

· 基础论著 ·

抗血小板衍生生长因子小干扰 RNA 表达质粒构建及其对肝星状细胞的影响

李发武 卢放根 余治健 王文琦

【摘要】 目的 研究靶向 PDGF-B 链的小干扰 RNA (siRNA) 对肝星状细胞 (HSCs) 细胞外基质分泌的影响。方法 根据 PDGF-B 链序列设计合成 siRNA 序列, 将 siRNA 序列插入 pSilencer 3.1-H1hygro 质粒, 酶切后测序鉴定; PDGF-B 链 siRNA 表达质粒转染 HSCs, 潮霉素筛选阳性细胞株, RT-PCR 和 Western blot 分别检测 PDGF mRNA 和蛋白的表达; 将各组筛选的阳性 HSCs 细胞株培养, MTT 观察各组细胞增殖, 放射免疫法检测 HSCs 细胞株上清液中透明质酸和Ⅲ型前胶原的表达。结果 成功构建 3 种表达 PDGF-B 链 siRNA 表达质粒, RT-PCR 和 Western blot 结果表明各 siRNA 表达质粒阳性 HSCs 细胞 PDGF mRNA 和蛋白表达均有明显抑制。PDGF-B 链 siRNA 表达质粒 HSCs 细胞组较对照组能明显降低 HSCs 增殖, 下调透明质酸和Ⅲ型前胶原表达。结论 靶向 PDGF-B 链的 siRNA 能降低 HSCs 增殖和分泌细胞外基质的能力, 具有抗纤维化治疗的潜力。

【关键词】 血小板衍生生长因子; 小干扰 RNA; 肝星状细胞

Construction and evaluation of small interfering RNA plasmids targeting against B chain of platelet-derived growth factor mRNA and its effects on biological characters of hepatic stellate cells LI Fa-wu, LU Fang-gen, YU Zhi-jian, WANG Wen-qi. Department of Infectious Diseases, Dongguan People's Hospital, Dongguan 523018, China

Corresponding author: LI Fa-wu, Email: lifw94@163.com

【Abstract】 Objective To construct small interfering RNAs (siRNAs) plasmids targeting against platelet-derived growth factor-B chain (PDGF-B) mRNA and evaluate their effects on the activity of hepatic stellate cells. **Methods** Expression plasmid vectors of anti-PDGF siRNA were constructed and subsequently transfected into HSC-T6 cells by routine means. The positive clones were gained by hygromycin selection. The expression of PDGF was detected by RT-PCR and Western blot. The cell proliferation was determined through MTT. Contents of hyaluronic acid and type Ⅲ pro-collagen in the supernatants were determined by radioimmunoassay. **Results** The

作者单位: 523018 东莞市, 广东省东莞市人民医院感染科(李发武、王文琦); 中南大学湘雅第二医院消化科(卢放根); 南方医科大学南方医院感染内科(余治健)

通讯作者: 李发武 Email: lifw94@163.com

expression of anti-PDGF siRNA plasmids could markedly inhibit the expression of PDGF-B mRNA and protein. These siRNAs can inhibit the proliferation of HSCs and downregulate the secretion of hyaluronic acid and type III pro-collagen. **Conclusions** The anti-PDGF siRNAs can inhibit the target RNA effectively and it may be a new therapy for liver fibrosis by inhibiting PDGF expression in HSCs by siRNA.

【Key words】 Platelet-derived growth factor; Small interfering RNA; Hepatic stellate cells

肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSCs)的活化和增殖是肝纤维化发生的关键环节^[1]。血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)与HSCs增殖和分泌细胞外基质密切相关,是HSCs的促增殖因子,在各种原因导致的肝纤维化肝组织和活化的HSCs中,PDGF均有较强表达;通过抑制PDGF表达和信号转导,可望抑制HSCs增殖,防止肝纤维化的发生与发展^[14]。小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)已证实能介导同源基因沉默,有望成为抗纤维化治疗的新手段^[5-7]。本研究针对大鼠PDGF-B链mRNA设计并合成3对siRNA序列,构建siRNA表达质粒,对siRNA抑制效果进行筛选并观察其对肝星状细胞的影响,体外探讨抗PDGF siRNA抑制肝纤维化进展的可能性。

