

[文章编号] 1007-3949(2011)19-05-0413-05

• 实验研究 •

肾素(前体)受体 miRNA 干扰质粒的构建及鉴定

张娜娜, 李茂莲, 边云飞, 高 奋, 杨慧宇, 肖传实

(山西医科大学第二医院, 山西省太原市 030001)

[关键词] 肾素(前体)受体; 微小干扰核糖核酸; 血管平滑肌细胞

[摘要] 目的 设计及构建肾素(前体)受体微小干扰核糖核酸(miRNA)质粒,并鉴定出有效干扰质粒。方法 设计及构建 4 对肾素(前体)受体的 pcDNATM6 • 2-GW/EmGFPmiR miRNA 及 1 对阴性对照 miRNA 干扰质粒,通过测序鉴定。将干扰质粒用 Lipofectamine™ 2000 转染大鼠血管平滑肌细胞,通过瞬时转染获得细胞系,倒置荧光显微镜下观察绿色荧光及流式细胞术确定转染效率,Real-time PCR 和 Western blot 检测 4 对干扰质粒、阴性对照质粒肾素(前体)受体的 mRNA 及蛋白表达水平。结果 测序显示肾素(前体)受体干扰序列及读框完全正确,倒置荧光显微镜及流式细胞术结果显示干扰质粒瞬时转染的大鼠血管平滑肌细胞系的转染效率均在 60% 以上。Real-time PCR 和 Western blot 结果显示 X2-2-3、X2-3-3 干扰质粒对肾素(前体)受体 mRNA 及蛋白有较好的抑制效果。结论 成功构建了肾素(前体)受体干扰真核表达载体,筛选出有效干扰质粒,为进一步研究肾素(前体)受体在大鼠血管平滑肌细胞中的作用提供参考。

[中图分类号] Q81

[文献标识码] A

Construction and Identification of miRNA Recombinant Eukaryotic Expression Vectors of (pro) Rennin Receptor

ZHANG Na-Na, LI Mao-Lian, BIAN Yun-Fei, GAO Fen, YANG Hui-Yu, and XIAO Chuan-Shi

(the Second Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

[KEY WORDS] (pro)Rennin Receptor; miRNA; Vascular Smooth Muscle Cell

[ABSTRACT] **Aim** To construct and identify the miRNA eukaryotic expression vectors of (pro)renin receptor ((P)RR). **Methods** miRNA nucleotides of (P)RR were chemically synthesized and inserted into pcDNATM6 • 2-GW/EmGFPmiR vector, which were confirmed by sequencing, then the recombinant miRNA vectors were transfected into A7r5 cell by Lipofectamine™ 2000. The mRNA expression of (P)RR was detected by Real-time PCR and Western blot. **Results** Sequencing suggested that miRNA eukaryotic expression vectors targeting (P)RR possessed correct read frame and nucleotide sequence, and green fluorescence of the transient transfected A7r5 cell lines could be observed under inverted fluorescence microscope. Real-time PCR and Western blot results showed that the sequence of X2-2-3 and X2-3-3 could effectively knockdown the level of mRNA and protein of (P)RR. **Conclusions** miRNA eukaryotic expression vectors targeting (P)RR were successfully constructed and the effectively interference RNA were identified, which may be used for understanding the effect of (P)RR in the vascular smooth muscle cells.

2002 年 Nguyen 等^[1]首次报道了人肾素(前体)受体 [(pro)rennin receptor, (P)RR] 的存在,并且克隆了该受体。(P)RR 在人体内广泛分布,免疫细胞化学研究表明,(P)RR 主要分布在远端肾小管、肾小球系膜区、肾和冠状动脉血管的平滑肌细胞、新生大鼠的心肌细胞、人脐静脉内皮细胞及人的单核细

胞。自从(P)RR 被发现以来,关于(P)RR 在肾脏和心脏中的生理及病理作用越来越受到重视。大量研究发现肾素-血管紧张素系统(RAS)参与了动脉粥样硬化发病的过程^[2-5],抑制 RAS 对治疗心血管疾病具有良好的效果。miRNA 是生物体内源长度约为 19 ~ 25 个核苷酸的非编码小 RNA,通过与靶

