

大鼠晚期糖基化终产物受体基因特异性小干扰 RNA 表达载体的构建及其活性鉴定

夏金荣 刘乃丰*

(东南大学附属中大医院消化科, 南京 210009)

摘要 应用两个 RNA 干扰实验技术网络的 RNA 设计软件, 模拟 SD 大鼠晚期糖基化终产物受体(RAGE) mRNA 的二级结构, 设计针对 RAGE mRNA 417、221 和 534 位点的 3 对小干扰 RNA (siRNA) 序列(21 nt), 再转化为能表达其小发夹结构 RNA(shRNA)的寡核苷酸序列, 分别将其克隆于 pGCsi-U6/Neo/GFP 载体, 利用酶切和序列分析鉴定克隆的正确性。将 RAGE 特异性 siRNA 表达克隆转染肝星状细胞(HSC)-T6 细胞系, 以空白及转染非特异性 siRNA 表达克隆作为对照, 分别以实时荧光定量 PCR 和 Western 印迹法检测各组 HSC-T6 细胞 RAGE 基因和蛋白质的表达。结果显示: 成功构建了 RAGE 特异性 siRNA 重组表达载体 pGCsi-R1、pGCsi-R2、pGCsi-R3 和非特异性 siRNA 重组表达载体 pGCsi-C, 与对照组相比, 转染特异性 siRNA 重组表达载体的 HSC-T6 细胞的 RAGE mRNA 表达受到明显抑制, 在 0.25~1.0 nmol/L 范围内, RAGE mRNA 下调幅度呈浓度依赖性增加, 以 1.0 nmol/L pGCsi-R1 最显著, 转染 pGCsi-C 的 HSC-T6 细胞的 RAGE mRNA 表达水平无明显变化。转染 pGCsi-R1 的 HSC-T6 细胞 24、48 和 72 h 表达的 RAGE mRNA 分别较空白对照组下调 (79.65±8.88)%、(78.96±7.94)% 和 (73.11±6.89)% ($F=71.397$, 61.824, 61.98, P 均<0.01), 在 72 h 范围内, RAGE mRNA 下调幅度呈时间依赖性降低。同时, 转染 pGCsi-R1 的 HSC-T6 细胞 50 kDa 和 46 kDa 的 RAGE、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA) mRNA 及蛋白质的表达也明显下调, 分别为空白对照组的 (43.91±1.18)% ($F=386.19$, $P<0.01$)、(36.33±0.78)% ($F=386.07$, $P<0.01$)、(57.53±3.25)% ($F=20.91$, $P<0.05$) 和 (58.48±3.08)% ($F=56.59$, $P<0.05$)。结果表明: pGCsi-R1 表达的特异性 siRNA 可高效抑制 HSC-T6 细胞中 RAGE 基因和蛋白质的表达及肝星状细胞的激活。

关键词 晚期糖基化终产物受体; 小干扰 RNA; 肝星状细胞

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是肝脏对慢性、持续性损伤因子的一种应激反应, 包括肝细胞损伤和伴随的炎症反应以及随后的组织重塑。作为反应结果, 大量的细胞外基质(extracellular matrix, ECM), 主要是 I、III 型胶原在肝实质间形成纤维疤痕。近年来, 随着对晚期糖基化终产物(advanced glycation end product, AGE)及其特异性受体(receptor for advanced glycation end product, RAGE)研究的深入, RAGE 与其配体 AGE 相互作用所介导的氧化应激和各种生物学作用越来越引起人们的重视。研究证实^[1-4], RAGE 作为信号转导受体介导 AGE 结合在细胞表面, 可引起广泛的病理作用和多种疾病如糖尿病、肾小球硬化、肾间质纤维化、炎症、神经性变性或多发性神经病变、动脉粥样硬化和老化等。Fehrenbach 等^[5]研究显示, RAGE 可能是 HF 过程中激活肝星状细胞

(hepatic stellate cells, HSCs)向肌成纤维细胞(myofibroblasts, MFs)转化的主要参与受体。小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)能非常特异地沉默内源性基因的表达, 为人们通过选择性地抑制有害基因表达, 研究抗炎症、抗凋亡、抗肿瘤等治疗策略提供了新思路和方法^[6]。本研究设计、构建了针对大鼠 RAGE mRNA 的特异性 siRNA 表达载体, 并探讨了特异性 siRNA 在 HSC-T6 细胞内抑制 RAGE、 α -平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin, α -SMA)基因和蛋白质表达的活性。

