DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.20.001
第26卷第20期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 20
2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

文章编号:1000-5404(2004)20-1795-04

论著

糖皮质激素受体α基因RNA干扰的生物学效应研究

王明海,粟永萍,程天民,王锋超,陆建华,刘晓宏,李洪涛 (第三军医大学预防医学院防原医学教研室、全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 采用RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术,通过构建人糖皮质激素受体α(glucocorticoid receptor α, GRα)基因的特异性siRNA(small interfere RNA)真核表达载体,体外观察对GRα基因的沉默作用及生物学效应。方法 采用基因克隆技术,将合成的发卡样特异性GRα干扰寡核苷酸序列插入真核表达载体(pPUR/U6),构建GRα siRNA的表达载体,转染体外ECV-304细胞,48 h后观测胞内GRα蛋白水平(Western blot)及对LPS刺激后细胞因子产生的影响作用。结果 ①成功构建发卡样GRα siRNA真核表达载体(pPUR/U6-GRα siRNA);②pPUR/U6-GRα siRNA转染(脂质体法)ECV-304细胞,48 h后明显下调胞内GRα蛋白水平;③转染pPUR/U6-GRα siRNA的细胞,在LPS刺激后,其TNF-α、IL-1β的表达释放显著高于空载体对照组。结论 该RNA干扰真核表达载体能明显干扰GRα蛋白的表达、释放,结果促进了LPS刺激后炎性细胞因子的表达释放。进一步说明严重创伤所引起的糖皮质激素受体下调是机体应激紊乱的重要原因。

关键词:糖皮质激素受体α亚基;RNA干扰;肿瘤坏死因子-α亚型;白细胞介素-1β亚型
中图法分类号:R392.11;R394-33;R394.3 文献标识码:A

Inhibition of glucocorticoid receptor α using hairpin siRNA expression vector *in vitro*

WANG Ming-hai, SU Yong-ping, CHENG Tian-min, WANG Feng-chao, LU Jian-hua, LIU Xiao-hong, LI Hong-tao (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the silence effect and biological effects of glucocorticoid receptor α (GRα) on LPS-induced cytokine expression by designing a hairpin GRα siRNA expression vector (pPUR/U6-GRα siRNA). Methods The pPUR/U6-GRα siRNA expression vector was constructed by gene recombination, and then transferred to the cultured ECV-304 cells. At 48 h after culture, the whole cell protein was extracted and detected by Western blotting using rabbit-anti-human GRα polyclonal antibody. The cells were stimulated with LPS at 48 h after pPUR/U6-GRα siRNA transference. The TNF-α and IL-1β productions in the supernatants were detected by ELISA. Results The pPUR/U6-GRα siRNA expression vector was successfully constructed. Western blot analysis demonstrated that siRNA against GRα reduced the expression of this protein at 48 h after pPUR/U6-GRα siRNA transference, but the productions of TNF-α and IL-1β in the supernatants were enhanced when the cells were stimulated with LPS. Conclusion The pPUR/U6-GRα siRNA expression vector can reduce the expression of GRα protein and enhance the productions of TNF-α and IL-1β after LPS stimulation, which would be harmful to tissue repair after trauma.

Key words: glucocorticoid receptor α; RNA interference; TNF-α; IL-1β

严重创伤早期全身性损害的一个重要原因是应激过度导致损伤性炎症介质(TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8等)的失控性表达、释放[1]。我们前期的研究发现,GR在严重创伤后明显下调,而损伤性炎性介质水平明显升高,而且炎性细胞因子能进一步下调GR的水平[2,3]。提示GR的下调可能是严重创伤应激紊乱的重要原因之一。为此,本研究应用目前最有效的基因沉默技术—RNA干扰(RNA interference, RNAi)[3],通过构建GRα基因的发卡样siRNA真核表达载体体外转染,观测对GRα基因的沉默作用及对LPS刺激的应答性,进一步探讨GR在严重创伤早期全身性损害中的作用的分子机制,阐明GRα在严重创伤后应激紊乱中的重要作用,为临床调控严重创伤应激紊乱提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 真核表达载体

pPUR/U6,美国新墨西哥大学医学院分子遗传与微生物学(Department of Genetics & Microbiology, University of New Mexico