[收稿日期] 2011-01-21

[作者简介] 张娜娜,博士研究生,住院医师,研究方向为冠心病的基础与临床,E-mail 为 nanazhang82@163.com。边云飞,博士,副主任医师,研究方向为冠心病的基础与临床,E-mail 为 yunfeibian@sina.com。通讯作者肖传实,主任医师,教授,博士研究生导师,研究方向为冠心病的基础与临床,E-mail 为 ganxibaozhongxin@sina.com。

mRNA 的互补配对而在转录后水平上对基因的表达进行负调控,导致 mRNA 的降解或翻译抑制。本研究模仿内源性 miRNA,针对(P) RR mRNA 的不同靶位点,构建能在真核细胞中表达 miRNA 序列的载体,并导入大鼠血管平滑肌细胞,筛选出特异性针对大鼠(P) RR 的干扰质粒,为进一步研究(P) RR 在心血管疾病中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

Opti-MEM 无血清培养基、DMEM 细胞培养基、胎牛血清购自 Hyclone 公司;A7r5 细胞株购自上海

中科院细胞库;胰蛋白酶、Ang II 为 Sigma 公司产品;RNA 抽提试剂盒购自美国 Gibco 公司;逆转录试剂盒购自 MBI 公司;SYBR Premix Ex Taq™ II 购自 TaKaRa 公司;GAPDH 和(P) RR 购自上海生工生物工程技术有限公司。根据基因序列(GenBank Aeeession AB188298)设计并合成 4 对 miRNA 寡聚单链 DNA(表 1)。BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP、Lipofectamine2000 及质粒中抽试剂盒购自 Invitrogen 公司;兔抗钙调蛋白结合多肽(calmodulin binding peptide, CBP)单克隆抗体(Millipore 公司);辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔 IgG(Cell Signaling Technology 公司);Alexa Fluor 488 偶联的抗兔 IgG(Molecular Probes 公司);其它试剂均为国产分析纯。

表 1. miRNA 寡聚单链 DNA 序列及阴性对照序列

Table 1. Oligomeric single-stranded DNA sequence of miRNA and negative control sequences

名称	寡聚单链 DNA 序列 5'-3'
2-1F	TGCTGATAGGTTGCCACAGCAAGCCGTTTTGGCCACTGACTGACGGCTTGCTGGGCAACCTAT
2-1R	CCTGATAGGTTGCCACAGCAAGCCGTCAGTCAGTGGCCAAAACGGCTTGCTGTGGGCAACCTATC
2-2F	TGCTGTTTACTCTCCAAGACAAGGGTTTTGGCCACTGACTGACCCTTGTCTGAGAGTCTAAA
2-2R	CCTGTTTACTCTCAGACAAGGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCTTGTCTTGGAGAGTCTAAA
2-3F	TGCTGTTCACTGTCACCATAATGGTAGTTTTGGCCACTGACTGACTACCATTAGTGACAGTGAA
2-3R	CCTGTTCACTGTCACATAATGGTAGTCAGTCAGTGGCCAAAACCTATTAGTGTGACAGTGAA
2-4F	TGCTGTTCCGTTGCAGGTTCTCGAAAGTTTTGGCCACTGACTGACTTTTCGAGACTGCAACCGAA
2-4R	CCTGTTCCGTTGCAGTCTCGAAAGTCAGTCAGTGGCCAAAACCTTTTCGAGAACCTGCAACCGAAC
Negative-F	TGCTGAAATGTACTGCGGTGGAGACGTTTTGGCCACTGACTGACGTCTCCACGCAGTACATTT
Negative-R	CCTGAAATGTACTGCGGTGGAGACGTCAGTCAGTGGCCAAAACGTCTCCACGCAGTACATTTc

1.2 质粒构建

将 4 对寡聚单链 DNA 退火成双链。然后用载体构建试剂盒 BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP 进行重组克隆,将 4 对双链的 miRNA oligo 分别插入到 miRNA 表达载体 pcDNA™ 6.2-GW/EmGFPmiR 中,构建 4 个 miRNA 表达质粒,并转化至感受态细胞 DH5 α 。每个转化平板分别挑取 4 个克隆,摇菌抽提质粒后进行测序,以验证重组克隆中插入片段序列是否与设计的寡聚单链 DNA 序列一致。

