文章编号:1000-5404(2009)13-1291-04

论著

小干扰 RNA 特异性抑制淋巴细胞 T-bet 表达的研究

张 维[1],李宝金[1],伊远学[1],吴立旋[1],刘晓平[1],陶剑平[2] ([1]北京大学深圳医院肝胆腔镜外科,广东 深圳 518036;[2]中山大学中山医学院微生物学教研室,广州 510080)

摘 要:目的 探讨体外转录法合成的小干扰 RNA(small interfering RNA,siRNA)对人淋巴细胞 T-bet 基因表达及功能的影响。**方法** 设计并合成4条 siRNA(siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3 及 siRNA-co),脂质体法转染淋巴细胞。转染后48 h 收集转染后细胞,采用 RT-PCR 方法检测细胞 T-bet mRNA 的抑制率;酶联免疫吸附试验(ELISA)方法检测细胞上清液中 IL-4 和 IFN-γ 水平;将淋巴细胞与人脐静脉血管内皮细胞(ECV304)共培养检测淋巴细胞对 ECV304 增殖的抑制作用。**结果** 转染后 48h 半定量 RT-PCR 的检测显示 siRNA-1、siRNA-2 和 siRNA-3 转染后的淋巴细胞 T-bet 表达抑制率分别为(72.50±1.01)%、(5.40±0.63)%和(30.90±0.90)%,以 siRNA-1 转染后的淋巴细胞 T-bet 表达抑制作用最强($P<0.05$),其细胞上清液中 IL-4 水平最高,而 IFN-γ 的水平最低($P<0.05$),siRNA-1 转染淋巴细胞对人脐静脉血管内皮细胞(ECV304)增殖的抑制作用低于 siRNA-2 及 siRNA-3。**结论** siRNA 可特异性抑制淋巴细胞 T-bet 基因的表达,从而为进一步研究 siRNA 在移植免疫耐受中应用提供了理论和实验基础。

关键词:RNA 干扰;小干扰 RNA;淋巴细胞;T-bet
中图法分类号:R392-33;R392.12;R392.4 **文献标识码**:A

Study on the expression of T-bet on human lymphocytes inhibited by specific siRNA

ZHANG Wei[1], LI Bao-jin[1], YI Yuan-xue[1], WU Li-xuan[1], LIU Xiao-ping[1], TAO Jian-ping[2] ([1]Department of Hepatobiliary Laparoscopy Surgery, Shenzhen Hospital, Peking University, Shenzhen 518036, Guangdong Province; [2]Department of Microbiology, Zhongshan Medical College, Sun Yet-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of T-bet on human lymphocytes inhibited by siRNA. **Methods** Four different siRNAs (siRNA-1, siRNA-2, siRNA-3, and siRNA-co) were designed and synthysized and transfected into freshly isolated human lymphocytes with cationic liposome. The changes of T-bet mRNA levels were determined by semi-quantitative RT-PCR at 48 h after transfection. IL-4 and IFN-γ cytokine levels were assayed by ELISA. The proliferation of ECV304 co-cultured with T lymphocyte by cck-8 assay was determined. **Results** Different siRNA showed different reduction in T-bet expression. At 48 h after transfection, the degrees of reduction with siRNA-1, siRNA-2, and siRNA-3 were (72.50±1.01)%, (5.40±0.63)%, and (30.90±0.90)%, respectively as compared with those of the control ($P<0.05$). siRNA-1 was the most efficient. The results of semi-quantitative RT-PCR assay indicated T-bet mRNA levels were inhibited after transfection. IL-4 cytokine level in the transfection group was higher than that in the control group, but IFN-γ cytokine level in the transfection group was lower than that in the control group. The proliferation level of ECV304 co-cultured with T lymphocyte transfected with siRNA-1 group was higher than that of siRNA-2 group and siRNA-3 group. **Conclusion** Three different siRNAs could reduce the expression of T-bet and the T-bet mRNA level. siRNA may be useful for further study on graft-versus-host disease after allogeneic transplantation.

