文章编号:1000-5404(2005)10-0951-03

论著

RNA 干扰技术对人 U937 巨噬细胞株糖皮质激素受体表达及功能的抑制效应

张 芳[1],钱桂生[1],陈维中[1],苏踊跃[2] (第三军医大学:[1] 新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037,[2] 西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 利用载体介导的 RNA 干扰技术,建立糖皮质激素受体(GR)基因阻断的人 U937 巨噬细胞株模型。**方法** 构建两个针对 GR 的 RNAi 重组表达载体,分别命名为 pSilencer 3.1-GR_1 和 pSilencer 3.1-GR_2,经测序确认后,转染人 U937 巨噬细胞株。RT-PCR、Western blot 分别检测糖皮质激素受体 mRNA 水平和蛋白水平表达变化;相对荧光素酶活性法检测地塞米松作用后 GR 转录激活功能的变化。**结果** 经测序证实:成功构建两个针对 GR 的 RNAi 表达载体(pSilencer 3.1-GR_1 和 pSilencer 3.1-GR_2);转染 pSilencer 3.1-GR_2 可明显降低细胞内 GR mRNA 的丰度及 GR 蛋白表达,细胞内 GR 转录激活功能明显降低;转染 pSilencer 3.1-GR_1 与对照组相比无显著变化。**结论** 成功地构建并筛选出一个高效且特异阻断 GR 表达及功能的 RNAi 质粒表达载体,为进一步研究糖皮质激素受体的功能提供新方法。

关键词:糖皮质激素受体;人巨噬细胞株 U937;RNA 干扰
中图法分类号:R392.12; R394-33; R394.3 **文献标识码**:A

Repressive effects of RNA interference technique on expression and function of glucocorticoid receptor in human macrophage cell line U937

ZHANG Fang[1], QIAN Gui-sheng[1], CHEN Wei-zhong[1], SU Yong-yue[2] ([1] Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037; [2] State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a glucocorticoid receptor knockdown model of human macrophage cell line U937 with RNA interference technique. **Methods** Two RNAi recombinant plasmids (named pSilencer 3.1-GR_1 and pSilencer 3.1-GR_2) targeting to GR gene were constructed. After RNAi recombinant plasmids were transfected into human macrophage cell line U937, the expressions of GR mRNA and GR protein were evaluated with RT-PCR and Western blotting respectively. The transcriptional activation function of GR was evaluated through the detection of relative luciferase activity after dexamethasone treatment. **Results** Two RNAi recombinant expression plamids were constructed and identified by sequencing. pSilencer 3.1-GR_2 transfection could inhibit not only GR mRNA and protein expressions, but also transcriptional activation function of GR specially; pSilencer 3.1-GR_1 transfection had no significant changes as compared to normal control. **Conclusion** A glucocorticoid receptor knockdown model has been established successfully, which offers a new method for the further research of GR biological functions.

Key words: glucocorticoid receptor; human macrophage cell line U937; RNA interference

在多种生物细胞中,外源或内源性双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)可触发同源 mRNA 的降解,进而发生序列特异性的转录后基因沉默,这种现象称为 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)[1]。本研究应用 RNAi 表达载体 pSilencer 3.1H1-hygro,构建针对糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)的 RNAi 重组表达质粒,建立 GR 基因阻断的人 U937 巨噬细胞株模型,探讨这种 RNAi 策略对 GR 表达和功能的影响,为进一步研究 GR 的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

pSilencer 3.1H1-hygro 试剂盒 (Ambion 公司);FuGene 6 非脂质体转染试剂 (Biochem 公司);RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司);GRE-TK-Luc 报告质粒由瑞典乌拉姆大学 Annika Wallberge 教授惠赠;β-半乳糖苷酶表达质粒 pCMV-β-Gal(Clotech 公司);兔抗大鼠 GR 多克隆 IgG、HRP 偶联的抗兔 IgG (SantaCruz 公司);荧光

作者简介:张 芳(1972-),男,安徽省庐江县人,博士研究生,主治医师,主要从事急性肺损伤病生机制方面的研究。电话:(023)65230729,E-mail: zhangfanglab@yahoo.com.cn
通讯作者:钱桂生,电话:(023)68755320
收稿日期:2004-09-02;修回日期:2004-11-15

