

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00048

体外筛选针对大鼠 Toll 样受体 4 mRNA 的小分子干扰 RNA 序列

卞金俊¹, 朱科明¹, 万小健¹, 邓小明^{1*}, 黄盛东², 袁 扬², 龚德军²

1. 第二军医大学长海医院麻醉科, 上海 200433
2. 第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433

[摘要] **目的:**筛选能高效干扰大鼠 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)mRNA 的最佳小分子干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)序列。**方法:**克隆大鼠 TLR4 基因全长, 将 TLR4 基因与含增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的质粒 pEGFP-C1 重组, 构建 pEGFP-rTLR4, 化学合成法合成 3 对干扰大鼠 TLR4 的 siRNA 后, 将 3 对 siRNA、阴性对照 siRNA 和干扰 EGFP 的 siRNA 分别与 pEGFP-rTLR4 经 Lipofectamine2000 共转染 HEK-293 细胞株, 通过倒置相差显微镜和流式细胞仪观察 EGFP 的荧光强度。**结果:**与阴性对照组相比, 3 对针对 TLR4 的 siRNA 及针对 EGFP 的 siRNA 均明显抑制 EGFP 的荧光表达($P<0.05$)。其中尤以 siRNA2(核苷酸序列为 5'-GTC TCA GAT ATC TAG ATC T-3', 位于 TLR4 基因序列的 1 352~1 370 位)的抑制效果最强, 干扰效率>75%。**结论:**成功筛选出体外可高效干扰大鼠 TLR4 mRNA 的 siRNA 片段。

[关键词] 小分子干扰 RNA; Toll 样受体 4; PCR; 化学合成法

[中图分类号] Q 781 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)01-0048-05

Screening for siRNA sequence targeting rat Toll-like receptor 4 mRNA *in vitro*

BIAN Jin-jun¹, ZHU Ke-ming¹, WAN Xiao-jian¹, DENG Xiao-ming^{1*}, HUANG Sheng-dong², YUAN Yang², GONG De-jun²

1. Department of Anesthesiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To screen for an optimized siRNA sequence targeting rat Toll-like receptor 4 (TLR4) *in vitro*. **Methods:** The full length gene of rat TLR4 was cloned and inserted into pEGFP-C1 plasmid to construct pEGFP-rTLR4. Three pairs of siRNAs targeting rTLR4 were chemically synthesized and were co-transfected with pEGFP-rTLR4 into HEK-293 cells *via* Lipofectamine2000. Cells were also co-transfected with siRNA targeting EGFP and negative control siRNA. The expression of EGFP was observed under inverted fluorescence microscope and flow cytometry. **Results:** Compared with the negative control group, 3 pairs of siRNAs targeting TLR4 and one pair of siRNA targeting EGFP significantly suppressed the EGFP expression ($P<0.05$); the inhibitory effect of siRNA2(gene sequence: 5'-GTC TCA GAT ATC TAG ATC T-3', 19 bp, 1 352-1 370) was the strongest one, with an interference efficiency over 75%. **Conclusion:** We have successfully obtained the siRNA sequence targeting TLR4 mRNA, which can efficiently suppress the expression of rat TLR4 mRNA *in vitro*.

[KEY WORDS] small interfering RNA; Toll like receptor 4; PCR; chemical synthesis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(1): 48-52]

Toll 样受体的研究被认为是近年来炎症信号转导领域所取得的最重要进展, 也是当前危重病医学研究的热点及重点领域之一^[1]。第一个被发现的存在于人单核/巨噬细胞表面的 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4), 在内毒素的识别和信号转导过程中起着非常关键的作用, 是人们长期致力寻

找的内毒素跨膜信号传递受体^[2]。TLR4 的功能与人体对内毒素及革兰阴性细菌的反应及脓毒症、成人呼吸窘迫综合征/急性肺损伤(ARDS/ALI)、多器官功能障碍综合征(MODS)的发生发展和转归密切相关^[3]。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种选择性沉默基因表达的有效工具^[4]。本实验拟

