DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.23.015
第26卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 23
2120 2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)23-2120-03

整合素β1小干扰RNA载体构建及其在表皮干细胞干扰效应检测

唐红英,伍素华,罗向东,刘月明,陈 建,苏踊跃,孙荣距 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 设计和构建整合素β1(integrinβ1)特异性的小干扰RNA表达载体,并初步验证其对靶基因的抑制作用。方法 设计靶点特异性的寡核苷酸,连接到经*Bam*HⅠ-*Hind*Ⅲ酶切线性化的pSlincer3.1/H1质粒上。转染重组质粒到表皮干细胞,通过免疫印迹(Western blotting)实验检测靶基因的抑制情况。结果 构建的小RNA干扰质粒siIntegrinβ1转染表皮干细胞能够抑制靶基因整合素β1的表达。结论 成功构建了针对整合素β1的siRNA质粒,为进一步研究整合素在表皮干细胞增殖与分化调控中的作用奠定了基础。

关键词:RNA干扰;表皮干细胞;整合素β1;转染
中图法分类号:R329.2;R392.11;R394-33 文献标识码:A

Construction of small interfering RNA expression vector targeting integrin β1

TANG Hong-ying, WU Su-hua, LUO Xiang-dong, LIU Yue-ming, CHEN Jian, SU Yong-yue, SUN Ju-rong (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To design and construct H1 promoter-based small interfering RNA (siRNA) expression vectors specific to integrin β1 and determine their effects on the expression of integrin β1. Methods DNA oligonucleotides targeting integrin β1 at different locations were synthesized and inserted into *Bam*HⅠ-*Hind*Ⅲ linearized pSinencer3.1/H1 plasmids. The inserted sequences were verified by DNA sequencing. The keratinocyte stem cells were transfected by positive reconstructed plasmids and the expression of integrin β1 protein was observed by immunoblot assay. Results The vector-based siRNAi could suppress integrin β1 gene expression specifically. Conclusion Vector-based siRNA expression plasmids have been constructed successfully, which lays the foundation for the studies of the regulatory role of integrin β1 in the proliferation and differentiation of keratinocyte stem cells.

Key words: RNA interference; keratinocyte stem cell; integrin β1; transfection

表皮干细胞(keratinocyte stem cell, KSC)作为组织特异性干细胞,具有分化成各种表皮和毛发的多能性,在皮肤更新、伤口愈合、肿瘤形成等方面发挥着重要作用[1]。整合素(又称整合蛋白)作为细胞粘附分子家族中的一员,在细胞之间、细胞与细胞外基质间的粘附及信息传递中发挥很重要的作用,进而调节细胞的生长、分化、增殖,甚至肿瘤的转移。研究表明[2,3],整合素β1在KSC中高表达,通过选取细胞表面高表达整合素β1的基底细胞可以富集到干细胞。整合素β1通过介导KSC与基底膜的粘附,而抑制KSC的分化。

RNA干扰是一种序列特异性的转录后基因沉默现象,它受到靶基因序列同源的双链RNA所诱导[4]。RNA干扰为生物学家提供了功能基因研究的快速和简便的方法。载体介导的RNA干扰方法是新近发展起来的在哺乳动物细胞中特异性抑制靶基因表达的技术[5]。本研究针对整合素β1靶基因,选择了两段靶序列,构建到pSilencer3.1/H1质粒中。并初步研究了重组质粒转染表皮干细胞对整合素β1蛋白表达的影响,为进一步研究整合素在表皮干细胞增殖与分化调控中的作用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

取包皮环切术后标本,用胰蛋白酶冷消化法获得表皮细胞,接种于用人Ⅳ型胶原包被的培养瓶/皿中,粘附10 min,吸除未粘附细胞,加入经丝裂霉素C处理过的小儿成纤维细胞作为滋养层,培养液为FAD培养基加10%胎牛血清,待细胞长至

基金项目:国家自然科学基金资助项目(10332060)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (10332060)
作者简介:唐红英(1969-),女,湖南省武冈市人,硕士研究生,主管护士,主要从事表皮干细胞增殖与分化的调控方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)65461987
通信作者:罗向东,电话:(023)65461987
收稿日期:2004-09-10;修回日期:2004-11-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

70%融合时传代, 以克隆密度接种于含有滋养细胞的培养皿中, 培养 14 d 后, 将所有含细胞数大于 50、肉眼直径大于 0.4 mm 的单个克隆挑取出来, 消化分散成单细胞后再接种于含有滋养细胞的培养皿中, 约 14 d 细胞达到 60%～70%融合时进行免疫细胞化学染色鉴定及转染。细胞转染时应用无抗、无血清 FAD 培养基。

