

TGF β 1shRNA 靶向抑制离体胎鼠肺成纤维 细胞 TGF β 1 基因表达

任建兵, 刘海英, 王志军, 罗瑶, 柳国胜

(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 TGF β 1shRNA 对离体胎鼠肺成纤维细胞 TGF β 1 基因表达的干扰作用,为研究纤维化病变的基因治疗提供技术基础和依据。方法:原代培养胎鼠肺成纤维细胞,并建立细胞高氧损伤模型。针对大鼠 TGF β 1 基因 mRNA 序列,设计、合成携带 3 条 TGF β 1shRNA 绿色荧光蛋白融合表达质粒载体,并设阴性质粒组和空白组为对照,通过 JetPEI 包裹分别转染上述高氧损伤的胎鼠肺成纤维细胞。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,采用实时荧光定量 PCR 检测 TGF β 1 基因表达情况,并计算干扰效率。结果:①成功培养胎鼠肺成纤维细胞,并建立细胞高氧损伤模型;②荧光显微镜下观察,可见转染后 24、48 和 72 h TGF β 1shRNA 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 检测转染后胎鼠肺成纤维细胞 TGF β 1 mRNA 表达量,转染后 24、48 和 72 h TGF β 1shRNA 质粒组 TGF β 1 mRNA 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 97.3%、96.9% 和 71.7%。结论:本研究证明自行设计的 TGF β 1shRNA 转染胎鼠肺成纤维细胞后 24、48 和 72 h 均能够高效干扰 TGF β 1 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 β 1; RNA 干扰; 肺成纤维细胞

[中图分类号] R587.1;R322.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)06-0644-05

Inhibition of TGF β 1 gene expression by TGF β 1 short hairpin RNA on lung fibroblasts of embryonic rats in vitro

REN Jian-bing, LIU Hai-ying, WANG Zhi-jun, LUO Yao, LIU Guo-sheng

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

[Abstract] **Aim:** The effects of RNA interference on TGF β 1 gene in lung fibroblasts of embryonic rats in vitro through TGF β 1 short hairpin RNAs designed by myself were investigated in order to provide the foundation and evidence of a potential siRNA therapy of fibrotic diseases. **Methods:** Lung fibroblasts of embryonic rats were primary cultured and the model of hyperoxia induced lung fibroblasts injury were established. Three short hairpin RNAs targeting the TGF β 1 mRNA sequence and constructing the green fluorescence plasmid DNA of expressing TGF β 1 short hairpin RNAs were transfected into those cells model above mentioned. To determine the effect of these short hairpin RNAs, the positive plasmid vectors of TGF β 1 were transfected into these cells with the JetPEI, also used negative and null vectors were treated as above as controls. After 24, 48 and 72 hours, the preliminary effect was evaluated with fluorescence microscope, and then fluorescent quantitation PCR was used to detect the expression of TGF β 1 gene at mRNA level. More-

[收稿日期] 2009-05-04

[基金项目] 广东省自然科学基金资助项目(07005966)

[作者简介] 任建兵(1984-),男,硕士研究生,研究方向:新生儿学

通讯作者:柳国胜,男,教授,博士生导师, Tel: 020-38688969; E-mail: tlgs@jnu.edu.cn

ver, calculated the efficiency of RNA interference. **Results:** ①Lung fibroblasts of embryonic rats were successfully cultured and the model of hyperoxia induced lung fibroblasts injury were established. ②Lung fibroblasts by the green fluorescence microscope were observed, fluorescence intensity decreased in the TGF β 1 short hairpin RNAs 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. The expression of TGF β 1 gene at mRNA level with fluorescent quantitation PCR was detected, the TGF β 1 gene expression was highly knocked down in the groups of TGF β 1 short hairpin RNAs 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 97.3%, 96.9% and 71.7% respectively. **Conclusion:** The results suggested that the TGF β 1 short hairpin RNAs designed can interfere the expression of TGF β 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; lung fibroblasts

