

用 siRNA 沉默人血红素加氧酶 -1 基因 降低胆红素水平

李春娥 金由辛¹ 史毅¹ 须丽清 钟文伟 申庆祥² 李云珠 俞善昌 夏振炜*

(上海交通大学医学院附属瑞金医院儿科, 上海 200025; ¹中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所分子生物学国家重点实验室, 上海 200031; ²上海市计划生育研究所, 上海 200032)

摘要 拟通过 RNA 干扰技术特异下调人血红素加氧酶 -1 (human heme oxygenase-1, hHO-1) 基因的表达, 减少 hHO-1 的产量从而降低胆红素的产生, 探讨在胆红素产生前就阻断其产生, 为临床早期防治新生儿高胆红素血症及胆红素中毒性脑病探索一种新的有效手段。针对 *hHO-1* 基因设计并化学合成三对小分子干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)。采用脂质体转染法将 siRNA 转染入人肝脏细胞株 HL-7702; 荧光显微镜检测 siRNA 转染细胞的效率; 转染 siRNA 1~2 天后经 RT-PCR 和 Western 印迹方法检测 *hHO-1* 表达水平和蛋白质量; 并采用 HO-1 诱导剂血红素诱导或 *hHO-1* 表达质粒转染细胞以上调 *hHO-1* 表达, 检测 siRNA 干扰后 hHO-1 产量和酶活性。结果显示: 设计的三对 siRNA 能不同程度的特异下调 *hHO-1* 表达, 筛选获得抑制效果最佳的 siRNA-3。siRNA-3 抑制 *hHO-1* 呈现浓度与时间依赖性。与非特异对照 siRNA 及未处理组比较, 血红素诱导和 *hHO-1* 表达质粒转染均能上调 HL-7702 细胞内 *hHO-1* 表达, 提高 hHO-1 产量, 但转染 siRNA-3 后 *hHO-1* 表达明显抑制, 同时 hHO-1 活性随着基因表达下调而下降。实验表明设计合成的 siRNA-3 抑制效果明显。siRNA-3 通过降解 *hHO-1*, 减少 hHO-1 产量, 降低酶活性, 最终减少胆红素产生, 从而使 RNA 干扰技术成为降低新生儿高胆红素血症和胆红素中毒性脑病发生的一种候选方法。

关键词 血红素加氧酶; RNA 干扰; 酶活力; 胆红素; 高胆红素血症

新生儿高胆红素血症是新生儿期常见的一种病症, 由胆红素产生增加和排泄减少所致^[1]。大约 60% 的足月儿在生后第一周会发生高胆红素血症, 其中临床需要治疗的高胆红素血症新生儿约有 10%^[2]。在大多数情况下, 新生儿高胆红素血症是一种良性过程, 但是严重高胆红素血症可以导致胆红素中毒性脑病(核黄疸)。在过去 15 年中, 报告的胆红素中毒性脑病例数在增加^[3]。

血红素加氧酶(heme oxygenase, HO)是胆红素产生的限速酶, 它通过一个耗能的过程将血红素代谢为胆红素, 同时释放一分子的一氧化碳和铁离子^[4]。HO 有三种同工酶, 其中 HO-1 可被多种因素(包括血红素)诱导而表达增加^[4]。产后新生儿, 由于红细胞裂解产生大量血红素, 所以高胆红素血症新生儿 HO-1 表达量增加^[5]。但在 HO-1 表达减少或酶活性抑制时, 未氧化还原的血红素不会聚集体内, 而是由肝脏组织以原形经胆道系统排泄^[6]。

RNA 干扰(RNA-mediated interference, RNAi)是

目前采用的一种新兴技术, 主要通过双链 RNA 的介导, 特异性地降解与之同源的靶基因 mRNA, 从而阻断相应基因表达, 导致转录后的基因沉默, 在特异并高效抑制基因活性方面展示出了广阔的前景。小分子干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 作为第二代治疗性 RNA, 较第一代反义 RNA 和核酶具有更高的特异性和稳定性, 以及其结构的特殊性, 又较核酶有更多的候选靶基因^[7-9]。应用 siRNA 降低胆红素水平以防治新生儿高胆红素血症, 至今尚无报道。

本实验采用 siRNA 技术, 针对人 *HO-1* (*hHO-1*) 基因设计并化学合成了三对 siRNA, 筛选有效 siRNA, 并转染经血红素诱导和导入 *hHO-1* 高表达质粒的人肝脏细胞株 HL-7702, 通过 RT-PCR 和 Western 印迹方法检测 *hHO-1* 表达和蛋白质量; 并经酶活性测定以评

收稿日期: 2006-07-27 接受日期: 2006-12-15

国家自然科学基金(No.30170988, No.30570798), 上海市科委基金(No.044119662) 和上海市教委基金(No.03BZ04) 资助项目

* 通讯作者。Tel/Fax: 021-64333414, E-mail: xzw63@hotmail.com

价其是否能有效抑制 *hHO-1* 表达, 降低 *hHO-1* 活性, 减少胆红素的产生。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人正常肝脏细胞 HL-7702(中国科学院上海生命科学研究院细胞库), 加入含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司), 置 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 每间隔 48 h 更换一次培养基, 待细胞长满后用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞并传代。

1.2 设计合成 siRNA

针对 *hHO-1* mRNA 设计合成了三对 siRNA, 根据 RNA 的二级结构选出能量较低处于环区的序列, siRNA 序列见表 1。siRNA 由中科院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所合成。

1.3 脂质体包埋

转染前一天, 将细胞接种于 12 孔板, 控制浓度使第二天转染时细胞的满度为 50~70%。转染前细胞更换无血清培养液 1 ml, 采用 Oligofectamine™ Reagent(美国 Invitrogen 公司)。2 μl 双链 siRNA 与 100 μl Opti-Mem I 混匀, 12 μl Oligofectamine 与 48 μl Opti-Mem I 混匀, 室温下温育 5~10 min, 将 siRNA 与 Oligofectamine 混合物轻轻混匀, 室温下温育 20~25 min, 形成脂质体-siRNA 复合物。同法将 400 ng 质粒与 100 μl Opti-Mem I 混匀, 1 μl lipofectamine2000(美国 Invitrogen 公司)与 100 μl Opti-Mem I 混匀, 室温下温育 5~10 min, 将制备的混合物轻轻混匀(质粒: lipofectamine2000 为 1 μg : 1~3 μl), 室温下温育 20~25 min, 形成脂质体-质粒复合物。同时设立空白对照及非特异 siRNA 对照。

