

利用逆转录病毒 RNAi 载体抑制心肌成纤维细胞分泌纤维连接蛋白*

吴 镒^① 洪 权^① 陈香美^{①**} 傅 博^① 李爱萍^②
刘 航^① 王建中^① 白雪源^①

(解放军总医院 ① 肾病中心暨肾病重点实验室; ② 心内科, 北京 100853)

摘要 心脏间质纤维化是心室重塑的最重要表现之一, 心肌细胞外基质的过度积聚在其中扮演着重要角色. 纤维连接蛋白是细胞外基质的重要成分之一, 它负责胶原之间的连接、细胞的黏附和增殖等. 纤维连接蛋白主要由心肌成纤维细胞产生. 由于导致心肌细胞外基质过度分泌的因素很多, 单独阻断某一上游途径很难完全抑制由其他途径导致的过度合成. 利用 RNAi 技术试图在细胞外基质合成的终末途径进行阻断以期达到更为有效的结果. 通过体外合成的双链 RNA, 抑制了纤维连接蛋白在血管紧张素 II 刺激下的过度表达, 进而构建带有 H1 启动子的逆转录病毒载体, 成功地实现了用可稳定表达的 shRNA 抑制纤维连接蛋白的过度分泌. 该载体也可作为今后进行基因功能快速分析和基因治疗的工具.

关键词 RNA 干扰(RNAi) 血管紧张素 II 细胞外基质 纤维连接蛋白

心室重塑在慢性心力衰竭中起着非常重要的作用, 纤维化是心室重塑的最重要的表现之一, 其原因是心肌细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过度积聚, 使心室僵硬并抑制了心室的收缩和舒张, 纤维化也导致心肌细胞间的电活动受到影响, 更严重的是纤维化减少了毛细血管的密度并且增加了氧气的弥散距离, 使心肌细胞缺氧, 因此, 抑制过度纤维化对心肌细胞的代谢和维持正常功能有着及其重要的意义^[1].

心肌成纤维细胞约占非心肌细胞的 90% 以上, 也是心肌细胞外基质最主要的来源. 正常情况下, 细胞间质起着心肌细胞支架和保证心肌细胞收缩舒张同步协调的作用^[2]. 临床上如心肌梗塞、心肌病、高血压和心脏瓣膜病等可导致心脏成纤维细胞增殖和 ECM 积聚, 出现心室重塑, 最终可发生心功能不全^[3]. 导致心肌细胞过度分泌 ECM 的原因非常多, 而且呈网络样共同作用^[4]. 单一的阻断某一致病因素是无法有效地控制最终的 ECM 分泌过程, 如果能在 ECM 分

2003-06-23 收稿, 2003-11-26 收修改稿

* 国家自然科学基金“创新研究群体”项目(批准号: 30121005)、国家自然科学基金项目(批准号: 30370655)和国家“973”项目(批准号: G2000057000)资助

** 联系人, E-mail: xmchen@public.bta.net.cn

泌的最终途径——ECM 的合成阶段进行干预, 则有可能得到一种更为有效的治疗手段.

纤维连接蛋白(fibronectin, FN)是心肌 ECM 重要成分之一, 它是一种比较大的糖蛋白, 在细胞黏附、移动、增殖等方面起着极其重要的作用, 而且它负责胶原间的连接^[5,6]. 因此, 如果能够抑制 FN 的过度合成, 则有可能抑制其他 ECM 成分如胶原 I 在心肌内的积聚. RNA 干扰(RNA interference, RNAi)现象的发现, 使人们找到了一种简单、有效的代替基因敲除的工具. RNAi 是指一些小的双链 RNA, 它可以高效、特异地阻断细胞内特定基因表达, 促使 mRNA 降解, 诱导细胞表现出特定基因缺失的表型, 它也是体内抵御外在感染的一种重要保护机制^[7-11]. RNAi 最重要的特点是特异性很强. 如果能够利用 RNAi 方法, 部分地抑制心肌成纤维细胞过度分泌细胞外基质, 则有可能在各种致病因素的最终共同途径上进行干预, 以达到最佳疗效. 本研究利用逆转录病毒载体形成的发夹样 RNAi(shRNA), 稳定地表达在心肌成纤维细胞内, 成功地抑制由血管紧张素 II(AT II)导致的 FN 的过度表达.

目前为止, 国内外尚未见用 RNAi 方法阻断 FN 分泌以延缓心肌纤维化的报道. 该载体将成为日后进行快速的基因功能分析和基因治疗的重要工具.

