

短发夹 RNA 介导 RNA 干扰的时间和剂量效应研究*

何国平¹⁾ 张思仲^{1)**} 王英成²⁾ 肖翠英¹⁾ 马用信¹⁾
许文明¹⁾ 丁 兰¹⁾ 陶大昌¹⁾ 孙 岩¹⁾ 陈玉娟¹⁾

¹⁾四川大学华西医院医学遗传学研究室, 人类疾病基因组学研究室, 人类疾病生物治疗国家重点实验室, 成都 610041;

²⁾四川大学华西医院精神科实验室, 成都 610041)

摘要 用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术抑制哺乳动物细胞中外源报告基因的表达, 以探讨该过程中 RNAi 作用的剂量和时间效应. 应用 Lipofectamine 2000 将外源报告基因的表达载体与编码短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 的质粒共转染 HEK293H 细胞, 观察 shRNA 载体对报告基因的抑制效应. 转染后, shRNAs 的瞬时表达可特异地抑制细胞内报告基因的表达. 在共转染后 12, 24, 48, 60, 72, 96 h 时检测 EGFP (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 基因 mRNA 及蛋白质表达水平, 结果显示, EGFP mRNA 及蛋白质表达在 12 h 时略有降低, 24~48 h 时表达逐渐降低, 48~72 h 时降低最明显, 其后 EGFP 表达水平逐渐恢复. 提示该过程中 RNAi 效应呈现由弱到强、又由强到弱的逐渐消逝趋势. 共转染一系列剂量比例的 EGFP 干扰载体与靶载体的结果表明, 在一定剂量范围内, RNA 干扰载体所介导的抑制效应与干扰载体剂量大小有关, 当其剂量进一步加大足以抑制外源基因表达时, 抑制效应则维持在一“平台期”. 此外, 通过 RNAi 抑制 HeLa 细胞、HEK293 细胞中荧光素酶基因的表达, 荧光素酶活性变化也表现出上述类似的效应. 这些结果表明, 在体外哺乳动物细胞中, 基于表达载体的 RNAi 作用呈现剂量和时间依赖性效应. 这为基于载体表达的 RNAi 技术应用研究提供了一定的理论参考及依据. **关键词** RNA 干扰, 短发夹 RNA, 报告基因, 共转染, 时间和剂量效应

学科分类号 Q522

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 现象首先在秀丽新小杆线虫的研究中被发现^[1], 它通过双链 RNA 介导同源靶 mRNA 的特异性降解, 导致转录后的基因沉默^[2]. 作为一种高效、特异的调节基因表达技术, RNAi 可以较容易地制备特定基因缺失表型的个体, 方便快捷地研究该基因的功能. 利用 RNAi 技术可抑制线虫基因组约 86% 的基因, 并鉴定其突变表型^[3]. 在果蝇中则已用于 Hedgehog 通路相关基因的筛查^[4]. 此外, RNAi 技术也为探索治疗人类重大疾病开辟了新的途径. 如用 RNAi 阻碍 K-RAS 蛋白的表达, 以抑制肿瘤发生^[5]、抑制人免疫缺陷病毒复制^[6]、治疗肝炎^[7]甚至研制治疗严重急性呼吸道综合征 (SARS) 的药物.

研究表明, 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 可在哺乳动物细胞中诱导特异性的基因沉默^[8]. siRNA 可通过化学合成、体外转录或核酸内切酶降解等途径生成. 但化学合成昂贵, 内切酶切割可导致非特异性效应, 且 siRNA 瞬时转染导致的沉默效应持续时间短, 因此众多研究者采用将靶向特异基因 (如 Lamin A/C、P53、GFP、荧

光素酶基因、CD8) 的干扰表达质粒导入细胞, 再在 pol III (H1/U6) 启动子控制下体内表达小发夹 shRNA (small hairpin RNA, shRNA)^[9-13]. shRNA 在 Dicer 酶作用下转化成 21~25 nt 的 siRNA, 可导致细胞靶基因持续、特异的改变. 由此产生的 RNAi 可克服上述缺点, 而且基因抑制效果显著.

在 RNAi 的应用研究中, 确定 siRNA/shRNA 的最佳作用时间、作用浓度以及降低副反应的最适剂量十分重要. Barbara 等^[14]在 siRNA 瞬时转染实验中发现, RNAi 效应呈现明显的剂量和时间依赖性. Naoki 等^[15]报道, 小鼠体内注射 shRNA 干扰载体可介导剂量和时间依赖性 RNAi 效应. 但在体外增殖的哺乳动物细胞中, shRNA 干扰载体介导的 RNAi

*国家高技术“863”计划资助项目 (2001AA216091) 和国家自然科学基金资助项目 (30470656, 30371491).