1 材料与方法

收稿日期: 2007-03-28 接受日期: 2007-06-12

* 通讯作者: Tel: 025-83272001, Fax: 025-83272010, E-mail:

liunf@seu.edu.cn

1.1 材料

1.1.1 质粒、细胞株 pGCsi-U6/Neo/GFP 质粒购自 Genscript 公司, 大鼠 HSC-T6 细胞株由美国西奈山医学院 Scott L. Friedman 教授惠赠。

1.1.2 试剂 脂质体转染试剂盒 LipofectAMINE™ 2000、胎牛血清购自美国 Invitrogen 公司, T4 DNA 连接酶、限制性内切酶(*Hind*III 和 *Bam*HI)、实时 PCR 试剂盒为日本 TaKaRa 公司产品, 质粒 DNA 小提试剂盒、Trizol 试剂购自德国 Qiagen 公司, 胰蛋白酶为 Amresco 公司产品, 琼脂糖和聚丙烯酰胺购自 Genview 公司, 鼠抗 RAGE 单克隆抗体为美国 R & D Systems 公司产品, 鼠抗 α -SMA 单克隆抗体和鼠抗 β -肌动蛋白单克隆抗体及 HRP 标记的兔抗鼠 IgG 二抗购自美国 Santa Cruz 生物技术公司, 其他均为分析纯试剂。

1.1.3 DNA 片段、引物合成和 DNA 序列分析 由上海生工生物技术服务有限公司合成及测序。

1.2 方法

1.2.1 靶位点选择、RAGE 特异性 siRNA 及其编码 DNA 双链的设计 应用两个 RNA 干扰实验技术网络的 RNA 设计软件(<http://www.ic.sunysb.edu/Stu/shilin.html>、http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html)模拟大鼠 RAGE mRNA 的二级结构, 并根据哺乳动物细胞 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)的设计原则(AA-N19 原则)^[7], 在距起始密码子 100 nt 后、GC 含量达 45%~50% 的 RNA 二级结构编码环区选择 3 个 siRNA 作用的靶位点(417、221 和 534 位点), 根据靶位点序列和其互补序列, 设计 3 对 21 nt siRNA 序列(经 Blast 确定序列的特异性), 再转化为能表达其发夹结构的短小 RNA 的寡核苷酸序列。在序列两端加上限制性内切酶切位点 *Bam*HI 和 *Hind*III 及 9 bp 环状的发夹样结构序列, 分别命名为 R1、R2 和 R3。R1(针对 RAGE mRNA 417 位点)序列为: 有义链 DNA: 5'-GATCCCAAGCCGGAATTGTGAATCCTTTCAAGAGAAGGATTCACAATTTCCGGCTTTTTTTGGAT-3', 反义链 DNA: 5'-AGCTATCCAAAAAAGCCGGAATTGTGAATCCTTCTTGAAAGGATTCACAATTTCCGGCTTGG-3'; R2(针对 RAGE mRNA 221 位点)序列为: 有义链 DNA: 5'-GATCCCAAGGACTGAAGCTTGAAGGTTTCAAGAGAACCTTCCAAGCTTCAGTCCTTTTTTTGGAT-3'; 反义链 DNA: 5'-AGCTATCCAAAAAAGGACTGAAGCTTGAAGGTTCTCTTGAAACCTTCCAAG-

CTTCAGTCCTTGG-3'; R3(针对 RAGE mRNA 534 位点)序列为: 有义链 DNA: 5'-GATCCCCACCTCTGATTCCTGATGGCTTCAAGAGAGCCATCAGGAATCAGAGGTTTTTTGGAAA-3', 反义链 DNA: 5'-AGCTTTTCCAAAAACCTCTGATTCCTGATGGCTCTTGAAGCCATCAGGAATCAGAGGTGGG-3'; 另一对编码非特异性 siRNA(经 Blast 确认与大鼠 RAGE mRNA 无同源性)的寡核苷酸序列, 同样在其两端加限制性内切酶切位点 *Bam*HI 和 *Hind*III 及发夹样结构序列, 命名为 C。其序列为: 有义链 DNA: 5'-GATCCCCAATTCAGTGGCCATCGTATTCAAGAGATACGATGGCCACTGGAATTTTTTTTA-3', 反义链 DNA: 5'-AGCTTAAAAAATTCCAGTGGCCATCGTATCTCTTGAATACGATGGCCACTGGAATTGGG-3'。

