

慢病毒介导的 TGFβ-R2 shRNA 抑制人 LECs 细胞 TGFβ-R2 的表达

李 贞, 徐 庆, 张 慧

基金项目:上海市卫生局青年科研项目(No. 2009Y126)
作者单位:(200083)中国上海市,上海建工医院眼科
作者简介:李贞,女,主治医师,研究方向:白内障。
通讯作者:李贞. eadyli@126.com
收稿日期:2013-10-08 修回日期:2013-12-09

Inhibition of lentivirus-TGFβ-R2 shRNA on the expression of TGFβ-R2 in human lens epithelial cells

Zhen Li, Qing Xu, Hui Zhang

Foundation item: Shanghai Municipal Health Bureau Youth Projects (No. 2009Y126)
Department of Ophthalmology, Shanghai Jiangong Hospital, Shanghai 200083, China
Correspondence to: Zhen Li. Department of Ophthalmology, Shanghai Jiangong Hospital, Shanghai 200083, China. eadyli@126.com
Received: 2013-10-08 Accepted: 2013-12-09

Abstract

• AIM: To observe the suppressing effect of specific small hairpin RNA (shRNA) on TGFβ-R2 expression in human lens epithelial cells (LECs).
• METHODS: Specific shRNA expression vector was constructed according to the design principles of TGFβ-R2 mRNA human GeneBank siRNA synthesis and transfected into cultured 293T with TGFβ-R2 over expression vector. After effective RNAi vector was selected by Western blot, then amplification, purification, and titration. lentivirus-TGF beta - R2 shRNA was transfected into LECs, then TGFβ-R2 mRNA expression in these cells was detected by the real-time fluorescence quantitative PCR detecting system (qPCR).
• RESULTS: TGFβ - R2/GV115RNAi # 1 target gene expression knockdown effect is the most obvious; the titer of packaging lentivirus is 8E+8 TU/mL; the knockdown effect is significant, the interfering efficiency is 78.1% ($P < 0.05$).
• CONCLUSION: TGFβ-R2 RNAi vector was successfully constructed, and can inhibit the expression of TGFβ-R2 mRNA in human LECs.
• KEYWORDS: human lens epithelial cells; TGFβ - R2; siRNA

Citation: Li Z, Xu Q, Zhang H. Inhibition of lentivirus-TGFβ-R2 shRNA on the expression of TGFβ-R2 in human lens epithelial cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(1):9-12

摘要

目的:观察转化生长因子β-R2特异性短发夹RNA(shRNA)对人晶状体上皮细胞TGFβ-R2表达的影响。
方法:根据小干扰RNA(siRNA)的设计原则,针对转化生长因子β-受体2基因序列特征构建特异性shRNA(RNAi)载体,与TGFβ-R2过表达载体共转染293T细胞,经Western blot筛选出有效RNAi载体后,进行扩增、纯化、滴度测定,并转染培养的人LECs,qPCR检测TGFβ-R2 siRNA慢病毒载体对TGFβ-R2 mRNA表达的影响。
结果:经Western blot筛选,TGFβ-R2/GV115RNAi#1对目的基因的表达敲减效果最明显,慢病毒包装,滴度为8E+8 TU/mL,感染人LECs细胞后,对TGFβ-R2基因有显著的敲减效果,达到78.1% ($P < 0.05$)。
结论:TGFβ-R2 RNAi载体构建成功,并且能抑制人晶状体上皮细胞TGFβ-R2 mRNA的表达。
关键词:人晶状体上皮细胞;TGFβ-R2;小干扰RNA
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.01.03

引用:李贞,徐庆,张慧.慢病毒介导的TGFβ-R2 shRNA抑制人LECs细胞TGFβ-R2的表达.国际眼科杂志2014;14(1):9-12

0 引言

后发性白内障的发生主要是白内障术后赤道部残留的晶状体上皮细胞(LECs)迁移、增殖、分化,最终转化为成纤维细胞,不断增殖的成纤维细胞促使晶状体后囊膜混浊,这一过程叫做LECs间充质化(EMT)。目前已有研究证实TGF-β参与了体内晶状体上皮的这一EMT过程^[1],因此如果干扰TGFβ-R2在LECs中的表达,使其低表达或沉默,将阻断TGF-β调控的LECs的EMT过程,从而减低后囊膜混浊(PCO)的发生。本研究设计并合成针对TGF-β的结合受体TGFβ-R2的小干扰RNA(siRNA),克隆入真核表达载体,并检测其对LECs的TGF-βR敲减效果,为进一步使用RNA干扰方法预防和治疗PCO提供有力工具。

