文章编号:1000-5404(2007)13-1285-04

论著

Nogo-66受体RNA干扰质粒的构建及其干扰效率鉴定

范有明[1],蔡明春[2] ([1]汕头大学香港中文大学联合汕头国际眼科中心,汕头 515041;[2]第三军医大学高原军事医学系病理生理学及高原生理学教研室,全军高原医学重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 构建及筛选高效率针对Nogo-66受体(Nogo-66 receptor, NgR)进行RNA干扰(RNAi)的质粒。**方法** RT-PCR克隆NgR,插入表达质粒中,构建NgR-GFP融合蛋白表达质粒。根据NgR序列,设计4对针对NgR mRNA进行RNAi的寡核苷酸。退火后,插入短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)表达质粒中,构建shRNA表达质粒。将NgR-GFP融合蛋白表达质粒与shRNA表达质粒共转染AAV-293细胞。通过对GFP表达量的观察及Western blotting定量检测NgR-GFP融合蛋白表达量,鉴定shRNA表达质粒对NgR的干扰效率。**结果** 针对NgR进行RNAi的4个序列中,有1个序列的干扰效率大于90%以上。**结论** 成功构建了1个针对NgR的高效RNAi表达质粒。

关键词:Nogo-66受体;RNA干扰;质粒
中图法分类号:R392-33;R392.11 **文献标识码**:A

Construction and identification of plasmid mediated RNA interference targeting Nogo-66 receptor

FAN You-ming[1], CAI Ming-chun[2] ([1]Joint Shantou International Eye Center of Shantou University and Chinese University of Hong Kong, Shantou 515041; [2]Department of Pathophysiology, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct and identify of a plasmid mediated high efficiency of RNA interference (RNAi) against Nogo-66 receptor (NgR). **Methods** After cloning of NgR by RT-PCR, the fragments were inserted into pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO to produce plasmid expressing NgR-GFP fusion protein. Four pairs of oligonucleotide were designed according to NgR sequence and annealed. The resulting fragments were ligated into short hairpin RNA (shRNA) expressing plasmid. The plasmids expressing NgR-GFP fusion protein and shRNA were co-transfected into AAV-293 cells. RNAi efficiency against NgR was observed under fluorescent microscope and calculated by Western blotting. **Results** The interference efficiency of one sequence was above 90%. **Conclusion** A plasmid mediated high RNAi efficiency against NgR is constructed successfully.

Key words: Nogo-66 receptor; RNA interference; plasmid

成年哺乳动物(包括人)中枢神经损伤后难以再生。研究表明中枢神经系统中存在多种抑制神经再生的物质。参与中枢神经髓鞘形成的胶质细胞为少突胶质细胞。髓鞘中含有抑制神经再生的物质。已经明确的有3种,分别为髓磷脂相关糖蛋白(myelin-associated glycoprotein, MAG),Nogo-A以及少突胶质细胞髓鞘糖蛋白(oligodentrocyte-myelin glycoprotein, OMgp)。这3种物质均能通过神经元表达的Nogo-66受体(Nogo-66 receptor, NgR)抑制神经再生[1-4]。NgR为只有膜外结构的膜受体,通过糖基酯磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol, GPI)连接于细胞膜外。NgR由473个氨基酸组成,含有信号序列,N端亮氨酸富集重复结构域(leucine-rich repeat domain, LRR),8LRR结构域,C端LRR结构域,C端特有区。NgR借助GPI连接于神经细胞表面。由于NgR没有细胞内结构,它必须与其他跨膜信号分子相作用,将信号传导到细胞内。研究证实,NgR、LINGO-1以及p75或TROY形成受体复合体,参与了NgR的信号转导,作用于RhoA,使神经生长锥崩溃,从而抑制神经再生。

基金项目:中国博士后科学基金(2005037624);国家自然科学基金面上项目(30672038)
Supported by Science Foundation for Post-doctor of China (2005037624) and General Program of the National Natural Science Foundation of China (30672038)