1.2.2 双链 DNA 的退火和制备 分别将合成的寡核苷酸有义链和反义链溶于 DEPC-H₂O 中配成 80 μ mol/L 的浓度, 各取 1 μ l 有义、反义 DNA 双链与 48 μ l 退火缓冲液(20 mmol/L KCl, 6 mmol/L HEPES-KOH, 0.2 mmol/L MgCl₂, pH 7.4)混匀, 94 °C 变性 3 min, 72 °C 温育 3 min, 37 °C 温育 30 min, 最终缓慢冷却至室温形成双链 DNA, 以 20 μ mol/L 的浓度保存备用。取 2 μ l 样本进行 16 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 了解 DNA 双链纯度和有无降解。

1.2.3 RAGE 特异性 siRNA 表达载体的构建 分别用 *Bam*HI、*Hind*III 限制性内切酶双酶切 pGCsi-U6/Neo/GFP 质粒并使之线性化, 线性化后的质粒分别与含有 *Bam*HI、*Hind*III 酶切位点的退火双链 DNA R1、R2 及 R3 连接, 构建成 RAGE 特异性 siRNA 表达载体并命名为 pGCsi-R1、pGCsi-R2 和 pGCsi-R3, 与对照 C 连接后构建的非特异性 siRNA 表达载体命名为 pGCsi-C。将上述重组质粒转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 挑取重组阳性克隆行酶切和测序鉴定。测序引物为: 5'-AGCTACAACAAGGCAAGG-3'。

1.2.4 细胞培养与转染 将用胰蛋白酶-EDTA 消化的 HSC-T6 细胞于转染前 1 天接种于 24 孔培养板中, 以 0.5 ml 高糖 DMEM 无双抗培养基置 5% CO₂ 培养箱中 37 °C 培养 24 h, 当细胞汇合率达到 70%~80% 时, 更换无血清 DMEM, 每孔 400 μ l。将 2 μ g 待转染的重组质粒稀释到 50 μ l 无血清 DMEM 中, 同时在另 50 μ l 无血清 DMEM 中加入 2 μ l 脂质体 LipofectAMINE™ 2000, 各自室温放置 5 min 后混合, 室温温育 20 min 形成 DNA-脂质体复合物, 加入 24 孔板中。6 h 后按终体积 10% 加新鲜胎牛血清, 48 h 后收集细

胞, 抽提总 RNA 检测。

1.2.5 浓度对特异性 siRNA 介导 RAGE mRNA 沉默的影响 3 种重组载体 pGCsi-R1、pGCsi-R2 和 pGCsi-R3 分别以 0.25、0.5、1.0 nmol/L 浓度转染传代培养 24 h 的 HSC-T6 细胞, 另设空白及转染 pGCsi-C 对照。培养 48 h 后抽提总 RNA 行实时荧光定量 PCR 检测。

1.2.6 时间对特异性 siRNA 介导 RAGE mRNA 沉默的影响 将筛选抑制效率最高的重组载体转染传代培养 24 h 的 HSC-T6 细胞, 另设空白及转染 pGCsi-C 对照。应用实时荧光定量 PCR 检测时间对重组载体表达特异性 siRNA 介导 RAGE mRNA 沉默的影响。

