

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.07.005

α -胞衬蛋白 siRNA 对人涎腺导管细胞的影响*

庞春艳,王 蓓,剧锦哲,王永福[△]

(内蒙古科技大学包头医学院风湿免疫研究所/包头医学院第一附属医院风湿免疫科,内蒙古包头 014010)

[摘要] **目的** 观察 α -胞衬(α -Fodrin)蛋白小干扰 RNA(siRNA)对人涎腺导管(HSG)细胞的影响,探讨 α -Fodrin siRNA 治疗干燥综合征(SS)的作用。**方法** 实验分对照组、空载体组、 α -Fodrin siRNA1 组及 α -Fodrin siRNA2 组,将成功构建的 10 μ g α -Fodrin siRNA1 和 α -Fodrin siRNA2 表达载体分别采用脂质体法转染 HSG 细胞,空载体组 HSG 细胞转染等剂量的 pGFP-V-RS 空载体。转染后 24、48、72 和 96 h 观察细胞转染效率,实时荧光定量(RT)-PCR 法检测 4 组 HSG 细胞中 α -Fodrin mRNA 的表达水平;细胞荧光免疫法检测 4 组细胞中 α -Fodrin 蛋白的表达水平;ELISA 法检测 4 组细胞上清液中 IFN- γ 、IL-10 的表达水平。**结果** 转染后 48 h HSG 细胞转染效率最高;转染后 48 h α -Fodrin siRNA1 组和 α -Fodrin siRNA2 组 HSG 细胞中 α -Fodrin mRNA 和蛋白的表达水平明显低于对照组和空载体组($P < 0.05$),且 α -Fodrin siRNA2 组中 α -Fodrin mRNA 的表达水平低于 α -Fodrin siRNA1 组的表达水平($P < 0.05$); α -Fodrin siRNA1 组和 α -Fodrin siRNA2 组细胞上清液中 IL-10 的水平明显升高,较对照组和空载体组差异有统计学意义($P < 0.05$), α -Fodrin siRNA1 组和 α -Fodrin siRNA2 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$); α -Fodrin siRNA1 组和 α -Fodrin siRNA2 组细胞上清中 IFN- γ 的水平低于对照组和空载体组,但 4 组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** HSG 细胞转染 α -Fodrin siRNA 载体后, α -Fodrin mRNA 和蛋白的表达水平下降,同时细胞上清中 IL-10 的水平升高、IFN- γ 水平下降,提示 α -Fodrin siRNA 可以减轻炎性反应,为 SS 的治疗提供实验依据。

[关键词] RNA,小分子干扰; α -胞衬蛋白;人涎腺导管细胞;白细胞介素-10;干扰素- γ

[中图分类号] R373.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)07-0880-03

Effect of α -Fodrin siRNA on human salivary gland cells*

Pang Chunyan, Wang Bei, Ju Jinzhe, Wang Yongfu[△]

(Institute of Rheumatology of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology/Department of Rheumatology, the First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou, Mongolia 014010, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of α -Fodrin siRNA on human salivary gland(HSG)cells and to discuss its therapy on sjögren's syndrome(SS). **Methods** The vectors expressing siRNA against α -Fodrin of human were transfected into HSG cells of 10 μ g α -fodrin siRNA1 group and α -Fodrin siRNA2 group, while pGFP-V-RS vector were transfected into the cells of empty vector group, there was no handling in HSG cell of control group. The efficiency was observed by fluorescence microscope after transfection of 24, 48, 72 and 96 h by lipofectamine 2000. The expression levels of α -Fodrin mRNA and protein of HSG were detected by real-time(RT)-PCR and immunohistochemistry method respectively. The expression levels of IFN- γ and IL-10 in supernatant of cells were detected by ELISA. **Results** The efficiency was highest on 48 h after transfection. The level of α -Fodrin mRNA and protein was lower in α -fodrin siRNA1 group and α -fodrin siRNA2 group than control group and empty vector group on 48 h after transfection ($P < 0.05$), the level of α -Fodrin mRNA in α -fodrin siRNA2 group was significant higher than α -fodrin siRNA1 group ($P < 0.05$). The levels of IL-10 were higher in α -fodrin siRNA1 group and α -fodrin siRNA2 group than control group and empty vector group on 48 h after transfection ($P < 0.05$), α -fodrin siRNA1 group and α -fodrin siRNA2 group had no statistical significance($P > 0.05$). The levels IFN- γ in α -fodrin siRNA1 group and α -fodrin siRNA2 group were lower than of control group and empty vector group on 48 h after transfection, but there were no significant differences in the four groups ($P > 0.05$). **Conclusion** The α -fodrin siRNA1 and α -fodrin siRNA2 can suppress the levels of α -fodrin mRNA and protein of HSG cells, at the same time; they can elevate the expression of IL-10 and decrease the level of IFN- γ . So α -Fodrin siRNA reduce the levels of inflammatory cytokines and provide experimental basis to therapy of SS.

