

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00481

慢病毒介导 shRNA 特异性沉默 TLR4 基因对大鼠肺泡巨噬细胞功能的影响

刘 建, 范慧敏, 刘中民*

同济大学医学院附属东方医院心胸外科, 上海 200120

[摘要] **目的** 构建表达大鼠 TLR4 shRNA 的慢病毒, 并观察其对大鼠肺泡巨噬细胞 TLR4 的抑制作用和对内毒素 (LPS) 诱导的 IL-6、IL-1 β 释放的影响。**方法** 设计并构建 4 个可能具有干扰效力的 shRNA 表达质粒, 将他们分别与预先构建好的 TLR4 表达质粒共转染 HEK-293T 细胞, 筛选出一段干扰效果最好的 shRNA, 使用 Gateway 的方法重组到慢病毒表达载体中并进行病毒包装和滴度测定, 使用包装好的慢病毒感染大鼠肺泡巨噬细胞系 NR8383 并加入 LPS 刺激, ELISA 检测 IL-1 β 、IL-6 的释放情况。**结果** 成功筛选出具有较高干扰效率的 shRNA, 并成功包装入慢病毒, 慢病毒滴度为 2.0×10^6 TU/ml。转染慢病毒后的 LPS 诱导的肺泡巨噬细胞 IL-1 β 、IL-6 的释放均明显减少 ($P < 0.05$)。**结论** 成功构建了表达大鼠 TLR4 shRNA 的慢病毒, 具有良好的抑制 IL-1 β 、IL-6 表达的作用, 为下一步动物体内实验基因治疗大鼠肺移植后的慢性排斥反应奠定良好的基础。

[关键词] Toll 样受体 4; RNA 干扰; 慢病毒; 白细胞介素 1 β ; 白细胞介素 6

[中图分类号] R 349.64 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)05-0481-04

Effect of lentivirus expressing TLR4 shRNA on function of rat alveolar macrophage

LIU Jian, FAN Hui-min, LIU Zhong-min*

Department of Cardiovascular and Thoracic Surgery, Shanghai East Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200120, China

[Abstract] **Objective** To construct the replication-incompetent lentivirus expressing rat TLR4 shRNA, and to observe its inhibitory effect on TLR4 expression in alveolar macrophage and on lipopolysaccharide (LPS)-induced release of IL-1 β , IL-6. **Methods** We designed and constructed four shRNA expressing plasmids with silencing effect, then they were co-transfected into HEK-293T cells with the TLR4 eukaryotic vector constructed previously; the best shRNA was selected to be packed into lentivirus; and the titer was determined. The packed lentivirus was used to infect the alveolar macrophage (NR8383) in presence of LPS, and the LPS-induced IL-1 β , IL-6 expression was examined by ELISA. **Results** The best shRNA was successfully screened out and was correctly inserted into the lentivirus. The titer of the recombinant lentivirus was 2.0×10^6 TU/ml. The LPS-induced expression of IL-1 β , IL-6 in the alveolar macrophages was greatly reduced after virus infection ($P < 0.05$). **Conclusion** We have successfully constructed the recombinant lentivirus expressing rat TLR4 shRNA, which has a satisfactory inhibitory effect against expression of IL-1 β , IL-6, paving a way for studying the chronic rejection reaction after rat lung transplantation *in vivo*.

[Key words] Toll-like receptor 4; RNA interference; lentivirus; interleukin-1 β ; interleukin-6

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(5):481-484]

肺移植是当今临床治疗一些终末期肺疾病的重要手段。肺移植中 70% 患者晚期出现慢性肺排斥, 即闭塞性细支气管炎 (obliterative bronchiolitis, OB), 是其主要病死原因^[1]。目前预防免疫排斥的方法就是长期使用免疫抑制药。虽然药物治疗比较有效, 但是药物毒性、慢性排斥疗效差、免疫缺陷 (主要是癌症和感染的发病率明显提高), 仍然是临床上无法解决的问题。抗原呈递细胞 (APC) 在免疫排斥中起到非常重要的作用, 抑制 APC 的激活可以诱导免疫耐受,

