

[文章编号] 1000-4718(2007)03-0435-03

# RNA 干扰抑制小鼠脾淋巴细胞分泌 IL-1 $\alpha$ \*

郑宁宁<sup>1</sup>, 于艳秋<sup>1</sup>, 宋晓宇<sup>1</sup>, 丁旭东<sup>2</sup>, 张海鹏<sup>1△</sup>(中国医科大学<sup>1</sup>基础医学院病理生理教研室,<sup>2</sup>附属盛京医院麻醉科, 辽宁 沈阳 110001)

**[摘要]** 目的: 确定针对 IL-1 $\alpha$  的 siRNA 在细胞内与其具有同源互补序列的靶标位点结合后, 特异性降解 IL-1 $\alpha$  的 mRNA, 从而抑制其表达的效果。方法: 体外 PCR 扩增合成针对 IL-1 $\alpha$  靶位点的 DNA 表达盒, 纯化后转染经 LPS 激活的小鼠脾淋巴细胞, 在细胞内源性 RNA 聚合酶 III 作用下转录形成 siRNA, 诱发目标 mRNA 的降解。于转染后 48 h 收集细胞培养上清。用 ELISA 法测定 IL-1 $\alpha$  浓度。结果: 干扰组 IL-1 $\alpha$  分泌量明显低于对照组和无关干扰组 ( $P < 0.05$ ), 抑制率约为 15%。结论: RNA 干扰技术可以在原代培养的小鼠脾淋巴细胞中发挥特异性干扰作用, 产生抑制 IL-1 $\alpha$  分泌的效果, 为 IL-1 $\alpha$  的基因治疗开拓了新途径。

**[关键词]** RNA 干扰; 转录后基因沉默; 白细胞介素 1; 淋巴细胞

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

## RNA interference inhibits the secretion of IL-1 $\alpha$ in mice spleen lymphocytes

ZHENG Ning - ning<sup>1</sup>, YU Yan - qiu<sup>1</sup>, SONG Xiao - yu<sup>1</sup>, DING Xu - dong<sup>2</sup>, ZHANG Hai - peng<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, <sup>2</sup>Department of Anesthesia, The Affiliated Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China. E-mail: hpzhangsq@yahoo.com)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To decide the effect that selected siRNA degrades mRNA of IL-1 $\alpha$  specifically and suppression of its expression after connected with target site with homology complementary sequence. **METHODS:** Synthesized DNA expression box aimed directly at target site through PCR reaction *in vivo* was purified, and transfected into lymphocytes stimulated by LPS. siRNA was transcribed by cellular endogenous RNA polymerase III and then evoke the degradation of target mRNA. After 48 hours of transfection, the cell culture supernatant was collected and the concentration of IL-1 $\alpha$  was assayed using ELISA. **RESULTS:** Compared with blank-control and negative-control, selected sequence decreased the expression of IL-1 $\alpha$ . Rate of the suppression was about 15%. **CONCLUSION:** RNAi technology produces specific interference effect in mouse spleen lymphocytes in original culture and inhibits the excretion of IL-1 $\alpha$ .

**[KEY WORDS]** RNA interference; Post-transcriptional gene silencing; Interleukin-1; Lymphocytes

白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)是一种非常活跃的细胞因子。目前已知与 IL-1 有关的疾病有: 感染性疾病、自身免疫性疾病和移植排斥反应等。由 19-21 个核苷酸组成的双链小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 能够在 mRNA 水平特异性地封闭相应基因的表达, 具有介导哺乳动物细胞基因沉默的强大功能<sup>[1]</sup>。该技术已在研究信号转导、病毒防治以及肿瘤基因治疗等方面得到了成功应用<sup>[2-4]</sup>。本研究利用体内转录法生成的 siRNA, 特异性阻断 IL-1 $\alpha$  分子的表达, 以令其在一定程度上抑制其活性作用, 以期在 IL-1 相关疾病的治疗提供新策略。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

用体重 20 g 的雄性 C<sub>57</sub>BL/6 纯系鼠, 购自中国医科大学动物部。

### 2 试剂

脂多糖(lipopolysaccharides, LPS, Sigma), Silence Gene™ U<sub>6</sub> 盒 RNA 干扰系统试剂盒(Promega), 小鼠 IL-1 $\alpha$  定量 ELISA 试剂盒(上海森雄生物公司), DMEM 及转染试剂(Invitrogen)。

### 3 方法

**3.1 脾淋巴细胞的分离培养及分组** 实验前 6 h,

[收稿日期] 2006-04-28 [修回日期] 2006-06-09

\* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30271444)