** 通讯联系人.

Tel: 028-85422749, Fax: 028-85501518

E-mail: szzhang@mcwccums.com

收稿日期: 2004-09-27, 接受日期: 2004-12-01

是否也存在类似效应目前尚未见报道. 因此, 有必要在体外哺乳动物细胞株中进一步验证上述效应.

本研究中, 我们选择半衰期仅 1 h 的非稳定型载体 pd1EGFP、表达荧光素酶(luciferase)的 pGL3-control 及表达红色荧光蛋白的 pdsRed2 为靶载体, 构建了一系列相应的 shRNA 干扰载体并与靶载体共转染于 HEK293H 细胞. 在 pAV-d1EGFP 转染后 12、24、48、60、72、96 h 时检测 EGFP mRNA 及蛋白质表达变化, 以探讨 RNAi 作用的时间效应; 同时, 共转染一系列剂量比例的 pd1EGFP 与 pAV-d1EGFP, 在基因抑制明显的时间点检测 GFP mRNA 及蛋白质表达变化, 以了解这种 RNAi 效应是否存在剂量依赖性. 此外, 在 HeLa 细胞中, 通过类似的方法还验证了针对 luciferase 报告基因的 RNAi 效应. 现将结果报道如下.

1 材料与方法

1.1 试剂

pAVU6+27 及 pCMV β -gal 由 Michigan 大学 Engelke 教授惠赠, pdsRed2 表达载体由哈佛大学医学院 Krichevsky 教授惠赠, pd1EGFP、pGL3-control 由本室保存. *Sal* I、*Xba* I、*Xho* I、*Bam*H I、PUC19 DNA/*Msp* I Marker、CIAP(MBI 公司), T4 多聚核苷酸激酶、T4 DNA 连接酶、RNA PCR kit (AMV) Ver3.0(Takara 公司), 小提质粒试剂盒 (Omega 公司), Plasmid Mini Kit (Cat#12123, Qiagen 公司), DMEM、FBS、青链霉素、胰酶、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、Tris、SDS、CHAPS、OPTI-MEM I、LipofectamineTM 2000 (Cat#11668-027)、TRIzol 总 RNA 提取试剂 (Cat#15596-026) 及硝酸纤维素膜均购于 Invitrogen 公司. Luciferase Assay System kit (Cat#E2000、

E1500, Promega 公司), BD Living ColorsTM A.v Peptide Antibody (Cat#8367-2, Clontech 公司), Actin (I-19) (Cat#sc-1616)、兔抗山羊 IgG (Cat#ZB-2306)、山羊抗兔 IgG (Cat#ZB-2301) 均购于 Santa Cruz 公司, ProSieve Color Protein Marker (Cat#50550). 其他均为国产试剂, 所有溶液均用 Milli-Q 水配置.

1.2 shRNA 表达载体构建

1.2.1 寡核苷酸设计. 利用 siRNA designer 软件 (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html), 结合文献报道, 选取 GFP、RFP、luciferase 基因的 19 nt siRNA 正义链序列, 并经 BLAST 证实与人类基因组其他序列无 100% 同源性. 将上述序列按以下方式进行 shRNA 正义链组装: 19 nt 正义链设计序列 + 茎环序列 + 19 nt 倒置的反义链序列 + TTTTT (转录终止序列). 在 shRNA 双链左、右端分别添加 *Xho* I 及 *Xba* I 酶切位点, 合成上述各寡核苷酸. GFP shRNA 正义链: 5' TCGAGG AAGCAGCACGACTTCTTCTTCGGAAGAAGTCG TGCTGCTTCTTTTT 3'; GFP shRNA 反义链: 3' CTTCGTCGTGCTGAAGAAGAAGCCTTCTTCAG CACGACGAAGAAAAAGATC 5'; RFP 正义链: 5' TCGAGAGTTCCAGTACGGCTCCAATTCGTTG GAGCCGTACTGGAAGCTTTTT 3'; RFP 反义链: 3' CTCAAGGTCATGCCGAGGTTAAGCACCTCG GCATGACCTTGAAAAAGATC 5'; Luciferase 正义链: 5' TCGAGTCGAAGTACTCAGCTAA GTTCGCTTACGCTGAGTACTTCGATTTTT 3'; Luciferase 反义链: 3' CAGCTTCATGAGTCG CATTCAAGCGAATGCGACTCATGAAGCTAAAA AGATC 5'. 如图 1 所示.

