

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

朱家源¹, 朱斌¹, 徐兵², 张涛¹, 陈东¹, 唐兵¹, 李新强¹ (¹中山大学附属第一医院烧伤外科, 广东 广州 510080; ²第一军医大学南方医院血液科, 广东 广州 510515)

摘要: 目的 体外研究锤头型 $\alpha 1$ I型及III型前胶原基因第2外显子片段核酶对各自靶RNA分子的切割活性及反应条件。同时观察两反义核酶对瘢痕中成纤维细胞胶原合成的影响。方法 将含 $\alpha 1$ I型及III型前胶原基因第2外显子片段的重组质粒(pT-I、pT-III), 经体外³²P标记转录后形成产物靶RNA。同时将含特异性核酶基因的重组质粒(pT-g I、pT-g III)进行非标记的体外转录, 产物(核酶)与各自的³²P-靶RNA按不同的条件混和反应, 电泳后放射自显影观察结果。将构建好的核酶以脂质体包裹后导入培养的成纤维细胞内, 采用图像分析法观察核酶对成纤维细胞I型、III型胶原蛋白mRNA合成的影响。结果 两种核酶在37℃、42℃均能有效切割各自的靶RNA, 对Mg²⁺浓度的要求范围较宽(10~20 mmol/L); 反应温度从65℃逐渐降至并维持在37℃的条件下核酶切割活性显著提高。I、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。结论 针对 $\alpha 1$ I型及III型前胶原基因第2外显子片段的核酶能有效地在体外对靶RNA进行切割并能有效地抑制瘢痕中成纤维细胞胶原的合成。

关键词: 前胶原基因; 核酶; 体外活性; 成纤维细胞; 瘢痕

中图分类号: R392.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2004)06-0653-03

In vitro cleavage activity of the ribozymes constructed specifically for the second exons of pro alpha I and III collagen genes

ZHU Jia-yuan¹, ZHU Bin¹, XU Bing², ZHANG Tao¹, CHEN Dong¹, TANG Bing¹, LI Xin-qiang¹

¹Department of Burns, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; ²Department of Hematology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To study the *in vitro* cleavage activity and the reaction conditions of the hammerhead ribozymes for the second exons of pro alpha 1 I and III collagen genes, and observe the effect of the two ribozymes on collagen synthesis by the fibroblasts in scar tissue. **Methods** The fragments of the second exons of pro alpha 1 I and III collagen genes were cloned into the plasmids pT-I and pT-III and labeled with ³²P during transcription to obtain the target RNA. The transcription products of the plasmids pT-g I and pT-g III containing specific ribozymes were incubated with the label target RNAs, respectively, under various conditions, and the results observed by electrophoresis autoradiography. The constructed ribozymes were transduced into cultured fibroblasts via liposomes for investigation of their effects on mRNA synthesis of type I and III collagen protein by image analysis. **Results** The two ribozymes (rg I and rg III) could efficiently cleave their target RNAs at both 37℃ and 42℃, in the presence of Mg²⁺ within a relatively wide concentration range from 10 to 20 mmol/L. When the temperature was lowered from 65℃ to 37℃ and maintained at 37℃, the cleavage activity of the ribozymes reached the maximum. The expression of mRNA of I and III collagen decreased accompanied by reduced collagen synthesis. **Conclusion** Hammerhead ribozymes for the fragments of the second exons of pro alpha 1 I and III collagen genes can cleave its target RNAs *in vitro* and effectively inhibit the collagen synthesis by the scar-derived fibroblasts.

Key words: procollagen genes; ribozyme; *in vitro* activity; fibroblasts; scar

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

收稿日期: 2003-09-30

基金项目: 国家自然科学基金(39770842)

This study was supported by National Natural Science Foundation of China (39770842)

作者简介: 朱家源(1963-), 男, 博士, 副教授、副主任医师, 主要从事创伤、烧伤、瘢痕及慢性皮肤溃疡的基础和临床研究, 电话: 020-87755766-8265, E-mail: zhujiayuan@163.net

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。核酶的转录反应不标记(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 μl , 25 mmol/L rNTP 15 μl , 5 \times buffer 10 μl , RNasin 1 μl , $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 4 μl , T7 RNA polymerase 5 μl , 最后加无 RNase 双蒸水至 50 μl 。37 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 h。转录产物用 DNase I 消化后乙醇沉淀(加 5 μl 3 mol/L 的 NH_4Ac 和 150 μl 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 μl)混合并加入缓冲液(终浓度 50 mmol/L Tris, pH8.0, 15 mmol/L MgCl_2), 终体积为 30 μl 。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 μl 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^{2+} 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 $5 \times 10^5/\text{L}$, 按 1 000 μl /孔接种于 6 孔板。于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 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 $^{\circ}\text{C}$ 、42 $^{\circ}\text{C}$)核酶均能有效切割靶 RNA, 从 65 $^{\circ}\text{C}$ 到 37 $^{\circ}\text{C}$ 并最终维持在 37 $^{\circ}\text{C}$ 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^{2+} 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^{2+} 浓度均能满足核酶活性的要求。相对而言, 15 mmol/L 的 Mg^{2+} 浓度似乎效果更好些。

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 \times 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



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 $^{\circ}\text{C}$; C: 42 $^{\circ}\text{C}$; D: 65 $^{\circ}\text{C}$ to 37 $^{\circ}\text{C}$

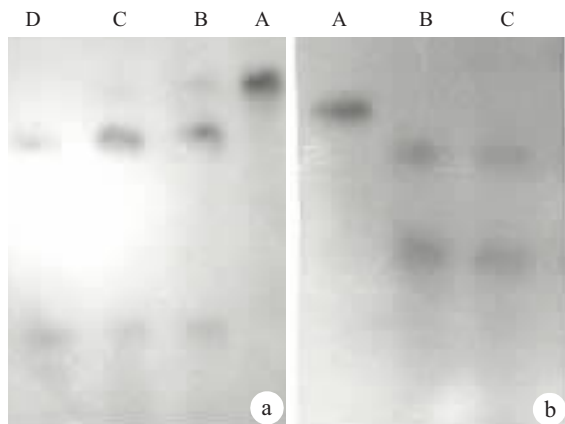


图 3 不同 Mg^{2+} 浓度下核酶对靶 RNA 的切割实验结果
Fig.3 In vitro cleavage activities of the ribozymes for their respective target RNAs in the presence of Mg^{2+} at different concentrations

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 rI by the ribozyme rgI (A: Control target RNA, B: 15 mmol/L, C: 20 mmol/L)

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。

3 讨论

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 °C、42 °C 以及 Mg^{2+} 浓度为 10~20 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 °C 逐渐降至 37 °C 并最终维持在 37 °C 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。

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.

(责任编辑:杨金星)