1 材料和方法

1.1 材料 1kp DNA ladder Marker(Fermentas公司), 250bp DNA ladder Marker(捷瑞公司),限制性内切酶(NEB公司),In-Fusion™ PCR Cloning Kit(clontech),Taq polymerase(SinoBio),dNTP(Takara),Primer(捷瑞生物),Plasmid 抽提 Kit(Promega),PCR仪(Applied Biosystems),positive clone 测序(美季生物),GV115载体、Lentivirus载体(吉凯基因),BCA Protein Assay Kit(HyClone-Pierce),Opti-MEM、Lipofectamine 2000(Invitrogen),CO₂培养箱(日本三洋SANYO),高速离心机(日立),荧光显微镜(奥林巴斯),TGFβ-R2过表达慢病毒载体由我们前期实验构建。

表1 RNAi 核苷酸序列构建框架

No.	5'	STEM	Loop	STEM	3'
TGFβ-R2/GV115RNAi#1-a	Ccgg	GCAGAACACTTCAGAGCAGTT	CTCGAG	AACTGCTCTGAAGTGTCTGTC	TTTTTg
TGFβ-R2/GV115RNAi#1-b	aattcaaaaa	GCAGAACACTTCAGAGCAGTT	CTCGAG	AACTGCTCTGAAGTGTCTGTC	
TGFβ-R2/GV115RNAi#2-a	Ccgg	GCAAGATACATGGCTCCAGAA	CTCGAG	TTCTGGAGCCATGTATCTTGC	TTTTTg
TGFβ-R2/GV115RNAi#2-b	aattcaaaaa	GCAAGATACATGGCTCCAGAA	CTCGAG	TTCTGGAGCCATGTATCTTGC	
TGFβ-R2/GV115RNAi#3-a	Ccgg	CTTCTACTGCTACCGCGTTAA	CTCGAG	TTAACGCGGTAGCACTAGAAG	TTTTTg
TGFβ-R2/GV115RNAi#3-b	aattcaaaaa	CTTCTACTGCTACCGCGTTAA	CTCGAG	TTAACGCGGTAGCACTAGAAG	
TGFβ-R2/GV115RNAi#4-a	Ccgg	GTCCGTTTGTCTGAGGTCTATA	CTCGAG	TATAGACCTCAGCAAAGCGAC	TTTTTg
TGFβ-R2/GV115RNAi#4-b	aattcaaaaa	GTCCGTTTGTCTGAGGTCTATA	CTCGAG	TATAGACCTCAGCAAAGCGAC	
TGFβ-R2/GV115RNAi#5-a	Ccgg	CCTGACTTGTCTAGTCATA	CTCGAG	TATGACTAGCAACAAGTCAGG	TTTTTg
TGFβ-R2/GV115RNAi#5-b	aattcaaaaa	CCTGACTTGTCTAGTCATA	CTCGAG	TATGACTAGCAACAAGTCAGG	

1.2 方法

1.2.1 RNAi 载体的制备 根据小干扰 RNA (siRNA) 的设计原则,设计 5 条不同序列的针对 TGFβ-R2 基因的 shRNA (表 1),并设空载自连对照组,将合成的每对双链连入经 AgeI, EcoRI 酶切后的线性化 GV115 载体上,连接产物转入感受态细胞,PCR 鉴定阳性重组子后,送测序验证。PCR 引物:Primer (+): CCATGATTCTTCATATTTG; Primer (-): CGCGTGGATAACCGTATTAC。

1.2.2 Western blot 筛选有效 RNAi 载体 按照 Invitrogen Lipofectamine 2000 使用说明将 TGFβ-R2shRNA 载体与 TGFβ-R2 过表达载体共同转染 293T 细胞,分两组进行,两组过表达质粒量均为 0.80μg,1 组 RNAi 质粒量为 0.20μg,2 组 RNAi 质粒量为 0.40μg。并设立空白对照 (不转染任何质粒的 293T 细胞)及阴性对照组 (共转染过表达质粒和阴性对照病毒载体质粒的 293T 细胞)。转染 48h 后收集细胞进行 Western blot 检测, TGFβ-R2 蛋白大小 91kDa,筛选出有效 TGFβ-R2shRNA 载体进入下游实验。