Toll 样受体 (如 TLR4) 是 APC 激活通路中的重要环节^[2]。本研究通过构建高沉默效率的大鼠 TLR4 shRNA 的慢病毒, 并使用慢病毒感染大鼠肺泡巨噬细胞系 NR8383, 检测其对 NR8383 功能的影响, 为下一步动物体内实验治疗 OB 奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 大肠杆菌 TOP10、DH5 α 菌株由复旦大学生物医学研究院提供, HEK-293T 细胞、

[收稿日期] 2009-12-28 **[接受日期]** 2010-03-29

[基金项目] 国家自然科学基金 (30772150)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30772150)。

[作者简介] 刘 建, 硕士, E-mail: 4871174@qq.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-38804518, E-mail: frankfan64@hotmail.com

NR8383 细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所。RNA 抽提试剂盒为 Ambion 公司出品; RT-PCR 试剂盒、限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶等为 TaKaRa 公司产品; 质粒纯化试剂盒为 Giagen 公司产品; 大鼠 IL-6 ELISA 试剂盒购自 BD 公司; peyfp-N1 表达质粒、大鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒购自 Ebioscience 公司。LipofectaminTM 2000、miRNA 表达载体 pcDNATM6. 2-GW/EmGFPmiR、慢病毒表达质粒 pLenti6. 3/V5-DEST、病毒包装系统 ViraPowerTM Packaging Mix 为 Invitrogen 公司产品。TLR4 一抗(兔抗大鼠)、 β -actin 一抗(小鼠抗大鼠), 羊抗兔、羊抗小鼠二抗购自 Santa Cruz 公司。

1.2 仪器 DK-8D 电热恒温水浴槽购自上海精宏实验设备有限公司; EPS-300 电泳仪为上海天能科技有限公司产品; PCR 仪购自 Biometra 公司; 显微镜购自 Olympus 公司; 共聚焦荧光显微镜购自 Zeiss 公司; Vicor 3 多标记酶标仪购自 PerkinElmer 公司; 流式细胞仪购自 BD 公司; 移液器、高速离心机为 Eppendorf 公司产品; 低速离心机购自上海医疗器械厂。

1.3 培养液 DMEM、F12K、胎牛血清为 Gibco 公司产品; 胰蛋白胨、酵母提取物购自 Oxoid 公司; 琼脂糖、琼脂粉购自 Difco 公司; 内毒素(LPS)为 Sigma 公司产品。

1.4 TLR4 真核表达载体的构建与鉴定 大鼠 TLR4 基因序列(NM_019178. 1)由 GenBank 获得, 使用 Primer 5.0 引物设计软件设计克隆引物, 上游: 5'-CTA GCT AGC GCC ACC ATG ATG CCT CTC

TTG-3'; 下游: 5'-GGG GTACC TG GGT CAA AGT TGT TGC TTC-3'。按照 Ambion 公司提供的说明书抽提 NR8383 细胞的总 RNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性。紫外分光光度计测定纯度并定量。取 2 μ g RNA 进行反转录反应, 根据 TaKaRa 公司的 M-MLV 操作说明书进行, 使用上面的引物完成 PCR 操作, 产物长度为 2 518 bp, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后使用 PCR 产物回收试剂盒回收, 使用 *Nhe* I、*Kpn* I 对回收产物和 peyfp-N1 分别进行双酶切, 利用酶切后的相同粘端, 用 T₄ DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 将 peyfp-N1 与目的基因连接过夜, 命名为 peyfpN1-TLR4。而后转化 TOP10 感受态细胞, 挑克隆抽提质粒 DNA, 用 *Nhe* I、*Kpn* I 分别酶切, 鉴定正确后再送样(上海 Invitrogen 公司)测序确认。