Key words: RNA interference; small interfering RNA; lymphocyte ; T-bet

诱导移植免疫耐受是解决临床器官移植排斥反应的理想方法。研究证明,移植免疫耐受的形成与 Th1/Th2 细胞亚群的转换有关。Th1 细胞应答与免疫排斥反应有关;Th2 产生的细胞因子可抑制 Th1 活性,下调 Th1 驱动的排斥反应,从而有助于建立移植免疫耐受[1],即可通过诱导"免疫偏离(immune deviation)"以达建立移植免疫耐受之功效[2]。T-bet(T-box ex-

基金项目:国家自然科学基金(30371386);广东省自然科学基金(31010)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371386) and the Natural Science Foundation of Guangdong Province (31010)
作者简介:张 维,男,湖南省醴陵市人,硕士研究生,医师,主要从事肿瘤免疫和移植免疫学方面的研究。电话:(010)84967878, E-mail: drzhangwei@bjmu.edu.cn
通信作者:刘晓平,电话:(0755)83923333-6026,E-mail: ninliu@163.com
收稿日期:2008-09-30;修回日期:2009-01-31

pressed in T cells)是属于T-box家族的新型转录因子,选择性地表达于Th1细胞,作为Th1特异的转录因子能诱导IFN-γ的产生,在Th1细胞的分化中起着决定性的作用[3]。基于以上理论,我们尝试通过小干扰RNA干预转录因子T-bet,从而介导Th细胞免疫偏离,促进Th2细胞的产生,抑制Th1细胞启动的排斥反应,诱导免疫耐受,从而控制移植物抗宿主病(GrafT-Versus-Host Disease,GVHD)的发生、发展。

1 材料与方法

1.1 材料

小牛血清购自杭州四季青公司,RPMI1640培养基购自美国GIBCO公司,Lipofectamine 2000为美国Gibco公司产品。反转录试剂盒购自Fermantas公司,PCR试剂盒购自北京博大泰克公司。免疫细胞化学试剂盒购自深圳晶美公司,人淋巴细胞分离管购自深圳达科维公司,IL-4和IFN-γ ELLSA试剂盒购自法国Diaclone公司;CCK-8为日本同仁化学研究所产品。

1.2 方法

1.2.1 siRNA的设计与合成 根据GeneBank人淋巴细胞T-bet基因(GeneID 30009)已知序列,依据Elbashir等的siRNA设计原则[4],我们选取了3条siRNA(siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3),并在预实验过程中根据基因沉默作用最强的siRNA-2,设计随机阴性对照(siRNA-co)。利用Silencer siRNA Construction Kit按照试剂盒操作指南体外转录法合成siRNA。siRNA序列如下:

siRNA-1:(正义链)5′-GCAUAUCUUUACUUUCCAATT-3′,(反义链)5′-UUGGAAAGUAAAGAUAUGCGT-3′;siRNA-2:(正义链)5′-GGAAGUUUCAUUUGGGAAATT-3′,(反义链)5′-UUUCCCAAAUGAAACUUCCTG-3′;siRNA-3:(正义链)5′-GCCAAAGGAUUCCGGGAGATT-3′,(反义链)5′-UCUCCCGGAAUCCUUUGGCTT-3′;siRNA-co:(正义链)5′-GACUAUCUUAUCUUCUCAATT-3′,(反义链)5′-UUGAGAAGAUAAGAUAGUCGT-3′,由上海吉玛制药技术公司合成。

1.2.2 外周血淋巴细胞的分离与培养 30名健康献血员(18~40)岁的外周血作为实验对象。在无菌条件下抽取外周血并加肝素抗凝,加入人淋巴细胞分离管,800×g离心10 min。从分离管中吸取PBMC细胞层,置37 ℃、5% CO_2、饱和湿度培养箱中培养,2 h后,去除贴壁细胞。台盼蓝拒染法测定活细胞数,调节细胞浓度为$1\times10^6 ml^{-1}$,继续培养。

1.2.3 脂质体转染 共设5组:实验组3组,分别为siRNA-1组(转染时加入siRNA-1与脂质体复合物)、siRNA-2组(转染时加入siRNA-2与脂质体复合物)、siRNA-3组(转染时加入siRNA-3与脂质体复合物);对照组2组,分别为control组(空白对照组,转染时不加siRNA或脂质体)、随机阴性对照(siRNA-co与脂质体复合物)。

转染前2 h,将新鲜分离培养的淋巴细胞重悬于无血清RPMI1640培养基,加入6孔培养板中,每孔细胞数为1×10^6。根据Lipofectamine 2000转染试剂盒的说明转染淋巴细胞,每孔加入siRNA 100 pmol,脂质体5 μl。转染4 h后洗涤细胞并重悬于含10%胎牛血清的培养基中继续培养。转染48 h后,收集细胞进行检测。

