

# TGFβ1shRNA 对 293 细胞合成 TGFβ1 的干扰作用

柳国胜, 王志军, 文妍, 罗瑶, 刘海英

(暨南大学附属第一医院 儿科, 广东 广州 510630)

[摘要] 目的: 探讨自行设计的 TGFβ1shRNA 对 293 细胞 TGFβ1 基因表达的干扰作用, 为研究纤维化病变的基因治疗方法提供技术基础和依据。方法: 针对大鼠 TGFβ1 基因 mRNA 序列, 设计、合成携带 3 条 TGFβ1shRNA 和 TGFβ1 基因的绿色荧光蛋白融合表达质粒载体, 并设阴性质粒组和空质粒组为对照, 通过脂质体包裹分别转染 293 细胞。转染后 24、48 和 72 h 收集细胞, 在荧光显微镜下观察干扰效果, 采用荧光定量 PCR 检测 TGFβ1 基因表达情况, 并计算干扰效率。结果: 荧光显微镜下观察, 可见转染后 24、48 和 72 h TGFβ1shRNA 质粒组细胞绿色荧光强度均明显弱于阴性质粒组细胞, 空质粒载体组未产生绿色荧光; 荧光定量 PCR 检测转染后 293 细胞 TGFβ1mRNA 表达量, 转染后 24、48 和 72 h TGFβ1shRNA 质粒组 TGFβ1mRNA 表达量均显著低于阴性质粒组 ( $P < 0.01$ ), 其基因干扰效率则依次递减, 分别为 97.2%、97.1% 和 67.7%。结论: 本研究证明自行设计的 TGFβ1shRNA 转染 293 细胞后 24、48 和 72 h TGFβ1shRNA 均能够高效干扰 TGFβ1 基因的表达, 其基因干扰效率呈现一定的时间依赖性。

[关键词] 转化生长因子 β1; RNA 干扰; 293 细胞

[中图分类号] R587.1; R322.1 [文献标识码] A [文章编号] 1000-9965(2009)04-0420-05

## The interference effect of TGFβ1 short hairpin RNA on the expression of TGFβ1 in 293 cells

LIU Guo-sheng, WANG Zhi-jun, WEN Yan, LUO Yao, LIU Hai-ying

(Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510630, China)

[Abstract] Aim: The effects of RNA interference on TGFβ1 gene in 293 cells through TGFβ1shRNAs designed by my own were investigated in order to provide the foundation and evidence of a potential siRNA therapy of fibrotic diseases. Methods: Three 21-nucleotides shRNA targeting the TGFβ1 mRNA sequence were designed by myself. Then to construct the green fluorescence plasmid DNA of expressing TGFβ1 shRNA and TGFβ1 fusion genes and identified it. To determine the effect of these shRNAs, the positive plasmid vectors of TGFβ1 were transfected into 293 cells with the aid of lipofectamin, besides using negative and empty vectors were treated as above as controls. After 24, 48 and 72 hours, the preliminary effect was evaluated with green fluorescence microscope, and then fluorescent quantitation PCR was used to detect the expression of TGFβ1 gene at mRNA level. Moreover, calculating the efficiency of RNA interference. Results: Observing 293 cells by the green fluorescence microscope. Fluorescence intensity decreased in the TGFβ1 shRNA plasmid groups compared with the negative plasmid groups at 24, 48 and 72 hours after transfection. Fluorescence was not observed in the null plasmid groups. Detecting the expression of TGFβ1 gene at mRNA level with fluorescent quantitation PCR. the TGFβ1 gene expression

[收稿日期] 2009-03-13

[基金项目] 广东省自然科学基金资助项目(07005966)

[作者简介] 柳国胜(1958-), 男, 教授, 博士, 研究方向: 新生儿学。

was highly knocking down in the groups of TGF $\beta$ 1 shRNA plasmid compared with groups of negative plasmid at 24, 48 and 72 hours after transfection ( $P < 0.01$ ), and their efficiency of RNA interference reduced by degree following times, were 97.2%, 97.1% and 67.7% respectively. **Conclusion:** the results suggested that the TGF $\beta$ 1 shRNAs designed by my own can interfere the expression of TGF $\beta$ 1 gene efficiently at 24, 48 and 72 hours after transfection and the efficiency of RNA interference reduced by degree following times.