1.2　KSC 的免疫细胞化学鉴定

一抗为小鼠抗人整合素β1 单克隆抗体(Chemicon 公司), 小鼠抗人外皮蛋白单克隆抗体(Sigma 公司), 二抗为 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG(北京中山)。方法如下: 4%多聚甲醛固定 10min, 室温; (抗外皮蛋白染色时加用甲醇通透 5 min); 磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗; TBST 缓冲液、0.02% tritonX-100 和 0.1%牛血清白蛋白(BSA)封闭, 37 ℃, 1 h; PBS 漂洗; 加一抗(1∶100), 37 ℃, 45 min; PBS 漂洗; 二抗(以 0.01%伊文蓝稀释, 1∶100), 37 ℃, 45 min; PBS 漂洗; 封固, 镜检, 阳性部分显示黄绿色荧光, 阴性部分被伊文蓝染成红色。每次染色均以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.3　重组整合素β1 小 RNA 干扰质粒的构建

pSilencer3.1/H1 质粒购自 Ambion 公司。靶点的选择和寡核苷酸序列的设计参照 Ambion pSilencer3.1 载体说明书, 寡核苷酸序列如下: 靶点一: 5′-GATCCGCAAATGCCAAATCATGTGTTCAAGAGACACATGATTTGGCATTTGCTTTTTTGGAAA-3′; 5′-AGCTTTTCCAAAAAAGCAAATGCCAAATCATGTGTCTCTTGAACACATGATTTGGCATTTGCG-3′。靶点二: 5′-GATCCGGAATGCCTACTTCTGCACTTCAAGAGAGTGCAGAAGTAGGCATTCCTTTTTTGGAAA-3′; 5′-AGCTTTTCCAAAAAAGGAATGCCTACTTCTGCACTCTCTTGAAGTGCAGAAGTAGGCATTCCG-3′。

核苷酸由上海博亚生物技术有限公司合成。对应的两段寡核苷酸分别以去离子水溶解(浓度为 1 μg/μl), 各取 5 μl 加入 90 μl 去离子水, 煮沸 5 min, 自然冷却, 寡核苷酸退火。用 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ双酶切 pSilencer3.1/H1 质粒 1.0 μg, 37 ℃, 1 h。对酶切产物进行琼脂糖电泳, 紫外灯下切下线性化的条带, 应用琼脂糖 DNA 回收试剂盒(Roche 公司)回收线性化载体。采用 DNA 连接试剂盒(TaKaRa 公司 Ver3.0)进行连接反应: 退火的寡核苷酸 1 μl, 双酶切的 pSilencer3.1/H1 5 μl, 去离子水 4 μl, Solution Ⅰ 10 μl, 16 ℃, 2 h。连接产物转化感受态 DH5α 大肠杆菌, 涂氨苄青霉素(50 μg/ml)抗性 LB 平板。待单个细菌克隆形成后, 挑取 2～3 个细菌克隆, 摇菌扩增, 抽提质粒。质粒进行 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ酶切鉴定, 及测序验证。根据不同靶点分别命名为 SiIntegrin-1 和 SiIntegrin-2 构建成功的质粒。

1.4　细胞转染

人 KSC 达到 60%～70%融合时, 采用 Dotap 试剂(Roche 公司)进行转染。组别设置如下: 转染 SiIntegrin-1 组, SiIntegrin-2 组, pSilencer3.1/H1 组。转染方法参照 Dotap 说明书。转染后 48 h 裂解细胞, 提取蛋白。