近年来,新生儿重症监护病房的早产儿吸入高氧后,因肺部氧化应激反应而介导的肺损伤肺纤维化机制^[1-2]已被公认。肺纤维化的主要病理特点是成纤维细胞增殖和大量细胞外基质(ECM)积聚,弥漫性肺炎、肺泡单位结构紊乱和肺纤维化,晚期多引起心、肺功能衰竭而死亡,发病机制尚未完全阐明,临床治疗效果欠佳。多种细胞及细胞因子参与了肺纤维化的发生发展过程,其中转化生长因子 β 1(transforming growth factor beta 1, TGF β 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,被认为是未成熟肺高氧损伤纤维化过程中的中心环节。基于此,本研究拟采用自行设计的转化生长因子 β 1相关短发夹RNA(TGF β 1 shRNA)(TGF β 1 short hairpin RNA, TGF β 1 shRNA)转染原代分离培养的胎鼠肺成纤维细胞(lung fibroblast, LfB),观察并分析其对TGF β 1合成的抑制作用,为防治早产儿高氧肺损伤寻找新的作用靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

shRNA质粒载体、阴性质粒载体及空质粒载体由武汉晶赛生物工程公司合成,送交Invitrogen公司测序鉴定;胎牛血清购自Hyclone公司,H-DMEM干粉购自Gibco公司,JetPEI购自法国Polyplus公司,胰蛋白酶、EDTA购自Corning公司,离心柱型无内毒素质粒提取试剂盒购自Omega公司,Thermoscript RT试剂盒,SYBR Green 荧光定量PCR试剂盒购自Takara公司,TRIzol试剂购自Invitrogen公司。

1.2 方法

(1)TGF β 1 shRNA的设计、合成及鉴定 首先登陆NCBI数据库搜寻大鼠TGF β 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。相关TGF β 1 shRNA质粒表达载体送交武汉晶赛生物工程技术有限公司合成,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,均转入相应的大肠杆菌E. coli DH5 α 以供保存和扩增,构建成功后送交Invitrogen公司测序鉴定。

(2)改良的干贴壁法细胞培养 19 d孕龄SD大鼠剖宫产,无菌术取出新生鼠肺组织,剪成0.5~1 mm³的小组织块,用枪头吸取组织块接种于培养瓶底部,每瓶20~25块,间距0.5 cm左右,轻轻将培养瓶翻转,底面朝上,加入2 mL培养液,盖好瓶盖,倾斜放置在温箱中,干贴壁2~4 h后,缓慢将培养瓶翻转平放,让培养液慢慢覆盖组织块,37℃、体积分数为5% CO₂培养箱内继续静置培养。24 h补加培养液,48 h换液。3 d细胞接近融合时,体积分数为0.25%胰酶进行消化,1:2接种传代。传代完后,采用差速贴壁法纯化。冻存第4代细胞用于转染实验。

(3)细胞高氧损伤模型的建立 高氧损伤模型组通以100%纯氧(2 L/min)10 min,密封后置培养箱中培养24、48和72 h,在培养结束时均用测氧仪检测培养瓶中氧浓度,氧浓度低于90%的样本弃去。

(4)质粒抽提 利用Omega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TG-

F β 1shRNA 质粒、阴性质粒和空质粒。

(5) 转染 shRNA 至高氧损伤 LfB 细胞为 6×10^5 /mL 的 LfB 按 2 mL/孔植入 6 孔板,待细胞密度达到 50% ~ 60% 后开始转染。转染分为 TG-F β 1shRNA 质粒组、阴性质粒组和空质粒组,每组按收集细胞时间不同(转染后 24、48、72 h)又分为 3 个亚组,共分为 9 个组,每组收集 6 孔细胞。转染过程按 JetPEI 产品说明操作,以每孔为单位,分别取 JetPEI 6 μ L、相应质粒 3 μ g 稀释于 100 μ L 150 nmol/L NaCl 溶液中,小心漩涡混匀并瞬时离心,室温孵育 15 ~ 30 min,每孔逐滴加入 200 μ L JetPEI/DNA 复合物,轻轻以 8 字形手动水平摇匀,置培养箱内培养,24 h 后在荧光倒置显微镜下观察转染效果,确定转染成功后各大组分别于 24、48 和 72 h 收集细胞 RNA(6 孔/组),用于后期实验。