1.3 大鼠血管平滑肌细胞的培养及转染

A7r5 细胞株用含 20% FBS 的 DMEM 培养基培养,置于 5% CO₂、37℃ 培养箱内培养,待细胞生长达亚融合状态时,以 0.25% EDTA 胰蛋白酶消化、传代。选择生长良好的第 2~5 代细胞用于实验。将

生长良好的细胞按照每孔 5×10^5 个细胞接种于 6 孔板中,当细胞贴壁覆盖率 70%~80% 左右时,按 Lipofectamine™ 2000 转染说明书进行转染,24 h 后倒置荧光显微镜下观察荧光,转染 48 h 后倒置荧光显微镜下观察转染情况。

1.4 流式细胞术检测细胞转染效率

收集转染后的各组细胞,PBS 漂洗 2 遍,PBS 调节至 $(1 \sim 5) \times 10^9$ /L,用流式细胞仪检测分析(激发波长为 488 nm,荧光波长为 495 nm) 10000 个细胞,检测绿色荧光阳性细胞占总细胞的百分比,即为转染效率。

1.5 Real-time PCR 检测(P) RR mRNA 的表达

质粒转染细胞 48 h 后,应用 RNA 提取试剂盒提取 RNA,并用紫外分光光度计进行检测,其后取 5 μ L RNA 按照反转录试剂盒制备 cDNA 后,以 GAP-

DH 作为内参照,采用 SYBR Green 法 Real-time PCR 检测,反应体系为 20 μ L,包含上、下游引物、DNA 模板、SYBR Premix Ex TaqTM II 和 dH₂O。大鼠 (P) RR 上游引物 5'-CAT AAG CAT CTC GCC AAG G-3', 下游引物 5'-ACC AGG GAT GTG TCG AAT GA-3', GAPDH 上游引物 5'-TGA ACG GGA AGC TCA CTG G-3', 下游引物 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'。定量反应条件:95 $^{\circ}$ C 10 min, 然后以 95 $^{\circ}$ C 15 s、56 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 45 s 进行 40 个循环。各组 PCR 均重复 3 次。mRNA 的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法来表示,其中 $\Delta Ct = Ct$ 目标 mRNA - Ct GAPDH, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ 处理 - ΔCt 对照。

1.6 Western blot 检测 (P) RR 蛋白的表达

miRNA 转染 48 h 后, PBS 洗涤 2 遍, 收集细胞, 加入 1 mL 细胞裂解缓冲液, 4 $^{\circ}$ C 旋转裂解 30 min, 12000 r/min 离心 15 min, 收集上清。Bradford 法测定蛋白质浓度, 取 60 μ g 总蛋白经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 常规方法转印至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉 TBS-T 溶液 37 $^{\circ}$ C 封闭 3 h 后, 加入 (P) RR 单克隆抗体 (1:1000 稀释), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 用 1 \times TBS-

T 溶液洗膜 4 \times 10 min。孵育二抗, 室温 (1:10000 稀释) 4 h, 1 \times TBS-T 溶液洗膜 4 \times 10 min。辣根过氧化物酶 HRP-ECL 发光法检测, 用凝胶成像系统拍照, 用 Lab-work 软件进行灰度分析。各组实验均重复 3 次。

1.7 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组均数进行单因素方差分析, 多重比较采用 LSD 法, 组间差异以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA 真核表达载体的测序

测序结果表明, 所获得的重组干扰质粒目的片段与预期完全相符, 表明退火形成的干扰寡核苷酸成功连接入 pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR 载体 (图 1)。

