RNA干扰对人瘢痕疙瘩成纤维细胞TGF-β1刺激后胶原合成的影响

赵 平[1],李世荣[2] (第三军医大学:1.训练部研究生处;2.附属西南医院整形科,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 体外构建结缔组织生长因子(CTGF)序列特异性小干扰RNA表达载体,转染导入后研究其对人瘢痕疙瘩成纤维细胞(HKFs)胶原蛋白分泌的影响。**方法** 体外构建CTGF序列特异性小干扰RNA质粒表达载体,Dosper脂质体转染人瘢痕疙瘩成纤维细胞后,观察加入10 ng/mL剂量的转化生长因子(TGF-β1)刺激前后胶原蛋白水平的变化。**结果** 转染小干扰RNA质粒后,胶原蛋白分泌水平降为正常表达的51.6%;经TGF-β1刺激后,蛋白表达仍无明显变化。**结论** 小干扰RNA质粒表达载体可抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞胶原蛋白分泌,为临床上瘢痕疙瘩的基因治疗提供理论依据。

[关键词] RNA干扰;人瘢痕成纤维细胞;胶原蛋白;转化生长因子-β1

[中图分类号] R62; Q782 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2009)02-0081-02

Impact of RNAi on collagen secretion in human keloid fibroblasts

ZHAO Ping, LI Shi-rong (Office of Graduate Studies, Department of Training, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of small interfering RNA (siRNA) -expressing plasmids targeting connective tissue growth factor(CTGF) on collagen secretion in human keloid fibroblasts(HKFs). **Methods** Constructed siRNA-expressing plasmids targeting CTGF were transfected into HKFs by Dosper package. The collagen level was measured by 3H-proline incorporation method before and after HKFs were stimulated by transforming growth factor(TGF-β1) of the dosage of 10 ng/mL. **Results** The collagen level was only 51.6% of the normal level and had no obvious change even after stimulated by TGF-β1. **Conclusion** The down-regulation of collagen by constructed siRNA-expressing plasmids may be a new way to treat keloid.

Keywords: RNA interference; human keloid fibroblast; collagen; TGF-β1

瘢痕疙瘩(Keloid,KD)是皮肤损伤如创伤、烧伤或手术后引发的以胶原过度沉积于真皮和皮下组织为特征的过度瘢痕化,其发病机制是异常表达的转化生长因子(TGF-β1)通过结缔组织生长因子(CTGF)促进病理性瘢痕的形成[1]。已有研究表明,TGF-β是一类具有多种生物学功能的蛋白多肽类物质,在创伤愈合的所有阶段均发挥了重要作用[2]。RNA干扰(RNA interference, RNAi)是由双链RNA(double-strands RNA,dsRNA)介导的基因沉默技术,通过长度21~23个核苷酸的双链小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)与细胞内相对应的mRNA结合,特异性降解mRNA,抑制蛋白表达,具有特异性、高效性和方便性等显著特点[2-3]。本研究旨在将体外构建的结缔组织生长因子siRNA表达载体转染导入人瘢痕疙瘩成纤维细胞(HKFs)后,观察TGF-β1刺激前后细胞外胶原蛋白分泌水平的变化,为瘢痕疙瘩的基因治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒pGenesil-1(武汉晶赛生物公司),Dosper脂质体(Roche,德国),DMEM高糖培养基(Gibco,美国),液体闪烁仪(SN-6930,上海)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 选用瘢痕疙瘩患者(诊断标准参见文献[4])术中切除的组织,用组织法分离HKFs,加入10%小牛血清的DMEM培养基,培养条件为37 ℃、5% CO_2,胰酶消化传代,取体外培养第5代细胞。

1.2.2 siRNA表达载体的构建、鉴定和转染 方法详见文献[5],本实验采用抑制效率最高的靶序列进行转染。转染细胞分为重组质粒组和空质粒组,每组各5份细胞样本。

1.2.3 ^{3}H-脯氨酸(^{3}H-pro)渗入法检测胶原蛋白 将^{3}H-pro原液配成20×稀释的使用液,在每组细胞中加入20 μL,37 ℃、5% CO_2 培养6 h。弃去培养液,每孔加入0.5 mL冰预冷的10% TCA,4 ℃固定30 min后弃去TCA。用冰预冷的PBS洗细胞2次后,换加0.5 mL 1% SDS、0.1 mmol/L NaOH裂解液,37 ℃过夜裂解细胞。每组取细胞裂解液0.3 mL加入装有8 mL闪烁液的瓶中,剧烈振荡,室温静置暗处,待其完全溶解后用闪烁仪计数。

[作者简介] 赵 平(1971-),男,江西省德安县人,讲师,博士,主要从事瘢痕基因治疗方面的研究。电话:(023)68752087,E-mail:zhaoping0401@yahoo.com.cn

[通迅作者] 李世荣,电话:(023)68754192,E-mail:zhengxing@163.vip.com

[收稿日期] 2009-02-18 [修回日期] 2009-03-01

1.3 统计学方法

采用SPSS10.0统计软件包进行统计学分析，实验计量结果采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