材料和方法

一、材料与试剂

1. 细胞株和质粒:含H启动子的转录载体pSilencer3.1-H1hygro质粒(抗氨苄西林和潮霉素B)购于美国Ambion公司,HSC-T6细胞由中南大学湘雅医学院细胞中心引进并保存。

2. 主要试剂:T4 DNA连接酶、T4磷酸激酶、*Bam* H I和*Hind* III(大连宝生物公司产品),脂质体转染试剂Metafectene(德国Biontex公司产品),一抗、兔二抗IgG均为武汉博士德公司产品。

二、方法

1. HSC-T6细胞的培养:HSC-T6细胞置于含10%胎牛血清的DMEM培养基中(含青霉素100 U/ml、链霉素100 U/ml),37℃、5% CO₂的培养箱中培养。

2. 靶位的选择及siRNA的设计:靶位选择原则参照文献[5],选择PDGF-B mRNA作为靶链,根据PDGF-B链的全基因序列(www.pubmed.com, GeneID: 24628)设计3个siRNA序列,siRNA I的靶点为397~417 bp, siRNA II的靶点为589~609 bp, siRNA III的靶点为769~789 bp,经BLAST分析,未发现同源序列。

3. PDGF-B链siRNA表达载体的构建:(1) siRNA表达载体插入序列的合成:根据pSilencer3.1-H1hygro质粒上游限制位点为*Bam* H I,下游限制位点为*Hind* III, loop环序列为TTCAAGAGA,合成siRNA DNA的模板结构为*Bam* H I + 正义链 + loop + 反义链 + 终止信号 + *Hind* III。siRNA I的上游链为5'-GATCCGA

CGCGTACAGAGGTGTTCTTCAAGAGAGAACACCTCTGTACGCGTCTTTTTTGGAAA-3',下游链为5'-AGCTTTTCCAAAAAAGACGCGTACAGAGGTGTTCTCTCTTGAAGAACACCTCTGTACGCGTCG-3'; siRNA II 的上游链为5'-GATCCGCCAGTCTTCAAGAAGGCCTTCAAGAGAGGCCTTCTTGAAGACTGGCTTTTTTGGAAA-3',下游链为5'-AGCTTTTCCAAAAAAGCCAGTCTTCAAGAAGGCCTCTCTTGAAGGCCTTCTTGAAGACTGGCG-3'; siRNA III 的上游链为5'-GATCCGCACCGAAAGTTTAAGCACTTCAAGAGAGTGCTTAACTTTTCGGTGCTTTTTTGGAAA-3',下游链为5'-AGCTTTTCCAAAAAAGCACCGAAAGTTTAAGCACTCTCTTGAAGTGCTTAACTTTTCGGTGCG-3'。另外合成非同源序列(对照),对照序列的碱基构成与 siRNA 基本相同,但排序有 70% 的差异,且选择的 siRNA 和对照序列经 BLAST 分析,均未发现同源序列(以上单链片段均由上海英俊公司合成);(2)单链目的片段的退火连接:各取 2 μ l 合成的 siRNA DNA 序列,按 2 μ l 正义链 + 2 μ l 反义链 + 16 μ l 退火缓冲液加样,94℃退火自然冷却至室温;(3)siRNA DNA 序列与线性化 pSilencer3.1-H1hygro 的质粒连接按常规分子克隆技术进行,构建 siRNA I、II、III 表达质粒和对照质粒。

4. 质粒的克隆及抽提和鉴定:按《分子克隆》(第三版)操作步骤,将构建好的质粒在大肠埃希菌 DH5 α 克隆并用氨苄西林筛选,克隆得到的菌株通过质粒提取试剂盒(Qiagen 试剂盒)进行提取纯化。得到的质粒进行 *Bam* H I 和 *Hind* III 酶切鉴定,并进一步测序分析。

5. 质粒转染:待细胞生长融合达 70% 左右时,表达 siRNA 的 pSilencer 3.1-H1hygro 质粒与脂质体 Metafectene 共转染,混合比例为 1:4,转染步骤按脂质体说明书进行。转染后的 HSC-T6 细胞在 200 μ g/L 潮霉素 B 进行筛选 2~3 周后挑选阳性克隆,即转染质粒 siRNA I、II、III 和对照质粒的细胞株,大量传代后冻存。