1.2.3 RNAi 慢病毒包装及滴度测定 将 TGFβ-R2shRNA 载体转染 293T 细胞,48h 后收集细胞上清液,纯化后将病毒浓缩液移出,分装后保存在病毒管中,-80℃ 长期保存。取其中一支荧光法测定滴度。

1.2.4 Real time PCR 检测人 LECs 细胞中 TGFβ-R2 的表达 体外分离并培养人 LECB3P2 细胞,以 TGFβ-R2shRNA 慢病毒进行转染,3d 后荧光显微镜观察慢病毒上报告基因 GFP 的表达情况,并收集细胞行 qPCR 检测 TGFβ-R2 的 RNA 表达量,计算基因敲除效率,实验重复 3 遍。GAPDH 上游引物 TGACTTCAACAGCGACACCCA,下游引物 CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA,产物 121bp, TGFβ-R2 上游引物 GTGCCAACAAACATCAACC,下游引物 GACTGCC ACTGTCTCAAACCT,产物 137bp。

统计学分析:数据经 SPSS 11.5 行统计学处理,行 t 检验, P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 RNAi 慢病毒载体的制备 阳性克隆 PCR 鉴定,连接入 vshRNA 片段的阳性克隆 PCR 片段大小应为 343bp,没有连接入 shRNA 片段的空载体克隆 PCR 片段大小应为 307bp。各组 250~500bp 之间均可见明显条带,与目的基因大小相符 (图 1)。阳性克隆测序结果经 GeneBank BLAST 分析证实 DNA 插入序列与所设计的 RNAi 序列完全一致。

2.2 Western blot 筛选有效 RNAi 载体 从 Western blot 结果可以看出,其中 KD1 (TGFβ-R2/GV115RNAi#1)、KD4 (TGFβ-R2/GV115RNAi#4)、KD5 (TGFβ-R2/GV115RNAi#5)

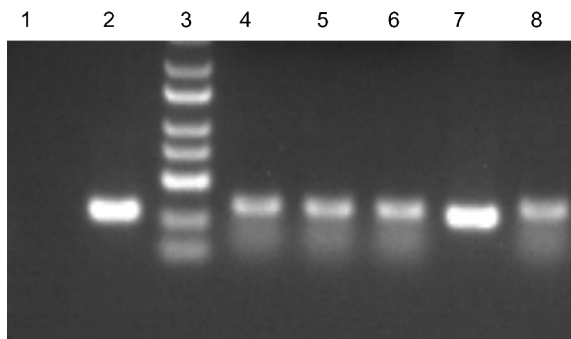


图1 RNAi#1 转染子鉴定结果 1:阴性对照 (ddH₂O);2:阴性对照 (空载自连对照组);3:Marker 自上而下依次为 5kb,3kb,2kb,1.5kb,1kb,750bp,500bp,250bp,100bp;4~8:TGFβ-R2/GV115RNAi#1 转染子。

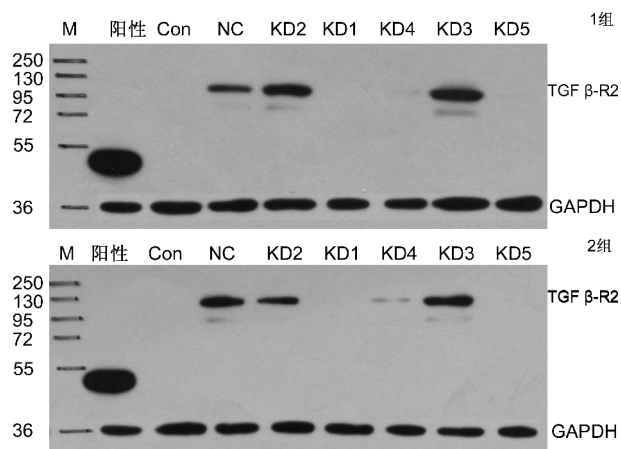


图2 Western blot 外源筛选有效 RNAi 靶点 M:Marker;阳性:WB 标准品 (分子大小 48kDa);Con:不转染任何质粒的 293T 细胞组 (空细胞组);NC:共转染过表达质粒和阴性对照病毒载体质粒细胞组 (阴性对照组);KD:共转染过表达质粒和 RNAi 病毒载体质粒细胞组。

