

文章编号: 1000-7423(2005)-06-0437-04

【论著】

阴道毛滴虫过氧化物氧化还原酶系统的 RNA 干扰

章家新¹, 傅玉才², 徐晓园², 吴统健¹, 曹凤玲¹

【摘要】 目的 用干扰 RNA 的方法特异性降解阴道毛滴虫细胞过氧化物酶(Prx)和硫氧还蛋白还原酶(TrxR)的 mRNA, 并观察其对虫体生长情况的影响。方法 取患者阴道毛滴虫培养, 用酚、氯仿法提取其基因组 DNA, 反转录合成双链 RNA (dsRNA)后用 RNase III 消化过柱, 合成小分子(21~23 bp)干扰 RNA (siRNA); 由脂质载体介导分 A、B、C 等 3 组转染, 分别降解毛滴虫细胞 Prx、TrxR 及 Prx+TrxR, 转染前的细胞作为对照组 (D 组); 收集转染前、转染后 24 h 和 48 h 的毛滴虫细胞, 用半定量反转录-PCR(RT-PCR)检测 Prx 和 TrxR 的 mRNA 水平; 转染 36 h 后显微镜下计数并观察细胞活力。结果 转染后阴道毛滴虫 Prx 和 TrxR 的 mRNA 水平显著下降, 组间细胞的活力差异无统计学意义 ($P>0.05$), 但组间细胞数差异具有统计学意义 ($P<0.01$), 4 组的细胞均数: A、B、C、和 D 组分别为 $7.2\times 10^7/L$ 、 $14.2\times 10^7/L$ 、 $3.8\times 10^7/L$ 和 $20.3\times 10^7/L$ 。结论 用干扰 RNA 的方法可以抑制 Prx 和 TrxR 的 mRNA 水平, 对阴道毛滴虫的细胞周期有明显延长作用, 而对细胞活力无明显影响。

【关键词】 阴道毛滴虫; RNA 干扰; 过氧化物酶; 硫氧还蛋白还原酶

中图分类号: R382.211

文献标识码: A

RNA Interference to the Expression of Peroxiredoxin-Related Genes in *Trichomonas vaginalis*

ZHANG Jia-xin, FU Yu-cai, XU Xiao-yuan, WU Tong-jian, CAO Feng-ling

(Department of Laboratory, Xiamen Xianyue Hospital, Xiamen 361012, China)

【Abstract】 Objective To inhibit the expression of the target genes of peroxiredoxin (Prx) and thioredoxin reductase (TrxR) by RNA interference and evaluate its effect on the growth of *Trichomonas vaginalis*. Methods Genomic DNA was extracted from cultured *Trichomonas vaginalis* with phenol-chloroform method and was transcribed to double stranded RNA (dsRNA). Short interference RNAs (siRNA, 21–23 bp) synthesized by digestion of dsRNA with RNase III and purified through filter cartridge, were transfected into the cells in three groups (A, B and C) to degrade the target genes of Prx, TrxR and Prx+TrxR through siPORT lipid, respectively, and the untransfected was selected as a control (group D). The levels of Prx and TrxR mRNA were determined 24 h and 48 h post-transfection by relative quantitative RT-PCR, and the growth of *Trichomonas vaginalis* was estimated under microscope 36 h post-transfection. Results *Trichomonas vaginalis* mRNA levels of Prx and TrxR decreased. Though the cell activity showed no significant difference ($P>0.05$) in four groups as expected, a difference existed ($P<0.01$) between the groups in the average of cells ($7.2\times 10^7/L$, $14.2\times 10^7/L$, $3.8\times 10^7/L$ and $20.3\times 10^7/L$ in groups A, B, C and D respectively). Conclusions RNA interference inhibits the expression of the genes of Prx and TrxR and extended *Trichomonas vaginalis* cells cycle considerably, but showed no influence on the cell activity.

【Key words】 *Trichomonas vaginalis*; RNA interference; Peroxiredoxin (Prx); Thioredoxin reductase (TrxR)

阴道毛滴虫系最原始的单细胞真核生物^[1], 没有线粒体, 但有氢酶体^[2,3], 能量代谢方式主要为糖酵解^[4], 并能适应在低氧环境下生长。在自然条件下, 毛滴虫细胞是暴露于氧气中的, 一般认为氧气不利于该细胞的生长, 因为有氧代谢可产生一些对细胞有害的活性氧自由基。在大部分真核细胞中, 氧气被还原