[**Key words**] transforming growth factor beta 1; RNA interference; 293cell

纤维化是细胞外基质异常沉积引起的一种病理改变,各种原因导致成纤维细胞合成胶原蛋白、纤维连接蛋白、蛋白多糖和层粘连蛋白等细胞外基质(ECM)增加;或者基质降解酶减少以及基质降解酶抑制物增加均能导致基质含量增加,产生纤维化的改变。转化生长因子 $\beta$ 1(transforming growth factor beta 1, TGF $\beta$ 1)是一种多效性的细胞因子,能促使细胞外基质的过度增加和聚积,被认为是临床疾病纤维化过程中的中心环节。RNA干扰(RNA interference, RNAi)是最新发现的一种基因阻断技术,长双链RNA(double strand RNA, dsRNA)被体内Dicer酶切成约19~22nt的小片段干扰RNA(small interfering RNA, siRNA),siRNA激活沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)降解具有同源序列的mRNA,最终导致特异性的基因表达沉默<sup>[1-2]</sup>。RNA干扰具有高度特异性和高效性,且简单易行,容易开展,迅速成为近年来研究基因功能的一种主要方法。本研究拟采用自行设计的TGF $\beta$ 1shRNA,观察其在细胞水平对TGF $\beta$ 1合成的抑制作用,为后期探讨TGF $\beta$ 1导致纤维化病变的机制打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

相关短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)质粒载体、空质粒载体及大肠杆菌*E. coli* DH5 $\alpha$ 由武汉晶赛生物工程公司合成,合成成功后送交Invitrogen公司测序鉴定;人胚肾293细胞由暨南大学生物工程研究所冻存;MEM培养液为Gibco公司产品;新生牛血清为Corning公司产品;离心柱型无内毒素质粒提取试剂盒、Thermoscript RT试剂盒、TRNzol试剂及脂质体lipofectamine 2000为Invitrogen公司产品;SYBR Green 荧光定量PCR试剂盒为Toyobo公司产品。

### 1.2 方法

(1)TGF $\beta$ 1shRNA的设计、合成及鉴定 首先登陆NCBI数据库搜寻大鼠TGF $\beta$ 1基因的mRNA序列,再利用Ambion公司软件设计针对靶序列的shRNA,筛选出3条序列为WY1(5'-AACCAAG-GAGACGGAATACAG-3')、WY2(5'-AAAGGGCT-CAACACCTGCACA-3')和WY3(5'-AAGGGCTAC-CATGCCAACTTC-3'),最后登陆NCBI网站进行Blast同源序列分析,以保证shRNA干扰片段的高度特异性。本研究所需的shRNA载体设计如下:使用pGenesil-1质粒载体(内含编码绿色荧光蛋白GFP序列和U6启动子),融合表达自行设计筛选的3条shRNA序列WY-1、2、3和大鼠TGF $\beta$ 1基因序列。相关TGF $\beta$ 1shRNA质粒表达载体送交武汉晶赛生物工程有限公司合成构建,并构建相应的阴性质粒(其编码的shRNA为错配序列,不会产生基因干扰效应)和空质粒(图1-2),均转化入相应的大肠杆菌*E. coli* DH5 $\alpha$ 以供保存和扩增,于构建成功后送交Invitrogen公司测序鉴定。

(2)细胞培养 人胚肾293细胞于含体积分数为10%新生牛血清的MEM培养液中贴壁生长,于转染前日接种于6孔板用无抗生素的MEM培养基培养,待板孔中细胞密度达到85%~90%后开始进行转染。

(3)质粒抽提 利用Invitrogen公司的离心柱型无内毒素质粒提取试剂盒,按产品操作说明抽提TGF $\beta$ 1shRNA质粒、阴性质粒和空质粒。

(4)转染shRNA至293细胞 转染分成TGF $\beta$ 1shRNA质粒组、阴性质粒组和空质粒组3个大组,每个大组按收集细胞时间不同(转染后24、48、72h)又分为3个亚组,故共分为9个组,每组收集6孔细胞;转染过程按lipofectamine2000产品说明操作,转染混合液用量为lipofectamine2000 8  $\mu$ L/孔、

相应质粒 4  $\mu\text{g}$ /孔、无血清无抗生素 MEM 培养液 500  $\mu\text{L}$ /孔;加样完毕后 37  $^{\circ}\text{C}$  处理 5 h,然后洗去脂质体,加入完全培养基继续培养。

