DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.08.001
第26卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 8
2004年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2004

文章编号:1000-5404(2004)08-0655-03

论著

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

王明海,王锋超,陆建华,麦 跃,刘晓宏,程天民,粟永萍 (第三军医大学预防医学系全军复合伤研究所、创伤烧伤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NF-κB p65基因的特异性siRNA真核表达载体,体外观察对NF-κB基因的沉默作用,以及对内毒素(LPS)刺激后NF-κB活性的调控作用。方法 采用基因克隆技术,将合成的发卡样特异性p65 RNA干扰寡核苷酸序列插入真核表达载体(pPUR/U6),构建p65 siRNA的表达载体,转染体外ECV-304细胞,48 h后观测胞内NF-κB p65亚单位蛋白水平(Western blotting)、及对LPS(10 μg/ml)刺激后NF-κB活化的抑制作用。结果 ①成功构建发卡样p65 siRNA(small interfere RNA)真核表达载体(pPUR/U6-p65 siRNA);②pPUR/U6-p65 siRNA转染(脂质体法)ECV-304细胞,48 h后明显下调胞内P65蛋白水平;③转染pPUR/U6-p65 siRNA的细胞,明显抑制LPS(10 μg/ml)刺激后NF-κB的活化。结论 该RNA干扰真核表达载体能明显干扰p65蛋白的表达、释放,进而抑制NF-κB的活化,可望进一步抑制细胞的过度炎症反应,减轻创伤组织的受损程度,促进创伤后组织的修复。

关键词:NF-κB;RNA干扰;ECV-304;LPS
中图法分类号:Q522;Q782;R392.1 文献标识码:A

Inhibition of NF-κB using hairpin siRNA expression vector *in vitro*

WANG Ming-hai, WANG Feng-chao, LU Jian-hua, MAI Yue, LIU Xiao-hong, CHENG Tian-min, SU Yong-ping (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To construct the small interfering RNA (siRNA) eukaryotic expression vector specific to human NF-κB p65 gene (pPUR/U6-p65siRNA) to observe its silencing effect on NF-κB and regulatory roles in LPS-induced activation of NF-κB *in vitro*. **Methods** The pPUR/U6-p65siRNA expression vector was constructed by gene recombination, then transfected into the cultured ECV-304 cells. At 48 h after transfection, the whole cell protein was extracted, and the protein level was detected by Western blotting with rabbit-anti-human NF-κB p65 polyclonal antibody. The cells were stimulated with LPS (10 μg/ml) at 48 h after transfection with pPUR/U6-p65siRNA transfection, then the nuclear proteins were extracted, and the NF-κB/DNA binding activity of nuclear proteins was detected by electrophoretic mobility shifty assay. **Results** pPUR/U6-p65siRNA expression vector was successfully constructed. DOTAP-mediated gene transfection of pPUR/U6-p65siRNA expression vector into ECV-304 cells down-regulated the protein level of p65 at 48 h after transfection. Cells transfected with pPUR/U6-p65 siRNA could obviously inhibit the activation of NF-κB stimulated by LPS (10 μg/ml). **Conclusion** The pPUR/U6-p65siRNA expression vector can inhibit the activation of NF-κB through intervention of the expression and release of P65 protein, which may modulate the inflammatory cytokine expression, and may be beneficial to tissue repair after trauma.

Key words: NF-κB; RNA interference; ECV-304; LPS

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炎症介质(TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8等)的失控性表达、释放[1]。大量的研究证实,NF-κB的过度活化是炎症介质产生的关键环节[2]。因此,抑制NF-κB的过度活化,可减少炎症介质的表达、释放,减轻严重创伤后组织器官的病理性损害,有利于创伤组织的修复。RNA干扰(RNA interference, RNAi)是目前最有效的基因沉默技术,能特异性抑制靶基因的转录,进而下调相应蛋白水平及功能[3]。本研究通过构建NF-κB p65基因的发卡样siRNA(small interfere RNA)真核表达载体,观测对p65基因的沉默作用及对NF-κB活性的调控抑制作用,探讨应用RNA干扰调控严重创伤后应激紊乱的可能性,探索促进创伤组织修复的新策略,为向临床过度奠定理论基础。