型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADPH)和黄嘌呤氧化酶转化成超氧阴离子后由超氧化物歧化酶转化成过氧化氢, 后者在过氧化物酶和谷胱甘肽过氧化物酶的作用下被还原成水。阴道毛滴虫缺乏真核细胞所具有的过氧化氢酶、谷胱甘肽及其过氧化物酶等^[5], 那么它是如何清除细胞内过氧化氢等活性氧呢? 章家新等^[6,7]通过构建阴道毛滴虫 cDNA 表达文库, 发现其存在另外一种抗氧化系统, 该系统包括过氧化物酶(Prx)、

作者单位: 1 厦门市仙岳医院检验科, 厦门 361012;

2 汕头大学医学院寄生虫学教研室, 汕头 515041

硫氧还蛋白还原酶(TrxR)和硫氧还蛋白(Trx)。由超氧化物歧化酶所产生的过氧化氢可被以 Trx 为供氢体的 Prx 还原成水, 而氧化型 Trx 在 TrxR 和 NADPH 作用下被还原。

RNA 干扰主要发生在基因转录后, 即 mRNA 的修饰或翻译水平, 由小分子(21~23 bp)的干扰 RNA (short interference RNA, siRNA)所触发。siRNA 与解旋酶、核酸酶等一起组成 RNA 诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC), 该复合体具有核酸内切酶的功能, 利用 siRNA 中反义链与特异基因的 mRNA 片段结合, 并从结合部位的两端将 mRNA 切割, 随即将其降解, 从而抑制该基因的表达, 而其他无关基因的表达不受影响。本研究通过体外合成小分子干扰的 Prx(siPrx)和小分子干扰的 TrxR (siTrxR), 由载体导入细胞后可特异性降解 Prx 和 TrxR 基因, 使两者不表达或低表达。

材料与方 法

1 主要试剂

总 RNA 提取和反转录 PCR 试剂盒均购于德国 Qiagen 公司, 小片段 RNA 合成、纯化及转染试剂盒均购自美国 Ambion 公司。

2 细胞培养

阴道毛滴虫(取自汕头大学医学院第一附属医院的 1 例患者), 用改良的蛋白胨、酵母和麦芽糖培养液(终浓度为 1%的葡萄糖代替麦芽糖, 再加入 10%新鲜灭活的小牛血清)于 37 °C 恒温箱中培养 48 h。

3 基因组 DNA 提取

取镜下观察活力良好的阴道毛滴虫细胞, 300×g 离心 5 min 收集沉淀, 用 PBS (pH 7.2)洗涤 2 次, 蛋白酶 K 56 °C 消化 3 h, 常规酚、氯仿法提取基因组 DNA。

4 模板的制备

根据此前所克隆的 cDNA 序列设计引物, 并在引物的 5' 端加上 T7 启动子, 序列如下: Prx_RiF: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGGCAGCGAACTGGTAAGC-3'), Prx_RiR (5'-TAATACGACTCACTATAGGGTATACAAGGGCAAGTGGCT-3') 和 TrxR_RiF (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAAGAACGCCTTAAGGGAC-3'), TrxR_RiR(5'-TAATACGACTCACTATAGGGCTGGAGAGCCGTTTGTA-3')。以基因组 DNA 为模板, PCR 反应条件, 95°C 30 s, 26 个循环 (95°C 30 s, 60°C 30 s,

72°C 2 min), 72°C 10 min。

5 siRNA 合成及纯化

以上述 PCR 产物作为模板, 加入 T7 酶和三磷酸腺苷(ATP)、三磷酸胞苷(CTP)、三磷酸尿苷 (UTP) 和三磷酸鸟苷(GTP), 体外反转录合成双链 RNA, 用 RNase III 消化后过柱纯化, 即为小分子干扰 RNA (siRNA), 用于和脂质体混合转染细胞。所有操作按照说明书进行。

6 用脂质体介导转染细胞

阴道毛滴虫细胞 1×10⁴ 接种于 12 孔板, 37°C 培养 24 h, 换入无血清改良的伊格尔(氏)最低必需培养液 (Opti-MEM I)0.4 ml, 同时加入 A、B 混合液 0.1 ml [A 液: 3 μl siPORT 脂质体(阳离子和中性脂类混合物) 稀释于 7μl 无血清 Opti-MEM I 中; B 液: 60 μl siRNA 稀释于 30 μl 无血清 Opti-MEM I 中, 混合 A、B 液] 置室温培育 30 min, 4 h 后换完全培养液培养不同时间备用。根据干扰基因的不同分为 A、B、C 和对照 4 个组(表 1), 每组分 3 管, 36 h 后镜下计数细胞并观察各组细胞的活力情况。