△通讯作者 E-mail: hpzhangsq@yahoo.com

给予小鼠腹腔注射 10 mg/L 的 LPS 1 mL,刺激脾淋巴细胞分泌 IL-1 $\alpha$ 。实验时颈椎脱臼法处死小鼠,无菌下剖腹取脾,研磨、离心后制成脾细胞悬液。经淋巴细胞分层液分离,提取单层淋巴细胞,用不含抗生素和血清的 DMEM 培养液制成细胞悬液,调细胞密度  $1 \times 10^8$  cells/L,接种于 96 孔板。培养细胞分为 3 组:干扰组、对照组和无关干扰组。干扰组转染针对 IL-1 $\alpha$  的 siRNA 表达体;无关干扰组转染非同源 siRNA 表达体(将靶位点基因序列打乱,保持碱基数目不变)。对照组给予 DMEM 培养液。转染后 48 h 收集细胞培养上清,ELISA 法检测 IL-1 $\alpha$  的浓度(每组样品做 6 个复孔)。

**3.2 siRNA 序列的设计** 选择靶标序列应考虑的因素有:序列大小为 19-21nt,  $U_6$  聚合酶倾向于从 G 开始,因此靶标序列最好是 5' GN<sub>17</sub> C3'; 选取目的基因起始密码子下游 100 bp 和终止密码子上游 100 bp 之间的序列,经 BLAST 比对以确保序列的特异性;GC 含量最好在 40% - 60%。根据以上原则选择编码靶标 RNA 的基因序列为 5' - GCAAGCTATG-GCTCACTTC - 3'。

**3.3 设计合成下游 DNA 引物序列** 对于一个靶位点需要两条下游引物:下游引物 A 和 B。经  $U_6$  表达盒 PCR 扩增后,产物被内源  $U_6$  聚合酶转录,其转录产物是互补的,能够退火形成 siRNA。每一个下游引物应包括 3 部分序列: $U_6$  盒配对序列,在 PCR 反应中,这 23 个附加碱基可使下游引物结合到  $U_6$  盒上;靶标序列及其互补序列; $U_6$  终止子序列,可使  $U_6$  聚合酶在 3' 突出处停止。序列如下:引物 A: 5' - CAAAACTGTAAAAA - GCAAGCTATGGCTCACTTC - GGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGA - 3'; 引物 B: 5' - CAAAACTGTAAAAA - GAAGTGAGCCATAGCTTGC - GGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGA - 3'。所有引物均由上海生工公司合成。PCR 反应体系组成依照试剂盒说明,扩增条件为 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 65  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 40 个循环。扩增产物经 Silence Gene<sup>TM</sup> PCR DNA 纯化系统纯化后准备转染。

**3.4 转染混合的纯化产物** Silence Gene<sup>TM</sup> 转染试剂稀释后与 DNA 混合物按比例形成转染试剂/DNA 复合物,转染淋巴细胞,和细胞彻底混匀,培养 48 h 后分别收集各组上清液。

**3.5 siRNA 抑制效果测定** ELISA 法测定上清液中 IL-1 $\alpha$  浓度。

**4 统计学处理**

数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,数据处理采用 SPSS 11.5 软件,组间比较行单因素方差分析。

**结 果**

**1 siRNA 表达盒扩增产物的电泳鉴定**

靶位点及阴性对照位点经两次 PCR 扩增反应后都分别产生一个反义和一个有义的表达盒,2% 琼脂糖电泳分析产物大小约为 300 bp,见图 1。

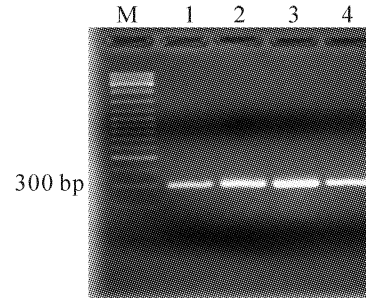


Fig 1 Agarose gel electrophoresis (2%) of PCR amplification product. M: marker ; 1: siRNA - A; 2: siRNA - B; 3: siRNA - co - A; 4: siRNA - co - B.

图 1 2%琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 扩增产物

**2 针对靶位点的 siRNA 对 IL-1 $\alpha$  浓度的影响**

干扰组 IL-1 $\alpha$  的分泌量明显低于对照组及无关干扰组 ( $P < 0.05$ ),从而实现了利用 RNA 干扰技术调控 IL-1 $\alpha$  表达的目的,见表 1。

表 1 RNA 干扰作用对小鼠脾淋巴细胞分泌 IL-1 $\alpha$  的影响  
Tab 1 The effect of RNA interference to the secretion of IL-1 $\alpha$  in mice spleen lymphocytes ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Group	IL-1 $\alpha$ (ng/L)
Control	25.01 $\pm$ 1.54
siRNA	21.19 $\pm$ 1.11*
siRNA-co	24.98 $\pm$ 1.07

\*  $P < 0.05$  vs control and siRNA-co.