1.2.7 RNA 抽提及实时荧光定量 PCR 测定 按 Trizol 说明书抽提各组细胞总 RNA, 用琼脂糖凝胶电泳检测所得 RNA 质量, 同时测 RNA 的吸光度(A)260/280 比值, 计算 RNA 的纯度。用 M-MLV 逆转录酶参照说明书合成 cDNA 链用于 PCR。实时荧光定量 PCR(ABI7700 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司)采用荧光染料法, 反应条件为 94 °C 3 min, 94 °C 20 s, 60 °C 30 s, 共循环 40 次, 然后 4 °C 保持, 荧光采集点在 60 °C。反应结束后, 通过在 PCR 反应指数期的扩增曲线得到的 CT 值来分析起始模板量。RAGE 引物序列: 上游: 5'-CAGGGTCACAGAAACCGG-3', 下游: 5'-ATTCAGCTCTGCACGTTCT-3', 扩增长度 214 bp; α -SMA 引物序列: 上游: 5'-GCATCCACGAAACCACCT-3', 下游: 5'-CGCCGATCCAGACAGAATAT-3', 扩增长度 209 bp; 内参照管家基因 β -肌动蛋白引物序列: 上游: 5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3', 下游: 5'-CCCATACCCACCATCACACC-3', 扩增长度 207 bp。采用比较 CT 法相对定量计算 RAGE mRNA 的抑制率。

1.2.8 蛋白质抽提及 Western 印迹分析 分别收集 pGCsi-R1 和 pGCsi-C 转染 24 h 后的 HSC-T6 细胞, 用冰 PBS 漂洗 3 次, 加入裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 100 μ g/ml PMSF, 1% Triton X-100)冰上裂解 30 min, 12 000 g 离心 5 min, 弃上清液, 取 50 μ l 样品与上样缓冲液混合, 煮沸 3 min, 使用 10% SDS-PAGE 分离蛋白质。将蛋白质转到 PVDF 膜上, 将膜放入含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.05% Tween-20)中 37 °C 温育 1 h。更换新鲜 5% 牛奶 TBS 溶液, 分别加入鼠抗 RAGE 单克隆抗体、鼠抗 α -SMA 单克隆抗体和鼠抗 β -肌动蛋白单克隆抗体, 37 °C 温育 2

h, 1% 牛奶 TBS 溶液洗膜 4 次, 每次 15 min, 再分别加入 HRP 标记的兔抗鼠 IgG 二抗室温震荡温育 1 h, ECL 作用后胶片曝光, 压片 2 min, 定影、显影、洗片。对凝胶电泳进行扫描分析。

1.2.9 统计学分析 使用 SAS 8.2 软件进行统计学处理。计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示, 组间比较采用方差分析(LSD), 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性统计学意义。

2 结果

2.1 双链寡核苷酸制备

将变性、退火后制备的 3 对寡核苷酸链行 16 g/L 琼脂糖凝胶电泳后分别可见 1 清晰条带, 表明寡核苷酸双链纯度正常, 无降解(图 1)。

2.2 RAGE 特异性 siRNA 重组阳性克隆的酶切鉴定和 DNA 序列分析

随机选取 3 个重组阳性克隆行酶切和测序鉴定, pGCsi-R1 和 pGCsi-R2、pGCsi-R3 重组细菌克隆分别行 *Bam*HI、*Hind*III 双酶切和 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 并以 pGCsi-C 重组阳性克隆和 pGCsi 空载作对照。三者双酶切后得到的小片段分别长约 66 bp、66 bp 和 64 bp(图 2), 证实为 R1、R2 和 R3 的插入

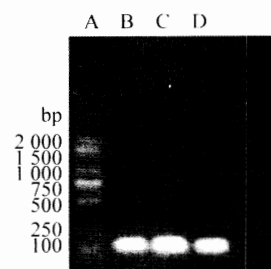


图 1 特异性 siRNA 编码寡核苷酸双链的制备
A: DNA ladder marker; B: R1; C: R2; D: R3。

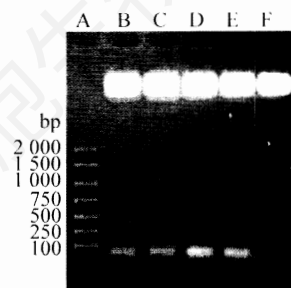


图 2 pGCsi-R1、pGCsi-R2 和 pGCsi-R3 *Bam*HI 及 *Hind*III 双酶切分析

A: DNA ladder marker; B: pGCsi-R1; C: pGCsi-R2; D: pGCsi-R3; E: pGCsi-C; F: pGCsi。

