

靶向载脂蛋白 M 基因小干扰 RNA 表达载体构建及其功能

黄 刚¹, 祝成亮², 潘 峰¹, 刘 芳²

(1. 华中科技大学医院, 湖北省武汉市 430074; 2. 武汉大学生命科学院病毒学国家重点实验室, 湖北省武汉市 430072)

[关键词] 生物工程学; RNA 干扰; 载脂蛋白 M; 小干扰 RNA; 表达载体; 基因表达; 冠心病

[摘要] 目的 设计和构建载脂蛋白 M 基因特异性的小干扰 RNA 体内表达载体, 筛选抑制载脂蛋白 M 表达的有效小干扰 RNA, 并初步探讨载脂蛋白 M 的功能。方法 以载脂蛋白 M 为目的基因, 以产生小干扰 RNA 质粒载体 pSilencerTM 2.1-U6 为表达模板, 细胞内转录合成 4 条小干扰 RNA, 并构建携带荧光素酶报告基因的重组质粒载体 plucF⁺ 载脂蛋白。将重组质粒载体 plucF⁺ 载脂蛋白与产生小干扰 RNA 的质粒 pSilencerTM 2.1-U6 共转染 293T 细胞, 定量测量荧光素酶活性, 初步筛选出抑制荧光素酶表达的有效小干扰 RNA, 然后将小干扰 RNA 转染 L-02, 逆转录聚合酶链反应检测载脂蛋白 M mRNA 的表达, 进一步证实小干扰 RNA 对载脂蛋白 M 表达的抑制效果, 酶联免疫吸附法检测有效小干扰 RNA 对载脂蛋白 A iv、载脂蛋白 B 和载脂蛋白 E 合成和分泌的影响。结果 合成的 4 条小干扰 RNA 中有 2 条抑制荧光素酶表达, 抑制效率分别为 86% 和 91%, 并特异性抑制肝细胞载脂蛋白 M mRNA 的表达; 有效小干扰 RNA 能够有效抑制载脂蛋白 A iv 合成和分泌 ($P < 0.05$), 而载脂蛋白 B 和载脂蛋白 E 的含量无明显改变 ($P > 0.05$)。结论 成功构建并筛选到针对载脂蛋白 M 基因表达的有效小干扰 RNA 质粒, 为研究冠心病的发病机制奠定基础。

[中图分类号] Q81

[文献标识码] A

Construction and Functional Analysis of Short Interfering RNA Expression Vectors of Targeting Gene Apolipoprotein M

HUANG Gang, ZHU Cheng-Liang, PAN Feng, and LIU Fang

(1. Hospital of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074; 2. College of Life Sciences, State Key Laboratory of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

[KEY WORDS] RNA Interfering; Apolipoprotein M; Short Interfering RNA; Expression Vectors; Gene Expression; Coronary Heart Disease

[ABSTRACT] **Aim** To design and construct the expression vector that can express the short interfering RNA (siRNA) against apolipoprotein M (ApoM) gene, screen the effective target sequence of siRNA and explore the function of ApoM.

Methods The four siRNA against ApoM gene were transcript synthesized intracellularly by expressed templates of plasmid vector pSilencerTM 2.1-U6, and the ApoM gene was inserted into the reporter gene in order to construct the recombinant plasmid vector plucF⁺-ApoM. The recombinant plasmid and siRNA producing plasmid were cotransfected into 293T cells and screened out the effective siRNA that inhibiting the expression of luciferase, siRNA was transfected into L-02, the expression of ApoM mRNA was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) to further identify the inhibiting function of siRNA on ApoM expression, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect the effect of effective siRNA on synthesis and secretion of apolipoprotein A iv (ApoA iv), apolipoprotein B (ApoB), apolipoprotein E (ApoE).

Results Two siRNA of the four synthesized siRNA displayed inhibitory effects on the luciferase expression with the inhibitory rate being 86% and 91% respectively, the expression of ApoM mRNA was specially inhibited, effective siRNA could inhibit synthesis and secretion of ApoA iv effectively ($P < 0.05$), while there was no change in ApoB and ApoE secretion ($P > 0.05$).

