

抑制 Smad3 的 pSUPER RNAi 系统的构建和活性鉴定

张东山^{1,2}, 刘伏友¹, 彭佑铭¹, 熊关钟², 柴湘平²

(中南大学湘雅二医院 1. 肾内科; 2. 急诊科, 长沙 410011)

[摘要] 目的: 构建抑制 Smad3 的 shRNA 表达载体。方法: 化学合成 2 段编码短发夹 RNA 序列的、靶向 Smad3 的寡核苷酸, 各 64 个碱基, 退火, 克隆到经 *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切同时经牛小肠碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, CIP) 处理后的 pSUPER 载体的 poly III H1 启动子的下游, 重组构建 RNA 干扰(RNA induced interference, RNAi) 质粒, 同时设立错义寡核苷酸作为非特异性对照。并将所构建的 pSUPER Smad3 转染到人类肾小管上皮细胞(human renal tubular epithelial cells, HKC), 检测其抑制效果。结果: 重组构建的 pSUPER Smad3 载体经双酶切电泳分析及插入基因片段序列分析, 结果表明 64 个碱基成功插入到预计位点, 并且序列完全一致。体外活性鉴定表明其能成功地抑制 Smad3 的基因和蛋白表达, 却不影响 Smad2 的表达。结论: 载体成功构建, 其在体外抑制效率高, 且特异性好。

[关键词] pSUPER 载体; Smad3; RNA 干扰; 肾小管上皮细胞

[中图分类号] R692.9; Q784 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2007)06-1042-05

Construction and activity evaluation of pSUPER RNAi system that inhibits Smad3

ZHANG Dong-shan^{1,2}, LIU Fu-you¹, PENG You-ming¹, XIONG Guan-zhong², CHAI Xiang-ping²

(1. Department of Nephrology; 2. Department of Emergency, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract: **Objective** To construct the expressing vector of siRNA which can inhibit the Smad3 activity. **Methods** Sixty-four bases of 2 pair oligos for hairpin in RNA expression which targeted *Smad3* gene were chemically synthesized and annealed. pSUPER vector was linearized with *Bgl* II and *Hind* III treated with alkaline phosphatase (CIP). Annealed oligos were inserted into the downstream of the treated pSUPER's poly III H1 promoter to construct RNAi plasmid (pSUPER Smad3). Oligos with a scrambled sequence were used as a negative control. pSUPER Smad3 was transfected into human renal tubular epithelial cells (HKC). **Results** Recombinant pSUPER Smad3 vector was identified by the digestion with *Eco*R I and *Hind* III, and confirmed by the sequencing analysis with T3 primer. Sixty-four bases had been inserted into the expected site. Furthermore, the insertion sequence was exactly corrected. The activity evaluation indicated that mRNA and protein of Smad3 but not Smad2 were inhibited by pSUPER Smad3 in HKC. **Conclusion** The pSUPER Smad3 system has been constructed successfully, and has high inhibition and specificity in vitro.

Key words: pSUPER vector; Smad3; RNA induced interference; renal tubular epithelial cells

[J Cent South Univ (Med Sci), 2007, 32(6): 1042-05]

RNAi 2002 年被 Science 评为全球科研十大突破之一,这一技术作为一种简单的、有效的代替基因敲除的工具,在功能基因组学领域掀起一场真正的革命。目前它被广泛用于肿瘤和病毒所致疾病的研究^[1]。RNAi 的作用机制是通过活化的小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 靶向降解目的 mRNA,从而使目的基因表达沉默,但长 dsRNA 不能产生 RNAi 活性,在哺乳动物中也就不是特异基因沉默的自然方式^[2]。而 21 ~ 23 nt 的短片断双链 RNA 分子,能够以同源互补序列的 mRNA 为靶目标降解特定的 mRNA^[3]。产生 siRNA 的方法主要有 5 种:化学合成、体外转录、长片断 dsRNAs 经 Rnase III 类降解、siRNA 表达载体或者病毒载体在细胞中表达 siRNAs 和 PCR 制备的 siRNA 表达框在细胞中表达^[4]。由于使用载体价格中等,操作简单,并且可以维持较长时间的基因沉默,可以用抗生素筛选等优点,故本研究选择一种 siRNA 表达载体 pSUPER 3.176 kb^[3]。