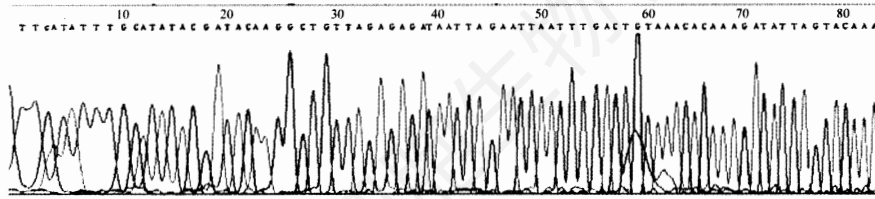


图3 重组阳性克隆 pGCsi-R1 基因测序图

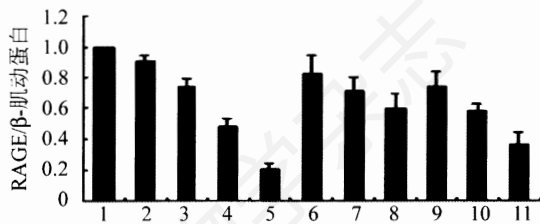


图4 浓度对重组载体表达的特异性siRNA介导RAGE mRNA沉默活性的影响

1: 空白对照; 2: pGCsi-C; 3: 0.25 nmol/L pGCsi-R1; 4: 0.5 nmol/L pGCsi-R1; 5: 1.0 nmol/L pGCsi-R1; 6: 0.25 nmol/L pGCsi-R2; 7: 0.5 nmol/L pGCsi-R2; 8: 1.0 nmol/L pGCsi-R2; 9: 0.25 nmol/L pGCsi-R3; 10: 0.5 nmol/L pGCsi-R3; 11: 1.0 nmol/L pGCsi-R3。

片段。重组阳性克隆测序结果表明合成的 RAGE 特异性 siRNA 编码寡核苷酸序列正确, 鉴定结果与预期完全一致(pGCsi-R1 测序见图 3)。

2.3 浓度对特异性 siRNA 抑制 RAGE mRNA 表达的影响

实时荧光定量 PCR 结果经内参管家基因 β -肌动蛋白均一化处理分析显示: 转染重组载体 pGCsi-R1、pGCsi-R2 和 pGCsi-R3 的 HSC-T6 细胞, 其 RAGE mRNA 表达量均呈浓度依赖性降低, 其中, 3 组浓度均为 1.0 nmol/L 时 RAGE mRNA 的表达分别较空白对照下调 $(79.46 \pm 3.5)\%$ ($F=150.03$, $P<0.01$)、 $(40.46 \pm 9.98)\%$ ($F=22.65$, $P<0.05$) 和 $(63.19 \pm 7.69)\%$ ($F=55.5$, $P<0.01$), 表明在 0.25~1.0 nmol/L 范围内, 重组载体表达的特异性 siRNA 介导 RAGE mRNA 沉默活性呈浓度依赖性增高, 且以 pGCsi-R1 表达的特异性 siRNA 介导的 RAGE mRNA 沉默活性最高, 而转染非特异性 siRNA 重组表达载体 pGCsi-C (浓度为 1.0 nmol/L) 的 HSC-T6 细胞, 其 RAGE mRNA 的表达量与空白对照相比, 差异无显著性 ($P>0.05$) (图 4)。

2.4 时间对特异性 siRNA 抑制 RAGE mRNA 表达的影响

实时荧光定量 PCR 结果经内参管家基因 β -肌动蛋白均一化处理分析显示: 转染抑制效率最高的 pGCsi-R1 的 HSC-T6 细胞, 其 24 h、48 h 和 72 h 的

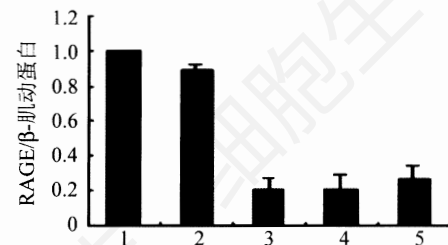


图5 时间对重组载体表达的特异性siRNA介导RAGE mRNA沉默活性的影响

1: 空白对照; 2: pGCsi-C 转染 48 h; 3: pGCsi-R1 转染 24 h; 4: pGCsi-R1 转染 48 h; 5: pGCsi-R1 转染 72 h。

