

[文章编号] 1007-3949(2007)15-11-0827-04

• 实验研究 •

靶向血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 基因的 发卡样 siRNA 表达载体的构建及其效应

张社兵, 姜德谦, 欧柏青, 刘虹, 张小炼
(中南大学湘雅二医院心血管内科, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 内科学; 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1; 发卡样 siRNA; RNA 干扰; 人脐静脉内皮细胞

[摘要] 目的 设计合成有效的靶向血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 基因的发卡样 siRNA (shRNA) 表达载体。方法 根据 siRNA 的设计原则, 以血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 为靶基因设计并合成小发卡结构两端配对的 siRNA 寡核苷酸链, 再经变性、复性后形成双链血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 shRNA。采用 DNA 重组技术, 将血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 shRNA 双链与线性化 pGenesit-1 质粒表达载体连接, 脂质体法转染人脐静脉内皮细胞株, 半定量逆转录聚合酶链反应法检测血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 的表达。结果 测序鉴定发现插入的发卡样序列正确, 成功合成了发卡样血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 基因 RNA 干扰表达载体; 靶向血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 基因的发卡样 siRNA 表达载体转染人脐静脉内皮细胞株后, 其凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 的表达显著下调。结论 成功构建了能有效抑制血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 表达的发卡样血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 基因 RNA 干扰表达载体, 为进一步利用 RNA 干扰技术防治动脉粥样硬化提供一种研究基础。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

A Study in Construction of Short Hairpin Small Interfering RNA Expression Vector Target Human Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 Gene and Its Silencing Effect in Human Umbilical Vascular Endothelial Cells

ZHANG She-Bing, JIANG De-Qian, OU Bai-Qing, LIU Hong, and ZHANG Xiao-Lian

(Department of Cardiology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011 Hunan, China)

[KEY WORDS] Lectin-Like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor-1; Short Hairpin siRNA; RNA Interference; Human Umbilical Vascular Endothelial Cells

[ABSTRACT] **Aim** To construct the short hairpin small interfering RNA (shRNA) eukaryotic expression vector specific to human lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) gene and to observe its silencing effect on LOX-1 in human umbilical vascular endothelial cells (hUVEC). **Methods** The pGenesit-1-LOX-1-shRNA expression vector was constructed by gene recombination, then transfected into the cultured hUVEC. At 48 h after transfection, the stable transfection and expression of LOX-1 mRNA in hUVEC were determined by semi-quantitative RT-PCR. **Results** pGenesit-1-LOX-1-shRNA expression vector was successfully constructed. DOTAP-mediated gene transfection of pGenesit-1-LOX-1-shRNA expression vector into hUVEC down regulated the mRNA expression level of LOX-1 gene, as compared with the control group. **Conclusion** The pGenesit-1-LOX-1-shRNA expression vector can inhibit the expression of LOX-1 mRNA in hUVEC, which may be beneficial in searching new gene therapy of atherosclerosis.

氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 在动脉粥样硬化形成和发展过程中起着关键的作用, 而血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 (lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1) 是 ox-LDL 在血管内皮细胞上的主要受体, 它在介导 ox-LDL 对血管内皮细胞的损伤、参与动脉粥样硬化的形成和发展过程中发挥了重要作用。

抑制 LOX-1 的表达将有利于防止动脉粥样硬化的形成。RNA 干扰是一种特异性的基因沉默技术, 能抑制靶基因的转录。本研究通过构建 LOX-1 基因的发卡样 siRNA (short hairpin small interference RNA, shRNA) 真核表达载体, 并检测其对 LOX-1 基因的抑制效应。

[收稿日期] 2007-07-09

[修回日期] 2007-11-03

[作者简介] 张社兵, 博士研究生, 副主任医师, 研究方向动脉粥样硬化及冠心病, E-mail 为 zhangshebing618@163.com。姜德谦, 教授, 博士研究生导师, 研究方向动脉粥样硬化及冠心病。欧柏青, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向动脉粥样硬化及冠心病。