(5) 荧光显微镜观察干扰效果 转染后 24、48 和 72 h 取出培养箱中的各组细胞,置于荧光显微镜下观察各组细胞 TGF $\beta$ 1 基因干扰效果。

(6) 荧光定量 PCR 法检测 TGF $\beta$ 1 基因在 293 细胞中的表达水平 ①总 RNA 的提取。用 TRNzol 试剂提取细胞总 RNA,并用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测其浓度、纯度和完整性。②引物的设计和合成。大鼠 TGF $\beta$ 1 及  $\beta$ -actin 的基因序列通过 GenBank 获得,引物设计结合参考文献和 Primer Premier 4 软件设计,具体基因序列为:TGF $\beta$ 1 上游引物 5'-AGGCGG TGCTCGCTTTGT-3',下游引物 5'-TCCCGAATG TCTGACGTATTGA-3'; $\beta$ -actin 上游引物:5' -CCATCGTCCACCGCAAAT-3',下游引物:5' -GCTCGCTCCAACCGACT-3'。引物合成交由上海生物工程技术有限公司。③荧光定量聚合酶链反应(RT-QT-PCR)。按逆转录试剂盒说明书方法,逆转录合成第一条 cDNA,再以此 cDNA 为模板进行 PCR 反应。反应体系:Master buffer 12.5  $\mu\text{L}$  (Master buffer 成分为 SYBR Green I、Taq 酶、dNTP、参比荧光 Passive Reference 1 和定量 PCR buffer)、 $\beta$ -actin 引物或 TGF $\beta$ 1 引物 1  $\mu\text{L}$ 、RNase-free water 15.5  $\mu\text{L}$ 、cDNA 1  $\mu\text{L}$ 。在 ABI 7500 定量 PCR 仪上按以下参数 PCR 扩增:预变性 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min,变性 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s,退火 56  $^{\circ}\text{C}$  30 s,延伸 68  $^{\circ}\text{C}$  30 s,共 30 个循环。每个样品做 2 个复孔,并重复 3 次荧光定量 PCR 的检测,结果取 3 次平均值。本实验采用相对定量  $\Delta\Delta\text{CT}$  法,荧光强度增加到可被检测出时所需要的 PCR 循环次数即为循环阈值 CT,再根据公式相对含量 =  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  得出实验结果。

(7) 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计软件处理实验相关数据,数值以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差别采用  $t$  检验,组内差别采用单因素方差分析,显著性检验水准取双侧  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 TGF $\beta$ 1shRNA 质粒和阴性质粒图谱

图 1 和图 2 分别是 TGF $\beta$ 1shRNA 质粒和阴性质粒图谱。

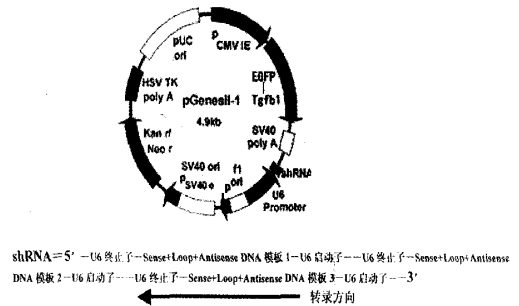


图 1 TGF $\beta$ 1shRNA 质粒图谱

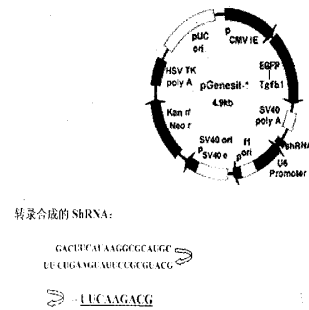


图 2 阴性质粒图谱

### 2.2 荧光显微镜观察质粒转染后 TGF $\beta$ 1 基因干扰效果

TGF $\beta$ 1shRNA 质粒、阴性质粒和空质粒分别转染 293 细胞,于转染后 24、48 和 72 h 在荧光显微镜下观察转染和干扰效率,如图 3 ~ 5。

TGF  $\beta$ 1 shRNA 质粒组

阴性质粒组

空质粒组

图 3 转染后 24 h 各组细胞 GFP 表达情况( $\times 100$ )