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM, 1640 RPMI, FCS, Trizol, *Xho* I 和 *Bam*H I 等为 Invitrogen 公司产品. 载体 pLXIN, pVSV-G, pBluescriptII SK(-), pcDNA3.1(+)为 Clontech 公司产品. Sybr Green I 染料为基因公司产品. 荧光定量 PCR 仪、电泳仪及转膜仪为 Bio-Rad 公司产品. 质粒提取试剂盒为 Promega 公司产品. Superfect 转染试剂为 QIAGEN 公司产品. α -³²P-dCTP 购自北京亚辉同位素公司. 随机引物标记试剂盒为 Roche 公司产品. siRNA 合成试剂盒 The SilencerTM siRNA Construction Kit 为 Ambion 公司产品.

1.2 大鼠心肌成纤维细胞的原代培养

选取三月龄的 Wistar 大鼠注射戊巴比妥钠处死

后, 在严格无菌情况下分离出心脏, 除去心房、右心室和血管, 保留左心室, 用 Hanks 溶液清洗 2 次, 除去红细胞, 将左心室切成 1 mm³ 小片, 研磨后用 Hanks 溶液清洗 2 次, 将洗液上清吸弃, 根据下沉组织块的多少, 加入 10~50 倍的 0.25% 的胰蛋白酶(pH 7.4), 置 37°C 水浴中消化 15~30 min, 视其组织碎块聚成一团, 边缘毛样模糊即可. 取出后用毛细管轻轻吸出消化液, 用 Hanks 液洗 1~3 次, 加 10 mL 无血清培养液, 用吸管反复吹打, 使细胞分散, 然后将分散好的细胞悬液通过不锈钢筛网, 将过滤的细胞悬液用吸管充分吹打分散, 取少量悬液进行计数, 培养基为 MEM Eagle 培养液, 另加 10% FCS, 100 u/mL 青霉素, 100 u/mL 链霉素. 将细胞接种到 25 cm² 的组织培养皿中, 细胞浓度为 2×10⁶ 个/培养皿. 细胞在 37°C, 潮湿的空气(5% CO₂, 95% 室内空气)条件下孵育, 1 h 后更换培养液, 以后每 2 天更换一次, 在培养的第 5 天进行试验.

1.3 双链 RNA 的合成

根据 GenBank 数据库提供的大鼠 Fibronectin 全长基因(GenBank Acc. No. NM_019143)设计 RNAi 的靶区: 1531~1551 bp, 并参照试剂盒在各自序列上加上特定 DNA 序列, 最后得到 29nt DNA 寡核苷酸, FN1 oligo1: 5'-AAGGTGCCGCACCATTTTCATGCC-TGTCTC-3'; oligo2: 5'-AACATGAAATGGTGC GGCA-CCCCTGTCTC-3'. FN2: oligo1: 5'-AAGGTGCCGC-ACCATTTGTTGCCTGTCTC-3', oligo2: 5'-AACAAC-AAATGGTGC GGCA CCCCTGTCTC-3'. 为证明合成的 siRNA 抑制 Fibronectin 的特异性, 我们在 FN2 序列上做成两个碱基置换. 用 siRNA 合成试剂盒将 DNA 序列转录成 siRNA.

1.4 shRNA 逆转录病毒载体的构建

根据文献[12]设计特异性引物以人基因组 DNA 为模板扩增 H1 启动子, 上游: 5'-CCATGGAATTC-GAACGCTGACGTC-3', 下游: 5'-GCCTCGAGAGAT-CTGTGGTCTCATACAGAACTTATAAGATTCCC-3', PCR 产物经 *Eco*R I 和 *Sal* I 双酶切后克隆到 pBSK II 中, *Xba* I 酶切 pBSK II 后 Klenow 补平末端, 然后用 *Kpn* I 消化后得到的片段亚克隆在 pCDNA3.1(+)载体

上(命名为 pCH1), pCDNA3.1 (+)同样预先用 *Bgl* II 消化后 Klenow 补平末端, 再用 *Kpn* I 消化. 载体 pCH1 用 *Xho* I 和 *Bam* HI 酶切后得到带 H1 启动子的目的序列克隆入逆转录病毒载体 pLXIN 上, 为了避免 5' LTR 和 H1 的冲突, 把 H1 启动子反向插入 5' LTR 后面, 命名为 pLXIN/H1. 人工合成 Fibronectin shRNA 的 DNA 模板序列 1: 5'-GATCCCC catgaa-tggtgcggcaccctcaagagaggtgccgcaccatttcagTTTTTGGG-3', 序列 2: 5'-AGCTTTTCCAAAAA catgaatggtgcggcacc tctcttgaa ggtgccgcaccatttcag GGG-3', 经退火后克隆入 *Bgl* II 和 *Sal* I 酶切的 pLXIN/H1 载体, 命名为 pLXIN/H1-FN.