1.5 TLR4 shRNA 重组质粒的构建 根据 TLR4 基因序列, 使用 <http://ihome.ust.hk/~bokcmho/siRNA/siRNA.html> 在线 shRNA 设计软件设计 4 段可能具有干扰效力的序列, 阴性对照为文献查阅得到的通用序列(表 1)。目的序列退火后两端分别含 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切粘端。先将质粒 pcDNATM6. 2-GW/EmGFPmiR 用 *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切, 利用酶切后的相同粘端, T₄ DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 与退火后的目的基因连接过夜, 而后转化 DH5 α 感受态细胞, 挑克隆抽提质粒 DNA, 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 分别酶切, 鉴定正确后再送样(上海 Invitrogen 公司)测序确认。测序正确后分别命名为 SR77-1、SR77-2、SR77-3、SR77-4、SR-NC。

表 1 设计的 shRNA 序列

Tab 1 Sequences of synthesized oligonucleotides

Name	Sequence (5'-3')
SR77-1 F	TGC TGT ACA GTG GCT ACC ACA AGC ACG TTT TGG CCA CTG ACT GAC GTG CTT GTT AGC CAC TGT A
SR77-1 R	CCT GTA CAG TGG CTA ACA AGC ACG TCA GTC AGT GGC CAA AAC GTG CTT GTG GTA GCC ACT GTA C
SR77-2 F	TGC TGA TAA CTT TCC GGC TCT TGT GGG TTT TGG CCA CTG ACT GAC CCA CAA GAC GGA AAG TTA T
SR77-2 R	CCT GAT AAC TTT CCG TCT TGT GGG TCA GTC AGT GGC CAA AAC CCA CAA GAG CCG GAA AGT TAT C
SR77-3 F	TGC TGT GAT CAA GCC AAG AAA TAT GCG TTT TGG CCA CTG ACT GAC GCA TAT TTT GGC TTG ATC A
SR77-3 R	CCT GTG ATC AAG CCA AAA TAT GCG TCA GTC AGT GGC CAA AAC GCA TAT TTC TTG GCT TGA TCA C
SR77-4 F	TGC TGT TCA AAG ATA CAC CAA CGG CTG TTT TGG CCA CTG ACT GAC AGC CGT TGG TAT CTT TGA A
SR77-4 R	CCT GTT CAA AGA TAC CAA CGG CTG TCA GTC AGT GGC CAA AAC AGC CGT TGG TGT ATC TTT GAA C
SR-NC F	TTT CTC CGA ACG TGT CAC GTT TCA AGA GAA CGT GAC ACG TTC GGA GAA TTT TTT C
SR-NC R	TCG AGA AAA AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT TCT CTT GAA ACG TGA CAC GTT CGG AGA AA

1.6 慢病毒载体的构建与病毒包装 将构建的干扰质粒中最有效的一段用 Gateway 重组技术重组到慢病毒表达载体中, 命名为 pLenti6. 3-SR77, 测序正确后进行慢病毒包装, 将 ViraPowerTM Packaging Mix 和慢病毒载体按照说明书转染入 HEK-293T 细胞, 转染试剂使用 LipofectaminTM 2000, 8 h 后更换培养液, 48

h 后收集病毒上清, 包装出的病毒命名为 Lv-SR77, 保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中, 病毒滴度使用倍比稀释法感染 HEK-293T 细胞, 荧光显微镜下测定。

1.7 细胞培养和转染 HEK-293T 细胞培养于添加 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素的 DMEM 培养液中, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中

培养。为了筛选出干扰效率最佳的质粒,SR77-1、2、3、4 或者 SR-NC 分别与 pefypN1-TLR4 共转染进入 HEK-293T 细胞。将 HEK-293T 细胞消化铺于 12 孔板中,铺板密度为 3×10^5 /ml,在上述条件下培养过夜后,将 $1 \mu\text{g}$ SR77-1、2、3、4 和 SR-NC 分别与 $0.6 \mu\text{g}$ pefypN1-TLR4 共转染入该细胞中,留一孔不转染作为对照。共转染 48 h 后收集细胞,抽提总蛋白并进行蛋白质免疫印迹检测。