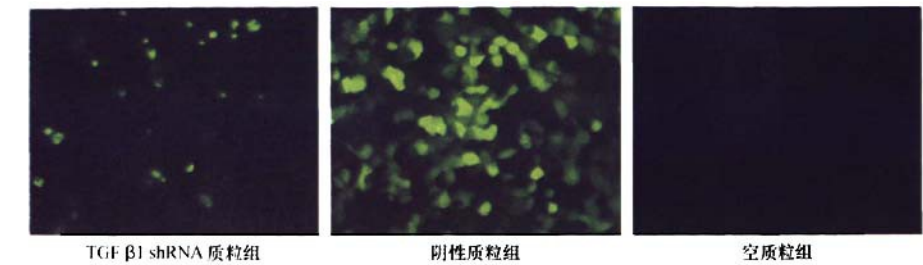


图 4 转染后 48 h 各组细胞 GFP 表达情况(×100)

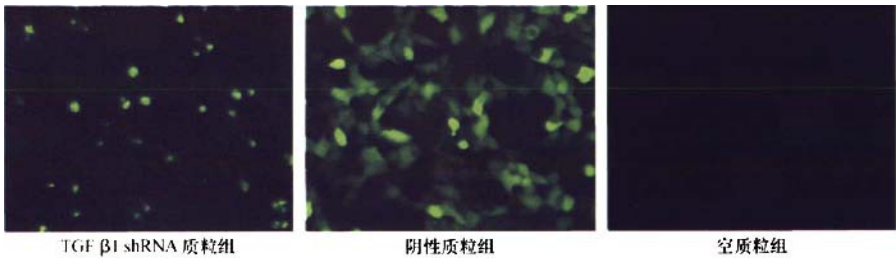


图 5 转染后 72 h 各组细胞 GFP 表达情况(×100)

从图中可以观察到,转染后 24、48 和 72 h 的 TGFβ1shRNA 质粒转染组荧光强度均明显弱于阴性质粒转染组,说明 TGFβ1shRNA 对 TGFβ1 基因产生了很强的 RNA 干扰效果,使得位于 TGFβ1 基因下游的绿色荧光蛋白 GFP 基因表达也随之下调,故可从 GFP 的表达强度初步检测到各组细胞 TGFβ1 基因的干扰效率。另外,还可发现 72 h 组的各组细胞荧光强度均较其他组为弱(图 5)。

2.3 荧光定量 PCR 法检测 TGFβ1 基因 mRNA 在 293 细胞中的表达

以 24 h 空质粒组 293 细胞为对照(阴性结果 CT 值设为 40),根据  $\Delta\Delta CT$  相对定量公式,可以计算出各组细胞 TGFβ1 基因 mRNA 表达相对含量,见表 1。

表 1 转染后不同时间各组细胞 TGFβ1mRNA ( $\bar{x} \pm s$ ) 表达水平

分组	TGFβ1mRNA 表达水平		
	24 h	48 h	72 h
空质粒组	1±0	1±0	1±0
TGFβ1shRNA 质粒组	1.20±0.05 <sup>1)2)</sup>	1.42±0.09 <sup>1)2)</sup>	1.78±0.07 <sup>1)2)</sup>
阴性质粒组	42.97±1.93 <sup>1)</sup>	49.34±2.74 <sup>1)</sup>	5.53±0.17 <sup>1)</sup>

1) 单因素方差分析,  $P < 0.05$ ; 2) 与同时时间阴性质粒组比较,  $P < 0.01$

从表 1 可以看到,各组 293 细胞 TGFβ1 基因 mRNA 在 TGFβ1shRNA 质粒转染后的表达量相对

于其在阴性质粒转染后的表达量均有明显下调。同时,根据表 1 数据和干扰效率 =  $(1 - X_{shRNA} / X_{untreat}) \times 100\%$ ,可以计算出转染后不同时间的干扰效率,转染后 24、48 及 72 h 基因干扰效率分别为 97.2%、97.1% 和 67.7%。

3 讨论

TGFβ1 是由多种细胞和组织产生的一类同源二聚体多肽分子,相对分子质量约  $25 \times 10^3$ ,是多功能细胞因子超家族成员之一,在调节正常生理过程如胚胎发生、细胞增殖和分化中起重要作用,过度表达时可参与体内纤维化和致癌作用。该因子是器官纤维化过程中的核心介质,是与纤维化发生、发展密切相关的生长因子,抑制其表达或生物活性可延缓器官纤维化进程<sup>[3]</sup>。但常规药物如干扰素、苏拉明等对其抑制效率不高,且安全性及给药途径等还有待于临床验证<sup>[4]</sup>。而 RNAi 技术的出现和成熟则为我们提供了一个新的有力工具和研究方向。

