

· 论 著 ·

人瘢痕疙瘩成纤维细胞 Smad2 特异 siRNA 的制备和活性鉴定

高中玉¹, 林子豪¹, 汪泽民², 江 华¹, 袁湘斌¹, 赵耀忠¹, 吴 宏¹, 史 毅³, 金由辛^{3*}

(1. 第二军医大学长征医院整形外科, 上海 200003; 2. 第二军医大学长海医院骨科, 上海 200433; 3. 中国科学院上海生物科学院生物化学与细胞生物学研究所分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

[摘要] **目的:**探讨应用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 特异性抑制人瘢痕疙瘩成纤维细胞内 Smad2 基因表达, 筛选高效特异性 siRNA。 **方法:**根据 siRNA 设计原则, 针对人 Smad2 基因序列特征设计 Smad2 特异 siRNA (1-3), 转染瘢痕疙瘩成纤维细胞, RT-PCR 检测 siRNA 对 Smad2 基因的抑制效果。 **结果:**Smad2 siRNA-3 可有效抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞中 Smad2 基因的表达。随 siRNA-3 终浓度由 50 nmol/L 增加到 100 nmol/L 及 200 nmol/L, 抑制效率逐渐增强 ($P < 0.05$); siRNA-3 以终浓度 200 nmol/L 转染后 24 h 抑制效果最强, 48 h 逐渐减弱, 但仍明显抑制 ($P < 0.05$)。 **结论:**应用 RNA 干扰技术可抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞中 Smad2 基因的表达, 其抑制作用具有明显的时间、浓度依赖性。

[关键词] RNA 干扰; Smad2; 瘢痕疙瘩; 成纤维细胞

[中图分类号] R 619.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)01-0034-04

Preparation and characterization of Smad2 specific siRNA in human keloid fibroblast

GAO Zhong-yu¹, LIN Zi-hao¹, WANG Zi-min², JIANG Hua¹, YUAN Xiang-bin¹, ZHAO Yao-zhong¹, WU Hong¹, SHI Yi³, JIN You-xin^{3*} (1. Department of Plastic Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Orthopaedics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433; 3. State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Science, Shanghai 200031)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the inhibition effect of Smad2 specific small interfering RNA (siRNA) on Smad2 gene expression in human keloid fibroblast, searching for the most efficient Smad2 specific siRNA. **Methods:** According to the principle of siRNA design, Smad2 specific siRNA (1-3) was designed and the keloid fibroblast were transfected. The level of Smad2 expressions were detected using semi-quantity RT-PCR. **Results:** Endogenous Smad2 expression were efficiently blocked in keloid fibroblast by Smad2 siRNA-3 in a dose- and time-dependent manner. Smad2 expression decreased significantly along with the increase of siRNA-3 dose within 50-200 nmol/L and was the lowest 24 h after transfection with 200 nmol/L siRNA-3. **Conclusion:** The expression of Smad2 in keloid fibroblast can be blocked efficiently in a dose- and time-dependent manner by specific siRNA.

[KEY WORDS] RNA interference; Smad2; keloid; fibroblast

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(1):34-37]

瘢痕疙瘩是皮肤创伤后典型的纤维化病理改变, 以成纤维细胞过度增生和细胞外基质的异常积聚为特征区别于增生性瘢痕。其造成的外形破坏和功能障碍乃是目前整形治疗中亟待解决的难题。研究表明: 瘢痕疙瘩与遗传、免疫、激素、成纤维细胞、细胞外基质、细胞因子等诸多因素有关。其中异质成纤维细胞对促瘢痕形成的细胞因子刺激的反应性增高, 被认为是瘢痕疙瘩发病的重要机制。因此, 对主要的促瘢痕形成细胞因子的信号转导进行研究, 揭示其调控机制的异常, 就有可能揭示成纤维细胞异质性和瘢痕疙瘩形成的机制。研究表明 RNA 干扰 (RNA interfering, RNAi) 是真核生物中普遍存在的抵抗病毒入侵、抑制转座子活动、调控基因表达