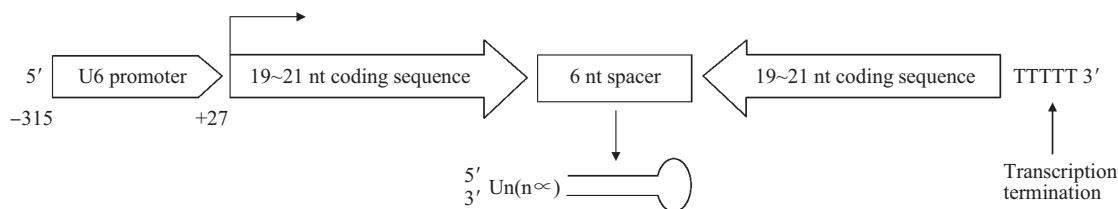


Fig.1 Schematic design of oligonucleotide for generation of hairpin RNA in the cell

1.2.2 DNA 单链退火及磷酸化. 将合成的寡核苷酸 (oligos) 用 MilliQ- 水稀释成 1 g/L, 按以下反应体系进行体外退火: 44 μ l 退火缓冲液 + 3 μ g 正义链 oligos + 3 μ g 反义链 oligos (退火缓冲液: 100 mmol/L

醋酸钾, 30 mmol/L Hepes-KOH pH 7.4, 2 mmol/L 醋酸镁). 退火程序: 95 $^{\circ}$ C 10 min, 70 $^{\circ}$ C 15 min, 以 0.1 $^{\circ}$ C/min 降温至 4 $^{\circ}$ C, 4 $^{\circ}$ C 10 min. 用 T4 激酶对退火产物进行 5'端磷酸化反应.

1.2.3 shRNA 表达载体构建. *Sal* I 过夜酶切 pAVU6+27, 核酸纯化法回收酶切产物后, 再用 *Xba* I 过夜酶切, 核酸回收, CIAP 处理, 1%琼脂糖电泳鉴定. 将 1.2.2 中经磷酸化的 shRNA DNA 双链与具 *Sal* I 及 *Xba* I 粘末端的 pAVU6+27 载体用 T4 DNA 连接酶过夜连接, 连接产物转化 DH5 α 感受态细菌, 氨苄青霉素 (100 g/L) LB 平板抗性筛选. 次日挑取阳性克隆, 在含氨苄青霉素 (100 g/L) 的 LB 培养基中 250 r/min 37 $^{\circ}$ C 震荡培养 14~16 h, 小量提取质粒, 随后用 *Xho* I 及 *Bam*H I 37 $^{\circ}$ C 双酶切 6 h, 2%琼脂糖电泳鉴定. 阳性克隆载体送上海生工生物工程技术服务有限公司测序验证 (High GC content protocol), 测序引物为: 5' TCTTGG GTAGTT TGCAG 3'.

1.3 细胞培养与脂质体转染

1.3.1 细胞培养. HEK293H、HeLa 细胞株为本室培养维持, 用 DMEM 高糖培养基、10%胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、1%青链霉素 (penicillin streptomycin, PS) 培养. 0.25%胰酶用于消化细胞, 常规计数、冻存, 数码荧光倒置显微镜 Olympus IX71 用于细胞形态观察并摄像.

1.3.2 转染条件的优化. pCMV β -gal 质粒可用于监测转染条件、确定转染效率及作为荧光素酶活性检测的内参使用. 转染前, 对 HEK293H、HeLa 细胞株的转染条件进行优化, 即确定最佳脂质体试剂和 DNA 的量. 转染前一天, 胰酶消化并计数细胞, 24 孔板接种, 使其在转染日密度为 85%~90%. 对于每孔细胞, 分别使用 50 μ l OPTI-MEM I 培养基稀释 Lipofectamine 2000 (LF2000) 及 pCMV β -gal, 四组实验中质粒 pCMV β -gal 分别加入 100 ng、200 ng、300 ng、400 ng, 而每组 6 孔的 LF2000 的量依次为 0.2 μ l、0.4 μ l、0.6 μ l、0.8 μ l、1.0 μ l、1.2 μ l. 37 $^{\circ}$ C, 5%的 CO $_2$ 中保温培养 48 h 后裂解细胞, 以 ONPG 检测 β -半乳糖苷酶 (gal) 活性 (Part #TB079, Promega 公司). 一旦确定了优化的条件, 转染实验可以根据培养板表面积增加的比例线性放大.