1.4 siRNA 转染 HL-7702 细胞后转染率检测

将消毒的盖玻片放于 6 孔板, HL-7702 铺于其上; 24 h 后用 FITC 标记的非特异性 siRNA 以 200 nmol/L 的浓度转染 HL-7702 细胞, 48 h 后去培养液, 用 DAPI 染核, 之后在荧光显微镜下分别拍摄 siRNA 荧

光和核荧光, 将两张图片重合, 计数分析 siRNA 在细胞内的分布。

1.5 RT-PCR 检测 hHO-1 mRNA 表达

siRNA 转染 HL-7702 细胞后 24 h, 抽提细胞总 RNA, 用 RT-PCR 检测 *hHO-1* mRNA 的表达量。引物序列如下: *hHO-1*: 有义 5'-GGT GAT AGA AGA GGC CAA GAC TGC-3', 反义 5'-TGT AAG GAC CCA TCG GAG AAG C-3'; *hHO-2*: 有义 5'-CCA CCA CGG CAC TTT ACT TCA-3', 反义 5'-GCT GGG CAT TGT CCA CAT TCT-3'; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*GAPDH*): 有义 5'-GTC GTG GAG TCT ACT GGC GTC TT-3', 反义 5'-CAG TCT TCT GAG TGG CAG TGA TGG-3' (均由上海英骏生物工程有限公司合成)。PCR 反应条件: 初始变性 94 °C, 4 min, 1 个循环; 变性 94 °C 30 s; 退火 *hHO-1* 56 °C、*hHO-2* 59 °C、*GAPDH* 58 °C, 均 30 s; 延伸 72 °C, 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存待测。

1.6 Western 印迹检测 hHO-1 产量

收集细胞, 6 000 r/min 离心 5 min, 去上清液; 加入 20 μl 2 × SDS 上样缓冲液, 煮沸 10 min, 10 000 r/min 离心 3 min, 留取上清液。SDS-PAGE 电泳, 选用 PVDF 膜, 于 4 °C 200 mA 转膜 2 h, 分别加入抗 *HO-1* IgG (1 : 200, Sigma-Aldrich 公司)和 HRP-羊抗兔二抗(1 : 10 000, Rockland 公司), 鼠抗 *GAPDH* 抗体(1 : 5 000, Kangchen 公司)和 HRP-羊抗鼠二抗(1 : 5 000, Rockland 公司)温育, ECL 检测。

1.7 血红素的作用剂量与时间

培养 HL-7702 细胞, 分别与 10 μg/ml、30 μg/ml 和 50 μg/ml 血红素共培养, 以及同一剂量的血红素培养 24 h、48 h 和 72 h, 检测 *hHO-1* 产量, 分析血红素的有效剂量和作用时间。

1.8 转染质粒 pcDNA3.1hHO-1 和 pcDNA3.1

HL-7702 细胞接种于 12 孔板, 采用 Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司)分别将 100 ng、200 ng 和 400 ng *hHO-1* 表达质粒 pcDNA3.1hHO-1(本实验室制备)和质粒 pcDNA3.1(-)(Invitrogen 公司)转染细胞, 以及同一剂量 pcDNA3.1hHO-1 转染细胞后 24 h、48 h 和 72 h, 检测 *hHO-1* 产量, 分析 pcDNA3.1hHO-1 有效剂量和表达时间。

1.9 HO-1 活性检测

将细胞培养于 10 cm 培养皿, 用 200 nmol/L siRNA-3 转染细胞, 4 h 后将 30 μg/ml 血红素加入培养液, 培养 48 h 后收集细胞; 或将 200 nmol/L siRNA-3

表 1 siRNA 序列

名称	序列
siRNA-1	154+ 5'-UGC UGA GUU CAU GAG GAA CdTdT-3'
	154- 5'-GUU CCU CAU GAA CUC AGC AdTdT-3'
siRNA-2	591+ 5'-CCA AGU UCA AGC AGC UCU AdTdT-3'
	591- 5'-UAG AGC UGC UUG AAC UUG GdTdT-3'
siRNA-3	786+ 5'-GCA ACA AAG UGC AAG AUU CdTdT-3'
	786- 5'-GAA UCU UGC ACU UUG UUG CdTdT-3'

和 400 ng pcDNA3.1hHO-1 共转染 HL-7702 细胞, 培养 24 h 后收集细胞, 于 4 °C 超声破膜, 14 000 r/min 离心 10 min, 留取上清液。取新鲜 Sprague-Dawley 大鼠肝脏约 10 g, 加入 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液 20 ml (pH 7.4), 匀浆并超声破碎, 于 4 °C 40 000 r/min 超速离心 1 h, 吸取中层水相为胆绿素还原酶。BCA 法 (BCA protein assay kit, Pierce 公司) 测定蛋白质浓度。酶促反应体系含 10 nmol/L 血红素, 20 nmol/L 还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸 (Sigma-Aldrich 公司), 1 U/ μ l 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (Sigma-Aldrich 公司), 1.17 mol/L 葡萄糖-6-磷酸 (Sigma-Aldrich 公司), 25 mmol/L $MgCl_2$, 一定量胆绿素还原酶和细胞上清液。分光光度计测 A_{464} 值。以单位时间 (1 h) 内催化生成 1 nmol/L 胆红素为 1 U hHO-1 活力^[10]。

1.10 统计分析

所有资料用 SPSS12.0 软件包分析处理, 符合正态分布值采用 *t* 检验, 其余采用非参数统计。

2 结果

2.1 siRNA 转染 HL-7702 细胞的转染率

用荧光标记的 siRNA (FITC-siRNA) 转染 HL-7702 细胞, 24 h 后用荧光显微镜检测 siRNA 被细胞吸收的情况。将 siRNA 荧光 (绿色) 和核荧光 (DAPI 染核, 蓝色) 两张图片重合后分析 siRNA 在细胞内的分布。结果显示: siRNA 分布在细胞核内及细胞质内, 计数 siRNA 转染 HL-7702 的效率 >90% (图 1)。

2.2 化学合成的 siRNA 下调 hHO-1 表达和产量

将 200 nmol/L 双链 siRNA 转染入 HL-7702 细胞, 48 h 后用 RT-PCR 和 Western 印迹方法检测 hHO-1 mRNA 表达和产量, 以看家基因 *GAPDH* 为内参。结果显示: siRNA 转染入细胞 48 h 后, *hHO-1* 表达量分