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

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
收稿日期:2003-10-23;修回日期:2004-02-24

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

沈智远博士惠赠，工具酶由 Boehriger Mannheim 公司购进。

1.2 发卡样 NF-κB p65 基因 siRNA 设计及 pPUR/U6-p65 siRNA 的构建

根据GenBank提供的 p65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′-TCC TTT CAG GAG ATG AAG ACT-3′)，合成其发卡样两端配对 siRNA 寡核苷酸链，同时合成互补链，分别在 5′和 3′端引入 *Apa* I 和 *Eco* R I 酶切位点。将上下链经过变性、复性后形成双链 p65 siRNA(表1)。采用 DNA 重组技术，将 p65 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，长出的单个单菌落为转化菌菌落。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。部分菌液送上海申友公司测序鉴定，阳性克隆命名为 pPUR/U6-p65 siRNA。

表 1 p65 特异性发卡样寡核苷酸序列

Tab 1 Hairpin oligonucleotide sequence of p65

Sequence	Sequence name	Length
5′-TCC TTT CAG GAG ATG AAG ACT TTC AAG AGA AGT TTT CAT CTG AAA GGA TTT TTT-3′	NF-κB p65F1576	57
5′-AAT TAA AAA ATC CTT TCA GGA GAT GAA GAC TTC TCT TGA AAG TCT TCA TCT CCT GAA AGG AGG CC-3′	NF-κB p65R1596	65

1.3 pPUR/U6-p65 siRNA 干扰效率研究

ECV-304 细胞常规培养于含 10%小牛血清的 1640 培养液，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-p65 siRNA(DOTAP 法)，同时设未转染对照。细胞转染 13 h，换含 1 μg/ml 嘌林霉素、10%小牛血清的 1640 培养液。转染 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 NF-κB p65 单抗，Western blotting 检测胞内 NF-κB 的蛋白水平。

1.4 pPUR/U6-p65 siRNA 干扰对 NF-κB 活化的影响

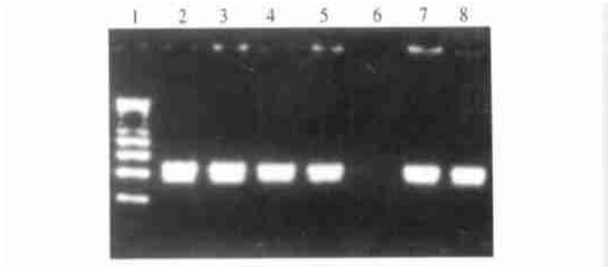
ECV-304 细胞分别转染 5 μg pPUR/U6、pPUR/U6-p65 siRNA 质粒，方法同上。转染 48 h 后，用 LPS(10 μg/ml)刺激细胞，收集不同时相的细胞，提取细胞核蛋白，凝胶电泳迁移率改变分析法(electrophoretic mobility shift assay，EMSA)检测 NF-κB/DNA 结合活性[4]，根据滞后带(NF-κB)的强弱判定 NF-κB 的活化程度。

2 结果

2.1 pPUR/U6-p65 siRNA 表达载体的构建

2.1.1 构建 pPUR/U6p65 siRNA 质粒 本研究依据根据 GenBank 提供的 p65 基因 cDNA 序列，设计合成的发卡样 p65 siRNA，采用 DNA 重组技术，将互补的双链 p65 siRNA 定向亚克隆入 pPUR/U6 真核表达载体，转化连接子，获得6个克隆的 pPUR/U6p65 siRNA 真核表达质粒(图1)。

2.1.2 pPUR/U6p65 siRNA 质粒的鉴定 取 pPUR/U6p65 siRNA 克隆1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。



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

图 1 pPUR/U6p65 siRNA 真核表达质粒阳性克隆

Fig 1 Positive clones of the pPUR/U6p65 siRNA eukaryotic expression vector plasmid

2.2 pPUR/U6-p65 siRNA 干扰效率实验

2.2.1 ECV-304 细胞 NF-κB 蛋白水平表达 pPUR/U6-p65 siRNA 转染 ECV-304 细胞后 48 h，Western blot 检测胞内 NF-κB 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-p65 siRNA)NF-κB P65 蛋白明显下调(70%)，见图2。

