

siRNA干扰小鼠睾丸支持细胞uPA表达的初步研究

胡 廉 刘 燕 李红钢 熊承良*

(华中科技大学同济医学院计划生育研究所/生殖医学中心, 武汉 430030)

摘要 该研究在验证小鼠睾丸支持细胞TM4有内源性uPA基因表达的基础上, 针对uPA mRNA靶序列设计三段不同的siRNA序列(*si-uPA*), 通过瞬时转染TM4细胞, 筛选确定uPA基因的有效干扰序列。将该有效干扰序列进行时效、量效实验, 观察siRNA对TM4细胞uPA mRNA和蛋白表达的影响。结果显示, siRNA的最佳转染浓度为50 nmol/L。三种*si-uPA*转染TM4细胞后, uPA mRNA和蛋白表达量均较空白对照组明显下降($P<0.05$), 以*si-uPA1*作用最为明显。*si-uPA1*转染24 h后, 转染组细胞uPA mRNA的表达均较对照组显著降低, 其中100 nmol/L组抑制效果最为明显, 抑制率达到70%; 随转染时间的延长, uPA mRNA表达持续降低, 转染72 h后, 三组转染细胞uPA mRNA表达量分别为对照组的53.9%、35.3%和27.7%($P<0.05$)。该研究成功筛选出针对uPA mRNA靶序列的有效干扰序列, 抑制效应持续至72 h; 同一时间点内, 抑制效应随转染浓度的增加而增强, 表现出良好的量效关系。

关键词 uPA; RNA干扰; siRNA; TM4细胞; 基因表达

尿激酶型纤溶酶原激活因子(urokinase-type plasminogen activator, uPA)是一种丝氨酸蛋白水解酶, 通过纤溶效应, 参与机体创伤愈合、血管再生、细胞迁移和组织重塑等多种生理和病理过程。近年来, uPA与雄性生殖系统的关系及其在雄性生殖中的作用日益受到关注。前期研究证实, uPA参与到精子发生、成熟、趋化、运动、精子获能、精卵识别、顶体反应和受精等一系列生殖生理过程^[1-7]。由于uPA参与男性生育的众多环节, 可能是一重要的生育相关因子, 理论上阻断uPA表达或拮抗uPA功能可对男性生殖过程产生多环节、多途径的干扰从而导致男性生育力下降。

随着分子生物学技术的飞速发展, RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术被越来越多的学者应用于各种领域的基因研究。RNAi是由双链RNA诱发的基因沉默现象, 通过阻碍特定基因的转录或翻译来抑制基因表达。当细胞中导入与内源性靶基因mRNA编码区同源的双链RNA时, 靶基因mRNA发生降解而导致基因表达沉默。利用这一作用机制, 研究者通过化学合成针对靶基因的双链RNA, 导入细胞或模型动物体内, 抑制靶基因的表达, 从而深入研究靶基因功能。

本实验以小鼠睾丸支持细胞株TM4为研究对象, 在验证其具有内源性uPA基因表达的基础上, 设计合成针对小鼠uPA基因的siRNA(*si-uPA*), 转染TM4细

胞, 观察siRNA对uPA基因的体外干扰效应, 比较不同序列的抑制效果, 筛选uPA基因的有效干扰序列, 并观察该有效干扰序列在不同浓度和作用时间对TM4细胞uPA mRNA表达的抑制效应, 为后续构建干扰载体提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 小鼠睾丸支持细胞株TM4(CRL-1715TM)购于美国标准生物制品收藏中心。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12培养基、胎牛血清、马血清购自Hyclone公司; Trizol、LipofectamineTM 2000、Opti-MEM1培养基购自Invitrogen公司; DNA marker (MarkerI)购自武汉华信阳光生物科技有限公司; 实时荧光定量PCR试剂盒购自TaKaRa公司; BCA蛋白浓度测定试剂盒购自北京碧云天生物技术研究所; 抗uPA单克隆抗体为Abcam公司产品。