肾间质纤维化是一种由多种临床疾病包括尿路梗阻、慢性炎症、糖尿病等所致的渐进的、潜在的致命性疾病。TGF- β 启动肾小管上皮细胞转化为间质成纤维细胞,而后者是细胞外基质积聚的来源,最终导致不可逆的肾衰。最近的研究表明,Smad 蛋白是 TGF- β 从细胞膜到细胞核信号级连放大的核心组成部分,T β R II 和 TGF- β 配体结合后,激活 T β R I; T β R I 再磷酸化激活 Smad 2 和 Smad 3,并直接和 Smad4 结合形成复合物转入核内,转录调控靶基因^[5]。虽然 Smad 2 和 Smad 3 同源性很高,但两者作用不同。最近的证据表明,TGF- β 致纤维病变前作用绝大部分是由 Smad3 介导的^[6]。通过抑制其表达可以用来抗纤维化。故选择 *Smad3* 基因作为 RNAi 的作用靶点,构建抑制 Smad3 的 shRNA 表达载体,并鉴定其活性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

1.1.1 主要试剂 PBS 缓冲液、0.05% 胰蛋白酶、DMEM 培养液、100 U/mL 青霉素、胎牛血清均为 Gibco/BRL 公司产品;新生牛血清为杭州四季青公司产品;Dispase II 分离酶为 Brehringer Mannheim 公司产品;I 型胶原酶为 Washington 公司产品;OligofectamineTM Reagent 为 Invitrogen lifetechnologies 产品;DMEM 培养液为 Gibco/BRL 公司产品。

本室 HKC 系。质粒、酶、pSUPER 质粒为 Clontech 公司产品,大肠杆菌 JM109 购自天为时代科技公司;限制性内切酶、牛小肠碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, CIP)、T 4 多核苷酸激酶 (polynucleotide kinase, PNK) 购自 MBI 公司, T4DNA 连接酶购自 GENE 公司。胶回收试剂盒购自上海华舜公司,小量质粒提取试剂盒 (plasmid minikit) 购自 QIAGEN 公司。DNA 由赛百盛生物技术公司合成。

1.1.2 仪器 PCR 仪为杭州产 TC-25/H 型,电泳仪为 CBS 公司产品,型号为 MGU-102T, ALPHAIMAGER 2200 凝胶图象分析系统为美国 Alpha 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 Smad3-siRNA 靶序列的选择 订购 4 段编码短发夹 RNA 序列的 DNA 单链,两两成对,一对为实验序列靶向 *Smad3* 基因的寡核苷酸,其它与 Forward 序列的中间部分反向互补,另一对为非特异对照的寡核苷酸,针对 Smad3 靶位设计的序列 forward 序列为: 5'-GATCCCCGCCATCACCACG-CAGAAC TTCAAGAGAGTTCTGCGTGATGGCC TTT-TTGAAA3'-; reverse 序列为: 5'-AGCTTTTC-CAAAAAGGCCATCACCACGCAGAAC TCTCTGAA GTT-CTGCGTGATGGCC GGG-3'; 非特异对照的序列 forward 序列为: 5'-GATCCCCGCGCGCAAAGTAGGAT-TGCTTCAAGAGAGCAATCCTACTTTGCGCGCTTT TTTT-GGAAA-3'; reverse 序列为: 5'-AGCTTTTC-CAAAAAAAGCGCGCAAAGTAGGATTGC TCTCTGAA-GTTCTGCGTGATGGCC GGG-3' 各 64 nt, 其中一段 19 nt 的编码序列同特异的靶基因同源、另一段 19 nt 的序列与其(下划线)反义互补,中间由短的 9 nt 的 spacer 区(大写字母)相隔,单链两端包含保护碱基和 *Bgl* II 和 *Hind* III 酶切残基,能直接与经 *Bgl* II 和 *Hind* III 酶切的载体连接。这 4 条寡核苷酸由上海吉凯生物公司合成。同时设计一对非特异序列作为对照,与实验序列碱基组成相同,但排列顺序不同。经过 The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 检索,与同种属的其它基因无同源性。

1.2.2 寡核苷酸与 pSUPER 的连接

1.2.2.1 寡核苷酸的退火 将合成的寡核苷酸溶解在 50 μ L H₂O 中,终浓度为 3 g/L。依次按以下步骤操作: 5'引物、3'引物 Oligos 各取 1 μ L; 加入 48 μ L 的退火缓冲液,在 95 $^{\circ}$ C 孵育 4 min, 70 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 缓慢冷却至 4 $^{\circ}$ C。

1.2.2.2 寡核苷酸的磷酸化 取 2 μL 退火的寡核苷酸, 1 μL T4 PNK 缓冲液, 1 μL 1 mmol/L ATP(储存液 10 mmol/L), 1 μL T4 PNK, 5 μL H_2O , 在 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 30 min, 70 $^\circ\text{C}$ 孵育 10 min(灭活 PNK)。