1.5 shRNA 逆转录病毒产毒及滴度测定

病毒包装细胞选用 GP2-293, 培养基用 10% FCS DMEM, 10 mmol/L Hepes, 2 mmol/L L-谷氨酰胺, 1 mmol/L MEM 丙酮酸钠, 100 u/mL 庆大霉素, 100 u/mL 链霉素, 15 μ g 的逆转录病毒载体(pLXIN/H1, pLXIN/H1-FN)和包装载体 pVSV-G 用磷酸钙试剂共转染 25 cm² 培养瓶中的 GP2-293 细胞, 转染前加入 4 μ g/mL 的 Polybrene, 8 h 后更换培养液, 24 h 后细胞置放 32℃ 孵箱以提高病毒滴度. 48 h 后收集上清, 并经 0.45 μ m 滤膜过滤后于 50000 $\times$ g 离心 1.5 h, 沉淀按 0.1%~0.05% 重悬于 TNE buffer, 4℃ 过夜后保存在 -80℃ 备用. NIH3T3 细胞以直径 6 cm 的培养皿接种 5 $\times$ 10⁵/皿, 接种后 24 h 加入病毒浓缩液及 polybrene 4 μ g/mL, 24 h 后加 300 μ g/mL G418 筛选, 1 周后经甲醛固定, Giemsa 染色液染色, 计数抗性细胞克隆数, 并计算病毒滴度, 以克隆形成单位(CFU/mL)表示.

1.6 siRNA 转染

12 孔板上均匀种植 3 $\times$ 10⁴/孔的心肌细胞, 待细胞融合后, 参照 superfect 转染试剂盒进行操作. 将 FN1 或 FN2 siRNA(0.15 μ g/孔)转染心肌成纤维细胞, 48 h 后用无血清的 1640 培养液同步 1 天, 然后用 10⁻⁷ mol/L 血管紧张素 II(AT II)刺激 16 h. 25 cm² 培养瓶中的细胞以同样的方法处理后做 Northern blot 检测.

1.7 逆转录病毒感染心肌成纤维细胞

按上述方法在 25 cm² 培养瓶中接种心肌成纤维

细胞 10⁵ 个/瓶, 待融合后加入病毒浓缩液 pLXIN/H1 或 pLXIN/H1-FN1 以及 4 μ g/mL 的 polybrene, 24 h 后更换新鲜培养液, 定量 PCR 检测 FN 的表达水平. 细胞长满培养瓶后常规方法传代, 传至第 4 代时细胞的处理同第 1.6 小节, Northern blot 及 Western blot 检测 FN 的表达水平.

1.8 定量 PCR 检测 FN 的表达丰度

根据大鼠 FN 全长 RNA 序列 (GenBank Acc. No. NM_019143) 用 prime5.0 软件设计定量 PCR 引物, 上游: 5'-TTATGACGACGGGAAGACCT-3', 下游: 5'-GCTGGATGGAAAGATTACTC-3', 内参选用大鼠 GAPDH 校准上样量, 引物为上游: 5'-TGCACCACCACTGCTTAGC-3', 下游: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'. 标准品为 PCR 产物纯化后经紫外分光光度计定量后梯度稀释得到: 10⁸ copies/ μ L, 10⁷ copies/ μ L, 10⁶ copies/ μ L, ..., 10³ copies/ μ L. Trizol 提取细胞总 RNA 并用 DNase I 消化后经紫外分光和电泳鉴定 RNA 的质和量, 2 μ g DNase I 处理的总 RNA 用 M-MLV 试剂盒和随机引物逆转录成 cDNA, 1:5 稀释后取 1 μ L 作为 PCR 反应的上样模板, 25 μ L 反应体系(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3; 50 mmol/L KCl; 1.5 mmol/L MgCl₂; 0.2 mmol/L dNTP mix; 50 pmol/L primers each; 1 U Takara Taq)进行 PCR 扩增, 95℃ 变性 3 min 后进入循环: 95℃, 45 s, 61℃, 45 s, 72℃, 40 s, 80℃, 5 s 采集荧光, 40 个循环后在 72℃ 下延伸 10 min, 同时在 Icyler 3.02 软件收集数据. 每次反应带有无 cDNA 模板的阴性对照.

1.9 Northern blot

Trizol 试剂提取各组的总 RNA, 紫外分光和电泳鉴定 RNA 的质和量, 30 μ g 总 RNA 经 1% 琼脂糖电泳, 常规转膜. Glassmilk 纯化 PCR 扩增产物, 经测序鉴定正确后随机引物标记法标记 α -³²P-dCTP FN 探针, 42℃ 杂交过夜, 常规方法洗膜, -70℃ 下放射自显影. 重复 3 次.

1.10 Western blot

25 cm² 培养瓶中的细胞经 0.25% 胰酶消化后用 RIPA 细胞裂解液(50 mmol/L Tris-Cl, pH 7.6; 5 mmol/L

EDTA; 150 mmol/L NaCl; 0.5% NP-40; 0.5% Triton-X-100, 含 1 μ g/mL leupeptin, aprotinin 和 antipain; 1 mmol/L NaVO₄; 0.5 mmol/L PMSF)提取总蛋白. BCA 试剂盒(Bio-Rad)检测提取的蛋白浓度 (Bio-Rad Laboratories), 以 30 μ g 总蛋白行 7.5%SDS-PAGE 电泳后转移到 PVDF 膜上, 5%脱脂奶粉 4℃过夜封闭, 依次用 1:100 兔抗大鼠 fibronectin 的多克隆抗体和 1:2000 稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 反应, 最后显色, 重复 3 次.

