

## 利用小干扰RNA表达框鉴定小鼠骨髓树突状细胞有效沉默RelB基因的实验研究

树突状细胞(dendritic cells, DCs)是目前已知机体内功能最强的抗原递呈细胞,具有激发免疫应答和诱导免疫耐受双重作用。其中,利用DC具有诱导T细胞免疫耐受的特性,构建耐受性DC(tolerogenic DC, Tol<sup>-</sup>DC)应用于治疗某些自身免疫性疾病及移植免疫排斥反应成为近年来的研究热点[1]。

目前,通过阻断核转录因子 $\kappa$ B (nuclear factor $\kappa$ B, NF $\kappa$ B)途径依赖的DC成熟途径是最有效的获取Tol<sup>-</sup>DC的方法之一。在NF- $\kappa$ B家族的成员中,有研究显示RelB在小鼠骨髓DC的分化和成熟中起重要作用,RelB基因被抑制,DC的成熟和功能将受到影响[2]。RNA干扰(RNA interference, RNAi)是一种新近发展的高效、特异的基因沉默技术,因此,利用RNAi技术干扰DC中RelB基因表达,有望成为获取Tol<sup>-</sup>DC的新方法。而获取特异有效的小干扰RNA(small interference RNA, siRNA)是发挥RNA干扰效应的前提。为此,我们对设计的3个位点的siRNA表达框对小鼠骨髓DC RelB基因的沉默效应作一比较。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物

7~9周龄C57BL/6小鼠由南方医科大学实验动物研究所提供。雌雄不限。

#### 1.2 试剂和仪器

RPMI 1640干粉培养基、重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)、重组小鼠白细胞介素-4(rmIL-4)(GIBCO公司);LPS(Sigma公司);胎牛血清(杭州四季青);Trizol(Invitrogen公司);DEPC、AMV、dNTPs、RNasin、Taq酶、DL2000 Marker和DNA片段纯化试剂盒(TaKaRa公司);anti-RelB rabbit IgG(Santa Cruz公司,sc-226);FITC-secondary anti-rabbit IgG(Immunotech公司);DU530紫外分光光度计(Beckman公司);GeneAMP PCR System 2400, PERKIN ELMER(PE公司)、GS-99G DNA凝胶图像分析系统(安莱公司)、BX-51荧光显微镜(Olympus公司)。

#### 1.3 小鼠骨髓DC细胞培养[3]

麻醉小鼠,固定,取其双侧股骨、胫骨。去除附着的肌肉和结缔组织,将骨髓细胞冲出骨髓腔,低渗去除红细胞。用含10%胎牛血清RPMI 1640完全培养液调整细胞浓度为 $2 \times 10^6$ /ml,添加rmGM-CSF 40 ng/ml、rmIL-4 10 ng/ml,接种24孔培养板,1 ml/孔,于37 °C, 5%CO<sub>2</sub> 孵箱孵育。隔天换液,补加因子,第4天更换无血清培养基,调整细胞密度为 $2 \times 10^5$ /孔,准备转染。

#### 1.4 siRNA靶向位点的选择

设计siRNA的原则如下:其一,从小鼠RelB cDNA序列中选择起始密码子下游50-100nt开始寻找21-nt基序AA(N<sub>19</sub>),其中A为腺嘌呤核苷酸,N为A、T、C、G中任意一种碱基,19为碱基数目;其二,靶序列的GC含量在50%左右,避免GC含量低于30%或高于60%;其三,进行Blast同源性检索以避免off-target现象对其它基因序列的干扰。我们设计的R1/siRNA、R2/siRNA 和R3/siRNA均位于RelB基因编码区。