[收稿日期] 2007-09-05 **[接受日期]** 2007-10-22

[作者简介] 卞金俊, 博士, 主治医师. E-mail: jinjunb@anesthesia.org.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25070601, E-mail: xmdeng@anesthesia.org.cn

选择增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)作为报告分子,通过检测 EGFP 荧光强度来评估小分子干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)介导的 RNAi 效应,希望筛选出可高效干扰大鼠 TLR4 mRNA 的 siRNA 序列。

1 材料和方法

1.1 主要材料 质粒 pEGFP-C1 购自 Promega 公司;HEK-293 细胞株和 DH5 α 大肠杆菌由第二军医大学长海医院胸心外科研究所提供;T4 DNA 连接酶、DNA marker 标准品及 PCR 试剂购自 TaKaRa 公司, Lipofectamine 2000 试剂盒、胎牛血清购自 Gibco 公司。质粒纯化试剂盒购自 Qiagen 公司。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 大鼠肺组织总 RNA 提取 100 mg 大鼠肺组织加 1 ml TRIzolTM,用电动匀浆器冰浴匀浆 1 min 后于冰浴中静置 5 min;加入氯仿 200 μ l 后快速振荡 15 s,冰浴静置 3 min,4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,取上清液置于另一新离心管中;加入异丙醇 500 μ l,冰浴放置 10 min 后再次 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,弃上清,加 2 ml 预冷的 75%乙醇清洗沉淀,4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,干燥后加 50 μ l 无 RNA 水溶解。紫外分光光度计测定 RNA 浓度和含量,TBE/琼脂糖电泳检测 RNA 完整性。

1.3 RT-PCR 反应 模板 cDNA 合成:向冰浴中的 0.2 ml PCR 薄壁管中加入模板 RNA 1.6 μ l(约含总 RNA 5 μ g),oligo (dt)₁₅ 1 μ l,用无 RNA 酶水补至总体积 6 μ l;置于 PCR 仪内 72 $^{\circ}$ C 3 min 后,取出置冰上冷却;再加 5 $\times$ RT buffer 5 μ l,10 mmol/L dNTP 1 μ l,逆转录酶 MMLV 1 μ l,混匀后置于 PCR 仪中 42 $^{\circ}$ C 逆转录 60 min,72 $^{\circ}$ C 放置 3 min 再常温冷却;离心后加入 1 μ l 的 RNase H,37 $^{\circ}$ C 反应 20 min 后-80 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 大鼠 TLR4 基因的获得 用引物设计软件 Primer Premier 5.0,结合 PCR 产物欲连接的质粒 pEGFP-C1 的酶切位点,设计引物序列,正义:5'-

CGG GAG CTC TGA ATG CCT CTC TTG CAT CTG GCT GG-3',反义:5'-CGG GTC GAC GAG ATA CAA TTC GAC CTG CTG-3'。其中 GAG CTC 为 Sac I 的酶切位点,GTC GAC 为 Sal I 的酶切位点,TGA 为转录终止密码子。目的基因扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 1 min;94 $^{\circ}$ C 8 s,54 $^{\circ}$ C 12 s,68 $^{\circ}$ C 100 s,共 25 个循环,终末延伸 68 $^{\circ}$ C 5 min。用普通琼脂糖凝胶分离 DNA,用 PCR 产物回收试剂盒回收目的基因片段。