1 材料和方法

1.1 所用酶类

T4 DNA Ligase、BamHI、HindIII、SalI (NEB 公司); Trizol (Molecular Research Center, Inc); 逆转录试剂盒

(RevertAid™ First strand Cdna Synthesis Kit, Fermentas)。

1.2 shRNA 的设计及 pGenesi1-shRNA 的构建

根据 GenBank 提供的 LOX-1 基因序列(OLR1 为 NM_002543),通过 Blast 挑选 2 个长为 19 个碱基的特异性寡核苷酸序列[序列 1(OLR1-1)为 5'-GCA TGC AAT TAT CCC AGG T-3',序列 2(OLR1-2)为 5'-CCT TTG CCT GGG ATT AGT A-3'],分别合成其发卡样两端配对的 siRNA 寡核苷酸链,引物结构为 BamHI+ Sense+ Loop+ Antisense+ 终止信号+ Sall+ HindIII,同时合成互补链,线性化 pGenesi1 质粒表达载体(武汉晶赛生物工程技术有限公司)用 BamHI+ HindIII 双酶切,在 BamHI 和 HindIII 之间设计一个 Sall 的酶切位点(武汉晶赛生物工程技术有限公司合成)。另外还合成阳性对照 GAPDH-shRNA(特异

性寡核苷酸序列为 5'-GTG GAT ATT GTT GCC ATC A-3')和阴性对照 HK-shRNA(特异性寡核苷酸序列为 5'-GAC TTC ATA AGG CGC ATG C-3')。OLR1-1、OLR1-2、GAPDH 及 HK 正义链和反义链序列见表 1。正义和反义链经过变性、复性后形成双链 LOX-1-shRNA。采用 DNA 重组技术,将 LOX-1-shRNA 双链与线性化 pGenesi1 质粒表达载体连接。各取 5 μ L 过夜连接产物转化感受态细胞 DH5a,分别涂布于含 Kanar 抗性(终浓度为 30 mg/L)的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 恒温箱培养过夜。从每个培养皿上各挑取 3 个单克隆菌落接种于 3 mL 含 Kanar 抗性(终浓度为 30 mg/L)的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 恒温摇床(250 r/min)培养过夜。用小提试剂盒小量提取质粒(中鼎公司),并分别用 Sall 做酶切鉴定,1% Agase 凝胶电泳。送转化菌液测序鉴定(大连宝生物工程有限公司)。

表 1. OLR1、GAPDH 及 HK 质粒模板序列

质粒名称	模 板 序 列
OLR1-1	正义链 5'-GATCCGCATGCAATTATCCCAGGTTTCAAGACG ACCTGGGATAATTGCATGCTTTTTTGTGCGACA-3' 反义链 5'-AGCTTGTGCGACAAAAAGCATGCAATTATCCCAGGTCGTCTTGAAACCTGGGATAATTGCATGCG-3'
OLR1-2	正义链 5'-GATCCGCCITTTGCCCTGGGATTAGTAITCAAGACGTAATAATCCCAGGCAAAGGTTTTTGTGCGACA-3' 反义链 5'-AGCTTGTGCGACAAAAACCTTTGCCCTGGGATTAGTACGTCTTGAATACTAATCCCAGGCAAAGGCG-3'
GAPDH	正义链 5'-GATCCGTGGATATTGTTGCCATCATTCAGACGTGATGGCAACAATATCCACTTTTTTGTGCGACA-3' 反义链 5'-AGCTTGTGCGACAAAAAGTGATATTGTTGCCATCACGTCTTGAATGATGGCAACAATATCCACG-3'
HK	正义链 5'-GATCCGACITTCATAAGCGCATGCTTCAAGACGGCATGCGCCTTATGAAGCTTTTTTGTGCGACA-3' 反义链 5'-AGCTTGTGCGACAAAAAGACTTCATAAGCGCATGCGCTCTTGAAGCATGCGCCTTATGAAGTCG-3'