6. 四唑盐(MTT)比色检测:将各组细胞株消化接种至 96 孔培养板,细胞数均为 2×10^3 个/孔,经过对数生长期,在 12 h、24 h、36 h、42 h、48 h 各时间点测 A 值,HSCs 悬浮于 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μ l/孔,继续培养 4 h,弃上清,每孔加入二甲基亚砷 200 μ l,震荡 10 min,在酶标仪上选择 570 nm 波长,以空白调零,测定各孔的吸光度(A)值,反映细胞增殖情况。

7. RT-PCR 检测 HSC-T6 细胞 PDGF-B 链 mRNA 表达:(1)RNA 抽提:收集细胞,按 Trizol 说明书抽提 RNA,琼脂糖电泳和分光光度计比色鉴定 RNA 的纯度和质量。RT-PCR 反应体系按照试剂盒(TaKaRa RNA PCR Kit Ver. 3.0)说明进行。PDGF-B 上游引物为 5'-GGTGAGAAAGATCGAAATTGT-3',下游引物为 5'-AGATTTGAGCCACTGGCAA-3',目的片段大小为 175 bp。内参照 GAPDH 基因引物:上游 5'-CATCCCACGGCAAGTTCAAT-3',下游为 5'-GGATGCAGGGATGATGTCT-3',目的片段大小为 489 bp。应用 GelWork 软件对凝胶电泳图进行扫描,计算半定量。抑制率用公式,抑制率 = [对照组(X) - siRNA 组(X)] / 对照组(X) 进行估算。

8. Western blot 分析:收集 siRNA 处理的细胞,常规制备蛋白电泳样品,定量后行蛋白电泳、转膜,分别加入一抗(抗-PDGF-B 抗体)、二抗,洗涤后灰度扫描检测 PDGF-B 量。

9. 放射免疫法分析:筛选的转染 siRNA I、II、III 及对照质粒的细胞和空白对照组细胞在培养 36 h 后,以放射免疫法检测上清液中透明质酸及 III 型前胶原含量。

三、统计学分析

实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 11.0 软件进行方差分析,两两比较用 t 检验。

结 果

一、重组质粒酶切及测序鉴定

按照质粒 pSilencer 3.1-H1hygro 说明书,使用 *Bam* H I 和 *Hind* III 酶切鉴定,重组质粒经酶切分析被酶切成两条 DNA 片段,一条 63 bp,另一条 4500 bp(图 1)。进一步测序分析表明,质粒所插入的表达 siRNA 的序列与设计相符。

二、MTT 比色检测 HSCs 增殖结果

MTT 比色结果(图 2)显示 36 h 是质粒 siRNA I、II、III 和对照组细胞株的增殖高峰,此后细胞均不再增殖,36 h 的 A 值(表 1)进行统计学分析显示质粒对照组和空白对照组间 A 值无显著性差异($P > 0.05$),而质粒 siRNA I、II、III 组的 A 值明显低于对照组(P 均 < 0.05)。其中质粒 siRNA I 对 HSCs 的抑制作用较明显,36 h 时抑制率为 34%。