1.5 重组质粒 pEGFP-rTLR4 的构建 以 pEGFP-C1 质粒、TLR4 PCR 产物、Sac I 和 Sal I 配制酶切反应体系,制备双酶切产物;配置连接反应体系,连接过夜;连接产物通过 Bio-Rad Gene Pulser II 电转系统转入 DH5 α 感受态细胞;接种多个菌落,37 $^{\circ}$ C 培养过夜;24 h 后挑 4 个孤立菌落分别作 PCR 鉴定。PCR 引物序列,正义:5'-TCA TCC AGG AAG GCT TCC AC-3',反义:5'-GGC GAT ACA ATT CGA CCT GC- 3'。阳性克隆再挑单克隆菌加入含卡那霉素的 LB 液体培养基,37 $^{\circ}$ C 摇床培养 16 h 后用 Qiagen Plasmid spin kit 抽提质粒。所得质粒送测序。测序引物为 PCR 引物,由于目的片段较长,中间一段不能够测出,另外又合成中间段测序引物,引物序列,正义:5'-ATG TCC ATC GGT TGA TCT TG-3',反义:5'-TGG ATG TCT CTA TGC GAT TG-3'。

1.6 针对目的基因 siRNA 的合成与退火 针对大鼠 TLR4 的 3 个靶位点分别设计 3 对互补的 siRNA,并将候选的靶序列进行序列同源性 BLAST 分析。设计序列由上海吉凯化学有限公司合成。合成试剂中另包括阴性对照和阳性对照(GFP22:已证实可有效干扰 EGFP 的 siRNA)共 5 对 siRNA(表 1)。于退火前 1 d 配制工作母液,在 2.5 nmol 的双链 siRNA 中加入 125 μ l 1 $\times$ 通用缓冲液,得到浓度为 20 μ mol/L 的 siRNA 母液,于 90 $^{\circ}$ C 中保存 2 min,自然冷却至室温后置 4 $^{\circ}$ C 过夜备用。

表 1 化学合成 siRNA 序列
Tab 1 Chemically synthesized siRNAs

Name	siRNA targeting sequence	Origin	GC content(%)	Location
siRNA1	5'-CTA CCA ACA GAG AGG ATA T-3'	1 307	42.1	ORF
siRNA2	5'-GTC TCA GAT ATC TAG ATC T-3'	1 352	36.8	ORF
siRNA3	5'-GCC GGA AAG TTA TTG TGG T-3'	2 420	47.4	ORF
GFP22	5'-CGG CAA GCT GAC CCT GAA GTT CAT-3'			
Negative control	5'-ATA CCA ACA TAG AGG ATA T-3'			

ORF:Open reading frame

1.7 siRNA 与 pEGFP-rTLR4 共转染 HEK-293 细胞株 于 6 孔板中接种 4×10^5 /孔,37℃、CO₂体积分数为 5%培养过夜,待细胞汇合至 80%,用无血清无抗生素的 DMEM 培养液洗涤细胞 2 次后继续加入 DMEM 培养备用。每孔分别用退火后的 5 种合成 siRNA 双链 3.3 μg 和 5 μg pEGFP-rTLR4 共转染 HEK-293 细胞,转染后的 6 孔板置于 CO₂体积分数为 5%、37℃湿度孵箱中培养 2 h 后,加入 1.5 ml 含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,CO₂体积分数为 5%、37℃继续培养。

1.8 荧光相差倒置显微镜观察和流式细胞仪检测 EGFP 荧光强度 转染 48 h 后在荧光倒置显微镜下分别观察 EGFP 在 HEK-293 细胞株中的表达情况。72 h 后胰酶常规消化后收集细胞,PBS 洗涤 2 次,用流式细胞仪检测每孔细胞的平均荧光强度(MFI)和 EGFP 表达细胞阳性率。

1.9 统计学处理 用 SAS 6.12 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用 *t* 检验。

2 结 果

2.1 大鼠 TLR4 基因的克隆 根据大鼠 TLR4 基因登录号 gi:25742798,获得 TLR4 mRNA 全长为 3 373 bp,其编码区(CDS)为 238~2 745 共 2 507 bp。使用 PCR 方法克隆 TLR4 基因 CDS 区,预期 PCR 产物长度为 2 376 bp,经 1%琼脂糖凝胶电泳检测,可见在略大于 2 000 bp 处有高度特异的 DNA 亮条带,所得基因片段与预期大小一致(图 1)。采用经典的分子克隆方法,构建 pEGFP-rTLR4 质粒(图 2)。以 PCR 引物对 4 个单克隆进行鉴定筛选,目的片段为 198 bp,PCR 结果显示其中 3 个单克隆为阳性克隆(图 3)。