**3 RNA 干扰作用的序列特异性**

无关干扰组 IL-1 $\alpha$  的分泌量与对照组无明显差异,见表 1。

**讨 论**

目前认为,细胞因子网络激活在诸多疾病的发生发展过程中具有十分重要的作用,特别是在免疫功能紊乱所致的各种疾病中。其中淋巴细胞激活及其产生的各种细胞因子的作用尤为显著。而 IL-1 是启动淋巴细胞-细胞因子网络激活的重要因素之一。因此,调节 IL-1 的表达对调控淋巴细胞-细胞因子网络具有十分重要的意义。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术是一种高效的抑制基因表达的新途径<sup>[5]</sup>。目前应用 RNAi 已经获得了满意的基因表达抑制效果<sup>[6]</sup>。但是,该技术在某些方面的应

用仍存在一定限制。例如, RNAi 多应用于分裂增殖旺盛的细胞, 特别是应用在肿瘤细胞上, 干扰某些致癌基因的表达, 从而达到肿瘤基因治疗的目的<sup>[7]</sup>。另外, RNAi 还多用于病毒性疾病的研究, 抑制病毒的复制<sup>[8]</sup>。而应用 RNAi 对淋巴细胞及其分泌的细胞因子进行干扰, 却鲜有报道<sup>[9]</sup>。因为, 无论是肿瘤细胞还是病毒, 它们都具有很强的分裂增殖能力。而淋巴细胞的增殖需要很多活化因子的刺激, 在正常情况下几乎是不分裂增殖的。因此针对淋巴细胞进行 RNAi 研究要困难的多。

有鉴于此, 本研究利用体外合成、体内转录法生成的 siRNA, 在脂质体<sup>[10]</sup>介导下转染经 LPS 激活的小鼠脾淋巴细胞, 观察对 IL-1 $\alpha$  分泌的影响。结果表明: 转染后 48 h 的 ELISA 检测显示干扰组 IL-1 $\alpha$  的浓度明显低于对照组及无关干扰组 ( $P < 0.05$ )。同时, 与干扰组 siRNA 核苷酸种类一致但序列随机的阴性对照 siRNA 未引起 IL-1 $\alpha$  基因沉默作用。此结果证实了应用 RNAi 技术可以在培养的小鼠脾淋巴细胞中, 在转录后水平上特异性的抑制 IL-1 $\alpha$  的分泌。为今后应用 RNAi 调节淋巴细胞分泌的细胞因子的表达及其相关疾病的治疗等方面提供了新途径。

#### [参 考 文 献]

- [1] Tuschl T, Borkhardt A. Small interfering RNAs : a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy[J]. Mol Interv, 2002, 2(3):158-167.
- [2] Sijen T, Plasterk RH. Transposon silencing in the caenorhabditis elegans germ line by natural RNAi [J]. Nature, 2003, 426(6964):310-314.
- [3] Stram Y, Kuzntzova L. Inhibition of viruses by RNA interference[J]. Virus Genes, 2006, 32(3):299-306.
- [4] Narayanan BA, Narayanan NK, Davis L, et al. RNA interference - mediated cyclooxygenase - 2 inhibition prevents prostate cancer cell growth and induces differentiation: modulation of neuronal protein synaptophysin, cyclin D1, and androgen receptor[J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(5):1117-1125.
- [5] Hannon GJ. RNA Interference [J]. Nature, 2002, 418(6894):244-251.
- [6] Sorensen DR, Leirdal M, Sioud M. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice [J]. J Mol Biol, 2003, 327(4):761-766.
- [7] Mulkeen AL, Silva T, Yoo PS, et al. Short interfering RNA - mediated gene silencing of vascular endothelial growth factor: effects on cellular proliferation in colon cancer cells[J]. Arch Surg, 2006, 141(4):367-374.
- [8] Kusov Y, Kanda T, Palmenberg A, et al. Silencing of hepatitis A virus infection by small interfering RNAs[J]. J Virol, 2006, 80(11):5599-5610.
- [9] Xu KL, Zhang Y, Pan XY. Inhibiting the expression of CD28 costimulatory molecule on human lymphocytes by special siRNA[J]. Chin Med J (Engl), 2005, 118(6):480-486.
- [10] Mbawuiké, Zhang YX, Wang Y, et al. Cationic liposome - mediated enhanced generation of human HLA - restricted RSV - specific CD8<sup>+</sup> CTL [J]. J Clin Immunol, 2002, 22(3):164-175.