1.2 方法

1.2.1 TM4细胞培养 TM4细胞用含有5%马血清、2.5%胎牛血清的DMEM/F12培养基在37 °C、5%

收稿日期: 2012-06-05 接受日期: 2012-07-18

国家自然科学基金面上基金(No.30770814)和华中科技大学医学科学基金(No.20100733)资助项目

*通讯作者。Tel: 027-83692651, Fax: 027-83692605, E-mail: clxiong951@sina.com

CO₂培养箱中培养,每2~3 d换液1次,0.25%胰酶常规消化传代。

1.2.2 siRNA的设计、合成 根据NCBI基因数据库中小鼠uPA的mRNA序列(Genbank No: NM_008873),设计三对siRNA序列,分别为: si-uPA1正义链: 5'-CUA CUA UGG CUC UGA AAU UdTd-3',反义链: 5'-AAU UUC AGA GCC AUA GUA GTdTd-3'; si-uPA2正义链: 5'-GGA AAG GCC AAC ACU GAU AdTd-3',反义链: 5'-UAU CAG UGU UGG CCU UUC CTdTd-3'; si-uPA3正义链: 5'-CCA UCU ACC AGA AGA ACA AdTd-3',反义链: 5'-UUG UUC UUC UGG UAG AUG GTdTd-3'。以上siRNA和带有Cy3荧光标记的siRNA(Cy3-siRNA)、阴性对照siRNA(siRNA-scramble, siRNA-sc)均由广州锐博生物科技有限公司合成。

1.2.3 siRNA转染 TM4细胞接种于细胞培养板上,待细胞生长融合达30%~50%时,按Lipofectamine™ 2000说明书的实验步骤进行转染。将Cy3-siRNA分为四组,使其转染终浓度分别为20, 30, 50, 100 nmol/L,以Lipofectamine™ 2000和Opti-MEMI分别作为试剂对照组和空白对照组。转染24 h后,荧光显微镜下550 nm激发波长观察红色荧光阳性细胞,选择siRNA的最佳转染浓度。

根据筛选的最佳转染浓度转染si-uPA1、si-uPA2、si-uPA3和siRNA-sc,设置试剂对照和空白对照,通过检测转染后72 h的uPA mRNA和蛋白水平,比较不同序列的抑制效果,筛选uPA基因的有效干扰序列。

转染uPA基因的有效干扰序列,测定不同转染浓度(30, 50, 100 nmol/L)和不同转染时间(24, 48, 72 h)后uPA mRNA水平,对siRNA抑制TM4细胞uPA mRNA表达的体外干扰效应进行初步观察。

1.2.4 实时荧光定量PCR检测uPA mRNA表达水平 Trizol法提取TM4细胞和小鼠肝脏、肾脏总RNA,蛋白核酸分析仪确定RNA浓度后,采用两步法进行RNA反转录、扩增。以 β -actin为内参,检测uPA mRNA的表达。uPA上游引物序列: 5'-GAA GGT GGC AGT GTA CTT GG-3',下游引物序列: 5'-CTG TGG GCA TTG TAG GGT TT-3',扩增产物长度为272 bp。 β -actin上游引物序列: 5'-GTC CCT CAC CCT CCC AAA AG-3',下游引物序列: 5'-GCT GCC TCA ACA CCT CAA CCC-3',扩增产物长度为266 bp。引物由上海生物工程技术有限公司合成。根据实时荧光定量PCR试剂盒说明书建立反应体系: SYBR Premix

Ex Taq™(2 \times) 12.5 μ L, Rox(50 \times) 0.5 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各0.5 μ L, cDNA模板2 μ L,双蒸水9 μ L,总体积25 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s,共计40个循环。PCR扩增结束后,将PCR产物从55 $^{\circ}$ C以0.2 $^{\circ}$ C/s的速度升温至95 $^{\circ}$ C,连续读取荧光值,由实时荧光定量PCR仪自动绘制熔解曲线。根据熔解曲线评判PCR反应的特异性,将反应产物行1.5%琼脂糖凝胶电泳分析。建立uPA、 β -actin的标准曲线,通过双标准曲线法计算各组uPA mRNA的相对表达量。