2.2 siRNA 干扰 pEGFP-rTLR4 中 EGFP 基因的表达 5 对 siRNA 分别和 pEGFP-rTLR4 共转染 HEK-293 细胞株 48 h 后,荧光倒置显微镜下观察绿色荧光蛋白在 HEK-293 细胞中的表达强度,可见与阴性对照组相比,siRNA1、siRNA2、siRNA3 以及 GFP22 组 EGFP 的荧光强度呈不同程度的减弱,荧光细胞数减少(图 4)。

2.3 流式细胞仪检测 EGFP 阳性细胞数比例和相对荧光强度 与阴性对照组相比,siRNA 1~3 组和 GFP22 组的 EGFP 阳性细胞数和相对荧光强度

均明显降低($P < 0.01$),在 siRNA1~3 组中,以 siRNA2 组中 EGFP 荧光强度最弱,其干扰效率最高(表 2)。

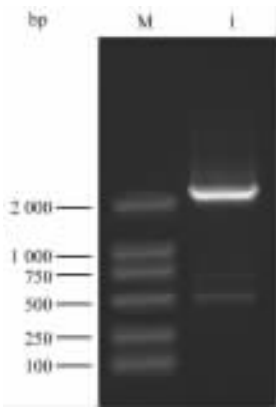


图 1 大鼠 TLR4 全长 PCR 产物
Fig 1 PCR product of full-length rTLR4 of rat
M:DNA marker; 1:rTLR4

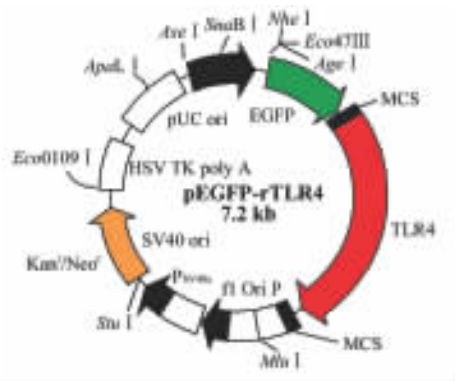


图 2 pEGFP-rTLR4 质粒图谱
Fig 2 Structure of pEGFP-rTLR4 plasmid

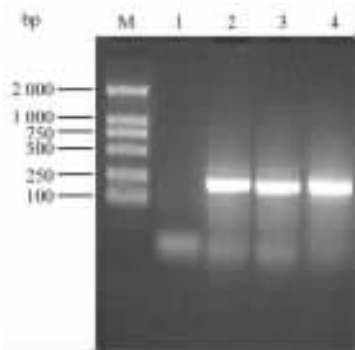


图 3 PCR 鉴定 pEGFP-rTLR4 克隆
Fig 3 Identification of pEGFP-rTLR4 clones with PCR
M:DNA marker; 1: Negative clone; 2-4: Positive clones

