

## I、III型前胶原基因第2外显子核酶对靶RNA的体外切割活性的研究

胶原蛋白作为细胞外基质的重要组分,参与瘢痕的形成[1][2]。目前已发现至少20种胶原蛋白,由30多种前胶原基因所编码。已知的所有前胶原基因均为不连续基因[3]。在瘢痕形成期间,发现某些类型前胶原基因转录增强[4];过量胶原的沉积是引起增殖性瘢痕的原因之一。核酶作为反义RNA的一种,目前常用来作为控制特定mRNA表达的有效手段。不少人工设计构建的核酶已在体外显示了对特异RNA的切割活性,部分在细胞内亦表现出对mRNA的抑制作用[5][6]。我们利用已构建的锤头型针对 $\alpha 1$  I型及III型前胶原基因第2外显子片段核酶,在体外研究了2种核酶对各自靶RNA分子的切割活性及反应条件。本实验结果为后续应用核酶体内防治瘢痕的研究提供了有益的参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 重组质粒pT-I及pT-III

由本室构建。它们分别由pGEM-T载体与 $\alpha 1$  I型及III型前胶原基因第2外显子片段直接连接而成,基因片段位于T载体T7启动子下游,作为靶RNA的转录模板。

#### 1.2 四个重组质粒的体外转录反应

参考文献[7]及按转录试剂盒(购自Promega公司)使用说明进行。靶RNA的转录利用同位素 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP(购自北京亚辉公司)进行放射性标记(在此之前,需先做一下放射性标记的转录反应,以检验转录的效果)。所有的载体在转录前经适当的内切酶Sal I切割成线性分子。反应体系为:线性DNA 5  $\mu\text{l}$ , 25 mmol/L rNTP 15  $\mu\text{l}$ , 5 $\times$ buffer 10  $\mu\text{l}$ , RNasin 1  $\mu\text{l}$ ,  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP 4  $\mu\text{l}$ , T7 RNA polymerase 5  $\mu\text{l}$ , 最后加无RNase 双蒸水至50  $\mu\text{l}$ 。37  $^{\circ}\text{C}$  1.5 h。转录产物用DNase I消化后乙醇沉淀(加5  $\mu\text{l}$  3 mol/L的NH<sub>4</sub>Ac和150  $\mu\text{l}$ 预冷的无水乙醇, -20  $^{\circ}\text{C}$ 沉淀18 h)。

#### 1.3 核酶反应

将等量靶RNA与对应的核酶(各4  $\mu\text{l}$ )混合并加入缓冲液(终浓度50 mmol/L Tris, pH8.0, 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 终体积为30  $\mu\text{l}$ )。分别在37  $^{\circ}\text{C}$ 、42  $^{\circ}\text{C}$ 及65  $^{\circ}\text{C}$ 至37  $^{\circ}\text{C}$ 的连续变温条件下保温1.5 h后加入10  $\mu\text{l}$ 终止液(98%甲酰胺, 5 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0)。在恒温(37  $^{\circ}\text{C}$ )下变换Mg<sup>2+</sup>浓度(10、15、20 mmol/L),观察核酶对靶RNA的切割效应。样品在65  $^{\circ}\text{C}$ 变性5 min,进行8%聚丙烯酰胺及7 mol/L尿素平板凝胶电泳分析。凝胶在-70  $^{\circ}\text{C}$ 放射自显影24 h。X光底片采用Kodak产品。

#### 1.4 核酶对增生性瘢痕中成纤维细胞内胶原合成的影响

取第2代生长状态良好的对数生长期成纤维细胞(FCS),以0.25%胰酶消化,用15% FCS的DMEM调整细胞浓度为 $5\times 10^5$ /L,按1 000  $\mu\text{l}$ /孔接种于6孔板。于37  $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub>孵育箱中培养12 h,待细胞贴壁后以0.25% FCS的DMEM培养24 h转G0期。分别设置对照组和核酶(脂质体包裹)+15% FCS的DMEM 3个实验组(实验组1:核酶I,实验组2:核酶III,实验组3:核酶I+核酶III),继续培养72 h。以TRIzol法提取细胞总RNA,用紫外分光光度计测总RNA的纯度和浓度,1%琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性。

## 2 结果

### 2.1 靶RNA的体外转录

所构建的靶转录载体(pT-I、pT-III)经Sal I线性化后在靶基因的两端保留了共81 bp的附加序列,插入的 $\alpha 1$  I型及III型前胶原基因第2外显子片段本身的大小分别为129 bp和189 bp,转录后生成的靶RNA(简称为r I、r III)分别为210 nt和270 nt(图1)。