1.2.5 Western blot检测uPA蛋白表达水平 RIPA裂解液提取细胞总蛋白,BCA法进行蛋白定量,常规处理蛋白样品后电泳、转膜。PVDF膜在封闭液中封闭1 h后加入一抗,4 $^{\circ}$ C过夜,二抗37 $^{\circ}$ C孵育1 h,洗膜后加入发光剂曝光显影成像。

1.2.6 统计学分析 mRNA表达量用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用SPSS15.0分析软件进行数据处理和统计分析。组间比较采用方差分析,两两比较采用SNK检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

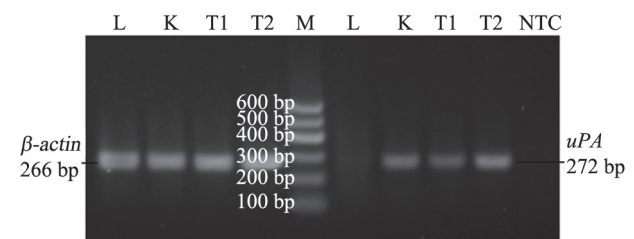
2 结果

2.1 TM4细胞中uPA mRNA的表达

PCR检测uPA mRNA的表达见图1。电泳结果显示, TM4细胞中有uPA基因(272 bp)表达,与小鼠肾脏组织表达条带一致,而小鼠肝脏组织无uPA基因表达。小鼠肝脏、肾脏组织以及TM4细胞中均有内参基因 β -actin(266 bp)表达。

