

· 论 著 ·

siRNA 对外培养红系细胞 α -珠蛋白基因表达的影响*罗琳, 赖永榕[△], 刘容容

(广西医科大学第一附属医院血液内科, 南宁 530021)

摘要:目的 研究针对 α -珠蛋白基因的小分子干扰 RNA (siRNA) 对外培养红系细胞 α -珠蛋白肽链 mRNA 表达的影响。方法 将针对 α -珠蛋白肽链设计、化学方法合成的 siRNA 通过脂质体转染体外培养正常人的红系细胞, 在转染后 24、48、72 h, 用流式细胞术检测转染效率, RT-PCR 检测 α 链 mRNA 表达水平。结果 脂质体转染 FCM 标记的 siRNA 进入红系细胞后, 24、48、72 h 的转染效率分别为 61.2%、44.3%、33.7%。siRNA 作用于体外培养的红系细胞, 经 RT-PCR 检测, 转染后 α -珠蛋白基因 mRNA 相对表达量下降, 浓度越高, 相对表达量越低。随着作用浓度增加, 红系细胞台盼兰拒染率越低; 且作用时间越长, 台盼兰拒染率也越低。结论 脂质体转染 siRNA 能特异性地抑制体外培养的红系细胞中 α -珠蛋白基因表达, 可能会成为 β -珠蛋白生成障碍性贫血基因治疗的一个新靶点。

关键词: β -珠蛋白生成障碍性贫血; 小分子干扰 RNA; α -珠蛋白; 基因治疗

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.20.011

中图分类号: R556.61; R459.9

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)20-2724-03

Effect of small interfering RNA on the Alpha-globin gene expression in erythroid cells cultured in vitro*

LUO Lin, LAI Yong-rong[△], LIU Rong-rong

(Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the effects of small interfering RNA (siRNA) targeting alpha-globin gene on the expression level of alpha-globin chain mRNA in erythroid cells cultured in vitro. **Methods** siRNA for alpha-globin gene was designed and chemical synthesized, and transferred into the normal adult donor originated erythroid cells cultured in vitro with liposome-induced gene transfection. After transfection, at the time of 24, 48, 72 h, the transfection efficiencies were inspected by flow cytometry, the level of mRNA in alpha-globin gene was detected by real-time quantitation PCR. **Results** Liposomal could effectively transfect the FCM-labeled siRNA into erythroid cells cultured in vitro. The transfection efficiencies were 61.2%, 44.3%, 33.7% at 24, 48, 72 h respectively. Results of RT-PCR indicated siRNA could down-regulated alpha-chain mRNA expression. The inhibition efficiency was higher as the siRNA concentration increased. The trypan blue exclusion rates of erythroid cells were decreased as the concentration increased and time lasts. **Conclusion** The siRNAs targeting alpha-globin gene transferred into erythroid cells cultured in vitro with liposome-induced gene transfection can down-regulate the alpha-chain mRNA expression level, which may be the new target for gene therapy in β -thalassemia.

Key words: beta-thalassemia; small interfering RNA; alpha-globin; gene therapy

对重型 β -珠蛋白生成障碍性贫血, 目前临床上缺乏有效的治疗手段。基因治疗是珠蛋白生成障碍性贫血治疗的希望。基因治疗靶向首选的是调控 β 珠蛋白基因, 其次是减少 α/β 珠蛋白链的不平衡。减少 α 珠蛋白链的合成, 改善 α 与非 α 链珠蛋白的合成失衡, 减少红细胞内包涵体的形成, 减少溶血, 改善 β -珠蛋白生成障碍性贫血症状, 这一新的治疗方式引起了人们的兴趣。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是近年来新发现的一种重要的基因表达调控方式, 自 1998 年发现 RNAi 以来^[1], 其机制研究和应用突飞猛进。本研究设计靶向 α -珠蛋白基因的小分子干扰 RNA (siRNA), 经脂质体 (Oligofectamine, Invitrogen, Ca. t No. 12252-011) 转染体外培养的红系前体细胞, 从分子水平部分抑制 α -珠蛋白基因表达, 减少 α 珠蛋白肽链合成, 筛选获得有效抑制 α -珠蛋白基因的 siRNA 及最佳作用浓度, 为后期选取适宜的 siRNA 作用于体外培养的重型 β -珠蛋白生成障碍性贫血患者的红系细胞提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 体外液体培养正常人外周血红系细胞 用 CS-3000 plus 血细胞分离机采集 rhG-CSF 动员的正常移植供者外周血 0.5

