

RNAi 抑制 PrP 表达载体的构建及其在 PrP 功能研究中的初步应用

李玉荣^{1,2}, 周向梅¹, 尹晓敏¹, 杨建民¹, 乔俊文¹, 赵德明^{1*}

(1. 中国农业大学动物医学院 国家动物传染性海绵状脑病实验室, 北京 100094;

2. 河北农业大学动物科技学院, 保定 071000)

摘要: 本文旨在构建有效抑制朊蛋白(Prion protein, PrP)表达的重组质粒, 并以此为工具控制 PrP 表达, 从而探讨 PrP 对细胞 SOD 活性的影响。设计并化学合成 1 对含有发夹结构的寡核苷酸片段(shPrP), 退火后与表达载体 pG-super(Hairpin siRNA expressing vector)定向连接, 构建重组质粒 pG-super-shPrP。对重组子进行 PCR 鉴定, 测序正确后, 脂质体法转染 C6 细胞, 采用实时荧光定量 RT-PCR 检测 PrP mRNA 的表达水平, 以验证 pG-super-shPrP 的抑制效率; 结果表明: 重组质粒 pG-super-shPrP 构建成功, 且显著降低 C6 细胞 PrP mRNA 表达 ($P < 0.05$), 抑制效率为 34.2%。利用 pG-super, pG-super-shPrP 分别转染 C6 细胞, 并检测细胞 SOD 总活性及 SOD 表达水平, 探讨 PrP 对细胞 SOD 活性的影响及其作用机制, 结果表明 PrP 促进细胞 SOD 的活性 ($P < 0.01$), 但对细胞 SOD 的表达量无影响, 即 PrP 对 SOD 活性的促进作用与 SOD1 的表达量无关。本研究在成功构建了 PrP 的 RNA 干扰表达质粒的基础上, 利用此质粒, 在细胞水平上揭示了 PrP 对细胞 SOD 活性的促进作用。

关键词: RNAi; C6 细胞; 朊蛋白; 表达; 超氧化物歧化酶

中图分类号: S852.65⁺9.7

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)03-0337-06

The Establishment and Application of Inhibited Expression Vector of Prion Protein by RNA Interference

LI Yu-rong^{1,2}, ZHOU Xiang-mei¹, YIN Xiao-min¹, YANG Jian-min¹,
QIAO Jun-wen¹, ZHAO De-ming^{1*}

(1. National Animal Transmissible Spongiform Encephalopathies Laboratory, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. College of Animal Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China)

Abstract: In present research, we intend to construct pG-super-siPrP expression plasmid and explore its function in C6 cells. shPrP was subcloned into pG-super. Recombinant plasmid pG-super-shPrP was transformed into Top10 *E. coli*, and the ampicillin resistant clones were identified by PCR and DNA sequencing. C6 cells were transfected with the identified pG-super-shPrP and pG-super (the control group) by LipofectamineTM 2000. PrP mRNA was quantified by real-time RT-PCR. The results showed that the expression of PrP mRNA in pG-super-shPrP group decreased by 34.2% compared with the control group ($P < 0.05$). The detection results of the total activity of superoxide dismutase indicated that PrP promoted the SOD activity. In conclusion, pG-super-shPrP expression plasmid was constructed effectively and took effect in C6 cells, which helped to further study about PrP biochemical and physiological role in animal and offer a attractive therapeutic approach to fight against prion disease.

收稿日期: 2007-04-17

基金项目: 国家自然科学基金(30500371); 国家科技支撑计划(2006BAD06A14); 科技部基金(2005KDA 21205-7)

作者简介: 李玉荣(1973-), 女, 汉族, 河北广宗人, 讲师, 博士生, 主要从事病理生理学研究

* 通讯作者: 赵德明, E-mail: zhaodm@cau.edu.cn

Key words: RNAi; C6 cells; prion protein(PrP); expression; superoxide dismutase (SOD)