2.2 siRNA最佳转染浓度的筛选

用不同浓度的Cy3-siRNA转染TM4细胞,转染24 h后荧光显微镜观察红色荧光(图2),通过荧光强

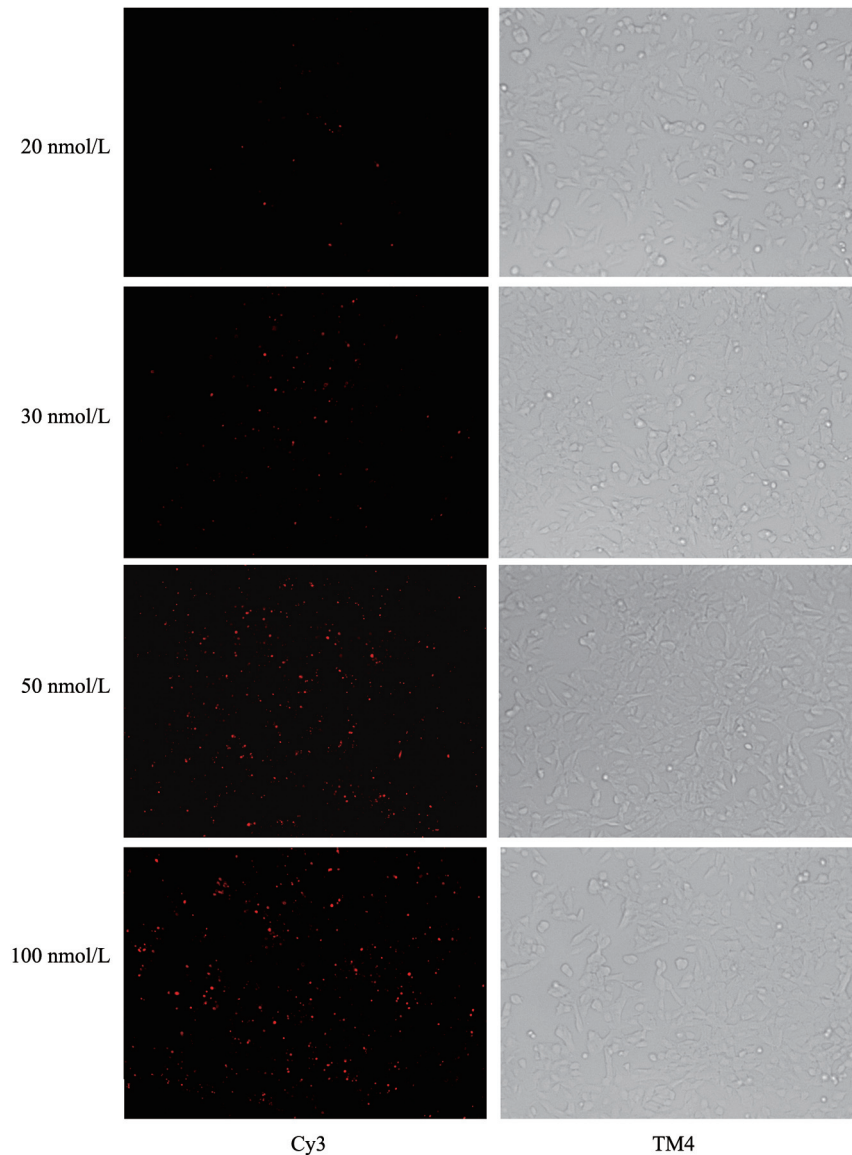


M: markerI; T1、T2: TM4细胞; L: 小鼠肝脏; K: 小鼠肾脏; NTC: 无模板阴性对照。

M: markerI; T1、T2: TM4 cells; L: liver; K: kidney; NTC: negative template control.

图1 uPA mRNA在TM4细胞中的表达

Fig.1 Expression of uPA mRNA in TM4 cells



左列为荧光显微镜下观察红色荧光图像,右列为同一视野下光镜观察图。
Fluorescent images in left panel and light microscopy images in right panel.

图2 不同浓度的Cy3-siRNA转染TM4细胞后的荧光照片(200×)

Fig.2 Images of TM4 cell after transfection with different concentration of Cy3-siRNA(200×)

弱筛选siRNA的最佳转染浓度。结果显示, 20 nmol/L的Cy3-siRNA转染TM4细胞24 h后仅见微弱的Cy3红色荧光, 随着转染浓度的增加, 荧光亮度逐渐增强, 发红色荧光的TM4细胞增多, 以50 nmol/L和100 nmol/L最为明显。根据Cy3-siRNA转染浓度筛选实验结果, 选定50 nmol/L作为siRNA的最佳转染浓度。

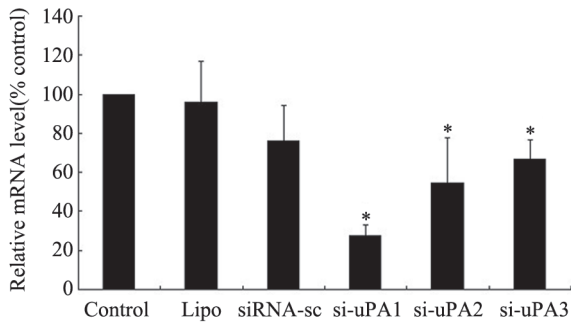
2.3 *uPA*有效干扰序列的筛选

以空白对照组为参照, 三种si-uPA以50 nmol/L的浓度转染TM4细胞72 h后, 各组*uPA* mRNA表达改

变见图3。三种si-uPA转染TM4细胞后, *uPA* mRNA表达量均较空白对照组明显下降($P < 0.05$), 而试剂对照组和阴性对照组*uPA* mRNA表达无明显改变。Western blot测定各组uPA蛋白表达见图4。结果显示, 三种si-uPA对TM4细胞uPA蛋白的表达均有抑制作用, 以si-uPA1作用最为明显。选择si-uPA1序列作为后续实验中*uPA*的有效干扰序列。

2.4 siRNA对TM4细胞*uPA* mRNA表达的抑制效应

不同浓度si-uPA1转染TM4细胞干扰*uPA*表达见图5。结果显示, 转染24 h后, 转染组细胞*uPA* mRNA



* $P < 0.05$.

图3 50 nmol/L的si-uPA转染72 h后各组uPA mRNA表达比较

Fig.3 Relative expression of uPA mRNA after transfection with 50 nmol/L si-uPA for 72 h

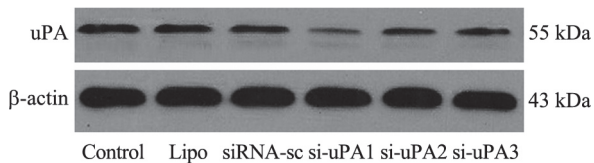
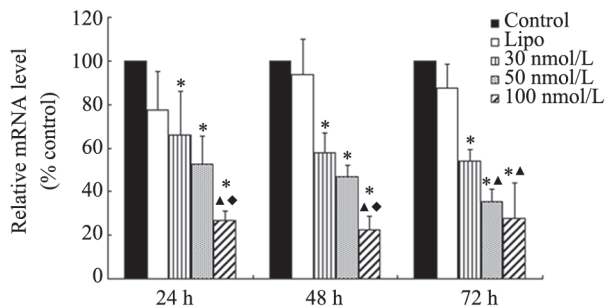