~1 mL, 制备单个核细胞 (MNC) 悬液。调整细胞浓度至 $5 \sim 6 \times 10^6$ 个/mL, 参照 Wojda 等^[2] 方法, 加入 RPMI-1640 培养基, 内含 1% 牛血清蛋白、 10^{-4} mol/L 2-巯基乙醇、2 mmol/L L-谷氨酰胺、 10^{-6} mol/L 地塞米松、30% 胎牛血清和 3 u/mL rhEpo、总体积为 10 mL、混匀后放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱中连续培养, 每 4 天更换全部旧培养基 1 次, 加入等体积新鲜培养基 (含相同浓度的上述成分)。换液同时取部分细胞, 制片染色, 观察培养的红系细胞形态学特征。

1.2 siRNA 设计、合成 从基因库获得 α -珠蛋白基因 mRNA 全序列 (GenBank: NM000517), 应用 Ambion 公司的在线 siRNA 序列设计工具, 选择 3 条 siRNA, 并用前期预实验进行分析和筛选; 获得最佳 siRNA: Sense 5'-AGG UUA AGG GCC ACG GCA ATT-3', Antisense 5'-UUG CCG UGG CCC UUA ACC UGG-3'。siRNA 由上海 Genepharma 公司合成、纯化、分装, 并在 5' 端标记荧光 (FAM), 以检查转染效率。同时合成与目的基因序列无同源性的阴性对照组及 GAPDH 阳性对照组。

1.3 siRNA 的脂质体转染 按照脂质体说明书的步骤操作,

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30860307); 广西自然科学基金资助项目 (桂科青 0832036)。 [△] 通讯作者: E-mail: laiyongrong@263.net。

在转染前 1 d 将红系细胞按 5×10^5 个/mL 在无血清条件下接种于 24 孔培养板, 脂质体、siRNA 均用 Opti-MEM I Medium (Invitrogen, Ca. t No. 31985-062) 溶解, siRNA 组设定 5 个终浓度: 40、80、120、160、200 nmol/L。同时设阴性对照组、空白对照组。置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养 72 h。

1.4 流式细胞仪检测脂质体转染效率 分别于 siRNA 作用 24、48、72 h 后, 取部分细胞, 经 PBS 洗涤 2 次, 应用流式细胞仪 (Beckman Coulter 公司产品, Epics XL 型) 进行检测, 数据采用 Cell Quest 软件分析。

1.5 RT-PCR 法检测红系细胞中 α -珠蛋白基因表达

1.5.1 RNA 提取 参照 TRIzol 试剂说明书分别提取上述各细胞中的总 RNA。用紫外分光光度计测 RNA 浓度 (RNA 浓度 = $A_{260} \times 40 \mu\text{g/mL} \times 1/\text{光径} \times \text{稀释倍数}$) 及纯度 (A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.0), 再用 2% 琼脂糖凝胶电泳确定 RNA 质量, 而后将 RNA 储存于 -80 °C 备用。

1.5.2 cDNA 合成 根据 TaqMan 逆转录试剂盒 [RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0, CatNo. DRR019A] 说明书, 把 1 μg 总 RNA 反转录成为单链 cDNA, 反应获得 cDNA 储存于 -20 °C 备用。样品准备, PCR 加样和 PCR 产物检测分析均在相互独立的环境中完成。

