技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)08-1217-04

RNA 干扰联合 Cre-loxP 系统建立小鼠巨噬细胞 RAW264.7 GR 表达抑制模型

李晓清[1],杨国汉[1],李秀英[2],钟 瑜[1],陈 林[1],徐晓玉[2]

(1.第三军医大学附属大坪医院及野战外科研究所中医科 重庆 400042;2.重庆医科大学药学院药理教研室 重庆 400016)

【摘 要】目的:应用 RNA 干扰(RNA interference,RNAi)及 Cre-loxP 系统构建针对目的基因糖皮质激素受体(Glucocorticoid receptor,GR)表达抑制细胞模型。方法:设计并合成两对 RNAi 靶序列,连接至 pBS/U6-Neo 载体,联合应用 Cre-loxP 系统及 RNAi 构建针对目的基因 GR 的两对重组质粒,对构建的重组质粒采用聚合酶链反应(Polymerase chain reaction,PCR)及测序的方法进行鉴定,将构建成功的重组质粒及 Cre-ERT2 质粒稳定共转染小鼠巨噬细胞 RAW264.7,采用半定量逆转录聚合酶链反应(Reverse transcription polymerase chain reaction, RT- PCR)及 Western blot 的方法分别检测诱导 RNAi 表达后 GR 在 mRNA 及蛋白水平的表达情况。结果:构建的两个针对目的基因 GR 的重组质粒可显著降低 GR 在 mRNA 及蛋白水平的表达。结论:联合采用 RNAi 及 Cre-loxP 系统能可控的稳定降低小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中的 GR 表达。

【关键词】糖皮质激素受体(GR);RNA 干扰;Cre-loxP 系统

【中国图书分类法分类号】R363.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-01-08

RNAi and Cre-loxP system inhibits GR expression in macrophage RAW264.7 cells of mouse

LI Xiao-qing, et al

(*Department of Traditional Chinese Medicine, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To inhibit GR expression in macrophage RAW264.7 cells of mouse by RNAi and Cre-loxP system. *Methods*: Two pairs of RNAi target sequence against GR gene were designed and inserted into pBS/U6-Neo vehicle. Recombinant plasmid constructed by Cre-loxP system and RNAi was identified by PCR and sequencing.The recombinant plasmid and Cre-ERT2 plasmid was transfected into the mouse macrophage RAW264.7 cells, in which GR expression was measured on mRNA and protein level respectively by RT-PCR and Western blot. *Results*: GR expression on mRNA and protein level was significantly inhibited by the two recombinant plasmid against GR gene. *Conclusion*: Combination using of RNAi and Cre-loxP system could inhabit GR expression in mouse macrophage RAW264.7 cells.

【Key words】GR; RNAi; Cre-loxP system

RNA 干扰(RNA interference,RNAi)是一种典型的转录后基因调控方法,又称转录后基因沉默。RNAi 现象广泛存在于生物界中,是一种简单有效研究基因功能的方法[1-3]。糖皮质激素作为重要的内分泌激素有着重要的生理与病理学作用,建立其受体表达水平抑制模型对研制其生理、病理作用有重要意义。由于 GR 在生物发育中的重要性,采用敲除 GR 基因的方法建立细胞及动物模型常常失败,RNAi 技术能使特定基因表达被部分抑制,从而使建立 GR 表达抑制细胞模型成为可能。本实验以 RNAi 表达载体和诱导载体Cre-ERT2 质粒共转染小鼠巨噬细胞 RAW264.7 构建 GR 表达抑制细胞模型,为探索 GR 表达抑制细胞生物学特性并了解 GR 生理病理机制提供条件,为进一步利用该技术建立 GR 基因表达抑制动物模型奠定基础。

作者介绍:李晓清(1981-),女,硕士,研究方向:中西医结合临床。

通讯作者:杨国汉,男,主任医师,E-mail:ygh81@sina.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30472119)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与质粒 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 由重庆工商大学陈刚老师惠赠。pBS/U6-Neo 质粒、Cre-ERT2 质粒由第三军医大学大坪医院创伤中心实验室提供。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶 *Apa* Ⅰ、限制性内切酶*Hind* Ⅲ、限制性内切酶 *EcoR* Ⅰ、RT-PCR 试剂盒等购自 TAKARA