Conclusion Effective siRNA plasmids against ApoM gene were constructed and screened out successfully which created a favourable condition for exploring the mechanisms of coronary heart disease.

冠心病(coronary heart disease, CHD)是严重威胁人类健康的心血管疾病, 动脉粥样硬化是其主要的

发病因素之一, 载脂蛋白在动脉粥样硬化的形成和发展过程中起着十分重要的作用。在新的载脂蛋白研究中, 1999 年 Xu 等^[1]鉴定、克隆了一个新的高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 特异性载脂蛋白 M (apolipoprotein M, ApoM)。到目前为止, 对于载脂蛋白 M 的生理功能及其在冠心病发病过程中所起的作用不是很清楚。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是一种序列特异性的转

[收稿日期] 2006-12-04 [修回日期] 2007-03-25

[基金项目] 湖北省自然科学基金 (2004ABA166)

[作者简介] 黄刚, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制, 联系电话为 027-63050155, E-mail 为 jianyanhg@163.com。祝成亮, 博士研究生, 主要从事医学病毒学的研究, 联系电话为 027-65150984, E-mail 为 xinchengzhu@126.com。通讯作者刘芳, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为血脂与动脉粥样硬化的关系, 联系电话为 027-68754592, E-mail 为 liufang@126.com。

录后基因沉默现象,它由与靶基因序列同源的双链RNA所诱导,现已成为研究功能基因经济、快速和简便的方法。本实验采用RNA干扰技术,针对载脂蛋白M基因选择四段靶序列,以质粒载体 pSilencerTM 2.1-U6 为模板体内转录合成载脂蛋白M的小干扰RNA(short interfering RNA, siRNA),并研究重组质粒转染 HepG2 细胞对载脂蛋白M mRNA 表达的影响,为进一步探讨载脂蛋白M的生理功能及冠心病的发病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株及细胞系

质粒 pSilencerTM 2.1-U6 购自 Ambion 公司,荧光素酶报告基因质粒 plucF 由本实验室构建,大肠杆菌 *E. Coli* DH5 α 购自 Invitrogen 公司,293T、HepG2 和 L-02 细胞系购自武汉大学典型培养物保藏中心。

1.2 主要试剂

限制性内切酶 BamH iv和 Hind Ⅳ及 T4DNA 连接

酶均购自大连保生物公司,M-MLV 逆转录酶和 TrizolR 购自 Invitrogen 公司,脂质体转染试剂梭华-SofastTM 购自厦门太阳马生物有限公司,凝胶纯化试剂盒购自 MBI 公司,DNA 回收试剂盒购自 Ferments 公司,载脂蛋白 A iv(apolipoprotein A iv, ApoA iv)、载脂蛋白 B(apolipoprotein B, ApoB) 及载脂蛋白 E(apolipoprotein E, ApoE) 酶联免疫吸附检测试剂盒购自温州市东瓯生物工程有限公司。

1.3 小干扰 RNA 转录模板的设计

根据 Genebank 中载脂蛋白M mRNA 的序列(genebank 号为 AF118393),本实验设计了4条不同的 siRNA 片段(表1),每个表达模板为来自载脂蛋白M 基因序列的 19 bp 和其反向互补序列,并将他们分开以便形成 harpin 结构的辅助序列和转录终止序列。在模板每条单链的 5' 端和 3' 端分别引入 BamH iv和 Hind Ⅳ的酶切位点,引物由 Invitrogen 公司合成。

表 1. 载脂蛋白M 小干扰 RNA 靶序列

siRNA	目的基因中的位置	正义链	反义链
siRNA1	637~ 655	5' CTGACCTGTAACITTCATCT 3'	5' GACTGGACATTGAAGTAGA 3'
siRNA2	86~ 104	5' ATTTGGGCAGCTCTGCTCT 3'	5' TAAACCCGTCGAGACGAGA 3'
siRNA3	431~ 449	5' AAGACTGAGCTCTTTTCCA 3'	5' TTCTGACTCGAGAAAAGGT 3'
SiRNA4	658~ 676	5' GTCCCCAGATGGGTACAAT 3'	5' CAGGGGTCTACCCATGITA 3'