[Key words] RNA, small interfering; α -Fodrin protein; human salivary gland cells; interleukin-10; interferon- γ

α -胞衬(α -Fodrin)蛋白是从干燥综合征(sjögren's syndrome, SS)小鼠唇腺中提取的涎腺特异性自身抗原,在 SS 的发病过程中起非常重要的作用,对 SS 的诊断和指导治疗都起到了很好的作用,有较好的特异度和灵敏度^[1-2]。人涎腺导管(human salivary gland cells, HSG)细胞来源于人下颌下腺的

管上皮,常作为研究 SS 的细胞模型。本研究采用小干扰 RNA(siRNA)技术沉默 HSG 细胞中 α -Fodrin 基因的表达,探讨 α -Fodrin 基因的 siRNA 对 HSG 细胞的可能作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 载体 pGFP-V-RS 和 TRIzol 分别购自 Orig-

* 基金项目:包头市医药卫生基金项目(2009S1001-34);内蒙古自治区科技计划项目(20120403)。 作者简介:庞春艳(1978-),主管检验师,硕士,主要从事免疫性疾病研究工作。 [△] 通讯作者, E-mail: wyf5168@hotmail.com。

ene 和 Takara 公司, M-MLV 逆转录酶、脂质体 lipofectamine™ 2000 和标记有红色荧光的二抗购自 Invitrogen 公司, ELISA 试剂盒为 RD 国内分装试剂盒, 购自上海生工生物工程有限责任公司, 兔抗人的一抗购自 Abcam 公司。

1.2 siRNA 的设计 针对人 α -Fodrin 基因的 cDNA 序列(序列号: XM_006717254), 根据 siRNA 靶点设计软件(<http://rnaidesigner.lifetechnologies.com/rnaexpress/>)设计 2 段 siRNA 序列, 分别位于全序列的第 238~256 位和第 405~423 位, 第 1 段序列为: CCC TTA GGC GTC AGA AGC T, 第 2 段序列为: GCT GAA GTG CAG GCC AAC T, 这 2 段 siRNA 序列的 GC 含量是一样的, 只是在人 α -Fodrin 全序列的位置不同。本实验将上述 2 段序列的模板插入质粒载体 pGFP-V-RS 的启动子下游, 构建 2 段 α -Fodrin 的 siRNA 真核表达载体。

1.3 细胞水平的各项检测 本实验分 4 组, 分别为对照组、空载体组、 α -Fodrin siRNA1 组和 α -Fodrin siRNA2 组, 将 α -Fodrin siRNA1 组和 α -Fodrin siRNA2 组中的 HSG 细胞分别转染 α -Fodrin siRNA1 和 α -Fodrin siRNA2 真核表达载体 10 μ g 和脂质体 lipofectamine™ 2000 的混合物(比例为 1:3), 对照组转染等剂量空载体与 lipofectamine™ 2000 的混合物(比例为 1:3)。转染 48 h 后, 采用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA, 反转录成 cDNA, 实时荧光定量(RT)-PCR 法检测各组细胞中 α -Fodrin mRNA 和内参 GAPDH 的 Ct 值, 计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。同时, 4 组细胞做细胞荧光免疫检测染色, 图片采用 IPP6 软件分析平均 OD 值; ELISA 法检测细胞上清中 IFN- γ 和 IL-10 的变化, 根据标准曲线计算出 IFN- γ 和 IL-10 的水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析, IFN- γ 和 IL-10 的水平及 α -Fodrin mRNA 和蛋白的表达水平以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间的比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