### 2.2 核酶的体外转录

由于同样的原因,转录生成的核酶在其两端增加共81 nt,插入载体中的核酶基因(g I、g III)本身的大小均为62 bp。故转录后生成的核酶(简称为rg I、rg III)大小增加至143 nt(图1)。

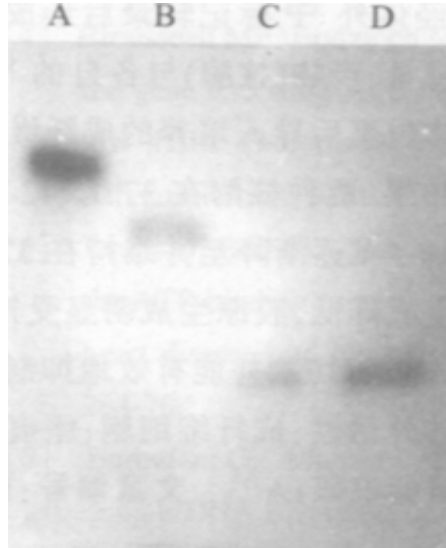


图1 两个核酶(rg I、rg III)及其相应的靶RNA(r I、r III)的体外转录结果

Fig.1 In vitro transcription of the two ribozymes (rg I and rg III) and their respective target RNAs (r I, r III)

A: r III(270 nt); B: r I (210 nt); C: rg III(143 nt); D: rg I (143 nt)

### 2.3 核酶rg I、rg III在体外分别对其靶RNA(r I、r III)的切割作用及所需条件分析

按照设计,靶r I将被rg I切割生成80 nt和130 nt的2个不同的片段。靶r III将被rg III切割生成69 nt和201 nt的2个不同的片段。实验结果与预期的相符(图2、3)。在不同温度下(37 °C、42 °C)核酶均能有效切割靶RNA,从65 °C到37 °C并最终维持在37 °C的反应条件下核酶的切割效率显著提高(能将靶RNA完全切开),提示预高温有助于消除它们预先形成的二级或三级结构。Mg<sup>2+</sup>浓度虽对核酶活性是必需的,但要求不甚严格,10~20 mmol/L的Mg<sup>2+</sup>浓度均能满足核酶活性的要求。相对而言,15 mmol/L的Mg<sup>2+</sup>浓度似乎效果更好些。

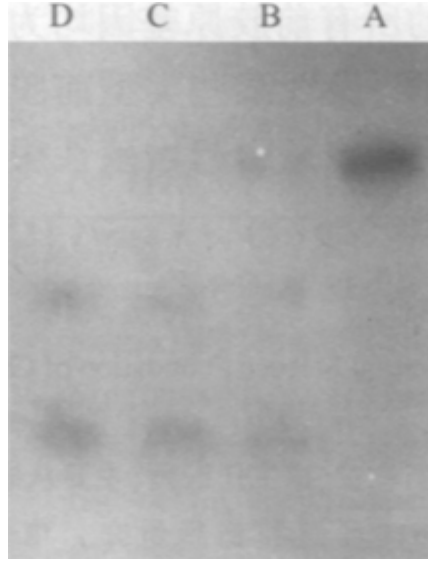


图2 不同温度条件下核酶对靶RNA的切割实验结果

Fig.2 In vitro cleavage activities of the ribozymes for their respective target RNAs at different temperatures