3 组在高 RNAi 组及低 RNAi 组中 91kDa 附近处未见特征条带,因此这三组对目的基因的表达有敲减作用,是有效靶点 (图 2)。其中 TGFβ-R2/GV115RNAi#1, TGFβ-R2/GV115RNAi#5 靶点对目的基因的表达敲减效果明显,我们选择 TGFβ-R2/GV115RNAi#1 进入下游实验。

2.3 RNAi 慢病毒滴度测定 根据荧光图片中 GFP 表达情况,在加入 1E-5μL 病毒原液的孔中观察到 8 个带有荧光的细胞 (图 3),则该病毒的滴度为 8/(1E-5)=8E+5 TU/μL=8E+8 TU/mL。

2.4 Real time PCR 检测人 LECs 细胞中 TGFβ-R2 的表达 荧光显微镜观察 TGFβ-R2 shRNA 慢病毒转染人 LECB3P2

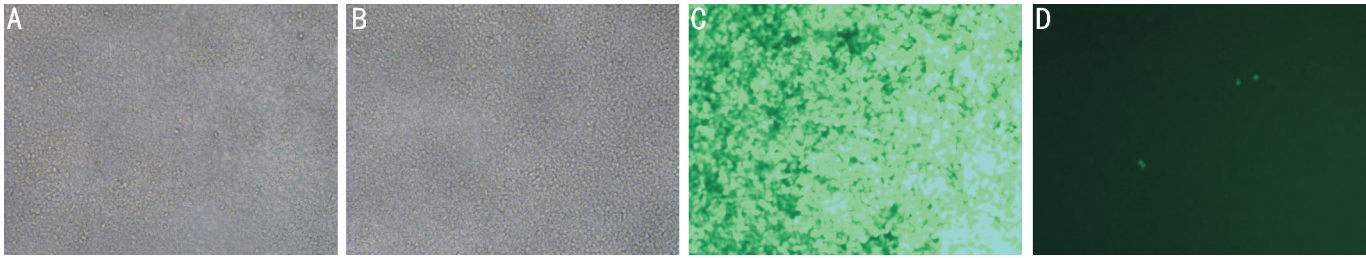


图3 滴度荧光图片($\times 100$) A:样品 1E-0 μ L(明视野);B:样品 1E-5 μ L(明视野);C:样品 1E-0 μ L(荧光视野);D:样品 1E-5 μ L(荧光视野)。