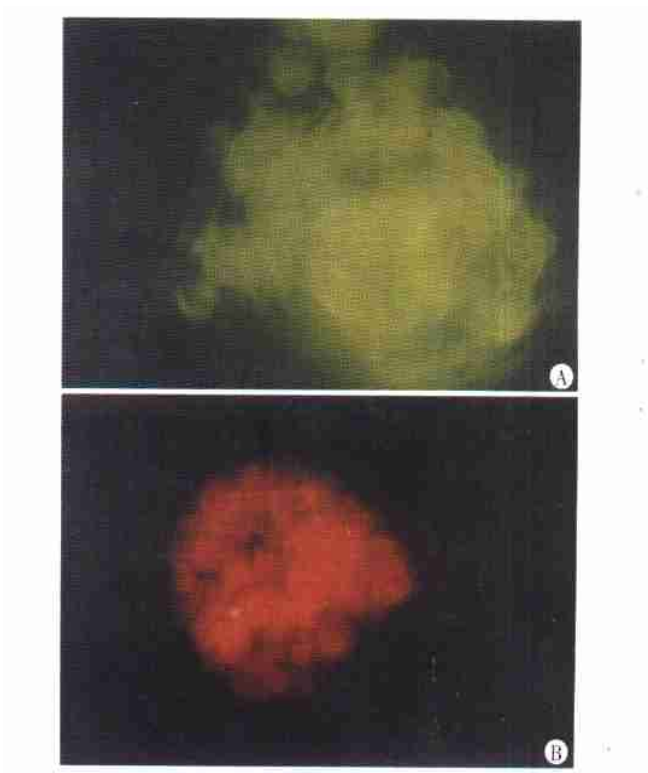
1.5　Western blotting 检测 RNA 干扰后 Integrinβ1 表达水平的改变

转染 48 h 后, 细胞用预冷的 PBS 洗 3 次, 4 ℃下用细胞裂解缓冲液 RIPA 裂解细胞 15～20 min, 4 ℃离心(10 000 r/min)5 min, 收获细胞裂解上清液作 Western blotting。用 BCA 法(BCA reagent kit Pierce 公司)进行蛋白定量, 以保证每孔的加样量一致。经 SDS-PAGE 电泳、转膜、4%脱脂奶粉封闭 2 h, 加鼠抗人 Integrinβ1 单克隆抗体(稀释比例 1∶300, 购自 Chemicon), 4 ℃孵育过夜, 加羊抗鼠二抗(稀释比例 1∶3 000, 购自 Santa)显影。显影底片经 Bio-Rad GS710 扫描仪扫描, 用其配套软件 Quantity One 进行定量分析。

2　结果

2.1　KSC 分离培养及免疫细胞染色鉴定

经低密度单克隆挑选 KSC 法可获得纯的 KSC。KSC 克隆(holoclone)免疫细胞化学染色阳性部分显示黄绿色荧光, 阴性部分被伊文蓝染成红色。KSC 克隆 integrinβ1 染色, 可见绝大多数细胞均为 integrinβ1 阳性, 见图 1A; KSC 克隆 involucrin 染色, 可见绝大多数细胞均为 involucrin 阴性, 见图 1B。



A: Holoclone immunocytochemical staining by integrinβ1; B: Holoclone immunocytochemical staining by involucrin

图 1　KSC 免疫细胞化学染色鉴定　(免疫荧光法×400)

Fig 1　Identification of KSC by immunocytochemical staining　(IFA×400)

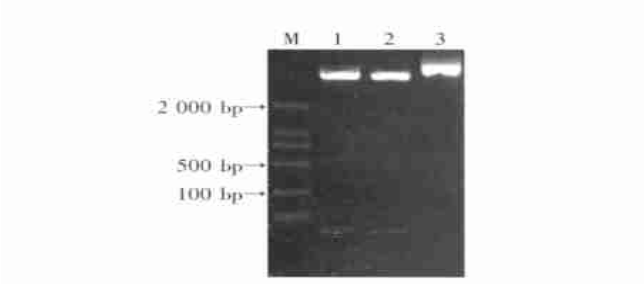
2.2　重组 siIntegrin 融合表达载体的酶切鉴定

重组载体阳性载体经 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ双酶切, 可切出大小为 60 bp 的片断(图 2), 而空载体没有切出条带, 初步验证了 siIntegrin 载体构建成功。

2.3　重组阳性载体 siIntegrin-1 和 siIntegrin-2 的测序验证

重组载体 siIntegrin-1 和 siIntegrin-2 转化的大肠杆菌菌株送上海博亚生物科技公司测序, 测序结果经 Genetool 软件比对分析, 发现插入片段寡核苷酸序列与设计的靶点序列完全吻合, 说明重组载体构建成功。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



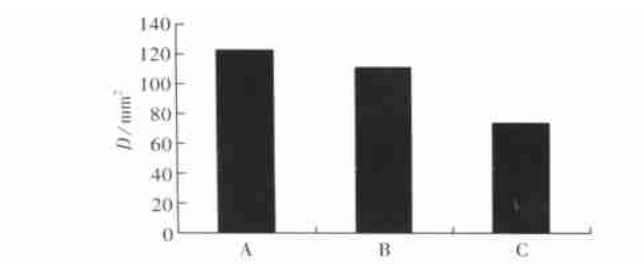
M: DL2000; 1: siIntegrin-1; 2: siIntegrin-1; 3: pSilencer3.1/H1