(6) 荧光显微镜观察干扰效果 转染后 24、48 和 72 h 取出各组细胞,置于荧光显微镜下观察 TGF β 1 基因干扰效果。

(7) 荧光定量 PCR 法检测 TGF β 1 基因在各组 LfB 中的表达水平 ①总 RNA 的提取:用 TRIzol 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引物的设计与合成:大鼠 TGF β 1 及 β -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 β 1 上游

引物:5' - AGCGGTGCTCGCTTTGT - 3',下游引物:5' - TCCCGAATGTCTGACGTATTGA - 3'; β -actin 上游引物:5' - CCATCGTCCACCGCAAAT - 3',下游引物:5' - GCTCGCTCCAACCGACT - 3'。引物合成交由英骏生物技术有限公司。③荧光定量聚合酶链反应(RT-QT-PCR):按试剂盒说明书方法操作,预变性 95 $^{\circ}$ C 5 min,变性 95 $^{\circ}$ C 10 s,退火 56 $^{\circ}$ C 40 s,延伸 68 $^{\circ}$ C 34 s,共 30 个循环。每个样品做 4 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 $\Delta\Delta$ 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 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 得出实验结果。

1.3 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 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 原代培养的胎鼠肺成纤维细胞

培养 6 h 后,可见 LfB 开始贴壁,细胞胞体较小,胞突少,多呈圆形或梭形,胞核较小。第 2、3 天胞体较前稍增大,胞突少,多长梭形,胞核较前稍大。第 4、5 天,LfB 呈星状或梭形,细胞胞体较大,核椭圆形,核仁明显,细胞伸出多个突起,并连接成网状,如图 1。

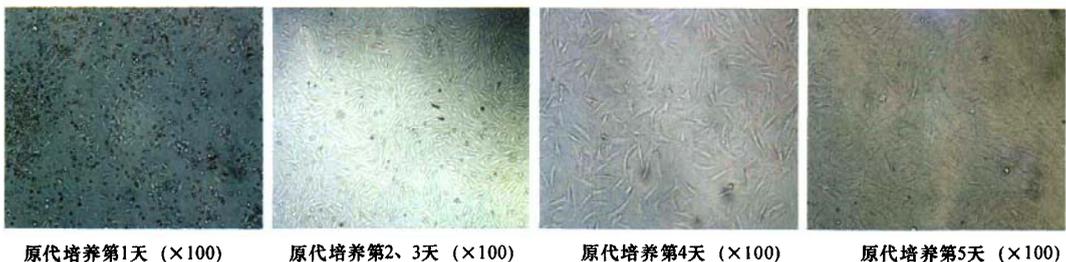


图 1 原代培养的胎鼠肺成纤维细胞

2.2 两种培养方法的比较

改良的培养方法和传统方法的比较详见表 1。

表 1 改良的培养方法与传统的方法比较

项目	原代分离所需时间/h	所需操作	细胞融合所需时间/d	细胞损伤
干贴壁法	1.5	较少,不易污染	3	较小
传统法	7~8	较多,易污染	7	较大

2.3 荧光显微镜观察质粒转染后 TGF β 1 基因的干扰效果

TGF β 1shRNA 质粒、阴性质粒和空质粒分别转

染胎鼠 LfB,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 2~4。

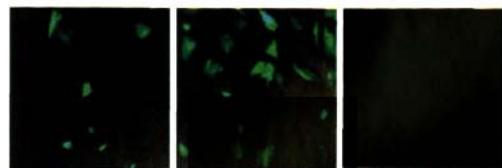
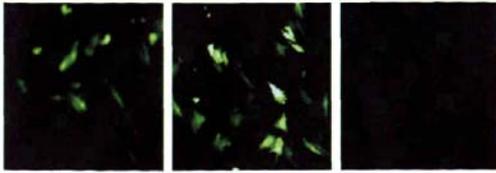
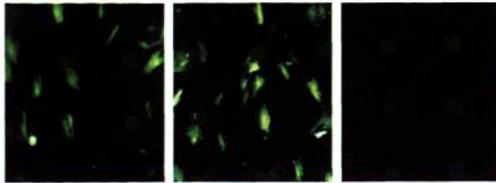