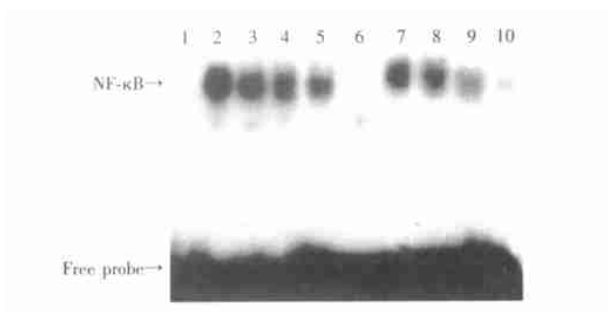


1: Control; 2: pPUR/U6 vector; 3: pPUR/U6-p65 siRNA

图 2 ECV-304 细胞胞内 NF-κB p65 蛋白变化(Western blotting)

Fig 2 Changes of NF-κB p65 protein expression in the cytoplasm of ECV-304 cells (Western blotting)

2.2.2 ECV-304 细胞 ECV-304 NF-κB 活性变化 LPS 刺激体外培养 ECV-304，收集不同时相细胞，提取胞核蛋白，EMSA 测定 NFκB/DNA 结合活性。结果干扰组(pPUR/U6-p65 siRNA)各时相点 NF-κB 的活性，明显相应时相点低于空载体转染对照组(pPUR/U6)(图3)。



1—5: The activation of NF-κB in the control groups at 0, 1, 3, 6, 12 h after stimulation by LPS; 6—10: The activation of NF-κB in pPUR/U6p65 siRNA transfected groups at 0, 1, 3, 6, 12 h after stimulation by LPS

图 3 ECV-304 细胞 LPS 攻击前后，胞核 NF-κB 活性变化(EMSA)

Fig 3 Changes of the activity of the NF-κB located in the nucleus of ECV-304 cells after stimulation by LPS (EMSA)

3 讨论

大量文献报道，严重创伤、感染后，过量炎症介质

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

(TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8 等因子)的产生是组织器官功能受损的重要原因, 严重影响创伤后组织器官的修复。研究证实, 炎症介质(TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8 等)的失控性表达、释放, 与核转录因子 Kappa B (nuclear factor kappa B, NF-κB)的活化和再活化密切相关[1~3]。NF-κB 的活化和反复活化在脓毒症炎性介质的失控性表达、释放中起关键作用, 是失控性炎性反应的中心环节, 被认为是一个新型抗炎靶点[4]。临床研究表明, 外周血单核细胞中 NF-κB 活性增高的患者, 其预后较差, 死亡率增高[5]。而抑制小鼠心脏 NF-κB 的激活, 可阻止心肌 TNF-α 的产生, 防止 LPS 诱发的心功能衰竭[2]。我们前期的研究发现, 提高细胞内 IκBα 的蛋白水平, 抑制 NF-κB 的过度活化, 能显著抑制炎症介质(IL-1、IL-6、TNF-α)的表达、释放[6]。NF-κB 与糖皮质激素受体之间存在交互抑制作用, NF-κB 活化后可导致糖皮质激素受体水平下降, 机体或细胞的抗炎能力随之下降; 提高胞内糖皮质激素受体水平, 又能显著抑制 NF-κB 的活化[7]。这些提示均抑制 NF-κB 的活化或者抑制其转录调控作用, 能有效抑制过量炎症介质的产生, 减轻严重创伤、或感染后组织细胞的受损程度, 促进组织器官的功能修复。

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[8~10], 它的特异性在于所挑选片段的特异性, 因为凡是与之配对的相关基因均受其干扰, 所以采用 RNA 干扰技术研究基因的功能, 所挑选的短链寡核苷酸片段必须是该基因所特有的, 基因 Blast 为我们提供挑选特异性片段的最佳平台。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(silence interfer RNA)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 蛋白的降减, 进而抑制 NF-κB 的活化。该研究是在 NF-κB 活化的上游阻断 NF-κB 的活化。

