

· 实验研究 ·

HIF-1α 特异性 RNA 干扰表达载体的构建及体外效应研究

何柳芳, 陈克正

(广州市儿童医院新生儿监护中心, 广东 广州 510120)

〔摘要〕 目的 已知缺氧诱导因子-1α (HIF-1α) 在缺氧状态下可通过调节内皮素-1 (ET-1) 的升高而参与肺血管内皮细胞损伤及肺动脉高压, 最终导致肺出血。RNA 干扰 (RNAi) 是双链 RNA 介导的序列特异性转录后同源靶基因沉默效应, 目前 RNAi 技术已成为一种研究基因功能的有力工具, 故拟通过构建人 HIF-1α 基因的特异性小干扰 RNA (siRNA) 真核表达载体, 观测该载体在缺氧状态下对 HIF-1α 基因的干扰作用及对 ET-1 的抑制作用。**方法** 选择 6 个 (a~f) 可能的人 HIF-1α siRNA 干扰位点, 设计合成相应的特异性互补寡聚核苷酸链 (A~F), 采用基因克隆技术, 将合成的 (A~F) 链序列定向插入真核表达载体中, 构建成重组质粒 HIF-1α siRNA 真核表达载体 (A'~F'), 通过脂质体法转染至体外人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 48 h, 再以 CoCl₂ (100 μM) 模拟缺氧刺激 3 h 后, 观测 siRNA 对 HIF-1α mRNA 和 HIF-1 α 蛋白表达的抑制效应及 ET-1 水平。**结果** ①成功构建了分别针对 6 个 HIF-1 α siRNA 干扰位点 (a~f) 的重组质粒 HIF-1α siRNA 真核表达载体 (A'~F'); ②该 6 组真核表达载体转染 HUVECs 并经 CoCl₂ 模拟缺氧刺激后, 与未转染组比较, 结果显示 B' 及 D' 组明显抑制 HIF-1α mRNA 及 HIF-1α 蛋白的表达, 并部分抑制 ET-1 表达, 而其余 4 组与未转染组比较并无差异。**结论** 针对 b 及 d 干扰位点的 B' 及 D' 特异性 siRNA 真核表达载体, 能明显干扰 HIF-1α 基因的表达, 进而抑制 ET-1 的释放。该实验为下一步用 B'、D' 特异性 siRNA 真核表达载体在动物体内研究 HIF-1α 与新生儿缺氧性肺出血关系奠定基础。

[中国当代儿科杂志, 2007, 10(1): 60-64]

〔关键词〕 RNA 干扰; 小干扰 RNA; 表达载体; 缺氧诱导因子-1; 内皮素-1
〔中图分类号〕 R-33 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1008-8830(2008)01-0060-05

The construction and identification of siRNA expression vector against hypoxia inducible factor -1α *in vitro*

HE Liu-Fang, CHEN Ke-Zheng. Department of Neonatal Intensive Care Unit, Guangzhou Children's Hospital, Guangzhou 510120, China (Chen K-Z, Email: kezchen@163.com)

Abstract: Objective Previous studies have suggested that under hypoxic conditions hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α) contributes to the progression of neonatal pulmonary hemorrhage (NPH) by increasing the expression of endothelin-1 (ET-1) gene. RNA interference (RNAi) refers to the process of sequence-specific post-transcriptional gene-silencing mediated by double-stranded RNA. This new gene-silencing technique has recently been shown to be a powerful approach for studying gene function. The aim of this study was to construct the small interfering RNA (siRNA) eukaryotic expression vectors specific to human HIF-1α gene (pSIREN-Shuttle HIF-1α siRNA) in order to observe its silencing effect on HIF-1α under hypoxic conditions. **Methods** Six potential siRNA target sites (a-f) specific to human HIF-1α gene were designed and synthesized to two complementary oligonucleotides (A-F) for each siRNA target site. Using a gene recombination technique, the recombinant expression vectors (A'-F') were constructed by cloning the double strands oligonucleotide into RNAi-Ready pSIREN vector. The recombinant vectors were then transfected into the cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). After 48 hrs of culture, the cells were treated with CoCl₂ (100 μM) for 3 hrs. Expression of HIF-1α mRNA and protein was detected using RT-PCR and Western blot. ET-1 level in cell culture supernates was detected using ELISA. **Results** The recombinant HIF-1α siRNA eukaryotic expression vectors A'-F' respectively aiming at sites (a-f) were constructed successfully. Compared to the non-transfection group, liposome-mediated gene transfection of pSIREN-Shuttle HIF-1α siRNA expression vectors into HUVECs obviously down-regulated the mRNA and protein levels of HIF-1α, and partly decreased the ET-1 level in the B' and D' transfection groups. **Conclusions** The specific pSIREN-Shuttle HIF-1α siRNA expression vectors B' and D' aiming at b and d sites can inhibit the expression of HIF-1α, thus decreasing the level of its target gene ET-1. This may be helpful to study the relationship