NR8383 细胞培养于添加 15% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素的 F12K 培养液中,在 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。将细胞以 5×10^5 /ml 的密度接种于 6 孔板中,培养过夜后,在最佳感染条件下使用 Lv-SR77 感染细胞 ($\text{MOI} = 2$),感染 24 h 后更换为新鲜完全培养液继续培养 72 h。

1.8 LPS 刺激 NR8383 后 ELISA 检测细胞因子表达 将 NR8383 铺于 24 孔板中,密度为 5×10^5 /ml,每孔 1 ml,培养过夜后分为 3 组: Negative control 组(未感染的 NR8383,加入与 LPS 等体积的 PBS)、SR77 组(上一步培养 72 h 后的 NR8383,每孔加入 100 ng LPS)、Positive control 组(未感染的 NR8383,每孔加入 100 ng LPS),LPS 刺激 1、6、12、24 h 后分别收集培养上清进行 IL-6、IL-1 β ELISA 检测。

1.9 蛋白质免疫印迹法检测蛋白的表达 收集转染 48 h 后的 HEK-293T 细胞,按 5×10^5 细胞加入 $100 \mu\text{l}$ 预冷至 0°C 的细胞裂解液,冰上放置 30 min,低温 $16 \times 100 \times g$ 离心 10 min,取上清液加入 $2 \times \text{SDS}$ 凝胶加样缓冲液 100°C 煮沸变性 5 min,为确保蛋白上样量一致,样品中蛋白经 Bradford 定量,样品中蛋白通过 12% SDS-PAGE 分离后转至 PVDF 膜上,加入一抗孵育 4°C 过夜,洗膜 10 min,3 次后加入二抗(1:5 000)室温孵育 1 h 洗膜后 ECL 化学发光法暗室显影曝光。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件处理数据,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pefypN1-TLR4 质粒的鉴定 使用该质粒转染 HEK-293T 细胞 48 h 后流式细胞仪检测到高比例的荧光细胞(图 1A、1B),将转染后的细胞裂解蛋白进行蛋白质印迹测定可见 TLR4 表达(图 1C)。

2.2 SR77-1、2、3、4 中最有效的 shRNA 的筛选 将共转染后 48 h 的细胞进行裂解获取总蛋白,经过蛋白质印迹检测(图 2),并使用 Quantity One 软件

分析条带灰度,各条 shRNA 的抑制效率(实验重复 3 次)分别为 SR77-NC (2.5 ± 1.96)%、SR77-1 (88.0 ± 7.89)%、SR77-2 (72.3 ± 5.42)%、SR77-3 (40.9 ± 8.12)%、SR77-4 (44.2 ± 7.31)%,可见 SR77-1 的抑制效果最好(与其他各组相比 $P < 0.05$)。

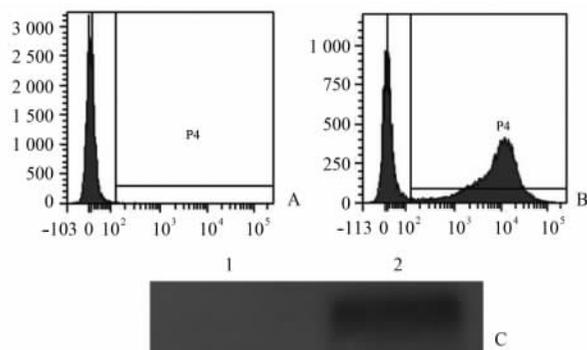


图 1 pefypN1-TLR4 质粒的鉴定

Fig 1 Identification of expression vector pefypN1-TLR4

A: HEK-293T cells were not transfected; B: HEK-293T cells were transfected by pefypN1-TLR4; C: Lysis of cells was detected by Western blotting 48 h after transfection. 1: Untransfected; 2: pefypN1-TLR4