重组质粒组胶原蛋白的分泌水平与空质粒组相比，转染导入重组的小干扰RNA质粒表达载体后细胞外胶原蛋白分泌水平下降至51.6%，抑制率达48.4%[胶原蛋白抑制率%=(1-各组蛋白含量÷空质粒组蛋白含量)×100%]，差异具有统计学意义($P<0.05$)，见表1。即使在TGF-β1刺激后，胶原蛋白分泌水平仅为正常的48.7%，抑制率达51.3%，差异仍具有统计学意义($P<0.05$)，见表2。

表1 转染后重组质粒组胶原蛋白的表达($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	胶原蛋白含量	抑制率(%)
空质粒组	510±32	0
重组质粒组	263±30	48.4*

*:与空质粒组比较，$P<0.05$

表2 TGF-β1刺激后重组质粒组胶原蛋白的表达($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	胶原蛋白含量	抑制率(%)
空质粒+TGF-β1组	837±52	0
重组质粒+TGF-β1组	407±27	51.3*

*:与空质粒+TGF-β1组比较，$P<0.05$

3 讨论

胶原蛋白是由动物细胞合成的一种生物性高分子，广泛存在于动物骨、软骨和皮肤及其它结缔组织中，约占哺乳动物总蛋白的1/3，是人体重要的细胞外基质成份，可作为组织的支持物，对细胞、组织乃至器官行使正常功能并对外伤修复有重大影响，胶原蛋白的异常积聚和降解是纤维化产生的病理学基础。人体胶原蛋白根据功能可分为纤维性胶原和非纤维性胶原两大类，多数是由3条肽组成，3链相互缠绕，形成胶原蛋白分子特有的杆状结构。胶原蛋白基因的表达是本身顺式作用元件、反式作用因子及诸多调控因子相互作用的结果，其中IL-1、TGF-β等属于正调节因子，γ-INF、PGE2、固醇类激素等属于负调节因子，而PDGF、EOF、TNF-α等因子则具有双向选择作用，对某些胶原类型具有正调节作用，而对另一些胶原类型则具有负调节作用[6]。

RNA干扰现象是Napoli等[7]在1990年发现的，其现象是当细胞内导入与内源性mRNA编码区同源的双链RNA时可高效、特异地阻断体内同源基因的表达，促使其mRNA降解，使细胞表现出特定基因表型缺失的过程，因发生在转录后水平，又称为转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)[8]。Elbashir等[2]发现运用长核苷酸序列的双链RNA(dsRNA>30 bp)转染哺乳动物细胞会引起整个细胞的蛋白质合成受阻、细胞内mRNA全面降解，导致非特异性的基因表达抑制和细胞调亡，而应用化学合成的21个核苷酸的siRNA成功抑制了哺乳动物细胞中含有同源序列的靶基因。RNA干扰发生于除原核生物以外的所有真核生物细胞内。现在的观点认为，RNA干扰是生物体防止外来病毒或其他外来核酸的入侵，保护基因组的重要手段，是生物普遍存在的RNA水平上调节基因表达的方式[9]。RNA干扰技术因其快速、高效、特异性抑制靶基因表达的特点，在某种程度上可以替代传统的反义核苷酸技术和复杂的基因敲除技术。

在以往的工作中，我们发现经转染导入体外合成的特异性结缔组织生长因子siRNA表达载体后，能显著抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞结缔组织生长因子mRNA和胶原蛋白的表达[5]，但在TGF-β1刺激的情况下胶原蛋白分泌水平是否仍会受到抑制还不清楚。在本研究中，我们在转染导入siRNA表达载体后，使用TGF-β1刺激，发现在TGF-β1刺激前和刺激后细胞外胶原蛋白分泌水平都明显受抑，说明即使在TGF-β1异常升高的情况下，RNA干扰仍能显著抑制细胞的分泌功能，为RNA干扰技术应用于临床瘢痕疙瘩治疗提供了理论依据。

[参考文献]

[1] Colwell AS, Phan TT, Kong W, et al. Hypertrophic scar fibroblasts have increased connective tissue growth factor expression after transforming growth factor-beta stimulation[J]. Plast Reconstr Surg, 2005, 116(5):1387-1390.

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

[3] Hannon GJ. RNA interference[J]. Nature, 2002, 418(6894):244-251.

[4] 鲍卫汉. 实用瘢痕学[M]. 北京:北京医科大学出版社, 2000.338-339.

[5] 张 玲，武继祥，李世荣. 肥厚性瘢痕和瘢痕瘤的病因病理学研究进展[J]. 局解手术学杂志, 2005, 14(2):127-128.

[6] 肖玉良，郑连英，韩俊芬，等. 胶原蛋白研究进展[J]. 泰山医学院学报, 2005, 26(5):493-496.

[7] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. . Introduction of a Chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans[J]. Plant Cell, 1990, 2(4):279-289.

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

[9] Mourrain P, Beclin C, Elmayan T, et al. Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance[J]. Cell, 2000, 101(5):533-542.

(编辑:余汇洋)