作者简介:范有明(1968-),男,土家族,湖北省利川市人,博士,讲师,主要从事中枢神经损伤与修复方面的研究,现在第三军医大学高原军事医学系病理生理学及高原生理学教研室。电话:(023)68752340-8203, E-mail:youmingf@yahoo.com.cn

收稿日期:2007-01-22;**修回日期**:2007-04-03

从上述抑制分子信号传递的分子机制可知，NgR是连接上述3种神经再生抑制分子的桥梁。如能抑制其表达，就能一次性阻断3种抑制分子的抑制作用。近来发展起来RNA干扰技术，通过降解特定基因的mRNA，阻断其蛋白质翻译，从而沉默相应基因表达及其相应生物学功能。本研究利用这一技术，在离体细胞模型上，观察RNAi对NgR蛋白表达的影响，为下一步在动物体内进行促进神经再生的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验设备

凝胶扫描成像系统(UVP Bioimaging system, Epichemi Darkroom, CHEMI CAMERA, 美国)，梯度PCR仪(Eppendorf, 德国)，二氧化碳培养箱(REVCO, 美国)，倒置荧光显微镜(Nikon, 日本)，图像采集分析系统(Spot, 美国)。

1.2 主要试剂

PowerScript逆转录酶(Clontech, 美国)，Advantage 2多聚酶混合液(Clontech, 美国)，pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO试剂盒(Invitrogen, 美国)，BD™ Knockout Clone & Confirm PCR试剂盒(Clontech, 美国)，引物及核酸序列(美国绿阳公司合成)，PVDF膜(Millipore, 美国)，ECL检测试剂(Pierce, 美国)，NOGO-R抗体(Santa Cruz)，β-Actin抗体(Sigma, 美国)，Lipofectamine 2000(Invitrogen, 美国)，AAV-293细胞(Stratagene, 美国)，生物素连接的山羊抗兔二抗(Jackson, 美国)，HRP连接的抗生物素三抗(Jackson, 美国)，HRP连接的山羊抗小鼠二抗(Santa Cruz)。

1.3 方法

1.3.1 表达NgR-GFP融合蛋白质粒的构建 提取F344近交系大鼠大脑皮层总RNA，逆转录为cDNA，用PCR的方法扩增NgR cDNA。PCR引物序列：上游引物，5′-ATGAAGAGGGCGTCCTCCGG-3′；下游引物，5′-TGCAGGGCCCAAGCACTGTCC-3′。将PCR产物克隆到pcDNA3.1/CT-GFP(green fluorescent protein，绿色荧光蛋白)-TOPO载体中，用PCR的方法确定NgR的插入方向，测序确定序列正确与否。方向及序列正确的质粒命名为pcDNA NgR-GFP。

1.3.2 表达NgR shRNA质粒的构建 根据shRNA设计原理[5,6]，将阴性对照序列：5′-ACTACCGTTGTTATAGGTG-3′；NgR RNAi-1：5′-GCAGTACCTCTACCTACAA-3′；NgR RNAi-2：5′-GCAACCGAATCTCTTACGT-3′；NgR RNAi-3：5′-GTCTCACCATCCTGTGGCTG-3′；NgR RNAi-4：5′-CCGAATCTCTTACGTGCCA-3′设计成用5′-TTCAAGAGA-3′连接的反向互补序列。

退火杂交，插入RNAi-Ready pSIREN-DNR-DsRed-Express载体。根据不同的插入序列得到不同质粒，并分别命名为pDsred NgR RNAi阴性对照质粒，pDsred NgR RNAi -1,-2,-3,-4。其中pDsred NgRi RNAi阴性对照质粒为阴性对照(因为通过GenBank查寻，在大鼠基因组中无相似序列)。提取相应质粒，纯化后用于转染AAV-293细胞。