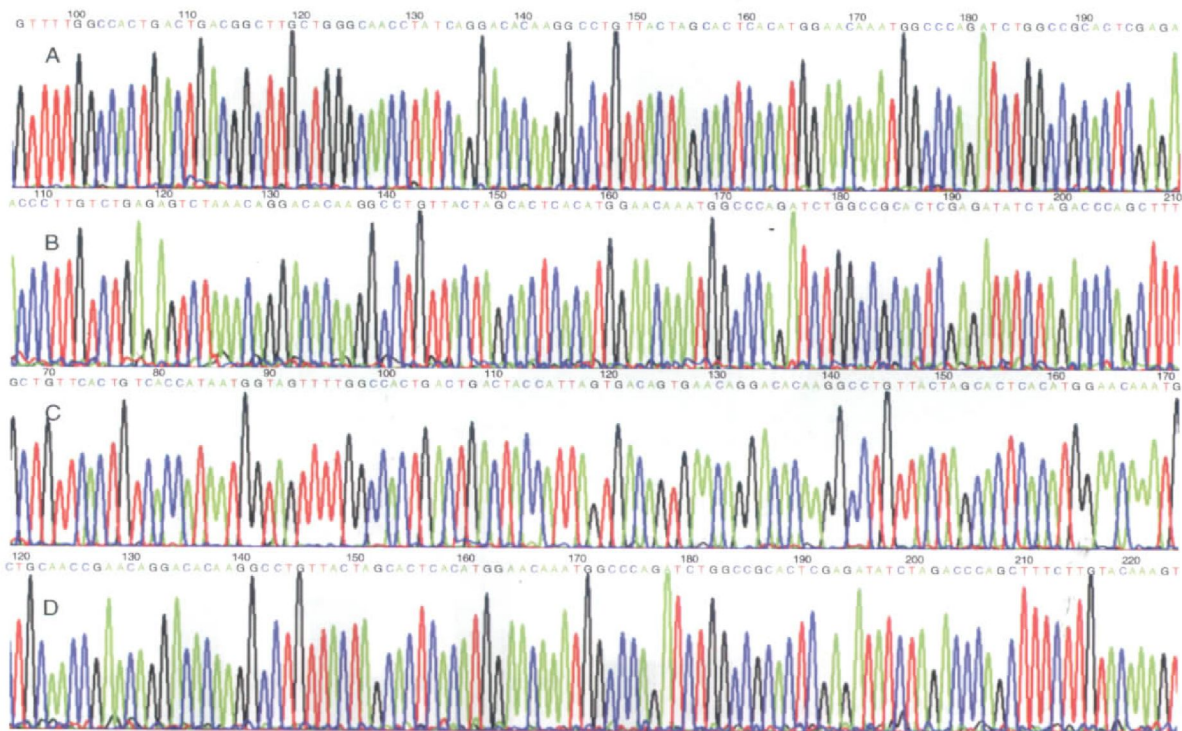


图 1. 重组质粒测序图 A、B、C、D 分别为重组质粒 X2-1-1、X2-2-3、X2-3-3、X2-4N-3 测序图。

Figure 1. Sequencing results of (P) RR interference vectors

2.2 细胞转染效率

倒置荧光显微镜和流式细胞术结果显示当质粒: LipofectamineTM 2000 为 3:7.5 时转染效率最高。由于 pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR 载体带有

绿色荧光报告基因, 因此, 干扰载体 X2-4N-3、X2-3-3、X2-2-3、X2-1-1 及阴性对照转染成功的细胞会发出绿色荧光, 表明细胞中有转染的外源基因表达 (图 2 和 3)。

