

· 技术与方法 ·

两种不同肝纤维化相关细胞因子 shRNA 重组质粒的构建*

蒋玉凤¹, 刘加群², 张建军^{1△#}, 孙华丽³, 黄飞⁴

(1. 泸州医学院附属医院感染病科, 四川泸州 646000; 2. 河北省秦皇岛市第三人民医院肝病科 066000; 3. 山东省菏泽市市立医院传染科 274031; 4. 湖北省荆州市中心医院感染科 434000)

摘要:目的 构建以大鼠结缔组织生长因子(CTGF)和金属蛋白酶组织抑制因子 1(TIMP-1)基因为靶点的短发夹 RNA (shRNA)表达质粒。方法 根据前期筛选出的对 CTGF 和 TIMP-1 基因最有效的 RNA 干扰靶位,各设计一对有短发夹结构的 RNA 干扰(RNAi)靶点序列,退火形成双链 DNA,克隆到质粒载体 psiRNA-h7SKGFPzeo;构建重组质粒载体 psiRNA-GFP-CTGF 和 psiRNA-GFP-TIMP-1,并进行酶切与测序鉴定。结果 酶切与序列测定均提示重组质粒 psiRNA-GFP-CTGF 和 psiRNA-GFP-TIMP-1 构建成功。结论 成功构建靶向大鼠 CTGF 和 TIMP-1 最有效的 RNAi 靶位的 shRNA 表达质粒,为进一步探索肝纤维化基因治疗的新途径打下了实验基础。

关键词:金属蛋白酶类;RNA 干扰;质粒;肝纤维化;生长因子

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.23.020

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)23-2341-02

Construction of two different of hepatic fibrosis-related cytokines shRNA recombinant plasmid*

Jiang Yufeng¹, Liu Jiaqun², Zhang Jianjun^{1△#}, Sun Huali³, Huang Fei⁴

(1. Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Division of Hepatology, the Third Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao, Hebei 066000, China; 3. Department of Infectious Diseases, Heze Municipal Hospital, Heze, Shandong 274031, China; 4. Department of Infectious Diseases, Jingzhou Central Hospital, Jingzhou, Hubei 434000, China)

Abstract: Objective To construct short hairpin RNA (shRNA) expression plasmid targeting at genes of rat connective tissue growth factor (CTGF) or tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1). **Methods** According to the most effective RNA interference sequences of rat CTGF gene and TIMP-1 gene screened out in the previous experiments, two pairs of CTGF and TIMP-1 gene-specific shRNA were designed and synthesized. After primer annealing, they were inserted into plasmid psiRNA-h7SKGFPzeo and named as psiRNA-GFP-CTGF or psiRNA-GFP-TIMP-1, respectively. The two recombinant plasmids were confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing. **Results** Restriction enzyme digestion and sequencing showed that the two double-stranded DNA fragments were inserted correctly into psiRNA-h7SKGFPzeo vectors as expected, respectively. **Conclusion** Two shRNA recombinant plasmids were constructed successfully, this would establish an experimental foundation for further exploring of new ways in gene therapy for hepatic fibrosis.

Key words: metalloproteases; RNA interference; plasmid; hepatic fibrosis; growth factor

结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是一种非结构性基质蛋白,能直接介导肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的活化、合成及分泌细胞外基质(extracellular matrix, ECM),也是促进胶原沉积致肝纤维化的主要细胞因子转化生长因子(transforming growth factor β , TGF- β)的下游效应因子^[1-2]。金属蛋白酶组织抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinase 1, TIMP-1)也是转化生长因子(TGF- β)的下游效应因子, TIMPs 家族 4 个成员中, TIMP-1 在肝纤维化过程中对基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)活性抑制作用最强^[3-4]。因此针对 CTGF 和 TIMP-1 的干扰小 RNA (small interfering RNA, siRNA) 阻断 TGF- β 下游信号途径,将有望成为一种更特异、更有效的长期防治肝纤维化的手段。

本研究旨在设计并构建能够表达含 CTGF 和 TIMP-1 靶基因片段的短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 重组质粒载体,为今后通过 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术抑制 CTGF 和 TIMP-1 表达、探索 CTGF 和 TIMP-1 在抑制肝纤维化的作用和治疗肝纤维化方法提供实验基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 真核表达载体 psiRNA-h7SKGFPzeo Kit 与 Fast-Media Zeo X-Gal 购自 Invitrogen 公司;限制性内切酶 ACC56I 和 Hind III、T4 DNA 连接酶与 Marker O'Range R μ ler 500 bp DNA Ladder 购自 Fermentas 公司;质粒提取试剂盒购自 Omega 公司,目标 OligoDNA 由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 CTGF 和 TIMP-1 基因靶向性 shRNA 序列的设计与