1.3.3 AAV-293细胞的培养及转染 AAV-293细胞接种于24孔培养板，放置于37 ℃、5% CO_2培养箱，在DMEM培养基(含10%胎牛血清，100 U/ml青霉素，100 mg/ml链霉素)中培养。用Lipofectamine 2000进行转染(按说明书进行)。共分5组，0.4 μg pcDNA NgR-GFP与0.4 μg pDsred NgR RNAi阴性对照质粒或0.4 μg pDsred NgR RNAi -1,-2,-3,-4中的任意1种组合，共转染AAV-293细胞。

1.3.4 荧光显微镜下观察干扰效果 质粒转染AAV-293细胞，48 h后在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白GFP及红色荧光蛋白DsRed的表达情况。

1.3.5 蛋白提取及Western blot检测 转染AAV-293细胞3 d，加入细胞裂解液，提取蛋白质。蛋白质经10% SDS-PAGE电泳后，转到PVDF膜上。5%的脱脂牛奶封闭。加入兔抗NOGO-R抗体(1∶200)，4 ℃过夜。加入生物素连接的山羊抗兔二抗(1∶20 000)，室温1 h，再加入HRP连接的抗生物素三抗(1∶20 000)，最后用ECL检测试剂盒检测。再次做Western blot时，先用剥离缓冲液剥离附着抗体。加入小鼠抗β-actin(1∶4 000)抗体，4 ℃过夜，加入HRP连接的山羊抗小鼠二抗，用ECL检测试剂盒检测。干扰效率的计算方法：NgR-GFP光密度=(阴性对照－RNAi)/阴性对照；β-actin光密度=(阴性对照－RNAi)/阴性对照；干扰效率= NgR-GFP光密度/β-actin光密度。

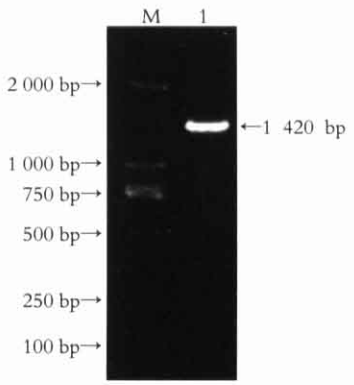
1.4 统计学分析

应用SPSS 13.0统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 构建NgR-GFP融合蛋白表达质粒

应用RT-PCR方法，从F344近交系大鼠大脑皮层细胞cDNA中成功地扩增了NgR cDNA，PCR产物出现在预期的1 420 bp大小位置(图1)。将其克隆到pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO表达载体中。测序显示F344近交系大鼠NgR序列中有5个位点的核酸序列与基因BANK记录中的序列不同。这5个核酸的位置为：428位的A变为G，586位的C变为T，818位的C变为G，1 086位的T变为C，1 271位的G变为A。NgR的插入方向与表达质粒的GFP一致，并且其序列融合在同一个开方阅读框(open reading frame, CDS)。提取pcDNA NgR-GFP质粒，转染AAV-293细胞，48 h后，可见绿色荧光蛋白GFP表达。说明成功构建了NgR-GFP融合蛋白表达质粒。

