

RNA 干扰下调小鼠心肌细胞可溶性环氧化物水解酶的表达

杜广胜^{1,2}, 文 渊¹, 马业新¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院心内科, 湖北省武汉市 430030;

2. 石河子大学医学院一附院心内科, 新疆石河子市 832000)

[关键词] 心肌细胞; 可溶性环氧化物水解酶; RNA 干扰

[摘要] 目的 构建含有可溶性环氧化物水解酶基因特异性的 RNA 干扰序列 pSUPER retro neo 质粒载体, 选择性下调小鼠心肌细胞可溶性环氧化物水解酶的表达, 筛选出抑制效果最明显的表达质粒。方法 构建 2 条靶向可溶性环氧化物水解酶基因的特异性小干扰 RNA 质粒载体(EH-1 和 EH-2), 以含非特异性小干扰 RNA 编码序列的质粒载体为阴性对照(pCN 组), 用 FuGENE HD 将质粒转染入原代培养的小鼠心肌细胞, 并设空白对照组, 转染后通过半定量 RT-PCR 和 Western Blotting 法, 检测可溶性环氧化物水解酶的 mRNA 和蛋白表达情况。结果 与空白对照组、阴性对照组和 EH-1 组相比, 质粒 EH-2 使心肌细胞可溶性环氧化物水解酶 mRNA 和蛋白的相对表达量明显下调(分别为 0.202 ± 0.017 和 0.212 ± 0.029 , $P < 0.01$)。结论 构建了特异性小干扰 RNA 质粒表达载体, 利用 RNA 干扰技术成功下调了原代培养的心肌细胞中可溶性环氧化物水解酶的表达, 为进一步进行心肌细胞的 RNA 干扰研究奠定了基础。

[中图分类号] Q81

[文献标识码] A

Knockdown of Soluble Epoxide Hydrolase by RNA Interference in Mice Cardiomyocytes

DU Guang-Sheng^{1,2}, WEN Yuan¹, and MA Ye-Xin¹

(1. Department of Cardiology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China; 2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Medical College, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

[KEY WORDS] Cardiomyocytes; Soluble Epoxide Hydrolase; RNA interference

[ABSTRACT] **Aim** To construct the soluble epoxide hydrolase (sEH) gene-specific recombinant vectors pSUPER retro neo, and selectively knockdown the expression of sEH in mice cardiomyocytes by RNA interference (RNAi), and to select the plasmids having the best silence effect to sEH. **Methods** Two pairs of siRNA that target at sEH gene were designed, and to construct the siRNA expression vectors specific to sEH gene (EH-1 and EH-2). There were plasmids carrying a nonspecific siRNA coding sequence (pCN) as the negative control group and the blank control group involved.

Then the plasmids were transfected into primary cultured mice cardiomyocytes by FuGENE HD. The mRNA and protein expressions of sEH were analyzed by RT-PCR and Western Blotting respectively. **Results** The expressions of mRNA and protein of sEH in EH-2 group (0.202 ± 0.017 and 0.212 ± 0.029 , $P < 0.01$) were significantly decreased compared with that of blank control group, negative control group, and EH-1 group. **Conclusion** Recombinant expression vectors have been constructed, and RNA interference can selectively knockdown sEH expression in cultured cardiomyocytes.

This lays a foundation for further research of RNAi on cardiomyocytes.

环氧二十碳三烯酸(epoxyeicosatrienoic acids, EET)具有扩张血管、降低血压等多种保护心血管系统的作用,但 EET 半衰期短,经可溶性环氧化物水

解酶(soluble epoxide hydrolase, sEH)代谢,迅速降解为生物活性低的二羟基衍生物。当心肌细胞、内皮细胞受损时,可致细胞内 EET 水平降低,同时细胞

[收稿日期] 2011-01-07

[作者简介] 杜广胜,博士,副主任医师,主要从事冠心病的防治、介入心脏病学的研究, E-mail 为 dugsh@163.com。通讯作者马业新,博士,主任医师,教授,博士研究生导师,主要研究方向为冠心病的防治、介入心脏病学和心肌力学, E-mail 为 drmayexin@sina.cn。文渊,博士,主治医师,主要从事介入心脏病临床及基础研究, E-mail 为 wwentj@163.com。

内 sEH 水平明显增高,而此时抑制 sEH 的表达,则可使降低的 EET 水平得以提高,从而缓解心肌和内皮细胞的损伤^[1-3]。可见,如果能抑制 sEH 表达,就能减少 EET 降解,增加体内 EET 水平,从而缓解高血压、炎症反应以及心肌受损等^[4-6]。本研究试图通过 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)来抑制小鼠原代心肌细胞 sEH 的表达,为进一步探索利用基因沉默技术缓解心肌病变创造条件。