别下降 60.9% (siRNA-1)、68.3% (siRNA-2)、88.5% (siRNA-3), 产量分别下降 43.3% (siRNA-1)、73.8% (siRNA-2)、74.2% (siRNA-3), 三种 siRNA 中 siRNA-3 下调 *hHO-1* 表达和降低产量效果最佳 (图 2 A 和图 2 B)。

2.3 siRNA 下调 hHO-1 表达呈现浓度依赖性

分别将 100 nmol/L、200 nmol/L 和 400 nmol/L siRNA-3 转染 HL-7702 细胞, 48 h 后分别抽提细胞总 RNA 或总蛋白, 用 RT-PCR 和 Western 印迹方法分别检测 hHO-1 mRNA 和蛋白质水平变化, 以 *GAPDH* 为内参。结果显示: siRNA-3 随浓度递增, *hHO-1* 表达和产量则依次递减 (图 3 A 和图 3 B), 说明 siRNA 抑制作用与剂量有量效关系, 随着 siRNA 转染浓度的增加, 对 *hHO-1* 的抑制效率增加。

2.4 siRNA 下调 hHO-1 表达的时效性

将 200 nmol/L siRNA-3 转染 HL-7702 细胞, 分别于 24 h、48 h 和 72 h 收集细胞, 抽提细胞总 RNA 或总蛋白, 用 RT-PCR 和 Western 印迹方法分别检测 hHO-1 mRNA 和蛋白质水平变化。结果显示: 转染 24 h 后 *hHO-1* 表达和产量最低 (图 4 A 和图 4 B), 72 h 后抑制效率减弱, 提示 siRNA-3 在作用 24 h 后的抑制效率最高, siRNA 作用呈现时间效应。

2.5 不同剂量和培养时间血红素对 hHO-1 的诱导作用

分别用 10 μ g/ml、30 μ g/ml 和 50 μ g/ml 血红素与 HL-7702 细胞共培养, 以及用 30 μ g/ml 相同剂量的血红素培养 24 h、48 h 和 72 h, 检测 hHO-1 产量, 分析血红素的有效剂量和作用时间。结果显示: 随着血红素剂量增加, hHO-1 含量增加 (图 5 A); 而同一剂量血红素干预下分析显示 hHO-1 在 24 h 时蛋白质量最高, 随着作用时间延长, 蛋白质量则下降 (图 5 B)。



图 1 HL-7702 细胞转染率检测

FITC 标记的非特异性 siRNA 转染 HL-7702 细胞, 24 h 后, 用 DAPI 染核, 荧光显微镜下观察计算 siRNA 对 HL-7702 细胞的转染效率 >90%。

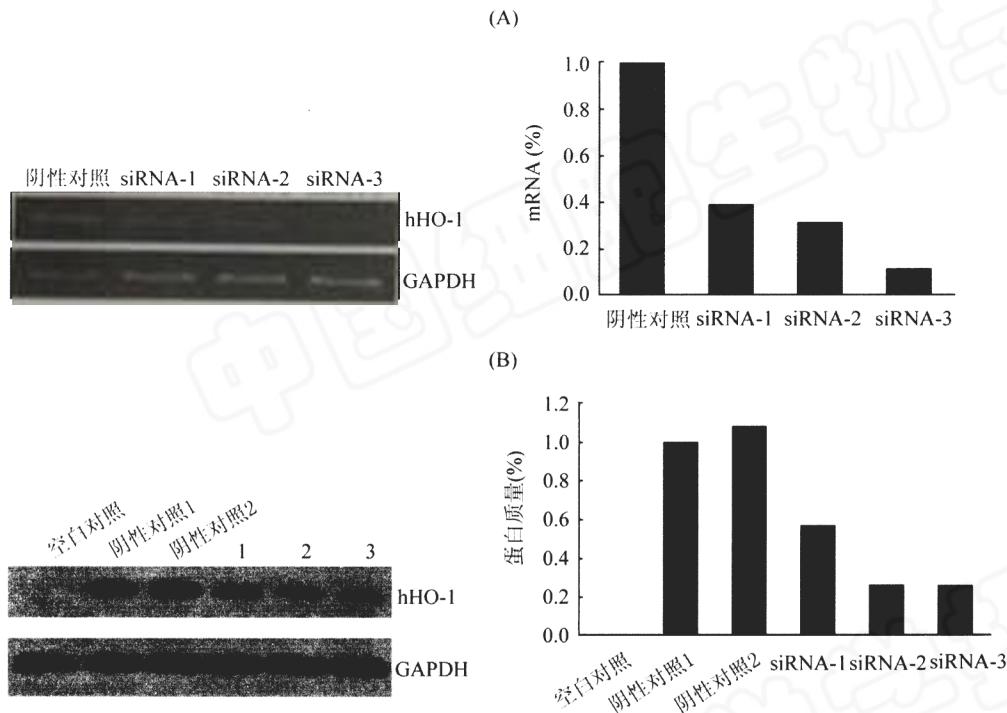


图2 三种化学合成的 siRNA 下调 *hHO-1* 表达和降低产量

A: 三种化学合成的 siRNA 对 *hHO-1* 表达的影响。阴性对照为非特异性 siRNA。与对照组比较, 转染 siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3 后 *hHO-1* mRNA 表达分别下降 60.9% (siRNA-1)、68.3% (siRNA-2) 和 88.5% (siRNA-3), 表明转染 siRNA-3 后下调 *hHO-1* mRNA 表达最明显, 抑制效果最佳。B: 三种化学合成的 siRNA 对 *hHO-1* 产量的影响。空白对照为未处理组; 阴性对照 1: 培养液中加入 30 $\mu\text{g/ml}$ 血红素; 阴性对照 2: 转染非特异性 siRNA 和培养液中加入 30 $\mu\text{g/ml}$ 血红素; 1: 转染 siRNA-1; 2: 转染 siRNA-2; 3: 转染 siRNA-3; 1~3 培养液中均加 30 $\mu\text{g/ml}$ 血红素。结果显示空白对照组未见 *hHO-1*; 与阴性对照 1 和阴性对照 2 相比, 转染 siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3 后 *hHO-1* 产量分别下降 43.3% (siRNA-1)、73.8% (siRNA-2) 和 74.2% (siRNA-3), 其中转染 siRNA-3 后 *hHO-1* 产量下降最明显, 抑制效果最佳。