的监控机制。尤其是一种可应用于哺乳动物研究的, 称为短干扰或小干扰 RNA (siRNA) 的出现, 进一步拓宽了 RNAi 在基因功能、信号转导、基因治疗、抗肿瘤治疗、抗病毒治疗等方面的应用^[1,2]。siRNA 是 RNAi 的起始诱导物, 它引导 RNA 诱导沉默复合物与互补的 mRNA 分子结合, 降解 mRNA 靶分子, 抑制细胞内相应的靶 mRNA 编码蛋白质的合成。转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 是已知的与瘢痕过度形成关系最为密切的细胞因子^[3]。Smad 蛋白家族是 TGF- β

[基金项目] 国家自然科学基金 (30300369; 004119065)。

[作者简介] 高中玉 (1976-), 男 (汉族), 博士。

* Corresponding author. E-mail: yxjin@sunm.shenc.ac.cn

受体下游信号蛋白, R-Smads(Smad2, Smad3)作为膜受体和靶基因之间的关键桥梁,在 TGF- β 1 信号转导通路中发挥了核心的作用。我们尝试设计应用 Smad2 特异 siRNA 抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞内 Smad2 基因,为进一步明确 Smad2 在瘢痕疙瘩等纤维化疾病发生中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 PBS 缓冲液、0.05%胰蛋白酶-EDTA、DMEM 培养液、100 U/ml 青霉素、胎牛血清均为 Gibco/BRL 公司产品;新生牛血清为杭州四季青公司产品;Dispase II 分离酶为 Brehringer Mannheim 公司产品;I 型胶原酶: Washington 公司产品;Oligofectamine™ Reagent: Invitrogen life technologies 产品;Opti-MEM® 培养液: Gibco/BRL 公司产品。

1.2 瘢痕疙瘩成纤维细胞原代培养 整形外科手术中切取的新鲜瘢痕疙瘩数块,无菌条件下用 0.05%醋酸氯己定清洗、消毒约 5 min 后,去除皮下组织,0.5% Dispase II 4℃消化过夜,分离表皮和真皮,真皮部分用 0.1% I 型胶原酶 37℃消化 4 h,用 DMEM 在 5% CO₂、37℃培养获得瘢痕疙瘩成纤维细胞,待细胞 70%~80%汇合生长时,0.05%的胰蛋白酶-EDTA 消化传代,取第 4~5 代细胞进行转染实验。

1.3 Smad2 siRNA 设计、合成 根据人 Smad2 基因(No. BC014840)序列特征,依照 siRNA 的设计原则^[4],由本实验室设计并合成 3 对 Smad2 siRNA。siRNA-1: 正义 5'-GAU CUU CAA CAA CCA GGA AdTdT-3',反义 5'-UUC CUG GUU GUU GAA GAU CdTdT-3'; siRNA-2: 正义 5'-GCC GUC UAU CAG CUA ACU AdTdT-3',反义 5'-UAG UUA GCU GAU AGA CGG CdTdT-3'; siRNA-3: 正义 5'-GUA CUC CUU GCU GGA UUG AdTdT-3',反义 5'-UCA AUC CAG CAA GGA GUA CdTdT-3'。

1.4 实验分组 瘢痕疙瘩成纤维细胞转染实验分 2 组:空白对照组,不转染任何 siRNA;Smad2 特异 siRNA 组,转染 Smad2 特异 siRNA。

1.5 转染 瘢痕疙瘩成纤维细胞均等接种于 12 孔板,选生长状态好,达 50%~80%汇合时,更换无血清培养基用于基因转染。siRNA 的准备:用 Opti-

MEM 分别稀释 siRNA 和 Oligofectamine™ Reagent,各自混匀后室温孵育 20 min,以形成 siRNA-脂质体混合物,在无血清条件下分别以不同终浓度(50、100、200 nmol/L)转染细胞。转染后 4 h 添加 10%的胎牛血清,继续培养,于不同时间点提取 RNA 检测目的基因的变化。每组实验重复 3 次。