A: Control RNA (r I); B: 37 °C; C: 42 °C; D: 65 °C to 37 °C

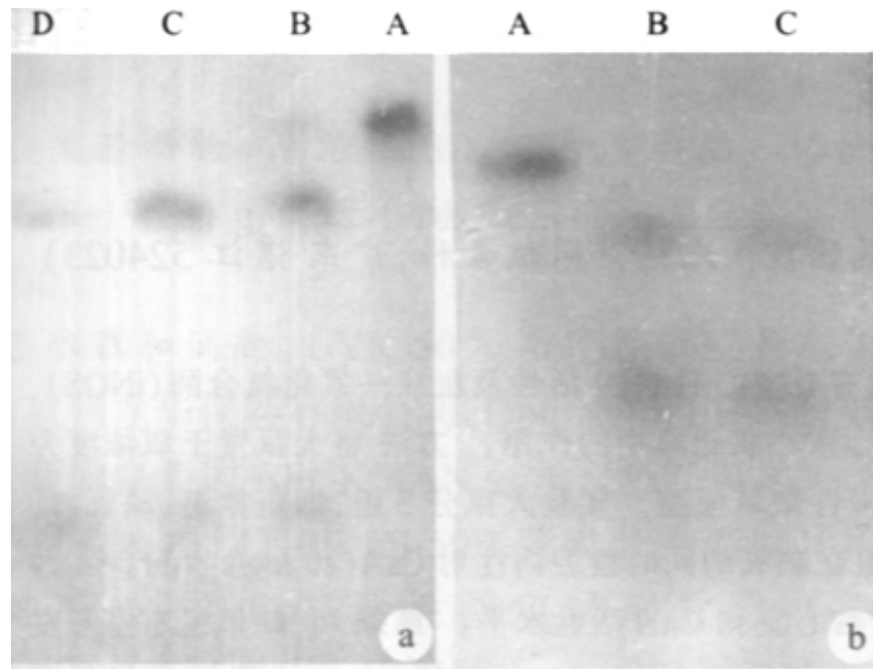


图3 不同Mg<sup>2+</sup>浓度下核酶对靶RNA的切割实验结果

Fig.3 In vitro cleavage activities of the ribozymes for their respective target RNAs in the presence of Mg<sup>2+</sup> at different concentrations

Picture a shows the cleavage of rIII by the ribozyme rgIII (A: Control target RNA, B: 10 mmol/L, C: 15 mmol/L, D: 20 mmol/L), and b shows the cleavage r I by the ribozyme rg I (A: Control target RNA, B: 15 mmol/L, C: 20 mmol/L)

#### 2.4 核酶对增生性瘢痕中成纤维细胞内胶原合成的影响

对照组及不同实验组成纤维细胞内 I 型胶原蛋白、III型胶原蛋白mRNA相对含量用其PCR产物与GADPH吸光度×面积的比值表示，图像扫描结果提示，对照组与实验组1、实验组2、实验组3比较，I 型胶原蛋白、III型胶原蛋白mRNA的表达减低，统计学分析有显著性差异，实验组3尤为明显。实验组1、2、3的组间差异不明显，但实验组3 I 型胶原蛋白、III型胶原蛋白mRNA的表达明显，胶原蛋白生成降低，胶原生成明显受抑制。

前胶原基因为多个外显子和内含子构成的不连续基因，它的过表达使胶原合成异常增加，易导致瘢痕形成[4]。抑制基因的表达将有助于减少胶原的合成从而防治瘢痕。核酶是具有催化活性的反义RNA分子，可序列特异性地结合并切割靶RNA从而抑制其功能。锤头状核酶是应用较多的一种，具有2个功能区：一个是与靶RNA分子配对的识别区，另一个是活性催化域，位于两侧识别区的中央[8]。本实验利用已构建的分别含有锤头状核酶基因及其相应的靶基因片段( $\alpha 1$  I型及III型前胶原基因第2外显子片段)4个重组质粒，研究了不同条件下核酶对靶RNA的体外切割活性。

我们发现核酶的体外切割活性对温度和 $Mg^{2+}$ 的要求范围较宽。在温度为37℃、42℃以及 $Mg^{2+}$ 浓度为 $10 \sim 20$  mmol/L的条件下，核酶均能有效地发挥作用。随着温度的上升，核酶的切割活性有逐渐提高的趋势。在从65℃逐渐降至37℃并最终维持在37℃的反应条件下，两种核酶对各自靶RNA的切割效率均明显提高。这提示经体外转录后的RNA分子(靶RNA及核酶)在溶液中预先形成的二级或三级结构并不利于二者之间的配对识别，尤其是对于单链RNA溶液。预高温后可使RNA分子处于有利于二者之间配对的伸展状态。从核酶和靶RNA二级结构的计算机模拟的结果亦可看出这一点(文中未显示)。我们还发现4个重组质粒体外转录的产物中均有相同大小的RNA小片段，推测是RNA聚合酶流产起始的结果。实验结果同时提示实验组I型胶原蛋白、III型胶原蛋白mRNA的表达明显降低，胶原蛋白生成降低，胶原生成明显受抑制。表明I、III型前胶原基因反义核酶对增生性瘢痕中成纤维细胞内靶RNA能起到有效的切割，这为下一步的体内实验打下了良好的基础。

本研究已认识到 $\alpha 1$  I及III型前胶原合成可较大程度地抑制疤痕的增生，并较系统研究了针对 $\alpha 1$  I及III型前胶原基因第2外显子片段的核酶对靶RNA的体外切割，从而阻断胶原合成。在基因水平探讨疤痕治疗机制，更具创新意义的是将目前最具吸引力的基因治疗手段中的基因剪刀和基因表达封条联合体-核酶技术应用到疤痕治疗中。本研究的最终目标是开发可供临床使用的疤痕治疗新药。