1.3.3 瞬时转染效率的测定. 用 β -gal 原位染色确定转染效率. 6 孔板上培养 HEK293H、HeLa 细胞, 依据优化的转染条件转染 1 μ g pCMV β -gal, 48 h 后收获细胞, 每孔用 2 ml 含钙镁 D-PBS 润洗细胞 1 次, 室温用 1 ml 固定液 (2%甲酰胺, 0.05%戊二醛的 D-PBS) 固定 5 min, 继以 2 ml D-PBS 洗 2 次, 每孔加入底物 / 染液溶液 (5 mmol/L 铁氰化

钾, 5 mmol/L 亚铁氰化钾, 2 mmol/L 氯化镁的 D-PBS, 1 g/L X-gal) 1 ml 并在 37 $^{\circ}$ C 温育过夜. 次日每孔加入 2 ml D-PBS 润洗, 在倒置显微镜下观察细胞, 并估计蓝色细胞 (β -gal 阳性) 的比例. 每孔随机计数 100 个细胞, 共计数 6 个培养孔. 以上过程独立重复 3 次, β -gal 阳性细胞占总细胞百分比的平均值代表该细胞株的转染效率.

1.3.4 干扰质粒的脂质体转染. 采用 6 孔板或 35 mm 细胞培养皿, pd1EGFP、dsRed2 的加入量为 0.2 μ g, pGL3-control 为 0.3 μ g. 在 RNAi 特异性证实过程中, RNAi 质粒按 1:8 (靶质粒 / 效应质粒) 加入, 最后所有转染组用 pAVU6+27 将质粒 DNA 量补足至 1.8 μ g. 在 RNAi 时间效应实验中, RNAi 质粒按 1:10 即 2.0 μ g 的量加入, 所有转染组用 pAVU6+27 将质粒 DNA 量补足至 2.20 μ g. 在 RNAi 的剂量效应实验中, psh-d1EGFP 的加入量按靶质粒 / 效应质粒的梯度比例 1:1 (0.2 μ g)、1:2 (0.4 μ g)、1:4 (0.8 μ g)、1:8 (1.6 μ g)、1:10 (2.0 μ g)、1:15 (3.0 μ g)、1:20 (4.0 μ g) 加入, 所有转染组用 pAVU6+27 将质粒量补足至 4.2 μ g, 转染 48 h 后收获细胞行下一步检测. 在针对 luciferase 基因的 RNAi 实验中, HEK293H 或 HeLa 细胞中共转染靶质粒 (pGL3-control/pCMV β -gal=3:1) 与效应质粒 psh-pGL3, 两者比例为 1:8, 转染组均用 pAVU6+27 将质粒 DNA 量补足平衡. luciferase 活性检测依据 Luciferase Assay System (Part #TB281) 程序, pCMV β -gal 分析同上.

1.4 RNAi 的半定量 RT-PCR 检测

收获预定时间点的培养细胞, 用 TRIzol 提取细胞总 RNA 后, 立即冰上分装、冻存 (-80 $^{\circ}$ C), 余样用于 RNA 浓度测定, 并调整样品至同一工作浓度. RT-PCR 采用引物如下: EGFP 上游 5' ATTCTGCAGTCGACGGTACC 3', 下游 5' GTAGGTCAGGGTGGTCACGA 3', 扩增片段长度为 249 bp; 内对照 GAPDH 上游 5' GGA CCTGACCTGCCGTCTAGAA 3', 下游 5' GGTGTCGCTGTTGAAGTCAGAG 3', 扩增片段长度为 141 bp. 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 2 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 40 s (EGFP)/58 $^{\circ}$ C 40 s (GAPDH), 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 33 个循环. 根据内对照 GAPDH 与上述各基因 PCR 产物的电泳条带相对强度, 用 Glyko Bandscan4.5 软件确定 mRNA 的抑制效率.