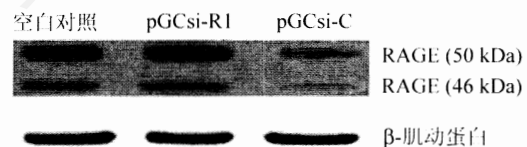


图6 特异性 siRNA 抑制 HSC-T6 细胞中 RAGE 表达

RAGE mRNA 表达量分别较空白对照组下调 $(79.65 \pm 8.88)\%$ 、 $(78.96 \pm 7.94)\%$ 和 $(73.11 \pm 6.89)\%$ ($F=71.38$ 、61.82 和 61.98, P 均 <0.01), 表明 pGCsi-R1 表达的特异性 siRNA 介导 RAGE mRNA 的沉默活性在 24~72 h 范围内呈时间依赖性降低, 且最佳沉默活性在 24 h (图 5)。

2.5 特异性 siRNA 对 HSC-T6 细胞中 RAGE 表达的影响

将转染 pGCsi-R1 及 pGCsi-C 的 HSC-T6 细胞提取的总蛋白行聚丙烯酰胺凝胶电泳可分别获得 50 kDa 和 46 kDa 两条蛋白质泳带。Western 印迹分析显示, 转染 pGCsi-R1 组的灰度比明显降低, 其 50 kDa 和 46 kDa 的 RAGE 表达量分别较空白对照组下调 $(56.09 \pm 1.18)\%$ ($F=386.19$, $P<0.01$) 和 $(63.67 \pm 0.78)\%$ ($F=386.07$, $P<0.01$) (图 6), 表明 pGCsi-R1 表达的特异性 siRNA 在蛋白质水平能显著抑制 RAGE 基因的表达。

2.6 特异性 siRNA 显著抑制 HSC-T6 细胞中 α -SMA mRNA 表达

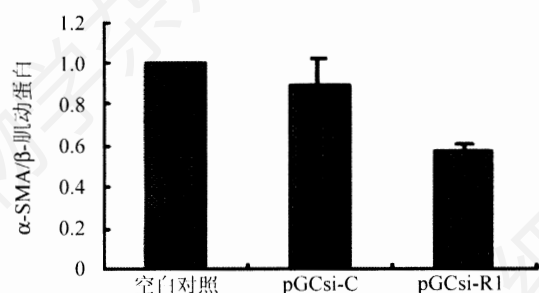


图7 特异性 siRNA 抑制 HSC-T6 细胞中 α -SMA mRNA 的表达

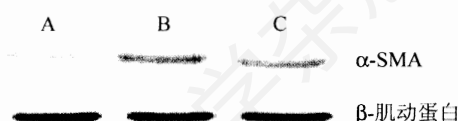


图8 pGCsi-R1 抑制 HSC-T6 细胞中 α -SMA 表达
A: pGCsi-R1; B: pGCsi-C; C: 空白对照。

实时荧光定量 PCR 结果分析显示, 转染 pGCsi-R1 的 HSCs, 其 α -SMA mRNA 的表达量较空白对照组下降($42.47 \pm 3.25\%$) ($F=20.91$, $P<0.05$) (图 7), 表明 pGCsi-R1 表达的 RAGE 特异性 siRNA 在 mRNA 水平能显著抑制 α -SMA 基因的表达。

2.7 特异性 siRNA 显著抑制 HSC-T6 细胞中 α -SMA 表达

Western 印迹分析显示, 转染 pGCsi-R1 组的灰度比明显降低, α -SMA 的表达量较空白对照组下降($41.52 \pm 3.08\%$) ($F=56.59$, $P<0.05$) (图 8), 表明 pGCsi-R1 表达的 RAGE 特异性 siRNA 在蛋白质水平能显著抑制 α -SMA 基因的表达。

3 讨论

目前认为 HSCs 是 ECM 的主要来源和纤维化反应的重要效应器, 也是细胞因子(cytokine, CK)的主要来源和靶点, 抑制 HSCs 的激活和增殖、调节某种活性因子或受体对 HSCs 的作用、干预性调节胶原的形成和降解被认为是目前抗 HF 治疗的中心策略和重要手段^[8]。