1.11 统计学分析

所有的数据结果用 $\bar{X} \pm SD$ 表示, 数据的统计用 t 检验进行分析, 组间比较以 $P < 0.05$ 显示显著性差异.

2 结果

2.1 逆转录病毒载体的构建

克隆得到逆转录病毒载体 pLXIN/H1 和 pLXIN/H1-FN, pLXIN 载体大小为 6.1 kb, H1 启动子为 226 bp(图 1). 经 *EcoR* I 酶切鉴定正确后转入 GP2-293 细胞, 产毒后浓缩并测定滴度, 约为 10^6 CFU/mL.

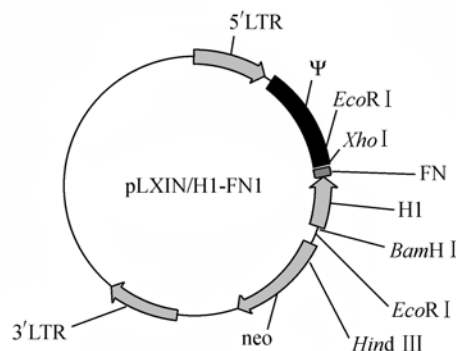
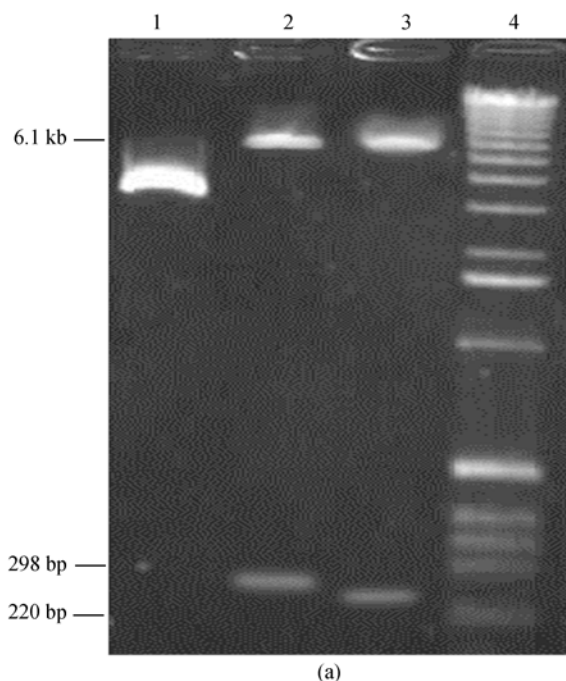


图 1 逆转录病毒载体构建与鉴定

(a) 逆转录病毒载体酶切鉴定图. 1 示 1 kb DNA 分子量标准; 2 示 pLXIN/H1; 3 示 pLXIN/H1-FN1 (*EcoR* I); 4 示 pLXIN/H1 (*EcoR* I). (b) 逆转录病毒载体 pLXIN/H1-FN1 图谱

2.2 FN1-siRNA 抑制 FN 的表达

大鼠心肌成纤维细胞转染 FN1-siRNA 和 FN2-siRNA 后用 AT II 刺激处理, 提取 RNA 逆转录成 cDNA 后经定量 PCR 检测. 转染 FN1-siRNA 组的 FN 表达明显低于转染 FN2-siRNA 组(按图 2(d)示顺序各组比值分别为: 0.723 ± 0.057 , 0.250 ± 0.020 , 0.457 ± 0.060 , 0.500 ± 0.040 , 0.448 ± 0.035 , $n = 6$, $P < 0.05$), 而且经过 AT II 刺激后明显高于非刺激组($n = 6$, $P < 0.05$) (图 2). 实时定量检测 PCR 扩增结果如图 2(a)~(c)所示, FN 标准品扩增的 Ct 值的相关性 $r^2 = 0.997$, 阴性对照 Ct 值为 0, 本次扩增的数据是有统计意义的, 从样品的溶解曲线中可以看出, PCR 反应中没有检测到引物二聚体. 同样, Northern blot 的结果也和上述的一致, 按图 3(b)示顺序各组比值分别为: 0.923 ± 0.174 , 0.464 ± 0.037 , 0.714 ± 0.117 , 0.259 ± 0.020 , 0.692 ± 0.085 , $n = 6$). FN1-siRNA 转染组的 FN 表达明显低于 FN2-SiRNA 转染组.