1.5.3 RT-PCR iCycler iQTM 荧光实时 PCR 仪为美国 Bio-Rad 公司产品。SYBR Green I (for QPCR) 购自捷瑞生物工程 (上海) 有限公司 (Code: RS0976), PCR 反应体系 20 μL 含 cDNA 模板 1 μL , 引物各 5 pmol。PCR 反应条件为: 95 °C 预热 3 min, 紧接着 35 个循环的 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s 和 72 °C 延伸 30 s, 热循环完成后进行 55~95 °C 的溶解曲线测定。PCR 反应结束后由电脑自动分析出定量结果。所有样品检测实验均包含 1 个无模板的阴性对照以排除假阳性结果, 见表 1。每个样品中 α -珠蛋白基因的相对 mRNA 表达水平可以用公式计算: 相对 mRNA 表达 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [3]。

表 1 引物序列及扩增片断长度

基因	引物序列	扩增片断 (bp)
α -珠蛋白基因	正义 CTG CCG ACA AGA CCA AC	129
	反义 CGA AGT GCG GGA AGT AG	
GAPDH	正义 AAT GGA AAT CCC ATC ACC ATC T	86
	反义 CAT CGC CCC ACT TGA TTT TG	

1.6 台盼兰拒染率检测细胞存活 分别于转染 24、48、72 h 后取部分细胞, 检测台盼兰拒染率, 了解细胞存活情况。

1.7 统计学方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS14.0 统计软件进行重复测量资料的方差分析。

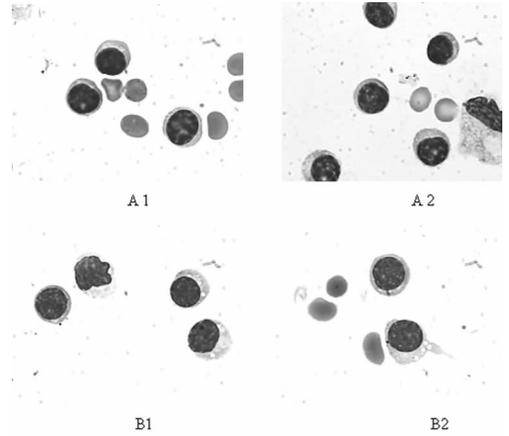
2 结 果

2.1 体外液体培养体系中红系细胞形态学特征 培养 4 d 时, 体系中部分细胞呈现出原始红细胞特征, 核为圆形或椭圆形, 核染色质为紫蓝色, 较细致, 可见 1~2 个核仁, 胞浆量少, 无颗粒; 培养第 8 天时 (转染 siRNA 当天), 上述细胞进一步分化, 核染色质开始凝集, 核仁消失, 胞浆量增多, 见图 1。

2.2 流式细胞仪检测脂质体转染 siRNA 效率 红系细胞用 Oligofectamin 转染带有 FITC 荧光素的 siRNA 后 24、48、72 h 分别收集部分细胞, 流式细胞仪检测 FITC 细胞百分率分别为 61.2%、44.3%、33.7%。检测结果显示, 转染效率随作用时间的递增而逐渐减低, 见图 2。

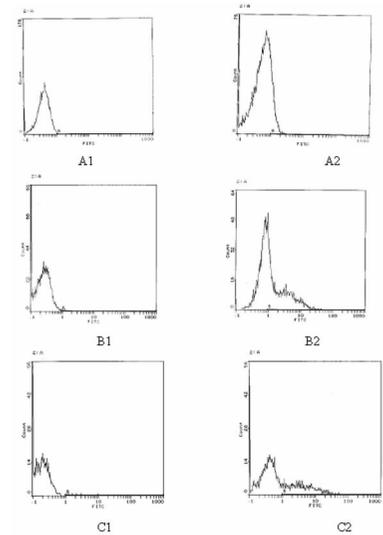
2.3 脂质体转染 siRNA 作用后 α -珠蛋白基因的表达 结果

表明, siRNA 对 α -珠蛋白基因表达的抑制效应在一定范围内具有浓度及时间依赖特性。浓度越高, 抑制效应越高。不同浓度 siRNA 的 α -珠蛋白基因相对表达量之间相互比较: 120、160、200 nmol/L 组相对表达量低于 40、80 nmol/L 组 ($P < 0.05$), 80、40 nmol/L 组之间, 200、160、120 nmol/L 组之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各时间点的 α -珠蛋白基因相对表达量之间比较: 200、160、120 nmol/L 3 组的相对表达量在 48、72 h 低于 24 h ($P < 0.05$), 但 48、72 h 之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2、图 3。