图 2 转染后 24 h 各组细胞 GFP 表达情况 (x100)



TGFβ1shRNA质粒组 阴性质粒组 空质粒组
图3 转染后 48 h 各组细胞 GFP 表达情况 (×100)



TGFβ1shRNA质粒组 阴性质粒组 空质粒组
图4 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。

2.4 荧光定量 PCR 法检测 TGFβ1 基因 mRNA 在胎鼠 LfB 中的表达

荧光定量 PCR 扩增曲线图横坐标为扩增循环数,纵坐标为收集到的荧光强度,从图中可以发现 PCR 反应扩增过程中存在明显的指数扩增期和平台期,到达平台期后,PCR 产物的量相差很大,而 CT 值处于指数扩增期的起始阶段,因此由 CT 值计算得到的基因起始模板量最接近真实模板量。胎鼠 LfB 转染 48 h 后 TGFβ1 和 β-actin 基因荧光定量 PCR 扩增曲线图,如图 5~6。

以 24 h 空质粒组 LfB 为对照,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 2。

从表 2 可以看到,各组 LfB 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 2 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 97.3%、96.9% 及 71.7%。

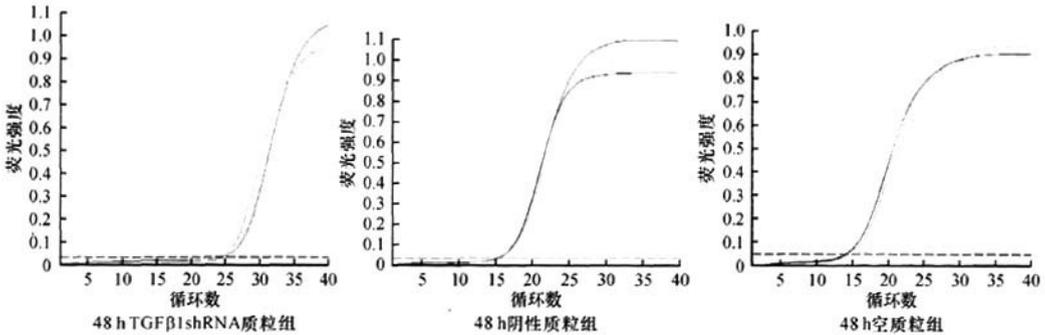


图5 TGFβ1 荧光定量 PCR 扩增曲线图

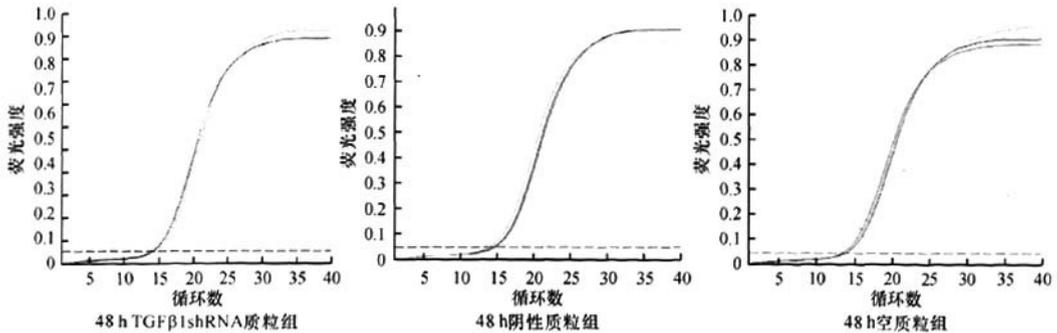


图6 β-actin 荧光定量 PCR 扩增曲线图

表2 转染后不同时间各组细胞 TGFβ1 mRNA ($\bar{x} \pm s$) 表达水平

分组	TGFβ1 mRNA 表达水平		
	24 h	48 h	72 h
空质粒组	1.000 ± 0	1.145 ± 0.012	1.221 ± 0.024
TGFβ1 shRNA 质粒组	0.022 ± 0.002 ¹⁾²⁾	0.027 ± 0.005 ¹⁾²⁾	0.259 ± 0.011 ¹⁾²⁾
阴性质粒组	0.807 ± 0.016 ¹⁾	0.860 ± 0.020 ¹⁾	0.914 ± 0.053 ¹⁾