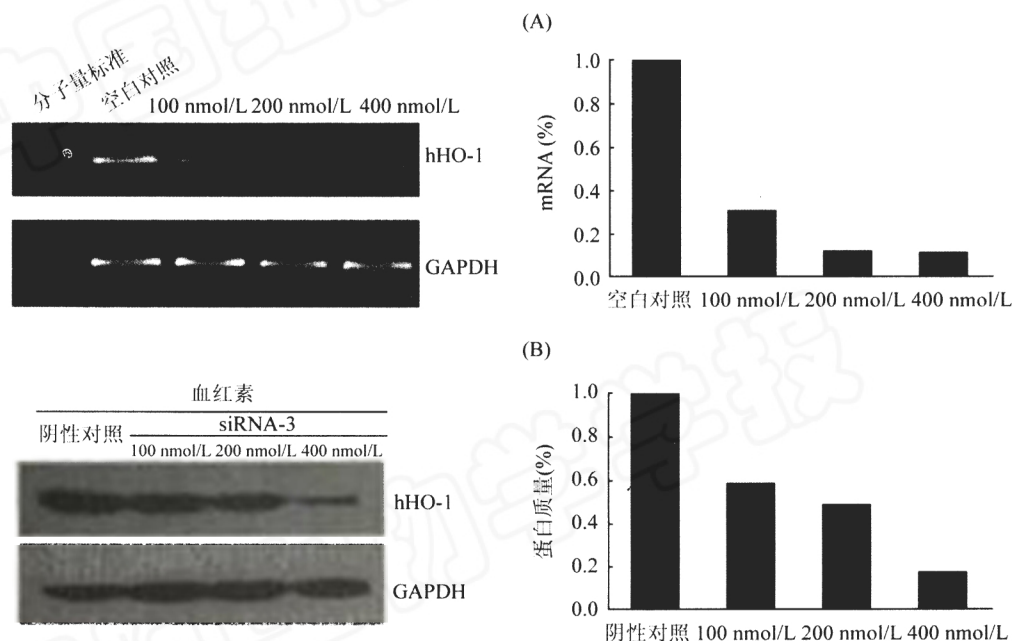


图3 不同浓度 siRNA-3 对 *hHO-1* mRNA 和蛋白质抑制效果

A: 不同浓度 siRNA-3 对 *hHO-1* mRNA 抑制效果的影响。空白对照为未处理组; 100 nmol/L、200 nmol/L、400 nmol/L siRNA-3 分别转染细胞。结果显示: 随着 siRNA-3 转染浓度的递增, *hHO-1* mRNA 表达则递减。B: 不同浓度 siRNA-3 对 *hHO-1* 抑制效果的影响。阴性对照: 30 $\mu\text{g/ml}$ 血红素; 100 nmol/L: 30 $\mu\text{g/ml}$ 血红素 + 100 nmol/L siRNA-3; 200 nmol/L: 30 $\mu\text{g/ml}$ 血红素 + 200 nmol/L siRNA-3; 400 nmol/L: 30 $\mu\text{g/ml}$ 血红素 + 400 nmol/L siRNA-3。结果显示: 随着 siRNA-3 转染浓度的递增, *hHO-1* 产量亦呈递减。

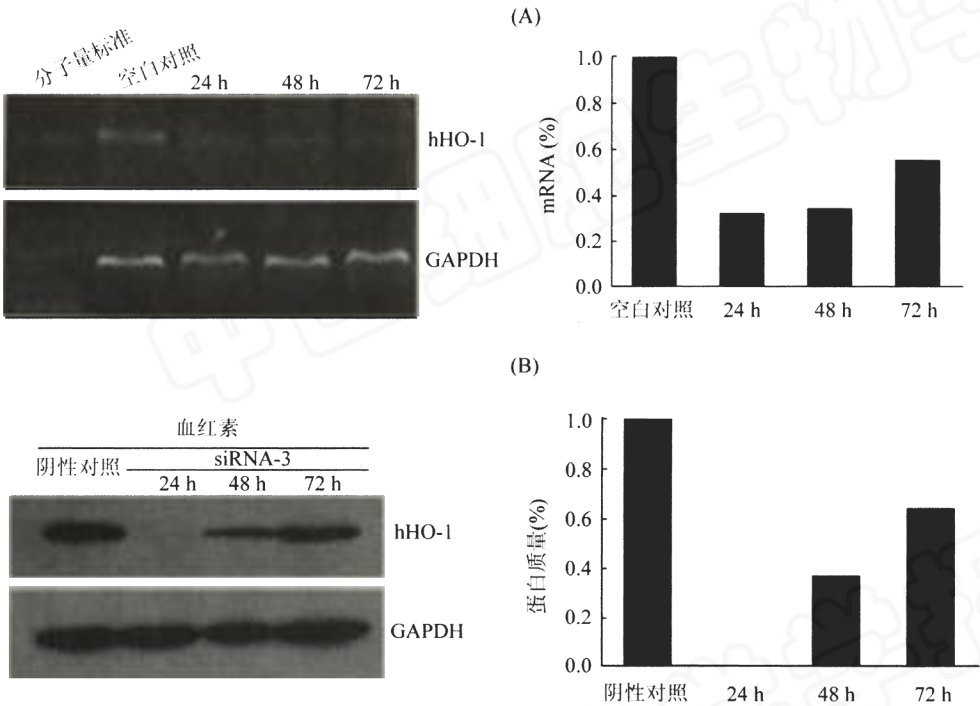


图4 siRNA-3不同作用时间对hHO-1 mRNA和蛋白质抑制效果

A: siRNA-3不同作用时间对hHO-1 mRNA抑制效果的影响。空白对照为未处理组。200 nmol/L siRNA-3转染细胞后24 h、48 h和72 h,显示24 h时hHO-1 mRNA表达最低,72 h后抑制效率减弱。B: siRNA-3不同作用时间对hHO-1抑制效果的影响。阴性对照为30 μ g/ml 血红素处理组,24 h、48 h和72 h分别为转染200 nmol/L siRNA-3及30 μ g/ml 血红素干预后hHO-1的测定时间。结果亦表明24 h时hHO-1产量最低,之后抑制作用逐渐减弱。