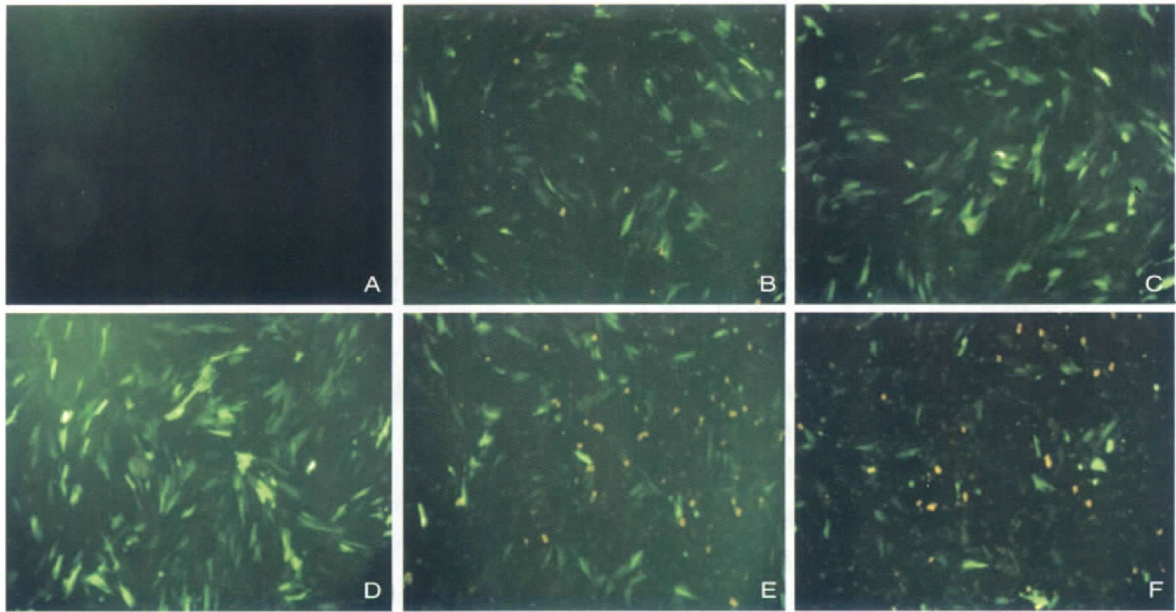


图2. 荧光显微镜观察重组质粒 X2-1-1 与脂质体转染剂不同比例的转染效率 (100 ×) A 为空白对照组, B、C、D、E、F 分别为重组质粒 X2-1-1: 脂质体转染剂 (g/L) 为 1:2.5、2:5、3:7.5、4:10 及 5:12.5。

Figure 2. The morphological of different transfected VSMC by fluorescent microscopy