1.2.4 脂质体介导载体转染T淋巴细胞的转染率 为了检测脂质体法在悬浮T淋巴细胞中的质粒转染效率,我们利用Lipofectamine 2000转染试剂盒将质粒pEGFP(本实验室保存)转染T淋巴细胞,然后在荧光显微镜下观察荧光,计算转染率,公式为:(绿色荧光蛋白细胞数/总细胞数×100)[5]。

1.2.5 半定量RT-PCR法测定T-bet基因mRNA的变化 转染后48 h,每组收集1×10^6个细胞,按照Total RNA Isolation System试剂盒的操作指南提取细胞总RNA。通过M-MLV逆转录试剂盒进行总RNA的反转录,其合成的cDNA通过多聚酶链反应(PCR)扩增目的基因片段。反应体系为RT产物5 μl,10×PCR buffer 5 μl,$MgCl_2$ 1.5 mmol/L,上游引物1 μl,下游引物1 μl,*Taq*酶1 μl,dNTP 2 μl,无RNA酶水补至50 μl。反应条件为95 ℃ 2 min;95 ℃ 30 s,56 ℃ 45 s,72 ℃ 45 s,共32个循环;72 ℃ 10 min。淋巴细胞T-bet和GAPDH基因PCR扩增产物长度分别为307 bp和301 bp。以GAPDH为内参照,最终的PCR产物通过1.5%的琼脂糖凝胶电泳。电泳显像后,通过凝胶成像分析仪(Dolphin-DOC,美国Wealtec公司)对凝胶上表达的条带进行扫描并用Dolphin分析软件测定灰度值,将各样本灰度值与其对应GAPDH灰度值的比值作为该样本T-bet mRNA的相对量,然后计算出siRNA转染后的淋巴细胞对其T-bet基因的抑制率。计算公式如下。

siRNA转染后的淋巴细胞其T-bet基因的抑制率=1-(转染siRNA组T-bet mRNA的相对量/空白对照组T-bet mRNA的相对量)×100%

1.2.6 ELISA法检测细胞上清液中IFN-γ和IL-4浓度 收集siRNA转染48 h后的淋巴细胞培养上清液,利用ELISA法检测其中IFN-γ和IL-4含量。

1.2.7 淋巴细胞对人脐静脉内皮细胞(ECV304)抑制作用的检测 将人脐静脉内皮细胞(ECV304)调整浓度为$1\times10^6 ml^{-1}$,分别与转染siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3、siRNA-co的淋巴细胞及未转染siRNA的淋巴细胞(以上5组为实验组)按1∶10靶效比混合培养24 h,未与淋巴细胞混合培养的ECV304细胞作为空白对照组,然后根据CCK-8试剂盒说明书方法测定450 nm吸光度[D(450)]检测上述淋巴细胞对人脐静脉内皮细胞(ECV304)增殖的抑制作用。

淋巴细胞对ECV304增殖的抑制率=(空白对照组A值-实验组A值)/空白对照组A值×100%

1.3 数据处理

用SPSS软件包处理,数据以$\bar{x}\pm s$表示,3组以上的组间差异采用单因素方差分析,两组间差异采用t检验。

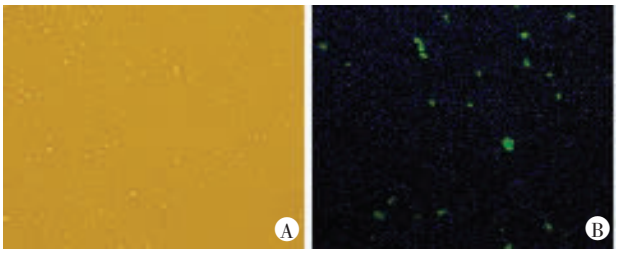
2 结果

2.1 外周血中淋巴细胞的存活率

选取30名健康献血员,取外周血进行淋巴细胞分离与培养。分离后台盼蓝拒染法测定活细胞数为(97±2.5)%。

2.2 脂质体介导载体法转染T淋巴细胞的转染率

Lipofectamine 2000试剂盒将质粒pEGFP转染T细胞,48 h后在荧光显微镜下观察荧光(图1),计算出转染率为35.2%。

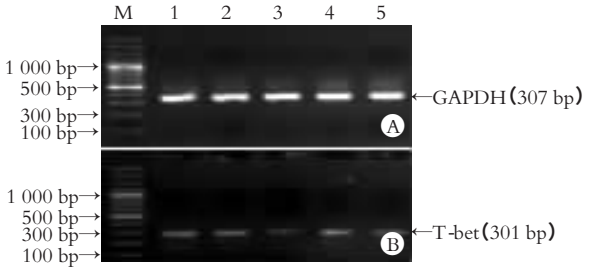


A:质粒 pEGFP 转染淋巴细胞前; B:质粒 pEGFP 转染淋巴细胞 48 h 后

图 1　荧光检测质粒 pEGFP 转染后 48 h 后的淋巴细胞　(×20)

