

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.04.019

合理设计 siRNA 下调锌指蛋白 A20 的表达促进 DC 成熟

Rational design of siRNA for down-regulation of zinc finger protein A20 expression promotes dendritic cell maturation

张晓颖, 宋海峰, 张斌, 陈虎(解放军第307医院造血干细胞移植科, 北京100071)

[摘要] 目的: 比较针对锌指蛋白 A20 基因不同位点的 siRNA 对正常人 DC 成熟度的影响。方法: 根据 A20 基因序列特点, 针对 A20 C 端的锌指结构-5 区(zinc finger-5, Zif-5)、Zif-2 和 N 端的序列分别设计合成了 Si1、Si2 和 Si3 三条 siRNA, 以脂质体法转染正常人 DC, RT-PCR 和 Western blotting 检测 DC 中 A20 mRNA 和蛋白表达水平, 流式细胞术检测 DC 的成熟度。结果: 成功合成了 3 条 siRNA。RT-PCR 和 Western blotting 检测显示, DC 中 A20 在 TNF- α 刺激后 24 h 表达最高; Si1 在 DC 中干扰效果最好, Si2 其次。A20 下调表达促进了 DC 的成熟。结论: 针对 A20 锌指结构区域的 siRNA 能有效下调 A20 的表达, 从而促进 DC 成熟。

[关键词] 树突状细胞; 锌指蛋白 A20; siRNA

[中图分类号] R392.11

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)04-0458-04

RNAi 技术沉默基因表达的特异性和高效性使它较传统的基因敲除和反义核酸技术更适合作为基因功能分析的工具^[1]。针对目的基因设计合适的 siRNA 序列, 可以达到很好的干扰效果。锌指蛋白 A20 基因(zinc finger protein A20, A20)是在人脐静脉血管上皮细胞中被发现的, 是肿瘤坏死因子诱导的初级应答基因, 其基因产物为锌指蛋白 A20^[2]。A20 蛋白具有抑制 NF- κ B 的作用, 在一些细胞中具有炎症保护和抗凋亡的双重活性^[3,4]。NF- κ B 转录因子在 DC 成熟、炎性因子产生及介导免疫反应等方面都起着重要作用。近期研究^[5-7]表明, A20 通过抑制 NF- κ B 信号通路来负向调控 DC; 利用 RNAi 技术沉默 A20 的表达, 能够促进 DC 成熟并提高其免疫刺激的能力。本研究通过比较不同基因位点的 A20 siRNA 在 DC 中的干扰效果, 为合理设计针对 DC 中 A20 的 siRNA 提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RPMI 1640 培养基为 Gibco 公司产品, 胎牛血清为南美进口血清, Ficoll 液购自天津美德太平洋科技有限公司, A20 单克隆抗体购自 Ebioscience 公司, β -actin 购自博奥森公司, HRP 羊抗鼠和羊抗兔均购自中杉金桥公司, TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司, cDNA 反转录试剂盒购自 Fermentas 公司, RIPA 细胞裂解液为本实验室自己配制, 荧光替代染料(EB)和 ECL 发光液购自普利莱基因技术有限公司。转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。

siRNA 合成请上海吉玛公司操作, 所有引物均有 Invitrogen 公司合成。

1.2 DC 的培养

购买血站分离成份血后的白膜层, 经 Ficoll 液分离后, 吸取中间的白细胞层, 经 PBS 3 次离心洗涤后均匀铺于培养板中, 放于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中贴壁 2 h。弃去非贴壁细胞, 加入含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 液, 其中含有 IL-4 30 ng/ml、GM-CSF 100 ng/ml。继续放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中常规培养, 第 5 天加入 TNF- α 10 ng/ml, 第 7 天收获。

1.3 RT-PCR 检测 DC 中 A20 mRNA 的表达

提取总 RNA 后逆转录合成 cDNA, 进行 PCR。其反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min, (95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min) \times 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min。A20 引物序列: 上游 5'-AGCCCTCATCGACAGAAA-CATCCAG-3'; 下游 5'-CGCTGTTTTTCCTGCCATTTCT-TGTA-3', 扩增片段 882 bp。内参照 β -actin 序列: 上游 5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3'; 下游 5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3', 产物片段 353 bp。扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色得