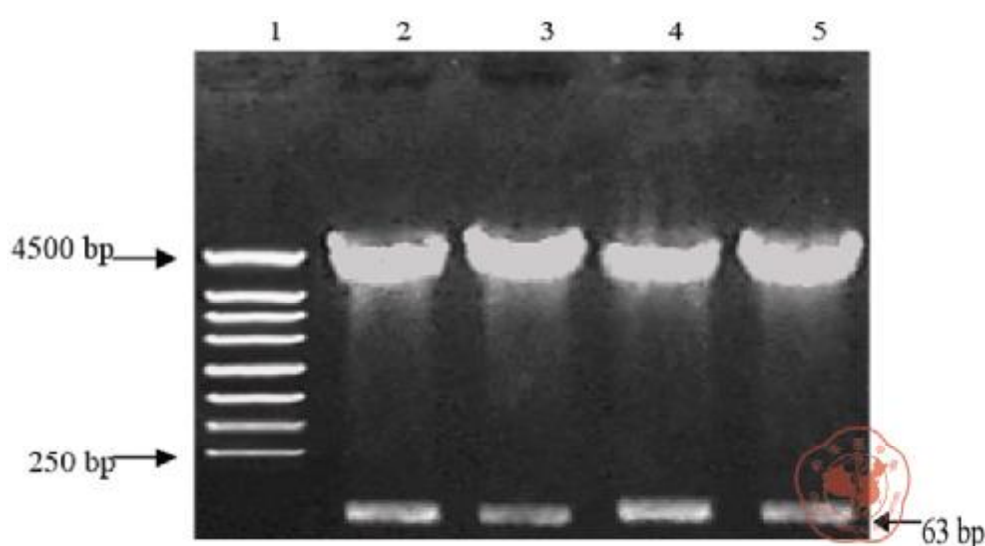


图 1 表达 siRNA 的质粒酶切鉴定

1 为 marker;2、3、4、5 分别为 siRNA I、II、III 及对照质粒酶切图

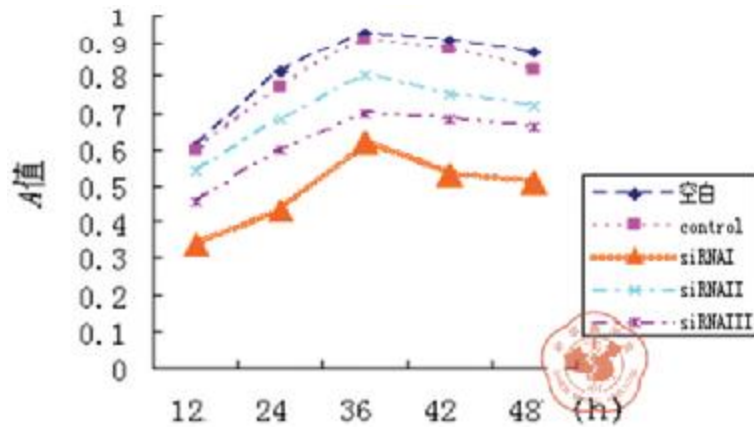


图2 MTT 观察各组 A 值

三、siRNA 对 PDGF-B 链 mRNA 的抑制作用

将同细胞数转染 siRNA I、II、III、对照质粒的筛选细胞株和空白细胞株(5组细胞)分别进行培养至 36 h, 然后进行定量 RT-PCR 检测分析(图 3 和表 1)。结果显示质粒对照组和空白对照组间 PDGF-B 链 mRNA 表达无显著性差异($P > 0.05$), 而质粒 siRNA I、II、III 组的 PDGF-B 链 mRNA 表达明显低于对照组(P 均 < 0.05), 其中质粒 siRNA I 的抑制效果较明显, 36 h 时抑制率为 86%。

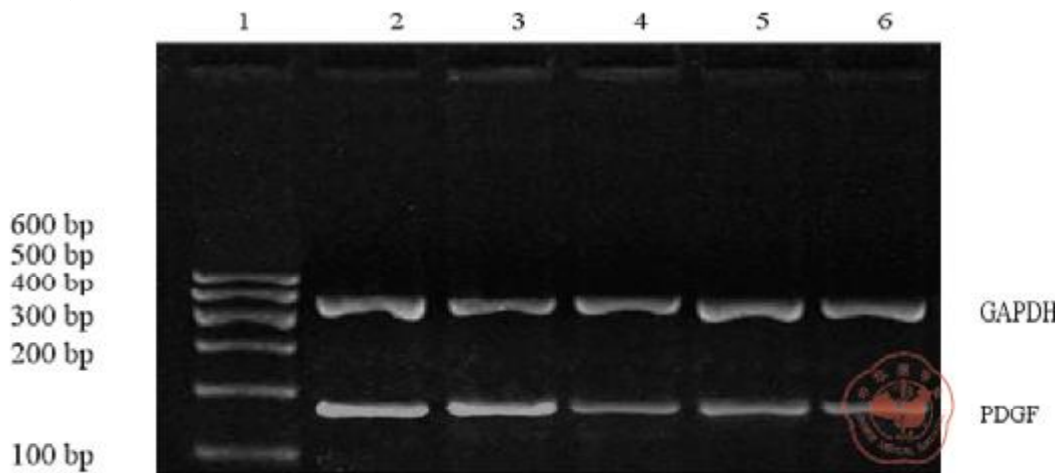


图3 siRNA 质粒对 HSCs PDGF-B 链 mRNA 表达的影响

1. marker; 2、3、4、5、6 分别为空白、control 质粒、及 siRNA I、II、III 的 RT-PCR 结果

四、Western blot 检测结果

将 5 组细胞株培养至 36 h, 经 Western blot 检测 PDGF-B 蛋白表达, 经计算机软件进行光密度扫描, 结果(图 4 和表 1)显示质粒对照组和空白对照组间无显著性差异($P > 0.05$), 而质粒 siRNA I、II、III 组 PDGF-B 蛋白表达均较对照组明显减低(P 均 < 0.05), 其中质粒 siRNA I 的抑制效果较明显, 抑制率为 90%。

