心、肺、泌尿疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001023

转化生长因子 β 型受体Ⅰ基因 RNA 干扰慢病毒载体的构建及其在人胚肺成纤维细胞中的表达

林时辉，付　娟，王川江，刘　琼

（重庆医科大学附属第一医院急诊医学科 & 重症医学科，重庆 400016）

[摘　要]目的：构建转化生长因子 β 型受体Ⅰ（transforming growth factor beta receptor Ⅰ，TGFβR Ⅰ）基因 RNA 干扰（RNA interference，RNAi）慢病毒载体并在人胚肺成纤维细胞株 MRC-5 上鉴定其沉默效应。方法：构建 4 种针对人 TGFβR Ⅰ基因不同干扰靶点的慢病毒干扰载体，PCR 筛选阳性克隆，测序鉴定，将筛选出的 4 种有效重组慢病毒干扰载体和其它辅助质粒一起共转染 293T 细胞并测定病毒滴度。最后将 4 种重组的慢病毒干扰载体分别感染 MRC-5 细胞，采用 Real-time PCR 和 Western blot 检测它们对靶基因的沉默效率。结果：经双酶切鉴定和 DNA 测序，证实短发夹 RNA 正确插入慢病毒载体且插入的序列正确。4 种重组慢病毒干扰载体经 293T 细胞成功包装后，其病毒滴度分别为：siRNA-1 6.37×10^{7} TU/ml、siRNA-2 1.65×10^{8} TU/ml、siRNA-3 4.50×10^{8} TU/ml、siRNA-4 2.31×10^{8} TU/ml，阴性对照组载体包装后的病毒滴度为：1.79×10^{9} TU/ml。4 种重组慢病毒干扰载体感染 MRC-5 细胞的效率均为 93%左右。与正常对照组和阴性对照组比较，在感染 4 种重组慢病毒干扰载体（siRNA-1~4）后，MRC-5 细胞内 TGFβR Ⅰ mRNA 表达水平均明显下降（$P=0.000$），其中 TGFβR Ⅰ-siRNA-2 下降最明显，沉默效率最好。Western blot 结果与 qRT-PCR 结果一致，4 种重组慢病毒干扰载体均能使 MRC-5 细胞内 TGFβR Ⅰ蛋白表达明显下降（$P=0.000$），且 TGFβR Ⅰ-siRNA-2 干扰效率最大。结论：筛选并构建了能有效沉默 TGFβR Ⅰ基因的最佳 RNAi 重组慢病毒载体——TGFβR-siRNA-2，从而为后续研究奠定基础。

[关键词]RNA 干扰；慢病毒载体；转化生长因子 β Ⅰ型受体；人胚肺成纤维细胞

[中图分类号]R563.1+3　　[文献标志码]A　　[收稿日期]2016-03-03

Construction of recombinant lentiviral vector of siRNA for transforming growth factor-beta type Ⅰ receptor gene and its expression in human embryonic lung fibroblasts

Lin Shihui, Fu Juan, Wang Chuanjiang, Liu Qiong

(Department of Emergency and Intensive Care Unit, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

[Abstract] ***Objective***: To construct lentiviral vector for RNA interference (RNAi) of the transforming growth factor beta receptor Ⅰ (TGFβR Ⅰ) gene and to detect its silencing efficiency in the human embryonic lung fibroblasts MRC-5. ***Methods***: Four kinds of siRNA lentiviral vectors targeting to TGFβR Ⅰ gene were constructed, and the vectors were identified by PCR and DNA sequencing. First the effective recombinant plasmids and the helper plasmids were mixed together, and then the mixture of plasmids was transfected into 293T cells. At last, the viral titers was measured. The human embryonic lung fibroblasts cell line MRC-5 infected by four recombinant lentivirus vectors, respectively. Then, qRT-PCR and Western blot were used to detect the expression of TGFβR Ⅰ mRNA and protein. ***Results***: Double restriction digestion analysis and DNA sequencing showed that the shRNA sequences was successfully inserted into the lentiviral vectors. The titer of RNAi virus group 1-4 was 6.37×10^{7} TU/ml, 1.65×10^{8} TU/ml, 4.50×10^{8} TU/ml and 2.31×10^{8} TU/ml, respectively. The titer of negative control group was 1.79×10^{9} TU/ml and the efficiency of infecting virus of MRC-5 was approximately 93%. The expression of TGFβR Ⅰ mRNA was significantly lower in siRNA-1-4 groups than in normal control group and negative control group ($P=0.000$). And, the siRNA-2 had the highest silencing efficiency. The result of

作者介绍：林时辉，Email：linshihui07@126.com，研究方向：ARDS 的发病机制。

通信作者：刘　琼，Email：liuqiong0219@163.com。

基金项目：重庆市科委自然科学基金一般资助项目 编号：cstcjjA10046）；重庆市科委基础科学与前沿技术研究资助项目 编号：cstc2016jcyja0005）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160928.1648.002.html（2016-09-28）

Western blot analysis showed that the expression of TGFβR Ⅰ protein was significantly decreased in the siRNA-1-4 groups compared with that of normal group（$P=0.000$）, and the siRNA-2 had the greatest reduction. ***Conclusion*** The optimal siRNA recombinant lentiviral vector targeting to TGFβR Ⅰ gene is successfully screened and constructed, which provides effective tool for further study.

[Key words] RNA interference; lentivirus; transforming growth factor beta receptor Ⅰ; human embryonic lung fibroblasts

肺纤维化是一种对损伤所产生的过度修复，同时也是多种弥漫性间质性肺疾病的一种共同病理学改变和最终结局[1]，它的主要病理特点是：弥漫性肺泡炎、大量成纤维细胞的病理性增生和基质胶原进行性积聚并取代了正常肺组织的结构[2]。肺纤维化的发病机制主要是因为机体内细胞因子网络调控失衡引起肺组织内胶原代谢失衡。近年来，肺纤维化患者越来越多，其病因除慢性阻塞性肺疾病（chronic obstructive pulmonary diseases，COPD）外，急性呼吸窘迫综合征（acute respiratory distress syndrome，ARDS）、中毒等导致的肺纤维化也在逐渐增多。在 ARDS 引起的肺纤维化中，肺部炎症反应导致肺泡持续性损伤，大量成纤维细胞被激活，损伤的肺组织被反复破坏、修复、重建，细胞外基质在肺组织内过度沉积，损伤的肺组织因过度修复而纤维化[3-4]。在肺损伤后纤维化的过程中，有许多细胞因子都发挥着重要的作用，其中转化生长因子 β1（transforming growth factor β1，TGF-β1）被认为是引起肺损伤后纤维化最为重要的一个细胞因子。TGF-β1 是迄今为止发现的最强的致纤维化因子[5]，在多种纤维化疾病中发挥着重要的作用[6-7]。在肺纤维化的发生发展过程中，肺组织内的巨噬细胞和成纤维细胞产生大量的 TGF-β1，产生的 TGF-β1 通过趋化巨噬细胞和成纤维细胞、促进成纤维细胞合成胶原与纤维结合蛋白、抑制细胞外基质降解和增加其沉积、调节下游致纤维化因子生成等发挥其促纤维化的作用[8-10]。同时，TGF-β1 还是一个促炎细胞因子，在 ARDS 的早期即被释放，加重肺部炎症反应和肺组织的损伤，从而加速肺组织纤维化。大量研究发现 TGF-β1 的致纤维化作用主要是通过与其特异性受体 TGF-β Ⅰ型受体（transforming growth factor beta receptor Ⅰ，TGFβR Ⅰ）和 TGF-β Ⅱ型受体（transforming growth factor beta receptor Ⅱ，TGFβR Ⅱ）结合实现的[11-12]。其中，TGFβR Ⅰ也叫作活化素受体样激酶（activin receptor-like kinase，ALK）。在组织纤维化时，TGF-β1 主要是通过激活 TGFβR Ⅰ/ALK-5，将信号传递给下游的 Smad2/Smad3 来发挥促纤维化作用的。可见 TGFβR Ⅰ是 TGF-β1 致纤维化过程中非常重要的一个受体。