1.3 干扰效率研究

人脐静脉内皮细胞株(细胞代号 CRL-1730, ATCC. USA.)用含 10% 新生小牛血清(中南大学湘雅中心实验室提供)的 RPMI 1640 培养基(GIBCO-BRL 公司)在 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 的培养箱(Thermo Forma, USA)中培养,稳定传代后以 1×10^6 /孔接种于 6 孔板,60% 汇合时进行细胞转染,采用 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen Corporation)转染试剂参照试剂说明书略加改良,每孔 pGenesi1-LOX-1-shRNA 的转染量为 2 μ g,每组设 3 个复孔。转染后 24 h 每孔加入 G418 500 μ g 筛选,48 h 提取细胞总 RNA,经紫外分光光度仪(Beckman DU-640)测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.8~2.0,半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 LOX-1 基因表达,操作按试剂盒说明书进行。RT 反应条件为 70 $^{\circ}$ C 5 min, 25 $^{\circ}$ C 5 min, 25 $^{\circ}$ C 10 min, 42 $^{\circ}$ C 60 min, 70 $^{\circ}$ C 10 min。LOX-1 引物序列上游为 5'-TTA CTC TCC ATG GTG GTG CC-3',下游为 5'-

AGC TTC TTC TGC TTG TTG CC-3',扩增长度 193 bp; GAPDH 引物序列上游为 5'-TCG GAG TCA ACG GAT TTG GTC GTA-3',下游为 5'-ATG GAC TGT GGT CAT GAG TCC TTC-3',扩增长度 521 bp;引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成。LOX-1 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s \rightarrow 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环,然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min; GAPDH 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s \rightarrow 59 $^{\circ}$ C 退火 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环,然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳,以 LOX-1 扩增条带的吸光度值与 GAPDH 条带的吸光度之比作为 LOX-1 mRNA 的表达量。

1.4 统计学处理

每组实验重复 3 次,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 统计软件分析,多个样本均数比较用 One-Way ANOVA,两两比较用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 shRNA 质粒表达载体的鉴定

根据 GenBank 提供的 LOX-1 基因序列, 设计合成 2 个发卡样 LOX-1-siRNA, 并且与线性化 pGenesi1 质粒表达载体连接, 转化连接子, 获得了真核表达质粒的阳性克隆。经酶切鉴定分析, 质粒 pGenesi1 的多克隆位点 (MCS) 为 HindIII-ShRNA-BamHI-U6 Promotor-EcoRI-SalI-XbaI-DraIII。在插入的目的基因片段里, 设计一个 SalI 的酶切位点, 插入在质粒 pGenesi1 的 BamHI 和 HindIII 之间, 且被 SalI 酶切出一条约 400 bp 的 DNA 小带(图 1); 经酶切鉴定分析, 质粒 OLR1-1、OLR1-2 均符合设计要求。测序鉴定显示插入的发卡样序列正确。

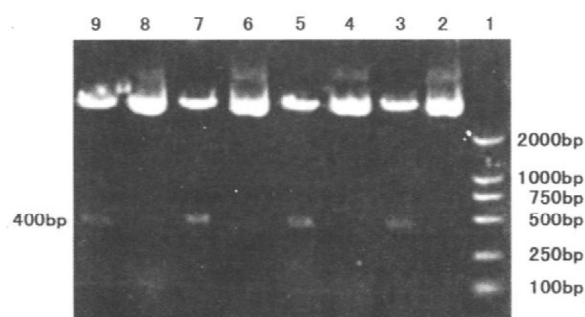


图 1. 质粒及 SalI 酶切后的凝胶电泳图 1 为 Marker, 2 为 OLR1-1, 3 为酶切后 OLR1-1, 4 为 OLR1-2, 5 为酶切后 OLR1-2, 6 为 HK, 7 为酶切后 HK, 8 为 GAPDH, 9 为酶切后 GAPDH。