1.4 小干扰 RNA 表达载体的构建与鉴定

正义链和反义链引物等体积混合,单链复性形成双链结构,将复性产物和 pSilencerTM 2.1-U6 分别经 BamH iv和 Hind Ⅳ酶切后进行连接,连接产物经电转化法转化感受态 *E. Coli* DH5 α ,筛选出阳性克隆后采用酶切鉴定和测序鉴定。

1.5 plucF-载脂蛋白M 融合质粒的构建与鉴定

载脂蛋白M 引物为上游引物 P1 5'-CTT GGA TCC GAA GAT GTT CCA CCA AAT T-3',下游引物 P2 5'-ATT AAG CTT GGT CAG TTA TTG GAC AGC TCA CA-3',并在 P1 和 P2 两端分别引入 BamH iv和 Hind Ⅳ酶切位点,TrizolR 试剂提取 HepG2 mRNA,采用逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 一步法扩增得到载脂蛋白M 的表达基因,扩增片段大小为 591 bp,将聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR) 产物和 plucF 质粒分别用 BamH iv和 Hind Ⅳ酶切,DNA 回收试剂盒回收后进行连接,连接产物转化感受态 *E. Coli* DH5 α ,

筛选阳性克隆进行 PCR 鉴定、酶切鉴定以及测序鉴定。

1.6 细胞培养及转染

293T 和 L-02 细胞培养在含 10% 热灭活胎牛血清(四季青)的 DMEM(Gibco/Brl) 培养液中。37℃ 恒温培养箱,5% 的 CO₂ 条件下培养。24 孔板每孔细胞含量为 1.0×10^5 个。用梭华-SofastTM 分别将 siRNA 与含荧光素酶报告基因重组质粒 plucF-载脂蛋白M 共转染 293T 细胞。细胞转染加样量为 0.15 μ g 的重组质粒 plucF-载脂蛋白M 和 0.45 μ g siRNA,转染后的细胞在培养 48 h 后行荧光素酶活性检测。

1.7 荧光素酶活性检测

分别将 4 个 siRNA 及表达相同大小的无关 siRNA 与含荧光素酶报告基因重组质粒 plucF-载脂蛋白M 共转染 293T 细胞,转染 48 h 后,将 293T 细胞用预冷的 PBS 溶液洗涤 1~2 次,加入 100 μ L 裂解液裂解细胞约 30 min。取 10 μ L 细胞裂解液与 100 μ L 荧光色素酶底物(已经达到室温)混匀后立即用

Luminometer(Bio-Rad) 进行光密度测定。表达相同大小的无关 siRNA 与重组质粒 plucF-载脂蛋白 M 共转染的结果作为对照,抑制效果以占对照组荧光素酶活性的百分数表示。

1.8 载脂蛋白 M mRNA 表达的检测

采用 RT-PCR 方法检测载脂蛋白 M mRNA 的表达。根据荧光素酶活性检测的结果,将 siRNA 分别转染 L-02 细胞,并以表达相同大小的无关 siRNA 转染 L-02 细胞作为对照组,48 h 后用 TrizolR 试剂提取总 RNA,逆转录成 cDNA,以 P1、P2 作为上下游引物,以 GAPDH 基因作为内对照,扩增片段大小分别为 591 bp 和 376 bp,取 PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶中电泳,紫外照相并扫描结果,以载脂蛋白 M 与 GAPDH 表达水平的比值表示结果。

1.9 小干扰 RNA 表达载体对其他载脂蛋白合成和分泌的影响

6 孔板培养 L-02 细胞,将有效 siRNA 转染 L-02 细胞,以表达相同大小的无关 siRNA 转染 L-02 细胞作为对照组,培养 48 h 后,收集培养液离心,准确吸取 1.5 mL 上清液,冻干后加入 50 μ L 样品稀释液,采用酶联免疫吸附法检测样品中载脂蛋白 A iv、载脂蛋白 B 及载脂蛋白 E 的含量。

1.10 统计学处理

统计学分析采用 SPSS11.0 软件,电泳条带扫描值比值之间的比较用 χ^2 检验,血脂测定值的比较用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光素酶活性的分析