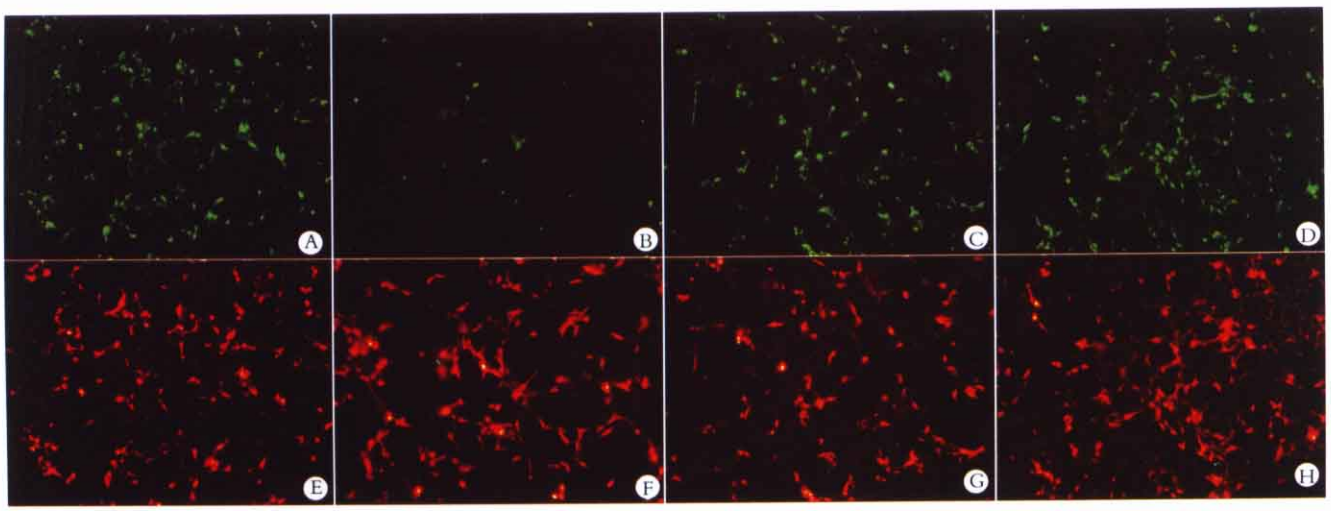


M：DNA标准(DL 2000)；1：NgR CDS

图1 NgR CDS RT-PCR产物电泳图

2.2　NgR RNAi 效果观察

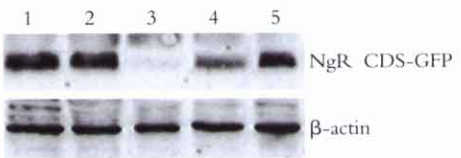
利用 BLOCK-iT™ RNAi Designer 软件，根据所测的 F344 近交系大鼠 NgR 核酸序列，找到 4 个得分级别高的 RNAi 序列。将这 4 个序列连同另 1 个阴性对照序列，按照表达 shRNA 的原理合成 5 对 DNA 序列。将退火片段插入带有 RNA 聚合酶Ⅲ启动子 U6 的质粒中，构建成表达 shRNA 的 RNAi 质粒。pcDNA NgR-GFP 质粒及表达 shRNA 质粒共转染 AAV-293 细胞 48 h 后，荧光显微镜下可看到，在 4 对干扰序列对应的质粒中，pNgR RNAi-2 的干扰效率特别明显（图 2）。



A～D：经 pDsred NgR RNAi-1，2，3，4 质粒干扰后 NgR-GFP 的表达量；E～G：转染了 pDsred NgR RNAi-1，2，3，4 质粒的 AAV-293 细胞

图 2　NgR RNAi 效果观察　（荧光显微镜×100）

为进一步确定干扰效果，我们接着用 Western blot 进行了定量分析。将 pcDNA NgR-GFP 质粒及表达 shRNA 的质粒共转染 AAV-293 细胞 72 h 后，提取蛋白。Western blot 显示，pcDNA NgR RNAi-2 质粒的干扰效率特别明显（图 3）。光密度定量分析结果显示，pcDNA NgR RNAi-1，2，3，4 质粒的干扰效率分别为（11 ± 2）%、（91 ± 4）%、（40 ± 2）% 及（28 ± 2）%。其中 pcDNA NgR RNAi-2 的干扰效率显著高于其他 4 组（$P < 0.01$）。经过这种筛选策略，我们成功地在 NgR mRNA 序列中找到了 1 个高效率干扰 NgR 蛋白表达的 RNAi 质粒。