1 材料与方法

1.1 主要材料

出生 0~3 天的 BALB/c 小鼠乳鼠(同济医学院实验动物中心)。I 型胶原酶(Gibco, Invitrogen 公司),高糖型 DMEM 培养基和胎牛血清(FBS)(Hyclone 公司),胰蛋白酶(Gibco 公司),PBS 溶液、 α -actin 抗体以及 SABC 免疫组织化学试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-BrdU)、FuGENE HD(罗氏公司),RIPA 蛋白裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(江苏碧云天),兔抗 sEH 蛋白多克隆抗体(美国 Santa Cruze),辣根过氧化物酶偶联羊抗兔 IgG 抗体(北京中杉公司),总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂、PCR MasterMix(北京全式金公司),质粒 pSUPER retro neo + GFP(Oligo 公司)为氨苄抗性筛选环型载体[两酶切位点为 EcoR I 和 Hind III,可进行酶切鉴定,通过绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)表达情况,对转染效率进行评价];限制性内切酶 Hind III、EcoR I 及 T₄DNA 连接酶(TaKaRa 公司),质粒提取试剂盒(美国 Promega 公司)。根据干扰序列设计并合成编码含小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 序列的 DNA 单链,由上海 Invitrogen 公司合成,序列测定也由 Invitrogen 公司完成,通用阴性对照质粒 pCN 为 Invitrogen 公司产品。

1.2 pSUPER-siRNA 重组质粒的构建

根据 GenBank 中 sHE mRNA (NM_007940.3) 序列,设计 2 条 siRNA 序列, EH-1 为 5'-GCATAAAGC-CACTGAAAT-3', EH-2 为 5'-GCAGCTGATTGGAGAG-TAA-3',合成含编码 siRNA 序列的 DNA 单链。将寡核苷酸单链退火连接,用 T₄DNA 连接酶将双链寡核苷酸与 pSUPER 载体定向连接;取连接产物,按常规方法转化入感受态细胞大肠杆菌 DH5 α ,涂布于含 100 mg/L 氨苄西林的平板,置 37℃ 孵箱培养,24 h 后观察菌落生长情况。挑取单克隆菌落,摇菌过夜,提取质粒,分别命名为 EH-1 和 EH-2 质粒。进行 EcoRI

与 Hind III 双酶切初步鉴定,由 Invitrogen 公司测序进一步验证。

1.3 原代心肌细胞的培养及质粒转染

取出生 3 天以内的 BALB/c 小鼠乳鼠心脏,剪碎,用 0.125% 胰蛋白酶、0.1% I 型胶原酶,反复吹打后静置于 37℃ 恒温水浴槽中消化 7 min,反复消化,直到将组织完全消化完毕。收集每次消化后的细胞上清液,离心,重悬于培养基中,以差速贴壁法纯化心肌细胞,在培养液中加入 5-BrdU 以抑制残余的非心肌细胞增殖,置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中,每天换液 1 次,48 h 后用免疫组织化学 SABC 法检测 α -actin 的表达,以鉴定心肌细胞。转染时严格按照 Fugene HD 说明进行操作,即首先把质粒加入到 DMEM 培养基中使质粒终浓度为 20 mg/L,然后再加入 Fugene HD 转染试剂 80 mL/L,使质粒和 Fugene HD 转染试剂的质量与体积比例保持 1:4,注意尽量减少 Fugene HD 与塑料壁的接触时间,以免使 Fugene HD 失活。在室温下孵育 15 min,以利于质粒-Fugene HD 复合物的充分形成,然后加入细胞培养皿中,轻摇混匀,继续将心肌细胞置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中。48 h 后,观察一次绿色荧光蛋白表达水平变化。设立空白对照组(未行转染的正常心肌细胞)和阴性对照组(pCN 组),余两组为 EH-1 组和 EH-2 组,分别转染 EH-1 和 EH-2 质粒。

1.4 绿色荧光蛋白检测评价转染效率

转染后 48 h,用倒置相差显微镜先后在自然光和紫外激发光源经 GFP2 特异性滤色片滤光后观察 6 孔板内心肌细胞,两人同时独立估计相同视野下绿色荧光细胞数与自然光下总细胞数百分比,取其平均值作为转染效率。