1.5 RNAi 的半定量蛋白质印迹检测

收获预定时间点之培养细胞, PBS 洗 2 次, 加

入 200 μ l 细胞裂解液冰上充分裂解 15 min, 超声短暂处理后分装. 用 Bradford 法测定余样蛋白质浓度, 并调整至同一工作浓度, 加入 5 $\times$ 上样缓冲液, 沸水浴 5 min. 制备 12% (EGFP 分析) 或 10% (Actin 分析) 聚丙烯酰胺凝胶, 点样 Protein Marker, 50~200 V 电泳 40~60 min. 电泳结束后, 在 1 $\times$ 转膜缓冲液中, 于 0 $^{\circ}$ C、100 V 100 min 条件下将蛋白质充分转移至硝酸纤维膜上. 转膜结束后, 1 $\times$ TBS 洗膜 5 min, 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后, 4 $^{\circ}$ C 一抗 (1: 200) 孵育过夜. 次日回收一抗, 1 $\times$ TBST 洗膜 5min /3 次, 加入 HRP 偶联的二抗, 室温下孵育 1 h, 1 $\times$ TBST 洗膜 5 min /3 次. 将膜置于 A 液 [8.8 ml H₂O, 1 mol/L Tris (pH 8.5), 100 μ l Lum, 44 μ l Cou] 及 B 液 [9.0 ml H₂O, 1 mol/L Tris (pH 8.5), 6 μ l H₂O₂] 的混合液中 1 min, 按 ECL 化学发光法常规显影、定影并检测膜上印迹的蛋白. 待目的蛋白检测完毕后, 1 $\times$ TBST 重新洗膜, 二抗孵育, 以检测内对照 Actin 的蛋白质表达. 用 Glyko Bandscan 4.5 软件分析 Actin 与目的蛋白条带灰度比例, 以确定其抑制程度.

2 结 果

2.1 shRNA 阳性克隆载体的鉴定

提取质粒后, *Xho* I 及 *Bam*H I 双酶切正常 pAVU6+27 载体酶切出现一约 400 bp 左右片段, 阳性 shRNA 重组体则为 450 bp, 如图 2 所示.

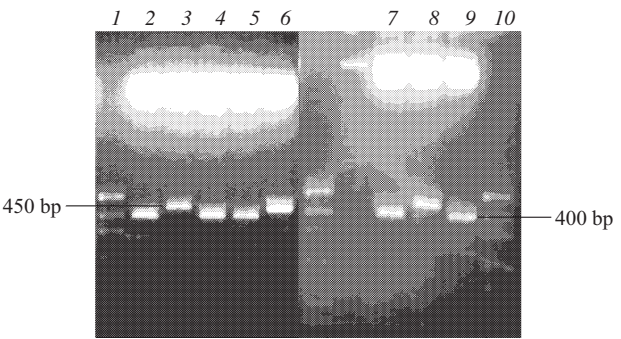


Fig.2 Identification of postive clones of shRNA expression vectors
About 450 bp bands of positive clones were observed by 2% agrose electrophoresis.

2.2 转染条件的优化及转染效率测定

由图 3 可知, β -gal 活性不仅取决于 Lipofectamine2000 (LF2000) 和 DNA 量的多少, 更决定于两者合适的比例. 在 HEK293H 细胞中, 200 ng/0.6 μ l、300 ng/0.8 μ l、400 ng/1.0 μ l 组合所测的 β -gal 活性在各组中居最高, 当 DNA/LF2000 比例为 1:2.5 时 β -gal 活性达最高, 进而确定 HEK293H 细胞中 DNA/ LF=1:2.5. 同理, 在 HeLa 细胞中, DNA/ LF2000 的合适比例为 1:3. 利用优化的转染条件, 我们转染 1 μ g pCMV β -gal, 48 h 后收获细胞并进行 β -gal 原位染色. 结果表明, 蓝色 HEK293 阳性细胞占总计数细胞的比例约为 88%~94%, 平均 91.6%, 而 HeLa 细胞的转染效率则为