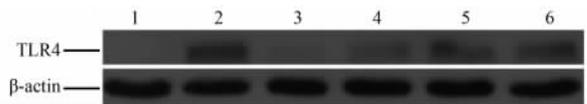


图 2 蛋白质印迹分析检测 shRNA 的干扰效率

Fig 2 Protein level of TLR4 in HEK-293T cells was detected by Western blotting analysis

1: Untransfected; 2: SR-NC; 3: SR77-1; 4: SR77-2; 5: SR77-3; 6: SR77-4

2.3 感染实验 用抑制效率最高的 SR77-1 构建慢病毒载体并包装,得到的病毒滴度为 2×10^6 TU/ml,感染 NR8383 96 h 后,荧光显微镜下成功转染的细胞有荧光蛋白表达(图 3)。用 LPS 刺激细胞 6~24 h IL-6、IL-1 β 的表达均受到明显抑制 ($P < 0.05$,表 2)。

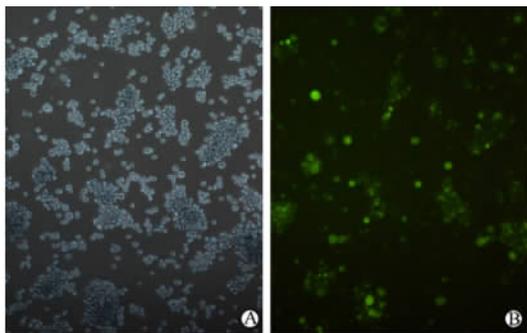


图 3 病毒感染 96 h 后 NR8383 细胞 GFP 的表达

Fig 3 GFP expression in NR8383 cells 96 h after infection with Lv-SR77

A: Phase contrast microscopic analysis; B: Fluorescence microscopic analysis. Original magnification: $\times 100$

表 2 不同时间点 3 组细胞因子比较

Tab 2 Comparison of IL-1 β and IL-6 at different time points between three groups

[$n=3, \bar{x} \pm s, \rho_B / (\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1})$]

Group		Time t /min			
		1 h	6 h	12 h	24 h
IL-1 β	Negative control	-	58.94 \pm 13.85	30.97 \pm 6.26	4.89 \pm 5.77
	SR77	95.40 \pm 48.54	134.35 \pm 19.16*	19.79 \pm 4.33*	117.34 \pm 83.66*
	Positive control	68.10 \pm 18.16	379.84 \pm 18.49	239.78 \pm 33.23	704.39 \pm 53.10
IL-6	Negative control	-	48.54 \pm 84.08	36.16 \pm 62.62	-
	SR77	16.45 \pm 28.49	860.45 \pm 27.53*	1 349.32 \pm 57.66*	1 752.35 \pm 150.63*
	Positive control	76.68 \pm 132.84	2 756.41 \pm 49.94	3 576.33 \pm 20.44	4 224.05 \pm 73.72

* $P < 0.05$ vs positive control group

3 讨论

肺移植已经成为治疗终末期肺疾病的有效方法。目前,由于免疫抑制剂的应用,肺移植后早期存活率有了显著提高,但 OB 仍然是困扰肺移植后长期存活的最主要障碍。长期应用免疫抑制剂会增加感染以及恶性肿瘤的发生率。因此获得移植物特异性的免疫耐受而不需要终生应用免疫抑制剂才是同种异体器官移植的最终目标^[3]。