1.5 RT-PCR 分析可溶性环氧化物水解酶 mRNA 的表达

转染后 48 h,用 Trizol 一步法抽提收集各组细胞总 RNA。取 RNA 1 μ g 逆转录合成 cDNA,以 20 μ L RT 反应体系,42℃ 30 min,85℃ 5 min。再取逆转录产物 3 μ L 进行 PCR 循环。以 GAPDH 为内参,标化 sHE mRNA 的表达。sEH 引物为上游 5'-GAAAGGATTACACAACATGCATTG-3',下游 5'-GGC-CAGGCTGTCTCTCTTGTC-3',产物大小为 70 bp。GAPDH 引物为上游 5'-ACCACAGTCCATGCCAT-CAC-3',下游 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3',产物大小为 452 bp。PCR 扩增参数为 94℃ 5 min,94℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 1 min,共 35 个循环,72℃ 延长 10 min。每组取 8 μ L PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析系统摄像分析。

1.6 Western Blotting 分析可溶性环氧化物水解酶蛋白的表达

转染后 48 h, 按说明书操作步骤进行细胞蛋白质提取, BCA 法测定蛋白质浓度, 取约 20 μ L 蛋白质用于 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转移至 PVDF 膜后, 用含 3% 牛血清白蛋白和 5% 脱脂奶粉溶液的 TBS-T 缓冲液室温封闭 2 h, 兔抗 sEH 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBS-T 溶液洗膜 3 次。室温下相应加入羊抗兔 IgG 抗体孵育 2 h, 同法洗膜 4 次, 用增强型化学发光试剂显色, X 线片曝光显影, 凝胶成像分析系统摄像分析。

1.7 统计学处理

采用 SPSS11.0 统计软件处理数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用 t 检验或方差分析。

2 结果

2.1 siRNA 表达质粒的鉴定及测序

pSUPER 载体有 EcoR I 与 Hind III 两酶切位点, 经双酶切鉴定分析, 质粒 EH-1 和 EH-2 均符合设计要求(图 1), 经测序证实重组质粒中插入的碱基序列与设计序列一致。

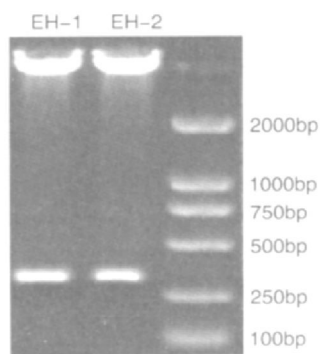


图 1. 重组质粒的 Hind III、EcoR I 双酶切鉴定

Figure 1. Check for the presence of positive clones of recombinant plasmid by cutting with Hind III & EcoR I

2.2 原代心肌细胞纯度鉴定

原代培养的心肌细胞经免疫组织化学 SABC 法检测, α -actin 的表达呈阳性, 高倍镜下计数心肌细胞纯度约为 94%, 可满足转染需要(图 2)。

2.3 绿色荧光蛋白转染效率评价

用 EugeneHD 转染 48 h 后, 结果显示质粒转染效率为 75% ~ 80%, 说明已将质粒成功转染导入了原代培养的小鼠心肌细胞(图 3)。

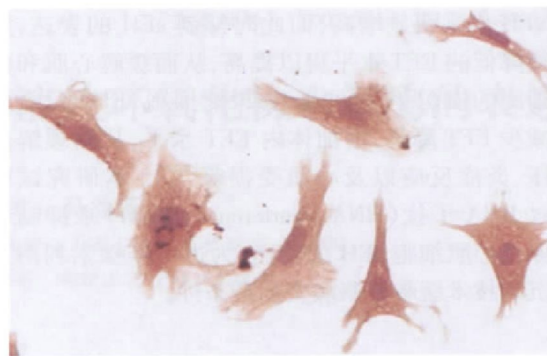


图 2. 原代心肌细胞 α -actin 染色鉴定 ($\times 400$)

Figure 2. Cardiomyocytes identified by anti- α -actin antibody immunostaining

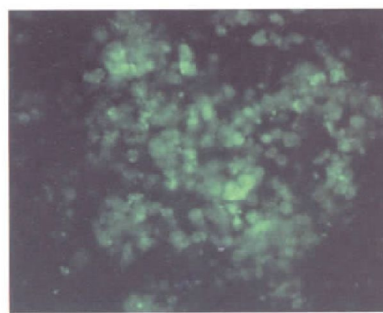


图 3. 心肌细胞转染质粒 48 h 后绿色荧光蛋白表达 ($\times 100$)

Figure 3. Green fluorescent protein expressions in the cardiomyocytes detected by fluorescence microscopy 48 h after transfection