1.2.2.3 pSUPER 的处理 用 *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切 pSUPER^[9], 反应体积 20 μL , 37 $^\circ\text{C}$ 过夜。加 CIP 去除酶切后载体 5'磷酸基团, 在酶切管中加入 10 \times 反应缓冲液 5 μL 、灭菌双蒸水至 24 μL 和 CIP 1 μL , 混匀后 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 30 min, 85 $^\circ\text{C}$ 15 min 终止反应。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳。在凝胶成像系统的紫外灯照射下, 割下 3.1 kb 的大片段, 用胶回收试剂盒回收。

1.2.2.4 寡核苷酸与 pSUPER 连接 实验分为 3 管: 第 1 管为靶向 Smad3 的寡核苷酸与 pSUPER 连接, 重组后的载体命名为 pSUPER-shSmad3; 第 2 管为非特异对照寡核苷酸与 pSUPER 连接, 重组后的载体命名为 pSUPER-shNC; 第 3 管为连接、转化反应的阴性对照, 即只有处理后的 pSUPER, 无寡核苷酸, 排除载体自身连接的可能。按常规操作方法连接并将重组载体转化感受态细胞 JM 109 后提取质粒。

1.2.3 阳性克隆鉴定

1.2.3.1 酶切鉴定 用 *Eco* RI 和 *Hind* III 酶切重组质粒, 同时用双酶切 pSUPER 做对照, 所有各管于 37 $^\circ\text{C}$ 水浴过夜。再用 2% 的凝胶电泳鉴定, 即取 10 μL 样品在 1% 琼脂糖凝胶和 TAE 缓冲液中 120 V 电泳 1 h, 在凝胶成像系统中观察结果。阳性克隆应该切出大约 300 bp 的小条带, 而空质粒只有 240 bp。

1.2.3.2 测序鉴定 为了进一步从序列的准确性上得到验证, 将 *Eco* RI 和 *Hind* III 酶切后电泳出现 300 bp 的阳性重组质粒送到北京六合生物工程技术有限公司测序, 使用 T3 通用引物。

1.3 实验分组 HKC 细胞用含 5% 的胎牛血清及 100 mg/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DEME/F12 培养基传代培养, 培养条件为 37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 。将传代的 HKC 细胞分为 3 组: (1) 无血清阴性对照组 (untreatment group, 以下简称 un 组); (2) pSUPER-shNC 组 (control 组); (3) pSUPER-shSmad3 组 (shSmad3 组), 于转染后 12 h 换为完全培养基。进一步孵育 48 h。提取 RNA 和蛋白检测目的基因的变化。每组实验重复 3 次。

1.4 RT-PCR 分析 利用 Trizol 一步法提取细

胞总 RNA, 取 10 μg 总 RNA 进行 RT-PCR。PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳各反应以 GAPDH 作为反应参照, 用 UVP22000 凝胶图像分析系统并进行半定量分析。采用的引物序列及反应参数如下: 3 磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 上游: 5'-AAC-GACCCCTTCATTGAC-3', 下游: 5'-TCCACGACATACTCAGCA-3'。反应参数为 94 $^\circ\text{C}$ 3 min, 94 $^\circ\text{C}$ 30 s, 58 $^\circ\text{C}$ 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 10 min 共 30 个循环, 扩增片段为 191 bp。Smad2 上游: 5'-TCA-CAGCCATCATGAGCTCAAGG-3', 下游 5'-TGTGACG-CATGGAAGGTCTCTC-3', 反应参数为 94 $^\circ\text{C}$ 3 min, 94 $^\circ\text{C}$ 1 min, 58 $^\circ\text{C}$ 1 min, 72 $^\circ\text{C}$ 1 min, 72 $^\circ\text{C}$ 10 min 共 30 个循环, 扩增片段为 432 bp。Smad3 上游: 5'-AGCACACAATAACTTGGACC-3', 下游: 5'-TAA-GACACACTGGAACAGCGGATG-3'。反应参数为 94 $^\circ\text{C}$ 3 min, 94 $^\circ\text{C}$ 1 min, 60 $^\circ\text{C}$ 1 min, 72 $^\circ\text{C}$ 1 min, 72 $^\circ\text{C}$ 10 min 共 30 个循环, 扩增片段为 636 bp。

