文章编号:1000-5404(2006)07-0633-03

论著

pSITITIN 载体的构建及表达

张小飞,陈 沅,田 杰 (重庆医科大学儿童医院心血管内科,重庆 400014)

提 要:目的 构建能阻断 Wistar 大鼠肌联蛋白表达的 siRNA 载体,为研究骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)向心肌细胞分化的过程中肌小节结构蛋白之间的相互关系打下基础。**方法** 针对 Wistar 大鼠 TITIN N2B 区设计并构建重组质粒 pSITITIN,针对人 β-ACTIN 设计并构建重组质粒 pSIACTIN,利用阳离子脂质体将其分别转染入体外培养 1 周的新生大鼠心肌细胞和经 5-氮杂胞苷(5-azacytidine, 5-aza)诱导后 2 周的 MSCs 中,免疫荧光检测肌联蛋白的表达。**结果** 重组质粒 pSITITIN 转染入正常心肌细胞和经 5-aza 处理后的 MSCs 后,肌联蛋白的表达均减弱($P<0.01$);而转染 pSIACTIN 后不影响肌联蛋白的表达。**结论** pSITITIN 具有确切阻断肌联蛋白表达的效果。

关键词: 骨髓间充质干细胞;RNA 干扰;肌联蛋白
中图法分类号: Q782; R394-33; R394.2 **文献标识码:** A

Construction and expression of pSITITIN plasmid vector

ZHANG Xiao-fei, CHEN Yuan, TIAN Jie (Department of Cardiology, Children's Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To construct small RNAi plasmid vectors which can suppress the expression of TITIN in Wistar rat. Methods A recombinant plasmid vector involving shRNA, which matched the base pair of rat TITIN N2B region mRNA perfectly, was constructed and transfected into normal neonatal cardiomyocytes and mesenchymal stem cells (MSCs) induced by 5-aza cytidine respectively. The expression of TITIN Z band was investigated by immunofluorescence. Results The expression of TITIN was weakened after recombinant plasmid was transfected into neonatal cardiomyocytes and MSCs induced by 5-aza cytidine. Conclusion The recombinant plasmid was constructed successfully, and it actually can block the expression of TITIN.

Key words: mesenchymal stem cells; RNA interference; TITIN

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)移植治疗心脏疾病有着广阔的前景,我们的前期研究表明:在体外去甲基化药物诱导[1]或者体内微环境的诱导[2,3]下,MSCs 都可朝着心肌细胞方向分化;同时也发现 MSCs 的植入能显著改善疾病模型动物的心功能[4]。但是如果阻断了调控心肌肌小节特异结构蛋白-肌联蛋白(TITIN)发育的基因以后,这种定向分化还能不能完成,目前尚少见报道。本研究拟构建对肌联蛋白有阻断作用的质粒表达载体系统 pSITITIN,来观察这个分化过程中肌小节组成蛋白的表达情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒 含 RNA pol Ⅲ的转录载体 pTZU6+1 由重庆医科大学附属第二医院病毒性肝炎研究所分子病毒室馈赠。含增强绿色荧光蛋白(enhance green fluorescent protein, EGFP)的转录载体 pGENESIL 由本所提供。

1.1.2 主要试剂 T_4DNA 连接酶、各种限制性内切酶购于美国 Promega 公司,脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 购于美国 Invitrogen 公司。免疫检测用抗体兔抗大鼠肌联蛋白-Z 带部分 z1z2 由 Dr. Siefried L 馈赠,FITC-羊抗兔多克隆抗体购于北京中山公司。

1.2 方法

1.2.1 体内从 DNA 模板产生 siRNA 的设计策略 设计的寡核苷酸序列 5′端和 3′端分别含 *Xhol* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ酶切位点,便于和表达载体 pTZU6+1 连接。5′端开始为 19 个核苷酸的 siRNA 作用链序列,中间以 4 个核苷酸的 TTCG 间隔形成发夹结构,最后为 siRNA 作用链的反向重复序列,3′端加有转录终止信号 TTTTT。针对大鼠 TITIN N2B 区 mRNA(pubmed Genbank AF:525412)的 3 个不同靶位(1 155~1 173;1 828~1 846;2 434~2 452)同时设计 3 对。用相同的方法针对人 β-actin mRNA(pubmed Genbank BC: 001 301 1051~1 069)设计 1 对对照。经过 BLAST 软件进行同源性分析后,交上海生物工程技术有限公司合成。设计序列分别如下:

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371499)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371499)
作者简介: 张小飞(1974-),男,四川省达州市人,硕士,主治医师,主要从事儿童心血管疾病方面的研究,现在达州市第二人民医院儿科。电话:13795680085, E-mail: 007zhangxiaofei@sina.com
收稿日期: 2005-09-01;**修回日期:** 2005-11-08

