

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.31.037

靶向抑制滑膜细胞 TNF- α 表达的 siRNA 筛选及鉴定*

沈孝龙, 廖琦[△], 郝亮

(南昌大学第二附属医院骨科, 南昌 330006)

摘要:目的 设计并筛选能高效抑制创伤性关节炎滑膜细胞肿瘤坏死因子 α (TNF- α)表达的最佳干扰序列,为进一步研究 TNF- α 基因对创伤性关节炎的临床应用奠定基础。方法 根据人源 TNF- α mRNA 的序列,设计合成 3 组不同的且能干扰 TNF- α 基因表达的小型干扰 RNA(siRNA)序列,将其转染入创伤性关节炎滑膜细胞,与阴性对照组(NC组)比较。培养 48 h 后,采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测滑膜细胞 TNF- α mRNA 表达水平,采用 ELISA 法检测细胞上清液 TNF- α 表达水平。结果 与 NC 组相比,3 组 siRNA 中有 2 组 siRNA 可有效使人滑膜细胞中 TNF- α mRNA 表达减少($P < 0.01$);同时细胞上清液中 TNF- α 分泌量下降,与 NC 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 成功设计合成了特异且高效阻断 TNF- α 表达的 siRNA。

关键词:肿瘤坏死因子 α ; RNA, 小分子干扰; 滑膜细胞; 创伤性关节炎

中图分类号: R34

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)31-4230-02

Screening and identification of siRNA-mediated TNF- α expression in synovial cells of Human*

Shen Xiaolong, Liao Qi[△], Hao Liang

(Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: Objective To design and identify small interfering RNA (siRNA) targeting tumor necrosis factor- α (TNF- α) expression, siRNAs were electroporated into synovial cells of Human to screen those which can effectively suppress TNF- α expression. **Methods** Three TNF- α specific double stranded siRNA were designed targeting different regions of TNF- α mRNA (compared with negative control group). RT-PCR and Elisa were applied to detect TNF- α mRNA expression and the secretion of TNF- α in cell supernatant, respectively. **Results** Two of the three customized TNF- α siRNA could inhibit the expression of TNF- α mRNA in synovial cells of Human ($P < 0.01$). At the same time, the secretion of TNF- α decreased in cell supernatant, the difference was significant statistically compared with the control group ($P < 0.01$). **Conclusion** TNF- α siRNA can be successfully designed and synthesized, which can specifically and effectively suppress TNF- α mRNA expression.

Key words: tumor necrosis factor-alpha; RNA, small interfering; synovial cells of human; traumatic arthritis

创伤性关节炎主要是负重关节创伤后引起的一种后遗症,即强大暴力使受累关节正常组成部及解剖结构受到破坏,引起软骨变性、破坏及在此基础上的关节软骨、软骨下骨、滑膜、关节囊、周围肌肉和韧带等的一系列改变,最后导致受累关节疼痛、功能障碍^[1-2]。近年来的研究表明,细胞因子和生长因子在骨性关节炎发生发展的病理生理过程中起着重要作用,它们与滑膜、关节软骨和软骨下骨的功能改变密切相关^[3]。一些因子在关节炎的病理过程中对关节软骨和关节滑膜具有一定的破坏作用,其中最引人注目的是 TNF- α ,这是关节炎病理过程中促进软骨基质降解和关节软骨破坏的最重要的细胞因子之一^[4]。研究证实在骨关节炎(OA)患者的关节液中 IL-1、TNF 等细胞因子水平明显升高^[5]。RNA 干扰技术(RNA interference, RNAi)是简单、高效阻断哺乳动物细胞内基因表达的最有效方法。本研究采用 RNAi 方法,设计并筛选出针对 TNF- α 基因的小型干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA),抑制人滑膜细胞中 TNF- α 基因的表达,为创伤性关节炎的基因治疗开辟新的途径。