2.4 心肌细胞可溶性环氧化物水解酶 mRNA 的表达

转染 48 h 后, 转染质粒 EH-2 组 sEH/GAPDH 比值明显低于 EH-1 组、pCN 组及空白对照组, 说明 EH-2 组 sEH mRNA 的表达水平明显低于其余三组(图 4 和表 1), 其 sEH mRNA 的表达下降 80% ($P < 0.01$)。而转染质粒 EH-1 组 sEH mRNA 表达水平与 pCN 组及空白对照组相比差异无显著性 ($P > 0.05$)。

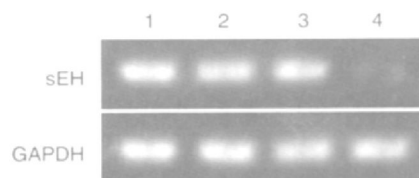


图 4. 转染质粒后各组心肌细胞 sEH mRNA 的表达 1 为空白对照组, 2~4 依次为 pCN 组、EH-1 组和 EH-2 组。

Figure 4. sEH mRNA expression of cardiomyocytes after transfection

2.5 心肌细胞可溶性环氧化物水解酶蛋白的表达

转染 48 h 后, 转染质粒 EH-2 组 sEH/ β -actin 比值明显低于 EH-1 组、pCN 组及空白对照组, 表明 EH-2 组的 sEH 蛋白表达明显低于其余三组 (图 5 和表 1), 其 sEH 蛋白的表达下降 75% ($P < 0.01$), 表明转染质粒 EH-2 产生的抑制 sEH 蛋白表达作用最明显。质粒 EH-1 组 sEH 蛋白表达水平与 pCN 组及空白对照组相比差异无显著性 ($P > 0.05$)。

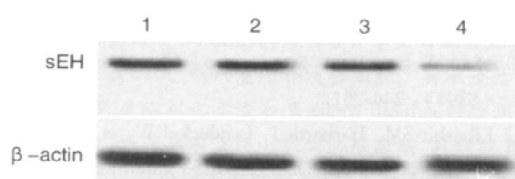


图 5. 转染质粒后各组心肌细胞 sEH 蛋白的表达 1 为空白对照组, 2~4 依次为 pCN 组、EH-1 组和 EH-2 组。

Figure 5. sEH protein expression of cardiomyocytes after transfection

表 1. 转染质粒后各组心肌细胞 sEH mRNA 和蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1. The relative expression of sEH mRNA and protein in cardiomyocytes after transfection

分 组	sEH mRNA	sEH 蛋白
空白对照组	0.965 $\pm$ 0.010	0.865 $\pm$ 0.034
pCN 组	0.943 $\pm$ 0.031	0.854 $\pm$ 0.026
EH-1 组	0.944 $\pm$ 0.028	0.849 $\pm$ 0.022
EH-2 组	0.202 $\pm$ 0.017 ^a	0.212 $\pm$ 0.029 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组及 pCN 组和 EH-1 组比较。

3 讨 论

可溶性环氧化物水解酶 (sEH) 作用于心血管系统的多个环节, sEH 可高度的选择性作用于 EET, 故通过抑制 sEH, 可稳定体内 EET 浓度, 发挥其有益于心血管系统的作用。抑制 sEH 的作用可有效缓解慢性压力超负荷和血管紧张素 II 诱导的心肌肥厚、心肌缺血/再灌注损伤, 减少心肌梗死面积和防止心肌重塑。sEH 作为心血管疾病的治疗靶点已受到关注, 已经有应用抑制剂和基因敲除的方法来抑制 sEH, 以提高细胞内 EET 的浓度缓解心血管病变的相关报道, 而应用 RNA 干扰抑制 sEH 的报道目前尚少^[7-9]。RNA 干扰是一种转录后基因沉默机制, 即 mRNA 被结合后即被降解或被相应的反义 RNA 封闭, 从而阻

止 mRNA 修饰和翻译, 这种 RNA 水平的基因调控具有高度特异性、高效性及低毒性等特点, 微量的 siRNA 就可使目的基因表达显著下降^[10,11]; 故本研究利用 RNA 干扰技术下调心肌细胞中 sEH 蛋白表达, 探索其在心血管疾病治疗中发挥作用的可能性。