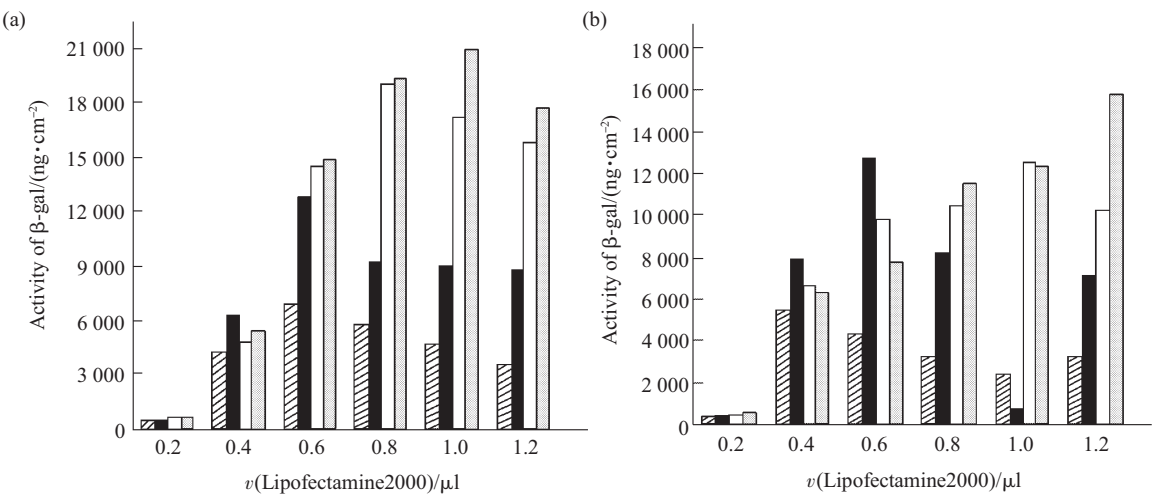


Fig.3 Optimization of Lipofectamine 2000

HEK293H (a) or HeLa (b) cells cultured in 24-well plate was transfected with pCMV β -gal using Lipofectamine 2000. β -galactosidase activity was analysed after 48 h. ▨: 100 ng; ■: 200 ng; □: 300 ng; ▤: 400 ng.

79%~85%，平均 82.6%。此外，我们也曾用 LF2000 将 pd1EGFP 导入上述两细胞中，转染 48 h 后，在荧光显微镜下计数具发绿色荧光的细胞数 (计算 100 个细胞)，三次独立实验的平均值接近上述数据。

2.3 shRNA 的瞬时表达对外源报告基因的干扰效应

在 HEK293H 细胞中共转染 psh-pGL3 与 pd1EGFP/dsRed2，图 4a 和 b 所示，针对 luciferase 的 RNAi 载体不能抑制 EGFP 及 RFP 的表达，荧光细胞数及荧光强度与对照组图 4g 和 h 无差异。图 4c 和 f 所示，转染 48 h 后，psh-d1EGFP 及

psh-dsRed2 能显著抑制 EGFP、RFP 的表达。荧光显微镜下，表达绿 / 红色荧光蛋白的细胞数明显减少，荧光强度亦明显降低。共转染 psh-d1EGFP 与 pdsRed2 却不能抑制 RFP 的表达，如图 4d 所示，RFP 的荧光强度与图 4h 无差异；同样，图 4e 所示，共转染 psh-dsRed2 与 pd1EGFP 亦不能抑制 EGFP 的表达，EGFP 表达与图 4g 无差异。此外，半定量 RT-PCR 及蛋白质印迹的实验结果表明 (图 5 和 6)，转染 48 h 后，psh-d1EGFP 的瞬时表达对靶基因 mRNA 及蛋白质表达抑制效率达 84.5%、75.6%。

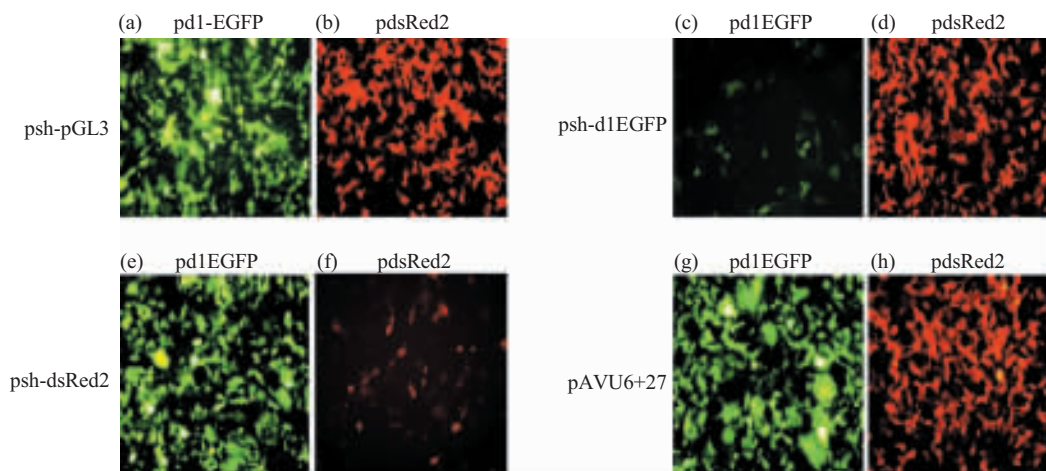


Fig.4 Specificity of RNA interference mediated by shRNA

Cotransfection of pd1EGFP and psh-pGL3, psh-d1EGFP, psh-dsRed2 or pAVU6+27 in HEK293H cell, indicated as (a), (c), (e) and (g) respectively. Cotransfection of pdsRed2 and psh-pGL3, psh-d1EGFP, psh-dsRed2 or pAVU6+27, indicated as (b), (d), (f) and (h) respectively. After 48 h, representative fluorescent pictures imaged by Olympus IX71 indicated as above. Each magnified by 10×20 times.