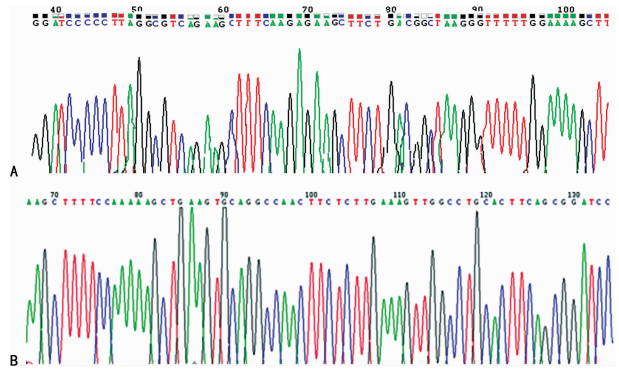
2.1 成功构建 α -Fodrin 的 siRNA 真核表达载体 构建的 2 段 α -Fodrin siRNA 真核表达载体送 invitrogen 公司进行 DNA 基因测序分析, 结果显示 α -Fodrin 的 2 段 siRNA 序列已准确无误地插入质粒载体 pGFP-V-RS 中, 见图 1。

2.2 荧光显微镜观察 HSG 细胞转染效率 α -Fodrin 的 siRNA 真核表达载体和空载体转染后 24、48、72、96 h 荧光显微镜下观察细胞绿色荧光, 结果显示转染后 48 h 绿色荧光最亮最多, 见图 2, 即细胞转染效率最高。

2.3 α -Fodrin 的 siRNA 真核表达载体转染 48 h 后 α -Fodrin mRNA 的表达水平 HSG 细胞转染 48 h 后, α -Fodrin siRNA1 组和 α -Fodrin siRNA2 组 α -Fodrin mRNA 的表达明显低于对照组和空载体组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), α -Fodrin siRNA1 组和 α -Fodrin siRNA2 组比较差异有统计学意义($P <$

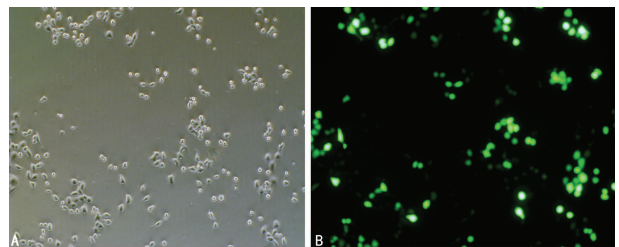
0.05)。见表 1。

2.4 α -Fodrin 的 siRNA 真核表达载体转染 48 h 后 α -Fodrin 蛋白的表达水平 HSG 细胞转染 48 h 后, 细胞荧光免疫的结果显示: α -Fodrin siRNA1 组的平均 OD 值为 (0.011 9 \pm 0.000 6), α -Fodrin siRNA2 组的平均 OD 值为 (0.008 6 \pm 0.000 6), 对照组的平均 OD 值为 (0.014 7 \pm 0.000 7) 和空载体组的平均 OD 值为 (0.016 7 \pm 0.001 9), α -Fodrin siRNA1 组和 α -Fodrin siRNA2 组 α -Fodrin 蛋白的表达低于对照组和空载体组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 同时 α -Fodrin siRNA2 组的 α -Fodrin 蛋白的表达低于 siRNA1 组, 差异也有统计学意义($P < 0.05$), 对照组和空载体组 α -Fodrin 蛋白的表达差异无统计学意义($P > 0.05$), 见图 3。



A: α -Fodrin siRNA1 组; B: α -Fodrin siRNA2 组。

图 1 α -Fodrin 的 siRNA 真核表达载体 (10 \times 20)

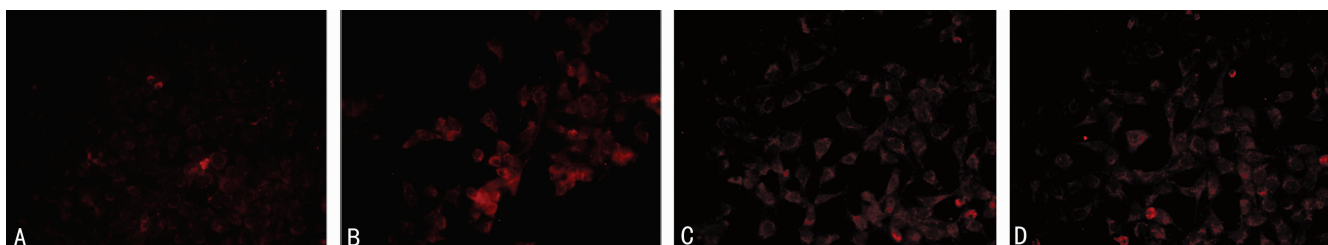


A: HSG 细胞的明视野; B: A 对应的绿色荧光。

图 2 HSG 细胞的转染效率 (10 \times 20)

