基础研究 文章编号:0253-3626(2009)01-0001-05

TGFβ1 基因 RNAi 慢病毒载体的构建与鉴定

王 翔,胡治平,卢 伟,唐湘祁,张 洁,李 婷,曾六旺
(湖南省长沙市中南大学湘雅二医院神经内科,长沙 410011)

【摘 要】目的:构建 TGFβ1 基因 RNAi 慢病毒载体。方法:根据人 TGFβ1 的 mRNA 序列选择 3 个靶序列并根据它们设计合成 3 对寡核苷酸序列,同时合成 1 对阴性对照寡核苷酸序列;将以上 4 对寡核苷酸序列退火后连入 pRNA-U6/Lenti 质粒,酶切和测序鉴定后,将以上质粒分别和包装质粒混合物共转染 293FT细胞,包装产生病毒颗粒。各组病毒载体转染 Hela 细胞后,运用 Real-Time PCR 和 ELISA 检测 TGFβ1mRNA 和蛋白的表达水平。结果:酶切和测序证实目的寡核苷酸片段已被准确克隆到 pRNA-U6/Lenti 质粒;各质粒与包装质粒共转染 293FT 细胞后能产生高滴度的慢病毒载体颗粒;各组慢病毒载体感染 Hela 细胞后,有两组可以显著抑制 TGFβ1 mRNA 水平及蛋白水平的表达,其中以第一组效果最佳。结论:成功构建了人 TGFβ1 基因 RNAi 慢病毒载体。

【关键词】RNAi;TGFβ1;慢病毒载体
【中国图书分类法分类号】R246.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-05-20

Construction and identification of lentiviral vector of RNA interference of GFβ1 gene

WANG Xiang, et al
(*Department of Neurology, the Second Xiangya Hospital, Central South University*)

【Abstract】*Objective*: To construct a lentiviral vector of RNA interference(RNAi) of TGF-β1 gene. *Methods*: Three target sequences were selected according to TGFβ1 mRNA sequence firstly, then three pairs of oligonucleotide sequences according to these target sequences and one pair of negative control oligonucleotide sequence were designed and synthesized. The annealed oligonucleotide fragments were subcloned into pRNA-U6/Lenti plasmid. After identified by restriction enzyme digestion and sequencing, these plasmids were co-transfected along with ViraPowerTM Lentiviral Packaging Mix into 293FT cells for the package of lentiviral particles. Then the lentiviral vector particles were transfected into Hela cells and TGF-β1 expression in the transfected cells was assayed by Real-Time PCR and ELISA. *Results*: It was confirmed by digestion and sequencing that lentiviral vectors had the correct structure and could express high titer of virus. After transfected into Hela cells, TGF-β1 expression was decreased significantly by two of these lentiviral vectors at both the protein and mRNA level and the first vector had the best interefence efficiency. *Conclusion*: The lentivirus RNAi vector of TGF-β1 was constructed successfully.

【Key words】RNA interference; Transforming growth factor-β1; Lentiviral Vector

TGFβ1 是 TGFβ 家族里最主要的亚型,众多研究表明其在细胞外基质形成、器官纤维化、局部炎症形成及肿瘤的发生发展中起非常重要的作用。抑制 TGFβ1 的表达可以在一定程度上对以上疾病加以控制,因此 TGFβ1 已经成为以上疾病治疗研究的重要靶点。RNA 干扰现象是由 Fire 等[1]在 1998 年首先发现的,具体是指通过正、反义 RNA 片段形成双链 RNA,从而特异性地抑制靶基因转录后表达的现象。作为高效、特异的调节基因表达的技术,RNA 干扰已成为基因功能和信号传递系统上下游分子相互关系研究的有力工具。但是应用这项技术主要限制是在哺乳动物细胞内转染的短链 RNA 仅能持续几天。而慢病毒载体技术则可以提供长期的基因表达抑制,因此更适合于体内实验及临床研究的需要[2]。为此,我们构建了针对 TGFβ1mRNA 的慢病毒干扰载体,并在 Hela 细胞内验证了其对 TGFβ1 的抑制效率,以期为 TGFβ1 后续的基因治疗研究奠定基础,现报导如下。