序列1：正义5′-TCGAGGGTTGACAGCAGTGAACTGTTCG-CAGTTCACTGCTGTCAACCTTTTT-3′，反义3′-CCCAACTGTCGT-CACTTGACAAGCGTCAAGTGACGACAGTTGGAAAAAGATC-5′；

序列2：正义5′-TCGAGGAGCAATCAGAGGTCATGGTTCGC-CATGACCTCTGATTGCTCTTTTT-3′，反义3′-CCTCGTTAGTCTC-CAGTACCAAGCGGTACTGGAGACTAACGAGAAAAAGATC-5′；

序列3：正义5′-TCGAGGATGGAGATACCGATGAGGTTCGC-CTCATCGGTATCTCCATCTTTTT-3′，反义3′-CCTACCTCTATGGC-TACTCCAAGCGGAGTAGCCATAGAGGTAGAAAAAGATC-5′；

序列4：正义5′-TCGAGGATCATTGCTCCTCCTGAGTTCGC-TCAGGAGGAGCAATGATCTTTTT-3′，反义3′-CCTAGTAACGA-GGAGGACTCAAGCGAGTCCTCCTCGTTACTAGAAAAAGATC-5′。

1.2.2 TITIN N2B区siRNA表达载体的构建 取等量100 mmol/L的DNA合成片断，在退火缓冲液（100 mmol/L NaCl，50 mmol/L N-2-羟乙基哌嗪-N′-2-乙磺酸）中于95 ℃保温5 min后，自然降至室温得到退火双链DNA。载体质粒pSITITIN的构建及鉴定：将纯化的DNA片断分别与*Sal* Ⅰ和*Xba* Ⅰ双酶切的转录载体pTZU6+1进行连接，得到含TITIN N2B区siRNA的表达载体pSITITIN。*Sal* Ⅰ、*Xba* Ⅰ或*Eco*R Ⅰ+*Hind* Ⅲ酶切鉴定，筛选出阳性克隆，并进行DNA序列分析加以确定。采用相同的方法进行人β-actin siRNA表达载体pSIACTIN的构建与鉴定。

1.2.3 细胞培养 新生大鼠心肌细胞分离与培养，采用差速贴壁法分离，新生大鼠心脏剪碎后，0.25%胰蛋白酶消化5～6 min，转移消化液，追加胰蛋白酶，至组织完全消化为止。消化液经钢网过滤后离心，重悬沉淀，贴壁2 h后，转入培养板继续培养。MSCs的分离与培养，参照Wang等[5]的方法，采用贴壁筛选法分离、培养并扩增成年大鼠MSCs，选用第5代细胞，用5-aza（10 μmol/L）诱导24 h后再以无5-aza的含10%胎牛血清（美国，Hyclone公司）的DMEM/F12（美国，Hyclone公司）完全培养基换液，以后每4天换液1次，至诱导后2周。

1.2.4 pSITITIN在真核细胞中的表达 pSITITIN转染，具体方法见美国Invitrogen公司产品说明书。分别用Lipofectamine 2000将pSITITIN和含有EGFP的空载体pGENESIL转染培养7 d的新生鼠心肌细胞及经5-aza诱导后2周的MSCs。同时设立转染细胞对照和无关siRNA对照pSIACTIN。细胞内表达肌联蛋白抑制作用观察，转染后24 h用PBS洗涤细胞，预冷纯丙酮固定，0.1% triton渗透，先后经封闭血清10 min，Ⅰ抗（1∶150）4 ℃孵育过夜，PBS洗涤，Ⅱ抗（1∶100）室温孵育60 min，PBS洗涤，DAPI（1 μg/ml）孵育10 min，PBS洗涤，50%缓冲甘油封片后进行免疫荧光检测。DAPI标记的细胞核在荧光显微镜下（激发滤色镜波长330～385 nm；吸收滤色镜波长420 nm）呈蓝色，FITC标记的抗体在荧光显微镜下（激发滤色镜波长450～480 nm；吸收滤色镜波长515 nm）呈绿色。同时设不加Ⅰ抗的阴性对照组。转染带有EGFP的质粒pGENESIL则用PBS洗涤，预冷纯丙酮固定后置于荧光显微镜下观察。