2.3　半定量 RT-PCR 法测定 T-bet 基因的抑制率

淋巴细胞经 siRNA 转染后 48h,每组分别收集 1×10^6 个细胞进行 RT-PCR 检测。不同 siRNA 对 T-bet 基因表达的抑制作用如图 2 所示,siRNA 转染 48 h 后,siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3 组 T-bet 表达均受到抑制,其抑制率分别为(72.50 ± 1.01)%、(5.40 ± 0.63)% 和(30.90 ± 0.90)%,与空白对照组(control 组)比较均具有显著性差异($P<0.05$)。其中,siRNA-1 组抑制作用最强,与 siRNA-2 组、siRNA-3 组相比均有显著性差异($P<0.01$)。



A:质粒 pEGFP 转染淋巴细胞前; B:质粒 pEGFP 转染淋巴细胞 48 h 后

M: 标准; 1: 空白对照组; 2: siRNA-co; 3: siRNA-1; 4:siRNA-2; 5: siRNA-3

图 2　半定量 RT-PCR 检测转染后 48 h T-bet mRNA 水平的变化

2.4　淋巴细胞上清液中 IFN-γ 和 IL-4 的含量

结果见表 1,转染 siRNA-1 组(RNA 组)细胞上清中 IL-4 水平高于对照组($P<0.05$),而 IFN-γ 的水平低于对照组($P<0.05$)。

表 1　细胞培养上清中细胞因子 IFN-γ 和 IL-4 水平($n=6, \bar{x}\pm s$)

组别	IFN-γ 浓度(pg/ml)	IFN-γ(OD 值)	IL-4 浓度(pg/ml)	IL-4(OD 值)
对照组	347.50 ± 6.92	1.807 ± 0.036	9.39 ± 1.06	0.186 ± 0.021
siRNA-1 组	295.77 ± 5.96[a]	1.538 ± 0.031[a]	12.83 ± 1.21[a]	0.254 ± 0.024[a]
siRNA-2 组	329.42 ± 5.58	1.713 ± 0.029	10.15 ± 1.31	0.201 ± 0.026
siRNA-3 组	315.77 ± 5.38	1.624 ± 0.028	10.51 ± 1.57	0.218 ± 0.031

a: $P<0.05$,与对照组比较

2.5　淋巴细胞对人脐静脉内皮细胞(ECV304)抑制作用的检测

其结果图 3 示:在效靶比 1∶10 时,转染 siRNA-1 淋巴细胞 ECV304 增殖的抑制率为(24.54 ± 1.36)%, 其 ECV304 细胞增殖的抑制作用最弱,与转染 siRNA-2 淋巴细胞、转染 siRNA-3 淋巴细胞、转染 siRNA-co 淋巴细胞和未转染 siRNA 的淋巴细胞组的差异有显著性($P<0.05$)。