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054200) Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G1999054200)
作者简介:王明海(1964-),男,四川省宜宾市人,博士,主治医师,主要从事严重创伤应激与组织修复方面的研究。电话:(023)68752355
通信作者:粟永萍,电话:(023)68752009, E-mail:Suyping@yahoo.com
收稿日期:2003-10-23;修回日期:2003-12-26

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

School of Medicine)沈智远博士惠赠，工具酶由 Boehriger Mannheim 公司购进。

1.2 发卡样GRα基因siRNA设计及GRα siRNA的构建

根据Genbank提供的GRα基因cDNA序列，通过基因Blast，挑选长为21个碱基的特异性寡核苷酸序列(5′-GGA TAA GAC CAT GAG TAT TGA-3′)，按表1合成其发卡样两端配对siRNA寡核苷酸链(Forward，F)，中间由9个碱基(TTC AAG AGA)构成发卡的环(loop)，环中有3个碱基错配，另外还有个A没有配对的碱基，构成环的顶端；同时合成与上链互补的下链(Reverse，R)，分别在5′和3′端引入*Apa*Ⅰ和*Eco*RⅠ酶切位点。将上下链经过变性、复性后形成双链GRα siRNA。采用DNA重组技术，依据切图谱设计，按DNA连接试剂盒说明书进行操作，将GRα siRNA双链定向亚克隆入U6启动子指导的真核表达载体pPUR/U6。转化连接子，37 ℃培养过夜，长出的单个菌落为转化菌菌落。挑单菌落种于10 ml LB(含170 μg/ml氯霉素)中，37 ℃摇菌过夜。收集细菌，按说明书操作小量快速抽提质粒DNA，1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测结果。再测序鉴定，阳性克隆命名为pPUR/U6-GRα siRNA。

表1 GRα特异性发卡样寡核苷酸序列

Tab 1 Hairpin oligonucleotide sequence of Grα

Sequence	Sequence name	Length
5′-GGA TAA GAC CAT GAG TAT TGA TTC AAG AGA TCA ATA CTC ATG GTC TTA TCC TTTTT-3′	GR3C1F2355	57
5′-AAT TAA AAA ATC CTT TCA GGA GAT GAA GAC TTC TCT TGA AAG TCT TCA TCT CCT GAA AGG CC-3′	GR3C1R2375	65

上链(F)所形成的发卡样结构：

```
5′-G G A T A A G A C C A T G A G T A T T G A T T C A
   | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |   A
3′-TTT TTT T C G C C T C A A C G T C T G C G G T C A G A G
```

1.3 pPUR/U6-GRα siRNA干扰效率研究

ECV-304细胞常规培养于含10%小牛血清的1640培养基，稳定传代后用于本实验。80%融合的ECV-304细胞，分别转染5 μg pPUR/U6、pPUR/U6-GRα siRNA(DOTAP法)，同时设未转染对照。13 h，换含1 μg/ml嘌林霉素、10%小牛血清的1640培养基。培养48 h后，收集细胞，加细胞裂解液(Pierce公司)，提取细胞全蛋白。取50 μg细胞全蛋白，10% SDS-PAGE电泳，转PVDF膜，1∶500兔抗人GRα单抗，Western blotting检测胞内GRα的蛋白水平。

1.4 pPUR/U6-p65 siRNA干扰后细胞的生物学行为变化

ECV-304细胞转染5 μg pPUR/U6-p65 siRNA质粒，方法同上；空载体作对照组。转染48 h后，用LPS(10 μg/ml)刺激细胞，收集不同时相的细胞培养上清，ELISA检测TNF-α、IL-1β的表达释放。