## 1.5 siRNA表达框的构建

DNA模板和上游引物购自Allele Biotechnology生产的LineSilence™ kit, 设计基因特异性的下游引物。其原则如下: 其一, 选择含有A<sub>2</sub>N<sub>19</sub>基序作为RelB RNA的意义链序列; 其二, 为产生反意义链的转录子, 合成下面引物序列: 5'-CAAAAAGTAA AAAN19AAACAAGGCTTTTCTCCAAGGGA-3', 其中5'端下划线部分为终止子, 3'端下划线部分为模板匹配区; 其三, 为产生意义链siRNA的转录子, 上面的N19可用其反向互补序列取代。按照上述原则三个不同位点的下游引物交由上海生物工程有限公司合成, 其序列如下:

R1/siRNA意义链引物:

5'-CAAAAAGTAAAAAAATCCGCAGCTCCGATGTGAAACAAGGCTTTTCTCCAAGGGA-3'

反意义链引物:

5'-CAAAAAGTAAAAACACATCGGAGCTGCGGATTAACAAGGCTTTTCTCCAAGGGA-3'

R2/siRNA意义链引物:

5'-CAAAAAGTAAAAAATTCGTCGATGATTCCAAAAACAAGGCTTTTCTCCAAGGGA-3'

反意义链引物:

5'-CAAAAAGTAAAAATTGAAATCATCGACGAATAACAAGGCTTTTCTCCAAGGGA-3'

R3/siRNA意义链引物:

5'-CAAAAAGTAAAAAACACCACGGATATGTCCTCAAACAAGGCTTTTCTCCAAGGGA-3'

反意义链引物:

5'-CAAAAAGTAAAAAGAGGACATATCCGTGGTGTAACAAGGCTTTTCTCCAAGGGA-3'

GFP/siRNA阴性对照的意义链引物:

5'-CAAAAAGTAAAAAGAAGAAGTCGTGCTTCAAACAAGGCTTTTCTCCAAGGGA-3'

反意义链引物:

5'-CAAAAAGTAAAAAGAAGCAGCAGACTTCTCAAACAAGGCTTTTCTCCAAGGGA-3'

## 1.6 建立PCR反应

PCR反应在50 μl反应体积中进行: 模板DNA 1 ng, 1×PCR缓冲液, 5 U Taq酶, 上、下游引物各0.6 μmol/L, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, 余为灭菌去离子水。PCR扩增条件参考LineSilence™ 试剂盒使用说明书进行。扩增产物用EB染色的1%琼脂糖凝胶电泳检测, 室温, 5V/cm, 紫外灯下观察, 在250 bp的处, 出现特异性的目的产物, 与目标产物大小接近。

## 1.7 PCR产物的纯化

参照TaKaRa公司DNA片段纯化试剂盒使用说明。纯化后电泳检测并用核酸蛋白浓度测定仪定量。

## 1.8 转染

参照Allele Biotechnology & Pharmaceuticals, Inc的AdvantGene™使用说明书进行。利用24孔细胞培养板转染的具体操作如下: ① 将2.5 μl AdvantGene和50 μl无血清无抗生素的培养基混合, 室温孵育10 min; ② 将①中的试剂与0.25~1 μg DNA或RNA混合, 室温孵育15 min; ③ 将调整好细胞密度的细胞更换无血清无抗生素的培养基200 μl/孔; ④ 将②中的转染混合物逐滴加入每个细胞培养孔, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>孵育; ⑤ 孵育4 h后, 更换含20%胎牛血清的正常培养基。⑥ 细胞在37 °C, 5% CO<sub>2</sub>孵育24 h。

## 1.9 实验分组

实验分为6组, 各组细胞均培养6 d。未成熟DC (immature DC) 组为培养第6 d, 未经LPS刺激的DC。成熟DC (mature DC) 组在培养结束前24 h加LPS (1 μg/ml) 刺激。R1/siRNA、R2/siRNA、R3/siRNA 及 GFP/siRNA组也分别在转染24 h后加LPS (1 μg/ml) 刺激24 h。收集各组细胞备用。