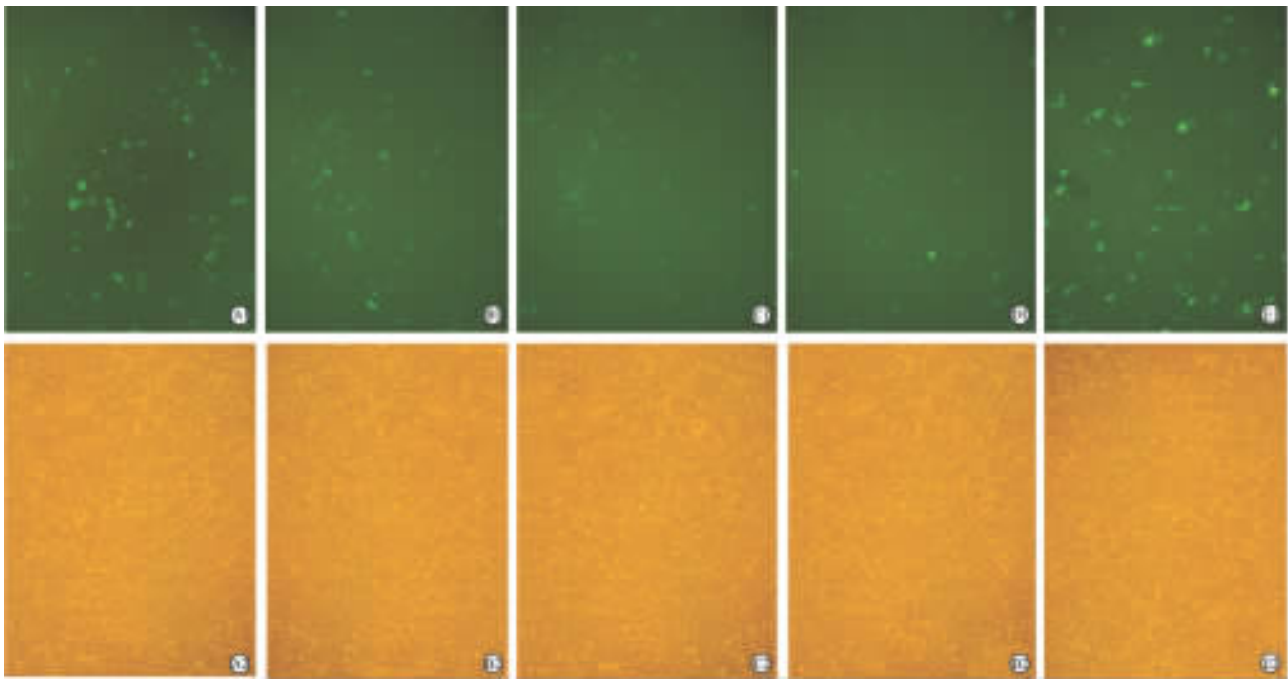


图 4 不同 siRNA 与 pEGFP-rTLR4 共转染的 HEK-293 细胞的荧光表达

Fig 4 Expression of EGFP in HEK-293 cells co-transfected with different siRNAs and pEGFP-rTLR4

A1, A2: siRNA1; B1, B2: siRNA2; C1, C2: siRNA3; D1, D2: GFP22; E1, E2: Negative control. A1-E1: Fluorescence microscope; A2-E2: Light microscope. Original magnification: $\times 50$

表 2 不同 siRNA 对 EGFP 蛋白表达的影响

Tab 2 Inhibition of EGFP protein expression by different siRNAs in HEK-293 cells

Group	Positive cell (%)	Relative fluorescence intensity	Interference efficiency (%)
siRNA1	18.60 $\pm$ 4.23**	146.44 $\pm$ 21.78**	65.4
siRNA2	11.63 $\pm$ 3.71**	91.08 $\pm$ 12.33**	79.5
siRNA3	11.87 $\pm$ 3.59**	95.60 $\pm$ 17.82**	78.4
GFP22	7.09 $\pm$ 3.28**	58.64 $\pm$ 9.04**	86.2
Negative control	49.78 $\pm$ 11.47	422.69 $\pm$ 76.33	0

** $P < 0.01$ vs negative control group

3 讨 论

目前,TLR4 受体是炎症信号转导领域的研究热点。TLR 最初是从果蝇胚胎发育过程中被发现的跨膜蛋白,其在果蝇的个体发育尤其是在抵御微生物的侵袭中发挥重要作用。哺乳类动物与果蝇的 TLR 具有高度同源性。迄今已确认鼠有 13 种 TLR,而人类拥有 10 种 TLR(TLR1~TLR10)^[5]。参与天然免疫的主要是 TLR4 和 TLR2。它们呈限制性表达,主要存在于巨噬细胞、多形核白细胞和树突状细胞中。TLR4 在巨噬细胞内的含量最高,可能与它们主要参与机体天然免疫有关。