素酶及 β-Gal 活性检测试剂盒(Promega 公司);PE480 基因扩增仪、荧光素酶及 β-Gal 活性检测所用 HTS 7000 Bio Assay Reader (Perkin Elmer 公司)。

1.2 人 U937 巨噬细胞株的培养

人 U937 巨噬细胞株购自 ATCC 公司。用含 2% 胎牛血清无支原体感染的 RPMI1640 培养基,在 37 ℃、5% CO_2 的条件下培养。

1.3 靶点靶序列的选择

通过 Ambion 公司网址 http://www.genscript.com/sirnaca.html在线寻找 GR 的 siRNA 靶点靶序列并设计对应的寡核苷酸序列,针对 GR 筛选的 19 个碱基的靶点靶序列以及来源如下:AAGATTTCATCGAACTCTGCA(编码区 974 位);AAGCTTCAGGATGTCATTATG (编码区 1 412 位)。本研究针对靶序列的寡核苷酸序列由上海博亚公司代理合成。

1.4 重组 siRNA 质粒的构建和鉴定

将合成的成对寡核苷酸,分别用去离子水稀释至 10 ng/μl。各取 100 μl 混匀后,煮沸 5 min,自然冷却到室温,达到退火的目的。将线性化的 pSilencer 3.1H1-hygro 质粒载体与合成的退火核苷酸片段连接,连接反应按照质粒 DNA 连接试剂盒(TaKaRa 公司)说明书进行。将连接产物转化 DH5α 感受态细菌,在含氨苄青霉素的 LB 平板上筛选阳性克隆,并扩增转化子。将阳性克隆送至上海博亚生物公司测序,本实验将上述的 RNAi 重组质粒分别命名为 pSilence 3.1-GR_1 和 pSilence 3.1-GR_2。

1.5 重组 siRNA 质粒转染人 U937 巨噬细胞株

将生长良好的人 U937 巨噬细胞株换液后,用无血清培养基调整细胞数量为 5×10^6/ml。取 2 ml 加入纯化的重组 siRNA 质粒 4 μg、FuGENE 6 试剂 8 μl,混匀后于培养箱中培养 24 h,用于实验。设置正常对照组和 pSilencer 3.1H1-negetive 对照组。pSilencer 3.1H1-negetive 是试剂盒提供的阴性对照质粒,即在载体质粒 pSilencer 3.1H1-hygro 中的插入一段无关非同源性寡核苷酸序列。

1.6 半定量 RT-PCR 法检测 GR mRNA 表达

按 Tripure 试剂(Roch 公司)说明书提取细胞总 RNA,使用分光光度仪定量。取 2 μg RNA,用 AMV 逆转录酶制备 20 μl 体系的 cDNA,取 5 μl cDNA 进行 PCR 扩增。GR 的引物自行设计,G3PDH 作为内源性对照。引物序列分别为:GR:5′- ATCCCACAGACCAAAGCACCTT -3′和 5′-TCCAGTTTTCAGAACCAACAGG -3′,扩增产物长度为 540 bp;G3PDH:5′-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3′和 5′-CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAT -3′,扩增产物长度为 983 bp。PCR 反应条件:变性 94 ℃,4 min,然后 94 ℃,1 min →55 ℃,1 min→72 ℃,2 min;35 个循环,延伸 72 ℃,8 min。扩增结束后进行琼脂糖凝胶电泳并照相,计算 GR mRNA/G3PDH 的泳带积分光密度比值,以表示 GR mRNA 的相对值。

1.7 Western blot 检测 GR 蛋白表达

收集细胞数约为 2×10^6 的细胞,加入蛋白裂解液(Promega 公司)200 μl,吹打裂解后,将裂解液于 4 ℃、12 000 × g 离心 10 min,取上清。采用考马斯亮蓝定量总蛋白,各取 20 μg/孔,行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。待电泳完毕后电转印 0.5 h 至硝酸纤维素膜,在室温下封闭 3 h。加入兔抗大鼠 GR 多克隆 IgG 抗体(1∶500 稀释),4 ℃过夜。二抗为 HRP 偶联的抗兔 IgG(1∶1 000稀释),室温反应 2 h,ECL 法化学发光,X 线底片曝光显影。