公司(大连),PCR 引物、测序引物等由上海生工公司合成。转染试剂 Lipofectamine 2000、TRIZOL 抽提试剂购自美国 Invitrogen 公司。蛋白分子量标准购自美国 cell signaling 公司。

1.2 方法

1.2.1 RNAi 寡核苷酸的筛选、设计与合成 根据 NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html) 及参考文献对 RNAi 靶序列的要求[4-6],分别设计 2 对寡核苷酸(见表 1)并由北京赛百盛公司合成。

表 1 RNAi 所用寡核苷酸序列

编号	序列
干扰序 1	
E1	5'-GGTCAGACCTGTTGATAGATA-3'
E2	5'-AGCTTATCTATCAACAGGTCTGACCCTTTTTG-3'
E3	5'-AGCTTATCTATCAACAGTCTGACC-3'
E4	5'-AATTCAAAAAGGGTCAGACCTGTTGATAGATA-3'
干扰序 2	
F1	5'-GGACAGCACAATTACCTTTGA-3'
F2	5'-GGACAGCACAATTACCTTTGA-3'
F3	5'-AGCTTCAAAGGTAATTGTGCTGTCC-3'
F4	5'-AATTCAAAAAGGGACAGCACAATTACCTTTG-3'

1.2.2 细胞培养 细胞株接种于含 10%小牛血清的 DMEM 液,置于 37℃,5% CO_2 常规培养,将细胞按 5×10^5 个接种于 6 孔板内,生长汇合率达 75%的细胞进行转染。采用 Invitrogen 公司推荐的 Lipofectamine 2000 转染方法进行转染。转染共 3 组:对照组(转染空质粒)、E 组(转染重组质粒 pBS/U6-Neo-E)及 F 组(转染重组质粒 pBS/U6-Neo-F),每组分别转染 3 份。

1.2.3 构建重组质粒 pBS/U6-Neo-GR

1.2.3.1 酶切 将 pBS/U6-Neo 质粒转染感受态细菌 *E.coli* DH5a 扩增,对其进行提取后分别用限制性内切酶 *Apa* Ⅰ、限制性内切酶 *Hind* Ⅲ对其酶切,并纯化酶切产物,所得产物保存备用。

1.2.3.2 连接第一条链 将磷酸化的第一条寡核苷酸(分别为 E1+E3 和 F1+F3)连接至双酶切的 pBS/U6-Neo 载体,并用 *Apa* Ⅰ酶切,加入至 100 μl *E.coli* DH5a 感受态细菌中进行转化,筛选阳性克隆产物并采用 PCR 鉴定。PCR 反应参数:94℃预变性 2 min;94℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,循环 30 次,末次循环后 72℃再延伸 10 min。扩增、提取第一链连接成功的质粒,分别称为 pBS/U6-Neo-E1 和 pBS/U6-Neo-F1 质粒。

1.2.3.3 连接第二条链 先后用 *Hind* Ⅲ、*EcoR* Ⅰ酶切 pBS/U6-Neo-E1 和 pBS/U6-Neo-F1 质粒,胶回收后用于连接第二条链(已退火、磷酸化的 E2+E4 和 F2+F4)。筛选阳性克隆产物、转化、扩增、PCR 鉴定均同第一条链。纯化扩增质粒,*Hind* Ⅲ酶切后产物送大连宝生物公司测序验证。将成功连接了干扰序列第一、二条链的质粒称为重组质粒 pBS/U6-Neo-E 与 pBS/U6-Neo-F。

1.2.4 联合应用 RNAi 和 Cre-loxP 系统诱导抑制 GR 在小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中的表达

1.2.4.1 Cre-ERT2 质粒转染生长状态良好的小鼠巨噬细胞 RAW264.7。加培养液(含潮霉素 B 650 μg/ml)进行筛选培养,必要时换液,使其形成单克隆。

1.2.4.2 PCR 鉴定 收集上述细胞,提取 DNA 进行 PCR 分析,所用引物为 C1:5'-GCCTGCATTACCGGTCGATGC-3';C2:5'-CAGGGTGTTATAAGCAATCCC-3'(481 bp),PCR 鉴定为阳性的细胞用于第二次转染,并将所得细胞命名为:RAW264.7-Cre。PCR 反应参数:94℃预变性 2 min;94℃变性 30 s,59℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,循环 30 次,末次循环后 72℃再延伸 10 min。