细胞型朊蛋白(Cellular prion protein, PrP^C)是哺乳动物体内存在的一种正常编码的糖蛋白,分布广泛,且在中枢神经系统的神经元和神经胶质细胞表达尤为丰富^[1]。目前,有关 PrP 的研究主要集中在 PrP^C 构象转变和 PrP^C 生理功能两大方面。PrP^C 在未知因子作用下通过构象转变,成为异构型的朊蛋白(Scrapie prion protein, PrP^{Sc})。在构象上,PrP^C 具有高的 α -螺旋结构,而 PrP^{Sc} 具有高的 β -折叠结构,PrP^{Sc} 具有蛋白酶抗性,可引发动物的传染性海绵状脑病(Transmissible spongiform encephalopathies, TSEs)^[2-3]。研究表明内源性 PrP^C 表达水平下降,可使感染潜伏期明显延长^[4-5]。这些结论说明抑制 PrP^C 的表达是一种治疗、至少是减缓痼疾发生的有效手段。研究表明 PrP 的生理功能包括参与神经系统功能维持、细胞信号转导、核酸代谢等^[6-7],但 PrP 这些功能对于细胞或生物体不是必要的,因 PrP 缺陷对其无显著性影响,所以对其功能的进一步研究有重要意义,控制 PrP^C 的表达水平可为研究 PrP^C 的正常生理功能提供材料。因此,笔者首先构建可有效抑制 PrP 表达的载体,以期为朊病毒病的临床治疗及 PrP 功能研究提供试验材料。

C6 细胞(大鼠脑神经胶质瘤细胞)是哺乳动物神经细胞系的一种,其 PrP 高度表达,是研究 PrP 的常用细胞模型,为此笔者选择 C6 细胞为研究材料。SOD 是体内超氧阴离子自由基清除剂和催化 H₂O₂ 分解的酶,对生物体有保护作用。PrP^C 的生理功能虽至今仍未完全清楚,但目前公认其具有抗氧化性能,主要表现为 SOD 样活性^[7],且 Wong 等研究表明脑内 PrP 表达丰度的部位特异性直接影响到相应部位 SOD 的活性,即体内 PrP 表达可直接影响 SOD 活性^[8]。抑制细胞 PrP 表达对细胞 SOD 酶活性的影响未见报道。本文以构建的 RNAi 载体为控制 PrP 表达丰度的工具,对此进行了研究,并对其可能的作用机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 细胞、载体

C6 细胞在 DMEM 完全培养液中常规培养,内含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 mg/mL,置 37 °C、5% 的 CO₂ 培养箱中培养。pG-super (Hairpin siRNA expressing vector) 由 Gary

教授(Northwest University in US)惠赠。

1.2 试剂与仪器

0.25% 胰蛋白酶购自 Gibco 公司;限制性内切酶 *Bgl* II、*Hind* III、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、T₄ DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司;TRIZOL 试剂购自 Promega 公司;反转录试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒及质粒提取试剂盒,购自博大泰克生物有限公司。RealmasterMix (SYBR Green) 购自 Tiangen (Beijing) 生物有限公司。DNA Engine Option 2 荧光定量 PCR 检测系统, MJ Research 公司, USA。

1.3 寡聚核苷酸合成

根据 GenBank 中的大鼠 PrP mRNA 序列、pG-super 载体图谱(图 1)及 pG-super 载体使用说明设计寡聚核苷酸。寡聚核苷酸的组成见图 1B, 由图可见寡聚核苷酸设计中关键是正义链 19 nt 的设计。按要求设计的正义链为 5'-CACTGGTGGAAAGC-CGGTAC-3'。由上海生工生物技术有限公司化学合成 1 对相应的 oligos, 命名为 small hairpin PrP (shPrP), 序列组成见表 1。70 °C 退火 10 min, 构建双链 DNA 分子, 两端自带 *Bgl* II 或 *Hind* III 黏性酶切位点。