[收稿日期] 2007-04-10; [修回日期] 2007-08-13
[作者简介] 何柳芳, 女, 博士研究生。主攻方向: 新生儿疾病。
[通讯作者] 陈克正, 教授, 硕士生导师, 广州市儿童医院新生儿监护中心, 邮编: 510120。

between HIF-1 α and neonatal pulmonary hemorrhage *in vivo* in future.

[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10 (1):60 – 64]

Key words: RNA interference; Small interfering RNA; Expression vector; Hypoxia inducible factor-1; Endothelin-1

新生儿肺出血的主要病理生理改变为肺血管内皮细胞损伤和肺动脉高压,初步研究证实缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 在缺氧状态下可通过调节内皮素-1 (ET-1) 而参与内皮细胞损伤及肺出血的形成^[1]。RNA 干扰 (RNAi) 是指将双链 RNA 导入细胞后引起与该段同源的 RNA 产生特异性降解,并使其相应的基因受到抑制的一种转录后基因沉默现象。RNAi 技术已成为目前最有效的基因抑制技术,能特异性抑制靶基因的转录,进而下调相应的蛋白水平。本研究通过构建并寻找有效的 HIF-1 α 基因的小干扰 RNA (siRNA) 真核表达载体,观测该载体在缺氧状态下对 HIF-1 α 基因及其下游基因 ET-1 的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞 (HUVEC), 为原代培养; pSIREN- Shuttle 真核表达载体 (购自 BD Clontech 公司); 胎牛血清 (购自 Gibco BRL 公司); DMEM 细胞培养基 (购自 Gibco BRL 公司); T4 连接酶及 BamHI 酶和 EcoRI 酶 (购自 NEB 公司); 质粒提取试剂盒 (购自 Omega 公司); 脂质体转染试剂盒 (购自 Invitrogen 公司); 小鼠抗人单克隆抗体 (购自 Santa-Cruz 公司); HRP 标记的羊抗鼠二抗 (购自中山公司); ECL Western blot 检测试剂 (购自 CST 公司); 硝酸纤维素膜 (购自 Whatman 公司); ET-1 ELISA 试剂盒 (购自 R&D 公司); 感受态大肠杆菌 DH5 α (广州医学院分子生物学实验室提供)。

1.2 方法

1.2.1 发卡样 HIF-1 α 基因 siRNA 设计 根据 Genbank 提供的 HIF-1 α 基因 cDNA 序列,用 Dharmacon 公司提供的在线 siRNA 设计工具,选择 6 个可能的干扰位点 (a ~ f): (a): 5'-ATGCTTACACACAGAAATG-3' (b): 5'-CCAACCTCAGTGTGGGTAT-3' (c): 5'-GTCACCACAGGACAGTACA-3' (d): 5'-AGTTCACCTGAGCCTAATA-3' (e): 5'-AAGACCGTATGGAAGACAT -3' (f): 5'-AGATACTAGCTTTG-CAGAA -3',并根据试剂盒的要求,以这 6 个位点分别设计合成发卡样两端反向互补配对的寡核苷酸序列 A ~ F (正义链),同时合成互补链 (反义链),其中正义链 5' 端引入 BamH I 酶切位点,反义链 5' 端引入 EcoR I 酶切位点 (表 1),寡核苷酸交由上海博亚生物科技公司合成。