图 2 重组质粒 siIntegrin 的酶切分析

Fig 2 Identification of the recombinant vector by double-enzyme digestion

2.4 Western blotting 检测 RNA 干扰后 Integrinβ1 表达水平的改变

转染 siIntegrin 质粒到表皮干细胞后，Integrinβ1 的表达水平明显降低。两个靶点都可以抑制 Integrinβ1 的表达，其中靶点二的抑制效率要高于靶点一。图 3 是用 Quantity One 软件对扫描图像进行定量分析结果。



A: Transfection of pSilencer3.1/H1 vector; B: Transfection of siIntegrin-1; C: Transfection of siIntegrin-2

图 3 Western blotting 检测的定量分析

Fig3 Quantitative analysis by Western blotting

3 讨论

表皮干细胞的两个最显著的特点：①在体呈慢周期性，为标记保留细胞；②体外培养呈克隆性生长，理论上一个干细胞可进行 140 次分裂，产生 1 040 个子代细胞[6]。KSC 的另一个重要特点是对基底膜的粘附，KSC 主要通过整合素(integrin)介导与基底膜的粘附，其中β1 亚基组成的整合素在与基底膜的粘附中起重要作用，失去粘附的 KSC 则失去干细胞特性而进入分化过程。Jones 等[7]发现整合素β1 表达水平的高低与细胞体外克隆形成能力成正相关，高表达整合素β1 的细胞具有更高的克隆形成能力，传代次数显著多于低表达的细胞，将其移植到皮肤缺损创面后能生成完整的上皮层，表明整合素β1 高表达的细胞富含干细胞，因而整合素β1 作为 KSC 的分子标记一直受到关注。

RNA 干扰(RNA interference，RNAi)是新近发展起来的一项反基因技术，与传统的反义技术相比，RNAi 技术对基因表达的阻断效应更加有效；与基因敲除或突变相比，RNAi 技术则有操作简便、成本低廉、实验周期短等优势。由于 RNA 易于被 RNA 酶分解，不论是生物合成还是化学合成，研究成本都较高而且费时，而且最初 RNAi 在哺乳动物细胞中应用遇到了困难，研究人员发现超过 30 bp 的外源双链 RNA 不是引起序列特异性的基因沉默而是引起了全部的蛋白合成关闭，这些在一定程度上限制了 RNAi 技术的广泛应用。2001 年 Elbashir 等[5]率先直接应用 21～23 nt 的小干扰 RNA(Small interfering RNA，siRNA)转染哺乳动物细胞，取得了明显的靶基因的沉默效应，RNA 干扰技术的应用潜力进一步受到重视。

本实验采用的 pSilencer3.1/H1 质粒系统是一个由 H1 启动子控制的 siRNA 表达质粒，模板为含有靶点序列回文结构，这样细胞内合成的 RNA 为发夹样双链结构。这种 RNA 干扰策略成本低、可操作性强，我们应用这种方法，设计和构建了针对靶基因 integrinβ1 的两个 siRNA 表达质粒 siIntegrin-1 和 siIntegrin-2，并转染人表皮干细胞，通过免疫印迹实验观察靶基因被抑制的效果。结果表明，siIntegrin-1 和 siIntegrin-2 质粒转染表皮干细胞能够不同程度的下调整合素β1 蛋白的表达。提示 H1 启动子介导的细胞内合成 siRNA 策略，能够成功的在 KSC 中应用。我们选择的靶点序列可以干扰整合素β1 的表达，为进一步研究整合素β1 基因在 KSC 中的功能奠定了基础。

参考文献：

[1] Blanpain C, Lowry W E, Geoghegan A, *et al*. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche[J]. Cell, 2004, 118(5): 635－648.

[2] Jensen U B, Lowell S, Watt F M. The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole mount labelling and lineage analysis[J]. Development, 1999, 126(11): 2409－2418.

[3] Gambardella L, Barrandon Y. The multifaceted adult epidermal stem cell [J]. Curr Opin Cell Biol, 2003, 15(6): 771－777.

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

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

[6] Jones P H. Isolation and characterization of human epidermal stem cells [J]. Clin Sci, 1996, 91(2): 141－146.

[7] Jones P H, Harper S, Watt F M. Stem cell patterning and fate in human epidermis[J]. Cell, 1995, 80(1): 83－93.

（编辑 刘洪娥）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net