RNAi 是最新发现的一种基因阻断技术,其现象最早在研究牵牛花合成色素基因时被发现,当时称为“共抑制(cosuppression)”,是指通过转基因或病毒感染引起转录或转录后水平基因沉默。1998 年 Fire 等<sup>[5]</sup>首次将正义和反义链混合的双链 RNA 导入线虫体内,发现靶基因 mRNA 发生了序列特异性降解,且比单独注射正义或反义连引起基因沉默的

效率高得多。近年来该技术已被广泛应用于哺乳动物和人类基因的研究,冷泉港研究中心的 Lassus 等<sup>[6]</sup>研究证明 RNAi 技术作为一种实用工具诱导哺乳动物细胞内的基因表达沉默,使得许多以前无法运用传统的功能基因组学技术方法研究的机制和模型成为可能,开创了研究基因和蛋白质功能的新天地。国内外已有将此技术用于器官纤维化方面的研究,Toshihiro 等<sup>[7]</sup>用针对 TGF $\beta$  II 型受体的 siRNA 表达质粒和表达 TGF II 型受体的质粒共转染 293T 细胞,发现实验组细胞上清液中的 TGF II 型受体蛋白表达明显低于对照组。

关于 shRNA 的设计,本研究选择 mRNA 的编码序列作为 shRNA 作用的靶点。设定条件如下:① 30% < GC% < 50%;②无 TGF $\beta$ 1 突变位点存在;③与基因组其他编码序列无明显的同源性;④无 4 个以上连续的 AAAA 或 TTTT 重复,最终得到了符合上述条件的 3 条 shRNA 序列,并设立相应的阴性对照和空白对照,以排除转染过程中其他因素的影响。结果显示转染后 24、48 及 72 h TGF $\beta$ 1shRNA 质粒转染组的荧光强度均明显弱于阴性质粒转染组,而空质粒载体组未发现有荧光产生,说明各组质粒已成功转染入 293 细胞,并且 TGF $\beta$ 1shRNA 对 TGF $\beta$ 1 基因产生了高效的干扰作用。转染后 72 h 细胞荧光强度明显减弱,推测其原因可能是脂质体和 shRNA 本身对细胞存在一定的毒性而导致此时时间点的细胞部分死亡,死亡细胞裂解后其 RNA 酶逸出降解 TGF $\beta$ 1mRNA,使得 TGF $\beta$ 1 基因表达受限。此外,观察转染后不同时间的 RNA 干扰效率,可发现转染后 24 h 干扰效率最高,而转染后 48 h 干扰效率稍次,这说明转染后 24~48 h 是 shRNA 产生 RNA 干扰作用的最佳时期,其作用高效而迅速。

本实验证实自行设计的 TGF $\beta$ 1shRNA 能在细胞水平有效地抑制 TGF $\beta$ 1 的表达,但由于质粒本身

为 3 条 shRNA 的融合蛋白,无法确定最高效的干扰片段。基于此现象,本研究将分别构建 3 条含不同 shRNA 序列的质粒载体,最终筛选出最有效的 shRNA 序列,以期稳定、高效地从基因水平抑制 TGF $\beta$ 1 的表达,为进一步探讨纤维化病变过程中 TGF $\beta$ 1shRNA 的体内防治作用打下基础。

### [参考文献]

- [1] 牛颜冰,青玲,周雪平. RNA 沉默机制及其抗病毒应用[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(2): 76-79.
- [2] 吴青. RNAi 技术研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(1): 92-96.
- [3] 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 beta I in living human lung fibroblasts [J]. J Biol Chem, 2004, 279(36): 37726-37733.
- [4] 高晓方,崔社怀. 干扰素  $\gamma$  对实验大鼠肺纤维化的治疗作用及机制的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(2): 143-145.
- [5] 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.
- [6] LASSUS P, RODRIGUEZ J, LAZEBNIK Y. Confirming specificity of RNAi in mammalian cells [J]. Sci STKE, 2002, 2002(147): PL13.
- [7] TOSHIHIRO K, NATSUKI N, MANABU S, et al. Delivery of plasmid DNA expressing small interference RNA for TGF-beta type II receptor by cationed gelatin to prevent interstitial renal fibrosis [J]. Journal of Controlled Release, 2005, 105(3): 318-331.

[责任编辑:陈咏梅]