现已知道,TLR4 被脂多糖(lipopoly saccha-

ride,LPS)激活后通过 NF- κ B 途径向细胞内传递信号,引起一系列炎症反应,清除入侵的病原体。但是过强的炎症反应也可导致休克、多脏器衰竭甚至死亡。许多体内与体外实验证明 TLR4 表达异常会使免疫炎症反应异常,削弱机体对病原微生物的清除能力,但是同时也降低过强炎症反应所起的感染性休克等临床危象。TLR4 的表达与功能完整直接影响 LPS 信号转导效能。反之,降低 TLR4 的表达与功能,有助于减少下游炎症因子的分泌与释放,从而减轻 LPS 所致的肺损伤。因此,本研究应用 RNAi 技术来部分阻断或减弱 TLR4 的信号转导,以期寻找治疗 ARDS/ALI 以及脓毒血症的新靶点。

抑制 TLR4 功能的方法有基因敲除^[6-7]、TLR4 单克隆抗体^[8]、反义 RNA 等。单克隆抗体的制备比较繁杂,而基因敲除需较长时间才能了解所缺失基因后的生物学现象,尤其在人类不可能用这种方法进行研究。特别是像 TLR4 这类的基因,为机体天然免疫所必需,敲除后可能引起致命性感染,在出生后可能容易死亡。本实验筛选 TLR4 siRNA 与以往的方法相比具有高效性、高特异性和便捷性^[9]的优点。

目前 RNAi 方法有多种,第一种为体外化学合成 siRNA 法^[10-11];第二种为体外转录合成 siR-

NA^[12];第三种方法为体内转录合成 siRNA^[13-15];还有一种方法是用 PCR 制备的 siRNA 表达框架(siRNA expression cassettes, SECs)在细胞中表达^[16]。目前,在各种类型的 siRNA 干扰实验中,化学合成 siRNA 方法因其简单、便捷得到较为广泛的应用,而应用最多、最广、作用时间最长、效果也最为明显的 siRNA 合成方法主要是体外构建发夹状 siRNA 表达质粒载体,使其在体内转录合成 siRNA。本实验首先通过生物信息学的方法,利用生物信息学软件设计了 3 条针对 TLR4 的 siRNA,然后再通过化学合成法体外合成。另外还合成了 1 对错配的针对 TLR4 的 siRNA(no-silence)和 1 对针对 EGFP 的 siRNA(GFP22),作为实验的对照组

本研究选择 pEGFP-C1 中的 EGFP 作为报告基因,该基因是由 Clontech 公司人工合成和优化,且适于哺乳动物细胞表达的编码基因,其蛋白对宿主细胞无毒性、稳定性好、易于观察,而且蛋白质十分稳定。EGFP 是 GFP 的突变体,它的激发波长是 488 nm,含有 1 个更适合于在哺乳动物细胞中表达的开放阅读框,因此其产生的荧光远远强于野生型。我们将大鼠 TLR4 的 PCR 产物经过经典克隆方法,将其连接入 pEGFP-C1 中编码 EGFP 的基因后面,使 TLR4 和 EGFP 共用 1 个 CMV 启动子,在体内只转录出 1 条 mRNA。由于我们在 TLR4 的 PCR 引物的上游插入了 TGA 翻译终止密码子,故这条 mRNA 在完成 EGFP 的翻译后,就停止翻译,即在细胞内 TLR4 只转录出 mRNA,而不翻译 TLR4 蛋白。当该融合的 mRNA 的 TLR4 部分在 siRNA 的作用下发生切割、降解,那么整条 mRNA 的表达都会受到抑制,即 EGFP 的表达亦受到抑制,其表现在荧光显微镜和流式细胞仪的荧光强度强弱上。本实验我们观察到针对 TLR4 的 3 对 siRNA 和针对 EGFP 的 siRNA(GFP22)与 pEGFP 共转染 HEK293 后,4 组荧光强度均比对照 siRNA 组(no-silence)荧光强度减弱,其中 GFP22 组荧光最弱,siRNA2 组次之。该高效干扰大鼠 TLR4 表达的 siRNA 片段的成功筛选将为下一步观察其对 LPS 诱导的大鼠肺巨噬细胞、LPS 诱导的大鼠 ARDS/ALI 模型的影响奠定了基础。