作者介绍:王 翔(1978-),男,医师,博士,研究方向:脑血管病的防治。
通信作者:胡治平,男,教授,E-mail:huzhiping2007@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金(No.30470602)。

1　材料与方法

1.1　实验材料

293FT 细胞、病毒包装系统（ViraPower™ Lentiviral Packaging Mix）、Lipofectamine2000 以及 Trizol（Invitrogen）；Hela 细胞、JM109 细菌（医学遗传学国家重点实验室惠赠）；pRNAT-U6.2/Lenti 病毒骨架质粒（GenScript）；限制性内切酶 *BamH* Ⅰ、*Xho* Ⅰ、T4 DNA 连接酶、Real-Time PCR 试剂盒（TAKARA）；Tip100 质粒抽提柱（QIAGEN）；逆转录试剂盒（Promega）；TGFβ1 ELISA 试剂盒（晶美生物工程有限公司）；寡核苷酸及引物（上海生物工程有限公司）；DMEM，胎牛血清（GIBCO）；7900HT 型 Real-Time PCR System（ABI）。

1.2　方法

1.2.1　靶向 TGFβ1 基因的寡核苷酸设计　根据 Reynolds 等[8]的经验，以人 TGFβ1 的 mRNA 序列（GenBank:NM_000660）为模板选择三段靶序列，同时设计一段阴性对照序列，经 BLAST 表明它们均不与人任何其它 cDNA 序列同源。再根据以上四段序列分别设计合成四对寡核苷酸序列，每对包含一条正义链（sense）和一条反义链（antisense）（表 1）；四对寡核苷酸序列退火后均可形成在 5'端含 *BamH* Ⅰ酶切位点，3'端含 *Xho* Ⅰ酶切位点，中间含 10 个碱基发夹环的小片段 DNA 双链。

1.2.2　TGFβ1-SiRNA 重组质粒构建、扩增、鉴定及再扩增　将 pRNAT-U6.2/Lenti 质粒用 *BamH* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ行双酶切，将酶切产物用低熔点琼脂糖胶回收并和上述寡核苷酸退火后的产物混合，然后经 T4DNA 连接酶连接过夜。连接后的重组质粒转化感受态 JM109 细菌，经含氨苄青霉素培养基筛选后，挑取单菌落扩大培养。按分子克隆实验指南用碱裂解法手工抽提质粒，由于重组质粒仍然含有 *BamH* Ⅰ及 *Xho* Ⅰ酶切位点，所以重组质粒可经 *BamH* Ⅰ及 *Xho* Ⅰ双酶切来初步鉴定，然后用 Spin 柱试剂盒抽提质粒并通过 DNA 测序进一步鉴定。

1.3　包装产生 siRNA 的病毒颗粒及滴度测定

常规方法培养 293FT 细胞于 10 cm 细胞培养皿，至细胞数量大约为 5×10^6 个进行转染，用 Lipofectamine2000 共转染 pRNAT-U6.2/lenti 质粒（分别用上步得到的 4 个阳性重组子）和包装质粒混合物（ViraPower™ Packaging Mix）；次日移去含 DNA-脂质体复合物的培养基，换为完全培养基培养，48～72 h 后大量病毒产生，收取含病毒的培养液，并通过 0.45 μm 滤器过滤，4℃，70 000 g×2 h 超速离心后弃上清，沉淀即为 TGFβ1 基因 RNAi 慢病毒载体，分装后冻存于 -80℃待用。4 组慢病毒载体分别命名为 pRNA-U6/Lenti-1，pRNA-U6/Lenti-2，pRNA-U6/Lenti-3和pRNA-U6/Lenti-4。上述 4 种纯化过的病毒倍比稀释后感染 293FT 细胞，48h 荧光显微镜观察荧光；以最大稀释度仍然有 GFP 荧光的病毒稀释度的倒数为病毒滴度，即每毫升病毒原液含有具有感染能力的病毒颗粒的个数。