2.3 逆转录病毒 pLXIN/H1-FN1 抑制 FN 的表达

大鼠心肌成纤维细胞瞬时转染逆转录病毒后用

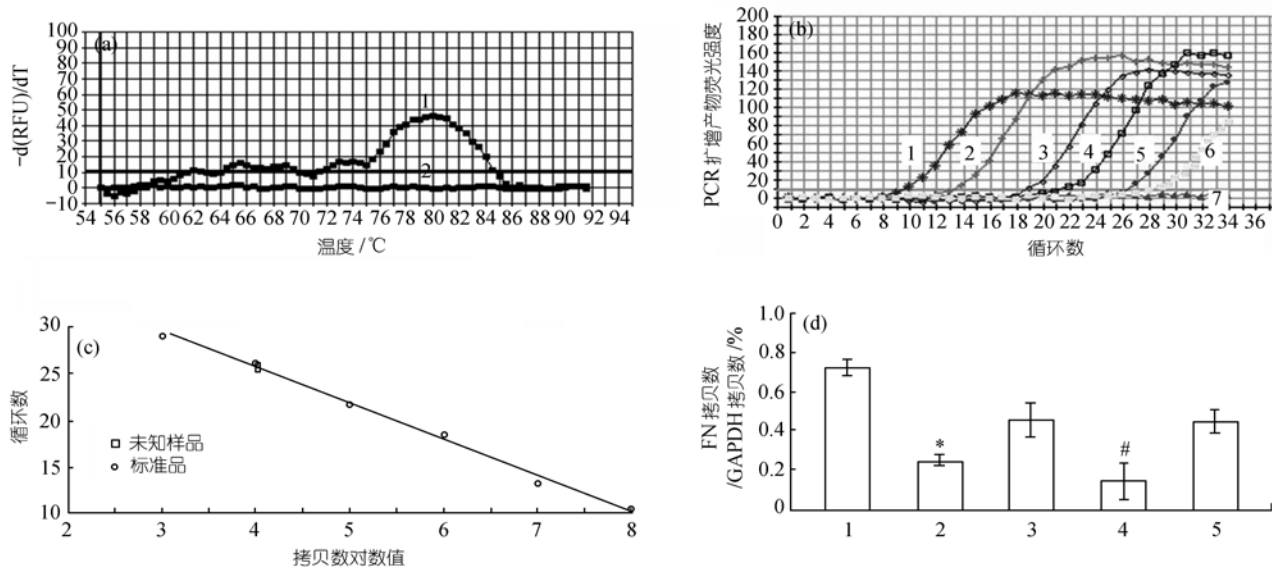


图2 定量 PCR 检测 siRNA 转染心肌成纤维细胞后的 FN 表达

(a) 溶解曲线; 1 示样品溶解曲线; 2 示阴性对照溶解曲线. (b) 扩增曲线; 1~6 示标准品 PCR 扩增曲线(10^8 , 10^7 ~ 10^3 copies/mL); 7 示阴性对照扩增曲线. (c) 标准品 PCR 扩增的标准曲线. (d) FN 表达统计图; 1 示 Ang II + FN2-siRNA; 2 示 Ang II + FN1-siRNA; 3 示 FN2-siRNA; 4 示 FN1-siRNA; 5 示对照; * 示 $P < 0.05$, 1, 3, 5 与 2 组间比较; # 示 $P < 0.05$, 1, 3, 5 与 4 组间比较

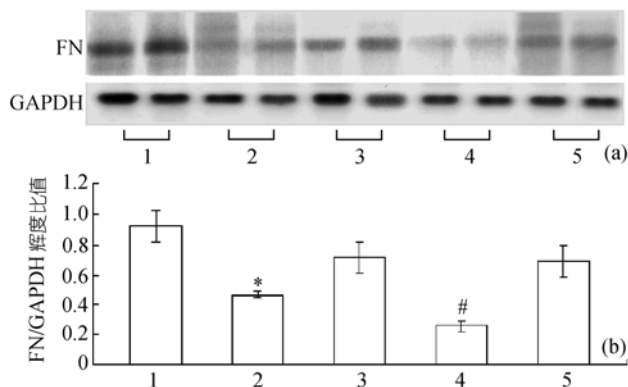


图3 Northern blot 检测 siRNA 转染心肌成纤维细胞后的 FN 表达

(a) FN 与 GAPDH 的 Northern blot 检测结果; (b) 数据统计图; 1 示 Ang II + pLXIN/H1; 2 示 Ang II + pLXIN/H1-FN1; 3 示 pLXIN/H1; 4 示 pLXIN/H1-FN1; 5 示对照(Ang II). * 示 $P < 0.05$, 1, 3, 5 与 2 组间比较; # 示 $P < 0.05$, 1, 3, 5 与 4 组间比较