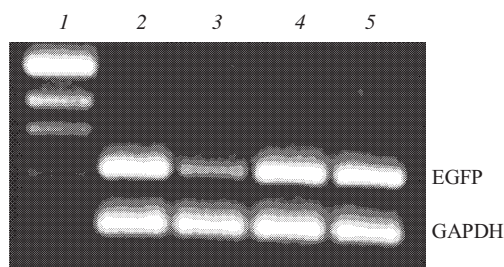


Fig.5 Validation of the specificity of psh-EGFP-mediated RNA interference by RT-PCR

The expression of EGFP mRNA in HEK293H cells cotransfected with pd1EGFP and pAVU6+27, psh-d1EGFP, psh-dsRed2 or psh-pGL3 respectively after 48 h, indicated as lane 2~5. Lane 1 represented PUC19 DNA/*Msp* I marker. GAPDH set as internal control.

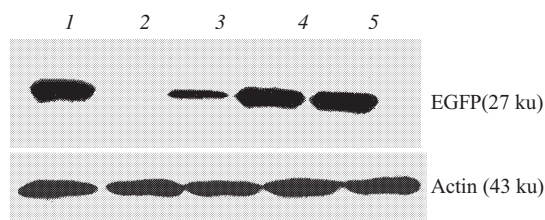


Fig.6 Validation of the specificity of psh-EGFP-mediated RNA interference by Western blot

The expression of EGFP in HEK293H cell cotransfected with pd1EGFP and pAVU6+27, psh-d1EGFP, psh-dsRed2 or psh-pGL3 respectively after 48 h, indicated as lane 1,3,4,5. Lane 2 showed blank control only transfected with pAVU6+27. Actin set as internal control.

2.4 psh-d1EGFP 介导时间依赖性 RNAi 效应

HEK293H 细胞中共转染 pd1EGFP 及 psh-d1EGFP, 在转染后不同时间点检测靶基因 mRNA 及蛋白质的表达 (均设立阴性对照). 结果表明, EGFP mRNA 表达在转染 12 h 后即有微弱的降低(图 7b), 但 6 h 点无变化, 说明细胞内 siRNAs 的生成需一定时间诱导表达. 转染后 24 h (图 7c), 发绿色荧光的细胞数已明显减少, 荧光强度也相应

降低, 此时 mRNA 及蛋白质表达抑制率分别为 58.4%、47.5%. 在转染 48~72 h 内 (图 7d~f), 表达 EGFP 的细胞数量大为减少, 荧光强度明显降低, mRNA 表达抑制率分别为 81.7%、89.6%、70.6%, 蛋白质表达抑制率分别为 71.5%、82.0%、58.4%, 即 72 h 的抑制率已不如 48 h 明显; 同样, 在转染 96 h 后 (图 7g), EGFP 表达水平基本已恢复, 荧光强度相对 72 h 明显增加. 结果见图 7~9.

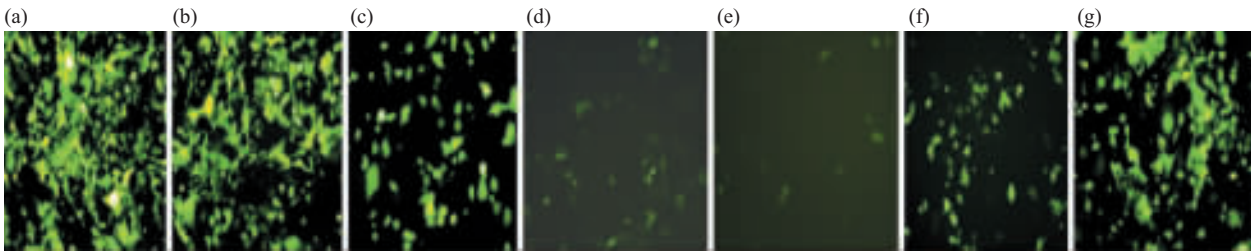


Fig.7 Time-dependent RNA interference mediated by psh-d1EGFP

Cotransfection of pd1EGFP and psh-d1EGFP in HEK293H cell. Representative fluorescent images were selected at 12, 24, 48, 60, 72 and 96 h after transfection, indicated as (b)~(g) correspondingly. Only transfection of pd1EGFP after 12 h, indicated as (a). Each magnified by 10×20 times.