1.4　细胞培养及 siRNA 病毒感染

Hela 细胞采用含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养液，置于 37℃的 CO_2 培养箱中培养。感染实验共分为以下 5 组：(1)空白对照组；(2)pRNA-U6/Lenti-1 组；(3)pRNA-U6/Lenti-2 组；(4)pRNA-U6/Lenti-3 组；(5)pRNA-U6/Lenti-4 组。感染在六孔板中细胞汇合度至 70%左右时进行，加入适量的病毒（MOL=15），重复 3 次。

1.5　Real-Time PCR 检测 TGFβ1 mRNA

病毒转染 48 h 后，从 6 孔板中每组各收集细胞 1×10^6 个，采用 Trizol 一步法抽提总 RNA，用逆转录试剂盒进行逆转录反应，然后用 7900 型荧光定量 PCR 仪进行 PCR 扩增，Real-Time PCR 引物：TGFβ1 正义链为 5'-GAGCCTGAGGCCGACTACTA-3'，反义链为 5'-CACGTGCTGCTCCACTTTTA-3'；β-actin 正义链为 5'-AATCTGGCACCACACCTTCT-3'，反义链为 5'-AGCACAGCCTGGATAGCAAC-3'。反应体系 10 μl，各管分别含 cDNA 1 μl，β-actin（或 TGFβ1）上游、下游引物各 0.2 μl，SYBR Premix Ex TaqTM（2×）5 μl，Rox Reference Dye（50×）0.2 μl，H_2O 3.4 μl；反应参数：95℃预变性 10 s，

表 1　针对靶序列和阴性对照序列分别设计的寡核苷酸对

序列名	碱基序列
1	正义链　5'-GGATCCCGTTGAACTTGTCATAGATTTCGTTGATATCCGCGAAATCTATGACAAGTTCAATTTTTTCCAA-3'
	反义链　5'-CTCGAGTTGGAAAAAATTGAACTTGTCATAGATTTCGCGGATATCAACGAAATCTATGACAAGTTCAACG-3'
2	正义链　5'-GGATCCCGTTTAACTTGAGCCTCAGCAGATTGATATCCGTCTGCTGAGGCTCAAGTTAAATTTTTTCCAA-3'
	反义链　5'-CTCGAGTTGGAAAAAATTTAACTTGAGCCTCAGCAGATTGATATCCGTCTGCTGAGGCTCAAGTTAAACG-3'
3	正义链　5'-GGATCCCGTATTTCTGGTACAGCTCCACGTTGATATCCGCGTGGAGCTGTACCAGAAATATTTTTTCCAA-3'
	反义链　5'-CTCGAGTTGGAAAAAATATTTCTGGTACAGCTCCACGTTGATATCCGCGTGGAGCTGTACCAGAAATACG-3'
4	正义链　5'-GGATCCCGTACTTAAGTATGTGATCTGTCTTGATATCCGGACAGATCACATACTTAAGTATTTTTTCCAA-3'
	反义链　5'-CTCGAGTTGGAAAAAATACTTAAGTATGTGATCTGTCTTGATATCCGGACAGATCACATACTTAAGTACG-3'

注：表 1 中第 1、2、3 组分别是 3 条靶序列的寡核苷酸序列的正反义链，下划直线标记的部分是靶序列及反义靶序列，第 4 组是阴性对照序列的寡核苷酸序列的正反义链，下划直线标记的部分是阴性对照序列及其反义序列；波浪线标记的是酶切位点，其中 GGATCC 为 *BamH* Ⅰ酶切位点，CTCGAG 为 *Xho* Ⅰ酶切位点。

95℃变性 5 s，60℃复性 30 s，40 个循环。扩增过程、荧光信号检查、数据储存和分析均由 7 900 型 PCR 仪及 SDS2.2.2 软件自动完成，所获数据导至 EXCEL 进行计算和分析。

1.6 细胞培养液中 TGFβ1 蛋白质含量测定（ELISA）

6 孔板细胞病毒转染 48 h 后，收集上清，离心后弃沉淀，采用 TGFβ1 ELISA 试剂盒根据其说明进行 TGFβ1 蛋白质含量测定，最后在酶标仪上 450 nm 处即刻测 OD 值。