1.2.4.3 重组质粒 pBS/U6-Neo-E 与 pBS/U6-Neo-F 分别转染小鼠巨噬细胞 RAW264.7-Cre。转染方法同前。转染后加浓度为 650 μg/ml 的 G418 进行筛选培养 2 个星期,取一 6 孔板的细胞用于提取重组质粒 DNA,对提取的质粒 DNA 插入序列 E 和 F 进行 PCR 鉴定,

所用引物为:E3:5'-AGCTTATCTATCAACAGGTCTGACC-3';F3:5'-AGCTTCAAAGGTAATTGTGCTGTCC-3' 和公用引物 TW12(561 bp),PCR 反应条件同 1.2.4.4 将所得到的细胞系分别命名为小鼠巨噬细胞 RAW264.7-Cre-GR(E)与小鼠巨噬细胞 RAW264.7-Cre-GR(F)。

1.2.5 转染后 GR mRNA 表达水平检测。用 1 μmol/L 4-HT (4-羟泰米芬)诱导 RAW264.7-Cre-GR 细胞 6 d 后提取细胞总 RNA,RT-PCR 扩增(GR 引物为:5'-GAGCAGTGGAAGGACAGCA-3';5'-GCCAAGTCTTGGCCCTCTAG-3',产物 1 164 bp;内参为 β-actin,产物为 510 bp,凝胶电泳后,凝胶成像扫描仪分析,记录积分光密度(IOD)。

1.2.6 转染后 GR 蛋白表达水平检测。提取细胞总蛋白,采用 Western blot 检测 GR 蛋白表达,DAB 法显色观察。

1.2.7 统计学处理 以 SPSS13.0 统计分析软件进行统计处理,统计方法采用单因素方差分析,所有数据用均数 ± 标准($\bar{x}\pm s$)表示,以 $P<0.05$ 为差异显著,$P<0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 通过对阳性克隆扩增后进行 PCR 鉴定,显示两种重组质粒 pBS/U6-Neo-E1 与 pBS/U6-Neo-F1 均有 561 bp 的目的条带产生,而未插入外源片段的质粒的双酶切片段的长度为 24 bp,表明第一条链已被连接上,结果见图 1。

2.2 对第二次连接产物进行测序分析,结果表明序列与设计的一致,说明两个重组质粒均构建成功。

2.3 用 Cre-ERT2 质粒转染小鼠巨噬细胞 RAW264.7 后,用潮霉素 B 进行稳定筛选获得了稳定生长的克隆,见图 2。对所形成的细胞系 DNA 进行 PCR 分析,显示 Cre—ERT2 质粒已转染进小鼠巨噬细胞 RAW264.7,结果见图 3。

2.4 用 G418 筛选分别转染了粒质 E 与粒质 F 的小鼠巨噬细胞 RAW264.7-Cre，可形成稳定的细胞系。从其提取的 DNA 中可以用 PCR 扩增出质粒 DNA E 与 F，说明重组质粒 E 与F 已被有效地转染进小鼠巨噬细胞 RAW264.7-Cre，结果见图 4。

2.5 RT-PCR 分析显示重组质粒 pBS/U6-Neo-E、重组质粒 pBS/U6-Neo-F 转染后对细胞 GR mRNA 的表达均有沉默作用，见图 5。各组相对光密度值统计学分析后发现：和对照组相比，质粒 E 和 F 对 GR 表达的抑制作用具有统计学意义，$P<0.05$，见表 2。质粒 E 和 F 对 GR 表达抑制率分别为 63.5% 和 71%。