1.5 细胞总蛋白质的提取及 Western 免疫印迹

提取细胞总蛋白, SDS-PAGE 电泳后, 恒电流转至硝酸纤维素膜 (200 mA, 2.5 h), 然后用 5% 的牛血清白蛋白 (BSA) 溶液封闭 2 h, 加小鼠抗 Smad2/3 多克隆抗体 (1:1 000 稀释), 4 $^\circ\text{C}$ 过夜, 洗涤后加辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗小鼠 IgG 反应 1 h, 免疫印迹化学发光试剂 (ECL) 显影。在同一张膜上测定山羊抗 β -Actin (1:100 稀释) 蛋白表达作为参照。用凝胶图象分析系统进行半定量分析。

1.6 统计学处理 所有数据均用微软 Excel 软件进行分析, 两样本间均数比较行独立样本 t 检验, 多个样本间比较行单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 重组质粒酶切结果及测序 将菌落扩增后提取质粒, 酶切鉴定结果显示, 在重组的质粒中, 只有 Lane1, Lane2, Lane3 (pSUPER-shSmad3), Lane4, Lane5 (pSUPER-shNC) 显示的重组质粒酶切的小片段与其它质粒不同, 位置在 300 bp 左右, 可能是重组的阳性载体; 而 Lane6 和 Lane7 菌落提取的质粒酶切的小片段在 240 bp 左右, 与对照 Lane8 中的 pSUPER 质粒双酶切的小片段位置一致, 说明这 Lane6 和 Lane7 菌落提取的质粒是空质粒, 没有寡核苷酸插入。各条泳道均显示出一

条明亮的 3 kb 的条带,与 pSUPER 由 3.176 kb 的碱基

组成一致(图 1)。测序结果表明完全正确(图 2)。

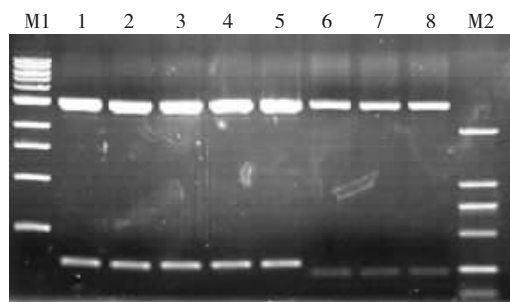


图 1 重组质粒用 *EcoR*I 和 *Hin*d III 双酶切鉴定 1~5:300 bp; 6~8:240 bp; M1:10 kb; M2:1 kb

Fig. 1 Electrophoresis pattern of recombinant vector digested with *EcoR*I and *Hin*d III small DNA fragment Lanes 1~5: 300 bp; Lane 6~8:240 bp; M1:10 kb; M2:1 kb

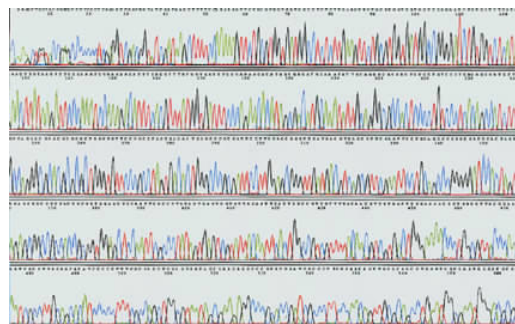


图 2 重组质粒测序图谱 与设计合成的靶向 *Smad3* 的 Reverse 链完全一致

Fig. 2 Sequencing map of recombinant vector It was similar to the targeted *Smad3* gene sequence

2.2 RT-PCR 检测 pSUPER-shSmad3 对 HKC *Smad2/3* mRNA 表达的影响 结果表明,与无血清阴性对照组和 pSUPER-shNC 组比较, pSUPER-shSmad3 能显著下调 *Smad3* mRNA 表达 ($P < 0.05$),对 *Smad2* 表达没有影响 ($P > 0.05$)。

2.4 Western 免疫印迹检测 pSUPER-shSmad3 对 HKC *Smad2/3* mRNA 蛋白表达的影响 Western 免疫印迹证实,与无血清阴性对照组和 pSUPER-shNC 组比较, pSUPER-shSmad3 能显著下调 *Smad3* 的蛋白表达 ($P < 0.05$),对 *Smad2* 表达没有影响 ($P > 0.05$)。

3 讨 论

肾小管间质纤维化是多种进展性损害致慢性肾衰的共同特征, TGF- β 在损伤应激反应如单侧输尿管梗阻中明显上调,启动上皮细胞间质转化并使细胞外基质的积聚从而促进肾纤维化^[6], *Smad3* 主要介导 TGF- β 的致纤维效应。尽管 *Smad3* 敲除鼠能减轻单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化,但由于 *Smad3* 在 TGF- β 调控 T 淋巴细胞活化和黏膜免疫方面具有重要作用, *Smad3* 敲除鼠其黏膜免疫力严重破坏,出生后的 1~6 月死于严重感染^[6-7],因此在肾脏局部抑制 *Smad3* 成为抗纤维化治疗的新手段,但目前还缺乏抑制该基因的有效手段。