## 1.10 RelB mRNA表达的RT-PCR分析

用RT-PCR方法检测各组DC RelB表达的变化。参照Invitrogen公司的Trizol™ kit 操作说明书进行RNA抽提。采用两步法RT-PCR, 参照TaKaRa公司AMV反转录酶说明书进行反转录。反转录程序为42 °C 20min→99 °C 5min→5 °C 5min。RelB cDNA的PCR反应如下: 1 μl的上述反转录产物, 1×PCR 缓冲液, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.15 mmol/L dNTPs, 上、下游引物各0.4 mol/L, 1 U Taq酶, 添加灭菌双蒸水至25 μl。PCR扩增程序如下: 94 °C 3min→32×(94 °C 30 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min)→72 °C 5 min。根据小鼠RelB

cDNA序列(NM-009046)设计引物,其序列如下:上游引物5'-ccggcacagctttaaacaacct-3';下游引物5'-cgtttgc tctcgattccatgtg-3'。选用小鼠 $\beta$ -actin(X03765)作内参,引物序列如下:上游引物:5'-tcctgtatgcctctggtcgta-3';下游引物:5'-accgctcgttgccaatagtgat-3';内参 $\beta$ -actin的RT-PCR反应体系与反应程序Re1B的条件相同。PCR产物可在EB染色的1%琼脂糖凝胶上电泳检测。实验重复3次。

### 1.11 Re1B蛋白的免疫荧光分析

用吸管将各组DC吹下,小心滴到盖玻片上,自然晾干。30  $\mu$ l 4%多聚甲醛室温固定30 min,用双蒸水洗3次,每次5min;加30  $\mu$ l一抗(rabbit anti-mouse Re1B, Santa Cruz)用PBS稀释(1:200),室温,于湿盒内放置90 min,用PBS洗3次,每次5 min;加30  $\mu$ l 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的二抗(goat anti-rabbit IgM)用PBS稀释(1:400),湿盒内室温放置2 h,再用PBS洗5 min,荧光显微镜下观察。

## 2 结果

### 2.1 PCR方法产生siRNA表达框

利用PCR扩增出含有特定修饰的启动子和终止子的目标基因和阴性对照的正义链和反义链。琼脂糖凝胶电泳显示在约250 bp的处出现特异条带,与期望片段长度一致(图1)。

### 2.2 RT-PCR检测各组DC Re1B mRNA的表达

利用RT-PCR分析Re1B基因在各组DC中的表达情况。电泳结果显示Re1B的RT-PCR产物约为648 bp;内参 $\beta$ -actin的RT-PCR产物约为343 bp。mDC组细胞表达Re1B较iDC组明显增强,R1/siRNA、R3/siRNA与阴性对照GFP/siRNA转染后的DC经LPS刺激后表达Re1B较iDC组细胞显著增强,而R2/siRNA转染的DC经LPS刺激后Re1B仍然呈现低水平表达,提示R2/siRNA可能是Re1B mRNA特异性抑制位点(图2)。

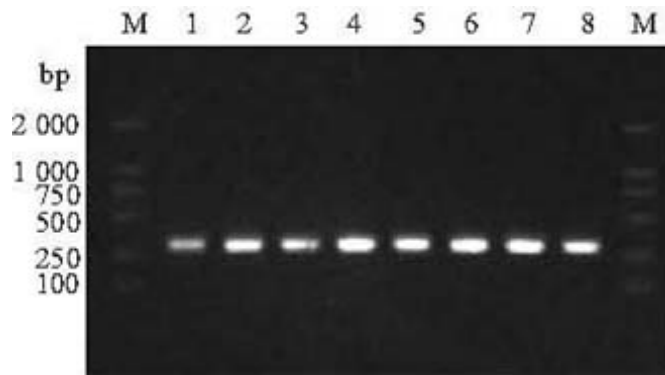


图1 PCR方法构建siRNA表达框

Fig.1 siRNA cassette constructed by PCR

M: DL2000 marker; Lane1, 3, 5, 7: Sense strands of R1/siRNA, R2/siRNA, R3/siRNA and GFP/siRNA, respectively; Lane2, 4, 6, 8: Antisense strands of R1/siRNA, R2/siRNA, R3/siRNA and GFP/siRNA, respectively.