1.5 统计学分析

应用SPSS10.0统计软件进行方差分析及均数间多重比较。

2 结果

2.1 pPUR/U6-p65 siRNA表达载体的构建

2.1.1 本研究根据Genbank提供的GRα基因cDNA序列，设计合成的发卡样GRα siRNA，采用DNA重组技术，将互补的双链GRα siRNA定向亚克隆入pPUR/U6真核表达载体，转化连接子，获得5个克隆的pPUR/U6GRα siRNA真核表达质粒(图1)。



M: Marker; 1, 5, 7: Negative clones; 2, 3, 4, 6, 8: Positive clones

图1 pPUR/U6GRα siRNA质粒电泳结果

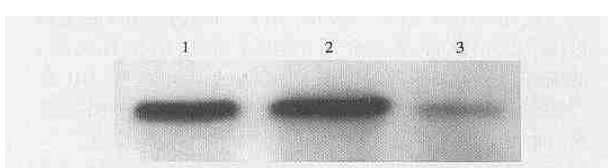
Fig 1 Electrophoretic result of pPUR/U6GRα siRNA

2.1.2 pPUR/U6p65 siRNA质粒的鉴定 取pPUR/U6p65 siRNA克隆2质粒菌种送上海申友测序鉴定，结果，插入的发卡样序列完全正确。测序结果如下：加框部分为本研究所插入的GR RNAi序列。

GGTTAATTTGCATATAATATTTCCTAGTAACTATAGAGGCTTAA
TGTGCGATAAAAGACAGATAATCTGTTCTTTTTAATACTAGCTACATT
TTACATGATAGGCTTGGATTTCTATAAGAGATACAAATACTAAATTA
TTATTTTAAAAAACAGCACAAAAGGAAACTCACCCTAACTGTAAAG
TAATTGTGTGTTTTGAGACTATAAATATCCCTTGGAGAAAAGCCTTGT
TTGGGCC GGATAAGACCATGAG TATTGATTCAAGAGATCAATACTCA
TGGTCTTATCCTTTT TTAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATA
CGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGAC
GTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTT
TATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAA
CCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAAGT
ATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGC
CTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGC
TGAAGATCAGTTGGGTGCACCAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTC

2.2 pPUR/U6-GRα siRNA干扰效率实验

2.2.1 ECV-304细胞GRα蛋白水平表达 pPUR/U6-GRα siRNA转染ECV-304细胞后48 h，Western blot检测胞内GRα蛋白水平。结果，与未转染组(Control)和转染空载体组(pPUR/U6)相比，干扰组(pPUR/U6-GRα siRNA)GRα蛋白明显下调(70%～80%)，见图2。



1: Control; 2: pPUR/U6 empty vector transfection group; 3: pPUR/U6-GRα siRNA tranfection group

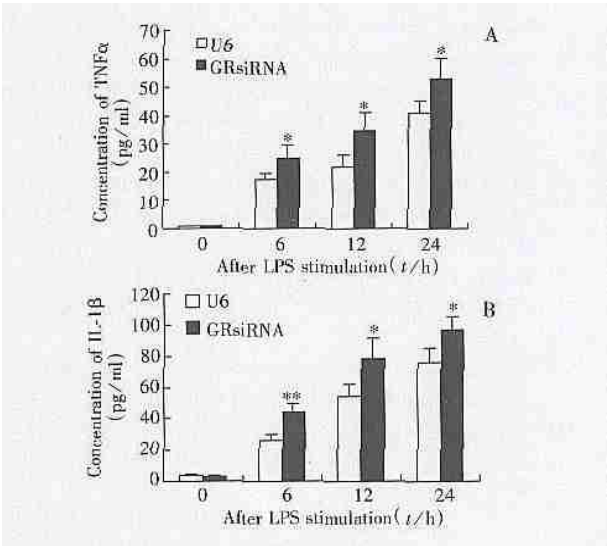
图2 ECV-304细胞胞内GRα蛋白变化(Western blot)