1.2.2 重组质粒 HIF-1 α siRNA 真核表达载体 (pSIREN- Shuttle HIF-1 α siRNA) 的构建 将预期的寡核苷酸序列 a ~ f 正、反义链经过变性、复性后形成双链 HIF-1 α siRNA。采用 DNA 重组技术,将 HIF-1 α siRNA 双链定向亚克隆入 PU6 启动子指导的、适于构建 siRNA 的穿梭载体 pSIREN- Shuttle 中,形成 HIF-1 α siRNA 真核表达载体,转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,长出转化菌菌落。挑取单克隆菌落接种于 10 mL LB/Kan⁺ (Kan 50 μ L/mL) 培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡过夜,收集细菌,PCR 法筛选阳性重组质粒,抽提质粒 DNA,1% 的琼脂糖凝胶电泳检测结果。菌液送上海博亚生物科技公司测序鉴定,阳性克隆命名为重组质粒 HIF-1 α siRNA 真核表达载体,分别为 A' ~ F'。

表 1 HIF-1 α siRNA 特异性寡核苷酸序列

寡核苷酸序列	
A:	正义链 5'-GATCCGATGCTTACACACAGAAATGTTCAAGAGACATTTCTGTGTGAAGCATCTTTTTTCTAGAG-3' 反义链 3'-GCTACGAATGTGTGTCTTTACAAGTTCTCTGTAAAGACACACATTCGTAGAAAAAAGATCTCTTAA-5'
B:	正义链 5'-GATCCGCCAACCTCAGTGTGGGTATTTCAAGAGAATACCCACACTGAGGTTGGCTTTTTTCTAGAG-3' 反义链 3'-GCGGTTGGAGTCACACCCATAAAGTTCTCTTATGGGTGTGACTCCAACCGAAAAAAGATCTCTTAA-5'
C:	正义链 5'-GATCCGGTCACCACAGGACAGTACATTCAAGAGATGTA CTGTCTGTGGTGACCTTTTTTCTAGAG-3' 反义链 3'-GCCAGTGCTGTCTGTCAATGAAGTTCTCTACATGACAGGACACCACTGGAAAAAAGATCTCTTAA-5'
D:	正义链 5'-GATCCGAGTTCACCTGAGCCTAATATTTCAAGAGATATTAGGCTCAGGTGAACCTCTTTTTTCTAGAG-3' 反义链 3'-GCTCAAGTGGACTCGGATTATAAGTTCTCTATAATCCGAGTCCACTTGAGAAAAAAGATCTCTTAA-5'
E:	正义链 5'-GATCCGAAGACCGTATGGAAGACATTTCAAGAGAATGTCTTCCATACGGTCTTCTTTTTTCTAGAG-3' 反义链 3'-GCTTCTGGCATACCTTCTGTAAAGTTCTCTTACAGAAGGTATGCCAGAAGAAAAAAGATCTCTTAA-5'
F:	正义链 5'-GATCCGAGATACTAGCTTTGCAGAATTCAAGAGATTCTGC AAAAGCTAGTATCTCTTTTTTCTAGAG-3' 反义链 3'-GCTCTATGATCGAAACGTCTTAAGTTCTCTAAGACGTTTCGATCATAGAAAAAAGATCTCTTAA-5'

• 62 •

2.2 寻找出有效的重组质粒 HIF-1α siRNA 真核表达载体

2.2.1 对 HIF-1α mRNA 表达的抑制作用 与未转染组相比,转染的重组质粒 HIF-1α siRNA 真核表达载体中,细胞 HIF-1α mRNA 的表达在 B' 和 D' 组明显下调,而在 A'、C'、E'、F'组则无改变。说明最初选择的 6 个可能干扰位点中,只有 b、d 位点为 HIF-1α siRNA 有效靶点,可抑制 HIF-1α mRNA 表达(图 2)。

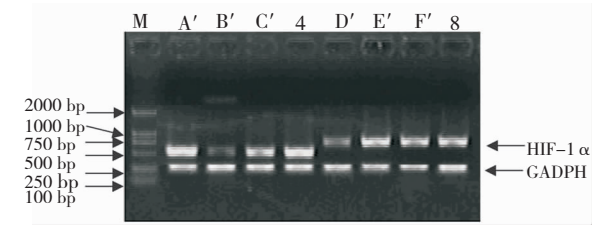


图 2 RT-PCR 检测 RNA 干扰后 HIF-1α mRNA 表达水平 A'、B'、C'、D'、E'、F'为重组质粒转染组;4、8 为未转染组;M 为 DNA 分子量标准。