1.4 pG-super 重组表达载体的构建

shPrP 退火产物定向克隆至经 *Bgl* II、*Hind* III 双酶切的 pG-super 载体, T₄ DNA 连接酶于 16 °C 作用 6 h。转至 Top10 感受态。由于插入片段仅有 59 bp, 不宜酶切鉴定, 故在目的片段插入位点两侧, 根据 pG-super 质粒的核苷酸序列设计鉴别引物 (Detecting Primer), 设计依据见图 2, 序列见表 1。用于 PCR 筛选阳性克隆, 阴性质粒 PCR 结果为 153 bp, 而重组阳性质粒的扩增片段为 206 bp (153 + 59 + 部分酶切位点区域)。将阳性质粒 PCR 的产物送至上海生物工程有限公司进行测序, 通过 DANMAN 与原设计序列进行同源性比较。

1.5 pG-super 载体转染

取传代的 C6 细胞, 胰酶消化, 按照浓度 1×10^5 /mL 的密度接种于 6 孔板, 不加双抗, 待细胞长至丰度约 80%, 按照 LipofectamineTM 2000 试剂说明书进行瞬时转染。利用优化的转染条件, LipofectamineTM 2000 与质粒的量分别为 3、5 μ L 对 C6 细胞进行转染, 共分为 2 组, 对照组转空载体 pG-super、试验组转质粒 pG-super-shPrP, 每组 3 个重

光定量 PCR 对 β -actin 和 PrP 进行检测,通过各自的标准曲线计算得到各组 PrP 和 β -actin 的表达水平。PrP 的相对表达量 = 同模板 PrP 拷贝数/同模板 β -actin 的拷贝数。

1.7 PrP 表达水平对细胞超氧化物歧化酶活性的影响

1.7.1 细胞蛋白质提取 C6 细胞分别转染 pG-super(对照组)、pG-super-shPrP,经冷的 PBS 洗涤后,加入蛋白裂解液,冰上放置 10 min 后,14 000 r/min 4℃ 离心 20 min,提取上清。蛋白裂解液为含 1% NP-40、EDTA-free 蛋白酶抑制剂复合物的 PBS^[8]。

1.7.2 SOD 活性的测定 采用氮蓝四唑法(NBT)测定,单位为 U/mg,一个酶活力单位(U)以抑制 NBT 光化学反应的 50% 来表示。具体操作方法见文献[8]。

1.7.3 SOD mRNA 表达水平的测定 方法和步骤同 PrP mRNA 的测定,引物序列见表 1。

1.8 数据统计

每个样品重复 3 次,由 Opticon analysis software (version 2.10) 荧光分析软件自动进行定量。用 SAS 统计软件中 *t*-test 对数据进行统计分析,结果以“平均值±标准误”表示。

2 结果

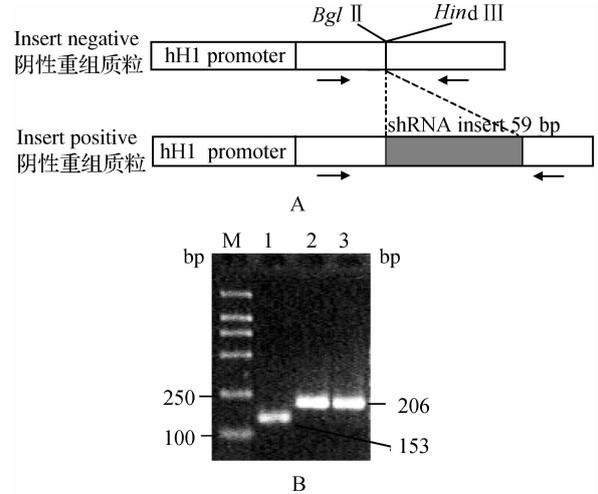
2.1 抑制载体 pG-super-shPrP 的构建

2.1.1 重组阳性质粒的构建 重组质粒用鉴别引物 PCR 扩增,结果见图 2,阴性质粒 PCR 扩增片段大小约为 153 bp,阳性质粒 pG-super-shPrP 扩增片段大小约为 206 bp。验证阳性的 PCR 产物送上海生物工程有限公司测序。测序结果证明目的片段已成功插入,阳性质粒构建成功。

2.1.2 细胞转染 分别提取不同的表达质粒,空质粒 pG-super(对照组)及阳性重组质粒 pG-super-shPrP。质粒通过 LipofectamineTM 2000 转染生长处于对数期的 C6 细胞。因载体自带绿色荧光蛋白 GFP 标签,GFP 转到细胞基因组,6 h 左右后即可用荧光显微镜观察到绿色荧光,转染后 48 h 的检测结果见图 3。