1.6 半定量 RT-PCR 检测 siRNA 对转染细胞 Smad2 基因的抑制 以 TRIzol 试剂(美国 Gibco 公司)提取瘢痕疙瘩成纤维细胞的总 RNA,以紫外分光光度计检测纯度并定量,RT-PCR 采用两步法试剂盒(日本 TaKaRa 公司),按试剂盒说明进行。引物设计:针对 NCBI GenBank 的人 Smad2 和 β -actin 的 mRNA 序列,排除与人其他基因的同源性后设计、合成引物。Smad2 引物序列:上游 5'-AAA CCC TTA CCA CTA TCA GA-3',下游 5'-CAC TAT CAC TTA GGC ACT CA 3'; β -actin 引物序列:上游 5'-GTG CCA CCA GAC AGC ACT GTG TTG-3',下游 5'-TGG AGA AGA GCT ATG AGC TGC CTG-3'。先 RT 反应获得全长 cDNA 序列,以持家基因 β -actin 为内参照,对样品模板用量标准化,PCR 扩增 Smad2 cDNA。反应体系:2×buffer 20 μ l, dNTP(analog) 4 μ l, MgCl₂ 8 μ l, Smad 2 上、下游引物各 1 μ l, β -actin 上、下游引物各 2 μ l, RT 反应液 10 μ l, AMV Taq 酶 1 μ l, 加 ddH₂O 至总体积为 50 μ l。反应条件:90℃变性 1 min, 56℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min, 反应 30 个循环。以 β -actin 为内参照。

1.7 统计学处理 所有数据均用微软 Excel 软件进行分析,两样本间均数比较行独立样本 *t* 检验,多个样本间比较行单因素方差分析。

2 结果

2.1 瘢痕疙瘩成纤维细胞 Smad2 基因特异 siRNA 的筛选 将 siRNA-1、2、3 分别转染瘢痕疙瘩成纤维细胞,以不加任何 siRNA 的瘢痕疙瘩成纤维细胞做空白对照。转染后 24 h, RT-PCR 结果表明, siRNA-3 以终浓度 200 nmol/L 转染时与对照组相比有明显抑制效果($P < 0.05$),而 siRNA-1、siRNA-2 没有明显抑制效果(图 1)。

2.2 siRNA-3 抑制 Smad2 基因表达的量效关系 siRNA-3 分别以终浓度 50、100 及 200 nmol/L 转染瘢痕疙瘩成纤维细胞,以不加 siRNA-3 的瘢痕疙瘩

成纤维细胞做空白对照。RT-PCR 结果表明, siRNA-3 抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞 Smad2 基因表达存在良好的剂量依赖性, 随 siRNA-3 终浓度增加, 抑制效率增强, 终浓度 100、200 nmol/L 时与对照组相比有明显抑制效果 ($P < 0.05$, 图 2)。

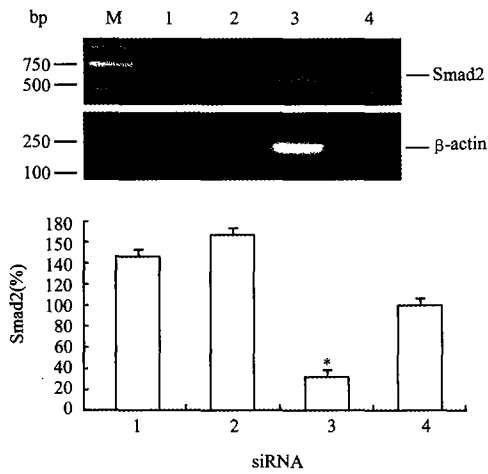


图 1 3 种 siRNA 对 Smad2 基因的不同抑制效果
Fig 1 Different inhibition effect of Smad2 siRNA1-3 on Smad2 expression in keloid derived fibroblast

M: DNA marker; 1: 200 nmol/L siRNA-1;
2: 200 nmol/L siRNA-2; 3: 200 nmol/L siRNA-3;
4: Blank; * $P < 0.05$ vs blank; $n = 3$