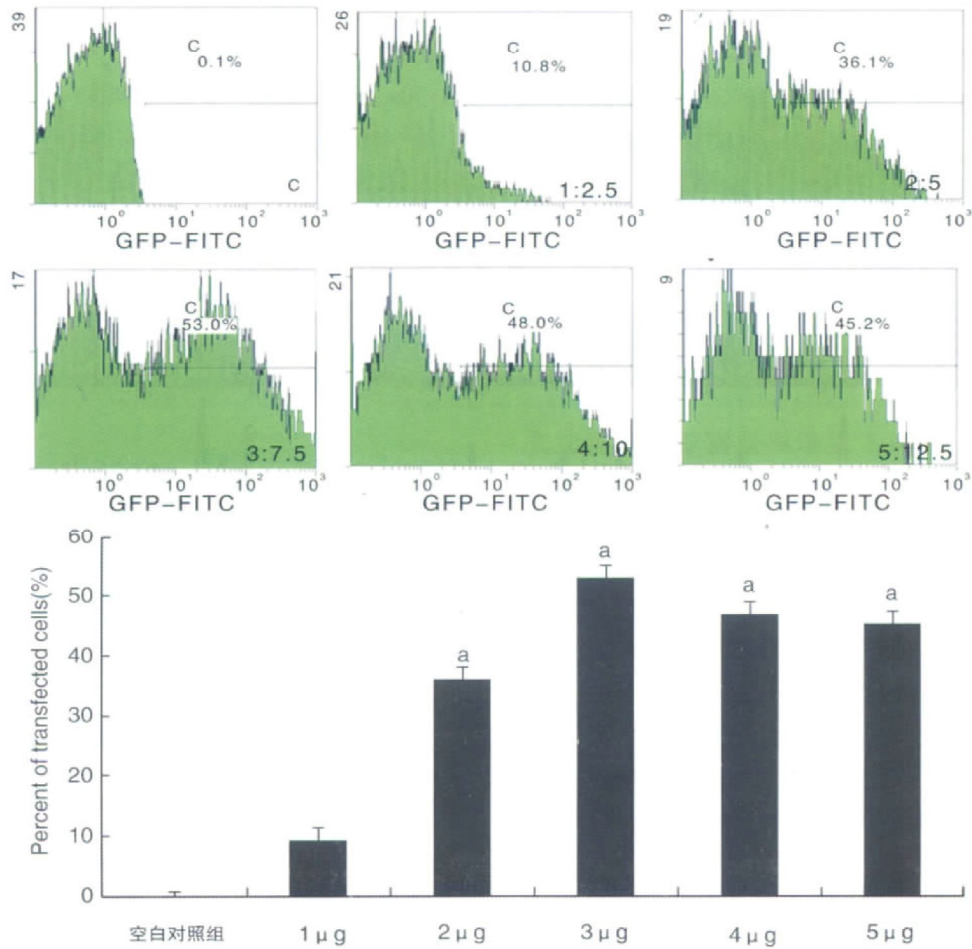


图3. 流式细胞仪测定重组质粒 X2-1-1 与脂质体转染剂不同比例的转染效率 a 为 $P < 0.05$, 与空白对照组相比。

Figure 3. Transfection efficiency of complex of different amount of plasmids with different concentration of Lipofectamine2000 by flow cytometry

2.3 转染前后 (P) RR mRNA 的表达

转染后 48 h, 与阴性对照组比较, X2-1-1、X2-4N-3 干扰序列对 A7r5 细胞 (P) RR mRNA 无抑制作用, 而 X2-2-3、X2-3-3 能显著抑制 A7r5 细胞 (P) RR mRNA 的表达 ($P < 0.01$; 图 4)。

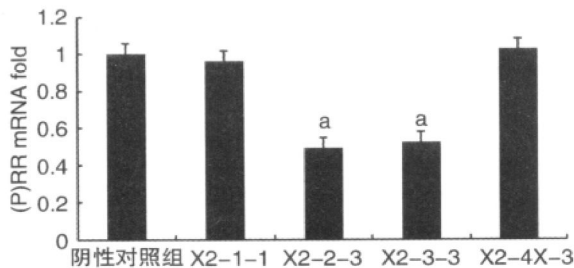


图 4. 转染前后细胞 (P) RR mRNA 的表达 a 为 $P < 0.05$, 与阴性对照组相比。

Figure 4. Expression of (P) PR in different transfected VSMC by Real-time PCR

2.4 转染前后 (P) RR 蛋白的表达

转染后 48 h, 与阴性对照组比较, X2-1-1、X2-4N-3 干扰序列对 A7r5 细胞 (P) RR 蛋白无抑制作用, 而 X2-2-3、X2-3-3 能显著抑制 A7r5 细胞 (P) RR mRNA 的表达 ($P < 0.01$), 其中 X2-2-3 的抑制作用最显著, 与 Real-time PCR 结果一致 (图 5)。

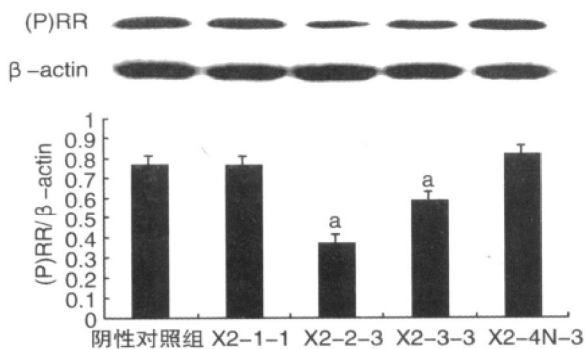


图 5. 转染前后细胞 (P) RR 蛋白的表达 a 为 $P < 0.05$, 与阴性对照组相比。

Figure 5. Expression of (P) PR in different transfected VSMC by Western blot

3 讨论

RAS 是机体维持正常的血压、水电解质平衡的重要系统。在经典的 RAS 中, 肾素发挥酶活性使血管紧张素原转变成 Ang I, 继而生成 RAS 中的主要效应分子 Ang II, 除此之外无其他生物学效应。肾