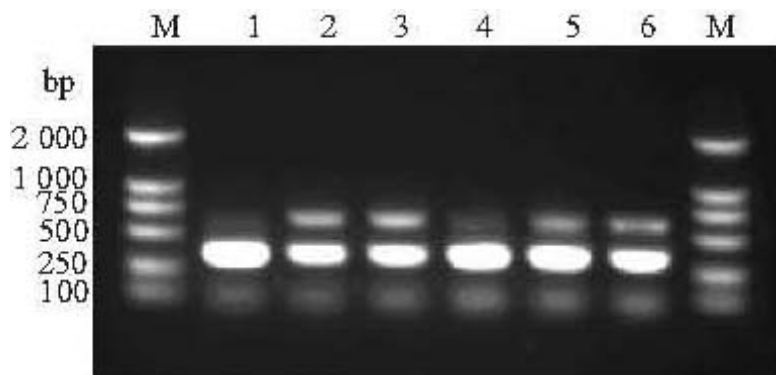


图2 RT-PCR检测DC Re1B mRNA的表达变化

### 2.3 免疫荧光细胞化学检测DC细胞RelB蛋白表达

利用免疫荧光细胞化学方法进一步检测3个位点的siRNA对DC中RelB蛋白表达的影响。结果发现，mDC组细胞荧光较iDC组细胞显著增强，R1/siRNA、R3/siRNA组与对照GFP/siRNA组细胞的荧光强度较R2/siRNA组显著增强，与mDC组荧光强度接近，而R2/siRNA荧光强度与iDC组相近。进一步验证了R2/siRNA能够特异地降低LPS刺激后DC细胞中RelB蛋白的表达(图3)。

## 3 讨论

目前已知的刺激DC成熟的方法几乎都是通过激活NF $\kappa$ B途径实现的，包括常用的刺激剂细菌脂多糖(LPS) [4]。NF $\kappa$ B家族由Rel蛋白家族中的成员以同源或异源二聚体的形式存在。在哺乳动物细胞中有5种NF $\kappa$ B/Rel家族成员：p50(NF $\kappa$ B1)、p52(NF $\kappa$ B2)、RelA(p65)、RelB和cRel。DC中NF $\kappa$ B激活后转位到细胞核内调控一系列基因表达，包括MHCII、CD80、CD86和CD40等基因表达，与DC成熟密切相关[5]。NF $\kappa$ B成员基因敲除后，DC成熟将发生障碍[6]。其中，RelB基因与DC成熟关系最为密切[2]。NF $\kappa$ B失活的DC可以诱导T调节细胞产生，并增强Th1细胞因子表达，诱导T细胞免疫耐受[7]。因此，通过阻断DC成熟的NF $\kappa$ B途径是获得耐受性DC的有效策略。

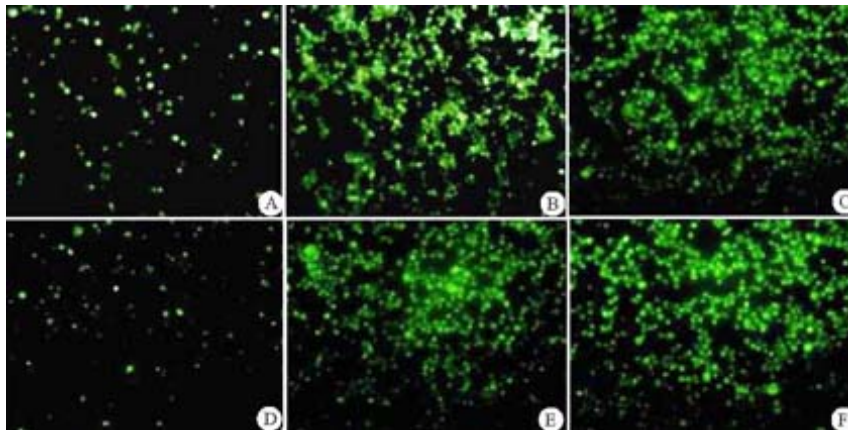


图3 各组DC RelB 蛋白表达的荧光图

Fig. 3 Immunofluorescence assay of RelB protein in different DCs (Original magnification:  $\times 400$ )