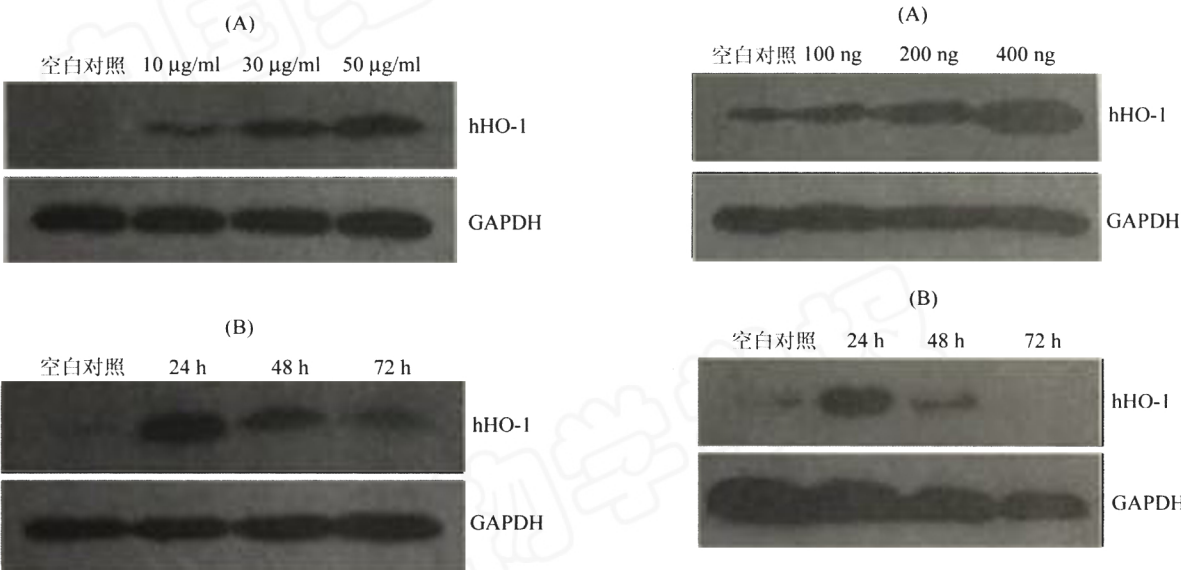


图5 血红素不同浓度和不同时间对hHO-1产量影响

A: 不同浓度血红素对hHO-1产量的影响。血红素的浓度分别为10 μ g/ml、30 μ g/ml和50 μ g/ml。随着血红素浓度的增加,hHO-1产量递增。B: 30 μ g/ml 血红素不同时间对hHO-1产量的影响。30 μ g/ml 血红素干预后在24 h、48 h和72 h时检测hHO-1产量。结果显示24 h时hHO-1产量最高,之后逐渐下降。空白对照为未处理组。

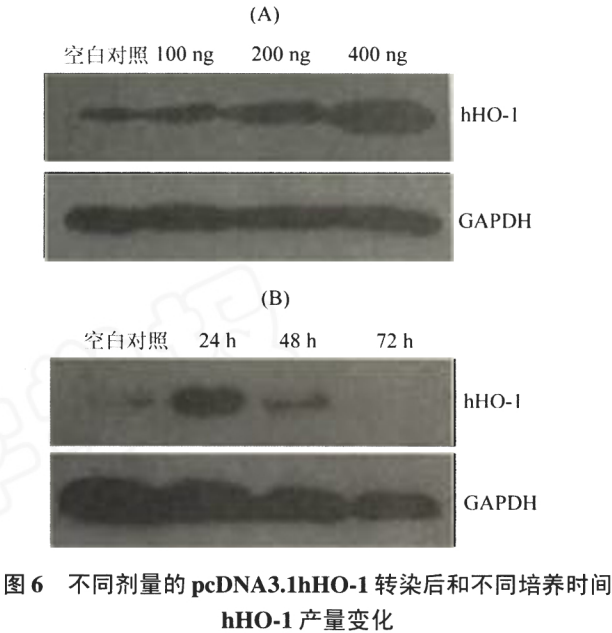


图6 不同剂量的pcDNA3.1hHO-1转染后和不同培养时间hHO-1产量变化

A: 转染不同剂量的pcDNA3.1hHO-1后hHO-1产量。100 ng、200 ng和400 ng pcDNA3.1hHO-1分别为转染剂量。随着转染量的增加,hHO-1产量递增。B: 转染pcDNA3.1hHO-1后不同时间hHO-1产量。24 h、48 h和72 h分别为转染400 ng pcDNA3.1hHO-1后培养时间。hHO-1在24 h量最高,之后逐渐降低。空白对照为未处理组。