近年来，本课题组对 TGF-β/Smad 信号通路在组织纤维化中的作用有了更深入的研究，通过采用 TGF-β1 的抗体、TGF-β1 受体抗体和可溶性受体等拮抗剂来阻断 TGF-β1 的信号通路对肺纤维化都有一定的治疗作用[13-15]，而肺纤维化的基因治疗更是成为了目前的一个研究热点。其中，RNAi 技术是一种发展迅速并且极富应用前景的基因调控技术，被广泛应用于基因功能的研究。它通过产生内源性特异性序列的小干扰 RNA（siRNA），诱导特异性靶基因 mRNA 降解，从而使该基因沉默，达到下调相应蛋白水平和功能的目的。有人通过构建特异性 TGF-β1 的短发夹 RNA（short-hairpin RNA，shRNA）真核表达质粒成功抑制人肺成纤维细胞内 TGF-β1 基因的表达，改善肺的纤维化，这使肺纤维化的基因治疗成为可能[16]。在 RNAi 技术中，shRNA 慢病毒载体具有免疫原性低和感染效率高等优点，能够直接感染各个细胞周期的细胞，从而使靶基因的沉默得以较长时间的维持，已成为目前实现 RNAi 最常用的一种方法。由于 TGF-β1 致肺纤维化主要是通过 TGF-β/Smad 信号通路发挥作用，所以，运用 RNAi 技术对致纤维化信号通路中的重要受体——TGFβR Ⅰ（ALK-5）基因表达进行特异性抑制，以阻断 TGF-β1 的信号通路，可能为肺纤维化的基因治疗带来新的希望。因此本研究的主要目的是采用 RNA 干扰技术构建 TGFβR Ⅰ基因的 shRNA 慢病毒载体，并筛选出最佳干扰靶点序列，在人胚肺成纤维细胞 MRC-5 中加以验证，为后续实验提供稳定而高效的慢病毒载体。

1 材料与方法

1.1 主要材料和设备

慢病毒载体系统包括 pMDlg-pRRE、pMD2G、pRsv-REV

和 pLV 目的基因重组载体（pMagic4.0/EGFP 载体）以及阴性对照慢病毒（生博生物医药科技有限公司，上海）；人胚肺成纤维细胞株 MRC-5 和 293T 细胞（中科院上海细胞库，中国）；限制性内切酶 *Age* I、*Eco*R I 和 T4 DNA 连接酶（NBE，USA）；Lipofectamine 2000 转染试剂（Invitrogen，USA）；总 RNA 提取试剂 RNAiso Plus、PrimeScript RT 试剂盒、DNA Marker（TaKaRa，大连）；SYBR Green PCR Master Mix（Roche，USA）；DMEM 高糖培养基（Hyclone，USA）；PCR 引物（生工，上海）；BCA 蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒（碧云天，江苏）；兔抗人 TGFβR I 多克隆抗体（CST，USA）；Polybrene（生博生物医药科技有限公司，上海）。

1.2 实验方法

1.2.1 siRNA 设计合成 利用 RNAi 设计软件按照 RNA 干扰序列设计原则，设计 4 条针对人 TGFβR I 基因（GenBank：NM_004612）的 siRNA 干扰序列和 1 条阴性对照序列，4 条 siRNA 序列分别为：siRNA-1 5'-CCATCTTCACATGGAGATT-3'；siRNA-2 5'-GGAGATTGTTGGTACCCAA-3'；siRNA-3：5'-TCAAGAGACCAAGGTACAT-3'；siRNA-4 5'-TCCTAA-CACTACAGTAGAA-3'。阴性对照序列 5'-TTCTCCGAACG-TGTCACGT-3'。根据上述干扰序列分别设计并合成其对应互补单链，使其两端均含有限制性内切酶对应的酶切位点黏性末端，然后将合成的上述正、反单链核苷酸链等量混匀，经退火形成带黏性末端的双链 DNA。同时，进行 BLAST 同源性分析确认 4 对干扰片段的特异性。

1.2.2 TGFβR I siRNA 慢病毒载体的构建 首先用 *Age* I 和 *Eco*R I 双酶切 pMagic 4.0/EGFP 载体，使其线性化。将合成的 4 对双链 DNA 以及阴性对照双链 DNA 分别与酶切后的载体混合，加入 T4 DNA 连接酶，使双链 DNA 与载体充分连接。为了获取重组克隆进行 PCR 鉴定，将过夜后的连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5α，然后将 PCR 获得的阳性克隆进行 DNA 测序分析。

1.2.3 慢病毒载体的包装 首先将生长良好的 293T 细胞（6×10^5 个/ml）接种于 24 孔细胞培养板，常规培养，当细胞密度达 60%~70%时，将慢病毒包装质粒混合物（pRsv-REV 载体 10 μg、pMDlg-pRRE 载体 15 μg、pMD2G 载体 7.5 μg 和含有不同干扰靶点的重组慢病毒 pMagic4.0-EGFP 载体 20 μg）与相应体积的 Lipofectamine 2000 试剂混合液加入到细胞培养皿中，共转染 293 T 细胞（具体转染步骤参照试剂盒说明书进行）。转染 72 h 后，收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液进行离心（4 ℃，4 000×g，10 min）、过滤、再次离心（4 ℃，25 000 r/min，20 min）、病毒沉淀重悬，将得到的慢病毒浓缩液在 -80 ℃存储以备进行滴度鉴定。