荧光素酶活性检测结果表明,siRNA2、siRNA3 有明显的抑制荧光素酶效应,抑制效率分别为 86% 和 91%,表明这两个靶序列是有效的。siRNA1 和 siRNA4 显示一定的抑制效果,但抑制效率较低,分别为 25% 和 15%。

2.2 小干扰 RNA 对载脂蛋白 M mRNA 表达的影响

根据荧光素酶活性检测结果,采用梭华-Sofast™ 将 siRNA 对照、siRNA1、siRNA2、siRNA3 和 siRNA4 分别转染 L-02 细胞,GAPDH 为 RT-PCR 内参照,分别检测 siRNA1、siRNA2、siRNA3、siRNA4 载脂蛋白 M mRNA 相对含量。结果表明,siRNA1 和 siRNA4 降解载脂蛋白 M mRNA 不明显,抑制效率分别为 23.8% 和 12.5%;而 siRNA2 和 siRNA3 明显降解载脂蛋白 M mRNA 含量,抑制效率分别为 85.2% 和 89.6%,表明 siRNA2 和 siRNA3 能抑制载脂蛋白 M mRNA 的表

达(图 1)。

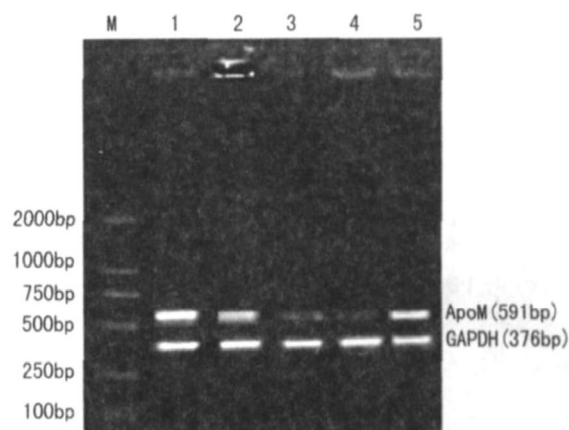


图 1 逆转录聚合酶链反应检测小干扰 RNA 对载脂蛋白 M mRNA 表达的影响 M 为 DNA marker; 1 为 siRNA 对照; 2 为 siRNA1, 3 为 siRNA2, 4 为 siRNA3, 5 为 siRNA4。

2.3 小干扰 RNA 表达载体对其他载脂蛋白合成和分泌的影响

采用梭华-Sofast™ 将 siRNA 对照、siRNA2 和 siRNA3 分别转染 L-02 细胞,酶联免疫吸附法检测载脂蛋白 A iv、载脂蛋白 B 和载脂蛋白 E 在培养液中的含量,结果发现,与 siRNA 对照相比,L-02 细胞转染 siRNA2 和 siRNA3 后载脂蛋白 A iv 合成和分泌明显降低($P < 0.05$),而载脂蛋白 B 和载脂蛋白 E 的含量无明显改变($P > 0.05$,表 2)。

表 2 小干扰 RNA 表达载体对其他载脂蛋白合成和分泌的影响 ($\bar{x} \pm s$, μ mol/L)

组别	载脂蛋白 A iv	载脂蛋白 B	载脂蛋白 E
siRNA 对照	52.6 \pm 0.8	1.86 \pm 0.07	1.82 \pm 0.17
siRNA2	12.8 \pm 0.4 ^a	1.62 \pm 0.05	1.74 \pm 0.21
siRNA3	11.9 \pm 0.5 ^a	1.73 \pm 0.05	1.88 \pm 0.25

a 为 $P < 0.05$, 与 siRNA 对照比较。

3 讨论

大量流行病学与临床数据表明,冠心病是多数发达国家和许多发展中国家成人死亡的主要原因之一,载脂蛋白在冠心病的发病机制中起重要作用。Xu 等^[1]人首次报道鉴定了载脂蛋白 M,它是由 188 个氨基酸组成的糖蛋白,分子质量为 26 kDa,属于 lipocalin 家族。载脂蛋白 M 是 HDLC 的主要成分之一,其 mRNA 表达具有组织特异性,仅在肝脏和肾脏表达^[2,3],目前为止,国内外对于载脂蛋白 M 的研究尚在起步阶段,对其功能尚不甚清楚^[4]。