1 资料与方法

1.1 一般资料 创伤性膝关节炎滑膜细胞; Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司); 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)试剂盒(日本 TOYOBO 公司, QPS201); 逆转录试剂盒(美国 Promega 公司); PRISM 7500 Sequence Detection System(美国 ABI 公司); Hema9600 基因扩增仪(珠海黑马医学仪器有限公司); 低温冷冻离心机(珠海黑马医学仪器有限公司); Beckman Coul-

ter DU 520 UV/Vis Spectrophotometer (美国 Beckman Coulter 公司); JS-power300 电泳仪(上海培清科技有限公司); 培清 JS-780 全自动凝胶成像分析仪(上海培清科技有限公司); 洁净工作台(苏州安泰 SW-CJ-IFD); 低速离心机(上海安亭, TDL-80-2B); 倒置光学显微镜(OPTEC, BDS200); 细胞恒温培养箱(Thermoscientific, HERACELL150i); 十万分之一电子天平(丹佛, TP-214); 水平摇床(北京六一, WD-9405B); 培养基(GIBCO); DMEM-F12; 胎牛血清(Hyclone): 20%; 青霉素(碧云天): 1%; 无蛋白白细胞用冻存液(赛业生物科技), 细胞上清液 TNF- α ELISA 检测试剂盒(BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 siRNA 的设计与合成 siRNA 由锐博生物科技有限公司设计、合成序列如下, (1)[siRNA-h-TNF- α _001], 靶序列: GCG TGG AGC TGA GAG ATA A; 正义链(5'~3'): 5'-GCG UGG AGC UGA GAG AUA A dTdT-3'; 反义链(3'~5'): 3'-dTdT CGC ACC UCG ACU CUC UAU U-5'。 (2)[siRNA-h-TNF- α _002], 靶序列: AGA CCA AGG TCA ACC TCC T; 正义链(5'~3'): 5'-AGA CCA AGG UCA ACC UCC U dTdT-3'; 反义链(3'~5'): 3'-dTdT UCU GGU UCC AGU UGG AGG A-5'。 (3)[siRNA-h-TNF- α _003], 靶序列: GAC TCA GCG CTG AGA TCA A; 正义链(5'~3'): 5'-GAC UCA GCG CUG AGA UCA A dTdT-3'; 反义链(3'~5'): 3'-dTdT CUG AGU CGC GAC UCU AGU U-5'。

1.2.2 细胞培养 首先使用多聚赖氨酸处理细胞培养瓶培养

* 基金项目:江西省自然(青年)科学基金项目(2010GZY0250)。作者简介:沈孝龙(1988-),在读硕士,主要从事创伤性关节炎的诊治。

[△] 通讯作者, Tel: (0538)7269312; E-mail: liaoqi@medmail.com.cn。

表面,采用 DMEM-F12 培养液(含 20%胎牛血清和 1%青-链霉素),37 ℃、5% CO₂ 恒温孵育箱孵育,常规用 0.25%胰酶消化传代,用第 3~6 代处于对数生长期创伤性膝关节炎滑膜细胞进行实验。

1.2.3 Lipo2000 转染 siRNA 转染前 1 d 将滑膜细胞以 1×10⁵ 个/孔接种至 12 孔细胞培养板中。每孔中加入不含抗菌药物的培养基,待细胞密度达到 70%~90%时进行 siRNA 转染,结果分为 4 组:阴性对照组(NC 组)、TNF-α 001 组、TNF-α 002 组、TNF-α 003 组,对于每个转染样品,按说明书准备 siRNA-Lipo2000 混合液,将 siRNA-Lipo2000 混合液加入含有 1 mL 培养基的相应培养孔中轻轻混匀,培养 4~6 h 后,将培养孔中含 siRNA-Lipo2000 混合液的培养基移去,更换新鲜完全培养基。置培养板于 37 ℃的 CO₂ 培养箱中培养 48 h。