1.2.4 逐孔稀释法进行病毒滴度测定 在测定前 24 h，先将 293T 细胞加入 96 孔板中（100 μl/孔）。然后梯度稀释病毒原液，准备 10 个已灭菌的离心管，加入无血清的培养基（90 μl/管），在第 1 号管中加入待测定的病毒原液 10 μl，充分震荡混匀，然后再从第 1 管中取 10 μl 混合液加入第 2 离心管，充分混匀，依次进行梯度稀释直到最后 1 管。然后取不同稀释度的病毒原液加入相应的细胞孔中转染 293T 细胞，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中继续培养。5 d 后在倒置荧光显微镜下观察各孔内含有增强型的绿色荧光蛋白（enhanced green fluorescent protein，EGFP）的细胞并计数。病毒的稀释倍数越大，孔内荧光细胞的个数就越少。数出最后 2 个有荧光的孔中的荧光细胞克隆数，并根据计算公式算出滴度。计算公式：滴度（TU/ml）=（A+B×10）×1 000/2/A 孔病毒液的含量（μl），注：A 为倒数第 2 孔荧光细胞克隆数）、B 为倒数第 1 孔荧光细胞克隆数）。

1.2.5 细胞培养 用高糖 DMEM 培养液培养人胚肺成纤维细胞株 MRC-5（含：10%进口胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素），培养条件：37 ℃，5% CO_2 饱和湿度孵箱。

1.2.6 慢病毒感染人胚肺成纤维细胞 MRC-5 在对数生长期的 MRC-5 细胞中加入胰酶，充分消化后进行细胞计数，将其制备成含有 2×10^5 个细胞的悬液，并接种到 6 孔板中（2 ml/孔），加入无血清的 DMEM 培养基后置于培养箱中培养（37 ℃，5% CO_2），随后进行病毒感染（细胞融合度为 40%~50%）。首先在 DMEM 培养基中加入 Polybrene 使其终浓度为 5 μg/ml，然后分别加入适量的干扰慢病毒（siRNA-1~4）和阴性对照慢病毒感染细胞，使其感染复数（multiplicity if infection，MOI）=30，再继续培养 8~12 h 后更换培养基，于感染 72 h 后在倒置荧光显微镜下观察 EGFP 的表达情况。

1.2.7 qRT-PCR 检测慢病毒感染后 MRC-5 细胞中 TGFβR I mRNA 的表达水平 分别提取干扰组（siRNA-1~4 组）、阴性对照病毒组、正常对照组的 MRC-5 细胞的 RNA，逆转录成 cDNA，采用 qRT-PCR 检测 MRC-5 细胞中 TGFβR I 基因 mRNA 的表达情况。TGFβR I 引物序列为上游引物：5'-TT-GATATTGCTCCAAACCACAGAG-3'，下游引物：5'-TACTAA-GCCCATTGCATAGATGTC-3'，扩增长度 128 bp。内参基因 GAPDH 的引物序列为上游引物：5'-GCACCGTCAAGGCT-GAGAAC-3'，下游引物：5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'，扩增长度 138 bp。引物由上海生工公司合成。PCR 反应条件：预变性 95 ℃，10 min 1 个循环；变性 95 ℃ 10 s，退火 59 ℃ 30 s，共 40 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta G}$ 表示目的基因的相对表达量。

1.2.8 Western blot 检测慢病毒感染后 MRC-5 中 TGFβR I 蛋白的表达水平 干扰组（siRNA-1~4 组）、阴性对照病毒组和正常对照组的的总蛋白被提取后，用 BCA 法测定蛋白浓度。取适量的蛋白经过电泳、转膜、封闭后加入兔抗人 TGFβR I 抗体（1∶1 000 稀释）4 ℃过夜，然后洗膜加入 HRP 标记羊抗兔的二抗（1∶2 000 稀释）室温孵育 1 h，洗膜后进行化学发光试剂（ECL）法显影。将得到的条带用 Vilber Lourmat 凝胶成像系统的分析软件进行分析，得到 TGFβR I 和 GAPDH 蛋白的灰度值，将 TGFβR I 的灰度值比上 GAPDH 的灰度值即为 TGFβR I 蛋白的相对表达量。

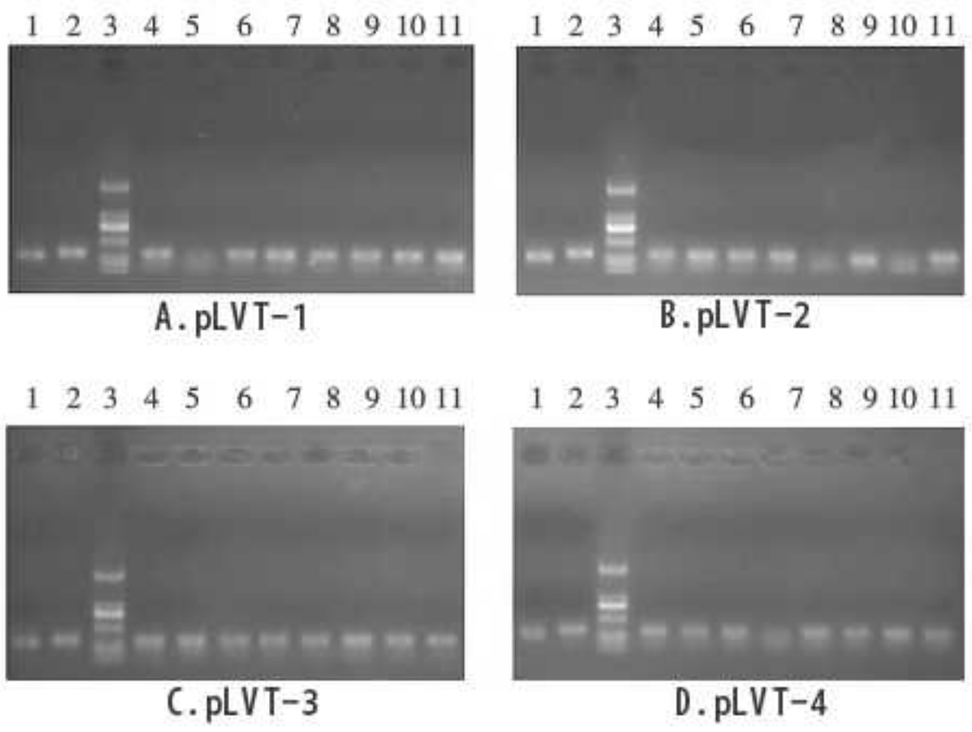
1.3　统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析，计量资料采用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。多组数据间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 SNK-q 法，检验水准 α=0.05。