2.2 pGenesi1-LOX-1-shRNA 细胞转染情况

pGenesi1 转染进入细胞, 为绿色荧光蛋白, 分布在胞质; 未转染进入细胞则无荧光表达(图 2)。

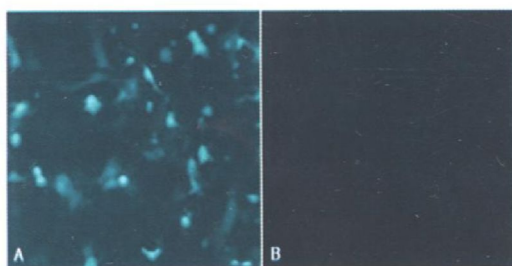


图 2. 质粒转染后荧光显微镜下观察 (10 × 40) A 为质粒转染进入细胞, B 为质粒未转染进入细胞。

2.3 转染后人脐静脉内皮细胞血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 的表达

pGenesi1-LOX-1-shRNA 两组 LOX-1 mRNA 的表达皆明显下调(表 2 和图 3)。

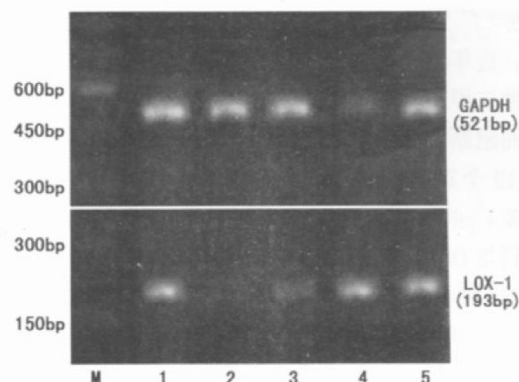


图 3. 2% Agase 凝胶电泳图 M 为 Marker, 1 为未转染 hUVEC 组, 2 为 pGenesi1-LOX-1-shRNA 1 组, 3 为 pGenesi1-LOX-1-shRNA 2 组, 4 为 pGenesi1-GAPDH 组, 5 为 pGenesi1-HK 组。

表 2. 各组 OD 比值比较

分 组	OD 比值
未转染 hUVEC 组	0.7845 ± 0.5845
pGenesi1-LOX-1-shRNA 1 组	0.4442 ± 0.5388 ^a
pGenesi1-LOX-1-shRNA 2 组	0.5880 ± 0.4210 ^a
pGenesi1-HK 组	0.7888 ± 0.5678

a 为 $P < 0.05$, 与未转染 hUVEC 组和 pGenesi1-HK 组比较。

3 讨论

研究表明, LOX-1 在介导动脉粥样硬化的形成过程中起着很重要的作用, 主要通过以下机制: 促进细胞间粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 的产生, 使单核细胞向内皮细胞粘附和聚集^[1]; ④ α -LDL 可以通过 LOX-1 激活蛋白激酶 C, 增加 CD40/CD40L 的表达, 促进粥样斑块的炎症反应^[2]; ④促进平滑肌细胞和巨噬细胞吞噬脂质进而形成泡沫细胞^[3], 而泡沫细胞是动脉粥样斑块特征性的标志之一; 参与 fas 介到的细胞凋亡, 促进血管内皮细胞损伤^[4]。另外, α -LDL 还可以通过 LOX-1 途径增加血管内皮细胞释放乳酸脱氢酶, 使内皮细胞存活率下降^[5]。以上亦提示 LOX-1 可以成为防治动脉粥样硬化的有效靶点, 抑制 LOX-1 将有可能防止动脉粥样硬化的形成。