在本实验中, 构建靶向 sEH 基因的 siRNA 干扰质粒是关键的一步。设计高效率基因沉默的 siRNA 序列, 主要应遵循以下原则: ①不要针对 5' 和 3' 端的非编码区, 选择起始密码子 100 nt 后较为保守的编码区序列; ②靶序列长度 21 nt, GC 含量应该在 30% ~ 52% 之间, 基本无内部重复序列; ③序列合成后, 退火温度在 45 ~ 65℃, 避免序列 5' 端有 AA 或 3' 端有 TT 而导致转录提前终止; ④避免使用 4 个及以上相同碱基的重复序列; ⑤进行 Blast 比对, 确保 siRNA 序列的特异性^[12]。根据上述原则, 本实验设计并构建了 2 个携带针对 sEH 基因的 siRNA 编码序列的质粒 EH-1 和 EH-2。

另外, 在本实验中培养出了成活率高、状态较好的 BALB/c 小鼠原代心肌细胞, 这是细胞转染的必备前提。原代培养的心肌细胞转染效率过低, 限制了针对心肌细胞基因治疗的研究, 目前常用的质粒转染方法有电穿孔法、磷酸钙和阳离子脂质体如 Lipofectamin 2000 等转染方法, 这些方法存在对细胞损伤较大、可重复性欠佳和转染效率偏低等不足之处。故我们选择了低毒、对细胞损伤较小、血清存在情况下也能有效转染的试剂 Fugene HD, 并摸索出使用不加抗生素的培养基进行细胞培养, 以免降低转染效率; 将质粒和 Fugene HD 转染试剂的比例保持在 1:4; 并在心肌细胞培养的 24 ~ 48 h 内, 来进行细胞转染等方法, 转染效率高达 80%, 为进行靶基因的 RNA 干扰提供了必需的实验基础。将 siRNA 质粒导入原代心肌细胞内后, 观察 sEH 基因表达的变化, 结果表明, 在转染 EH-2 质粒组, sEH 基因的 mRNA 和蛋白表达水平较其余组均显著降低 (分别为 80% 和 75%); 表明本实验成功构建了靶向 sEH 基因的 siRNA 干扰质粒, 并能将质粒高效率的转染入原代小鼠心肌细胞, 并筛选出了下调心肌细胞 sEH 表达效果最好的质粒 EH-2。可见利用 RNA 干扰技术, 能够使心肌细胞内的 sEH 表达明显受到抑制, 使这一特异、高效和低毒的抑制 sEH 的方法, 可以进一步应用于体内、体外的有关心肌受损的实验研究中, 为心肌病变的基因治疗研究提供了新的思路和方法。

[参考文献]

[1] Ai D, Fu Y, Guo DL, et al. Angiotensin II up-regulates sol-

- uble epoxide hydrolase in vascular endothelium in vitro and in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104 (21) : 9 018-023.
- [2] Ai D, Pang W, Li N, et al. Soluble epoxide hydrolase plays an essential role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106 (2) : 564-569.
- [3] Zordoky BNM, Aboutabl ME, El-Kadi AOS. Modulation of cytochrome p450 gene expression and arachidonic acid metabolism during isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in rats [J]. *Drug Metab Dispos*, 2008, 36 (11) : 2 277-286.
- [4] Gross GJ, Nithipatikom K. Soluble epoxide hydrolase: a new target for cardioprotection [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2009, 10 (3) : 253-258.
- [5] Motoki A, Merkel MJ, Packwood WH, et al. Soluble epoxide hydrolase inhibition and gene deletion are protective against myocardial ischemia-reperfusion injury in vivo [J]. *Am J Physiol-Heart Circul Physiol*, 2008, 295 (5) : H2 128-134.
- [6] 许丹焰, 赵水平, 刘玲, 等. 可溶性环氧化物水解酶抑制剂对压力负荷增加所致小鼠心肌肥厚的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, 14 (5) : 405-408.
- [7] Seubert JM, Sinal CJ, Graves J, et al. Role of soluble epoxide hydrolase in postischemic recovery of heart contractile function [J]. *Circ Res*, 2006, 99 (4) : 442-450.
- [8] Monti J, Fischer J, Paskas S, et al. Soluble epoxide hydrolase is a susceptibility factor for heart failure in a rat model of human disease [J]. *Nature Genetics*, 2008, 40 (5) : 529-537.
- [9] Xu D, Li N, He Y, et al. Prevention and reversal of cardiac hypertrophy by soluble epoxide hydrolase inhibitors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103 (49) : 18 733-738.
- [10] Hannon GJ. RNA interference [J]. *Nature*, 2002, 418 (6894) : 244-251.
- [11] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. *Nature*, 2001, 411 (6836) : 494-498.
- [12] Reynolds A, Leake D, Boese Q, et al. Rational siRNA design for RNA interference [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22 (3) : 326-330.
- (此文编辑 许雪梅)