* 基金项目:四川省卫生厅科技项目(080197);四川省重点学科资助项目(SZD 0421)。△ 通讯作者, Tel: (0839) 3313508; E-mail: zhangjianjun 2535@163.com。# 现在四川省广元市第一人民医院工作(628017)。

表 1 设计的大鼠 CTGF 和 TIMP-1 的 siRNA 序列

序列名称	序列
CTGF(正义链):	5'-GTACCTC <u>GCCAGGAGAAAGACAGGTA</u> CTTCAAGAG AGTACCTGTCTTTCTCTGGCTTTTTGGAAA-3'
CTGF(反义链):	5'-AGCTTTTCCAAAAA <u>GCCAGGAGAAAGACAGGTA</u> CTCTTGA AGTACCTGTCTTTCTCTGGC GAG-3'
TIMP-1(正义链):	5'-GTACCTC <u>GCCTTCGTAAAGACCTATAGT</u> TCAAGAG <u>ACTATAGGCTTTACGAAGGC</u> TTTTTGGAAA-3'
TIMP-1(反义链):	5'-AGCTTTTCCAAAAA <u>GCCTTCGTAAAGACCTATAGT</u> CTCTTGA <u>ACTATAGGCTTTACGAAGGC</u> GAG-3'

合成 通过 GeneBank 查询大鼠 CTGF 和 TIMP-1 基因序列,设计 3 个 RNAi 靶位,化学合成双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA),各自转染或不同组合转染经 TGF- β_1 刺激活化的大鼠肝星状细胞,筛选出对肝纤维化指标表达抑制作用最强的 RNAi 候选靶位(此部分研究已于前期工作中完成):CTGF1 560~1 580 nt(GCCAGGAGAAAGACAGGUACU)。TIMP-1 412~432 nt(GCCUUCGUAAGACCUAUAGU)。在 shRNA 5'端和 3'端分别引入 ACC 56 I 和 Hind III 酶切位点,反义片段以后接终止信号 TTTTT 以终止转录,形成 ACC 56 I + 正义链 + 环链 + 反义链 + 终止信号 + Hind III 的结构。针对 CTGF 和 TIMP-1 基因的 shRNA 片段序列见表 1。

1.2.2 psiRNA-GFP-CTGF 和 psiRNA-GFP-TIMP-1 的构建

1.2.2.1 载体质粒 psiRNA-h7SKGFPzeo 制备 按 psiRNA-h7SKGFPzeo 试剂盒说明书制备质粒溶液 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,转化感受态大肠杆菌,接种于含博来霉素(zeocin)的 Fast-Media Zeo X-Gal 固体培养基,蓝白筛选提取质粒 psiRNA-h7SKGFPzeo,ACC65 I 和 Hind III 双酶切,酶切产物胶回收,获得线性目的质粒 20 μL (22.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)。

1.2.2.2 oligoDNA 退火 用灭菌三蒸水分别将合成 shRNA 片段(正义链与反义链)溶解,终浓度 25 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。按以下条件完成退火:正义链 2 μL ,反义链 2 μL ,0.5 mol/L NaCl 6 μL ,加三蒸水到总体积 30 μL ,80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 min。

1.2.2.3 连接反应 双酶切线性质粒 psiRNA 4 μL ,退火 siRNA 片段 1 μL ,T4 DNA 连接酶 2 μL ,10 \times 连接缓冲液(ligation buffer) 2 μL ,加灭菌三蒸水至总体积 20 μL ,27 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h,后置 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,转化感受态大肠杆菌,接种于 Fast-Media Zeo X-Gal 培养基,做蓝白筛选。

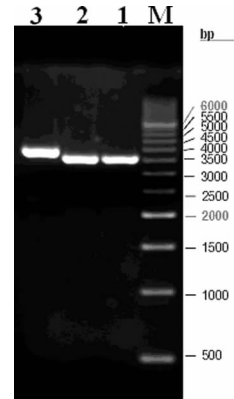
1.2.3 重组质粒 psiRNA-GFP-CTGF 和 psiRNA-GFP-TIMP-1 酶切与测序鉴定 蓝白筛选后提取质粒 psiRNA-GFP-CTGF 和 psiRNA-GFP-TIMP-1,分别用 ACC65 I 和 Hind III 双酶切,空载质粒 psiRNA-h7SKGFPzeo 用 Hind III 单酶切,通过电泳图初步确定重组质粒是否构建成功。取重组质粒 psiRNA-GFP-CTGF 与 psiRNA-GFP-TIMP-1 送上海生工生物工程有限公司测序。