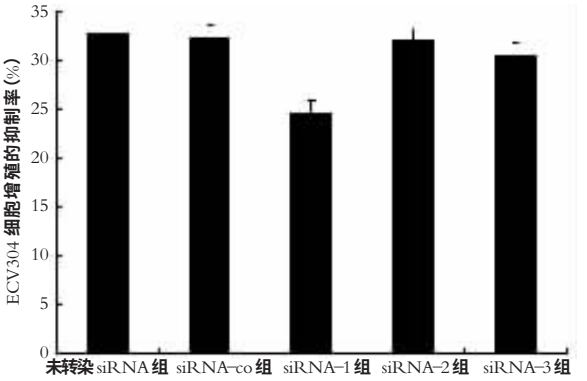


图 3　转 siRNA 淋巴细胞对 ECV304 细胞增殖的抑制率

3　讨论

1986 年 Mosmann 等[6]依小鼠 $CD4^+$ T 细胞分泌的细胞因子和介导免疫功能的不同,将其分为 Th1 和 Th2 2 个亚群。Th1 主要分泌 IL-12,称为 Thl 型细胞因子,参与细胞免疫;Th2 主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 及 IL-13 等,称为 Th2 型细胞因子,介导体液免疫[7],正常机体内 Thl/Th2 细胞维持着动态平衡。Th1 和 Th2 细胞所诱导的免疫反应能互相调节或产生交叉调节作用。IL-4 和 IL-l0 下调 Th 应答反应,而 IFN-γ 可抑制 Th 细胞的增殖[8]。Saggi[9]等在器官移植排斥反应的研究过程中发现 Thl 型细胞因子的表达增多及 Th2 型细胞因子不表达或低表达,而在免疫耐受时则呈相反的情况,因而推测这种 Thl 型和 Th2 型细胞因子的相对水平变化可能是产生排斥反应或免疫耐受的重要原因。随后的多个实验证实分化的 Th2 在啮齿动物中诱导移植免疫耐受,转染 IL-4 基因大鼠的移植心脏存活时间延长;在转染组中可检出 IL-4,而 IL-2 及 IFN-γ 受到抑制,Th2 的偏移有助于产生移植耐受,部分机制在于诱导 Th1 细胞因子下调[10]。采用体外诱导的 Th2 型细胞进行异基因骨髓移植,显示 Th2 型细胞可有效地减低和延迟 GVHD 的发生[11]。

T-bet 是 Szabo[12]等发现的一种 Thl 特异的转录因子,不但能正向促进 Thl 细胞的极化,诱导产生 IFN-γ 等 Thl 型细胞因子,同时也能促使 Th2 细胞向 Thl 的转换,因此 T-bet 可特异地调控 Th0 细胞向 Thl 的分化,起到 Thl/Th2 转换的开关作用。T-bet 不仅控制 Thl 细胞特征性细胞因子 IFN-γ 的表达,而且抑制 Th2 细胞特征性转录因子 IL-4 的产生[13]。

RNA 干扰(RNAinterference,RNAi)是将一段双链 RNA 序列导入机体或细胞中,其中与之有同源序列的基因的表达将会受到部分或完全抑制,即基因沉默[14]。RNAi 技术的日渐发展和成熟为人类开启了寻

找新型治疗策略的大门。不同于传统的药物靶点如蛋白质、酶和受体,siRNA 诱导的抑制提供了转录后的靶点。因此在医学研究领域,学者们将 RNAi 作为潜在的基因治疗手段并通过加强转染效率来提高其效应。RNAi 在血液学、肿瘤学、干细胞生物学和感染性疾病学等研究领域中都有着相应的应用,如相关的研究为用 RNA 来治疗 SARS 提供实验依据[15]。LovetT-Racke 等[16]利用 RNAi 技术沉默 T-bet 基因治疗多发性硬化病,显示 T-bet 基因可作为治疗 Th1 细胞所介导疾病的靶点。Bachmann 等[17]应用 RNAi 沉默人白血病细胞 KG-1 的 T-bet 基因探讨了 T-bet 基因的活化可能纠正白血病免疫抑制相关的 Th1 型细胞因子缺乏。我们利用体外转录法合成的 siRNA,在脂质体介导下转染淋巴细胞观察其对淋巴细胞 T-bet 基因表达和功能的影响,进而探讨 siRNA 在移植免疫中的作用和意义。

我们的研究结果表明体外合成的3条 siRNA(siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3)通过脂质体转染淋巴细胞后,T-bet 的表达的抑制效率有所不同,其中 siRNA-2 抑制 T-bet 的抑制作用最明显。转染后 48 h 的半定量 RT-PCR 检测检测显示 siRNA-1 组的 T-bet 表达抑制率较对照组明显减低($P < 0.05$),表明 siRNA 可在 mRNA 水平抑制 T-bet 基因表达,且靶向 T-bet mRNA 不同部位的 siRNA 基因沉默作用不同。为了进一步研究其特异性,我们针对 siRNA-2 设计并合成了随机阴性对照 siRNA-co ,这种与 siRNA-2 核苷酸完全一致但序列随机的 siRNA-co 在受体分子水平和 mRNA 水平均无 T-bet 基因沉默作用,验证了 siRNA 介导的基因沉默作用存在序列特异性。实验过程中我们同时进行了单纯脂质体转染和单纯 siRNA 转染的对照实验,结果对照组均无显著抑制作用,表明同等剂量的脂质体或 siRNA 无明显的抑制作用。转染 siRNA-1 后 48 h 的 ELISA 检测显示细胞上清中细胞因子 IL-4 水平高于对照组而 IFN-γ 的水平低于对照组。另外我们对淋巴细胞对人脐静脉内皮细胞(ECV304)抑制作用的进行检测,结果显示转染 siRNA 的淋巴细胞对 ECV304 细胞增殖的抑制作用比为转染 siRNA 的淋巴细胞的抑制作用降低,其中转染 siRNA-1 淋巴细胞抑制作用降低最明显。