[基金项目] “十一五”新药创制重大专项(No. 2009zx09503-23)。Project supported by the Key New Drug Creation and Development Program of the “Eleventh Five-year Plan”(No. 2009zx09503-23)

[作者简介] 张晓颖(1982-), 女, 河北省迁西市人, 硕士生, 主要从事造血干细胞移植和细胞免疫治疗方面的研究。E-mail: woshixiaosanybing@yahoo.com.cn

[通信作者] 陈虎(CHEN Hu, corresponding author), E-mail: chenhu217@yahoo.com.cn

到特异扩增条带和内参条带。

1.4 Western blotting 检测 DC 中 A20 蛋白的表达

收集细胞,加入裂解液提取细胞总蛋白。调整蛋白浓度进行 SDS-PAGE。电泳分离蛋白电转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭;加 A20(1:200)单克隆抗体,4℃ 过夜,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min;加入 HRP 标记的二抗,室温反应,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。ECL 发光,以胶片显影、定影。以 β -actin(1:250)为内参照。

1.5 siRNA 设计

根据 GenBank A20 mRNA 序列(NM_006290.2),用 Ambion 公司的 siRNA 在线设计工具 siRNA target finder,找到以 AA 起始、GC 含量低于 50%、长度在 21 bp 的候选靶序列;根据 Reynolds 等^[8]关于 siRNA 自身序列特征的研究,按照其总结的 siRNA 设计规则评分,选择评分在 6 分以上的 siRNA。将得到的序列在人基因库中进行 Blast 同源性比对,以排除 RNAi 脱靶效应;用 RNA Structure 4.0 软件预测 A20 RNA 二级结构,根据预测的结果选取了 3 条靶序列,分别位于 A20 的羧基末端的 Zi5 区、Zi2 区和氨基末端。设计合成的 siRNA 序列为:siRNA1(Si1)为 5'-GCACCAUGUUUGAAGGAUATTUAUCC-UUCAAACAUGGUGCTT-3';siRNA2(Si2)为 5'-CACUGAAUGUGCAGCACAATTUUGUGCUGCACAUUCAGUGTG-3';siRNA3(Si3)为 5'-GGUAGAUGAUUACUUUGAATTUCAAAGUAAUCAUCUAC CAG-3'。

1.6 脂质体法转染不同位点 siRNA

DC 转染操作按照 Lipofectamine 2000 说明进行^[9],转染后 4 h 更换为含 10% FBS 的 1640 培养基,24 h 收获细胞进行流式检测细胞表型。

1.7 统计学处理

所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS 9.2 软件进行成对 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TNF- α 刺激 DC 后高表达 A20 的时间点

RT-PCR 检测结果(图 1)显示,分别在 TNF- α 刺激后 4 个不同时间点收获的 DC,只有 24 h 有 A20 mRNA 的表达,片段大小为 882 bp,与预计结果一致。各时间点的 β -actin 对照均在 353 bp 处出现明显的扩增条带,表明提取 RNA 的质量及 RT-PCR 过程均较良好。

Western blotting 结果(图 2)显示,分别在 TNF- α 刺激后 4 个不同时间点收获 DC 检测,只有 24 h 时

在相对分子质量 60 000 附近出现阳性条带,与 RT-PCR 结果一致。

2.2 siRNA 干扰后 DC 中 A20 在 mRNA 和蛋白水平的表达

RT-PCR 结果显示,使用 3 条 siRNA(Si1、Si2、Si3)在 TNF- α 刺激后 24 h 转染 DC,并在转染后 24 h 收获 DC 进行检测,结果发现 Si1 和 Si2 成功下调了 A20 的表达,Si3 干扰效果不好(图 3)。

Western blotting 检测结果显示, Si1 和 Si2 成功下调 A20 表达,Si3 干扰效果较差(图 4),与 RT-PCR 结果一致。

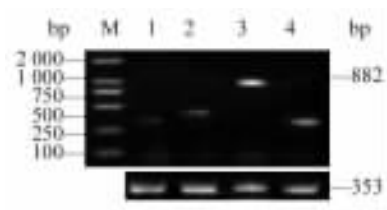


图 1 TNF- α 刺激后不同时间点收获的 DC 中 A20 mRNA 的表达

M:DL 2000 Marker;1:TNF- α 刺激后 0 h;2:TNF- α 刺激后 6 h;3:TNF- α 刺激后 24 h;4:TNF- α 刺激后 48 h