表 1 不同组别的细胞转染情况

Table 1 Different components in cell culture

组别 Group	30%双氧水 30%H ₂ O ₂ (μl)	siPrx (μl)	siTrxR (μl)
对照组 Control group	3.42	-	-
A 组 Group A	3.42	60	-
B 组 Group B	3.42	-	60
C 组 Group B	3.42	60	60
终浓度(mol/L) Final concentration(mol/L)	0.6×10 ⁻³	25×10 ⁻³	25×10 ⁻³

7 反转录 PCR (RT-PCR) 检测 Prx 和 TrxR 的 mRNA 表达

分别于转染前及转染后 24 h 和 48 h 收集细胞, 提取总 RNA。经测定后用无 RNA 酶双蒸水稀释至 0.2 μg/μl。25μl 反转录-PCR (RT-PCR) 反应体系有 5×反应缓冲液 5μl、脱氧核苷三磷酸(dNTP)2.5μl、引物各 1 μl (Prx: 5'-CAAACCAGCTCCAGCATT-3', 5'-TAGTTGTTAGCCTTCCGAAG-3', 产物为 579 bp; TrxR: 5'-GCTCAAGCATTTCGATCTC -3', 5'-AGATATCTCTCAGCAAGGAG-3', 产物为 899 bp)、MgCl₂ 1.5μl、总 RNA 5μl、禽成髓性白血病病毒(AMV)反转录酶及 Taq DNA 聚合酶各 1 μl。扩增条件: 42°C 1 h 合成 cDNA 第 1 链, 95°C 5 min 灭活反转录酶, 然后 94°C

45 s, 58°C 45 s, 72°C 45 s, 35 个循环后 72°C 5 min。甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 作为内对照进行半定量检测(GAPDH: 5'-ATGGCCACCTTGTCTG-3', 5'-GATCGTTTGTGTAGGAGTGG-3', 其产物为 234 bp), 用 2 %琼脂糖电泳观察 PCR 产物, 凝胶成像系统拍照鉴定。

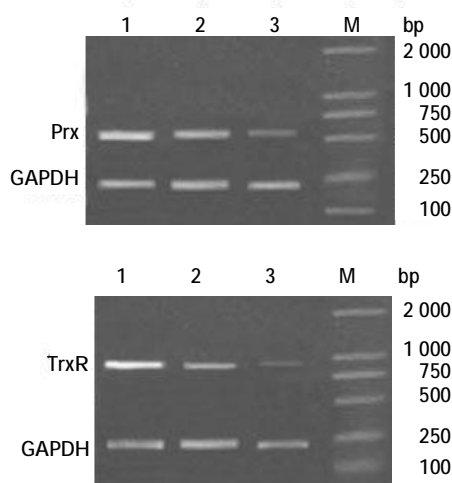
8 统计分析

计数结果取常用对数, 采用随机化设计资料的两因素重复方差检验, 用 SPSS12.0 进行统计分析。

结 果

1 RT-PCR 分析

收集瞬时转染前和转染 24 h 和 48 h 后的培养细胞, 提取总 RNA, RT-PCR 半定量检测细胞 Prx 和 TrxR 的 mRNA, 以 GAPDH 作为内对照 (图 1)所示, 转染后细胞的 Prx 和 TrxR 的 mRNA 水平显著下调。



1: 转染前, 2: 转染 24 h 后, 3: 转染 48 h 后, M: DNA 标志物。
Lane 1: Before transfection, Lane 2: 24 h after transfection, Lane 3: 48 h after transfection, M: DNA marker.

图 1 RT-PCR 分析转染前、后细胞的 Prx 和 TrxR mRNA 水平
Fig.1 mRNA levels of Prx and TrxR in cells before and after transfection by RT-PCR

2 转染后细胞生长情况

在加入适量的过氧化氢使活性氧浓度超出其生理浓度的情况下, 再导入 siPrx 和 siTrxR 特异性地抑制 Prx 和 TrxR 基因的表达, 观察阴道毛滴虫的细胞周期和细胞活力是否发生明显改变。RNA 干扰的观察结果显示: 4 组的细胞活力无明显差异, 各管细胞计数情况见表 2。统计分析表明: 单独干扰 TrxR 基因 ($F=134.84, P<0.01$)或单独干扰 Prx 基因 ($F=745.53, P<$