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

3 讨论

TGFβ1 是一种多效能的生长因子,与组织发育和基质沉积密切相关,一方面能刺激成纤维细胞合成 ECM,另一方面抑制新合成的基质金属蛋白酶降解,还具有抑制肺泡上皮细胞增殖的作用,最终导致器官纤维化^[3]。TGFβ1 在多种纤维增生性疾病中表现出相似的促纤维化作用。Gauldie 等^[4]证实 TGFβ1 的过度表达可导致幼鼠肺间质纤维化,从而引起支气管肺发育不良。一些抗纤维化的药物也是通过 TGFβ1 途径而发挥作用。针对与发病机制相关的信号转导的关键环节进行阻断,可以达到限制纤维化发展和减少病变范围。通过阻断 TGFβ1 的作用来治疗肺纤维化,已成为新近人们研究的热点^[5]。RNAi 技术的出现和成熟则提供了一个新的研究手段。

RNAi 是近几年发展起来的基因沉默技术,它通过内源性或外源性双链 shRNA 触发同源性 mRNA 的降解,从而使靶基因表达沉寂^[6]。作为高效、特异的调节基因表达的技术, RNAi 已成为基因功能和信号传递系统上下游分子相互关系研究的有力工具。国内外已有将此技术用于器官纤维化方面的研究, Takabatake 等^[7]将 RNAi 技术应用于肾病的治疗,用 siRNA 靶向抑制体外培养的鼠肾小球系膜细胞中的 TGFβ1,有效地降低了该基因 mRNA 和蛋白的表达,从而改善了实验性肾小球肾炎时细胞基质的增殖和纤维蛋白的沉积。此外,他们还分别从体内和体外应用载体介导的 RNAi 抑制 TGFβ1 的基因表达,提示应用 RNAi 技术抑制 TGFβ1 的基因表达对纤维化疾病的防治极具价值。

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 TGFβ1 在大鼠 LfB 中的突变位点存在; 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 TGFβ1 shRNA 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 LfB,并且 TGFβ1 shRNA 对 TGFβ1 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,推测其原因可能是因为 GFP 表达随时间推移而减少。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。

[参考文献]

- [1] PALOMINO M A, MORGUES M, MARTINEZ F. Management of infants with chronic lung disease of prematurity in Chile [J]. *Early Hum Dev*, 2005, 81(2): 143 - 149.
- [2] JUAN L, KELUN W. Management of infants with chronic lung disease of prematurity in China [J]. *Early Hum Dev*, 2005, 81(2): 151 - 154.
- [3] LASKY J A, BRODY A R. Interstitial fibrosis and growth factors [J]. *Environ Health Perspect*, 2000, 108(S4): 751 - 762.
- [4] CELTIK C, ACUNAS B, ONER N, et al. Neuron-specific enolase as a marker of the severity and outcome of hypoxic ischemic encephalopathy [J]. *Brain Dev*, 2004, 26(6): 398 - 402.
- [5] 翟华强, 叶先志, 杨毅. 转化生长因子-β 致肺纤维化作用的研究进展 [J]. *中国职业医学*, 2006, 33(1): 53 - 54.
- [6] MASIERO M, NARDO G, INDRACCOLO S, et al. RNA interference: implications for cancer treatment [J]. *Mol Aspects Med*, 2007, 28(1): 143 - 166.
- [7] TAKABATAKE Y, ISAKA Y, MIZUI M, et al. Exploring RNA interference as a therapeutic strategy for renal disease [J]. *Gene Ther*, 2005, 12(12): 965 - 973.

[责任编辑:陈咏梅]