2 结 果

2.1 重组质粒 psiRNA-GFP-CTGF 和 psiRNA-GFP-TIMP-1 双酶切及空质粒单酶切产物电泳符合预期,电泳图谱中显示重组质粒 psiRNA-GFP-CTGF 与 psiRNA-GFP-TIMP-1 双酶切产物均有一大小约 3 548 bp 片段(3 894-369+23-23),而空质粒单酶切产物为一大约 3 894 bp 片段,见图 1。

2.2 重组质粒的测序分析 上海生工测序结果提示重组质粒 psiRNA-GFP-TIMP-1 与 psiRNA-GFP-CTGF 中 siRNA 编码

序列与设计片段完全一致,表明载体构建正确,见插图 2、3。



M: Marker(分子量标准品); 1: psiRNA-GFP-CTGF 双酶切产物; 2: psiRNA-GFP-TIMP-1 双酶切产物; 3: 空质粒单酶切产物。

图 1 重组质粒双酶切电泳图谱

3 讨 论

TGF- β 及其信号转导途径在肝纤维化发生机制中起着关键作用,可诱导产生 CTGF 的表达而促进 ECM 的合成^[5-7]。CTGF 是 TGF- β 促纤维化活性的下游信号因子,因此阻断 CTGF 表达或抑制其活性,将有望成为一种更特异、更有效的长期防治肝纤维化的手段。TIMP-1 是 TGF- β 及其信号转导途径可诱导另一种促纤维化活性的下游信号因子,可阻断 MMPs 对 ECM 的降解^[8]。siRNA 是一种近年发展起来的沉默基因的新技术^[9-10]。由于 siRNA 表达载体成功转染后可进行瞬时或稳定的基因沉默,因此相较于化学合成的 siRNA 更有应用价值和前景^[11-12]。

在本研究前期工作中,已经从各 3 个针对大鼠 CTGF 和 TIMP-1 基因序列的 RNAi 候选靶位中成功筛选出最有效的 RNAi 靶位,联合干扰较单独干扰效果更强。实验中构建 CTGFshRNA 和 TIMP-1shRNA 重组质粒,使用了 7SK 启动子启动 shRNA 的转录以及反义链后加 TTTTT 终止信号终止转录,形成 ACC 56I+正义链+环链+反义链+终止信号+Hind III 的结构,符合 siRNA 表达载体的设计要求。

通过酶切鉴定与基因测序均证实成功构建了靶向大鼠 CTGF 与 TIMP-1 的 siRNA 表达载体,为进一步研究针对 CTGF 和 TIMP-1 的 RNA 干扰对肝纤维化的预防及治疗作用奠定了基础。

参考文献:

- [1] Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. Gastroenterology, 2008, 134(6): 1655-1669.
- [2] Gressner OA, Gressner AM. Connective tissue growth factor: a fibrogenic master switch in fibrotic liver (下转第 2345 页)

WHO 保障血液安全的重要策略之一。本研究结果表明,在初次献血者和 5 次以下重复献血者中 HIV 感染率是没有差异的,而在多于 6 次的无偿献血者中,HIV 感染者所占比例高于总献血人群中的多次献血者,因此仅通过提高固定献血队伍的数量是不能充分保障血液安全的。

因此本组的分析结果提示,采供血机构为了最大限度地降低 HIV 经血传播的风险,保证临床用血安全的第一道防线就是献血者健康评估与献血前咨询,应该不断加强献血者招募和献血咨询岗位人员多方面的专业知识培训,提高其献血咨询的技巧和识别排除高危人群的能力,加强献血前招募和咨询工作,引导献血者如实填写健康咨询表,让有危险行为的献血者能主动自我排除,避免献血者因个人对高危行为后献血的危害认识不足而发生的献血行为^[10-11]。再者,在无偿献血者中应加强性病及艾滋病知识的宣传教育,增强其自我保护意识,强调健康的生活方式对于自身和社会的重要性。特别是要在无偿献血人群中树立健康生活理念,这既是爱心的奉献,又是保证广大受血者生命健康的基石,也是促进社会和谐的重要途径,更是保证血液安全的长久之计^[11-12]。虽然对无偿献血的健康教育是一项复杂、系统且需持之以恒才能见效的工程,但应该意识到从低危人群中招募献血者和建立低危固定无偿献血队伍是无偿献血可持续发展的关键,也是保障血液安全的根本^[13-14]。

参考文献:

- [1] 季阳,郑忠伟,蔡辉,等.病毒血清学检测与核酸检测技术在输血传染病筛检中的应用[J].中国输血杂志,2010,23(6):413-416.
- [2] 冯连贵,丁贤彬,卢戎戎,等.重庆市男性接触人群高危行为和性病艾滋病感染率调查[J].热带医学杂志,2007,7(5):483-486.
- [3] 沈鹏,王振维,潘传波,等.重庆市主城某区 MSM 人群

HIV/梅毒感染情况及影响因素分析[J].重庆医学,2010,30(8):956-958.