图4 50 nmol/L的si-uPA转染72 h后各组uPA蛋白表达比较

Fig.4 Expression of uPA protein after transfection with 50 nmol/L si-uPA for 72 h



* $P < 0.05$, 与空白对照组比较; $\blacktriangle P < 0.05$, 与30 nmol/L组比较; $\blacklozenge P < 0.05$, 与50 nmol/L组比较。

* $P < 0.05$ vs blank control; $\blacktriangle P < 0.05$ vs 30 nmol/L group; $\blacklozenge P < 0.05$ vs 50 nmol/L group.

图5 转染24, 48, 72 h后, 不同浓度组si-uPA1的uPA mRNA相对表达量的比较

Fig.5 Comparison of uPA mRNA expression after transfection with different concentrations of si-uPA1 for 24, 48, 72 h

的表达均较对照组显著降低, 其中100 nmol/L组抑制效果最为明显, 抑制率达到70%, 抑制效果强于30 nmol/L组和50 nmol/L组($P < 0.05$); 随转染时间的延长, uPA mRNA表达持续降低, 转染72 h后, 三组细

胞uPA mRNA表达量分别为对照组的53.9%、35.3%和27.7%, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 50 nmol/L与100 nmol/L组抑制效果均高于30 nmol/L组($P < 0.05$), 两组之间无显著性差异。时效、量效实验表明, 三组浓度的si-uPA1在转染24 h后即可抑制TM4细胞uPA mRNA的表达, 抑制效应持续至72 h; 同一浓度的si-uPA1在不同时间点内的抑制效应无显著性差异; 同一时间点内, 抑制效应随转染浓度的增加而增强, 表现出良好的量效关系。

3 讨论

TM4细胞系源自未成年小鼠睾丸, 由于其既有小鼠睾丸支持细胞的一般特性又不存在致癌风险, 自从1980年由Mather等^[8]首次分离建立以来, 就成为科学家用以研究支持细胞体外功能的特定细胞系。近年来随着转基因技术的发展, TM4细胞也成为睾丸组织体细胞相关基因转染的常用宿主细胞^[9-10]。依据美国标准生物品收藏中心对TM4细胞的描述 (<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-1715&Template=cellBiology>), 该细胞除分泌视黄醇结合蛋白、转铁蛋白等物质外, 还表达卵泡刺激素受体、雄激素和孕激素受体等支持细胞激素相关受体。对其与纤溶酶原激活因子关系的研究表明, 组织型纤溶酶原激活因子(tissue-type plasminogen activator, tPA)为TM4细胞产物之一, 是否有uPA的分泌和表达尚无文献报道。根据GenBank数据库中uPA基因表达组织类型的检索结果(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Mm.4183>), uPA基因在小鼠肾脏组织表达, 而肝脏组织不表达。因此, 我们以小鼠肾脏组织和肝脏组织分别作为阳性和阴性对照, 对TM4细胞中uPA基因表达情况进行检测。本实验首次验证TM4细胞存在内源性uPA基因的表达, 为uPA在男性生殖领域开展细胞水平研究的功能提供了新的思路。

在验证TM4细胞具有内源性uPA表达的基础上, 我们设计针对uPA的siRNA序列, 瞬时转染TM4细胞后, 观察比较各组TM4细胞uPA mRNA和蛋白表达情况, 结果显示, 三种si-uPA均能抑制TM4细胞中uPA mRNA的表达, 与空白对照组比较具有显著性差异。通过Western blot对uPA蛋白的检测, 确定si-uPA1的抑制作用较其他两条干扰序列更为明显。本实验表