(责任编辑：杨金星)

#### 参考文献：

- [1] Sato M, Ishikawa O, Miyachi Y. Distinct patterns of collagen gene expression are seen in normal and keloid fibroblasts grown in three-dimensional culture[J]. *Br J Dermatol*, 1998, 138(6): 938-43.
- [2] 王向东, 高建华, 鲁峰, 等. 病理性瘢痕成纤维细胞Fas介导的死亡信号传导研究I:  $Ca^{2+}$ 在Fas介导的死亡通道中的作用[J]. *第一军医大学学报*, 2000, 20(4): 297-9.  
Wang XD, Gao JH, Lu F, et al. Death signal transduction mediated by Fas on fibroblasts derived from pathological scars: differences of Fas-induced apoptosis and responses of intracellular  $Ca^{2+}$  in fibroblasts[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2000, 20(4): 297-9.
- [3] 翟中和. 细胞生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1995. 84-6.
- [4] El-Shabrawi Y, Kublin CL, Cintron C. mRNA levels of alpha (VI) collagen, and alpha (XII) collagen, and beta collagen in rabbit cornea during normal development and healing[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998, 39(1): 36-44.
- [5] Toudjarska I, Kilpatrick, Niu J. Delivery of a hammerhead ribozyme specifically downregulates mutant type I collagen mRNA in a murine model of osteogenesis imperfecta[J]. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2001, 11(5): 341-6.
- [6] 郑燕芳, 饶智国, 张积仁. 特异性核酶对宫颈癌细胞CaSKi增殖与凋亡的影响[J]. *第一军医大学学报*, 2002, 22(6): 496-8.  
Zheng YF, Rao ZG, Zhang JR. Effects of anti-HPV16 E6-ribozyme on the proliferation and apoptosis of human cervical cancer cell line CaSKi[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2002, 22(6): 496-8.
- [7] Xu Z, Anzola JV, Nalin CM, et al. The 3'-terminal sequence of a wound tumor virus

transcript can influence conformational and functional properties associated with 5'-terminus[J]. Virology, 1989, 170(5): 511-22.

[8] Hutchins CJR, Rathjen PD, Forster AC, et al. Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sun blotch viroid[J]. Nucleic Acids Res, 1986, 14(231): 3267-79.

#### 参考文献:

[1] Sato M, Ishikawa O, Miyachi Y. Distinct patterns of collagen gene expression are seen in normal and keloid fibroblasts grown in three-dimensional culture[J]. Br J Dermatol, 1998, 138(6): 938-43.

[2] 王向东, 高建华, 鲁峰, 等. 病理性瘢痕成纤维细胞Fas介导的死亡信号传导研究I: Ca<sup>2+</sup>在Fas介导的死亡通道中的作用[J]. 第一军医大学学报, 2000, 20(4): 297-9.

Wang XD, Gao JH, Lu F, et al. Death signal transduction mediated by Fas on fibroblasts derived from pathological scars: differences of Fas-induced apoptosis and responses of intracellular Ca<sup>2+</sup> in fibroblasts[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2000, 20(4): 297-9.

[3] 翟中和. 细胞生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1995. 84-6.

[4] El-Shabrawi Y, Kublin CL, Cintron C. mRNA levels of alpha (VI) collagen, and alpha (XII) collagen, and beta collagen in rabbit cornea during normal development and healing[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39(1): 36-44.

[5] Toudjarska I, Kilpatrick, Niu J. Delivery of a hammerhead ribozyme specifically downregulates mutant type I collagen mRNA in a murine model of osteogenesis imperfecta[J]. Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 2001, 11(5): 341-6.

[6] 郑燕芳, 饶智国, 张积仁. 特异性核酶对宫颈癌细胞CaSKi增殖与凋亡的影响[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(6): 496-8.

Zheng YF, Rao ZG, Zhang JR. Effects of anti-HPV16 E6-ribozyme on the proliferation and apoptosis of human cervical cancer cell line CaSKi[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(6): 496-8.

[7] Xu Z, Anzola JV, Nalin CM, et al. The 3'-terminal sequence of a wound tumor virus transcript can influence conformational and functional properties associated with 5'-terminus[J]. Virology, 1989, 170(5): 511-22.

[8] Hutchins CJR, Rathjen PD, Forster AC, et al. Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sun blotch viroid[J]. Nucleic Acids Res, 1986, 14(231): 3267-79.