AT II 刺激处理, 提取总 RNA 逆转录成 cDNA 后经定量 PCR 检测. 实时定量 PCR 扩增结果统计曲线显示转染 pLXIN/H1-FN1 组的 FN 表达明显低于转染 pLXIN/H1 组($n = 6$, $P < 0.05$), 而且经过 AT II 刺激后明显高于非刺激组($n = 6$, $P < 0.05$), 图 4 所示各组比值为: 0.997 ± 0.096 , 0.440 ± 0.052 , 0.566 ± 0.065 , $0.248 \pm$

0.027 , 0.584 ± 0.070 . 实时定量检测 PCR 扩增结果图未给出, FN 标准品扩增的 Ct 值的相关性 $r^2 = 0.990$, 阴性对照 Ct 值为 0, 本次扩增的数据是有统计意义的, 样品的溶解曲线同样反应出 PCR 反应中并没有引物二聚体被检测到(图未给出). 经 G418 筛选的转染逆转录病毒的心肌成纤维细胞传至第 4 代后做 Northern blot(图 5(b)各组数据为: 1.068 ± 0.105 , 0.535 ± 0.054 , 0.684 ± 0.069 , 0.369 ± 0.032 , 0.697 ± 0.064 , $n = 6$)和 Western blot (图 6(b)各组比值为: 1.090 ± 0.087 , $0.550 \pm$

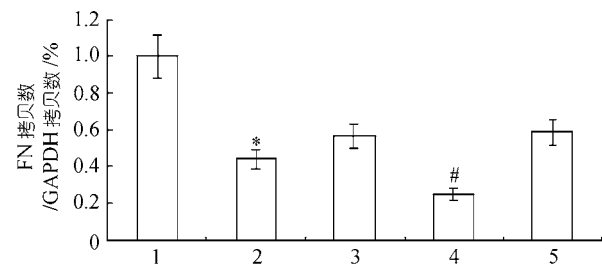


图4 定量 PCR 检测逆转录病毒瞬时转染心肌成纤维细胞后的 FN 表达

1 示 Ang II + pLXIN/H1; 2 示 Ang II + pLXIN/H1-FN1; 3 示 pLXIN/H1; 4 示 pLXIN/H1-FN1; 5 示对照. * 示 $P < 0.05$, 1, 3, 5 与 2 组间比较; # 示 $P < 0.05$, 1, 3, 5 与 4 组间比较

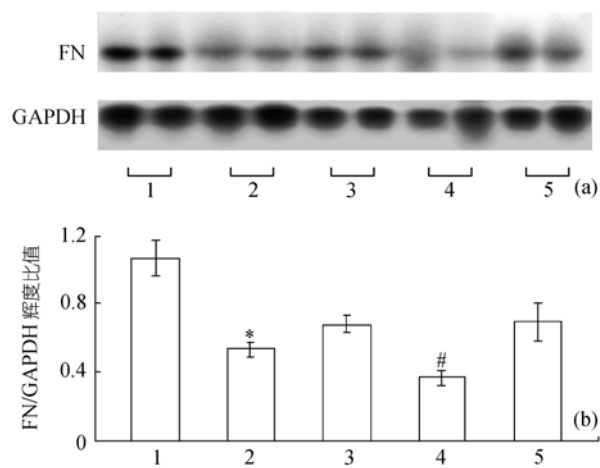


图 5 Northern blot 检测逆转录病毒转染心肌成纤维细胞后稳定表达的 FN 表达

(a) FN 与 GAPDH 的 Northern blot 检测结果. (b) 数据统计图; 1 示 Ang II + pLXIN/H1; 2 示 Ang II + pLXIN/H1-FN1; 3 示 pLXIN/H1; 4 示 pLXIN/H1-FN1; 5 示对照. * 示 $P < 0.05$, 1, 3, 5 与 2 组间比较; # 示 $P < 0.05$, 1, 3, 5 与 4 组间比较

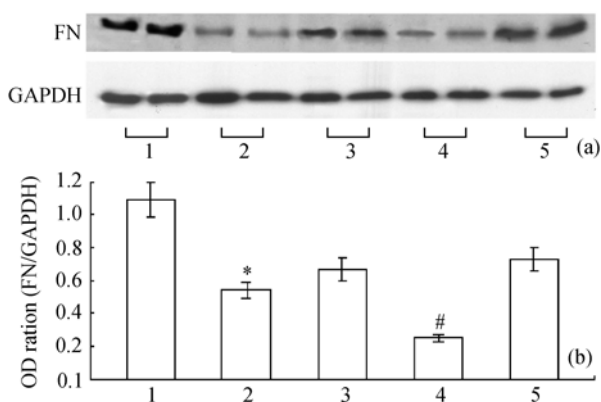


图 6 Western blot 检测逆转录病毒转染心肌成纤维细胞后稳定的 FN 表达

(a) FN 与 GAPDH 的 Western blot 检测结果. (b) 数据统计图; 1 示 Ang II + pLXIN/H1; 2 示 Ang II + pLXIN/H1-FN1; 3 示 pLXIN/H1; 4 示 pLXIN/H1-FN1; 5 示对照. * 示 $P < 0.05$, 1, 3, 5 与 2 组间比较; # 示 $P < 0.05$, 1, 3, 5 与 4 组间比较

0.044, 0.666 ± 0.053 , 0.248 ± 0.025 , 0.725 ± 0.055 , $n = 6$)检测的结果与上述一致.