2.6 Western blot 分析显示重组质粒 E、重组质粒 F 均显著降低了 GR 的蛋白表达，结果见图 6。重组质粒 E 与重组质粒 F 降低 GR 蛋白表达与降低 GRmRNA 表达趋势一致，见表 3。

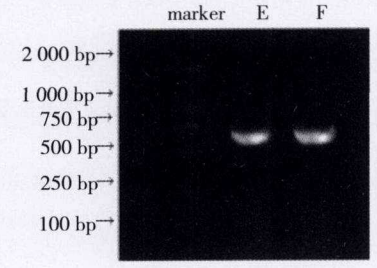


图 1 重组质粒 E 和 F 第一次连接后 PCR 分析

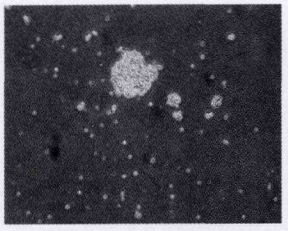


图 2 重组质粒 Lipofectamine 2000 转染后形成的克隆

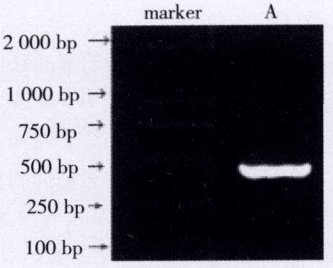


图 3 质粒 Cre-ERT2 稳定转染 RAW264.7 细胞后的 PCR 分析

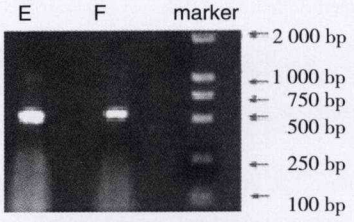


图 4 重组质粒 E 与 F 稳定转染 RAW264.7-Cre 细胞后的重组子的 PCR 分析

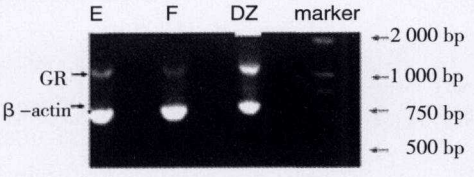


图 5 4-HT 诱导稳定转染重组质粒 E 与 F RAW264.7-Cre 后 RT-PCR 检测 GR mRNA 表达

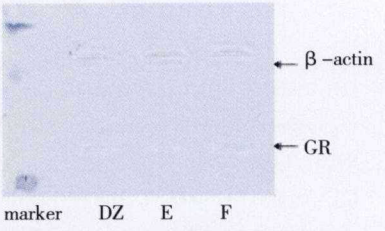


图 6 Western blot 检测重组质粒 E 与 F RAW264.7-Cre 后 GR 蛋白表达的变化

表 2 RT-PCR 法检测 GR mRNA 的表达（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	GR/β-actin
对照组	3	0.63 ± 0.05
样品 E 组	3	0.23 ± 0.04*
样品 F 组	3	0.18 ± 0.04*

* 为样品组与对照组相比 $P<0.05$

表 3 Western blot 法检测 GR 蛋白的表达（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	GR/β-actin
对照组	3	0.71 ± 0.03
样品 E 组	3	0.29 ± 0.03*
样品 F 组	3	0.21 ± 0.03*

* 为模型组与对照组模型组相比 $P<0.05$

3 讨 论

GR 通过介导糖皮质激素调节多种生理功能如：抗炎、代谢、分化、生长发育、免疫等。多种疾病如慢性阻塞性肺疾病、应激性溃疡、难治性内风湿等的发生、发展以过程中伴随着 GR 表达下调。GR 表达下调模型对于研究 GR 在多种疾病中生理、病理功能研究十分必要，因此复制 GR 表达下调模型对于 GR 在多种疾病中生理、病理功能研究中十分必要[7~10]。RNAi 技术的出现为该模型的建立提供了技术支持。RNAi 是 1 种双链 RNA（Double-standed RNA，dsRNA）分子在 mRNA 水平上关闭相应序列的基因表达过程。小的双链 RNA 可高效、特异地阻断体内特定基因表达，促使 mRNA 降解，诱使细胞表现出特定基因缺失的表型[11~13]。RNAi 与 Cre-loxP 系统联合应用可以实现对基因的不同发育阶段、不同组织类型中特异性的删除，可以消除由于基因位置改变造成的影响，加强了对基因的控制能力，使研究者可以更方便地有针对性地进行目标阶段的研究工作[13~15]。Cre 蛋白为来源于噬菌体 P1 的一种重组酶，loxP 为一段 34 bp 的回文 DNA 序列。Cre 蛋白可特异地识别 loxP 序列，可介导两个方向相同的 loxP 之间的重组，从而把位于两个 loxP 间的 DNA 序列切除。Cre-loxP 系统既可以在细胞水平上用 Cre 重组酶表达质粒转染靶细胞，通过识别 loxP 位点将抗性标记基因切除，又可以在个体水平上将重组杂合子小鼠与 Cre 转基因小鼠杂交，筛选子代小鼠就可得到删除外源标记基因的条件性敲除小鼠。因此本研究采用 RNAi 联合 Cre-loxP 系统作为抑制小鼠巨噬细胞 RAW264.7GR 基因表达的方法不仅可以在细胞水平观察 GR 基因表达抑制对细胞的影响，也为在个体水平建立 GR 表达抑制小鼠提供基础。

