。国内 RNA 干扰研究刚刚开展, 多数用于观察对报告基因的抑制效应, 如绿色荧光蛋白、荧光素酶等, 用于功能性基因的研究还比较少。本研究从 mRNA、蛋白表达以及酶活性 3 个层次, 对 shRNA 抑制脂蛋白脂肪酶基因表达来进行评价, 所得结果基本一致, 说明针对脂蛋白脂肪酶的基因敲下是可行的, 为下一步的实验奠定了基础。

如何将载体导入靶组织或细胞, 也是在 RNA 干扰实验中需要考虑的一个问题。转染的效率很大程度上制约 RNA 干扰效果, 我们使用脂质体方法经过优化后, 获得了 70% 以上的基因抑制效果, 既说明实验的成功, 也提示还有改进的余地。因此, 应当构建基于病毒载体的 RNA 干扰系统, 提高转染效率, 在能表达脂蛋白脂肪酶的原代细胞乃至动物体内进行脂蛋白脂肪酶基因 RNA 干扰的研究。

[参考文献]

- [1] Stein Y, Stein O. Lipoprotein lipase and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2003, **170** (1): 1-9
- [2] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 2002, **296** (5567): 550-553
- [3] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 2001, **15** (2): 188-200
- [4] Hasuwa H, Kaseda K, Einarsdottir T, Okabe M. Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats. *FEBS Lett*, 2002, **532** (1-2): 227-230
- [5] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南. 第二版, 北京: 科学出版社, 1996; 880-897
- [6] 张爱宏, 刘国庆. 放射性同位素标记法检测脂蛋白脂肪酶活性及其应用. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (6): 573-576
- [7] 吴晓君, 王瑾瑜, 陈明哲, 刘国庆. 家兔动脉壁损伤后野生型脂蛋白脂肪酶的高表达与动脉粥样硬化早期病变形成的关系. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (5): 476
- [8] 全其广, 赵水平. 脂蛋白脂肪酶和冠心病. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (4): 363-365
- [9] Auerbach BJ, Cain W, Ansong M, Newton RS, Saxena U, Bisgaier CL. Lipoprotein lipase greatly enhances the retention of lipoprotein (a) to endothelial cell matrix. *Atherosclerosis*, 1999, **142** (1): 89-96

(此文编辑 朱雯霞)