1：转染 pDsred NgR RNAi 阴性对照质粒；2～5：转染 pDsred NgR RNAi-1，2，3，4 质粒

图 3　Western blot 分析 NgR RNAi 效率

3　讨论

中枢环境中存在抑制神经再生的分子，目前认为这些抑制分子是导致神经再生失败的重要原因。中枢神经损伤时，髓鞘中的抑制分子暴露，主要有 3 种神经再生抑制分子：NOGO-A、MAG、OMgp。它们均作用于神经细胞膜上的 NgR 受体[1-4]。该受体在中枢神经中广泛表达[7]。NgR 与 LINGO-1、p75 或 TROY 形成 NgR 受体复合体（NgR/LINGO-1/p75 or TROY）[8-10]。p75 细胞内结构域的第 5α 螺旋与 RhoA-GDP-鸟嘌呤核苷酸解离抑制因子（guanine nucleatide dissociation inhibitors，GDI）复合体中的 GDI 结合，将 RhoA-GDP 从复合体中释放出来，RhoA 与 GTP 结合，转变为活性形式。活性形式的 RhoA 与 ROCK 羧基端 Rho 结合结构域结合，解除 ROCK 蛋白自身对其氨基端酶结构域的抑制作用，激活其蛋白激酶活性。激活的 ROCK 磷酸化肌球蛋白轻链及肌球蛋白轻链磷酸酶结合亚基，引起磷酸化肌球蛋白轻链水平增加，肌动肌球蛋白（actomyosin）收缩。激活的 ROCK 还可以磷酸化 LIM 激酶，后者通过磷酸化 cofilin，稳定纤维性肌动蛋白（filament actin），抑制神经再生[11]。NgR 受体复合体-RhoA-抑制神经再生信号途径的发现，初步揭示了髓鞘分子抑制神经再生的分子机制，是最近在成年哺乳动物中枢神经再生方面所取得的重大进展之一。

从上述抑制分子信号传递的分子机制可知，3 种抑制分子均通过 NgR 受体复合体，抑制神经再生。如能抑制其表达，便能一次性阻断多种抑制分子的神经再生抑制作用。近年来发展起来 RNA 干扰（RNA in-

terference, RNAi)技术,是一种阻断基因表达、抑制其功能的有效工具之一。RNAi 是由 21 ~ 23 bp 双链小分子 RNA 诱发的,RNA 序列指导的,RISC(RNA-induced silencing complex)介导的,降解同源 mRNA 的现象。因此,当外源引入小分子 RNA,就可激活这一机制,引起 RNAi。siRNA 为指导分子,其序列特异性决定所降解的 mRNA 分子。因此,在设计 siRNA 之前,应准确地弄清楚被干扰 mRNA 的序列。根据 mRNA 的序列设计 siRNA 的序列。本课题的目标之一就要在 F344 近交系大鼠视神经挤压伤模型上观察 NgR RNAi 对视神经再生的治疗效果。由于大鼠基因组常出现多态性,如果不能准确地知道所用种类大鼠 NgR 的序列,当 RNAi 针对多态性发生的部位,将显著影响 RNAi 的干扰效率,就无法准确地判断 NgR RNAi 的治疗效果。因此,我们首先克隆 F344 近交系大鼠 NgR cDNA,并对其序列进行了测序,以准确地知道 F344 近交系大鼠 NgR mRNA 的序列。根据测序结果,设计 RNAi 序列,以避免因核酸多态性影响 RNAi 效果。

利用 RNAi 技术,阻断目的基因的第 2 步,也是最关键的一步就是找出具有高效率 RNAi 的序列。由于不同的 mRNA 分子存在差异等因素的影响,针对 mRNA 分子不位点的 RNAi 效率相差很大。即便使用专业 RNAi 设计软件找出的 RNAi 序列,也只能提高找到高效 RNAi 序列的几率,不能十分准确地预测所设计序列的干扰效率。因此,要找出高效率的 RNAi 序列,还需用实验的方法来实现。目前设计软件预测的 4 个序列中,一般能找到一个干扰效率达到 70% 以上的序列。RNAi 实验主要采用两种策略:一种是体外合成 siRNA,然后将其转入细胞内;另一种是构建表达 shRNA的载体或 shRNA 表达盒。将其转入细胞内后,质粒或 shRNA 表达盒利用其 RNA 聚合酶Ⅲ启动子(如 U6),以及细胞内的 RNA 聚合酶Ⅲ,合成 shRNA,经 Dicer 酶切后,成为 siRNA。后一策略由于启动子不断地合成 shRNA,故 RNAi 持续时间长且效率高[5,6]。