HSCs 与 ECM 及各种 CK 相互作用需要细胞表面的受体介导。研究证实, HSCs 受体至少有三大类: 整合蛋白类、酪氨酸激酶类(包括新发现的盘状结构域受体)和内皮素受体 A 及 B^[9]。刘乃丰等^[10]研究发现, HSCs 表面有 AGEs 受体表达, AGE 能刺激 HSCs 增殖并大量合成纤维连接蛋白(LN), 用细胞化学法研

究显示, AGE 与 HSCs 呈高度亲和性结合, 部分被内化。Fehrenbach 等^[5]运用 Northern 杂交分析证实, 在大鼠肝脏只有 HSCs 和 MFs 特异性表达 RAGE mRNA, 且在培养大鼠 HSCs 转化为 MFs 过程中, RAGE mRNA 水平表达上调, 同时伴随 RAGE 表达和 TGF- β_1 合成增加。另有报道证明, 通过抗可溶性的 RAGE 或 IgG 的 F(ab')₂ 片段可明显改善肝功能, 同时可加快 85% 肝切除术后肝脏的再生^[11]。表明 HSCs 表达的 RAGE 在 HF 过程中起重要作用。因此, 通过研究剔除 HSCs 上的 RAGE 基因对其上下游调节基因和细胞生物学特性的影响, 将有助于阐明 RAGE 介导 HF 形成和发展的作用机制及细胞内信号转导通路。为此, 我们筛选、设计、合成了 3 对针对 RAGE mRNA 417、221 和 534 靶位点的特异性 siRNA 编码寡核苷酸序列, 构建了 3 对 RAGE 特异性 siRNA 表达载体 pGCsi-R1、pGCsi-R2 和 pGCsi-R3, 较全面地研究了重组载体表达的特异性 siRNA 介导 RAGE mRNA 和蛋白质沉默的活性。实时荧光定量 PCR 检测结果证实, 3 种重组载体 pGCsi-R1、pGCsi-R2 和 pGCsi-R3 均能显著抑制靶基因 RAGE 的表达, 且以 pGCsi-R1 的抑制作用最强。Western 印迹分析结果显示, pGCsi-R1 也能显著抑制 RAGE 的表达, 表明 RAGE 特异性 siRNA 重组表达载体构建成功, 并有望在不远的将来使 RAGE 成为抗 HF 治疗的一个新靶点。

RNAi 技术可通过转录后沉默达到抑制目的基因的表达。siRNA 重组表达载体能够用于基因转录并在 RNA 多聚酶 III 启动子如 U6、H1 的控制下在体内生成 siRNA。实时荧光定量 PCR 能快捷、准确、灵敏地反映 siRNA 介导的同源 mRNA 降解。我们的研究结果显示, 重组载体表达的特异性 siRNA 介导的 RAGE mRNA 沉默活性在一定范围内呈剂量依赖性增高和时间依赖性降低, 其中以浓度为 1.0 nmol/L 的 pGCsi-R1 转染 HSC-T6 细胞后 24 h 对 RAGE mRNA 沉默活性最高, 达到 79.96%。重组表达载体这种明显的时间局限性, 可能与 siRNA 在细胞内被核酸酶降解及细胞增殖导致 siRNA 稀释有关。

3 种重组载体表达的特异性 siRNA 介导的 RAGE mRNA 沉默活性差异较大, 可能与 siRNA 序列的差异性导致其解链形成、RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)效率不同及反义链进入 RISC 概率不同有关^[12]。

任何原因引起肝损伤后, 静止的 HSCs 激活转化为增殖性的具有纤维生成和收缩性的 MFs, 并伴有公

认的作为体内外 MFs 激活标志物的 α -SMA 表达增高。我们的研究结果显示, 与空白对照组和转染 pGCsi-C 组相比, 转染 pGCsi-R1 组的 α -SMA 在 mRNA 和蛋白质水平的表达均受到显著抑制, 提示 pGCsi-R1 表达的特异性 siRNA 通过介导 RAGE 基因的沉默可抑制 HSCs 激活。

RAGE 特异性 siRNA 表达载体的成功构建, 为建立大鼠 RAGE 特异性 siRNA 的 HSC-T6 细胞株, 进一步在大鼠体内研究 RAGE 基因在 HF 中的作用机制和基因治疗打下了良好的基础。

参考文献(References)