Fig 2 The variation of GRα expression in ECV-304 cells

2.2.2 ECV-304细胞培养上清TNF-α、IL-1β的表达释放 LPS刺激体外培养ECV-304，收集不同时相细胞培养上清，

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

ELISA 检测 TNF-α、IL-1β 的表达释放。结果, pPUR/U6-GRα siRNA 干扰组其 TNF-α、IL-1β 均显著高于空载体对照(图 3)。



The productions of TNF-α and IL-1β in the supernatant were determined by ELISA; $F_{TNF-\alpha}=13.42$, $P<0.01$; $F_{IL-1\beta}=9.68$, $P<0.01$; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* U6

图 3　ECV-304 细胞 LPS 刺激前、后培养上清 TNF-α、IL-1β 的释放

Fig 3　Expressions of TNF-α (A) and IL-1β (B) in the ECV-304 cells after LPS (10 μg/ml) stimulation

3　讨论

3.1　糖皮质激素受体(GR)在严重创伤应激反应中的重要意义

糖皮质激素(glucocorticoid, GC)效应是机体最为重要的应激反应之一, 对炎症反应起着一定的调控作用, 可防止炎症反应过度和继发性全身损害。研究证实, GC 效应发挥的关键环节是通过糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)来发挥的。GR 是激素核受体家族的一个主要成员, 同时也是一种重要的核转录调控因子, 文献报道, 其抗炎作用机制可能是: ①它可以直接调控多种基因的转录激活和抑制, 从而抑制过度的炎症反应[4]; ②也可以与 NF-κB 等核转录因子发生蛋白-蛋白交互抑制作用而间接抑制炎性细胞因子的生成与释放[5]; ③还可通过促进 I-κBα(α inhabitor of NF-κB)基因的转录, 间接抑制 NF-κB 的活化, 从而抑制炎性细胞因子的表达、释放[6]。人糖皮质激素受体(hGR)有两个亚型: hGRα 和 hGRβ, 分别由 hGRα 和 hGRβ 基因表达、调控。hGRα 和 hGRβ 基因全长 cDNA 序列已克隆, 其区别仅在于第 9 外显子不同。研究表明, 在 GC 效应中发挥作用的是 hGRα, 而 hGRβ 却抑制 hGRα 的作用[7]。故 hGRα 又称功能型 GR, hGRβ 称为拮抗型 GR。文献报道, hGRα 表达质粒体外转染培养细胞, 能抑制炎症介质介导的核转录因子 NF-kB、AP-1 的过度活化及炎症介质级联放大[7]。我们既往的研究证实, 严重创伤后出现高 GC 血症、高炎症介质血症, 而 GR 的表达及功能却显著低下, 其结果可能是导致应激紊乱, 最终导致脓毒血症、多器官功能衰竭(MOF)等严重后果的重要原因。为进一步深化研究 GR 的功能, 本研究采用最新的基因沉默技术, 观测 GR 基因沉默后细胞的生物学行为变化, 进一步明确 GR 在严重创伤应激中的重要作用, 为临床调控应激紊乱提供理论依据。