本研究利用载体表达 shRNA 的策略,共针对 NgR 序列上 4 个不同的序列(靶点)进行了 RNAi 实验。研究表明,有 1 个序列可以高效地阻断 NgR-GFP 蛋白的表达,另外 3 个质粒干扰效率不足 50%。在筛选高效 RNAi 序列过程中,本研究采用了双质粒共转染的方法。一种质粒表达目的基因,是因为它与 GFP 融合,可在荧光显微镜下直观地判断其表达量;另一种质粒为干扰 NgR 蛋白表达的 RNAi 质粒。它携带红色荧光蛋白 Dsred,可以指示被 RNAi 质粒转染的细胞。在荧光显微镜下,通过对与目的基因融合的 GFP 的观察,可以迅速直观地了解 RNAi 效率。这一方法比用 RT-PCR,免疫组化及 Western blot 等方法简单快捷,为快速初选高效率序列的理想方法之一。随后的 Western blot 实验结果也进一步证实了这一方法的可靠性。

总之,利用离体细胞模型,我们合成了 4 对针对 NgR mRNA 进行 RNAi 的序列,插入 shRNA 表达质粒后,成功地找到了一个高效率干扰 NgR 表达的质粒。我们下一步将把这个质粒的 shRNA 表达盒插入腺相关病毒载体中,包装成病毒颗粒后,用于视神经挤压伤 F344 近交系大鼠模型,观察其对视神经再生的治疗效果,为基因治疗中枢神经再生奠定基础。

参考文献:

[1] Liu B P, Fournier A, GrandPre T, *et al*. Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor[J]. Science, 2002, 297(5584): 1190 - 1193.

[2] Fournier A E, GrandPre T, Strittmatter S M. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration[J]. Nature, 2001, 409(6818): 341 - 346.

[3] Domeniconi M, Cao Z, Spencer T, *et al*. Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth[J]. Neuron, 2002, 35(2): 283 - 390.

[4] Wang K C, Koprivica V, Kim J A, *et al*. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth[J]. Nature, 2002, 417(6892): 941 - 944.

[5] McCaffrey A P, Meuse L, Pham T T, *et al*. RNA interference in adult mice[J]. Nature, 2002, 418(6893): 38 - 39.

[6] Novina C D, Sharp P A. The RNAi revolution[J]. Nature, 2004, 430(6996): 161 - 164.

[7] 谢 琳, 贺翔鸽, 何凤慈, 等. Nogo-66 受体在大鼠神经组织中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(23): 2335 - 2337.

[8] Mi S, Lee X, Shao Z, *et al*. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex[J]. Nat Neurosci, 2004, 7(3): 221 - 228.

[9] Park J B, Yiu G, Kaneko S, *et al*. A TNF receptor family member, TROY, is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors[J]. Neuron, 2005, 45(3): 345 - 351.

[10] Shao Z, Browning J L, Lee X, *et al*. TAJ/TROY, an orphan TNF receptor family member, binds Nogo-66 receptor 1 and regulates axonal regeneration[J]. Neuron, 2005, 45(3): 353 - 359.

[11] Hsieh S H, Ferraro G B, Fournier A E. Myelin-associated inhibitors regulate cofilin phosphorylation and neuronal inhibition through LIM kinase and Slingshot phosphatase[J]. J Neurosci, 2006, 26(3): 1006 - 1015.

(编辑 张大春)