APC 是免疫应答中的关键环节,它的激活将启动机体的免疫应答;TLR4 是 APC 的重要膜表面受体,由于肺是与外界空气相通的空腔脏器,空气中漂浮的革兰阴性菌含有大量的 LPS,TLR4 识别 LPS 后被活化,活化的 TLR4 经过一系列下游信号转导系统激活 IKK 使 I κ B 家族 α 、 β 激酶活化^[4],最终通过 NF- κ B 的作用启动细胞因子(如 IL-1、IL-6、IL-8、IL-12 等)和辅助刺激分子 CD80 和 CD86 基因的转录、翻译,导致 APC 的激活,并最终导致排斥反应的发生和 OB 的形成。因而 TLR4 的表达与功能完整可能会直接影响 OB 的发生^[5]。因此部分阻断或减弱 TLR4 的信号转导有望成为研究排斥反应和 OB 形成的新靶点。

RNA 干扰就是利用双链 RNA(double stranded RNA, dsRNA)高效、特异地阻断体内特定基因表达,使细胞表现出特定基因缺失表型的过程^[6]。本研究根据网络上的 shRNA 设计工具并参考相关文献^[7],筛选获得高干扰效率的 shRNA,进而通过慢病毒系统实现 TLR4 基因的沉默。慢病毒的转染效率比单纯质粒介导表达载体的转染效率要高得多,可大大增强体内实验的干扰效率^[8]。而且它的生物安全性较好,也极不容易引起免疫反应,这一点恰恰是研究免疫排斥反应与未来体内应用所需要的^[9]。

在本研究中,从 TLR4 序列中筛选出了专一靶向作用序列,并成功构建重组慢病毒用于转染,干扰

TLR4 的表达。蛋白质印迹分析结果显示,TLR4 表达水平明显降低,而且位于其信号通路下游的 IL-1 β 、IL-6 分泌也明显降低,说明所构建的慢病毒可有效“敲低”TLR4 基因。

总之,本研究成功构建能够干扰大鼠 TLR4 的慢病毒,体外实验可明显抑制 LPS 诱导的大鼠肺泡巨噬细胞诱导的炎症反应,为体内实验奠定基础,有望提供一个治疗肺移植慢性排斥反应的新方法。

[参考文献]

- [1] Shilling R A, Wilkes D S. Immunobiology of chronic lung allograft dysfunction: new insights from the bench and beyond [J]. *Am J Transplant*, 2009, 9: 1714-1718.
- [2] Ketloy C, Engering A, Srichairatanakul U, Limsalakpetch A, Yongvanitchit K, Pichyangkul S, et al. Expression and function of Toll-like receptors on dendritic cells and other antigen presenting cells from non-human primates [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2008, 125: 18-30.
- [3] Golshayan D, Buhler L, Lechler R I, Pascual M. From current immunosuppressive strategies to clinical tolerance of allografts [J]. *Transpl Int*, 2007, 20: 12-24.
- [4] Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors: their physiological role and signal transduction system [J]. *Int Immunopharmacol*, 2001, 1: 625-635.
- [5] Garantziotis S, Palmer S M, Snyder L D, Ganous T, Chen B J, Wang T, et al. Alloimmune lung injury induced by local innate immune activation through inhaled lipopolysaccharide [J]. *Transplantation*, 2007, 84: 1012-1019.
- [6] Moffat J, Sabatini D M. Building mammalian signalling pathways with RNAi screens [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7: 177-187.
- [7] Zhong W, Shen W F, Ning B F, Hu P F, Lin Y, Yue H Y, et al. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1 by adenovirus mediated small interfering RNA attenuates hepatic fibrosis in rats [J]. *Hepatology*, 2009, 50: 1524-1536.
- [8] Wiznerowicz M, Szulc J, Trono D. Tuning silence: conditional systems for RNA interference [J]. *Nat Methods*, 2006, 3: 682-688.
- [9] Dissen G A, Lomniczi A, Neff T L, Hobbs T R, Kohama S G, Kroenke C D, et al. *In vivo* manipulation of gene expression in non-human primates using lentiviral vectors as delivery vehicles [J]. *Methods*, 2009, 49: 70-77.

[本文编辑] 尹 茶