2.1.3 RNAi 抑制效果的检测

2.1.3.1 PrP、SOD、 β -actin 荧光定量 PCR 标准曲线的构建: 对 PrP 和 β -actin 重组质粒按照 10^{-1} 倍比稀释后,分别按照 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、



A. 表达载体 pG-super 阳性克隆的 PCR 筛选鉴定示意,箭头示意筛选用的引物;B. 表达载体 pG-super 阳性克隆的 PCR 筛选鉴定

M. DL2000 分子量标准; 1. 阴性质粒(pG-super); 2、3. 质粒 pG-super-shPrP

A. Schematic illustration of PCR screen for shRNA expression positive *E. coli* clones. Arrows indicate the primer for PCR;B. PCR screen for shRNA expressing *E. coli* positive clones

M. DL2000 marker; 1. Negative control pG-super; 2, 3. pG-super-shPrP

图 2 shRNA 表达载体阳性克隆的 PCR 筛选鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmids by PCR

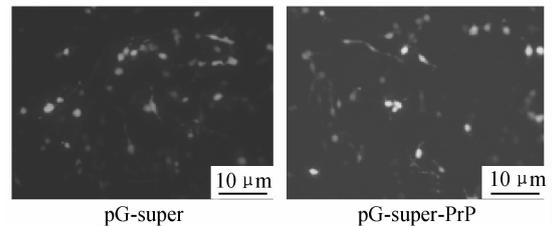


图 3 重组表达载体转染 C6 细胞 48 h 后荧光检测结果 (320×)

Fig. 3 The images of transfected C6 under fluorescence microscopy after 48 h (×320)

10^{-5} 、 10^{-6} (体积分数) 作为模板进行 PCR 扩增,系统自动生成标准曲线(图 4 A、B)。它们的 T_m 分别为 $84.6 \sim 85.4^\circ\text{C}$ 、 $88.2 \sim 89.0^\circ\text{C}$, T_m 值均一,说明溶解曲线峰值单一,产物的特异性良好;相关系数分别为 0.999、1.000,说明起始模板浓度与 C_t 值之间呈良好的线性关系,由此可见标准曲线完全可以用于定量试验。

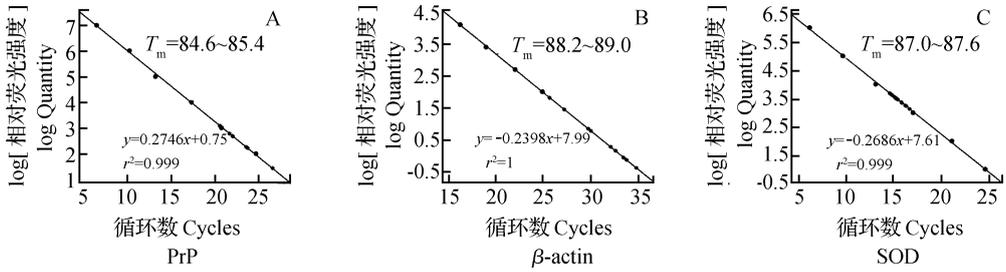
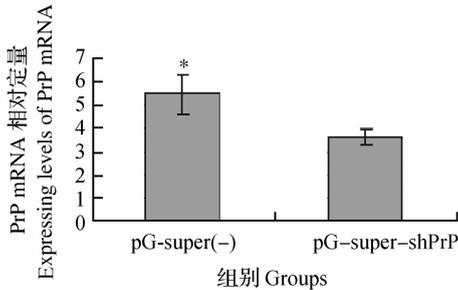


图 4 PrP、SOD 及 β -actin mRNA 实时荧光定量 PCR 检测回归曲线

Fig. 4 Real-time PCR amplification standard curve for mRNA of PrP, SOD and β -actin