- [4] 王珍贤,李小红,韩继姝,等.重庆市近 7 年来献血者血液 HIV 筛查与确证情况[J].中国输血杂志,2007,20(3):212-213.
- [5] 郑鹏,张容,杨春晖,等.四川省自愿无偿献血适龄人群 HIV 流行特征调查[J].中国输血杂志,2008,21(6):458-459.
- [6] 刘国英,邢培青,王莉,等.郑州市无偿献血者 HIV 流行病学调查[J].中国输血杂志,2010,23(2):135-136.
- [7] 韩慧,杨向萍,冯飞.海口市无偿献血者 HIV 感染状况的调查分析[J].中国输血杂志,2010,23(2):135-136.
- [8] 孙家志,黄聪,林红艳.北海市无偿献血者抗-HIV 阳性率分析[J].中国输血杂志,2009,22(4):315-317.
- [9] 陈文仙,杨雪斌.艾滋病高发地区献血者抗-HIV 感染性指标检测情况分析[J].中国医疗前沿,2008,3(14):108.
- [10] Musto JA, Seed CR, Law M, et al. Estimating the risk of blood donation associated with HIV risk behaviors [J]. Transfus Med, 2008, 18(1):49-54.
- [11] Heyns Adu P, Benjamin RJ, Swanevelder JP, et al. Prevalence of HIV-1 in blood donations following implementation of a structured blood safety policy in South Africa [J]. JAMA, 2006, 295(5):519-526.
- [12] 景秀.健康教育在无偿献血中的作用[J].中华临床新医学,2004,4(1):89-90.
- [13] 季阳,郑忠伟,庄文.保障我国输血安全的策略和措施[J].中国输血杂志,2007,20(5):359-360.
- [14] 章杏英,胡俊锋,鲍淳茂,等.献血者教育对献血者筛选的影响[J].中国输血杂志,2007,20(5):390-391.

(收稿日期:2011-01-10 修回日期:2011-03-18)

(上接第 2342 页)

- diseases [J]. Liver Int, 2008, 28(8):1065-1079.
- [3] 白艳锋,尤红.肝纤维化形成中 MMPs/TIMPs 的动态变化及治疗进展[J].肝脏,2009,14(2):162-164.
- [4] 孙华丽,张建军.组织金属蛋白酶及其抑制因子与肝纤维化[J].西南军医,2010,12(1):81-83.
- [5] Shin JY, Hur W, Wang JS, et al. HCV core protein promotes liver fibrogenesis via up-regulation of CTGF with TGF-beta1[J]. Exp Mol Med, 2005, 37(2):138-145.
- [6] Kobayashi H, Hayashi N, Hayashi K, et al. Connective tissue growth factor and progressive fibrosis in biliary atresia[J]. Pediatr Surg Int, 2005, 21(1):12-16.
- [7] 徐列明.肝纤维化的研究进展[J].中华肝脏病杂志,2010,18(8):563-565.
- [8] Zhang BB, Cai WM, Weng HL, et al. Diagnostic value of platelet derived growth factor-BB, transforming growth

factor-beta1, matrix metalloproteinase-1, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in serum and peripheral blood mononuclear cells for hepatic fibrosis [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(11):2490-2496.

- [9] Song E, Lee SK, Wang J, et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis [J]. Nat Med, 2003, 9(3):347-351.
- [10] 林远洪,吴永忠,郭启帅,等.RNAi 抑制 EGFR 基因增强卵巢癌细胞对泰素敏感性的研究[J].重庆医学,2009,38(5):539-541.
- [11] 李曙芳,刘田福.RNA 干扰技术的应用新进展[J].中国实验动物学报,2009,17(1):76-79.
- [12] Tomari Y, Zamore PD. Perspective: machines for RNAi [J]. Genes Dev, 2005, 19(5):517-529.

(收稿日期:2010-12-10 修回日期:2011-04-10)