3.2　GRα siRNA 的 RNA 干扰效率及效应

RNA 干扰是双链 RNA 分子在 mRNA 水平关闭相应序列基因表达或使其沉默的过程[8,9]。近年来, RNA 干扰技术广泛用于基因功能研究, 成为研究热点。Song 等[10] 通过尾静脉注射合成的小鼠 Fas 基因的特异性 siRNA 片段, 特异性地沉默小鼠肝细胞 Fas 蛋白的表达。Takaesu 等[11] 通过构建 IKK 激酶的发卡样 siRNA 真核表达载体, 体外转染后, 特异性抑制 IKK 激酶的表达, 从而减少了胞内 IκB 蛋白的降解, 进而抑制 NF-κB 的活化。提示 RNA 干扰技术是研究基因表达及蛋白功能的有效方法。本研究通过基因 Blast, 设计合成 GRα 基因的特异性发卡样双链 siRNA 短片段, 再将变性、复性后的 siRNA 短片段插入 U6 启动子指导的真核表达载体(pPUR/U6), 构建 NF-κB GRα siRNA 真核表达载体(pPUR/U6-GRα siRNA), 获得 5 个阳性克隆, 取克隆 2 测序鉴定, 结果所插入的片段正确无误。从理论上讲, 该表达载体转染进入细胞后, 在胞内自身的 RNA 聚合酶 III(RNA polymerase III, pol III)的作用[9], 自动释放出双链 GRα siRNA 短片段, 进而干预 GRαmRNA 的转录, 下调 GRα 蛋白的表达。本研究结果显示, 该表达载体转染内皮细胞后 48 h, 转染组胞内 GRα 蛋白水平明显低于正常对照和空载体 pPUR/U6 转染对照, 证明该 RNA 干扰效率较高, 可以用于 GR 的功能研究。进一步的研究还表明, pPUR/U6-GRα siRNA 转染细胞, 在 LPS 刺激后, 培养上清 TNF-α、IL-1β 的表达释放明显高于空载体转染组。结合前期的研究[2,3], 本研究结果再次证实, 细胞内的 GR 下调, 可能是炎性介质产生的重要原因之一。

综上所述, 严重创伤应激状态下, GR 的显著下调与炎性细胞因子的过度表达释放密切相关, 两者互为因果。GR 的显著下调促进炎性细胞因子的表达释放, 而产生的炎性细胞因子又进一步加剧 GR 的下调。因此, 在严重创伤应激反应中, 如果能有效抑制 GR 的下调, 或者增强 GR 的生理功能, 将有利于维持机体的内稳态, 促进创伤组织的修复。目前我们正在探索抑制严重创伤后 GR 下调或者增强 GR 功能的策略, 已经取

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

得初步结果。

参考文献：

[1] Caller M P, Kamei T, Mangino M J, *et al*. Organ interactions in sepsis Host defense and the hepatic-pulmonary macrophage axis[J]. Arch Surg, 1991, 126(1): 28－32.

[2] 王军平, 粟永萍, 赵景宏, 等. TNF-α 和 IL-1 对大鼠肝细胞糖皮质激素受体表达及功能的影响[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(5): 585－587.

[3] 王军平, 粟永萍, 赵景宏, 等. 严重烫伤大鼠肝组织核蛋白中糖皮质激素受体表达的变化及地塞米松对其的影响[J]. 中华创伤杂志, 2002, 18(4): 210－213.

[4] Liu D, Diorio J, Tannenbaum B *et al*. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress [J]. Science, 1997, 277(5332): 1659－1662.

[5] Scheinman R I, Cogswell P C, Lofquist A K, *et al*. Role of transcriptional activation of IκBα in mediation of immunosuppression by glucocorticoids[J]. Science, 1995, 270(5234): 283－286.

[6] De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors[J]. J Neuroimmunol, 2000, 109(1): 16－22.

[7] Webster J C, Oakley R H, Jewell C M, *et al*. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative βisoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(12): 6865－6870.

[8] Leirdal M, Sioud M. Gene silencing in mammalian cells by preformed small RNA duplexes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 295(3): 744－748.

[9] 王明海, 王锋超, 陆建华, 等. 发卡样 NF-κB 特异性 RNA 干扰表达载体的构建及体外效应研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(8): 655－657.

[10] Song E, Lee S K, Wang J, *et al*. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis[J]. Nat Med, 2003, 9(3): 347－351.