A1、A2: 培养第 4 天; B1、B2, 培养第 8 天。

图 1 培养的红系细胞形态学特征



A、B、C 分别为 24、48、72 h 的转染效率; 1 为空白对照组; 2 为 siRNA 组。

图 2 流式细胞仪检测脂质体转染 siRNA 效率

表 2 不同浓度 siRNA 作用后 α -珠蛋白基因相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

时间(h)	siRNA 浓度(nmol/L)				
	40	80	120	160	200
24	0.67±0.01	0.61±0.02	0.55±0.02	0.52±0.01	0.51±0.01
48	0.60±0.02	0.54±0.01	0.42±0.02	0.39±0.02	0.38±0.01
72	0.57±0.01	0.52±0.02	0.39±0.01	0.36±0.02	0.34±0.02

2.4 台盼兰拒染率检测细胞存活 不同浓度 siRNA 作用后, 红系细胞台盼兰拒染率的差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 浓度

越高,台盼兰拒染率越低;且作用时间越长,台盼兰拒染率也越低,见表 3。

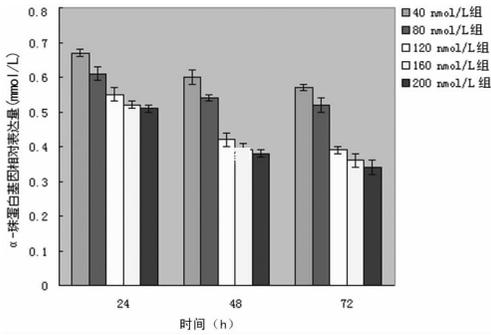


图 3 不同浓度 siRNA 作用后 α -珠蛋白基因相对表达量

表 3 不同浓度 siRNA 作用后细胞台盼兰拒染率

时间 (h)	组别	siRNA 浓度 (nmol/L)				
		40	80	120	160	200
24	siRNA 组	0.91	0.90	0.84	0.81	0.79
	空白对照组	0.97	0.97	0.96	0.95	0.95
48	siRNA 组	0.84	0.80	0.72	0.68	0.62
	空白对照组	0.92	0.90	0.87	0.86	0.86
72	siRNA 组	0.80	0.74	0.70	0.66	0.57
	空白对照组	0.91	0.88	0.86	0.84	0.82

3 讨 论

部分血液系统疾病是由于基因缺陷或变异造成的,而 RNAi 技术可以高效特异地抑制异常基因的表达,故 RNAi 技术在研究血液疾病在基因分子水平上的发病、致病机制、探讨血液疾病的基因治疗方法等领域有广阔的应用前景。目前在血液系统肿瘤、肿瘤多药耐药、血红蛋白病等方面都有较深入的研究^[4-8]。在 RNAi 过程中起关键作用的物质就是 siRNA,为了保证实验的顺利进行,作者选择了质量可靠、纯度高并且可以修饰的化学合成法制备 siRNA。在前期的预实验中,作者已筛选出最佳的 siRNA 序列。

相比其他的转染试剂,脂质体 Oligofectamine 对悬浮细胞有较高的转染效率^[9]。本研究采用脂质体 Oligofectamine 作为转染试剂,流式细胞术检测转染细胞后 24、48、72 h 的荧光表达,分别为 61.2%、44.3%、33.7%,转染效果较为满意,能满足实验的进行。