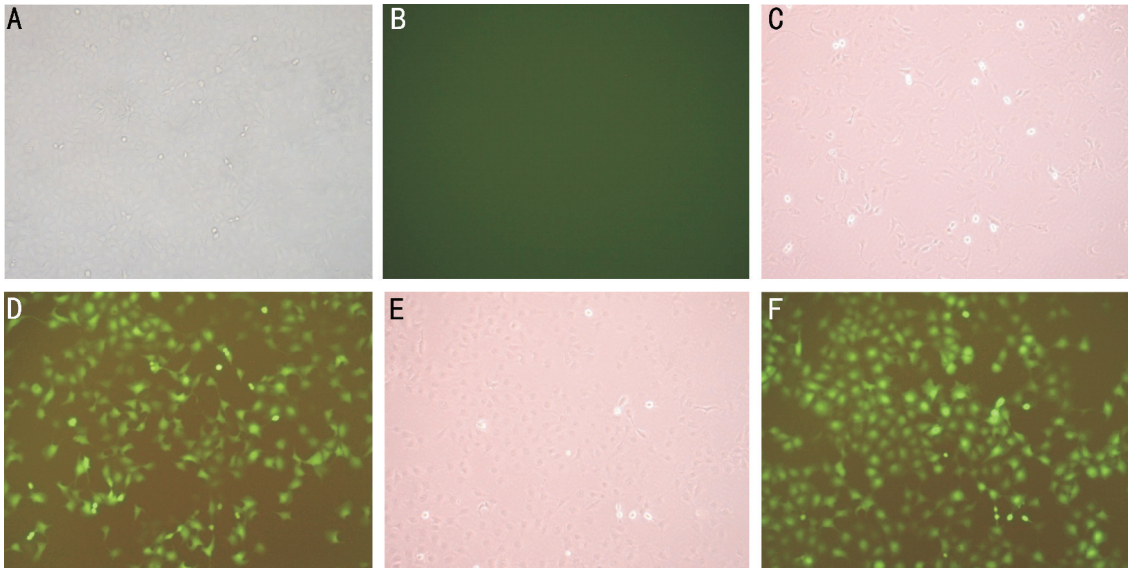


图4 LECB3P2 细胞感染后荧光图片($\times 100$) A:未感染任何病毒细胞组(明视野);B:未感染任何病毒细胞组(荧光视野);C:阴性对照病毒感染细胞组(明视野);D:阴性对照病毒感染细胞组(荧光视野);E:加 TGF β -R2 RNAi 病毒感染细胞组(明视野);F:TGF β -R2 RNAi 病毒感染细胞组(荧光视野)。

表2 Real time PCR 结果 Ct 值及数据分析

样品	GAPDH Ct 值	TGFBR2 Ct 值	Δ Ct	$-\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}
CON	13.613 \pm 0.025	22.350 \pm 0.040	8.737 \pm 0.056	-0.010 \pm 0.056	0.994 \pm 0.038
NC	13.817 \pm 0.015	22.543 \pm 0.047	8.727 \pm 0.055	0.000 \pm 0.055	1.000 \pm 0.038
KD	13.767 \pm 0.040	24.687 \pm 0.025	10.920 \pm 0.017	-2.193 \pm 0.017	0.219 \pm 0.003

注: Δ Ct=TGFBR2 Ct 值-GAPDH Ct 值; $-\Delta\Delta$ Ct=NC 组 Δ Ct 平均值-各样品 Δ Ct; $2^{-\Delta\Delta$ Ct 反映各样品相对 NC 组样品 TGFBR2 的相对表达水平。

细胞后,以绿色荧光显微镜观察结果(图4),LECB3P2 细胞胞质中有明显的绿色荧光表达,表明包含 TGF β -R2 shRNA 的慢病毒在 LECB3P2 细胞中成功表达。从定量 PCR 结果(表2)可以看出,LECB3P2 细胞中,KD 组 TGF β -R2 相对表达量为 0.219 \pm 0.003,与 NC 组 1.000 \pm 0.038 相比,二者差异具有显著统计学意义($P=0.000757799<0.05$),因此该慢病毒介导的 TGF β -R2 siRNA 对 TGF β -R2 基因有显著的敲减效果,即干扰效率为 78.1%(图5)。

3 讨论

转化生长因子 β (TGF β)是一类促进细胞生长和转化的多功能细胞因子,在免疫功能、胚胎发育、癌发生、组织应答、细胞的增殖分化、胞外基质的形成降解以及细胞移行等方面发挥着重要的调节作用^[2],在眼组织创伤后的修复中发挥着重要作用^[3]。TGF β 通过与细胞表面受体结合发挥其调节作用,TGF β 受体有 I, II, III 型 3 种形式,其中 I 型、II 型受体为跨膜蛋白,具有丝氨酸/苏氨酸激酶区^[4],III 型受体(TGF β -R3)是一种膜固定蛋白,缺乏蛋白

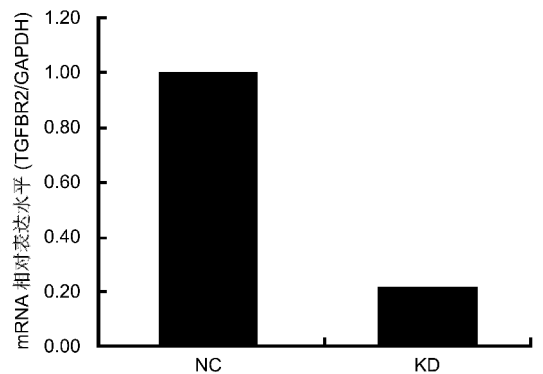


图5 KD 组相对 NC 组的 TGF β -R2 的相对表达水平结果统计图。

激酶区域,本身不参与信号转导,主要功能是将 TGF β 吸引至细胞周围并呈递于 II 型受体(TGF β -R2)^[5,6]。TGF β -R2 是主要的信号转导受体,能直接与游离配体 TGF β 或 TGF β -R3 结合,启动整个信号传导通路,结合配体的 TGF β -R2 连接并磷酸化 I 型受体(TGF β -R1),TGF β -R1