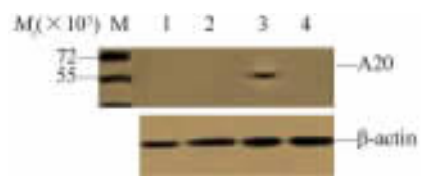


图 2 TNF- α 刺激后不同时间点收获的 DC 中 A20 蛋白的表达

M:Marker;1:TNF- α 刺激后 0 h;2:TNF- α 刺激后 6 h;3:TNF- α 刺激后 24 h;4:TNF- α 刺激后 48 h



图 3 siRNA 转染后 DC 中 A20 mRNA 的表达

M:DL 2000marker;1:Si1 干扰 DC;2:Si2 干扰 DC;3:Si3 干扰 DC;4:Irrelevant siRNA 干扰 DC;5:对照 DC

2.3 siRNA 干扰 A20 表达后促进 DC 的成熟

siRNA 转染 24 h 后收获 DC,流式细胞术检测显示,转染组 DC 成熟的细胞表型较未转染组高。Si1 组 DC 的 CD83、HLA-DR 和 CD54 表达较未转染

组的高, Si2 组的 CD83 和 CD54 较未转染组的高 ($P < 0.05$, 图 5)。

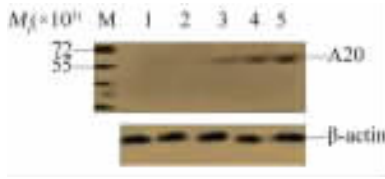


图 4 siRNA 转染后 DC 中 A20 蛋白的表达

M: Marker; 1: Si1 干扰 DC; 2: Si2 干扰 DC;

3: Si3 干扰 DC; 4: Irrelevant siRNA 干扰 DC; 5: 对照 DC

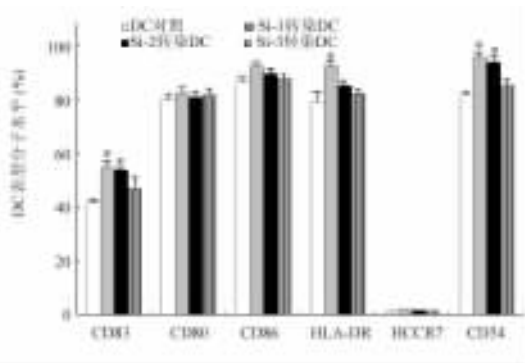


图 5 DC 成熟的细胞表型流式分析

* $P < 0.05$ vs DC 对照

3 讨论

RNAi 技术的关键点之一在于设计出高效特异的 siRNA 序列, 其影响因素众多。首先, siRNA 自身的序列特征, 包括 siRNA 的 G/C 含量、siRNA 双链分子内发卡结构的形成、对 siRNA 双链末端稳定性的评价及 siRNA 双链特定位置的碱基偏好性等等; 其次, 靶序列所在的 mRNA 二级结构, 在呈现较高自由能的不稳定的突环、内环样 mRNA 二级结构处, 有利于寡核苷酸的靠近和结合, 进而发挥其阻断基因表达的作用^[10-12]; 再次, Reynolds 等^[8]在 siRNA 设计的研究中发现, 少数不符合其设计规则的 siRNA 序列中也存在具有 RNAi 效果的序列, 这预示可能还存在其他对 siRNA 性能有影响的序列特征。

本研究中设计合成针对 A20 基因的 siRNA, 脂质体介导转染 DC 细胞。通过 PCR 和 Western blotting 检测显示, DC 中的 A20 在 TNF- α 刺激后 24 h 表达最高, 在此时转染的 3 条 siRNA 中, Si1 和 Si2 的明显下调 A20 表达, Si3 的下调效果较差。A20 下调表达后 DC 成熟度较前提高, Si1 组和 Si2 组 DC 中 CD83 和 CD54 表达明显增加, 促进了 DC 成熟,