综上所述,本研究应用 EGFP 报告基因成功筛选出了针对大鼠 TLR4 的高效 siRNA 片段,其核苷酸序列为 5'-GTC TCA GAT ATC TAG ATC T-3',位于 TLR4 基因序列的 1 352~1 370 位,其干扰大鼠 TLR4 的效率高达 79.5%。有关该 siRNA 对

LPS 诱导的大鼠肺巨噬细胞以及 LPS 诱导的大鼠 ARDS/ALI 模型的影响有待进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Sheedy F J, O'Neill L A. The Toll in Toll; Mal and Tram as bridges for TLR2 and TLR4 signaling[J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 82:196-203.
- [2] Stoll L L, Denning G M, Weintraub N L. Endotoxin, TLR4 signaling and vascular inflammation: potential therapeutic targets in cardiovascular disease[J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12:4229-4245.
- [3] Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 117:979-987.
- [4] Matzke M A, Birchler J A. RNAi-mediated pathways in the nucleus[J]. *Nat Rev Genet*, 2005, 6:24-35.
- [5] Kawai T, Akira S. TLR signaling[J]. *Semin Immunol*, 2007, 19:24-32.
- [6] Cohn E F, Nathan C, Radzioch D, Yu H, Xiang Z, Ding A. Aberrant expression of TLR4 in TLR4-deficient macrophages imposes a selective disadvantage: genetic evidence for TLR4-dependent responses to endogenous, nonmicrobial stimuli[J]. *J Immunol*, 2006, 176:1185-1194.
- [7] Poltorak A, Smirnova I, Clisch R, Beutler B. Limits of a deletion spanning Tlr4 in C57BL/10ScCr mice[J]. *J Endotoxin Res*, 2000, 6:51-56.
- [8] Daubeuf B, Mathison J, Spiller S, Hugues S, Herren S, Ferlin W, et al. TLR4/MD-2 monoclonal antibody therapy affords protection in experimental models of septic shock[J]. *J Immunol*, 2007, 179:6107-6114.
- [9] Yu J Y, DeRuiter S L, Tumer D L. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and Hairpin RNAs in mammalian cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99:6047-6452.
- [10] Boshier J M, Labouesse M. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog[J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2:E31-E36.
- [11] Caplen N J, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan R A. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98:9742-9747.
- [12] 袁葵洲, Bodmer R, 朱传炳, 王跃群, 李永清, 吴秀山. 利用 RNAi 技术研究果蝇心脏发育基因的功能[J]. *遗传学报*, 2002, 29:34-38.
- [13] Miyagishi M, Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells[J]. *Nat Biotech*, 2002, 19:497-500.
- [14] Lee N S, Dohjima T, Bauer G, Li H, Li M J, Ehsani A, et al. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells[J]. *Nat Biotech*, 2002, 19:500-505.
- [15] Paul C P, Good P D, Winer I, Engelke D R. Effective expression of small interfering RNA in human cells[J]. *Nat Biotech*, 2002, 19:505-508.
- [16] Chan H M, La Thangue N B. p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds[J]. *J Cell Sci*, 2001, 114(Pt 13):2363-2373.

[本文编辑] 曹 静