1.3 统计学处理

选取10个非重复视野（400倍），计数各组阳性细胞数（百分率），用SPSS 11.5软件行one way LSD检验。

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定

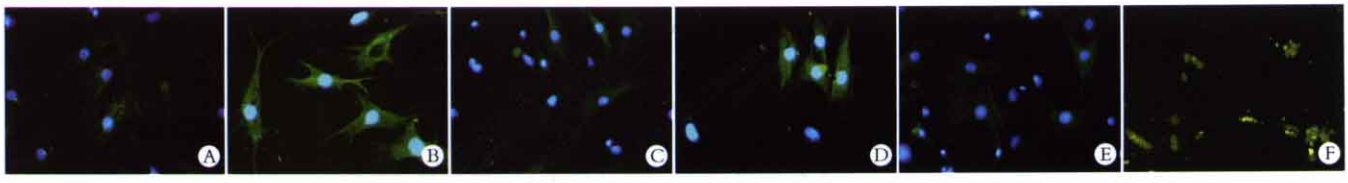
重组质粒1～4 *Sal* Ⅰ酶切位点丢失，但可以被*Xba* Ⅰ酶切，而空载体可分别*Sal* Ⅰ、*Xba* Ⅰ酶切成约3.1 kb的DNA片断。用*Eco*R Ⅰ和*Hind* Ⅲ双酶切后重组质粒产生2 800、395 bp 2个条带，而空质粒双酶切后产生2 800、352 bp的片断，实验结果与预期相符。进一步用DNA测序方法证实重组载体序列正确。

2.2 新生鼠心肌细胞内肌联蛋白的表达

序列2转染新生鼠心肌细胞内肌联蛋白的表达明显减弱（$P<0.01$，$n=30$），序列1、3、4转染则肌联蛋白的表达无明显变化（$P>0.05$）（图1，表1）。

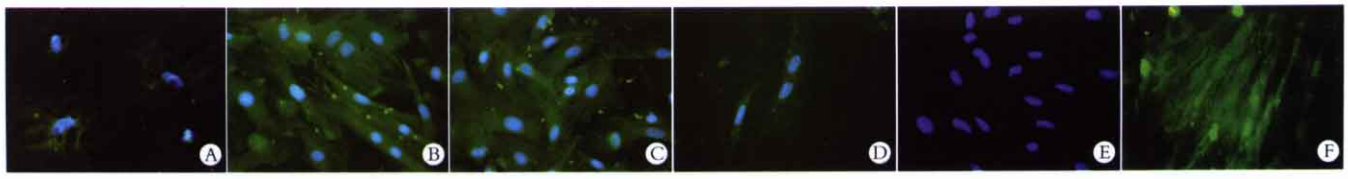
2.3 MSCs内肌联蛋白的表达

序列2转染经5-aza诱导后的MSCs，肌联蛋白的表达明显减弱，序列4转染则肌联蛋白的表达无明显变化（图2，表2）。



A：正常新生鼠心肌细胞；B：转染序列1的心肌细胞；C：转染序列2的心肌细胞；D：转染序列3的心肌细胞；E：转染序列4的心肌细胞；F：转染pGENESIL

图1 免疫荧光检测新生鼠心肌细胞TITIN Z带表达 （荧光显微镜×400） 蓝色：DAPI；绿色：FITC



A：正常MSCs；B：培养2周后的MSCs，经5-aza处理；C：培养2周后的MSCs，经5-aza处理，转染pSIACTIN；D：培养2周后的MSCs，经5-aza处理，转染pSITITIN；E：无Ⅰ抗的阴性对照；F：转染pGENESIL

图2 免疫荧光检测MSCs TITIN Z带表达 （荧光显微镜×400） 蓝色：DAPI；绿色：FITC

表 1　转染重组质粒前后新生鼠心肌细胞肌联蛋白阳性表达百分率($\bar{x} \pm s$)

组　别	阳性表达率（%，$\bar{x} \pm s$）
新生鼠心肌细胞	0.846 0 ± 0.064 73
新生鼠心肌细胞转染序列 1	0.847 0 ± 0.077 91
新生鼠心肌细胞转染序列 2	0.267 0 ± 0.063 04[a]
新生鼠心肌细胞转染序列 3	0.839 7 ± 0.092 64
新生鼠心肌细胞转染序列 4	0.844 3 ± 0.041 16[a]

a：$P < 0.01$，与未处理的新生鼠心肌细胞比较

表 2　转染重组质粒前后 MSCs 肌联蛋白阳性表达百分率($\bar{x} \pm s$)

组　别	阳性表达率（%，$\bar{x} \pm s$）
正常 MSCs	0.420 0 ± 0.044 33
MSCs 转染 pSITITIN	0.152 7 ± 0.021 64[a]
MSCs 转染 pSIACTIN	0.412 0 ± 0.080 58

a：$P < 0.01$，与正常 MSCs 比较

3　讨论

RNAi 是近年来发现的、最重要的 RNA 新功能之一，是微生物基因组复制、转录和翻译研究的一项崭新技术，已成为国内、外研究的热点。其主要利用双链 RNA 诱发对宿主细胞特异性 RNA 转录的抑制，从而抑制特异目的基因的表达[6]。近年来利用 RNAi 技术正逐渐走向成熟，在致病微生物及致病相关基因鉴定方面有重要意义，并有望成为病毒性疾病预防和治疗的新手段。而在干细胞移植治疗心脏疾病的研究中，应用这一技术去阻断正常功能基因，然后观察相关基因或者蛋白质表达的变化，国内外尚少见相关文献报道。