3 讨论

本研究成功地利用了逆转录病毒载体, 结合 H1

启动子, 在细胞内稳定地表达出发夹样短链 RNA (shRNA), 有效地抑制了血管紧张素 II 刺激的心肌成纤维细胞纤维连接蛋白的过度合成. 结果显示, 带有 H1 启动子的逆转录病毒表达系统 pLXIN 能有效地合成 shRNA, 稳定高效地抑制基因的表达. 本研究为基因功能研究以及临床治疗提供了一个新的工具.

心肌重要的细胞外基质成分主要来源于心肌成纤维细胞分泌的胶原和纤维连接蛋白. 当心脏暴露于各种压力或损伤时会导致成纤维细胞增殖和 ECM 积聚, 出现心肌僵硬、传导异常及心功能不全等. 由于导致 ECM 积聚的因素很多, 而且成网络样相互作用, 仅对某一因素进行干预无法阻止其他途径导致的 ECM 分泌^[13]. 如果能在 ECM 的合成这一终末环节进行干预, 则可能避免上述问题. 纤维连接蛋白(FN)是由一条 mRNA 编码的大分子糖蛋白, 起着交联 ECM 各成分的作用, FN 通过靠近 3' 端的多个可变剪切位点形成多种异构体. 如果在 5' 端将其共有序列破坏, 可使所有的异构体形式消失而易于检测和观察效果, 因此本研究选取了 FN 作为目的基因进行阻断. 在刺激因子中我们选取了血管紧张素 II (AT II) 作为刺激源. 在各种导致心肌重塑的血管活性因子中, 血管紧张素 II 具有明确的诱导心肌成纤维细胞增殖和过度分泌 ECM 作用, 在心室重塑过程中扮演着非常重要的角色. 我们观察了在该因子作用下 FN 分泌情况的改变以及用 RNAi 方法对其合成的抑制作用.

在抑制方法上本研究探索了用 RNAi 原理进行基因抑制的可能. 虽然反义寡核苷酸在基因表达抑制中的应用最为广泛, 但其有显著的缺点, 比如其治疗所需浓度往往与中毒剂量非常接近, 而且需经常给药以维持疗效^[14,15]. RNAi 是近年发现的一种细胞在抵制外源性病毒或细菌侵入的自我调控机制. 通过在细胞内转染与靶基因相同序列的 21 bp 的双链 RNA, 即可使靶基因降解, 而且具有特异性强、抑制效率高等特点. 由于双链 RNA 在体内无法稳定表达而发挥作用, 研究人员发现小的发夹样 RNA——shRNA (small hairpin RNA)可以发挥与双链 RNA 相同的作用. 通过在哺乳动物细胞体内转染带有 RNA 聚合酶 III 启

动子 H1 或 U6 的基因, 可以形成发夹样的 RNA^[16-18]. H1 启动子的特点是在当其遇到连续 5 个胸腺嘧啶时, 它指导的转录就会终止, 并且转录产物在第二个尿嘧啶处被切下来, 可以很方便地形成小的发夹结构. 本研究探索了将 H1 启动子整合进传统的逆转录病毒表达载体以稳定表达 shRNA 的可能性, 如果该系统有效, 则大大简化了靶片段的筛选速度, 而且可以将所得的载体直接产毒后进行细胞感染以快速筛选目的细胞系或进行体内实验.