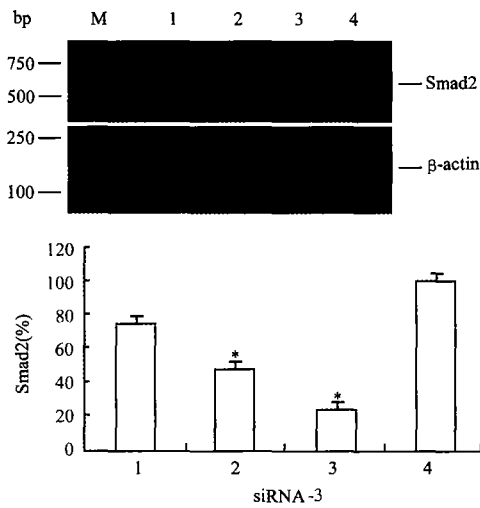


图 2 siRNA-3 转染抑制 Smad2 基因表达的量效关系
Fig 2 Smad2 siRNA-3 transfection inhibiting mRNA levels of Smad2 in a dose-dependent manner

M: DNA marker; 1: 50 nmol/L siRNA-3;
2: 100 nmol/L siRNA-3; 3: 200 nmol/L siRNA-3;
4: Blank; * $P < 0.05$ vs blank; $n = 3$

2.3 siRNA 抑制 Smad2 基因表达的时效关系 根据 siRNA-3 对 Smad2 抑制的量效关系, 为明确 siR-

NA-3 对 Smad2 基因抑制的时效动态变化, 以 200 nmol/L 终浓度 siRNA-3 转染瘢痕疙瘩成纤维细胞, 以不加 siRNA-3 的瘢痕疙瘩成纤维细胞做空白对照。RT-PCR 结果表明, siRNA-3 抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞 Smad2 基因表达存在良好的时间依赖性, 转染后 16 h 就已有轻度抑制效果, 但无统计学差异; 24 h 最强, 同对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$); 48 h 逐渐减弱, 但仍明显抑制 ($P < 0.05$), 见图 3。

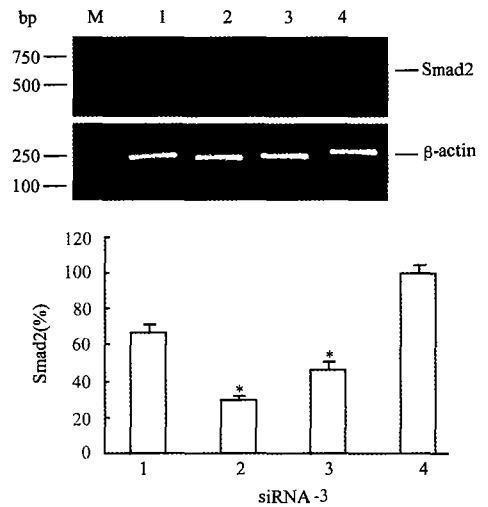


图 3 siRNA-3 转染抑制 Smad2 基因表达的时效关系
Fig 3 Smad2 siRNA-3 transfection inhibiting mRNA levels of Smad2 in a time-dependent manner

M: DNA marker; 1: 16 h, 200 nmol/L siRNA-3;
2: 24 h, 200 nmol/L siRNA-3; 3: 48 h, 200 nmol/L siRNA-3;
4: Blank; * $P < 0.05$ vs blank; $n = 3$

3 讨论

TGF- β 1 是已知的与瘢痕过度形成关系最为密切的细胞因子, 在多种纤维化疾病中存在着 TGF- β 信号转导异常^[5,6]。TGF- β 与细胞膜上受体结合后, 通过 Smads 蛋白调节细胞核内特异基因的表达。正常的创面愈合过程中, TGF- β 1 首先与成纤维细胞膜上的 II 型受体 (T β R2) 结合, TGF- β 1 的构型即发生变化, 从而可被 I 型受体 (T β R1) 识别, 形成 II 型受体-TGF- β 1-I 型受体三聚体复合物。I 型受体即被激活, 进而磷酸化胞质内的受体调节型 Smad, 即 Smad2 和 Smad3, 磷酸化的 Smads (PSmad2, PSmad3) 再与 Smad4 形成异三聚体, 转运到核内, 与核内的转录因子共同作用或独立调控下游特异基因的表达。其中包括激活 I 型、III 型和 VII 型胶原的启动子, 促进胶原的合成。上调 TIMP-1 的