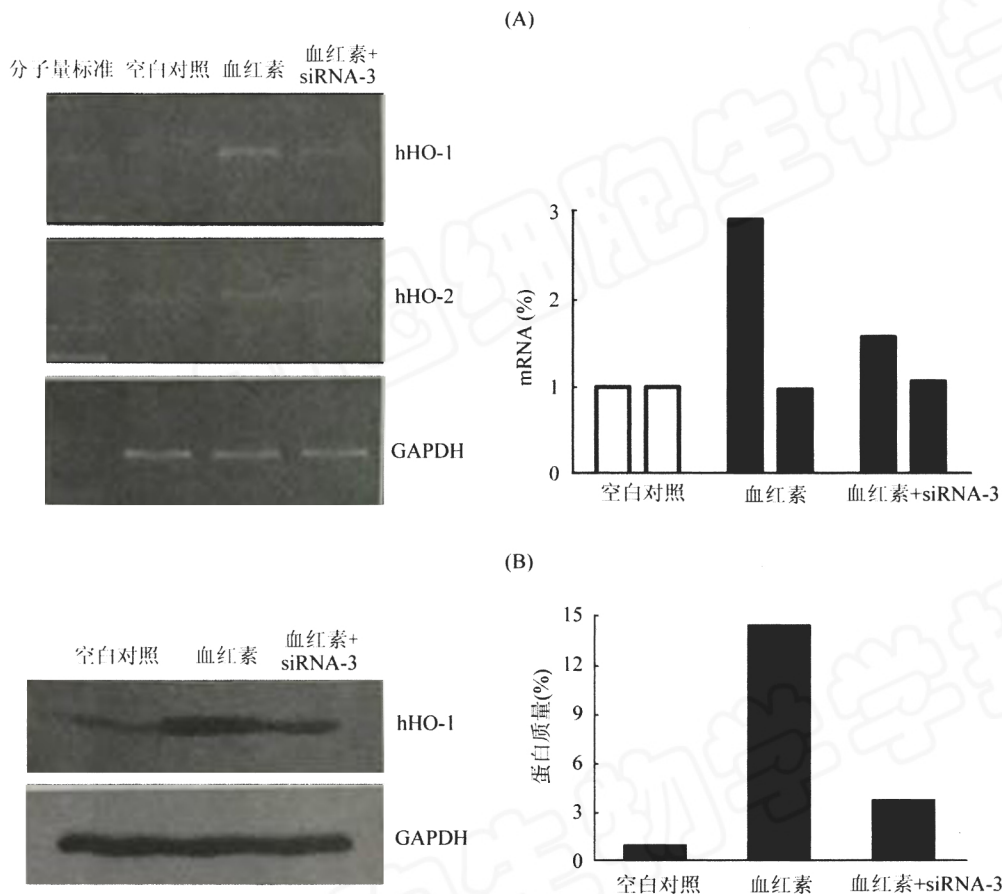


图7 血红素和 siRNA-3 对 hHO-1 mRNA 和 hHO-2 mRNA 和产量的影响

空白对照: 未处理组; 血红素: 30 $\mu\text{g/ml}$ 血红素; 血红素+siRNA-3: 30 $\mu\text{g/ml}$ 血红素 +200 nmol/L siRNA-3。A: 血红素和 siRNA-3 对 hHO-1 mRNA 和 hHO-2 mRNA 表达的影响。血红素上调 hHO-1 mRNA 表达, siRNA-3 则下调其表达, 而 hHO-2 mRNA 表达无变化。B: 血红素和 siRNA-3 对 hHO-1 产量的影响。血红素诱导 hHO-1, 而 siRNA-3 则抑制其含量。空白对照组可见内源性 hHO-1 mRNA 和蛋白质。

2.6 不同剂量和培养时间 pcDNA3.1hHO-1 对 hHO-1 的影响

分别将 100 ng、200 ng 和 400 ng pcDNA3.1hHO-1 转染细胞, 以及 400 ng pcDNA3.1hHO-1 转染细胞后 24 h、48 h 和 72 h, 检测 hHO-1 产量, 分析 pcDNA3.1hHO-1 的有效剂量和培养时间对表达的影响。结果显示: 随着 pcDNA3.1hHO-1 转染量的增加, hHO-1 含量增加(图 6 A); 同一剂量的 pcDNA3.1hHO-1 转染后 24 h, hHO-1 产量最高, 随着时间延长, 蛋白质量则下降(图 6 B)。

2.7 siRNA 抑制经血红素诱导和 pcDNA3.1hHO-1 转染后表达上调的 hHO-1

以 200 nmol/L siRNA-3 转染细胞 4 h 后, 将 30 $\mu\text{g/ml}$ 血红素加入培养液中, 培养 48 h 后, 收集细胞, 分别抽提细胞总 RNA 或细胞总蛋白, 用 RT-PCR 和 Western 印迹方法检测 siRNA-3 对 hHO-1 表达和产量的影响。结果显示: 在基因和蛋白质水平 siRNA-3 明

显抑制由血红素诱导 hHO-1 表达, 降低蛋白质量(图 7 A 和图 7 B), 但在抑制 hHO-1 表达上调的同时, hHO-2 表达则无变化。

200 nmol/L siRNA-3 和 400 ng pcDNA3.1hHO-1 共转染 HL-7702 细胞, 培养 24 h 后, 收集细胞, 分别抽提细胞总 RNA 或细胞总蛋白, 用 RT-PCR 和 Western 印迹检测 siRNA-3 对 hHO-1 表达和产量的影响。结果显示: 转染 pcDNA3.1hHO-1 后, 在基因和蛋白质水平 siRNA-3 亦明显抑制 hHO-1 表达, 减少蛋白质量(图 8 A 和图 8 B), 但在抑制 hHO-1 表达上调时, hHO-2 表达亦无变化。

2.8 siRNA 对 hHO-1 活性的影响

酶促反应检测结果显示: 经血红素诱导或转染 pcDNA3.1hHO-1 后, hHO-1 的活性增加, 而 siRNA-3 干预则明显抑制增高的 hHO-1 活性(表 2 和表 3, 图 9 A 和图 9 B)。

表2 血红素诱导与 siRNA-3 干预后 hHO-1 活性

	空白对照(n=6)	血红素(n=6)	血红素+siRNA-3 (n=6)
A ₄₆₄	0.627±0.015	0.743±0.025	0.703±0.021
样品酶活力(U)	6 270±150	7 430±250	7 030±210
样品酶比活力(U/mg)	199 518.8±4 863.4	952 588.4±32 250.6*	311 805.5±9 228.6
活性倍数	1	4.77	1.56

与对照组比较, **P*<0.05 有统计学差异。

表3 转染 pcDNA3.1hHO-1 与 siRNA-3 干预后 hHO-1 活性

	空白对照(n=6)	pcDNA3.1hHO-1(n=6)	pcDNA3.1hHO-1+siRNA-3(n=6)
A ₄₆₄	0.65±0.020	0.76±0.010	0.64±0.026
样品酶活力(U)	6 500±200	7 600±100	6 400±260
样品酶比活力(U/mg)	919 946.9±28 306.1	1 566 171±20 607.5*	820 165.8±33 905.5
活性倍数	1	1.70	0.89

与对照组比较, **P*<0.05 有统计学差异。

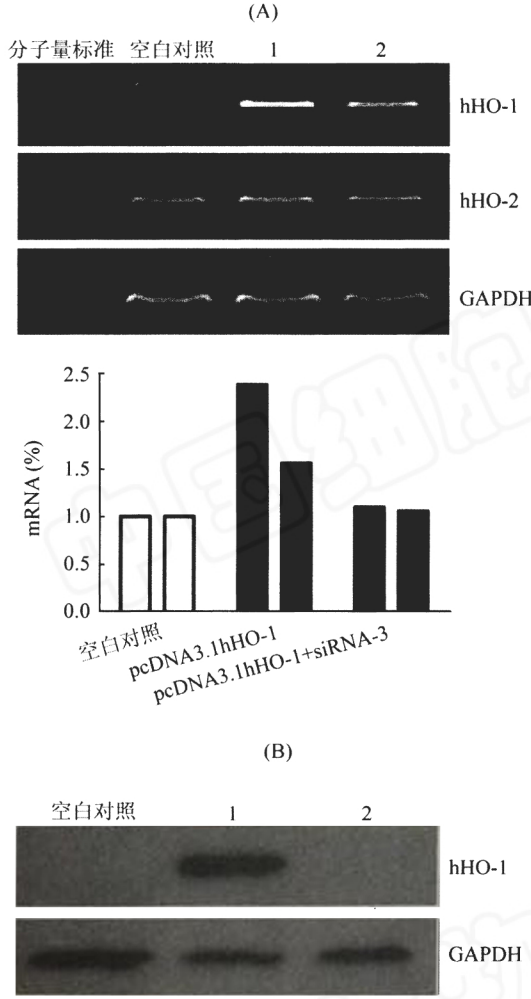


图8 pcDNA3.1hHO-1 和 siRNA-3 对 hHO-1 mRNA、hHO-2 mRNA 和蛋白质的影响
1: 400 ng pcDNA3.1hHO-1; 2: 400 ng pcDNA3.1hHO-1+200 nmol/L siRNA-3。A: pcDNA3.1hHO-1 和 siRNA-3 对 hHO-1 mRNA 和 hHO-2 mRNA 表达的影响。转染质粒后 hHO-1 mRNA 表达增加, siRNA-3 下调其表达, hHO-2 mRNA 表达无变化。B: pcDNA3.1hHO-1 和 siRNA-3 对 hHO-1 产量的影响。转染质粒后 hHO-1 产量增加, 而 siRNA-3 降低蛋白质质量。空白对照为未处理组。