五、放射免疫法检测结果

将各组细胞株培养至 36 h, 放射免疫法检测上清液中透明质酸($\mu\text{g/L}$)及 III

型前胶原($\mu\text{g/L}$)含量。结果(表1)显示质粒对照组和空白对照组间无显著性差异($P > 0.05$),而质粒 siRNA I、II、III组细胞株上清中透明质酸及III型前胶原含量表达均较对照组明显减低(P 均 < 0.05)。

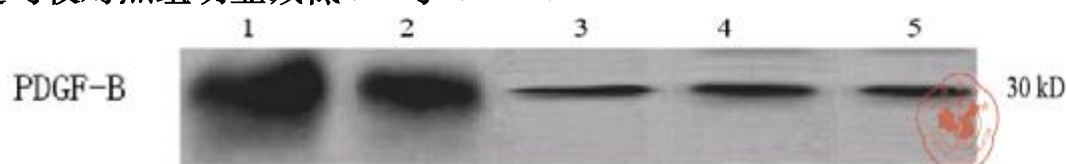


图4 siRNA 质粒对 HSCs PDGF-B 蛋白表达的影响
1、2、3、4、5 分别为空白、control 质粒及 siRNA I、II、III Western blot 结果

表1 MTT、RT-PCR、Western blot、放射免疫测试结果($\bar{x} \pm s$)

	MTT (36 h)(A)	RT-PCR	Western blot	透明质酸($\mu\text{g/L}$)	III 胶原($\mu\text{g/L}$)
空白对照	0.94 ± 0.03	1.42 ± 0.15	1.35 ± 0.10	810 ± 24	81 ± 5
对照组	$0.91 \pm 0.04^*$	1.30 ± 0.09	1.34 ± 0.86	781 ± 16	75 ± 9
SiRNA I	$0.62 \pm 0.03^{\Delta\#}$	$0.19 \pm 0.04^{\Delta\#}$	$0.19 \pm 0.07^{\Delta\#}$	$212 \pm 31^{\Delta\#}$	$22 \pm 5^{\Delta\#}$
SiRNA II	$0.80 \pm 0.04^{\Delta}$	$0.77 \pm 0.05^{\Delta}$	$0.69 \pm 0.06^{\Delta}$	$516 \pm 73^{\Delta}$	$51 \pm 14^{\Delta}$
SiRNA III	$0.70 \pm 0.02^{\Delta}$	$0.41 \pm 0.05^{\Delta}$	$0.49 \pm 0.07^{\Delta}$	$312 \pm 30^{\Delta}$	$40 \pm 9^{\Delta}$

注: Δ : 与对照组和空白组分别比较 P 均 < 0.05 ; *: 与空白组比较 $P > 0.05$; #: 与 siRNA II、III 组分别比较 $P < 0.05$

讨 论

小分子干扰 RNA (siRNAs) 是长度为 21 ~ 23 核苷酸片段, 其在效应阶段通过双链结合一个核酶复合物形成所谓 RNA 诱导沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 能高效、特异地阻断体内特定基因表达, 使其下游基因沉默, siRNAs 作为一种转录后基因沉默的强大工具已被广泛重视, 这种技术在抗病毒和抗纤维化的治疗中已经受到广泛的重视^[6-10]。目前研究认为 HSCs 的激活是肝纤维化发生的重要原因, PDGF 能明显促进 HSCs 增殖和分泌细胞外基质的能力, 而且参与多种原因所致肝纤维化的发生发展, 其中 PDGF-AB 和 PDGF-BB 均与肝纤维化有密切关系^[3,4]。因此, 本文通过构建 PDGF-B 链 mRNA 的 siRNAs 试图通过阻止 PDGF 的合成和分泌, 探讨肝纤维化治疗的新的有效手段。