2　结　果

2.1　TGFβR Ⅰ siRNA 重组慢病毒干扰载体的鉴定结果

结果显示：挑取重组克隆行 PCR，并将 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳，可见 4 种重组载体中至少有 6 个克隆为阳性克隆（图 1），阳性克隆进行 DNA 测序。结果显示：所构建的沉默 TGFβR Ⅰ 基因的 4 种 siRNA 重组慢病毒干扰载体的 DNA 序列与设计的序列相同，插入的 TGFβR Ⅰ siRNA 核苷酸序列是正确的，所构建的 4 组 TGFβR Ⅰ RNAi 慢病毒载体是成功的。



1. 阴性对照（空载体）　2. 阳性对照（pLVT-nc）；
3. DL2 000 DNA Marker：2 kb、1 kb、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp；4～11.挑取的 8 个转化子

图 1　TGFβRⅠ基因干扰的重组阳性克隆的 PCR 鉴定

Fig.1　Lentiviral vector containing TGFβRⅠshRNA confirmed by PCR

2.2　慢病毒载体的包装及滴度测定

在慢病毒转染的第 5 天时，在倒置荧光显微镜下观察细胞内荧光表达情况，可见细胞内发出强弱程度不一的绿色荧光，表明慢病毒载体质粒已成功转染进 293T 细胞。计数荧光细胞的克隆数，根据公式计算得到干扰组慢病毒（siRNA-1～4）滴度分别为：6.37×10^{7} TU/ml、1.65×10^{8} TU/ml、4.50×10^{8} TU/ml、2.31×10^{8} TU/ml，阴性对照组的病毒滴度为：1.79×10^{9} TU/ml，表明 RNAi 慢病毒载体包装成功。

2.3　重组慢病毒感染人胚肺成纤维细胞株 MRC-5

用慢病毒感染人胚肺成纤维细胞株 MRC-5 72 h，在倒置荧光显微镜下观察各组细胞内荧光表达情况，发现：各组细胞内 EGFP 的表达均强，细胞内可见明显的绿色荧光，慢病毒 EGFP 表达效率高，病毒感染效率达到 93%左右（图 2）。

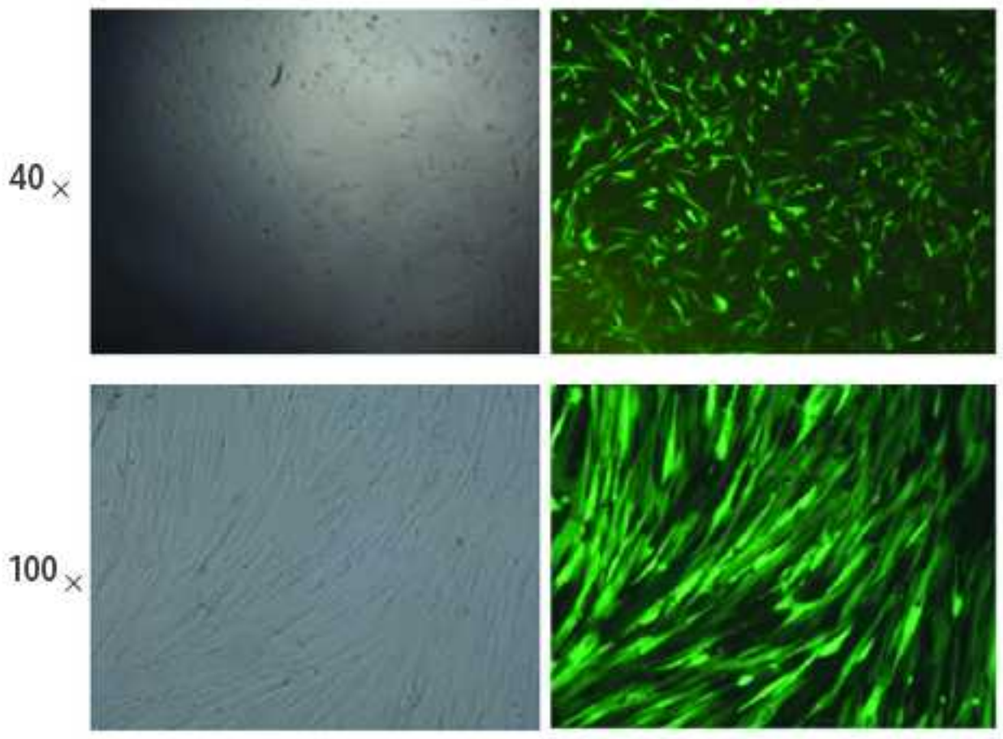


图 2　慢病毒感染后细胞内 EGFP 表达

Fig.2　Expression of EGFP in MRC-5 infected by recombinant lentivirus vectors

2.4　RNAi 慢病毒载体感染后，MRC-5 细胞内 TGFβR Ⅰ mRNA 表达情况

qRT-PCR 检测结果显示：TGFβR Ⅰ 和内参基因 GAPDH 的扩增曲线均为平滑的曲线，其溶解曲线均显示为特异单峰（图 3）。与正常对照组比较，siRNA-1 组、siRNA-2 组、siRNA-3 组和 siRNA-4 组人胚肺成纤维细胞株 MRC-5 中 TGFβR Ⅰ mRNA 的表达均明显下降（P=0.000、P=0.000、P=0.000、P=0.000），阴性对照组与正常对照组比较，TGFβR Ⅰ mRNA 表达无明显差异（P=0.406），其中，TGFβR Ⅰ-siRNA2 组下降最明显，具有最佳干扰效率（图 4，表 1）。