我们首先用试剂盒法合成了几条针对 FN mRNA 不同位置的 siRNA. 通过检测, 发现靠 5' 端 1531~1551 为靶序列的 RNAi 效率最高, 而且可使所有的 FN 异构体降解, 便于进行检测. 从图 2 可以看出, FN1-siRNA 能有效地降低 FN 的表达, 在 AT II 的刺激下, 未进行 siRNA 干预的组 FN 的表达量显著增加, 而 FN1-siRNA 干预组 FN 的表达量明显下调, 与对照组无差异. FN2-siRNA 只与 FN1-siRNA 有两个碱基的差异, 却没有起到抑制作用, 从而证实了 FN1-siRNA 的特异性. 由于质粒转染所起的作用也是瞬时的, 因此我们首先将克隆出的 H1 启动子插入 pCDNA3.1(+) 载体, 再将其亚克隆至逆转录病毒载体 pLXIN 中. H1 末端留有 Bgl II 和 Sal I 酶切位点 (pLXIN 上无 Sal I 位点), 所以今后只需要在靶片段末端加上 Bgl II 和 Sal I 位点合成双链寡核苷酸, 直接插入该载体即可应用. 为避免载体本身 5' LTR 和 H1 启动子的冲突, 我们将 H1 启动子反向插入 5' LTR 的后面. 产毒时用 VSV-G 包装的逆转录病毒具有很高的感染效率, 而且经超速离心后滴度达 10^7 CFU/mL, 可以基本满足体内转染的需要量. 产毒后用 NIH3T3 细胞检测滴度达到 10^6 CFU/mL. 病毒感染心肌成纤维细胞 16 h 后用 AT II 刺激, 从图 4 可以看出, FN1 shRNA 不仅能抑制正常条件下 FN 的表达水平, 而且对 AT II 刺激条件下的 FN 表达可有效地抑制, 使其表达水平回到正常, 因此 pLXIN/H1-FN1 逆转录表达系统对 FN 合成的抑制是有效的. 为证实该载体在细胞内可稳定表达, 我们用 G418 筛选感染后的细胞, 传 4 代后, 再次用 AT II 刺激, 检测 FN 水平, 从图 5 和 6 可以看出抑制组仍显著低于对照组, 因此证明该

载体生产的 shRNA 可长期稳定地抑制 AT II 导致的 FN 积聚. shRNA 对 mRNA 的抑制作用还有另外一个优点, 即使可以使基因的表达降低到所需的程度, 并不使基因完全失去功能. FN 是机体非常重要的基质成分, 完全抑制其表达会非常危险, 已有研究表明 FN 基因中的无义突变会导致胚胎的死亡^[19], 因此保持 FN 足够的表达水平是非常有必要的, shRNA 对 FN 的部分抑制, 刚好满足这一要求.

综上所述, 本研究首先构建了一个高效、简单的 shRNA 表达系统. 由逆转录病毒载体形成的 shRNA 具有很强的感染能力, 大大优于质粒载体形成的 shRNA, 且可以稳定地表达在细胞内, 对目的基因持续抑制. 本研所得的 FN 抑制片段可以对 AT II 刺激所导致 FN 合成进行有效地抑制, 这将对心室重塑过程中逆转 ECM 的过表达起到很重要的作用. 我们的结果提示 shRNA 将在心室重塑的基因治疗中有非常重要的应用价值, 该载体也可成为基因治疗的又一有力工具.

参 考 文 献

- 1 Manabe I, Shindo T, Nagai R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res*, 2002, 91(12): 1103~1113[DOI]
- 2 Gong S Z, Pan J Y. The regulatory of interstitial cells on function and growth of cardiac myocytes. *Foreign Medical Sciences: Physiology, Pathology & Clinic*, 2000, 20(6): 510~512
- 3 Dai G Z. Ventricular remodeling and neuroendocrine antagonists. *Chinese Journal of Cardiology*, 1997, 25(4): 317~320
- 4 Su H, Long Y D. Cardiac fibrosis and reversion of cardiac hypertrophy caused by hypertension. *Chinese Journal of Hypertension*, 1994, (2 suppl): 8~10
- 5 Potts J R, Campbell I D. Structure and function of fibronectin modules. *Matrix Biol*, 1996, 15: 313~320[DOI]
- 6 Magnusson M K, Mosher D F. Fibronectin: structure, assembly, and cardiovascular implications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, 18: 1363~1370
- 7 Montgomery M K, Xu S, Fire A, et al. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(26): 15502~15507[DOI]
- 8 Knight S W, Bass B L. A role for the RNaseIII enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001, 293(5538): 2269~2271[DOI]
- 9 Grishok A, Tabara H, Mello C C. Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science*, 2000, 287(5462): 2494~2497[DOI]

- 10 Zamore P D, Tuschl T, Sharp P A, et al. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 2000, 101(1): 25~33[DOI]
- 11 Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2000, 411(6836): 494~498[DOI]
- 12 Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 2002, 296: 550~553[DOI]
- 13 Maytin M, Colucci W S. Molecular and cellular mechanisms of myocardial remodeling. *J Nucl Cardiol*, 2002, 9(3): 319~327[DOI]
- 14 Hooks J J. Inhibition of human cytomegalovirus replication in a human retinal epithelial cell model by antisense oligonucleotides. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42: 163~169
- 15 Detrick B, Nagineni C N, Grillone L R, et al. Novel antisense and peptide nucleic acid strategies for controlling gene expression. *Biochemistry*, 2002, 41: 4503~4510[DOI]
- 16 Sui G, Soohoo C, Affar E L, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(8): 5515~5520[DOI]
- 17 Yu J Y, DeRuiter S L, Turner D L. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(9): 6047~6052[DOI]
- 18 Paul C P, Good P D, Winer I, et al. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(5): 505~508[DOI]
- 19 George E L, Georges-Labouesse E N, Patel-King R S, et al. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development*, 1993, 119: 1079~1091