A: Immature DCs; B: Mature DCs; C: R1/siRNA group; D: R2/siRNA group; E: R3/siRNA group; F: GFP/siRNA group

RNAi技术是近年来发展的基因特异性沉默技术，与反义技术、核酶技术以及抗体介导的基因表达沉默技术相比，siRNA沉默基因表达RNAi具有高效、特异等优点[8]。

本实验利用PCR方法构建三个不同位点的表达框，R1/siRNA、R2/siRNA和R3/siRNA分别位于1027、302和1121位点。由于未成熟状态下DC RelB基因表达偏低，不利于观察RNAi效应，因此在DC经过RNAi作用后给予LPS刺激，若RelB被siRNA有效沉默，DC将不能被LPS刺激成熟，RelB表达水平及细胞表型与iDC相似；若siRNA未能有效抑制RelB基因表达，DC经LPS刺激后将高表达RelB mRNA和蛋白，细胞呈现成熟表型，与mDC相似。

本实验发现mDC组RelB表达水平明显高于iDC组，比较三个位点siRNA抑制效应，R1/siRNA、R3/siRNA组

DC表达RelB较iDC组细胞显著增强, 与mDC组相近; 而R2/siRNA组DC经LPS刺激后RelB仍然呈现低水平表达, 提示R2/siRNA可能是有效的位点。细胞免疫荧光技术显示mDC组细胞荧光较iDC组细胞显著增强, R1/siRNA、R3/siRNA组细胞荧光强度较R2/siRNA组显著增强, 与mDC组荧光强度接近, 而R2/siRNA荧光强度较弱, 与iDC组相近。实验结果在蛋白水平进一步支持RT-PCR实验得出的结论, 即R2/siRNA是RelB mRNA特异性抑制的有效位点。

(责任编辑: 吴锦雅)

#### 参考文献:

- [1] Lu L, Thomson AW. Manipulation of dendritic cells for tolerance induction in transplantation and autoimmune disease[J]. *Transplantation*, 2002, 73(1 Suppl): S19-22.
- [2] Zanetti M, Castiglioni P, Schoenberger S, et al. The role of relB in regulating the adaptive immune response[J]. *Ann NY Acad Sci*, 2003, 987: 249-57.
- [3] 顾春瑜, 王前, 郑磊, 等. 小鼠骨髓耐受性树突状细胞的体外培养与鉴定[J]. *第一军医大学学报*, 2005, 25(8): 959-62.
- Gu CY, Wang Q, Zheng L, et al. In vitro culture and identification of tolerogenic dendritic cells from mouse bone marrow[J]. *J First Mil Med Univ/ Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2005, 25(8): 959-62.
- [4] Kim JS, Jobin C. The flavonoid luteolin prevents lipopolysaccharide- induced NF-kappaB signalling and gene expression by blocking IkappaB kinase activity in intestinal epithelial cells and bone-marrow derived dendritic cells[J]. *Immunology*, 2005, 115(3): 375-87.
- [5] Hackstein H, Thomson AW. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs[J]. *Nature*, 2004, 4(1): 24-34.
- [6] Ouaaz E, Arron J, Zheng Y, et al. Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits[J]. *Immunity*, 2002, 16(2): 257-70.
- [7] Yoshimura S, Bondeson J, Brennan FM, et al. Role of NfkappaB in antigen presentation and development of regulatory T cells elucidated by treatment of dendritic cells with proteasome inhibitor PSI[J]. *Eur J Immunol*, 2001, 31(6): 1883-93.
- [8] Li M, Qian H, Ichim TE, et al. Induction of RNA interference in dendritic cells [J]. *Immunol Res*, 2004, 30(2): 215-30.