2.2.2 对 HIF-1α 蛋白表达的抑制作用 为了进一步证实转染的重组质粒 HIF-1α siRNA 真核表达载体对细胞 HIF-1α 表达的影响,用鼠源性 HIF-1α 多克隆抗体对细胞蛋白水平进行 Western Blot 检测。结果显示,转染的 B'和 D'组细胞 HIF-1α 蛋白表达下调,其他 4 组无明显变化。进一步说明 b、d 两个位点均可抑制 HIF-1α 表达(图 3)。

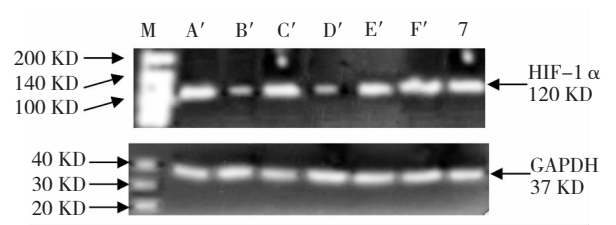


图 3 Western blot 检测 RNA 干扰后 HIF-1α 蛋白表达水平 A'、B'、C'、D'、E'、F'为重组质粒转染组;7 为未转染组。

2.2.3 细胞培养上清液中 ET-1 含量的变化 转染的 B' 和 D'组,ET-1 水平有所降低,与未转染组相比,差异有显著性($t = 18.974, 11.634, P < 0.05$);其余各转染组 ET-1 水平无下降,与未转染组相比,差异均不明显($P > 0.05$)。

表 2 各组 HUVECs 培养上清 ET-1 水平比较
($n = 6, \bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	n	ET-1
A'	6	79.00 ± 2.08
B'	6	43.25 ± 2.02
C'	6	81.03 ± 3.54
D'	6	49.20 ± 5.44
E'	6	82.56 ± 3.80
F'	6	82.09 ± 4.45
未转染	6	83.70 ± 4.48

3 讨论

新生儿肺出血是新生儿期危重急症之一,围生期缺氧/窒息、寒冷损伤/低体温是其主要病因,目前对其发病机制已初步明了。HIF-1 是由 HIF-1α 亚基与 HIF-1β 亚基组成的异二聚体,其中 HIF-1β 在细胞内稳定表达,HIF-1α 则受缺氧信号的调控^[2]。HIF-1 作为缺氧诱导的一个特异的 DNA 结合蛋白,能调节许多缺氧反应基因的转录,是联系氧信号传导与氧反应的桥梁。ET-1 是迄今所知最强的内源性缩血管活性肽,ET-1 基因是缺氧反应基因(HRG)之一,缺氧可引起 ET-1 表达分泌增加^[3]。我们前期实验采用低温缺氧后复温供氧的方法,制作了符合临床肺出血病因的新生大鼠肺出血动物模型^[4],并通过外源性 ET-1 气管内滴入,证明肺组织 ET-1 与肺出血的发病及病理生理过程相关^[5, 6]。此外亦证实了低温缺氧可诱导新生鼠肺组织 HIF-1α 水平升高,从而促进肺血管内皮细胞中靶基因 ET-1mRNA 转录和翻译,使内皮源性 ET-1 水平显著升高而导致肺出血^[1]。这些结果提示,在缺氧状态下 HIF-1 可能通过调节 ET-1 的表达,在肺出血的发生及发展过程中起重要作用。

RNAi 是指内源性或外源性双链 RNA(dsRNA)介导的细胞内某特定基因的 mRNA 发生特异性降解,从而导致靶基因的表达沉默,产生相应的功能表型抑制的现象^[7, 8]。因为 RNAi 技术能高效、特异地使相应基因失活,目前已作为一种简单有效的替代基因敲除的有力工具,广泛用于研究基因功能以及进行初步基因治疗的研究。

本研究选择 HIF-1α 作为靶目标,拟通过沉默其基因表达来抑制 HIF-1α 及其下游靶基因 ET-1 的表达。目前 siRNA 靶序列选择通常遵循以下原则^[9]: (1)从转录本(mRNA)的 AUG 起始密码开始,寻找“AA”二连序列,并记下其 3'端的 19 个碱基序列,作为潜在的 SiRNA 靶位点。正义链和反义链都采用