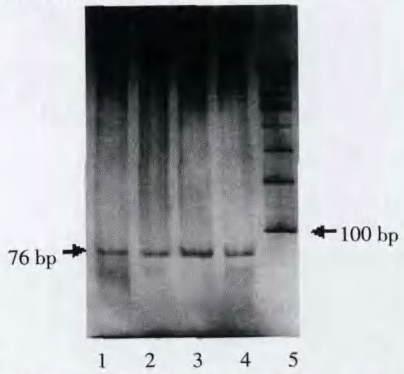
1.7 统计学处理

用 t 检验进行两组间差异比较，利用 SPSS11.5 软件进行统计分析，$P<0.05$ 被认为组间差异有显著性。

2 结 果

2.1 重组质粒的鉴定

重组质粒经 *BamH* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切后，用非变性丙烯酰胺凝胶电泳检测其结果（图 1）。由于重组质粒仍含有 *BamH* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 酶切位点，因此经 *BamH* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切后可以将插入的小片段 DNA 切出来，大小为 76 bp，在胶上清晰可见；而 pRNAT-U6.2/Lenti 质粒骨架大小为 8 385 bp，已超出非变性丙烯酰胺凝胶的检测大小，故表现为模糊的阴影。以上结果说明目标片段已正确插入 pRNAT-U6.2/Lenti 质粒载体。DNA 测序进一步证实目的片段已正确插入 pRNAT-U6.2/Lenti（图 2~5）。



第 1,2,3,4 泳道为分别为 pRNA-U6/Lenti-1，pRNA-U6/Lenti-2，pRNA-U6/Lenti-3，pRNA-U6/Lenti-4 经 *BamH* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切后的产物；第 5 泳道为 DL2000 Marker

图 1 重组质粒酶切鉴定图

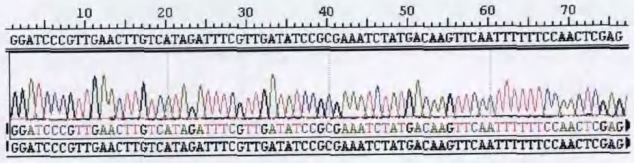


图 2 重组质粒 pRNA-U6/Lenti-1 测序报告

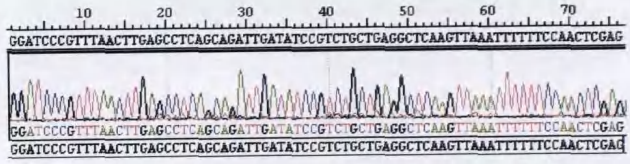


图 3 重组质粒 pRNA-U6/Lenti-2 测序报告

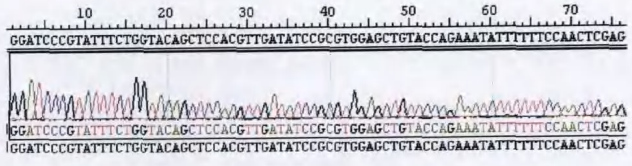


图 4 重组质粒 pRNA-U6/Lenti-3 测序报告

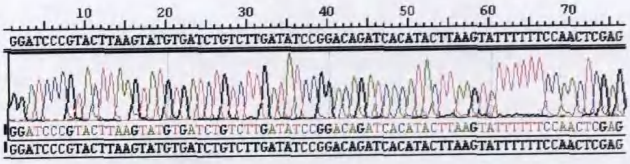


图 5 重组质粒 pRNA-U6/Lenti-4 测序报告

2.2 转染后 293FT 的细胞效应

各重组质粒与 ViraPowerTM Lentiviral Packaging Mix 共转染 293FT 细胞后，293FT 细胞部分融合，出现多核复合体；随着病毒增殖，细胞内可见多量病毒颗粒，并逐渐从壁上脱落，出现细胞病变效应（图 6）。

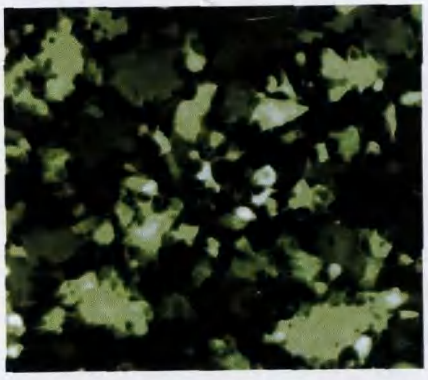


图 6 转染后 293FT 细胞出现细胞病变效应荧光照片（×100）

2.3 病毒滴度测定结果

测定得重组慢病毒载体的滴度分别是：pRNA-U6/Lenti -1:3.1 ×10^7TU/ml；pRNA -U6/Lenti -2:2.7 ×10^7TU/ml；pRNA -U6/Lenti -3:2.4×10^7TU/ml；pRNA -U6/Lenti-4:2.9×10^7TU/ml。