再磷酸化下游底物 Smad 蛋白,激活的 Smad2,Smad3 与共同的介质 Smad4 转移至核内发挥重要的基因调节作用^[7,8]。综上所述,TGFβ-R2 在上述信号途径中起至关重要的作用,是 TGFβ 发挥其调节作用的中心环节。

白内障术后,囊袋上残留的柱状晶状体上皮细胞经历 EMT 过程,形态发生改变,转分化为表达 aSMA 的成纤维细胞,并表达细胞外基质和基质降解酶,导致囊袋浑浊收缩,光学透明度降低以及人工晶状体移位,最终导致患者视力再次下降。研究发现单纯的外伤和 TGF-β 两者一起或单独刺激都可诱导 LECs 发生 EMT,此外不管是通过调控相关基因或直接眼内注射 TGF-β,还是在培养的 LECs 中加入 TGF-β,均能诱导 LECs 发生 EMT^[9-11]。进一步实验发现白内障术后 LECs 的 EMT 过程与 TGF-β 介导的 EMT 过程类似,均使 LECs 最终转变为成纤维细胞^[10]。因此抑制或调整 TGFβ-R2 的表达从而阻断 TGFβ-R2 信号转导途径,可能为后发性白内障的预防及治疗提供新的途径和策略。

为了研究 RNA 干扰 TGFβ-R2 对晶状体细胞间充质化的抑制作用,本研究设计了 5 条 shRNA 序列,并成功构建了 TGFβ-R2 的 RNA 干扰质粒,Western Blot 结果可以看出,TGFβ-R2/GV115RNAi#1 组在 91KD 处未见任何条带,为最有效的干扰质粒,因此我们选择 TGFβ-R2/GV115RNAi#1 进行了大量的病毒包装纯化。TGFβ-R2 siRNA 慢病毒载体转染人 LEC 细胞后,TGFβ-R2 的相对表达量仅为阴性对照组的 21.9%,基因敲减达 78.1%,进一步证实 TGFβ-R2 siRNA 慢病毒载体构建成功,可以进入后续实验,我们将在下一步的研究中证实干扰效应实现的同时是否对 LECs 细胞表型产生影响,本实验结果为进

一步研究针对 TGFβ-R2 的 RNA 干扰技术对体外晶状体细胞间充质化的抑制作用以及对体内后发性白内障的预防及治疗作用奠定了实验基础。

参考文献

- 1 Srinivasan Y, Lovicu FJ, Overbeek PA. Lens-specific expression of transforming growth factor β1 in transgenic mice causes anterior subcapsular cataracts. *J Clin Invest* 1998;101(3):625-634
- 2 Mauviel A. Transforming growth factor-beta: a key mediator of fibrosis. *Methods Mol Med* 2005;117:69-80
- 3 Saika S. TGFbeta pathobiology in the eye. *Lab Invest* 2006;86(2):106-115
- 4 de Caestecker M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15(1):1-11
- 5 Massague J. TGF beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998;67:753-791
- 6 徐巍华,盛耀华. TGF-β 抑制剂研究及眼科应用进展. *国际眼科杂志* 2009;9(3):138-141
- 7 Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113(6):685-700
- 8 ten Dijke P, Goumans MJ, Itoh F, et al. Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol* 2002;191(1):1-16
- 9 Marcantonio JM, Syam PP, Liu CS, et al. Epithelial transdifferentiation and cataract in the human lens. *Exp Eye Res* 2003;77(3):339-346
- 10 Saika S, Okada Y, Miyamoto T, et al. Smad translocation and growth suppression in lens epithelial cells by endogenous TGFbeta2 during wound repair. *Exp Eye Res* 2001;72(6):679-686
- 11 Lovicu FJ, Schulz MW, Hales AM, et al. TGFbeta induces morphological and molecular changes similar to human anterior subcapsular cataract. *Br J Ophthalmol* 2002;86(2):220-226