表达,下调 MMP-1 的表达,从而阻断胶原的降解等^[7,8]。当外界信号结束后,PSmads 迅速去磷酸化,胞质和核内的 R-Smads 蛋白也主要通过泛素-蛋白酶体系统迅速代谢而恢复到信号作用前的水平。R-Smads(Smad2,Smad3)作为膜受体和靶基因之间相联系的桥梁,在 TGF- β 1 信号转导通路中发挥了核心的作用。

目前有关 Smads 蛋白与瘢痕疙瘩形成关系研究的文献报道较少。本研究应用 RNA 干扰技术特异抑制瘢痕疙瘩中 Smad2 基因的表达,旨在进一步揭示 Smad2 同瘢痕疙瘩等纤维化疾病发生的确切关系。RNA 干扰是由内源或外源导入与靶基因序列互补的小双链 RNA 引发的转录后基因沉默机制(post transcriptional gene silencing,PTGS)。目前已开始广泛应用于各种细胞生物中特定基因及蛋白功能研究^[9,10]。

我们针对 GenBank 中人 Smad2 基因序列特征依照 siRNA 的设计原则,设计并合成 3 对 Smad2 siRNA1-3。体外基因转染瘢痕疙瘩原代培养成纤维细胞,RT-PCR 结果表明 siRNA-3 抑制效果明显,以终浓度 200 nmol/L 转染时对靶基因的抑制效率接近 80%,而其他两对 siRNA 并无恒定、明显的抑制效果。筛选出 siRNA-3 后,我们进一步通过 RT-PCR 检测 siRNA-3 抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞 Smad2 基因表达时,是否存在剂量、时间依赖性。RT-PCR 结果表明:siRNA-3 抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞 Smad2 基因表达存在良好的剂量、时间相关性,随 siRNA-3 终浓度增加,抑制效率增强;siRNA-3 转染后 16 h 就已有抑制效果,24 h 最强,48h 逐渐减弱,但仍明显抑制。这与文献报道 siRNA 作用特性相符^[11]。

总之,瘢痕疙瘩是现代医学面临的几大难题之一。其中异质成纤维细胞对促瘢痕形成的细胞因子刺激的反应性增高,被认为是瘢痕疙瘩发病的重要机制。TGF- β 1 是已知的与瘢痕过度形成关系最为密切的细胞因子。我们设计并筛选出特异抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞内 Smad2 基因的 siRNA-3,并初步明确其作用的时间、剂量依赖性,为进一步研究

TGF- β 1 信号转导通路中 Smad2 基因在瘢痕疙瘩等纤维化疾病发生中的作用奠定基础。

[参考文献]

- [1] Guo S, Kempfues KJ. Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed[J]. *Cell*, 1995, 81(4): 611-620.
- [2] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811.
- [3] Luo S, Benathan M, Raffoul W, et al. Abnormal balance between proliferation and apoptotic cell death in fibroblasts derived from keloid lesions[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2001, 107(1): 87-96.
- [4] Elbashir SM, Harborth J, Weber K, et al. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs[J]. *Methods*, 2002, 26: 199-213.
- [5] Chin GS, Liu W, Peled Z, et al. Differential expression of transforming growth factor-beta receptors I and II and activation of Smad 3 in keloid fibroblasts[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2001, 108(2): 423-429.
- [6] Mori Y, Chen SJ, Varga J. Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts[J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(7): 1964-1978.
- [7] Verrecchia F, Chu ML, Mauviel A, et al. Identification of novel TGF-beta/Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(20): 17058-17062.
- [8] Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation[J]. *J Invest Dermatol*, 2002, 118(2): 211-215.
- [9] Shi W, Sun C, He B, et al. GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor[J]. *J Cell Biol*, 2004, 164(2): 291-300.
- [10] Koinuma D, Shinozaki M, Komuro A, et al. Arkadia amplifies TGF-beta superfamily signalling through degradation of Smad7 [J]. *EMBO J*, 2003, 22(24): 6458-6470.
- [11] Wang JF, Merle E, Ma LL, et al. Connective tissue growth factor siRNA modulates mRNA levels for a subset of molecules in normal and TGF- β 1-stimulated porcine skin fibroblasts[J]. *Wound Repair Regen*, 2004, 12(2): 205-216.

[收稿日期] 2004-07-15

[修回日期] 2004-09-09

[本文编辑] 贾泽军, 邓晓群