RNA 干扰技术是采用双链 RNA 分子在 mRNA 水平的基因沉默技术^[6,7], 具有高度的序列特异性和抑制基因的高效性, 因此它成为了功能基因组研究中的重要工具。特别在基因敲除、基因治疗、基因表达调控等方面具有广阔的应用前景。有关运用 RNA 干扰技术行 LOX-1 基因沉默的研究文献报道较少, 已往相关的研究大多采用 LOX-1 的单克隆抗体或使用 LOX-1 阻断剂聚肌苷酸和爱兰苔胶来阻断

LOX-1 的作用,但它们都不是在基因水平上进行阻断。近年有学者通过构建 LOX-1 的 siRNA 抑制非对称性二甲基精氨酸对巨噬细胞 LOX-1 的上调作用,进而阻断泡沫细胞的形成^[8]。本研究挑选了 2 条各含 19 个寡核苷酸序列的干扰片段,它们分别位于 LOX-1 mRNA 的 231~249 和 193~211 处,Blast 分析它们与 ORL1 有 100% 的同源性,其中片段 1 与其它 mRNA 最多有 16 个碱基一致,片段 2 与其它 mRNA 最多有 18 个碱基一致,说明片段 1 比片段 2 具有较好的特异性。由于发卡样双链 RNA 干扰表达载体转染入细胞后,在细胞自身的 RNA 聚合酶 III 的作用下,可以释放出双链靶序列的 siRNA 短片段,干扰相应的 mRNA 转录及使蛋白表达水平下调。我们通过实验合成了 2 个 LOX-1 基因的发卡样双链 siRNA 短片段,并成功构建 2 个 LOX-1-siRNA 真核表达载体,将它们转染入 HUVEC 后,能显著抑制 LOX-1 mRNA 的表达,其中又以 pGenesil-1-LOX-1-shRNA 1 抑制作用更强,从而为下一步从基因水平上防治动脉粥样硬化的形成提供了一个有效的工具。

[参考文献]

- [1] Inoue K, Arai Y, Kurihara H, Kita T, Sawamura T. Overexpression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 induces intramyocardial vasculopathy in apolipoprotein E-null mice [J]. *Circ Res*, 2005, **97** (2): 176-184.
- [2] Li D, Liu L, Chen H, Sawamura T, Mehta JL. LOX-1, an oxidized LDL endothelial receptor, induces CD40/CD40L signaling in human coronary artery endothelial cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (5): 816-821.
- [3] Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, Minami M, Moriaki H, Murase T, et al. Expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesion [J]. *Circulation*, 1999, **99** (24): 3110-117.
- [4] Imanishi T, Hano T, Sawamura T, Takarada S, Nishio I. Oxidized low density lipoprotein potentiation of Fas-induced apoptosis through lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in human umbilical vascular endothelial cells [J]. *Circ J*, 2002, **66** (11): 1060-064.
- [5] 朱惠莲, 侯孟君, 李燕, 郑佩英, 凌文华. 氧化型低密度脂蛋白经血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 途径诱导血管内皮细胞损伤[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (4): 383-386.
- [6] Fire A, Xu S, Montgomery M K, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, **391** (6669): 806-811.
- [7] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. *Nature*, 2001, **411** (6836): 494-498.
- [8] Smirnova IV, Kajstura M, Sawamura T, Goligorsky MS. Asymmetric dimethyl-arginine upregulates LOX-1 in activated macrophages: role in foam cell formation [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, **287**: H782-H790.

(此文编辑 文玉珊)

•读者•作者•编者•

郑重道歉

由于责任编辑工作疏忽,致使我刊 2007 年第 9 期第 641~654 页与第 8 期第 641~654 页重复,给文章刊发在这些页码范围内的作者带来不便,我刊深表遗憾,并郑重向这些文章的作者道歉。此事的发生,说明我刊编校人员有加强学习提高工作责任心的必要。在今后的编校工作中,认真负责,精益求精,把我刊越办越好。

编辑部
2007-11-26