表 1 4 组细胞中 α -Fodrin mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
对照组	1.00 \pm 0.00
空载体组	0.75 \pm 0.07
α -Fodrin siRNA1 组	0.06 \pm 0.03
α -Fodrin siRNA2 组	0.01 \pm 0.01



A: 对照组; B: 空载体组; C: α -Fodrin siRNA1 组; D: α -Fodrin siRNA2 组。

图 3 4 组 HSG 细胞中 α -Fodrin 蛋白的表达水平

2.5 α -Fodrin 的 siRNA 真核表达载体转染 48 h 后细胞上清中 IFN- γ 的表达水平 细胞转染 48 h 后 α -Fodrin siRNA1 组和 α -Fodrin siRNA2 组细胞上清中 IFN- γ 的水平低于对照组和空载体组,但差异无统计学意义($P>0.05$),4 组之间比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 2 4 组细胞上清中 IFN- γ 表达水平($\bar{x}\pm s$,pg/mL)

组别	IFN- γ
对照组	125.46 \pm 4.32
空载体组	118.06 \pm 6.84
α -Fodrin siRNA1 组	98.89 \pm 8.13
α -Fodrin siRNA2 组	103.53 \pm 8.20

2.6 α -Fodrin 的 siRNA 真核表达载体转染 48 h 后细胞上清中 IL-10 的表达水平 细胞转染 48 h 后 α -Fodrin siRNA1 组和 α -Fodrin siRNA2 组细胞上清中 IL-10 的水平高于对照组和空载体组,差异有统计学意义($P<0.05$), α -Fodrin siRNA1 组和 α -Fodrin siRNA2 组比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

表 3 4 组细胞上清中 IL-10 表达水平($\bar{x}\pm s$,pg/mL)

组别	IL-10
对照组	245.33 \pm 6.66
空载体组	233.33 \pm 6.65
α -Fodrin siRNA1 组	293.33 \pm 7.57
α -Fodrin siRNA2 组	304.00 \pm 9.85

3 讨 论

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术自发现以来就引起了研究者的极大关注,因其具有高效性、特异性等优点,这使得 RNAi 技术广泛用于基因功能和治疗多种疾病等方面的研究,尤其是用于治疗自身免疫性疾病^[3-5]、肿瘤^[6-7]的研究。Pauley 等^[3]将 caspase-3 的特异性 siRNA 序列和 M3 受体激动剂胆碱连接,转染 HSG 细胞,以受体介导的细胞内吞的方式将 siRNA 带入 HSG 细胞内,它可以明显抑制 caspase-3 在基因和蛋白水平的表达。Yu 等^[8]构建 TNF- α siRNA 的腺病毒载体注射小鼠,可有效沉默小鼠假体周围组织中的 TNF- α 的表达,从而抑制骨溶解。

Fodrin 在大多数哺乳动物细胞均有表达,本研究成功构建的 2 段 siRNA 真核表达载体并转染 HSG 细胞,结果发现 α -Fodrin siRNA1 组和 siRNA2 组中 HSG 细胞的 α -Fodrin mRNA 的表达与对照组和空载体组比较明显下降,充分说明 α -Fodrin 的特异性 siRNA 能在基因水平上沉默其表达。本研究进一步采用细胞荧光免疫法检测 HSG 细胞中 α -Fodrin 的蛋白表达情况,结果显示: α -Fodrin siRNA1 组和 α -Fodrin siRNA2 组 α -Fodrin 的蛋白表达水平与对照组和空载体组比较明显减弱,差异有统计学意义,说明 α -Fodrin siRNA 能抑制 α -Fodrin 在蛋白水平的表达。

Th 依据分泌细胞因子模式的不同分为 Th1 和 Th2, Th1 主要分泌 IFN- γ 等, Th2 主要分泌 IL-4、IL-6 等, Th1 和 Th2 在体内保持平衡,二者的失衡在自身免疫病的发病机制中具有

重要作用^[9-11]。本研究结果发现,与对照组比较, α -Fodrin 的 siRNA 作用 HSG 细胞后,IL-10 的水平明显升高,而 IFN- γ 的水平下降,但不明显。提示 α -Fodrin 的 siRNA 可以减轻炎症反应,同时逆转 HSG 细胞中 Th1 和 Th2 的失衡,使二者保持平衡。