NF-κB 活化后调控相关基因表达的功能性亚单位是其二聚体中的 P65 蛋白, 因此抑制 p65 的功能, 有可能下调 NF-κB 的转录调控活性。为此本研究选择 p65 作为靶目标, 拟通过沉默其基因表达来抑制 NF-κB 的活性及转录调控作用。本研究挑选 21 个寡核苷酸序列(5′-TCC TTT CAG GAG ATG AAG ACT-3′)作为干扰片段, 此段序列位于整个 NF-κB p65 亚单位 mRNA 的 1659-1679 处, 编码的氨基酸为 LISGDE, 对应第 527-534 个氨基酸, 位于碳端, 蛋白质结构域分析显示其在转录因子保守结构域 RHD(rel homology domain, RHD), Ig-like plexin transcription factors 等之外, BLAST 分析与 NF-kappa-B 有 100%的同源性, 与其他 mRNA 序列相似性低, 最多有 16 个碱基一致, 显示该序列具有良好特异性。发卡样双链 RNA 干扰表达载体的特点是, 转染入细胞后, 在胞内自身的 RNA 聚合酶 III(RNA polymerase III, pol III)的作用下, 自动释放出双链靶序列的 siRNA 短片段, 干预相关 mRNA 的转录, 下调相应蛋白的表达。本研究设计合成 p65 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 p65siRNA 真核表达载体(pPUR/U6-p65 siRNA), 获得 6 个阳性克隆, 取克隆 1 测序鉴定, 所插入的片段正确无误。该表达载体转染进入体外培养的内皮细胞后, 结果显示, 能显著抑制胞内 p65 蛋白水平(与正常对照和空载体 pPUR/U6 转染对照)。pPUR/U6-p65 siRNA 转染组细胞, 能显著抑制 LPS 刺激后胞核内 NF-κB/DNA 的结合活性(与空载体转染组相比)。本研究结果提示, p65 RNA 干扰后, 可下调胞内 p65 的蛋白水平, 进而抑制 NF-κB 的过度活化。我们前期的研究实验证实, 抑制 NF-κB 的活化, 能明显下调炎性细胞因子的产生[4]。而内皮细胞是体内炎性反应中重要的效应细胞, 抑制其过度的炎性反应, 减轻炎性细胞因子的对组织、器官的损伤作用, 将有利于创伤组织的修复。

参考文献:

[1] 盛志勇, 姚咏明. 我国创伤脓毒症基础研究新进展[J]. 中华创伤杂志, 2003, 19(1): 9-12.

[2] 潘曙明, 陈德昌, 杨兴易. 核因子-κB 研究与脓毒症[J]. 中华急诊医学杂志, 2002, 11(1): 62-63.

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

[4] Yamamoto Y, Gaynor R B. Therapeutic potential of inhibition of the pathway in the treament of inflammation and cancer[J]. J Clin Invest, 2001, 107(2): 135-141.

[5] Hubert B, Feng G, Thomas K D, *et al*. Role of NF-κB in mortality of sepsis[J]. Clin Invest, 1997, 100(5): 972-985.

[6] 王明海, 太光平, 张雅萍, 等. 腺病毒介导 IκBα 基因在体外培养的 U937 细胞中的表达及效应研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(1): 1386-1389.

[7] 王明海, 粟永萍, 程天民, 等. 糖皮质激素受体α基因转染在创伤组织修复过程中的意义[J]. 中国临床康复, 2003, 7(29): 3930-3931.

[8] Bondeson J, Browne K A, Brennan F M, *et al*. Selective regulation of cytokine induction by adenoviral gene tranfer of IκBα into human macrophages L: Lipopolysaccharide-induced, but not zymosan-induced, proinflammatory cytokines are inhibited, but IL-10 is nuclear factor-κB independent[J]. J Immunol, 1999, 162(10): 2939-2945.

[9] Wrighton C J, Hofer-Warbinek R, Moll T, *et al*. Inhibition of endothelial cell activation by adenovirus-mediated expression of IκBα, an inhibitor of the transcription factor NF-κB[J]. J Exp Med, 1996, 183(9): 1013-1022.

[10] Song E, Kyung Jee S, 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 IkappaB kinase-mediated activation of the NF-kappaB pathway[J]. J Mol Biol, 2003, 326(1): 105-115.

(编辑　张大春)

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