2.1.3.2 RNAi 抑制效率: C6 细胞转染不同质粒 pG-super(对照组)、pG-super-shPrP 后 PrP mRNA 相对表达量分别为 5.50 ± 0.86 、 3.62 ± 0.36 (图 5)。pG-super-shPrP 组 PrP mRNA 与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$), 表达水平较对照组降低 34.2%。说明所构建的质粒 pG-super-shPrP 在 C6 细胞内产生的 shRNA 发挥了抑制作用。



*. $P < 0.05$

图 5 C6 细胞中 PrP mRNA 表达

Fig. 5 Specific inhibition of PrP mRNA expression in C6 cells by pG-super-shPrP transfection

2.2 PrP 对细胞 SOD 酶活性的影响

2.2.1 PrP 对细胞 SOD 活性的调节 对照组(转染 pG-super)和 RNAi 组(转染 pG-super-shPrP)转染 48 h 时细胞 SOD 酶的活性见表 2。RNAi 组 SOD 酶活性较对照组降低 19.21% ($P < 0.05$), 可见 PrP 表达水平的降低可使细胞 SOD 酶活性降低。

表 2 PrP 表达对 SOD 酶活性及 SOD mRNA 表达的影响

Table 2 Effects of PrP on activity of SOD and SOD mRNA

组别 Groups	超氧化物歧化酶活性 SOD activity / (U/mg)	SOD mRNA
Control	93.2 ± 6.30	1.32 ± 0.26
RNAi	$75.3 \pm 4.52^*$	1.34 ± 0.31

* $P < 0.05$

2.2.2 对 SOD1 mRNA 水平相对定量 SOD1 定

量的标准曲线见图 4C, T_m 值均一, 且相关性高, 说明定量结果数据可靠。定量结果见表 2, 结果显示, 对照组和 RNAi 组 SOD1 自身的表达水平无变化, 即 PrP 对细胞内 SOD1 的表达无影响。这提示 PrP 不是通过调节 SOD1 的表达来影响 SOD 活性的。

3 分析与讨论

3.1 RNAi 表达载体的构建及应用

RNAi 是指将外源双链 RNA (Double-stranded RNA, dsRNA) 导入细胞后引起与其序列同源的特异基因 mRNA 降解的现象, 属于转录后基因沉默 (Post-transcription gene silencing, PTGS) 的一种形式。RNAi 现象最早在植物中发现, 目前此技术已广泛应用于植物、模式动物和人类基因组的研究。利用其短的双链 RNA (19~21nt) 来干扰目的基因的表达, 进而分析基因的功能或抑制目的基因的表达量。由于 RNA 合成昂贵, 易于降解, 现在多用短发卡 RNA (shRNA) 的方式来进行 RNA 干扰试验, 即借助表达质粒或病毒载体在细胞内产生 siRNA, 使研究者无需直接操作 RNA, 就可达到长期抑制靶基因表达的目的^[9]。本试验所用的 pG-super (Hairpin siRNA expressing vector) 属于 shRNA 表达载体的一种, 操作时首先需体外合成一段能互补形成发卡结构的 DNA 序列, 将其连入载体后, 利用载体上的 RNA 聚合酶启动子转录生成发卡结构的 RNA (shRNA), 进而在细胞内发挥类似 siRNA 的作用。本研究所用载体为 pG-super, 启动子为 Human H1 promoter, 目的片段两侧带有 *Bgl* II、*Hind* III 酶切位点, 用于目的片段的插入, 载体构建成功后转入细胞内产生 shRNA。载体自带荧光蛋白可用于检测转染效果。抑制效率决定于两个因素, ①质粒本身对 PrP mRNA 的抑制效率, ②转染效率。本试验中脂质体对于神经细胞的转染效率是

影响抑制效率的一个关键性因素。结果表明本试验设计、合成的 pG-super-shPrP 对 PrP mRNA 有明显的抑制作用,最佳抑制效率为 34.2%。在不具备通过遗传学方法生产 PrP 缺陷(PrP^{0/0})动物或细胞条件的情况下, RNAi 是研究 PrP 功能的有效工具。