而 Si3 效果最差。根据 siRNA 设计原则挑选设计的 3 条 siRNA, Si3 在自身序列特征和靶序列所在的 mRNA 二级结构分析中符合高效 siRNA 的设计原则^[13], 但是干扰效果与其他 siRNA 相差很大。参考现有关于高效 siRNA 的研究, 对于 siRNA 自身的序列特征分析是否还存在影响 siRNA 效能的序列特征、多个序列特征在 siRNA 效能中贡献的权重问题以及这些 siRNA 序列所适用的范围都是有待进一步考证的。但是 A20 所具有的特殊的功能结构域在 DC 细胞中所发挥的作用引起了我们的注意。

A20 有两个功能结构域: A20 的氨基(N)末端(1~385)和羧基(C)末端(386~775)。N 末端与已知的任何蛋白无同源性; C 末端是锌指区, 有 7 个重复的 Cys2/Cys2 型锌指结构(Zif)。Marco 等构建了一系列 A20 突变体表达质粒转染炎症细胞的模型, 发现 A20 抑制 NF- κ B 活性的分子基础是它 C 末端的 7 个 Zif, 而且只要突变体含有 4 个或 4 个以上的 Zif, 对 NF- κ B 活性的抑制程度就能与含有 7 个 Zif 的野生型 A20 相同。因此, 有人认为 A20 对 NF- κ B 活性的抑制存在“功能性过剩”, 它的 N 末端并没有发挥作用^[14]。本实验中所设计的 3 条 siRNA, Si1 位于 A20 的 Zif-5 区, Si2 位于 A20 的 Zif-2 区, Si3 位于 A20 的 N 末端。A20 主要通过抑制 NF- κ B 来负向调节 DC 成熟^[15-16], 由于 N 末端在 A20 抑制 NF- κ B 过程中的无能性, 导致 Si3 的干扰作用失败, 从而不能更好地促进 DC 成熟, 达到干扰的目的, 这与我们所得到的流式细胞仪分析的结果相一致。Si3 无论在设计位点还是自身结构上都可能是不合理的。同样也说明, 要通过 RNAi 技术下调或者沉默 A20 在 DC 中的表达, siRNA 序列的设计就要避开 A20 的 N 末端, 选择在 Zif 结构区域较为合理, 尤其是 Zif-5 区。

目前, 以 DC 为基础的免疫治疗已经在临床广泛应用, 其安全性和有效性为临床工作者所称道, 但如何能进一步提高其免疫刺激能力一直是人们关注的问题。如果能够通过设计合理高效的 siRNA 下调 DC 中 A20 的表达, 促进 DC 的成熟和免疫刺激能力, 将为制备新型 DC 疫苗提供新的思路。

[参考文献]

[1] 宋尔卫. RNA 干扰的生物学原理与应用 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2005: 18-19.
 [2] Dixit VM, Green S, Sarma V, Holzman LB, Wolf FW, O'Rourke K, et al. Tumor necrosis factor-alpha induction of novel gene products in human endothelial cells including a macrophage-specific chemotaxin [J]. J Biol Chem, 1990, 265 (5): 2973-2978.