- [1] Yamamoto Y *et al. Ann N Y Acad Sci*, 2005, **1043**: 562
- [2] Ramasamy R *et al. Glycobiology*, 2005, **15**: 16R
- [3] Haslbeck KM *et al. Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2005, **113**: 288
- [4] Jandeleit-Dahm KA *et al. Ann N Y Acad Sci*, 2005, **1043**: 759
- [5] Fehrenbach H *et al. Hepatology*, 2001, **34**: 943
- [6] Huh JW *et al. Biotechnol Lett*, 2005, **27**: 1229
- [7] Zamore PD *et al. Cell*, 2000, **101**: 25
- [8] Sakaida I *et al. Life Sci*, 2004, **74**: 2251
- [9] 王宝恩. *中华肝脏病杂志*, 2000, **8**: 197
- [10] 刘乃丰等. *铁道医学*, 1999, **27**: 288
- [11] Zeng S *et al. Hepatology*, 2004, **39**: 422
- [12] Schwarz DS *et al. Cell*, 2003, **115**: 199

Expression of Receptor for Advanced Glycation End Product mRNA and Protein in Cultured Hepatic Stellate Cells Inhibited by Specific Small Interfering RNA

Jin-Rong Xia, Nai-Feng Liu*

(Department of Gastroenterology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China)

Abstract Three pair of small interfering RNA (siRNA) sequences (21 nt) directing to RAGE mRNA 417, 221 and 534 targets were designed by utilizing two RNA design softwares on line to stimulate secondary structure of receptor for advanced glycation end product (RAGE) mRNA in SD rats, and were converted into cDNA coding expression of small hairpin RNAs (shRNA) of siRNA for RAGE gene. These DNA sequences were synthesized and separately cloned into pGCsi-U6/Neo/GFP vectors and identified by digestion with restriction enzymes and sequence analysis. Specific recombinant siRNA expressive vectors were differently transfected into hepatic stellate cell (HSC)-T6 cell line with lipofectamine, HSC-T6 untreated and transfected unspecific recombinant siRNA expressive vector as control. The expression of RAGE genes and proteins in the cells were determined by real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot. The results showed that specific recombinant siRNA expressive vectors targeting 417, 221 and 534 sites of RAGE mRNA coding domain (pGCsi-R1, pGCsi-R2 and pGCsi-R3) as well as unspecific recombinant siRNA expressive vector (pGCsi-C) were constructed successfully. Compared with blank control, the expression of RAGE at mRNA level was remarkably down-regulated in specific recombinant siRNA expressive vectors-transfected HSC-T6, degree of down-regulation in RAGE mRNA increased in a concentration-dependent manner within 0.25–1.0 nmol/L, especially pGCsi-R1 at 1.0 nmol/L, the expression of RAGE at mRNA level was not found any significant change in pGCsi-C-transfected HSC-T6. The expression of RAGE at mRNA level down-regulated 79.46% $\pm$ 3.5% ($F=71.38$, $P<0.01$), 78.96% $\pm$ 7.94% ($F=61.82$, $P<0.01$) and 73.11% $\pm$ 6.89% ($F=61.98$, $P<0.01$), respectively, in pGCsi-R1-transfected HSC-T6 compared with blank control, extent of down-regulation in RAGE mRNA decreased in a time-dependent manner within 24–72 h. The expressions of 50 kDa and 46 kDa RAGE protein, α -smooth muscle actin (α -SMA) mRNA and protein in pGCsi-R1-transfected HSCs were markedly down-regulated by 43.91% $\pm$ 1.18% ($F=365.19$, $P<0.01$), 36.33% $\pm$ 0.78% ($F=386.07$, $P<0.01$), 57.53% $\pm$ 3.25% ($F=20.91$, $P<0.05$) and 58.48% $\pm$ 3.08% ($F=56.59$, $P<0.05$) of that in blank control cells. The results indicated that RAGE specific siRNA expressed by pGCsi-R1 could effectively inhibit RAGE gene and protein expression and activation in HSCs.

Key words receptor for advanced glycation end products; small interfering RNA; hepatic stellate cells

Received: March 28, 2007 Accepted: June 12, 2007

*Corresponding author. Tel: 86-25-83272001, Fax: 86-25-83272010, E-mail: liunf@seu.edu.cn