1.2.4 RT-PCR 检测 TNF-α mRNA 表达水平

1.2.4.1 提取细胞总 RNA 严格按照说明书使用 TRizol 试剂裂解细胞并提取细胞总 RNA。

1.2.4.2 RT-PCR 分析 采用美国 Promega 公司反转录试剂盒进行逆转录反应,所有操作在冰浴条件下进行,20 μL 反应体系彻底混合后,30 ℃孵育 10 min,42 ℃孵育 60 min,72 ℃孵育 10 min,然后进行 RT-PCR 反应。RT-PCR 反应引物序列(由上海生工生物合成)如下,Human TNF-α:正义链 5'-GTC TGG GCA GGT CTA CTT TGG-3',反义链 5'-GGT TGA GGG TGT CTG AAG GAG-3'; Human 18srRNA:正义链 5'-GTC TGG GCA GGT CTA CTT TGG-3',反义链 5'-GCG GCG CAA TAC GAA TGC CCC-3',冰浴条件下操作,彻底混合后放入:ABI PRISM 7500 Sequence Detection System 仪器,使用软件 7500 software v2.0.6 分析,反应程序如下:95 ℃ 1 min,95 ℃ 15 s,62 ℃ 30 s(收集荧光信号),40 个循环,60 ℃,所有反应设 3 个复孔反应,结束后确认 RT-PCR 的扩增曲线和融解曲线,结果采用相对定量法分析,目的基因相对表达量利用 2^{-ΔΔCt} 法进行计算。

1.2.5 ELISA 检测细胞上清液 TNF-α 收集上述转染 48 h 后的细胞上清液,按 BD 公司 TNF-α ELISA 试剂盒说明书严格操作。使用试剂盒提供的标准品按说明书稀释制作标准曲线,每个样品进行 3 复孔检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 滑膜细胞形态学观察 见图 1。

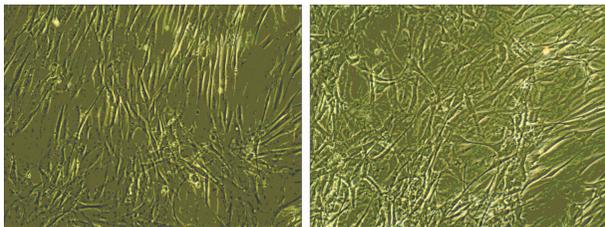
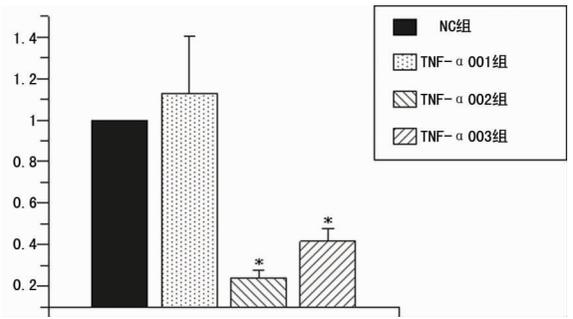


图 1 细胞形态学观察 (×25)

2.2 RT-PCR 检测 TNF-α mRNA 表达水平 同等剂量的 3 对化学合成的 TNF-α-siRNA (siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3) Lipo-2000 转染人创伤性膝关节炎滑膜细胞,分别进行荧光定量 PCR 检测。结果显示,转染后的 TNF-α 001、TNF-α 002 组人创伤性膝关节炎滑膜细胞 TNF-α mRNA 均有明显抑制作用,TNF-α 001 组无明显抑制作用。48 h 后 TNF-α 001 组、TNF-α 002 组、TNF-α 003 组 3 组细胞中 mRNA 相对表达量分别为 1.13±0.28、0.24±0.04 和 0.42±0.06,与 NC 组的 1.00±

0.00 相比,TNF-α 002 组减少 76%,TNF-α 003 组减少 58%,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 2。



*: $P < 0.01$,与 NC 组比较。

图 2 转染不同 TNF-α-siRNA 滑膜细胞的 TNF-α mRNA 表达

2.3 ELISA 实验结果 采用 siRNA 转染后可抑制创伤性膝关节炎滑膜细胞分泌 TNF-α,3 组不同 siRNA 转染对 TNF-α 的抑制效果不同,TNF-α 001 组无明显抑制效果,与 NC 组比较无统计学差异,TNF-α 002 组、TNF-α 003 组抑制较明显,与 NC 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),第 2、3 组抑制效果比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 不同 siRNA 作用后滑膜细胞分泌 TNF-α 含量($\bar{x} \pm s$,pg/mL)

组别	n	TNF-α 水平	P
NC 组	3	161.47±6.15	—
TNF-α 001 组	3	162.45±7.17	0.998
TNF-α 002 组	3	91.41±6.81	0.001
TNF-α 003 组	3	93.15±9.63	0.007