由于 MSCs 具有多向分化潜能，且易获得、易扩增、不受伦理道德的限制；这些优点使 MSCs 成为一种理想的种子细胞。本实验采用 5-aza 作用于 MSCs 24 h，在诱导后 2 周能检测出心肌特异蛋白肌联蛋白的表达，阳性细胞数（35% ± 5%），与相关报道类似[7]；至于如何提高诱导率或者纯化这些阳性细胞，对于今后的体内移植研究及临床应用必将产生深远的意义。同时也观察到：经 5-aza 诱导后 MSCs 的肌联蛋白表达的荧光强度不及正常新生鼠心肌细胞，而且未观察到规则的肌小节形成以及搏动细胞，推测与 5-aza 促分化作用有限有关。

实验中利用阳离子脂质体可将携带 EGFP 的质粒 pGENESIL 转染入心肌细胞中，说明用脂质体可将外源性 DNA 转染入心肌细胞中，但转染率不高，约 35%，具体原因不详，分析可能与原代细胞转染率较低有关[8,9]。实验显示体内转录产生的针对肌联蛋白 N2B 区的 siRNA 对肌联蛋白基因能的发挥有效和特异的抑制作用，为 MSCs 定向分化为心肌样细胞过程中功能基因组学的研究奠定了方法学基础。由于本实验阻断的是肌小节组装的重要正常基因，在干扰后 24 h已经发现有核固缩、碎裂、坏死等现象的发生，细胞丧失了收缩性能，如果延长观察时间点，随着大量细胞的死亡，将不利于后续免疫组化的检测。这一点与阻断致病基因不同，因为后者延长阻断时间并不会影响细胞的寿命。推测细胞死亡的原因可能有：①肌联蛋白受到抑制后，心肌细胞的肌小节组装不能完成，细胞收缩的超微结构基础丧失；②与所使用的脂质体本身的细胞毒性有关；③转染时要求的无血清转染液不能提供足够的能量满足细胞生存的需要。探索其他转染方法和提高转染试剂质量或许有所帮助。

序列 1、2、3 来源于同一基因，同一靶区（TITIN N2B 区）的不同位点，它们各自的干扰效应强弱大相径庭，折射出每个位点地位的不平等性，有的位点显得重要些，有的则相对次要些。推测序列 2 所代表的位点可能是该基因靶区的核心位点，而 1、3 所对应的位点则可能相对较次要些。实验选择 N2B 区为干扰靶区，如果同时阻断多个核心区，对于降解同一靶基因效果如何？这是应该深入探讨的问题。

参考文献：

[1] 张　文，田　杰，江德勤，等. 骨髓间充质干细胞体外分化为心肌样细胞相关调控基因的时序表达[J]. 中华心血管病杂志，2004，32(11)：1004－1008.

[2] 吕铁伟，田　杰，朱　静，等. 骨髓间充质干细胞体内诱导分化为心肌细胞[J]. 细胞生物学杂志，2004，26(2)：197－203.

[3] 吕铁伟，田　杰，邓　兵，等. NKx2.5，GATA-4 基因表达对骨髓间充质干细胞分化为心肌细胞的影响[J]. 基础医学与临床，2005，25(1)：40－43.

[4] 江德勤，田　杰，白永虹，等. 骨髓间充质干细胞移植对心衰大鼠心肌结构和功能的影响[J]. 细胞生物学杂志，2004，26(6)：617－622.

[5] WANG J S，SHUM-TIM D，CHEDRAWY E，*et al*. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration：pathophysiologic and therapeutic implications[J]. J Thorac Caridovasc Surg，2001，122(4)：699－705.

[6] MATZKE M，MATZKE A J，KOOTER J M. RNA：guiding gene silencing[J]. Science，2001，293(5532)：1080－1083.

[7] LIU Y，SONG J，LIU W，*et al*. Growth and differentiation of rat bone marrow stromal cells：does 5-azacytidine trigger their cardiomyogenic differentiation?[J]. Cardiovasc Res，2003，58(2)：460－468.

[8] HAMMOND S M，BERNSTEIN E，BEACH D，*et al*. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells[J]. Nature，2000，404(6775)：293－296.

[9] BERNSTEIN E，CAUDY A A，HAMMOND S M，*et al*. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference[J]. Nature，2001，409(6818)：363－366.

（编辑　陈聪连）