- [3] Zhou Z, Connell MC, MacEwan DJ. TNFR1-induced NF- κ B, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression on endothelial cells [J]. *Cell Sig*, 2007, 21 (9): 1238-1248.
- [4] Patel VI, Daniel S, Longo CR, Shrikhande GV, Scali ST, Czimmer E, et al. A20, a modulator of smooth muscle cell proliferation and apoptosis, prevents and induces regression of neointimal hyperplasia [J]. *FASEBJ*, 2006, 20 (9): 1418-1430.
- [5] O'sullivan BJ, Thomas R. CD40 ligation conditions dendritic cell antigen-presenting function through sustained activation of NF- κ B [J]. *J Immunol*, 2002, 168(11): 5491-5498.
- [6] Breckpot K, Aerts-Toegaert C, Heirman C, Peeters U, Beyaert R, Aerts JL, et al. Attenuated expression of A20 markedly increases the efficacy of double-stranded RNA-activated dendritic cells as an anti-cancer vaccine [J]. *J Immunol*, 2009, 182(2): 860-870.
- [7] Song XT, Evel-Kabler K, Shen L, Rollins L, Huang XF, Chen SY. A20 is an antigen presentation attenuator, and its inhibition overcomes regulatory T cell-mediated suppression [J]. *Nat Med*, 2008, 14(3): 258-265.
- [8] Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorov A. Rational siRNA design for RNA interference [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(3): 326-330.
- [9] Aerts-Toegaert C, Heirman C, Tuyvaerts S, Corthals J, Aerts JL, Bonehill A, et al. CD83 expression on dendritic cells and T cells: Correlation with effective immune responses [J]. *Eur J Immunol*, 2007, 37(3): 686-695.
- [10] Mittal V. Improving the efficiency of RNA interference in mammals [J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5 (5): 355-365.
- [11] Vecenie CJ, Morrow CV, Zyra A, Serra MJ. Sequence dependence of the stability of RNA hairpin molecules with six nucleotide loops [J]. *Biochemistry*, 2006, 45(5): 1400-1407.
- [12] Khvorov A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias [J]. *Cell*, 2003, 115(2): 209-216.
- [13] 胡颖, 叶枫, 谢幸. RNA 干扰技术中 siRNA 设计原则的研究进展 [J]. *国际遗传学杂志*, 2007, 30(6): 419-423.
- [14] 吴丽娟, 康格非. 锌指蛋白 A20 及其对炎症反应的调控 [J]. *生命的化学*, 2004, 24(3): 204-206.
- [15] Werner SL, Kearns JD, Zadorozhnaya V, Lynch C, O'Dea E, Boldin MP, et al. Encoding NF- κ B temporal control in response to TNF: Distinct roles for the negative regulators IkappaB alpha and A20 [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(15): 2093-2101.
- [16] Wang, RF, Miyahara Y, Wang HY. Toll-like receptors and immune regulation: Implications for cancer therapy [J]. *Oncogene*, 2008, 27(2): 181-189.
- [收稿日期] 2010-04-27 [修回日期] 2010-05-25
[本文编辑] 王莹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

化学元素和核素符号规范书写的要求

化学符号虽然是化学专业的学术交流语言,但在生物医学领域也有很广泛的使用。化学符号的书写有其特殊的规律和要求,生物医学论文中必须重视化学符号书写的规范化。根据 GB3102. 8-93《物理化学和分子物理学的量和单位》的规定,把化学元素和核素符号书写的规范要求介绍如下:

- (1) 元素或核素的单字母符号均用正体大写,双字母符号首字母正体大写,第二个字母用正体小写。
- (2) 核素的核子数(质子数)应标注在元素符号的左上角,例如: ^{60}Co , ^{32}P , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{125}I 等;过去习惯把核子数标注在元素符号右上角的写法是错误的,例如: N^{14} , Co^{60} 等。
- (3) 离子价态的字符应标注在元素符号的右上角,例如: H^+ , Cl^- , O^{2-} , Mg^{2+} , Al^{3+} , PO_4^{3-} 等,不应写成 O^{-2} , O^{--} , Mg^{+2} , Mg^{++} , Al^{+++} , PO_4^{-3} 等。
- (4) 激发态的字符(电子激发态用 * ; 核子激发态用正体 m, 也可用 *)标注在元素或核素符号的右上角,例如: $^{110}\text{Ag}^{\text{m}}$, $^{110}\text{Ag}^*$, He^* , NO^* 等。
- (5) 分子中核素的原子数标注在核素符号右下角,例如: H_2 , FeSO_4 等。
- (6) 质子数(原子序数)标注在元素符号左下角,例如: $_{82}\text{Pb}$, $_{26}\text{Fe}$ 等。
- (7) 对于形状相似的元素符号、化合物的化学式符号,书写时应注意区分,如:Co(钴)—CO(一氧化碳),No(锘)—NO(一氧化氮),Ba(钡)—Ra(镭),Nb(铌)—Nd(钕)—Np(镎),HF(氟化氢)—Hf(铪)等。

(本刊编辑部)