—:表示此项无数据。

3 讨 论

关节损伤后,OA 的发生几乎不可避免^[6]。关节液内的炎症因子是造成创伤性关节炎关节损伤的重要因素^[7-8]。TNF-α 能刺激软骨细胞和滑膜产生基质金属蛋白酶(MMPs)等蛋白酶,促进软骨基质的降解;刺激滑膜产生 NO,诱导关节软骨细胞的凋亡;促进软骨细胞和滑膜细胞产生前列腺素 E2(dinoprostone prostin E,PGE2) 参与炎症反应;促进成骨细胞样细胞的增殖和骨吸收,参与骨质增生和软骨下骨囊形变的形成;介导软骨细胞分化,节软骨细胞表型变成成纤维细胞表型;抑制蛋白多糖的合成;抑制滑膜细胞的增殖^[9]。目前的研究认为,TNF-α 不但可以引起软骨基质的破坏,而且抑制基质的修复,是创伤性关节炎病理进程中促进软骨破坏和基质降解最重要的细胞因子之一^[10]。RNAi 是指通过引入与内源靶基因具有相同序列的双链 RNA(dsRNA),诱导内源靶基因的 mRNA 降解,从而特异性的使靶基因转录后出现沉默的现象,经过近 10 年的发展,RNAi 技术已较为成熟^[11]。目前,利用 RNAi 阻断 TNF-α 表达,进而评价对滑膜细胞的作用效果的报道很少,siRNA 的最有效作用靶点需要进一步研究。

本研究结合上述研究进展,针对 TNF-α 基因序列重新设计并构建出 3 组 siRNA,特异性抑制滑膜细胞中 TNF-α 基因的表达,研究中通过 RT-PCR 准确计算出了 RNA 被干扰后 TNF-α 的减少程度,与 NC 组相比,TNF-α 002 组、TNF-α 003 组分别减少 76%、58%,差异有统计学意义($P < 0.01$);随后进一步通过 ELISA 观察细胞上清液 TNF-α 分泌受抑制,3 组不同 siRNA 转染对 TNF-α 的抑制效果不同,TNF-α 001 组无明显抑制效果,以 TNF-α 002 组、TNF-α 003 组(下转第 4234 页)

基因型为 CD41-42 杂合子、CD17 杂合子、CD71-72 杂合子、CD28 杂合子等。 α 地贫检出率偏低,除静止型 α 地贫血液学指标多在正常范围内,在实验室中还没有理想的筛查静止型 α 地贫贫血的方法(除外基因检测),造成较高的漏诊。目前,已发现的 α 地贫基因突变型有 81 种,在中国人中发现了 7 种缺失(3 种 α^+ 地中海贫血和 4 种 α^0 地中海贫血),本实验室只能检测 3 种缺失($-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$ 、 $-\alpha^{SEA}$)及 3 种点突变(CS、QS、WS), β 地中海贫血基因突变类型有 186 种,在我国已报道 27 种点突变^[9-12]。本实验室能检测常见的 17 种点突变,所以存在着缺失及突变的漏检。

广西是地贫高发区,在人群中进行地贫检查、筛查显得尤为重要。虽然地贫基因携带者、静止型和轻型患者无明显自觉症状,对健康也未能造成大的危害,但中、重型地贫是严重的致死、致残性血红蛋白病,目前没有很好的治疗手段和根治办法,只能依靠规律输血和除铁维持生命。在育龄期妇女中开展婚前、孕前筛查,指导合理的联姻、妊娠,并通过人群干预来预防常见的人类单基因致死、致残性遗传病,对促进优生优育、提高人口素质有重要意义。

参考文献:

- [1] 邓俊耀,龙安翼,李惠. 桂林市城镇育龄人群地中海贫血现状调查[J]. 中华流行病学杂志,2009,30(2):156-158.
- [2] 吕福通,谢丹尼,陈一君,等. 广西区计划生育服务网络开展地中海贫血干预经验[J]. 中国计划生育学杂志,2009,

(上接第 4231 页)