这19个碱基(不包括AA重复)来设计;(2)避开cDNA的5'和3'非编码区(UTRs)以及5'起始密码区附近的50个~100个核苷酸序列;(3)将挑选的序列在公共数据库中进行比较以确保目的序列与其他基因没有同源性;(4)GC碱基比例(GC%)为40%~50%。我们根据上述4项原则,挑选6个位点(a~f)作为候选干扰位点,并以此合成相应的寡核苷酸序列A~F。为验证所选序列是否有效,实验首先采用DNA重组技术构建重组质粒HIF-1 α siRNA真核表达载体A'~F',经阳性克隆测序鉴定证实,所插入的片段正确无误,5'上游具有真核表达的启动子pU6,3'下游具有转录终止结构poly(A)加尾信号。再通过脂质体转染技术,将重组质粒转染到HUVECs中,重组质粒转录出一段含HIF-1 α siRNA序列的具有反向互补特征的序列,按碱基互补配对原则,转录出来的此短序列折叠形成短链dsRNA,称为siRNA。其中siRNA中的反义链指导形成RNA诱导型沉默复合体RISC,再通过RISC介导切割靶mRNA分子中与siRNA反义链互补的区域,从而达到干扰基因表达的作用。重组质粒HIF-1 α siRNA真核表达载体A'~F'转染进入体外培养的HUVECs后,结果显示,在缺氧状态下B'、D'组能显著抑制胞内HIF-1 α mRNA和蛋白表达,并可以部分抑制ET-1水平增加。实验结果提示,本实验创建并寻找出有效的重组质粒HIF-1 α siRNA真核表达载体,所选择的b、d位点为HIF-1 α siRNA有效靶位点,HIF-1 α RNA干扰后,可下调HIF-1 α 蛋白水平,进而抑制其下游基因ET-1的表达,从而可能减轻缺

氧所致的肺出血程度,本实验为下一步用该2个有效的真核表达载体在新生动物体内研究HIF-1 α 与缺氧性肺出血关系奠定基础。

[参 考 文 献]

[1] 陶莉,陈克正. 低温缺氧后复温供氧新生大鼠出血肺组织缺氧诱导因子-1 α 及其受控蛋白的动态变化[J]. 中华围产医学杂志, 2007, 10(1):33-36.

[2] Semenza GL, Agani F, Feldser D, Lyer N, Kotch L, Laughner E, et al. Hypoxia, HIF-1, and the pathophysiology of common human diseases [J]. Adv Exp Med Bio, 2000, 475 (2):123-130.

[3] Hu J, Discher DJ, Bishopric NH, Webster KA. Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 245 (3):894-899.

[4] 陈克正,王卫. 新生大鼠肺出血动物模型的建立及对临床的启示[J]. 中国当代儿科杂志, 2002, 4 (5):357-360.

[5] 陈克正,王卫,吕回. 新生鼠出血肺组织中内皮素、降钙素基因相关肽与氧自由基的关系[J]. 广东医学, 2003, 24 (1):8-10.

[6] 陈克正,高晓燕. 内皮素致肺出血及降钙素基因相关肽拮抗内皮素作用的研究[J]. 中华儿科杂志, 2004, 42 (6):446-449.

[7] Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals [J]. Cell, 2000, 101(1):25-33.

[8] Matzke M, Matzke AJ, Kooter JM. RNA: guiding gene silencing [J]. Science, 2001, 293 (5532):1080-1083.

[9] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs[J]. Genes Dev, 2001, 15 (2):188-200.

(本文编辑:吉耕中)

· 消息 ·

新书消息

静脉输液是临床医师的重要治疗手段,合理输液能迅速改善体内环境,促进疾病治疗,不合理输液则加重内环境紊乱使病情加重,甚至造成死亡,故掌握合理输液疗法是临床医师的基本功。华中科技大学同济医学院协和医院儿科唐典俊教授主编的《小儿水电解质平衡与液体疗法》一书,深入浅出地介绍了人体水和电解质平衡及其失调的处理,提出平衡液、维持液、呕吐补充液、腹泻补充液的合理配方及输液不当反应的纠正等,有助于临床医师掌握合理的输液疗法。此书现已由中国医药科技出版社出版,每本26元,各大新华书店均有销售,欢迎选购。