2.4 Hela 细胞感染病毒后荧光观察

感染后 48 h 观察荧光，理论上病毒感染细胞效率高，甚至可以达到 90%以上，但实际操作过程中可能有稍许差别，一般感染效率达到 70%左右即可以进入后续检测。观察发现各组病毒感染效率都在

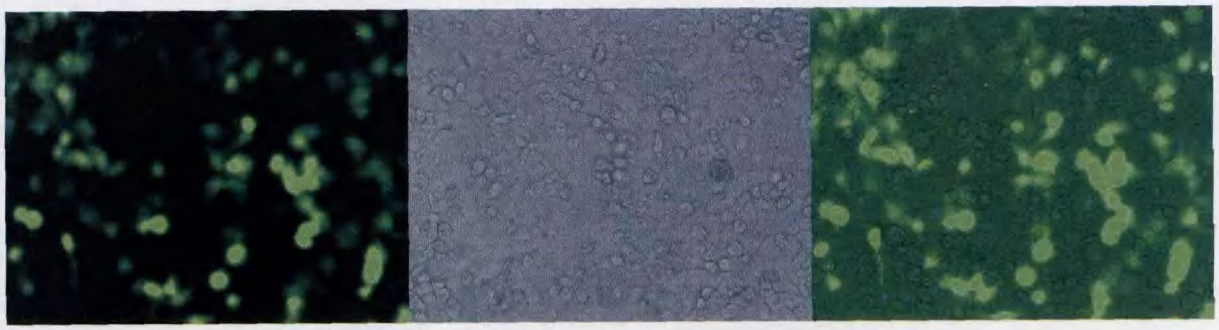
70%左右，符合下一步检测条件（图 7）。

2.5　Real-Time PCR 检测 TGFβ1mRNA 表达结果

选择管家基因 β-actin 作为校准基因，空白组做为对照，该组 Hela 细胞 TGFβ1 mRNA 的相对含量值定为 1；所有样本重复 3 次，计算-△△ct，以平均相对含量=$2^{-\triangle\triangle ct}$ 计算其他各病毒转染组 Hela 细胞 TGFβ1mRNA 的相对含量并作图（见图 8）。经统计分析显示，pRNA-U6/Lenti-4 组、pRNA-U6/Lenti-3 组 TGFβ1mRNA 相对含量与空白组无明显区别；与空白组比较，pRNA-U6/Lenti-2 组、pRNA-U6/Lenti-1 组 TGFβ1mRNA 相对含量分别降低 72.0% 和 91.7%，差异有统计学意义。

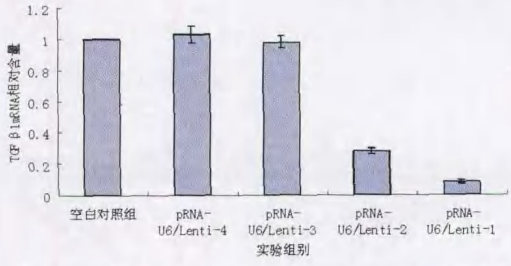
2.6　ELISA 检测 Hela 细胞上清中 TGFβ1 蛋白的表达水平

各组 Hela 细胞培养液中 TGFβ1 蛋白质浓度见表 2。与空白对照组比较，pRNA-U6/Lenti-4 和 pRNA-U6/Lenti-3 组蛋白质水平无明显变化；而在 pRNA-U6/Lenti-1 和 pRNA-U6/Lenti-2 两组中，TGFβ1 蛋白质浓度较空白组明显下调，其中 pRNA-U6/Lenti-1 组 TGFβ1 蛋白下调 90.7%，pRNA-U6/Lenti-2 组 TGFβ1 蛋白浓度下调 73.3%，差异有统计学意义。