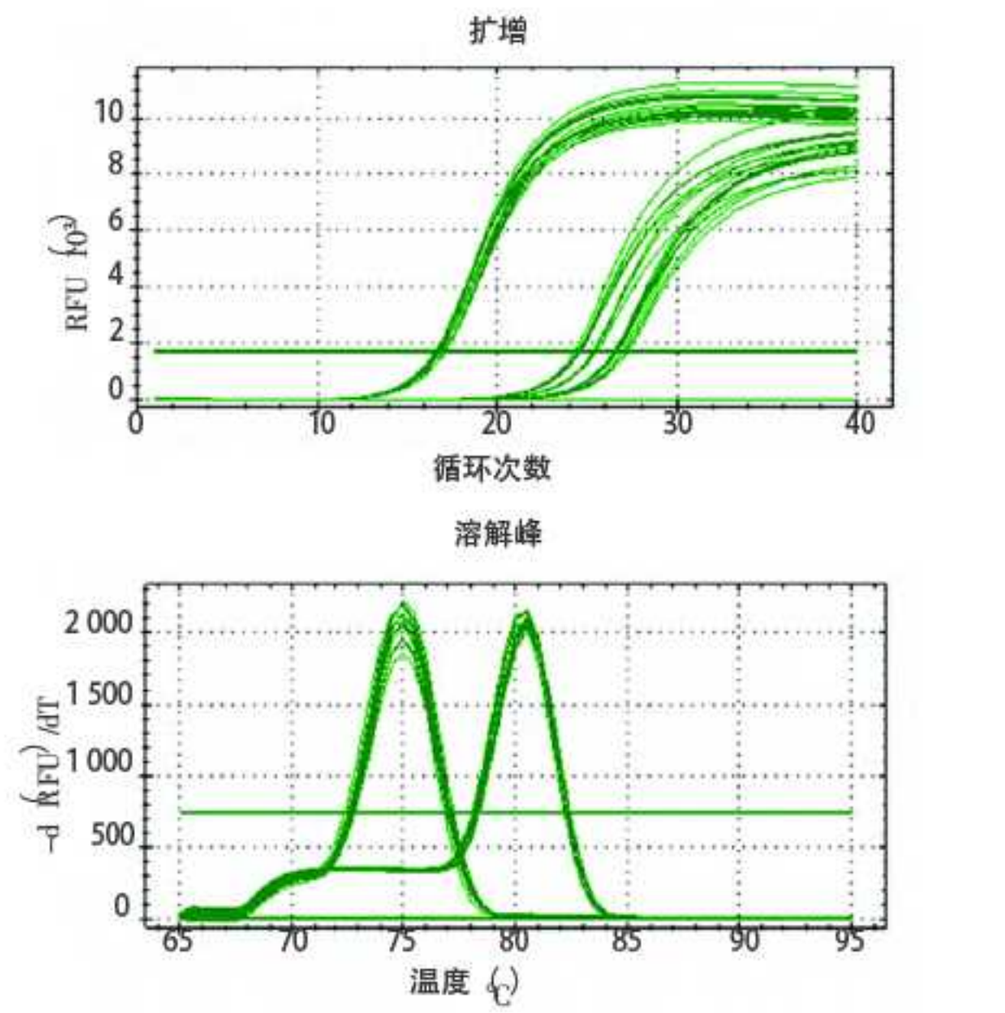
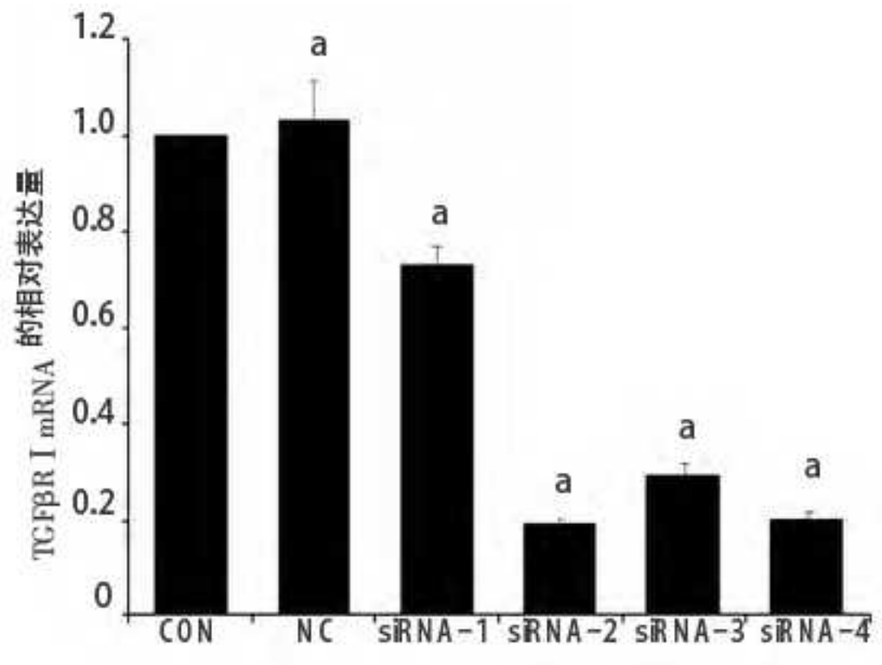


图 3　扩增曲线和溶解曲线示意图

Fig.3　Representative pictures of amplification curve and melting curve for target and GAPDH genes



CON：正常对照组；NC：阴性对照病毒组；
a：与正常对照组和阴性对照比较，$P<0.05$

图 4　qRT-PCR 检测各组 TGF$_\beta$R Ⅰ mRNA 的相对表达量

Fig.4　Relative expression of TGF$_\beta$R Ⅰ mRNA in different groups detected by qRT-PCR

表 1　各组 TGF$_\beta$R Ⅰ mRNA 的相对表达量（$\bar{x}\pm s$，n=5）

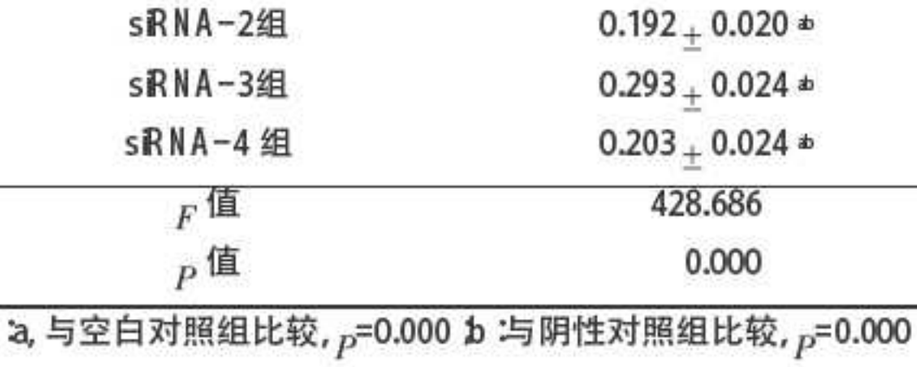
Tab.1　Relative expression of TGF$_\beta$R Ⅰ mRNA in different groups（$\bar{x}\pm s$，n=5）

组别	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 均值
CON 组	1.000 ± 0.000
NC 组	1.029 ± 0.073
siRNA-1 组	0.732 ± 0.063[ab]
siRNA-2 组	0.192 ± 0.020[ab]
siRNA-3 组	0.293 ± 0.024[ab]
siRNA-4 组	0.203 ± 0.024[ab]
F 值	428.686
P 值	0.000

注：a，与空白对照组比较，P=0.000　b：与阴性对照组比较，P=0.000

2.5　RNAi 慢病毒载体感染后，MRC-5 细胞内 TGFβR Ⅰ 蛋白表达情况

Western blot 检测结果显示：与正常对照组比较，siRNA-1 组、siRNA-2 组、siRNA-3 组和 siRNA-4 组 MRC-5 细胞内 TGFβR Ⅰ 蛋白的表达均明显下降（P=0.000、P=0.000、P=0.000、P=0.000），阴性对照组与正常对照组比较，无明显差异（P=1.000），且可以看出 siRNA-2 组的下降率最高，与 qRT-PCR 结果一致。见图 5、表 2。