明, 针对同一靶基因不同靶点设计的siRNA干扰效应存在一定差异。尽管很多研究通过对siRNA效能与mRNA靶点二级结构的关系进行探讨, 总结出众多siRNA设计原则, 但由于mRNA的高级结构、区域性调节蛋白以及转录本亚细胞定位的不同^[11]等因素的影响, 仅凭序列统计学方法推测^[12]或siRNA氢键能量分布^[13]所得的siRNA序列仍然存在局限性。同一靶基因的不同siRNA是否有效以及干扰效应的评估, 必须通过实验进行验证, 即对候选siRNA进行筛选, 才能获得最佳干扰效应的siRNA序列。

通过对si-uPA1的时效量效实验, 我们对siRNA抑制TM4细胞uPA基因表达的干扰效应进行了初步观察。结果显示, siRNA对uPA的抑制效应在转染后24 h后即出现, 可一直持续至72 h。siRNA作用期间, 抑制效应随时间的延长而增强。虽然目前研究认为, 导入体内的化学合成siRNA由于半衰期短, 无法对靶基因产生长期沉默效应。本实验中瞬时转染的siRNA仍然显示出良好的抑制效果, 在实验观察时段内有效的抑制了靶基因的表达。另一方面, 量效实验结果显示, 相同时间点内, 100 nmol/L组siRNA的抑制效果远高于30 nmol/L组; 转染24 h和48 h时, 50 nmol/L组的抑制效果与30 nmol/L组无差异, 而在转染72 h后, 50 nmol/L组的抑制效果接近于100 nmol/L组, 高于30 nmol/L组。这表明, RNAi的抑制效果与siRNA剂量存在明显正相关, siRNA剂量越大, 干扰效果越强, 在一定剂量范围内, 高浓度的siRNA干扰效应较快达到“平台期”, 其抑制靶基因表达的作用没有早期明显。虽然本实验未能将RNAi作用时间点延伸至干扰效应消失, 但推测随RNAi作用时间的延长, siRNA抑制效果渐趋平缓后下降, 靶基因的表达在达到抑制高峰后会逐渐恢复。

综上, 本实验成功筛选出uPA基因的有效干扰序列, 为后续构建RNAi载体提供了前提条件。同时, 通过si-uPA1的时效量效实验, 对siRNA抑制TM4细胞uPA基因表达的干扰效应进行了初步观察, 表明TM4细胞中uPA基因的表达可受到siRNA的抑制, 为uPA基因的诱导调控奠定了理论基础。

参考文献 (References)

- 1 Uhrin P, Dewerschim M, Hilpert M, Chrenek P, Schöfer C, Zechmeister-Machhart M, *et al.* Disruption of the protein C inhibitor gene results in impaired spermatogenesis and male infertility. *J Clin Invest* 2000; 106(12): 1531-9.