0.01), 均可延长细胞周期, 且后者大于前者, 两者之间也存在交互作用 ($F=11.48, P<0.05$), 即同时干扰两个靶基因效果更显著。

表 2 siPrx、siTrxR 及 siPrx+siTrxR 干扰 36 h 后阴道毛滴虫的细胞数 (/L)
Table 2 Cell growth after interfered by siPrx and/or siTrxR for 36 hours

组别 Group	1	2	3
对照组 Control group	19.1×10^7	23.1×10^7	18.7×10^7
A 组 Group A	7.3×10^7	6.9×10^7	7.5×10^7
B 组 Group B	14.9×10^7	13.6×10^7	14.1×10^7
C 组 Group C	3.7×10^7	3.6×10^7	4.1×10^7

讨 论

RNA 干扰是指双链 RNA 特异性地抑制靶基因的转录后 mRNA 表达的现象。作为高效、特异的调节基因表达和一定程度上替代基因敲除的技术, RNA 干扰已成为基因功能研究的有力工具, 但对于其生物学作用及机制的认识仍处于初始阶段。

感染阴道毛滴虫可引起非病毒性性传播疾病——滴虫性阴道炎^[8], 全世界每年患病人数超过 1.7 亿^[9], 也是诱发艾滋病的主要危险因素之一^[10]。目前对该病的控制主要以硝基咪唑类药物治疗, 但虫体的耐药性在逐渐增加^[11]。Prx 不仅具有调节细胞抗氧化还原状态, 通过信号转导调节细胞的增殖、分化和凋亡^[12,13]; 且可在免疫反应、细胞粘附、结合和运输一些疏水性大分子等过程中起着重要作用。本研究应用 RNA 干扰技术对新近克隆的抗氧化基因 Prx 和 TrxR 进行 RNA 干扰, 降低其 mRNA 表达, 细胞计数结果提示干扰具有明显延长细胞周期的作用, 对细胞增殖具有一定的抑制作用, 但经细胞染色并未发现有明显的形态学改变。因此, 如果能同时阻断 Prx、TrxR 和 Trx 的 mRNA 表达, 则很可能使细胞受到活性氧的损伤而导致细胞在形态结构上的破坏性改变。有研究报道耐甲硝唑的阴道毛滴虫细胞株对氧敏感^[14], 而阴道毛滴虫 Prx 系统与人 Prx 系统的同源性不高。因此, Prx 系统有可能成为新的药物靶点, 为治疗耐药性阴道毛滴虫病提供了新思路。

参 考 文 献

[1] Sogin M. History assignment: when was the mitochondrion founded?[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1997, 7:792-799.
[2] Dyaal SD, Johnson PJ. Origins of hydrogenosomes and mitochondria: evolution and organelle biogenesis[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2000, 3:404-411.
[3] van der Giezen M, Slotboom DJ, Horner DS, et al. Conserved properties of hydrogenosomal and mitochondrial ADP/ATP carriers:

- a common origin for both organelles[J]. EMBO J, 2002,21:572-579.
- [4] Martin W, Muller M. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote[J]. Nature, 1998,392 (6671):37-41.
- [5] Ellis JE, Yarlett N, Cole D, et al. Antioxidant defences in the microaerophilic protozoan *Trichomonas vaginalis*: comparison of metronidazole-resistant and sensitive strains[J]. Microbiology, 1994, 140:2489-2494.
- [6] 章家新, 傅玉才, 郑晓虹, 等. 阴道毛滴虫 cDNA 文库的构建和鉴定[J]. 汕头大学医学院学报, 2003,16:198-200.
- [7] 章家新, 傅玉才, 刘红, 等. 阴道毛滴虫硫氧还蛋白过氧化物酶的 cDNA 克隆及序列分析(英文)[J]. 医学研究生学报, 2004, 17:680-684.
- [8] Yarlett N, Yarlett NC, Lloyd D. Metronidazole-resistant clinical isolates of *Trichomonas vaginalis* have lowered oxygen affinities [J]. Mol Biochem Parasitol, 1986,19:111-116.
- [9] Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, et al. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*[J]. Clin Microbiol Rev, 1998, 11:300-317.
- [10] World Health Organisation. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted diseases: overview and estimates[R]. WHO/CDS/CSR/EDC/2001.10.
- [11] Sorvillo F, Smith L, Kerndt P, et al. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans[J]. Emerg Infect Dis, 2001,7:927-932.
- [12] Delaunay A, Pflieger D, Barrault MB, et al. A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation [J]. Cell, 2002,111:471-481.
- [13] Fujii J, Ikeda Y. Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein[J]. Redox Rep, 2002, 7:123-130.
- [14] Upcroft P, Upcroft JA. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic Protozoa[J]. Clin Microbiol Rev, 2001,14:150-164.
- (收稿日期:2005-03-11 编辑:盛慧锋)