综上所述,本研究表明体外合成的 T-bet 基因特异性 siRNA,通过脂质体介导转染淋巴细胞后,可特异性抑制 T-bet 的表达。由于 T-bet 基因是 Th0 向 Th1 分化的关键因素,而活化的 T 淋巴细胞在 GVHD 的发生、发展中起重要作用,因此本课题为 T-bet 基因特异性 siRNA 在移植免疫耐受及移植物抗宿主病防治方面的研究开辟了新的思路。

参考文献:

[1] Li X C, Zand M S, Li Y, *et al*. On histocompatibility barriers, Th1 to Th2 immune deviation, and the nature of the allograft responses[J]. J Immunol, 1998,161(5): 2241 - 2247.

[2] Aharoni R, Teitelbaum D, Arnon R, *et al*. Copolymer 1 inhibits manifestations of graft rejection[J]. Transplantation, 2001, 72(4): 598 - 605.

[3] Robinson D S, Lloyd C M. Asthma: T-beT--a master controller? [J]. Curr Biol,2002,12(9):R322 - R324.

[4] Elbashir S M, Harborth J, Weber K, *et al*. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using a small interference RNAs[J]. Methods, 2002, 26: 199 - 213.

[5] 姜 萌,王长谦,王彬尧,等. 低氧诱导因子过表达对人外周血内皮祖细胞分化影响的体外研究[J]. 中国实验血液学杂志,2006,14(3): 565 - 570.

[6] Mosmann T R, Cherwinski H, Bond M W, *et al*. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins[J]. J Immunol, 1986, 136(7): 2348 - 2357.

[7] Maggi E, Biswas P, Del-Prete G, *et al*. Accumulation of Th-2-like helper T cells in the conjunctiva of patients with vernal conjunctivitis [J]. J Immunol,1991,146(4):1169 - 1174.

[8] 顾国浩,彭群新. Th1/Th2 细胞的免疫功能变化及其意义[J]. 国外医学:临床生物化学与检验学分册, 2003,24(6):333 - 334.

[9] Saggi B H, Fisher Ra, Bu D, *et al*. Intragraft cytokine expression and tolerance induction in rat renal allografts[J]. Transp1antation,1999, 67(2):206 - 210.

[10] Takeuchi T, Ueki T, Sunaga S, *et al*. Murine interleukin 4 transgenic heart allograft survival prolonged with down-regulation of the Th1 cytokine mRNA in grafts[J]. Transplantation, 1997, 64(1): 152 - 157.

[11] 夏云金, 高清平, 万楚成, 等. 肝细胞生长因子对 ALL 小鼠骨髓移植后 GVHD 和血清 Th1/Th2 相关细胞因子的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2005, 13(1): 35 - 38.

[12] Szabo S J, Kim S T, Costa G L, *et al*. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment[J]. Cell, 2000,100(6):655 - 669.

[13] Szabo S J, Sullivan B M, Stemmann C, *et al*. Distinct effects of T-bet in Th1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD_4 and CD_8 T cells[J]. Science,2002,295(5553):338 - 342.

[14] 李 阳, 倪 兵. RNA 干扰与人类疾病[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(23):2393 - 2395.

[15] 李 阳,倪 兵,石辛甫,等. 质粒表达型 SiRNA 对 SARS-CoV 复制与感染干扰的初步研究[J]. 第三军医大学学报,2005,27(2): 91 - 94.

[16] LovetT-Racke A E, Rocchini A E, Choy J, *et al*. Silencing T-bet defines a critical role in the differentiation of autoreactive T lymphocytes [J]. Immunity, 2004, 21(5): 719 - 731.

[17] Bachmann M, Dragoi C, Poleganov M A, *et al*. Interleukin-18 directly activates T-bet expression and function *via* p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB in acute myeloid leukemia-derived predendritic KG-1 cells[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(2): 723 - 731.

(编辑 王 红)