1：正常对照组；2：阴性对照组；3~6：siRNA-1~4

图 5　Western blot 检测各组 TGF$_\beta$R Ⅰ 蛋白的表达

Fig.5　TGF$_\beta$R Ⅰ protein expression in different groups detected by Western blot

表 2　各组 TGF$_\beta$R Ⅰ 蛋白的表达水平（$\bar{x}\pm s$，n=5）

Tab.2　TGF$_\beta$R Ⅰ protein expression in different groups（$\bar{x}\pm s$，n=5）

组别	TGF$_\beta$R Ⅰ/GAPDH 均值
CON 组	0.474 ± 0.005
NC 组	0.474 ± 0.004
siRNA-1 组	0.242 ± 0.015[ab]
siRNA-2 组	0.182 ± 0.007[ab]
siRNA-3 组	0.237 ± 0.013[ab]
siRNA-4 组	0.188 ± 0.006[ab]
F 值	1 074.129
P 值	0.000

注：a，与空白对照组比较，P=0.000　b：与阴性对照组比较，P=0.000

3　讨　论

ARDS 是机体在遭受创伤、严重感染、休克等肺内或肺外因素打击后出现的以肺泡毛细血管损伤为主要表现的临床综合征。据不完全统计，每年仅美国 ARDS 发病数即达 15 万例[17]；国内有文献报道部分地区死亡率可达 70%，ARDS 已成为严重影响人民健康的疾病。自 1967 年 Ashbaugh 等首次描述 ALI/ARDS 临床特征以来，人们普遍认为其主要是由于毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞破坏，导致肺泡内液体清除能力下降、肺泡内出血、肺泡表面活性物质稳态破坏和肺泡毛细血管屏障功能丧失，最终导致肺换气功能严重受损，但确切的发病机制至今尚未完全阐明。目前业界认为，肺纤维化是 ARDS 晚期最严重的并发症之一，预后极差，临床上对肺纤维化尚无有效治疗手段，其 5 年生存率仅为 20%，严重影响危重病人的救治进程[18]。

肺纤维化是以炎症细胞浸润为主要特征的弥漫性肺部炎症性疾病，是人体内各种细胞因子相互作用的结果。在纤维化的进程中，细胞因子主要从以下 3 个方面来发挥作用，即：①促进纤维化的形成；②参与局部的损伤和炎症反应过程；③抑制纤维化的形成。一方面，细胞因子能够刺激肺组织发生诸如诱导肺泡上皮细胞凋亡、促进胶原纤维沉积等一系列的纤维化反应；另一方面，细胞因子也可以抑制纤维化的发展，甚至某些细胞因子还能在纤维化晚期参与组织的修复过程。近年来，越来越多细胞因子在肺纤维化中的作用与机制已被逐步揭示，在包括上游调节物质与下游靶点、相关受体、时

间依赖性和器官特异性等诸多方面均有深入研究[19]。在这些对细胞因子致纤维化作用的研究中，认识最为深入的是 TGF-β1。

TGF-β 这一致纤维化的关键性细胞因子是一组包括 TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3 的生长因子。TGF-β1 是迄今为止发现的最强的致纤维化因子，它具有调节细胞生长、分化、凋亡、免疫抑制和细胞外基质合成等不同的生物学功能[20-22]，能通过多种途径参与肺纤维化的发生发展[23]。TGF-β1 还可以调节其它致纤维化细胞因子的产生，加速肺纤维化的发生发展[16]。TGF-β1 的致纤维化作用主要是通过 TGF-β-smad 通路实现的，TGFβR Ⅰ和 TGFβR Ⅱ在这一信号传导通路中起着至关重要的作用[24]。在肺纤维化中，TGF-β1 主要是通过激活 ALK5（一种 TGFβR Ⅰ）和下游的 Smad2/3 这一信号通路来促进肺纤维化的形成[25-26]。同时，TGF-β1 也可作为一种早期炎症因子，在不同因素诱导的 ARDS 模型肺组织中表达均明显增高。在 ARDS 及其失控性炎症反应早期，TGF-β1 可通过趋化相应的炎症细胞和诱导炎性因子释放以推动“瀑布样”炎症反应的发展，TGF-β1 还可以通过上调胶原和纤维粘连蛋白的 mRNA 表达水平，使细胞外基质过度合成和沉积。同时，TGF-β1 亦可促进损伤区域内成纤维细胞的大量增殖，进而促进成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化。体内和体外实验研究均证实 TGF-β1 通过细胞外信号调节激酶 1/2（extracellular signal-regulated kinase1/2，ERK1/2）依赖方式抑制钠通道蛋白 αENaC mRNA 和蛋白表达，进而抑制肺泡上皮细胞钠离子和液体转运[27]。最近还发现 TGF-β1 可通过磷脂酰肌醇-3-羟激酶（phosphatidyl inositol 3-kinase，PI3K）通路抑制 β2 肾上腺素能受体激动剂从而促进氯离子和液体进入人和大鼠原代Ⅱ型肺泡上皮细胞[28]。此外，TGF-β1 还能促进 Fas 诱导肺泡上皮细胞凋亡和抑制肺泡表面活性物质产生[29]。另一方面，甲基泼尼松龙和人脐带间充质细胞通过降低 TGF-β1 表达水平改善大鼠急性肺损伤（acute lung injury，ALI）[30-31]。同时，通过抑制 TGF-β1-smad2 途径也可减轻内毒素诱导的大鼠 ALI[32]。可见，TGF-β1 在 ALI/ARDS 发病机制中起非常重要作用。以 TGF-β1 为治疗靶点，可能形成一种新的 ALI/ARDS 治疗策略。目前，已经证实 TGF-β1 的抗体、TGF-β1 受体抗体和可溶性受体等拮抗剂对肺纤维化有一定的治疗作用，但是这些拮抗剂都是外源性蛋白，会产生免疫原性或在体内降解等问题，因而限制了其在生物治疗中的作用。近年来，随着分子生物技术的飞速发展，应用基因阻断技术在基因水平对病理性表达的细胞因子进行调控已被广泛应用于基因功能的研究。因此，利用 RNAi 技术选择性的靶向抑制 TGF-β/Smad 信号通路中 TGFβR Ⅰ基因的表达，可能成为一个极富应用前景的抗肺纤维化治疗的方法。