(上接第 436 页)

- [5] 阎玉河, 许威光, 陈辉. 旋毛虫 ES 抗原特异性蛋白两个结构基因的序列分析及重组质粒的构建[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1996, 14: 15-19.
- [6] 阎玉河, 童光志, 卢景良. 旋毛虫肌幼虫 ES 抗原特异性蛋白两个结构基因的分子克隆及其高效表达[J]. 中国兽医学报, 1997, 17:581-588.
- [7] 张伟光, 蔡海松. 旋毛虫 P49 抗原基因克隆体外表达条件的研究 [J]. 中国人兽共患病杂志, 1998, 14(2): 7-10.
- [8] 宋思扬, 郑忠辉, 黄耀坚, 等. 旋毛虫排泄分泌抗原 P49 基因的克隆[J]. 厦门大学学报, 1999, 28: 117-120.
- [9] 温艳, 劳为德, 高虹, 等. 旋毛虫 p49 基因的克隆、序列分析及表达[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2002, 20: 339-341.
- [10] 温艳, 劳为德, 刘思国, 等. 旋毛虫 ES 抗原基因的克隆和序列分析 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18(6): 32-33, 87.
- [11] 赵凌, 孟宪荣, 栗绍文, 等. 旋毛虫幼虫分泌性蛋白 P49 基因的克隆与表达[J]. 中国兽医杂志, 2003, 39(7): 7-10.
- [12] 付宝权, 原丽红, 张亚兰, 等. 旋毛虫肌幼虫 cDNA 文库的免疫筛选[J]. 吉林农业大学学报, 2004, 32: 389-393.
- [13] Su XZ, Prestwood AK, McGraw RA. Cloning and expression of complementary DNA encoding an antigen of *Trichinella spiralis* [J]. Mol Biochem Parasitol, 1991, 45: 117-120.
- [14] Goyal PK, Wheatcroft J, Wakelin D. Tyvelose and protective responses to the intestinal stages of *Trichinella spiralis*[J]. Parasitol Int, 2002, 51: 91-98.
- [15] Yao C, Prestwood AK, McGraw RA. *Trichinella spiralis* (T1) and *Trichinella* (T5): a comparison using animal infectivity and-molecular biology techniques [J]. J Parasitol, 1997, 83: 88-95.
- [16] Nagano I, Wu Z, Boonmars T, et al. Molecular cloning and characterization of two kinds of proteins in excretory-secretory products of *Trichinella pseudospiralis* [J]. Int J Parasitol, 2004, 34: 491-500.
- [17] Mak CH, Ko RC. Characterization of endonuclease activity from excretory/secretory products of a parasitic nematode, *Trichinella spiralis*[J]. Eur J Biochem, 1999, 260: 477-481.
- [18] Mak CH, Chung YY, Ko RC. Single-stranded endonuclease activity in the excretory-secretory products of *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis* [J]. Parasitology, 2000, 120: 527-533.
- [19] Mak CH, Ko RC. DNA-binding activity in the excretory-secretory products of *Trichinella pseudospiralis* (Nematoda: Trichinelloidea) [J]. Parasitology, 2001, 123: 301-308.
- [20] 刘明远, 黎诚耀, 吴秀萍, 等. 旋毛虫新生幼虫差减 cDNA 文库的构建及其初步筛选[J]. 中国兽医学报, 2001, 21: 355-358.
- [21] Catchside DG, Holmes B. The action of enzymes on chromosomes [J]. Symp Soc Exp Biol, 1947, 1: 225.
- [22] Laskowski Sr M. DNases and their use in the studies of primary structure of nucleic acids[J]. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1967, 29: 165-220.
- [23] Harosh I, Binninger DM, Harris PV, et al. Mechanism of action of deoxyribonuclease II from human lymphoblasts[J]. Eur Biochem, 1991, 202: 479-484.
- [24] Kyle SM, Ronald Jk, Alan E. Revised structure of the active form of human deoxyribonuclease IIa[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 292: 415-421.
- [25] Lyon CJ, Evans CJ, Bill BR, et al. The *C. elegans* apoptotic nuclease NUC-1 is related in sequence and activity to mammalian DNase II[J]. Gene, 2000, 252: 147-154.
- (收稿日期:2005-01-15 编辑:盛慧锋)

本刊祝广大读者

新春快乐、事业成功、万事如意!