3.2 以 RNAi 为工具,研究 PrP 对 SOD 活性的影响

pG-super-shPrP 的成功构建为研究 PrP 生理功能提供了材料。笔者以转染 pG-super 空质粒的 C6 细胞为对照组,以转染 pG-super-shPrP 的 C6 细胞为试验组(低 PrP 表达)来探讨 PrP 对 SOD 活性的影响。结果表明,PrP 促进细胞 SOD 活性。

PrP^C 的生理功能至今仍未完全清楚,近来,有关 PrP 生理功能的研究表明其具有 SOD 样活性^[10-12],其抗氧化功能主要表现为 SOD 样活性,并且在体内参与了抗氧化应激功能。目前从动物试验、细胞水平、分子水平均证明 PrP^C 的 SOD 样活性是 Cu²⁺ 依赖性的,且与构象有密切的联系。PrP^C 八肽重复区、疏水区以及 C 端的 GPI 锚定位点都对其 SOD 活性有不同程度的影响,特别是其八肽重复区的影响最为明显^[13]。

本研究表明 PrP 直接参与 SOD 酶活性的调节,与 Wong 等^[8] 体内研究的结论相一致。通过 real-time RT PCR 证明 PrP 表达水平不影响 SOD mRNA 的表达,与 Wong 等^[8] Western blotting 的结果相一致,PrP 含量的改变对 Cu/Zn-SOD(SOD1)和 Mn-SOD 没有显著影响。所以 PrP 对 SOD 酶活性的调节不是通过改变 SOD 的表达来实现的。Wong 等^[8] 认为虽然 PrP^C 对 Cu 离子的亲和力较弱,但可能其存在 Cu 伴侣分子,促进 SOD 与 Cu²⁺ 的作用而参与此过程。

致谢:感谢 Gary 教授(Northwest University in US)惠赠 pG-super 载体,感谢袁晶博士在实验中给予的帮助,载体示意图参考袁晶博士毕业论文。

参考文献:

[1] HORIUCHI M, YAMAZAKI N, IKEDA T, et al. A cell form of prion protein(PrP^{Sc}) exists in many non-

neuronal tissues of sheep[J]. J Gen Viro, 1995, 76: 2 583-2 587.

[2] PRUSINER S B. Prions[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 13 363-13 383.

[3] BROWN D R. Prion and prejudice: normal protein at synapse[J]. Trends Neurosci, 2001, 24: 85-90.

[4] BUELER H, AGUZZI A, SAILER A, et al. Mice devoid of PrP are resistant to Scrapie[J]. Cell, 1993, 73: 1 339-1 347.

[5] MALLUCCI G R, RATTE S, ASANTE E A, et al. Post-natal knock-out of normal prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration[J]. EMBO J, 2002, 21: 202-210.

[6] ROBB G B, BROWN K M, KHURANA J, et al. Specific and potent RNAi in the nucleus of human cells[J]. Nat Struct Mol Biol, 2005, 12(2): 133-137.

[7] KABEUDER NC, KASER A, DUNZENDOUFER S, et al. Neurokinin-1 receptor interacts with PrP(106-126)-induced dendritic cell migration and maturation[J]. J Neuroimmunol, 2005, 158(1-2): 153-158.

[8] WONG B S, PAN T, LIU T, et al. Differential contribution of superoxide dismutase activity by prion protein *in vivo* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 273, 136-139.

[9] 张定校, 樊 斌, 刘 榜, 等. RNA 干扰(RNAi)技术应用于哺乳动物细胞的研究策略[J]. 遗传, 2005, 27(5): 839-844.

[10] LIEMANN S, GLOCKSHUBER R. Transmissible spongiform encephalopathies [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 250: 187-190.

[11] BALGUERIE A, DOS REIS S, RITTER C, et al. Domain organization and structure-function relationship of the HET-s prion protein of *Podospora anserina* [J]. Embo J, 2003, 22(9): 2 071-2 081.

[12] CHIARINI L B, FREITAS A R, ZANATA S M, et al. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals[J]. EMBO J, 2002, 21: 3 317-3 326.

[13] PRUSINER S B, SCOTT M R, DEARMOND S J, et al. Prion protein biology[J]. Cell, 1998, 93(3): 337-348.