将体外合成的 siRNA 直接导入哺乳动物细胞的方法，存在沉默维持时间短、转染效果不稳定以及在后续在体实验中操作较为困难的特点。而利用载体介导的 RNAi 技术能克服

以上问题[14]。pBS/U6-Neo 质粒载体介导的 RNAi 能够在哺乳动物细胞内产生有效的目的基因沉默效应。如何有效地将携带目的序列的质粒转入细胞内是 RNAi 实验的关键。实验中发现，良好的细胞活力、活性以及较低的细胞传代数对于提高转染效率十分关键，因此在转染时，小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 须具有高活力，因小鼠巨噬细胞 RAW264.7 生长较快，所以采用生长汇合率达 75%的细胞进行转染，且传代次数低于 20 代。

本课题将针对靶序列的寡核苷酸序列设计成具有回文结构的模板链，运用 pBS/U6-Neo 载体质粒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，达到抑制目的基因表达的目的[16]。GR 表达抑制细胞模型的建立为细胞水平研究 GR 生理、病理功能研究提供了条件，也为建立 GR 表达抑制动物模型奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Paddison P J, Caudy A A, Hannon G J. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(3): 1443-1448.

[2] Yu J Y, DeRuiter S L, Turner D L. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells [J]. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2002, 99(9): 6047 - 6052.

[3] Elbashir S M, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs[J]. Genes Dev, 2001, 15: 188-200.

[4] Novina C D, Sharp P A. The RNAi revolution [J]. Nature, 2004, 430 (8): 161-164.

[5] Hough S R, Wiederholt K A, Burrier A C, et al. Why RNAi makes sense [J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(7): 731-732.

[6] Zhu X Y, Liu Y J, Lu J, et al. Knockdown of glucocorticoid receptor expression by RNA interference promotes cell proliferation in murine macrophage RAW264.7 cells [J]. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 2004, 92(5): 375-382.

[7] 刘凌云，曾 勉，左万里，等. COPD 患者氧化应激与糖皮质激素受体水平的相关性中国[J]. 实用医药，2008，3(22)：56-57.

[8] 刘宁宇，韩 芳，杜 喆，等. PTSD 样大鼠杏仁中央核糖皮质激素受体表达的变化[J]. 中国医科大学学报，2008，37(2)：148-151.

[9] 李 薇，于孟学，王国锋，等. 糖皮质激素受体在类风湿关节炎外周血单个核细胞中表达水平的研究[J]. 北京医学，2008，30(4)：208-211.

[10] 陈雪萍，陈向芳，邹俊杰，等. 溃疡性结肠炎鼠糖皮质激素受体改变的意义[J]. 第二军医大学学报，2007，28(7)：796-797.

[11] Vivi Kasim L, Makoto Miyagishi, Kazunari Taira. Control of siRNA expression using the Cre-loxprecombination system [J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(7): 66-73.

[12] Hung-Shu Chang, Ching-Hui Lin, Yu-Chi Chen, et al. Using siRNA technique to generate transgenic animals with spatiotemporal and conditional gene knockdown[J]. American Journal of Pathology, 2004, 165(5): 1535-1541.

[13] Ventura A, Meissner A, Dillon C P, et al. Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(28): 10380-10385.

[14] Chang H S, Lin C H, Chen Y C, et al. Using siRNA technique to generate transgenic animals with spatiotemporal and conditional gene knockdown [J]. Am J Pathol, 2004, 165(5): 1535-1541.

[15] Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable express of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. Science, 2002, 296 (5567): 550-553.

[16] Miao G Y. Downregulation of survivin by RNAi inhibits growth of human gastric carcinoma cells[J]. World Journal of Gastroenterology, 2007, 13(8): 1170-1174.

（责任编辑：关蕴良）

欢迎投稿，欢迎订阅

《医学教育探索》

邮发代号 78-127