- 2 刘以训. 纤溶酶原激活因子和抑制因子在生殖中的作用. *科学通报*(Liu Yixun. The effects of plasminogen activator and inhibitor in reproduction. *Chinese Science Bulletin*) 1999; 44(3): 242-52.
- 3 丁晓芳, 熊承良. 尿激酶型纤溶酶原激活因子在精子趋化运动中的作用. *中华男科学*(Ding Xiaofang, Xiong Chengliang. Effects of urokinase-type plasminogen activator on chemotactic responses of spermatozoa *in vitro*. *National Journal of Andrology*) 2005; 11(6): 409-12, 418.
- 4 郑萍, 邹如金, 刘以训. 纤溶酶原激活因子与猕猴精子运动力的关系及其在附睾和附性腺中的表达调节. *动物学研究*(Zheng Ping, Zou Rujin, Liu Yixun. Possible involvement of plasminogen activator in the acquirement of sperm progressive motility and the regulation of PA and PAI-1 mRNA expressions in epididymis, prostate and seminal vesical in rhesus monkey. *Zoological Research*) 2002; 23(1): 19-24.
- 5 丁晓芳, 田永红, 李红钢, 熊锦文, 熊承良. 尿激酶型纤溶酶原激活因子在小鼠精-卵接触前通讯和体外受精中作用初探. *生殖与避孕*(Ding Xiaofang, Tian Yonghong, Li Honggang, Xiong Jinwen, Xiong Chengliang. Role of urokinase-type plasminogen activator in the pre-contact sperm-egg communication and fertility of mice *in vitro*. *Reproduction and Contraception*) 2006; 26(1): 3-9.
- 6 郑萍, 邹如金, 刘以训. 猕猴精浆纤溶酶原激活因子的来源及在精子获能中的作用. *生理学报*(Zheng Ping, Zou Rujin, Liu Yixun. Source of plasminogen activator in rhesus monkey semen and its possible role in sperm capacitation. *Acta physiologica Sinica*) 2001; 53(1): 45-50.
- 7 熊承良, 赵天华, 翁宁, 孙淑杰, 李志强, 苏静, 等. 人受精卵和未受精卵培养液中尿激酶型纤溶酶原激活因子的含量比较. *生殖与避孕*(Xiong Chengliang, Zhao Tianhua, Weng Ning, Sun Shujie, Li Zhiqiang, Su Jing, *et al.* Comparative study on level of urakinse-type plasminogen activator in medium containing fertilized oocytes and unfertilized oocytes. *Reproduction and Contraception*) 1998; 18(6): 342-5.
- 8 Mather JP. Establishment and characterization of two distinct mouse testicular epithelial cell lines. *Biol Reprod* 1980; 23(1): 243-52.
- 9 Zeng J, Hassan AJ, Morales CR. Study of the mouse sortilin gene: Effects of its transient silencing by RNA interference in TM4 Sertoli cells. *Mol Reprod Dev* 2004; 68(4): 469-75.
- 10 Yoon KA, Chae YM, Cho JY. FGF2 stimulates SDF-1 expression through the Erm transcription factor in Sertoli cells. *J Cell Physiol* 2009; 220(1): 245-56.
- 11 Krueger U, Bergauer T, Kaufmann B, Wolter I, Pilk S, Heider-Fabian M, *et al.* Insights into effective RNAi gained from large-scale siRNA validation screening. *Oligonucleotides* 2007; 17(2): 237-50.
- 12 Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 2004; 22(3): 326-30.
- 13 Chalk AM, Wahlestedt C, Sonnhammer EL. Improved and automated prediction of effective siRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 319(1): 264-74.

Inhibition of *uPA* Expression with siRNA in Mice Sertoli Cells

Hu Lian, Liu Yan, Li Honggang, Xiong Chengliang*

(Family Planning Research Institute, Center of Reproductive Medicine, Tongji Medical College,
Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430030, China)

Abstract The aim of our study is to analyze the suppressive effects of siRNA targeting *uPA* gene (*si-uPA*) in *uPA* expression in mice sertoli cell line (TM4 cells). 3 different sequences of si-uPA were transfected into TM4 cells to screen the effective si-uPA. The inhibition of *uPA* expression was observed at various time points after transfection with the effective si-uPA in three different concentration (30, 50, 100 nmol/L). The results showed that the proper concentration of transfection for TM4 cells was 50 nmol/L. Among the three si-uPA, si-uPA1 had best suppressive effect. After transfection of si-uPA1 into TM4 cells, the decrease of *uPA* mRNA expression was observed in all three groups at 24 h, and the suppressive rate reached 70% in 100 nmol/L group, which was much obvious than those in 30 nmol/L and 50 nmol/L groups ($P<0.05$). The relative expression of *uPA* reduced steadily with the extension of transfection. At 72 h after transfection, the *uPA* mRNA in those three groups were 53.9%, 35.3% and 27.7%, respectively, compared with those in blank control ($P<0.05$). In this study, the effective sequence of siRNA targeting *uPA* gene was screened from three candidates and the inhibition effect continued to 72 h. The suppressive effects of the same siRNA concentration showed no significant differences when detected at different time points, while variant concentration of siRNA inhibited the expression of *uPA* gene in a dose-dependent manner.

Key words *uPA*; RNA interference; siRNA; TM4 cells; gene expression

Received: June 5, 2012 Accepted: July 18, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30770814) and Medical Research Foundation of Huazhong University of Science and Technology (No.20100733)

*Corresponding author. Tel: 86-27-83692651, Fax: 86-27-83692605, E-mail: clxiong951@sina.com