RNAi 通过内源性表达或外源性介导 siRNA,以序列特异性的方式有效抑制内源性基因的表

达,目前已成为广泛应用的研究基因功能的有力工具,且有潜在的药物研究和开发价值。以质粒 DNA 为载体转染哺乳动物细胞,利用细胞中 RNA 聚合酶持续转录合成 RNA,这种 RNA 内部互补折叠形成发夹样结构,在细胞内酶的作用下迅速形成 siRNA,可在更长的时间内抑制靶基因的表达^[8]。由于 pSUPER 载体上的 *H1* 基因启动子能精确地定位转录的开始,其终止信号包括 5 个连续的 T,并且精确地在第 2 个 T 后导致合成 siRNAs 的转录装配终止,形成内源性表达的 RNA。其正义链(19nt)的 3'端与反义链(19nt)的 5'端由 9bp 的环连接,互补折叠形成发夹样结构,3'端悬挂 5 个 U,此种结构的 RNA 与体外合成的 siRNA 一样,能有效地诱导靶基因的 RNAi,故选择 pSUPER 作为载体^[9]。

本研究成功地将编码针对 *Smad3* shRNA 的 DNA 模板,定向克隆至 pSUPER 载体 H1 启动子的下游,双酶切电泳及插入基因片段进行序列分析,结果表明 64 个碱基成功地插入到预计位点,并且序列完全一致。为鉴定其活性,将 pSUPER *Smad3* 质粒转染 HKC,从 *Smad2/3* 的 mRNA 和蛋白表达水平等方面检测对 *Smad3* 的抑制作用,结果表明抑制非常成功,并且特异性好,不影响 *Smad2* 的表达。这为进一步体内抑制实验打下了基础。

参考文献:

- [1] Lee N S, Dohjima T, Bauer G, et al. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human

- cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(5):500-505.
- [2] Sui G, Soohoo C, Affarel B, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(8):5515-5520.
- [3] Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells [J]. *Science*, 2002, 296(5567):550-553.
- [4] 沈维干. RNA 干扰的研究方法 [J]. *实用临床医药杂志*, 2003, 7(1):73-74.
SHEN Wei-gan. The research methods of interfering RNAs [J]. *Journal of Clinical Medicine in Practice*, 2003, 7(1):73-74.
- [5] Heldin C H, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins [J]. *Nature*, 1997, 390(6659):465-471.
- [6] Sato M, Muragaki Y, Saika S, et al. Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(10):1486-1494.
- [7] Yang X, Letterio J J, Lechleider R J, et al. Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF-beta [J]. *EMBO J*, 1999, 18(5):1280-1291.
- [8] Chang J T, Chen Y L, Yang H T, et al. Differential regulation of telomerase activity by six telomerase subunits [J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269(14):3442-3450.
- [9] Shi Y. Mammalian RNAi for the masses [J]. *Trends in Genetics*, 2003, 19(1):9-12.

(本文编辑 傅希文)

《中南大学学报(医学版)》

征 稿 启 事

《中南大学学报(医学版)》原名《湖南医科大学学报》,创刊于1958年,为教育部主管、中南大学主办的国家级医药卫生类综合性学术期刊;是中文核心期刊、中国科技论文统计源期刊;多次被国家和省部级新闻和出版部门评为优秀科技期刊;已被美国医学文献分析和联机检索系统(MEDLINE)及其《医学索引》(IM),荷兰《医学文摘》(EM),美国《化学文摘》(CA),俄罗斯《文摘杂志》(AJ, VINITI),中国科学引文数据库(核心库)(CSCD)等国内外多家重要数据库和权威文摘期刊收录。

本刊已开辟述评、论著、综述、病例报告、科研快报等栏目。现面向全国高等医药院校、医药卫生系统和海外相关研究机构的作者征集优秀的中、英文稿件,尤其欢迎国家攻关项目、重点科研项目及重大基金资助课题的有关研究论文,已设置相关研究报道专栏,并为优质稿件开设“绿色通道”。

地址:湖南省长沙市湘雅路110号湘雅医学院75号信箱

邮编:410078

电话:0731-4805495;0731-4805496

传真:0731-4804351

E-mail: xyxb2005@VIP.163.com; xyxb2005@126.com

投稿网址: [Http://xybx.xysm.net](http://xybx.xysm.net)