[11] Takaesu G, Surabhi R M, Park K J, *et al*. TAK1 is critical for I kappa B kinase-mediated activation of the NF-kappaB pathway[J]. J Mol Biol, 2003, 326(1): 105－115.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)20-1798-01

原发性闭角型青光眼合并青睫综合征 1 例

A case report of primary angle closure glaucoma accompanied by glaucomatocyclitic crisis

赵长霖, 谢汉平 （第三军医大学西南医院全军眼科中心, 重庆 400038）

青光眼-睫状体炎综合征(glaucomatocyclitic crisis)首先由 Posner-Schlossmann 于 1948 年提出, 故又名 Posner-Schlossmann 综合征(简称青睫综合征), 属继发性开角型青光眼, 临床常见。本病可同时合并双眼原发性开角型青光眼(POAG), 而合并原发性闭角型青光眼(PACG)的病例, 国内外文献仅见 1 篇报道[1]。我们遇到 1 例右眼青睫综合征合并双眼原发性慢性闭角型青光眼的病人, 现报告如下。

男性, 77 岁, 因右眼胀痛、视物模糊 1 d 于 2004 年 2 月 13 日入院。患者 2001 年 11 月体检时发现双眼原发性慢性闭角型青光眼, 及时行双眼 Nd: YAG 激光周边虹膜切除术。此后滴 0.5%的噻吗心安眼液, 2 次/d, 双眼眼压控制在 16～20 mmHg 之间。2002 年 8 月、2003 年 7 月两次发作右眼眼压升高, 伴羊脂状 KP, 持续约 2 周, 用激素类眼液和降眼压药物后缓解。入院前 1 d 劳累后感右眼胀痛。入院查体: 矫正视力右 0.6(－5.5DS), 左 0.8(－6.5DS)。右眼结膜轻度充血, 角膜轻度水肿, 可见 4 个细小 KP, 前房轴深 2.5CT, 周边 1/3 CT, Tyndall(＋), 虹膜无膨隆, 瞳孔正圆, 直径约 3 mm, 对光反应灵敏。视乳头色泽淡红, C/D=0.4。左眼周边前房深度约 1/3 CT。眼压右眼 48 mmHg, 左眼 18 mmHg。房角镜检查: 动态下右眼鼻侧象限窄Ⅰ, 上、下、颞侧窄Ⅱ, 颞侧象限周边虹膜锥状粘连; 左眼鼻侧、下方象限窄Ⅰ, 上方、颞侧窄Ⅱ。自动视野计检查双侧视野大致正常; 视觉诱发电位(P-VEP)双眼 P100 波潜时稍延长, 幅值正常; 光学相干断层成像(OCT)显示双眼上方视乳头神经纤维层厚度变薄。给予 0.5%的噻吗心安眼液点右眼, 2 次/日; 口服醋氮酰胺 0.25 g, 2 次/d; 静脉滴注 20%甘露醇 250 ml, 1 次/d。入院 3 d 后, 右眼角膜出现一灰白色羊脂状 KP, 眼压为 41 mmHg。考虑右眼慢性闭角型青光眼合并青睫综合征, 加用 0.1%的地塞米松眼液点右眼, 6 次/d。入院一星期后, 右眼眼压下降到 13～17 mmHg 之间, 停醋氮酰胺、甘露醇; 羊脂状 KP 逐渐缩小, 入院 10 d 后消失。出院诊断: ①右眼青光眼-睫状体炎综合征; ②双眼原发性慢性闭角型青光眼。

讨论

青睫综合征多发于青壮年, 常单眼反复发作, 偶有双眼者。典型临床特征是发作性眼压增高, 伴有轻度睫状体炎, 多有闭角型青光眼症状[2]。但前房不浅, 房角开放, 角膜上皮水肿, 有

（下转 1805 页）

作者简介: 赵长霖(1975－), 女, 安徽省安庆市人, 硕士研究生, 医师, 主要从事角膜病防治方面的研究。电话: (023)65986613, E-mail: zcl1975@sina.com

通信作者: 谢汉平, 电话: (023)68765377, E-mail: xiehanping@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2004-04-05; 修回日期: 2004-09-01

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