RNA 干扰（RNA interference，RNAi）是生物进化过程中广泛存在的一种保守现象，它通过阻断外源基因的表达，使自身基因组保持完整性[33]。因为 RNAi 可使特定靶基因的表达沉默，现在已被广泛应用于基因工程。其作用机制是将与靶基因 mRNA 序列具有同源性的一段短的双链 RNA 导入细胞，诱导与之同源靶基因的 mRNA 降解，从而特异性抑制目的蛋白的表达，使该基因“沉默”[33-34]。RNAi 技术较传统的基因敲除技术更加快速、高效，且操作简单，序列特异性强。RNAi 技术的关键是能否获得在细胞内产生干扰的 siRNA。其常用方法包括：化学合成 siRNA、构建 shRNA 的真核表达载体、体外转录、慢病毒载体和 siRNA 表达盒。其中，慢病毒载体是携带干扰 RNA 的理想载体，它以人类免疫缺陷 1 型病毒为基础，能够实现对处于分裂期和非分裂期细胞的高效感染，并在细胞内稳定、持久表达外源的基因；同时，慢病毒载体所容载的外源基因片段大，宿主免疫反应发生率低[35-37]。目前，慢病毒载体已被广泛应用于基因功能的研究，在调控生长发育、抗纤维化、抗病毒和抗肿瘤等方面均有较好的应用前景[38]。有研究发现构建的肝星状细胞的内源性大麻素 1 受体（cannabinoid receptor 1，CB1 receptor）基因 RNA 干扰慢病毒载体能有效沉默 CB1 受体，显著抑制星状细胞的活化、增殖及细胞外基质的产生，从而抑制肝的纤维化[39]。另一项研究发现，将构建的乙型肝炎病毒（hepatitis B Virus，HBV）基因 RNAi 慢病毒载体注射到新生的 HBV 转基因小鼠体内时，能持续抑制其体内 HBV 的复制，改善乙型肝炎的预后，这为乙肝的基因治疗以及肝硬化和肝癌的防治带来了新的希望[40]。此外，多项研究表明 RNAi 慢病毒载体在多种肿瘤的基因治疗中具有很好的应用前景。最近一项研究发现受体相互作用蛋白 1（receptor-interacting protein-1，RIP-1）在胃癌

组织内高度表达，而 RIP-1 基因 RNAi 慢病毒载体能显著抑制胃癌细胞 HGC 和 AGS 细胞的增殖和浸润，为胃癌的治疗提供了新的方向[41]。另一项研究则发现利用 RNAi 慢病毒载体沉默网状内皮素 4C (reticulon 4C，RTN4-C) 基因能有效抑制人结直肠癌细胞的生长[42]。利用 RNAi 慢病毒载体抑制癌基因 Kras 的活化，可下调肺癌细胞内糖酵解酶己糖激酶 2 (glycolytic enzyme hexokinase Ⅱ，HK2) 的表达，诱导癌细胞凋亡和自噬，从而抑制肺癌细胞的生长[43]。除此之外，RNAi 慢病毒载体还被应用于急性肺损伤的治疗。研究发现利用 RNAi 慢病毒载体沉默 PALM3 (paralemmin-3) 基因能减轻脂多糖 (lipopolysaccharide，LPS) 诱导的急性肺损伤小鼠的肺部损伤和炎症程度[44]。本研究在构建 TGFβR Ⅰ基因 siRNA 表达载体时，亦采用慢病毒作为介导载体。研究中所使用的四质粒慢病毒载体系统的致病基因 (HIV-1/env) 已被剔除，不仅使其具有了更高的安全性，而且能感染更多种类的细胞。

利用 RNAi 技术沉默 TGFβR Ⅰ基因的关键是针对 TGFβR Ⅰ基因设计有效的 siRNA 序列，进而筛选出最佳的有效干扰靶点。由于基因结构复杂，基因内含有内含子，常常针对同一基因的不同位置设计的 siRNA 片段其沉默效率并不相同，所以为了实现干扰序列的有效性，本研究选择并设计了 TGFβR Ⅰ基因 (Homo：NM_004612) 不同起始位点的 4 条干扰序列，同时设计了阴性对照 siRNA。因为本研究是以人胚肺成纤维细胞 MRC-5 为实验对象，在前期预实验中采用体外化学合成 TGFβR Ⅰ基因 siRNA 及真核表达载体_质粒的方法进行转染，发现其转染人胚肺成纤维细胞 MRC-5 效率较低，且该细胞株属于有限细胞系，培养相对困难，因此，为了提高转染效率，保证对 TGFβR Ⅰ基因的有效沉默，本研究最终选择构建了 4 种转染效率和安全性更高的 TGFβR Ⅰ基因 RNAi 慢病毒载体。经测序比对，所设计的 4 对干扰序列均插入正确。然后，在 MOI 值=30，添加感染增强剂 Polybrene (5 μg/ml) 的条件下，将得到的 4 种 RNAi 慢病毒载体分别感染 MRC-5 细胞 8~12 h，在荧光显微镜下观察细胞内 EGFP 的表达情况，感染 72 h 后超过 93%的 MRC-5 细胞内可见绿色荧光蛋白表达极强，显示病毒颗粒转染成功，siRNA 片段得到有效的整合并实现最佳表达。随后，运用 qRT-PCR 检测各组 TGFβR Ⅰ的 mRNA 表达情况，以及运用 Western blot 检测各组 TGFβR Ⅰ的蛋白表达情况，筛选出有效干扰 TGFβR Ⅰ基因的最佳靶点。结果显示 4 组中 TGFβR Ⅰ-shRNA2 和 TGFβR Ⅰ-shRNA4 组的沉默效率比较接近，而且是 4 组中沉默效率最高的 2 组，2 种重组载体都可以用于后续的实验研究。通过本研究，成功构建并筛选了感染效率和沉默效率都高的针对 TGFBR Ⅰ基因的特异性 RNAi 慢病毒载体从而为后续实验打下了坚实的基础，也为肺纤维化的基因治疗开辟了崭新的前景。

参 考 文 献

[1] Thannickal VJ，Toews GB，White ES，et al. Mechanisms of pulmonary fibrosis[J]. Annu Rev Med，2004，55(1)：395-417.

[2] Sheppard D. Transforming growth factor beta：a central modulator of pulmonary and airway inflammation and fibrosis[J]. Proc Am Thorac Soc，2006，3(5)：413-417.

[3] Hamacher J，Lucas R，Lijnen HR，et al. Tumor necrosis factor-alpha and angiostatin are mediators of endothelial cytotoxicity in bronchoalveolar lavages of patients with acute respiratory distress syndrome [J]. Am J Respir Crit Care Med，2002，166(5)：651-656.

[4] 高 巨. TGF-β1 信号通路在急性肺损伤纤维化中的研究新进展[J]. 临床急诊杂志，2008，9(6)：381-384.

[5] Park S，Ahn JY，Lim MJ，et al. IM-412 inhibits transforming growth factor beta-induced fibroblast differentiation in human lung fibroblast cells[J]. Biochem Biophys Res Commun，2010，399(2)：268-273.

[6] Branton MH，Kopp JB. TGF-beta and fibrosis[J]. Microbes Infect，1999，1(15)：1349-1365.

[7] Molina V，Blank M，Shoenfeld Y. Fibrotic diseases[J]. Harefuah，2002，141(11)：973-978，1009.