小干扰 RNA 技术是一项近年来用于基因功能

研究的新技术,作用方式是通过一段与靶基因 mRNA 互补的 19-21 nt 的寡核苷酸引导,激发细胞内源性酶反应,将转录合成的靶基因 mRNA 特异降解,与反义寡核苷酸、核酶等基因封闭技术相比, RNAi 具有高效和高度特异性等特点^[5-7]。siRNA 的制备目前最常用的方法是化学合成法,但其价格昂贵,且作用时间比较短,受转染试剂的影响较大。本实验采用质粒载体介导的发夹环样 siRNA 生成的方式,该方法的优点在于通过 siRNA 表达质粒的选择标记, siRNA 可更长时间地抑制目的基因表达,此外,相比化学合成来说,其 siRNA 的制备成本大为降低。

小干扰 RNA 通过双链 RNA 与目的 mRNA 相互结合起作用,目的 mRNA 有很多复杂的二级结构,并非设计出来的所有 siRNA 都能与模板结合作用,筛选有效的 siRNA 就显得非常关键。本研究以载脂蛋白 M 为目的基因设计了 4 条小干扰 RNA,以 pSilencerTM 2.1-U6 质粒载体为模板,细胞内转录合成 siRNA,同时将载脂蛋白 M 克隆到含有产荧光素酶报告基因的载体 plucF,由于构建的 plucF-载脂蛋白 M 融合质粒的报告基因位于载脂蛋白 M 下游,当载脂蛋白 M mRNA 被降解后,报告基因亦不能得到有效表达,因此可通过检测荧光素酶的活性来检测 siRNA 的效果。本研究将 plucF-载脂蛋白 M 融合质粒与细胞内表达 siRNA 的质粒共转染 293T 细胞,初步筛选出有效的 siRNA 后,将有效 siRNA 转染正常肝细胞系,通过 RT-PCR 检测载脂蛋白 M mRNA 的表达水平,进一步证实 siRNA 对靶基因表达的抑制效果,从而快速地筛选出有效的 siRNA。实验结果表明 siRNA2 和 siRNA3 能够有效抑制载脂蛋白 M 的

表达,其抑制效率在 80%~90%。

为进一步探讨载脂蛋白 M 的功能,本实验将有效 siRNA 转染 L-02 细胞,采用酶联免疫吸附法检测培养液中载脂蛋白 A iv、载脂蛋白 B 和载脂蛋白 E,结果表明通过 siRNA 抑制载脂蛋白 M 的表达后,细胞合成和分泌的载脂蛋白 A iv 水平降低,而对载脂蛋白 B 和载脂蛋白 E 合成和分泌的影响较小,表明载脂蛋白 M 可能参与肝脏 HDLC 的合成和分泌,进而在脂质代谢和转运中起重要作用。

总之,本实验成功构建并筛选出有效的靶向载脂蛋白 M 小干扰 RNA 真核表达载体,并初步研究了其功能,为进一步探讨载脂蛋白 M 的生理功能及冠心病的发病机制打下了稳固的基础。

[参考文献]

- [1] Xu N, Dahlback B. A novel human apolipoprotein (apoM) [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 31 286-290.
- [2] Xu N, Zhang XY, Dong X, Ekstrom U, Ye Q, Nilsson-Ehle P. Effects of platelet-activating factor, tumor necrosis factor, and interleukin 1alpha on the expression of apolipoprotein M in HepG2 cells [J]. *Biochem biophys Res Commun*, 2002, **292**: 944-950.
- [3] Zhang XY, Dong X, Zheng L, Luo GH, Liu YH, Ekstrom U, et al. Specific tissue expression and cellular localization of human apolipoprotein M as determined by in situ hybridization [J]. *Acta Histochem*, 2003, **105** (1): 67-72.
- [4] 祝成亮,刘芳,周新. 载脂蛋白 M 的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (5): 659-661.
- [5] Baulcombe D. RNA silencing [J]. *Trends Biochem Sci*, 2005, **30** (6): 290-293.
- [6] Lipardi C, Wei Q, Paterson BM. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs [J]. *Cell*, 2001, **107** (3): 297-307.
- [7] Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference [J]. *Nature*, 2001, **409** (6818): 363-366.

(此文编辑 许雪梅)