1.8 相对荧光素酶法检测 GR 转录激活功能

报告质粒 GRE-tk-luc 和内参照质粒 pCMV-β-Gal 各 1.0、0.1 μg 与构建成功的重组质粒 4.0 μg 共转染细胞(方法同 1.5)。将转染 24 h 的细胞,加入含浓度为 10^{-5} mol/L 地塞米松的培养基,培养 6 h 后收集细胞。按照荧光素酶及 β-Gal 活性检测试剂盒说明书检测二者活性,二者比值为相对荧光强度(relative activity of luciferase, RAL),代表 GR 转录激活功能。

1.9 统计学处理

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件行 t 检验。

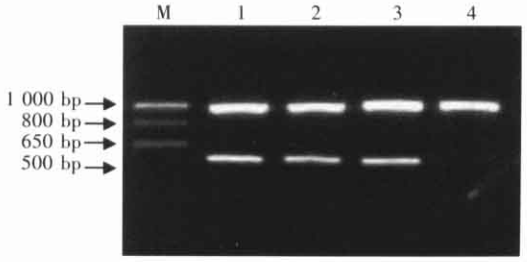
2 结果

2.1 RNAi 重组质粒鉴定

测序结果证实:合成的寡核苷酸片段正确连入 pSilencer 3.1H1-hygro 质粒载体,成功构建针对 GR 基因的 RNAi 重组质粒 pSilencer 3.1-GR_1 和 pSilencer 3.1-GR_2(上海博亚公司测序号分别为 1524-032 和 1524-033)。

2.2 GR mRNA 表达

pSilencer 3.1-GR_1 转染组(0.40 ± 0.06)与正常对照组(0.42 ± 0.04)比较无明显差异($P > 0.05$);pSilencer 3.1-GR_2 转染组(0.10 ± 0.03)与正常对照组比较显著降低($P < 0.05$),GR mRNA 表达抑制率达到 76%(图 1)。



M: PCR marker; 1: Normal control; 2: Negative control; 3: pSilencer 3.1-GR_1; 4: pSilencer 3.1-GR_2

图 1 转染 RNAi 重组质粒对 GR mRNA 表达的影响

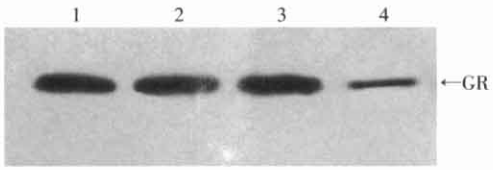
Fig 1 Effects of RNAi recombinant plasmids transfection on GR mRNA expression

2.3 GR 蛋白表达

pSilencer 3.1-GR_1 转染组(6.69 ± 0.23)与正常对照组(6.45 ± 0.19)比较无明显差异($P > 0.05$);pSilencer 3.1-GR_2 转染组(1.96 ± 0.11)与正常对照组比较显著降低($P < 0.05$),GR 表达抑制率达到 70%(图 2)。

2.4 GR 转录激活功能

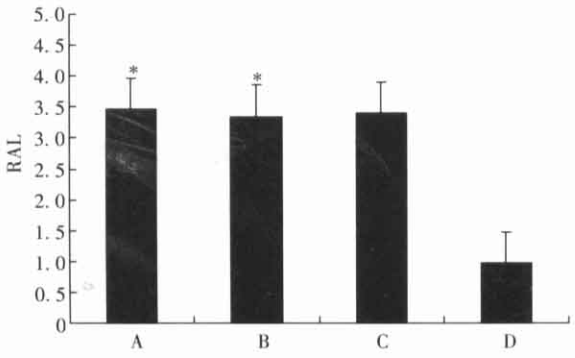
pSilencer 3.1-GR_2 转染能显著抑制 GR 转录激活报告质粒 GRE-tk-luc 的表达,与正常组、阴性对照组比较有显著差异($P < 0.05$),GR 转录激活功能抑制率达到 72%;pSilencer 3.1-GR_1 转染组与正常组比较无显著差异($P > 0.05$),见图 3。



1: Normal control; 2: Negative control; 3: pSilencer 3.1-GR_1; 4: pSilencer 3.1-GR_2

图 2　转染 RNAi 重组质粒对 GR 表达的影响

Fig 2　Effects of RNAi recombinant plasmids transfection on GR expression



A: Control; B: Negative control; C: pSilencer 3.1-GR_1; D: pSilencer 3.1-GR_2; *: $P<0.05$, *vs* D