较明显,与 NC 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。充分验证并成功筛选出 2 对能够有效抑制滑膜细胞中 TNF- α 表达的 siRNA (TNF- α -2、TNF- α -3)为进一步研究 TNF- α 的基因治疗奠定基础。

基因组学研究显示,数个基因组区间与 OA 关系密切,例如 TNF- α 、IL-1 等基因^[12]。siRNA 应用于沉默特定基因表达,通过抑制致病因子 TNF- α 等的基因功能,使针对致病基因的 siRNA 用于临床治疗疾病成为可能,将给创伤性关节炎的研究提供新思路。

参考文献:

- [1] Buckwalter JA, Brown TD. Joint injury, repair, and remodeling: roles in post-traumatic osteoarthritis[J]. Clin Orthop,2004(423):7-16.
- [2] Dirschl DR, Marsh JL, Buckwalter JA, et al. Articular fractures[J]. J Am Acad Orthop Surg,2004,12(6):416-423.
- [3] Chikanza I, Fernandes L. Novel strategies for the treatment of osteoarthritis[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2000,9(7):1499.
- [4] Sandra K, Leo ABJ, Alison MB, et al. Different roles of tumour necrosis factor and interleukin-1 in murine streptococcal cell wall arthritis[J]. Cytokine,1998,10(9):690-702.
- [5] Kobayashi M, Squire GR, Mousa A, et al. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage [J]. Arthritis

4(4):241-242.

- [3] 丛玉隆,金大鸣,王鸿利,等. 中国人群成人静脉血细胞分析参考范围调查[J]. 中华医学杂志,2003,83(14):1201-1205.
- [4] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京:科学出版社,2007:29-35.
- [5] 叶应妩,王毓三,申子瑜,等. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版,南京:东南大学出版社,2006:392-393.
- [6] 张玲,胡朝晖,吴鹏,等. 4 种方法筛查血红蛋白病的探讨[J]. 中国实用医药,2009,4(1):15-17.
- [7] 陈萍. α 地中海贫血分子基础与临床研究现状[J]. 广西医学,2004,26(5):619-621.
- [8] 李林海. β 地中海贫血的分子杂交诊断技术及其进展[J]. 中国优生与遗传杂志,2001,9(5):113.
- [9] 莫宗平,喻长顺,胡朝晖,等. α 地中海贫血的基因诊断方法[J]. 中华临床医师杂志:电子版,2012,6(3):682-684.
- [10] Bank A. Regulation of human fetal hemoglobin:new players,new complexities [J]. Blood,2006,107(2):435-443.
- [11] 张俊武,龙桂芳. 血红蛋白与血红蛋白病[M]. 南宁:广西科学技术出版社,2003:204-234.
- [12] 李巍,何蕴韶. 遗传咨询[M]. 郑州:郑州大学出版社,2003:405-419.

(收稿日期:2014-03-15 修回日期:2014-06-22)

Rheum,2005,52:128-135.

- [6] 邓廉夫,柴本甫,齐进. 损伤性和骨关节炎性滑膜细胞成骨作用的体外研究[J]. 中华骨科杂志,1997,17(11):693-695.
- [7] Lopez-Armada MJ, Carames B, Lires-Dean M, et al. Cytokines,tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta, differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes[J]. Osteoarthritis Cartilage,2006,14(7):660-669.
- [8] Goldring MB, Otero M, Tsuchimochi K, et al. Defining the role of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism[J]. Ann Rheum Dis,2008,67(3):75-82.
- [9] Mendes AF, Caramona MM, Carvalho AP, et al. Differential roles of hydrogen peroxide and superoxide in mediating IL-1 induced NF-kappaB activation and iNOS expression in bovine articular chondrocytes[J]. Cell Biochem, 2003,88(4):783-793.
- [10] Daheshia M, Yao JQ. The interleukin 1beta pathway in the pathogenesis of osteoarthritis [J]. J Rheumatol, 2008, 35(12):2306-2312.
- [11] Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges[J]. Adv Drug Deliv Rev,2007,59(2/3):75-86.
- [12] Loughlin J. The genetic epidemiology of human primary osteoarthritis:current status[J]. Expert Rev Mol Med, 2005,7(9):1-12.

(收稿日期:2014-05-08 修回日期:2014-09-22)