[8] Willis BC，Borok Z. TGF-beta-induced EMT：mechanisms and implications for fibrotic lung disease[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol，2007，293(3)：L525-534.

[9] Gharaee-Kermani M，Hu B，Phan SH，et al. Recent advances in molecular targets and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis：focus on TGFbeta signaling and the myofibroblast[J]. Curr Med Chem，2009，16(11)：1400-1417.

[10] 朱玉凤. 肺纤维化细胞因子机制研究进展[J]. 当代医药论丛，2015，13(5)：157-158.

[11] de Caestecker M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors[J]. Cytokine Growth Factor Rev，2004，15(1)：1-11.

[12] ten Dijke P，Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling [J]. Trends Biochem Sci，2004，29(5)：265-273.

[13] Nagaraj NS，Datta PK. Targeting the transforming growth factor-beta signaling pathway in human cancer[J]. Expert Opin Investig Drugs，2010，19(1)：77-91.

[14] Ogunjimi AA, Zeqiraj E, Ceccarelli DF, et al. Structural basis for specificity of TGFbeta family receptor small molecule inhibitors[J]. Cell Signal, 2012, 24(2): 476-483.

[15] Yao H, Pan J, Qian Y, et al. Enhanced effect of soluble transforming growth factor-beta receptor Ⅱ and IFN-gamma fusion protein in reversing hepatic fibrosis[J]. Eur J Med Res, 2010, 15(4): 152-161.

[16] 马 莎. 短发夹 RNA 抑制人肺成纤维细胞 TGF-β1 基因表达的研究[D]. 昆明医学院, 2008.

[17] Villar J, Sulemanji D, Kacmarek RM. The acute respiratory distress syndrome: incidence and mortality, has it changed?[J]. Curr Opin Crit Care, 2014, 20(1): 3-9.

[18] Raghu G, Weycker D, Edelsberg J, et al. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2006, 174(7): 810-816.

[19] 王司仪, 原铭贞, 刘笑玎, 等. 细胞因子与肺纤维化相关性的研究进展[J]. 吉林大学学报 (医学版), 2014, 47(6): 1325-1329.

[20] Huang SS, Huang JS. TGF-beta control of cell proliferation[J]. J Cell Biochem, 2005, 96(3): 447-462.

[21] Smith GH. TGF-beta and functional differentiation[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 1996, 1(4): 343-352.

[22] Tabibzadeh S. Homeostasis of extracellular matrix by TGF-beta and lefty[J]. Front Biosci, 2002(7): d1231-1246.

[23] Massague J. TGF-beta signal transduction[J]. Annu Rev Biochem, 1998(67): 753-791.

[24] Wrana JL, Attisano L, Wieser R, et al. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor[J]. Nature, 1994, 370(6488): 341-347.

[25] Singh J, Ling LE, Sawyer JS, et al. Transforming the TGFbeta pathway: convergence of distinct lead generation strategies on a novel kinase pharmacophore for TbetaRI (ALK5)[J]. Curr Opin Drug Discov Devel, 2004, 7(4): 437-445.

[26] Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, et al. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors[J]. EMBO J, 2002, 21(7): 1743-1753.

[27] Frank J, Roux J, Kawakatsu H, et al. Transforming growth factor-beta1 decreases expression of the epithelial sodium channel alphaENaC and alveolar epithelial vectorial sodium and fluid transport via an ERK1/2-dependent mechanism[J]. J Biol Chem, 2003, 278(45): 43939-43950.

[28] Wagener BM, Roux J, Carles M, et al. Synergistic Inhibition of beta2-adrenergic receptor-mediated alveolar epithelial fluid transport by interleukin-8 and transforming growth factor-beta[J]. Anesthesiology, 2015, 122(5): 1084-1092.

[29] Bai L, Yu Z, Wang C, et al. Dual role of TGF-beta1 on Fas-induced apoptosis in lung epithelial cells[J]. Respir Physiol Neurobiol, 2011, 177(3): 241-246.

[30] Leite-Junior JH, Garcia CS, Souza-Fernandes AB, et al. Methylprednisolone improves lung mechanics and reduces the inflammatory response in pulmonary but not in extrapulmonary mild acute lung injury in mice[J]. Crit Care Med, 2008, 36(9): 2621-2628.

[31] Jiang X, Jiang X, Qu C, et al. Intravenous delivery of adipose-derived mesenchymal stromal cells attenuates acute radiation-induced lung injury in rats[J]. Cytotherapy, 2015, 17(5): 560-570.

[32] Mu E, Ding R, An X, et al. Heparin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta/Smad signaling pathway[J]. Chinese Critical Care Medicine, 2014, 26(11): 810-814.

[33] 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.

[34] Paul CP, Good PD, Winer I, et al. Effective expression of small interfering RNA in human cells[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(5): 505-508.

[35] Sumimoto H, Kawakami Y. Lentiviral vector-mediated RNAi and its use for cancer research[J]. Future Oncol, 2007, 3(6): 655-664.

[36] Huang DD. The potential of RNA interference-based therapies for viral infections[J]. Curr HIV/AIDS Rep, 2008, 5(1): 33-39.

[37] Nishitsuji H, Ikeda T, Miyoshi H, et al. Expression of small hairpin RNA by lentivirus-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary non-dividing cells[J]. Microbes Infect, 2004, 6(1): 76-85.

[38] Jiang R, Xue S, Jin Z. Stable knockdown of MYCN by lentivirus-based RNAi inhibits human neuroblastoma cells growth in vitro and in vivo[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 410(2): 364-370.

[39] Chen SW, Wu BY, Xu SP, et al. Suppression of CB1 cannabinoid receptor by lentivirus mediated small interfering RNA ameliorates hepatic fibrosis in rats[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e50850.

[40] Ivacik D, Ely A, Ferry N, et al. Sustained inhibition of hepatitis B virus replication in vivo using RNAi-activating lentiviruses[J]. Gene Ther, 2015, 22(2): 163-171.

[41] Zhu G, Ye J, Huang Y, et al. Receptor-interacting protein-1 promotes the growth and invasion in gastric cancer[J]. Int J Oncol, 2016. doi: 10.3892/ijo.2016.3455.[Epub ahead of print].

[42] Xue H, Wang Z, Chen J, et al. Knockdown of reticulon 4C by lentivirus inhibits human colorectal cancer cell growth[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(2): 2063-2067.

[43] Wang H, Wang L, Zhang Y, et al. Inhibition of glycolytic enzyme hexokinase Ⅱ (HK2) suppresses lung tumor growth[J]. Cancer Cell Int, 2016(16): 9.

[44] Li S, Guo L, Zhao Y, et al. Silencing of Paralemmin-3 Protects Mice from lipopolysaccharide-induced acute lung injury[J]. Peptides, 2016(76): 65-72.

责任编辑 冉明会)