本实验设计的第 2 段 siRNA 序列抑制 α -Fodrin mRNA 和蛋白水平的表达作用强于第 1 段 siRNA 序列,差异有统计学意义,而两段 siRNA 序列对 IFN- γ 和 IL-10 的作用没有明显差别。提示本实验的第 2 段 siRNA 序列具有更好的基因沉默效果,但对炎症反应的作用没有明显差别。本研究结果发现, α -Fodrin 的 siRNA 可以降低 Th1 细胞相关的细胞因子,升高 Th2 细胞相关的细胞因子,逆转 Th1 和 Th2 的失衡,保持 Th1 和 Th2 的平衡。本课题组从细胞水平观察了 α -Fodrin siRNA 对 HSG 细胞的作用,为 SS 的基因治疗提供实验依据。

本研究采用构建 α -Fodrin siRNA 质粒载体转染细胞,转染后 48 h 转染效率最高,但经流式细胞术鉴定也只能达到 40% 左右,因此, α -Fodrin siRNA 虽然能抑制 α -Fodrin mRNA 和蛋白水平的表达,但检测细胞上清中细胞因子却没有明显的改变,可能和其转染效率不是很高有关系。接下来本研究团队将构建腺病毒载体,从而大幅度提高其感染 HSG 细胞的效率,进一步检测细胞上清中细胞因子、细胞周期和细胞凋亡的变化,进行深入研究。此外,本研究只是通过检测部分细胞因子的表达而间接推测 T 细胞亚群的变化,而不是直接证明 T 细胞亚群的变化,因此是不充分的。后续本团队将研究 siRNA 对 SS 患者的外周血单个核细胞或 SS 动物模型 NOD 小鼠脾细胞的作用,从而直接说明 siRNA 对 T 细胞亚群的影响。

参考文献

- [1] 秦琴,孙懿,谷明莉,等.抗 α -胞衬蛋白抗体对干燥综合征的诊断价值:一项 Meta 分析[J]. 检验医学,2012,27(12):1074-1079.
- [2] Witte T. Diagnostic markers of Sjogren's syndrome [J]. Dev Ophthalmol,2010,45:123-128.
- [3] Pauley KM, Gauna AE, Grichtchenko II, et al. A secretagogue-small interfering RNA conjugate confers resistance to cytotoxicity in a cell model of Sjogren's syndrome[J]. Arthritis Rheum,2011,63(10):3116-3125.
- [4] Komano Y, Yagi N, Onoue I, et al. Arthritic joint-targeting small interfering RNA-encapsulated liposome: implication for treatment strategy for rheumatoid arthritis[J]. J Pharmacol Exp Ther,2012,340(1):109-113.
- [5] Zhou Z, Li A, Wang Z, et al. Blimp-1 siRNA inhibits B cell differentiation and prevents the development of lupus in mice[J]. Hum Immunol,2013,74(3):297-301.
- [6] Gao FL, Li WS, Liu CL, et al. Silencing bmi-1 enhances the senescence and decreases the metastasis of human gastric cancer cells[J]. World J Gastroenterol,2013,19(46):8764-8769.
- [7] 袁丽华,郭武华,肖志华,等. SUMO-1 基因沉默对肝癌细胞株 SMMC-7721bcl-2 及 c-myc 基因表达的影响[J]. 重庆医学,2010,39(19):2578-2580. (下转第 887 页)