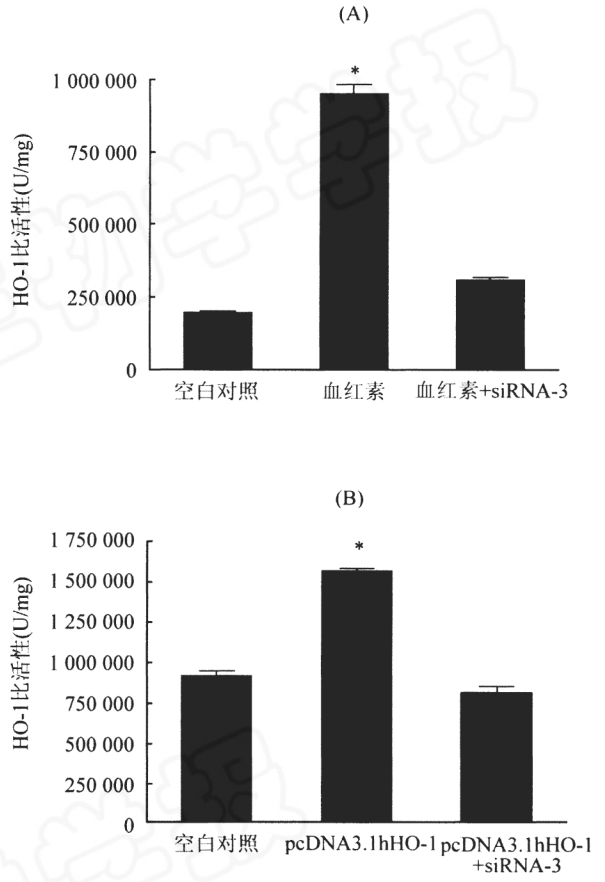


图9 血红素、pcDNA3.1hHO-1 和 siRNA-3 对 hHO-1 活性的影响
A: 血红素和 siRNA-3 对 hHO-1 活性的影响。血红素: 30 μg/ml 血红素; 血红素+siRNA-3: 30 μg/ml 血红素+200 nmol/L siRNA-3。纵坐标为各组细胞 hHO-1 的比活性。血红素增强 hHO-1 比活性, siRNA-3 降低 hHO-1 比活性。B: pcDNA3.1hHO-1 和 siRNA-3 对 hHO-1 活性的影响。pcDNA3.1hHO-1: 400 ng pcDNA3.1hHO-1, pcDNA3.1hHO-1+siRNA-3: 400 ng pcDNA3.1hHO-1+200 nmol/L siRNA-3。pcDNA3.1hHO-1 提高 hHO-1 比活性, 而 siRNA-3 亦降低 hHO-1 比活性。空白对照为未处理组。与对照组比较, **P*<0.05 有统计学差异。

3 讨论

统计显示临床新生儿高胆红素血症的发生率足月儿为 10.5%、早产儿为 25.3%^[11], 东亚地区其发生率和严重程度都较白种新生儿高(相对危险度 RR 分别为 1.37 和 1.70)^[12]。病理性高胆红素血症具有潜在的神毒性, 可导致胆红素中毒性脑病, 有很高的致死率或致残率, 应予以高度重视。

换血和光照疗法是新生儿高胆红素血症的传统治疗方法^[13,14]。光照疗法使用方便、副作用小, 为首选疗法。但有些新生儿高胆红素血症单纯应用光照疗法无法有效降低血清胆红素水平。换血疗法虽能快速降低血清胆红素水平, 却有很多并发症^[15]。而最为关键的是该类传统疗法只能清除已经产生的胆红素, 未能在胆红素形成之前就阻断其产生, 起到早期防治的作用。

HO 是血红素代谢产生胆红素的限速酶, 抑制 HO 活性可有效减少胆红素生成。因此在新生儿期肝脏处理胆红素功能尚未成熟时, 利用 HO 抑制剂阻断胆红素过度产生, 较血清胆红素已经产生且已达危险水平后再处理, 有更合理的临床应用前景和科学价值。锡-中卟啉是血红素的结构类似物, 可特异性地抑制 HO 的活性^[1]。但由于其作为化合物具有潜在毒性作用, 及治疗的长期安全性和抑制胆红素产生的全身作用还尚未清楚, 还不能推荐作为临床常规治疗^[14,16]。

由于许多药物可以通过与白蛋白结合而置换出胆红素或者干扰血脑屏障的磷酸糖蛋白功能, 从而增加胆红素进入脑组织产生神经毒性的危险性, 因此药物治疗新生儿高胆红素血症伴有很多危险性^[14]。新近发现的小分子干扰 RNA, 能特异性地切割靶 RNA, 抑制蛋白质的合成, 而不诱导非特异性的双链 RNA 反应, 从而为基因功能研究和基因治疗提供了一个新的有力工具。

本研究利用 RNA 干扰技术抑制胆红素产生的限速酶——HO 同工酶 HO-1 来减少胆红素的产生。实验针对 *hHO-1* 不同位点设计的 siRNA 抑制 *hHO-1* 表达的效率有很大的差别。这种抑制效率的差别主要取决于 siRNA 作用的靶位点, 两条 siRNA 作用的靶位点即使相差几个碱基, 其抑制效率就会产生很大差别。此外, 抑制效率还与作用位点的二级结构和碱基配对结合紧密程度有关^[17]。中间位置的碱基对比两端的碱基配对重要, 不同的碱基错配对抑制效率也有不同的影响^[18]。因此, 本实验经检测从中筛选

出一对抑制效率最佳的 siRNA (siRNA-3), 并以不同的浓度转染人肝脏细胞株后, 发现随着 siRNA 转染浓度的增加, 其抑制表达产物 *hHO-1* 的效率也随之递增, 说明该对 siRNA 对 *hHO-1* 的抑制有浓度依赖性, 与以往相似的研究结果相符^[19]。同时在相同浓度 siRNA 转染人肝脏细胞后, 于不同时间收集细胞, 检测 *hHO-1* 的抑制效率, 发现转染后随着时间的延长, siRNA 抑制 *hHO-1* 的效率则逐渐减弱, *hHO-1* 表达在 48 h 后会逐渐恢复。说明该对 siRNA 对 *hHO-1* 的抑制具有时间依赖性。这种时间依赖性的表达恢复也见于其他 siRNA, 推测和转染的 siRNA 被降解有关^[20]。