图 3　转染 RNAi 重组质粒对 GR 转录激活功能的影响($\bar{x} \pm s$)

Fig 3　Effects of RNAi recombinant plasmids transfection on transcriptional activation function of GR ($\bar{x} \pm s$)

3　讨论

RNAi 是一种序列特异性的转录后基因沉默现象，它作为一种反向遗传学技术，它在后基因组时代功能基因的研究中具有非常重要的作用，科学家称 RNAi 技术为靶基因或靶蛋白的“剔降”(knockdown)[2]。RNAi 技术最初的方法主要是化学合成或者体外转录合成双链 RNA，再转入细胞内。基于对 RNAi 现象的不断深入了解，科研人员陆续开发出了细胞内稳定表达小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA)技术。siRNA 是长度为 21 ~ 23 核苷酸的双链 RNA(dsRNA)，通过与完全互补配对的靶 mRNA 结合并降解之，发挥 RNAi 效应[3]。

本实验运用 pSilencer 3.1H1-hygro 载体质粒，将针对靶序列的寡核苷酸序列设计具有回文结构的模板链，在细胞内转录出具有互补序列的单链 RNA，并自身折叠形成发夹样双链结构，类似于小干扰 RNA，阻断目的基因的表达[4]。实验显示针对 GR 的 RNAi 重组表达载体 pSilencer 3.1-GR_1 和 pSilencer 3.1-GR_2 对 GR 基因抑制效率不一，其中转染 pSilencer 3.1-GR_1 无明显抑制效率，转染 pSilencer 3.1-GR_2 对 GR mRNA 和蛋白抑制效率分别为 76%、70%。提示 pSilencer 3.1-GR_2 转染后可以发挥 RNAi 效应，能识别、降解 GR 基因的转录产物进而抑制 GR 蛋白表达。不同的 RNAi 重组质粒能否诱导基因沉默，与目的基因 mRNA 上靶点序列的选择密切相关。其原因可能受 mRNA 二级结构或 RNA 结合蛋白的影响，也不能排除其它尚未清楚的机制[5]。目前，虽然 RNA 二级结构预测等方法为靶点序列选择提供了一些参考，但是总的来讲，靶点的选择还是试探性的，风险性的[6]。RNAi 重组质粒能否发挥 RNAi 效应必须通过实验来验证和筛选。

本研究还运用体外转录激活报告系统，观察 RNAi 重组质粒转染后糖皮质激素(GC)对 GR 转录激活功能的影响。在此系统中，GR 与糖皮质激素调控元件(GRE)结合可活化报告质粒 GRE-tk-luc 启动子，导致报告基因荧光素酶活性(luciferase)的表达；pCMV-β-Gal 为内参照质粒。通过二者比值，即相对荧光强度来校正荧光素酶活性，以消除转染效率对荧光素酶活性的影响。检测结果表明：pSilencer 3.1-GR_2 转染能够有效抑制 GC-GR 信号通路中 GR 转录激活功能。这种 GR 转录激活功能的抑制与细胞内 GR 表达降低相符。

综上所述，本研究成功地构建并筛选出一个特异而高效地阻断 GR 表达及转录激活功能的质粒表达载体：pSilencer 3.1-GR_2，建立 GR 基因阻断的人 U937 巨噬细胞株模型，为进一步研究 GC 和 GR 的功能及作用机制提供了新的手段。

参考文献：

[1] Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al*. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans[J]. Nature, 1998, 391(6669): 806 - 811.

[2] Miyagishi M, Taira K. RNAi expression vectors in mammalian cells[J]. Methods Mol Biol, 2004, 252: 483 - 491.

[3] Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohmmed A, *et al*. RNA interference: biology, mechanism, and applications[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2003, 67(4): 657 - 685.

[4] Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, *et al*. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. Natue, 2001, 411(6836): 494 - 498.

[5] Jain K K. RNAi and siRNA[J]. Pharmacogenomics, 2004, 5(3): 239 - 242.

[6] Kumar R, Conklin D S, Mittal V. High-throughput selection of effective RNAi probes for gene silencing[J]. Genome Res, 2003, 13(10): 2333 - 2340.

(编辑　陈聪连)