A 为绿色荧光视野 × 100　　B 为可见光视野 × 100　　C 为 A 与 B 重合

图 7　Hela 细胞感染病毒后照片



$2^{-\triangle\triangle ct}$ 相对定量法检测各组 TGFβ1mRNA 的相对含量；与空白组比较 *P<0.01

图 8　实验各组 TGFβ1mRNA 的相对定量（$\bar{x}\pm s$）

表 2　ELISA 检测 Hela 细胞上清中 TGFβ1 蛋白浓度（$\bar{x}\pm s$）

组别	TGFβ1 浓度（pg/ml）
空白对照组	193.553 7 ± 9.290 5
pRNA-U6/Lenti-4 组	187.215 4 ± 7.695 4
pRNA-U6/Lenti-3 组	179.025 0 ± 10.442 1
pRNA-U6/Lenti-2 组	53.369 9 ± 5.461 0*
pRNA-U6/Lenti-1 组	19.708 8 ± 4.808 9*

注：pRNA-U6/Lenti-1，2 两组分别与空白对照组比较 * P<0.01

3　讨　论

大量研究已经表明 TGFβ1 能刺激未成熟纤维细胞生长、刺激基质合成、增加细胞外基质的聚集并抑制其降解，与器官纤维化的发生、发展密切相关[4,5]。而 TGFβ1 在大多数肿瘤患者尤其是中晚期肿瘤患者体内可以通过抑制机体的免疫功能、增加肿瘤内血管生成、加强肿瘤细胞与胞外基质的相互作用等机制促进肿瘤细胞异常增殖、侵袭、转移并逃避宿主的免疫监视[6-8]。除此之外，TGFβ1 还与一些较少见的疾病密切相关。譬如，Alexander 等发现 TGFβ1 在人巨细胞动脉炎（颞动脉炎）中高度表达，并且对激素耐受，正是因为 TGFβ1 存在和对激素的耐受使得巨细胞动脉炎患者在接受治疗数年后仍然存在血管的慢性炎症和内膜增生[9]。由此可见，抑制 TGFβ1 蛋白的生物学功能将成为治疗以上疾病的重要措施之一。

通过采用药物、反义寡核苷酸等方法抑制 TGFβ1 的表达或生物学功能可以改善细胞外基质的增殖和纤维蛋白的沉积，可以抑制肿瘤细胞的增殖和转移[10,11]，但效果往往不尽人意。而近年来进展迅速的 RNAi 技术的应用为这条治疗途径提供了新的方法。

RNAi 的本质是由发夹样结构的小干扰 RNA (Small interference RNA,siRNA)介导的与之同源的 mRNA 特异性降解，进而抑制相应基因表达的过程。因此,通过适当的技术生产特异性的 siRNA 并使其能有效地作用于靶基因的 mRNA,就能达到使该基因"沉默"的目的。生成 siRNA 的方法有化学合成法、体外转录合成法、质粒载体介导的细胞内表达法和病毒载体介导的细胞内表达法等。其中,慢病毒载体由于具有可感染分裂细胞及非分裂细胞、转移基因片段容量较大、目的基因表达时间长、不易诱发宿主免疫反应等优点,已经成为多数研究者的首选。