素前体则被视为无活性的肾素的前体。近年来, 研究表明肾素和肾素前体可不依赖于传统的 RAS 激活即 Ang II 而发挥生物学作用。而这种机制有赖于肾素 (前体) 受体的参与。最近研究表明, (P) RR 具有生物学功能, 在机体的一些功能调节, 特别是在心血管疾病和糖尿病肾病的发病中起着重要的作用^[6-9]。RNAi 是利用外源性的与靶 mRNA 序列完全同源的 dsRNA 引入细胞内, 进而实现对 mRNA 的降解, 从而阻止特定蛋白质的翻译, 是主要通过转录后水平阻断基因的表达。参与 RNAi 的主要有两类 RNA, 即 siRNA 和 miRNA。与 siRNA 相比, miRNA 对于有效沉默序列的筛选量要远少于 siRNA^[10], 因此, miRNA 是一项快速、高效和便于操作的使靶基因失活的高新技术, 为将来可控地打开或关闭某一特定基因奠定了基础, 同时还为疾病治疗开辟了新途径。目前 miRNA 已经成为重要的实验工具^[11]。

本研究通过设计合成 miRNA, 利用基因重组技术转入 pcDNATM6 · 2-GW/EmGFPmiR 载体中, 通过测序的方法确定重组克隆中插入片段序列, 结果显示插入片段序列与设计的序列完全一致。通过脂质体法瞬时转染大鼠血管平滑肌细胞, 倒置荧光显微镜和流式细胞仪观察到质粒: Lipofectamine2000 为 3: 7.5 时转染效率最高, 在 60% 以上。Real-time PCR 结果显示 X2-2-3、X2-3-3 能有效抑制大鼠血管平滑肌细胞 (P) RR mRNA 的表达, 而且干扰效率确实在 60% 以上, 同时 Western blot 结果也显示 X2-2-3、X2-3-3 能有效抑制大鼠血管平滑肌细胞 (P) RR 蛋白的表达。故我们认为本次转染完全达到筛选有效干扰质粒的要求。(P) RR 作为新近发现的受体, 在肾脏和心脏疾病中起重要作用, 但是目前国内外对 (P) RR 与动脉粥样硬化关系以及对 (P) RR 作用机制研究还不是十分清楚, 本研究成功获得了 (P) RR miRNA 的有效干扰质粒, 为下一步阐明 (P) RR 在心血管疾病中的作用奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Nguyen G, Delarue F, Burckle C, et al. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin [J]. J Clin Invest, 2002, 109 (11): 1 417-427.
- [2] Napoleone E, Disanto A, Camera M, et al. Angiotensin converting enzyme inhibitors downregulate tissue factor synthesis in monocytes [J]. Circ Res, 2000, 86 (2): 139-143.

(下转 422 页)

(上接 417 页)

- [3] Miyazaki M, Sakonjo H, Takai S. Anti-atherosclerotic effects of an angiotensin converting enzyme inhibitor and an angiotensin II antagonist in cynomolgus monkeys fed a high-cholesterol diet [J]. *Br J Pharmacol*, 1999, 128: 523-529.
- [4] 杨慧宇, 杨志明, 边云飞, 等. 血管紧张素(1-7)对血管紧张素 II 诱导的人脐静脉内皮细胞血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17 (6): 465-469.
- [5] 张娜娜, 杨志明, 边云飞, 等. 血管紧张素(1-7)对血管紧张素 II 诱导脐静脉内皮细胞表达 E 选择素和单核细胞趋化蛋白 1 的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17 (8): 651-656.
- [6] Cousin C, Bracquart D, Contrepas A, et al. Potential role of the (pro) renin receptor in cardiovascular and kidney diseases [J]. *J Nephrol*, 2010, 23 (5): 508-513.
- [7] Iehihara A, Hayashi K, Kaneshiro Y, et al. Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the “handle, region for nonproteolytic activation of prorenin [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114: 1 128-135.
- [8] Iehihara A, Kaneshiro Y, Takemitsu T, et al. Nonproteolytic activation of prorenin contributes to development of cardiac fibrosis in genetic hypertension [J]. *Hypertension*, 2006, 47 (5): 894-900.
- [9] 贺明, 黄娅林. 肾素(原)受体在大鼠肾小球系膜细胞和肾脏的表达 [J]. *生理学报*, 2007, 59 (6): 796-804.
- [10] Lee YS, Nakahara K, Pham JW, et al. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways [J]. *Cell*, 2004, 117 (1): 69-81.
- [11] Rajewsky N. MicroRNA target predictions in animals [J]. *Nat Genet*, 2006, 38 (Suppl): S8-S13.

(此文编辑 文玉珊)