为提高 siRNA 的稳定性, 我们设计了转录发夹状 siRNA 的 DNA 质粒, RT-PCR 和 Western blot 结果表明我们设计的 3 条 PDGF-B 链 mRNA 的 siRNA I、II、III 均能靶向抑制肝星状细胞 PDGF-B 链 mRNA 和 PDGF 蛋白的表达, 而对照质粒对肝星状细胞的影响和空白组没有差异。本研究还发现 siRNA I 抑制肝星状细胞 PDGF-B 链 mRNA 和 PDGF 蛋白表达作用较另外两种 siRNA 质粒明显, 36 h 时对 PDGF-B 链 mRNA 的抑制率均达到 86%, 不同 siRNA 对目标片段的抑制效果不尽相同, 这可能与片段的序列和作用位点有关^[5,6]。

MTT 法能较好的反应细胞增殖情况, 本实验中 siRNA I、II、III 的 A 值均明显低于对照组 (P 均 < 0.05), 而对照组的 A 值与空白组没有区别 ($P > 0.05$), 这一结果显示 3 种 siRNA 均对 HSCs 的增殖分裂有抑制作用, 数据显示 siRNA I 对

HSCs 的增殖抑制作用较强。透明质酸及Ⅲ型前胶原是反映肝纤维化发生发展动态变化较灵敏的两种 ECM 成分, HSCs 被认为是肝纤维化时肝内 ECM 的主要来源^[1]。放射免疫结果显示, 抑制 PDGF 表达的 siRNA 对 HSCs 分泌透明质酸及Ⅲ型前胶原有明显抑制作用。该实验结果表明 PDGF siRNA 不仅能显著靶向抑制 HSCs 的 PDGF 基因和蛋白表达, 且能通过抑制 PDGF 的表达, 从而抑制 HSCs 增殖并减少透明质酸及Ⅲ型前胶原的合成与分泌, 这一结果也说明 siRNA 介导的 PDGF 沉默可能成为各种原因导致的肝纤维化的一种新的治疗途径。

参 考 文 献

- 1 Tangkijvanich P, Yee HF Jr. Cirrhosis-can we reverse hepatic fibrosis? Eur J Surg Suppl. 2002;587:100-112.
- 2 Czochra P, Klopceic B, Meyer E, et al. Liver fibrosis induced by hepatic overexpression of PDGF-B in transgenic mice. J Hepatol. 2006;45:419-428.
- 3 Patsenker E, Popov Y, Wiesner M, et al. Pharmacological inhibition of the vitronectin receptor abrogates PDGF-BB-induced hepatic stellate cell migration and activation in vitro. J Hepatol. 2007;46:878-887.
- 4 Kanazawa S, Miyake T, Kakinuma T, et al. The expression of platelet-derived growth factor and connective tissue growth factor in different types of abdominal aortic aneurysms. J Cardiovasc Surg (Torino). 2005;46:271-278.
- 5 Gonzalo T, Beljaars L, van de Bovenkamp M, et al. Local inhibition of liver fibrosis by specific delivery of a platelet-derived growth factor kinase inhibitor to hepatic stellate cells. J Pharmacol Exp Ther. 2007;321:856-865.
- 6 Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference double-stranded RNA in caenorhabditis elegans. Nature. 1998;391:806-810.
- 7 Couzin J. Small RNAs make big splash. Science. 2002;298:2296-2297.
- 8 Novina CD, Murray MF, Dykxhoorn DM, et al. SiRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. Nature Med. 2002;8:681-686.
- 9 Seo MY, Abrignani S, Houghton M, et al. Small interfering RNA-mediated inhibition of hepatitis C virus replication in the human hepatoma cell line Huh-7. J Virol. 2003;77:810-812.
- 10 Borkham-Kamphorst E, Stoll D, Gressner AM. Antisense strategy against PDGF B-chain proves effective in preventing experimental liver fibrogenesis. Biochem Biophys Res Commun. 2004;321:413-423.

(收稿日期:2008-01-22)

(本文编辑:王丹静)

李发武, 卢放根, 余治健, 等. 抗血小板衍生生长因子小干扰 RNA 表达质粒构建及其对肝星状细胞的影响[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2008, 2(2): 6-12.