目前,国内外还未见有采用慢病毒载体介导的 RNAi 来沉默 TGFβ1 基因的研究报道,鉴于此,本研究构建了针对 TGFβ1 基因的 siRNA 表达慢病毒载体。产毒系统我们选用了 pRNA-U6.2/Lenti 慢病毒骨架质粒和与其配套的病毒包装系统(ViraPowerTM Lentiviral Packaging Mix)。pRNA-U6.2/Lenti 骨架质粒具有细胞核内转录小核 RNA-U6.2 的作用元件,能准确地启动和终止转录信号,有效限制被转录 RNA 片断的大小,抵抗引起干扰素的非特异作用[12];载体上游序列内部包含 SV40 复制起点,可使所构建的载体在真核细胞内进行复制,增加细胞内 siRNA 转录的模板数,增强、加快和延长 RNAi 的效应;Amp 抗性基因和 GFP 元件则为该基因连入载体后能够在真核细胞中表达并在荧光显微镜下直接观查其在细胞或转染组织内的转染效率提供了保证。因此该质粒具有的各种元件为 TGFβ1 siRNA 的构建和沉默效应的实现提供了良好载体,而病毒包装更为将其高效转染动物活体提供了可靠保证。在设计SiRNA 时,本研究根据Reynolds 等[3]的经验,遵循了以下原则:(1)在起始密码子后的 50~100 个碱基后进行设计;(2)SiRNA 长度设计为 21 个碱基;(3)GC含量不超过 50%;(4)避免 4 个连续的 A 或者 T 碱基的序列;(5)避免与人任何其他 cDNA 序列同源。酶切和测序鉴定后,包含由以上原则设计而来的小片段双链 DNA 的 pRNA-U6.2/Lenti 质粒载体和其包装系统共转入 293FT 细胞,293FT 细胞随之出现了明显的细胞病理效应,说明 293FT 细胞产毒成功,滴度测定进一步证实产毒成功。将各组慢病毒载体感染 Hela 细胞,结果显示pRNA-U6/Lenti-1 和 pRNA-U6/Lenti-2 慢病毒组在 Hela 细胞中对 TGFβ1 的表达在 mRNA 和蛋白质水平均有明显的抑制作用。尽管本实验只是在 Hela 细胞中证实了上述两病毒载体的有效性,但由于 TGFβ1 高度保守,其基因结构在人不同组织和细胞中高度一致,该病毒在人体其他不同组织细胞中理应也能发挥同样的作用,因此为器官纤维化、肿瘤、巨细胞动脉炎等疾病基因治疗进一步的体内实验提供了良好的实验工具。

(致谢:感谢中南大学医学遗传学国家重点实验室在实验技术上给予的支持！)

参 考 文 献

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

[2] Kong Q. RNAi: a novel strategy for the treatment of prion diseases[J]. J Clin Invest,2006,116(12):3101-3103.

[3] Reynolds A,Leake D,Boese Q,et al. Rational siRNA design for RNA interference[J]. Nat Biotechnol,2004,22(3):326-330.

[4] Prudhomme G J. Pathobiology of transforming growth factor beta in cancer,fibrosis and immunologic disease,and therapeutic considerations[J]. Lab Invest,2007,87(11):1077-1091.

[5] Scaffidi A K,Petrovic N,Moodley Y P,et al. Alpha(v) beta(3) integrin interacts with the transforming growth factor beta(TGF-beta) type Ⅱ receptor to potentiate the proliferative effects of TGF-beta1 *in living human lung fibroblasts*[J]. J Biol chem,2004,279(36):37726-37733.

[6] Li A G,Lu S L,Han G,et al. Role of TGFbeta in skin inflammation and carcinogenesis[J]. Mol Carcinog,2006,45(6):389-396.

[7] Leivonen S K,Kahari V M. Transforming growth factor-beta signaling in cancer invasion and metastasis[J]. Int J Cancer,2007,121(10):2119-2124.

[8] 唐 华，张才全.TGF-β1 蛋白在大肠癌组织的表达及意义[J].重庆医科大学学报,2004,29(1):71-73.

[9] Alexander B,Heike L,Rittner B R,et al. Glucocorticoid-mediated repression of cytokine gene transcription in human arteritis-SCID chimeras[J]. J Clin Invest,1997,99(12):2842-2850.

[10] Uchio K,Graham M,Dean N M,et al. Down-regulation of connective tissue growth factor and type I collagen mRNA expression by connective tissue growth factor antisense oligonucleotide during experimental liver fibrosis[J]. Wound Repair Regen,2004,12(1):60-66.

[11] Kawajiri H,Yashiro M,Shinto O,et al. A novel transforming growth factor {beta} receptor rinase inhibitor,A-77,prevents the peritoneal dissemination of scirrhous gastric carcinoma[J]. Clin Cancer Res,2008,14(9):2850-2860.

[12] Boden D,Pusch O,Lee F,et al. Promoter choice affects the potency of HIV-1 specific RNA interference[J]. Nucleic Acids Ras,2003,31(17):5033-5038.

(责任编辑:冉明会)