- [3] 中华医学会眼科学分会青光眼学组. 我国原发性青光眼诊断和治疗专家共识(2014)[J]. 中华眼科杂志, 2014, 50(5):382-383.
- [4] Sakata LM, Lavanya R, Friedman DS, et al. Comparison of gonioscopy and anterior segment ocular coherence tomography in detecting angle closure in different quadrants of the anterior chamber angle[J]. Ophthalmology, 2008, 115(5):769-774.
- [5] 安玮, 郑琦, 路美侠. 丝裂霉素 C 在青光眼手术中的应用[J]. 国际眼科杂志, 2006, 6(2):417-419.
- [6] Khong JJ, Muecke J. Complications of mitomycinC therapy in 100 eyes with ocular surface meoplasia[J]. Ophthalmol, 2006, 90:819-822.
- [7] Hardillo J, Vanclooster C, Delaerep R. An investigation of airway wound healing using a novel in vivo model[J]. Laryngoscope, 2011, 111:1174-1182.
- [8] 林爱华, 刘奕明, 平其能. 壳聚糖纳米粒表面游离氨基与纳米粒特性研究[J]. 药学学报, 2007, 42(3):323-328.
- [9] Tokumitsu H, Ichikawa Y. Chitosan-gadopentetic acid complex nanoparticles for gadolinium neutron capture therapy of cancer: preparation by novel emulsion droplet coalescence technique and characterization [J]. Pharm Res, 2009, 16:1830-1835.
- [10] 赵堪兴, 杨培增. 眼科学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010:102-103.
- [11] Song Y, Onishi H, Machida Y, et al. Particle characteristics of carboxymethyl-chitin-mitomycin C conjugate and N-succinyl-chitosan-mitomycin C conjugate and their distribution and histological effect on some tissues after intravenous administration [J]. Pharma Sciences, 2009, 5:162-170.
- [12] Khandare J, Minko T. Polymer-drug conjugates: Progress in polymeric prodrugs[J]. Prog Polym Sci, 2006, 31(4):359-397.
- [13] 黄健强, 毛应清, 杨蕴刘. MMC 的研究与展望[J]. 国外医药抗生素分册, 2009, 20(1):37-40.
- [14] 丁敏, 程圭芳, 赵洁. MMCC 还原代谢机理研究[J]. 分析化学研究报告, 2005, 33(1):5-8.
- [15] Agnihotri NN. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery [J]. J Control Release, 2005, 100:5-28.
- [16] Howling GI, Dettmar PW, Goddard PA, et al. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro [J]. Biomaterials, 2001, 22(22):2959-2966.
- [17] Aksungur P, Sungur A, Unal S, et al. Chitosan delivery systems for the treatment of oral mucositis: in vitro and in vivo studies [J]. J Control Release, 2004, 98(2):269-279.
- [18] Onishi H, Takahashi H, Yoshiyasu M, et al. Preparation and in vitro properties of N-succinylchitosan-or carboxymethylchitin-mitomycin C conjugate microparticles with specified size [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2001, 27(7):659-667.

(收稿日期:2015-09-08 修回日期:2015-11-26)

(上接第 882 页)

- [8] Yu B, Hao S, Sun S, et al. Experimental study on small interfering RNA silencing expression of tumor necrosis factor alpha and inhibiting osteolysis [J]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2013, 27(8):994-999.
- [9] Gor DO, Rose NR, Greenspan NS. TH1-TH2: a procrustean paradigm [J]. Nat Immunol, 2003, 4(6):503-505.
- [10] Mitsias DI, Tzioufas AG, Veiopoulou C, et al. The Th1/Th2 cytokine balance changes with the progress of the immunopathological lesion of Sjogren's syndrome [J]. Clin Exp Immunol, 2002, 128(3):562-568.
- [11] Garcíe-Carrasco M, Font J, Filella X, et al. Circulating levels of Th1/Th2 cytokines in patients with primary Sjogren's syndrome: correlation with clinical and immunological features [J]. Clin Exp Rheumatol, 2001, 19(4):411-415.

(收稿日期:2015-09-18 修回日期:2015-11-28)

统计资料类型

统计资料共有三种类型: 计量资料、计数资料和等级资料。按变量值性质可将统计资料分为定量资料和定性资料。

定量资料又称计量资料, 指通过度量衡的方法, 测量每一个观察单位的某项研究指标的量的大小, 得到的一系列数据资料, 其特点为具有度量衡单位、多为连续性资料、可通过测量得到, 如身高、红细胞计数、某一物质在人体内的浓度等有一定单位的资料。

定性资料分为计数资料和等级资料。计数资料为将全体观测单位(受试对象)按某种性质或特征分组, 然后分别清点各组观察单位(受试对象)的个数, 其特点是没有度量衡单位, 多为间断性资料, 如某研究根据患者性别将受试对象分为男性组和女性组, 男性组有 72 例, 女性组有 70 例, 即为计数资料。等级资料是介于计量资料和计数资料之间的一种资料, 可通过半定量的方法测量, 其特点是每一个观察单位(受试对象)没有确切值, 各组之间仅有性质上的差别或程度上的不同, 如根据某种药物的治疗效果, 将患者分为治愈、好转、无效或死亡。