新生儿高胆红素血症因血红素产生过度, 诱导 *hHO-1* 高表达以降解增加的血红素。尽管 HL-7702 细胞能表达内源性 *hHO-1*, 但产量低, 实验有时难以检测, 这与我们实验对照组发现的结果一致。因此, 实验中分别采用血红素和转染质粒两种方法上调 *hHO-1* 表达以增加外源性 *hHO-1* 含量, 并用筛选出的 siRNA 转染 *hHO-1* 表达上调的细胞。结果发现与未转染 siRNA 的 *hHO-1* 表达上调的细胞相比, 转染 siRNA 的细胞 *hHO-1* 表达水平下降, 从而证实筛选出的 siRNA 可以抑制由血红素诱导或质粒转染后 *hHO-1* 高表达, 从而为 siRNA 在体内抑制 *hHO-1* 表达, 降低酶产量提供了一种可能性。

在筛选作用最佳的 siRNA 时, 我们选用乱序的、与我们合成的 siRNA 不具同源性的 siRNA 转染细胞作为阴性对照, 结果显示这些非特异性 siRNA 不能降低 *hHO-1* 表达, 说明我们设计合成的 siRNA 具有特异性作用。此外, 筛选的 siRNA 在抑制 *hHO-1* 表达的同时, *hHO-2* 表达没有变化, 进一步说明 siRNA 能特异性抑制 *hHO-1* 表达。

酶活性检测又发现经血红素诱导和转染质粒后, 细胞内 *hHO-1* 活性增加, 而筛选出的 siRNA 经酶切 *hHO-1*, 降低了酶的量, 酶比活力 (U/mg) 或活性倍数明显下降。从而进一步说明 siRNA 可以抑制表达上调的 *hHO-1*, 降低酶活性, 最终减少胆红素的产量。

鉴于 siRNA 的体外细胞实验尚不能完全证实体内的作用, 因此我们将在此基础上设想通过构建新生儿高胆红素血症大鼠模型^[21], 并设计合成和筛选出有效抑制大鼠 *HO-1* 的 siRNA, 采用脂质体包埋^[22], 靶向性作用于大鼠肝细胞以验证 siRNA 在体内对 *HO-1* 的抑制作用, 为临床早期防治新生儿高胆红素血症和胆红素中毒性脑病提供一种新的有效手段。

参考文献 (References)

- [1] Dennery PA. *Semin Neonatol*, 2002, **7**: 111
[2] Riskin A et al. *Acta Paediatr*, 2003, **92**: 574
[3] Gourley GR et al. *Semin Neonatol*, 2002, **7**: 135
[4] Watchko JF et al. *Semin Neonatol*, 2002, **7**: 143
[5] Drummond GS et al. *J Clin Invest*, 1984, **74**: 142
[6] Alexander D. *Pediatrics*, 2004, **113**: 135
[7] Sharp PA. *Genes Dev*, 2001, **15**: 485
[8] Hannon GJ. *Nature*, 2002, **418**: 244
[9] Alisky JM et al. *Am J Pharmacogenomics*, 2004, **4**: 45
[10] Balla G et al. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 18148
[11] Sarici SU et al. *Pediatrics*, 2004, **113**: 775
[12] Setia S et al. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 2002, **156**: 276
[13] Maines MD et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **338**: 568
[14] Hansen TW. *Expert Opin Pharmacother*, 2003, **4**: 1939
[15] Patra K et al. *J Pediatr*, 2004, **144**: 626
[16] Yao TC et al. *Clin Perinatol*, 1995, **22**: 741
[17] Saetrom P et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **321**: 247
[18] Du Q et al. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**: 1671
[19] Persengiev SP et al. *RNA*, 2004, **10**: 12
[20] Holen T et al. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**: 1757
[21] Drummond GS et al. *J Clin Invest*, 1984, **74**: 142
[22] Onodera Y et al. *Ann Nucl Med*, 2003, **17**: 181

Heme Oxygenase-1 Gene Silenced with siRNA to Reduce the Level of Bilirubin

Chun-E Li, You-Xing Jing¹, Yi Shi¹, LI-Qing Xu, Wen-Wei Zhong, Qing-Xiang Shen²,
Yun-Zhu Li, Shan-Chang Yu, Zhen-Wei Xia^{1*}

(Department of Pediatrics, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; ¹State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; ²Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, Shanghai 200032, China)

Abstract Neonatal hyperbilirubinemia is a common clinical condition mainly caused by the increased production and decreased excretion of bilirubin. Current treatment is aimed at reducing serum level of bilirubin. Heme oxygenase (HO) is a rate-limiting enzyme which generates bilirubin. In this study, we intended to specifically suppress HO-1 using RNA interference technique. Small interfering RNA (siRNA)-1, -2 and -3 were designed based on human HO-1 (hHO-1) mRNA sequences. siRNA was transfected into a human hepatic cell line (HL-7702). hHO-1 transcription and protein levels were then determined. In addition, the inhibitory effect of siRNA on hHO-1 was assessed in the cells treated with hemin or transfected with hHO-1 plasmid. siRNA-3 showed the most potent suppressive effect on hHO-1. This inhibition is dose- and time- dependent. Compared with control, both hemin and hHO-1 plasmid up-regulated HO-1 expression in HL-7702 cells. However, the up-regulation was significantly attenuated by siRNA-3. Furthermore, the decrease of hHO-1 activity was coincident with the suppression of its transcription. Finally, siRNA-3 was shown to reduce hHO-1 enzymatic activity and bilirubin level. Thus, this study provides a novel therapeutic rationale via blocking bilirubin formation for preventing and treating neonatal hyperbilirubinemia as well as bilirubin encephalopathy at an early clinical stage.

Key words heme oxygenase; RNA interference; activity; bilirubin; hyperbilirubinemia

Received: July 27, 2006 Accepted: December 15, 2006

*This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30170988, No.30570798), the Shanghai Municipal Science and Technology Commission (No.044119662) and the Shanghai Municipal Education Commission (No.03BZ04)

*Corresponding author. Tel: 86-21-64333414, Fax: 86-21-64333414, E-mail: xzw63@hotmail.com