本研究选用了 40、80、120、160、200 nmol/L 作为测试浓度,结果显示不同浓度 siRNA 作用于红系细胞后其 α -珠蛋白基因相对表达量的差异有统计学意义,浓度越高,抑制效应越大,但不同浓度 siRNA 之间比较提示在一定范围内,siRNA 的作用存在浓度依赖,但达到一定浓度后,即使增大浓度也不再提高抑制效应。各时间点的 α -珠蛋白基因相对表达量之间比较提示 siRNA 作用后可在 48 h 或 72 h 观察干扰效果。

王海燕等^[10]应用不同浓度的 dsRNA 转染大鼠的神经干细胞,发现 50~200 nmol/L 浓度转染组细胞均能正常生长,但形态存在明显差异。0.5% 锥虫蓝法检测培养细胞活力及统计结果表明,各浓度组之间差异有统计学意义,浓度与细胞活力呈负相关,相关系数为 -0.9。作者在研究中也观察了 siRNA 不同浓度、不同时间对培养细胞存活情况的影响。发现不同浓

度 siRNA 作用后,随着作用浓度增加,培养的红系细胞台盼兰拒染率越低,细胞死亡越多。而且作用时间越长,台盼兰拒染率也越低,细胞死亡越多。提示虽然高浓度 siRNA 能更有效地抑制靶基因的表达,但是高浓度对细胞的毒性也不可低估,低浓度的 siRNA 则更有利于细胞存活。

对于 β -珠蛋白生成障碍性贫血,目前国内外学者主要侧重于对 β -珠蛋白链的研究,而甚少关注 α -珠蛋白链。不同于以往国内外的研究,本研究设计针对 α -珠蛋白基因的 siRNA,通过封闭部分 α -珠蛋白基因,抑制相应的 α -珠蛋白链合成,改善 α 与非 α -珠蛋白链的比例失衡状况,减少红细胞内包涵体的形成,减轻或缓解红细胞溶血,达到治疗 β -珠蛋白生成障碍性贫血的目的,为探讨基因调控治疗 β -珠蛋白生成障碍性贫血寻找新的靶点。

参考文献:

- [1] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 1998, 391(6669): 806.
- [2] Wojda U, Nopel P, Miller JL, et al. Fetal and adult hemoglobin production during adult erythropoiesis: coordinate expression correlates with cell proliferation[J]. Blood, 2002, 99(8): 3005.
- [3] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} method[J]. Method, 2001, 25(4): 402.
- [4] Koldehoff M, Steckel NK, Beelen DW, et al. Therapeutic application of small interfering RNA directed against bcr-abl transcripts to a patient with imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia[J]. Clin Exp Med, 2007, 7: 47.
- [5] Ortega-Paino E, Fransson J, Ek S, et al. Functionally associated targets in mantle cell lymphoma as defined by DNA microarrays and RNA interference[J]. Blood, 2008, 111(3): 1617.
- [6] 赵珍珍, 徐酉华, 郑改焕, 等. 靶向 ABCG2 基因的 RNA 干扰提高 K562 细胞的化疗敏感性[J]. 肿瘤, 2009, 29(10): 929.
- [7] Lim MN, Lau NS, Chang KM, et al. Modulating multidrug resistance gene in leukemia cells by short interfering RNA[J]. Singapore Med J, 2007, 48(10): 932.
- [8] Xie SY, Ren ZR, Zhang JZ, et al. Restoration of the balanced α/β -globin gene expression in β 654-thalassemia mice using combined RNAi and antisense RNA approach[J]. Hum Mol Genet, 2007, 16(21): 2616.
- [9] Cioca DP, Aoki Y, Kivosawa K. RNA interference is a functional pathway with therapeutic potential in human myeloid leukemia cell lines[J]. Cancer Gene Ther, 2003, 10(2): 125.
- [10] 王海燕, 徐如祥, 姜晓丹, 等. dsRNA 阻断大鼠骨髓源性神经干细胞 Hes5 表达的实验研究[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(1): 35.