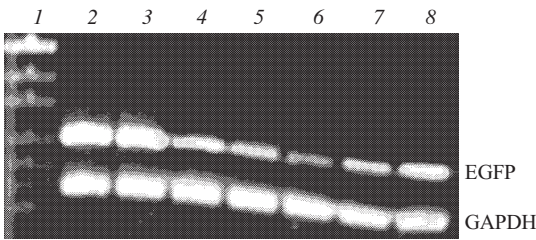


Fig.8 Time-dependent RNA interference validated by RT-PCR

The expression of EGFP mRNA was detected in HEK293H cells cotransfected with pd1EGFP and psh-d1EGFP at 12, 24, 48, 60, 72, 96 h after transfection, indicated as lane 3~8. Lane 1,2 represented PUC19 DNA/*Msp* I marker and 12 h transfection of pd1EGFP respectively. GAPDH set as internal control.

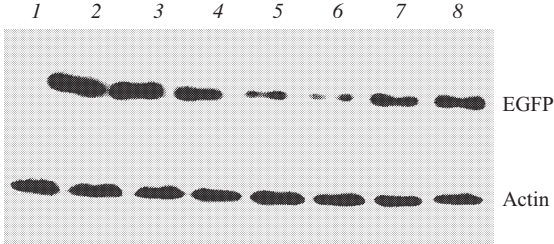


Fig.9 Time -dependent RNA interference validated by Western blot

The expression of EGFP was detected in HEK293H cells cotransfected with pd1EGFP and psh-d1EGFP at 12, 24, 48, 60, 72 and 96 h after transfection, indicated as lane 3 ~8. Lane 1,2 represented 12 h transfection of pAVU6+27 and pd1EGFP respectively. Actin set as internal control.

2.5 psh-d1EGFP 介导的剂量依赖性 RNAi 效应

为确定 psh-d1EGFP 介导的 RNAi 效率是否与干扰载体的剂量有关, 我们运用一系列梯度比例的 pd1EGFP /psh-d1EGFP 共转染 HEK293H 细胞. 48 h 后收获细胞, 检测 mRNA 及蛋白质表达情况. 结果表明, 低剂量 (0.2 μ g) psh-d1EGFP 的转染仅能轻度抑制 EGFP 的表达, 随着剂量的加大, RNAi 抑

制效应逐渐增强, mRNA 及蛋白质表达抑制率在 1.6 μ g 时已达 82.5%、73.8%, 当干扰载体的剂量进一步加大(2.0 ~ 4.0 μ g), 基因表达受抑制仅较 1.6 μ g 时略有降低, 呈现类似“平台效应”的抑制作用, mRNA 及蛋白质表达抑制率维持在 90.8%~92.4%及 88.5%~90.6%水平(图 10~12).

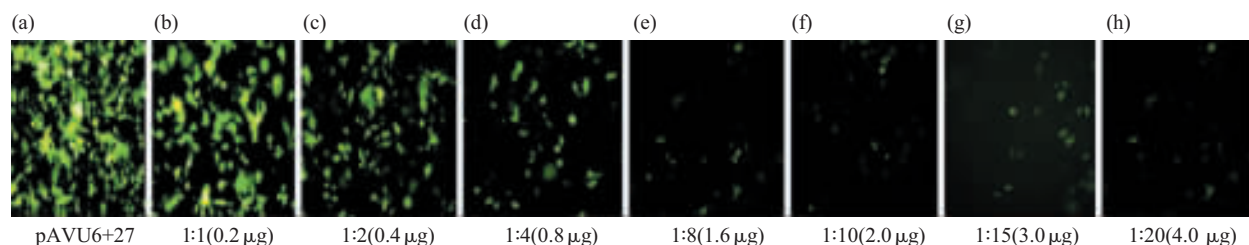


Fig.10 Dose-dependent RNA interference mediated by psh-d1EGFP

Cotransfection of a series of dose-proportional pd1EGFP and psh-d1EGFP into HEK293H cells, dose displayed as below. After 48 h transfection, representative fluorescent images were indicated as (b)~(h) respectively. Only transfection of pd1EGFP after 48 h, displayed as (a). Each magnified by 10×20 times.

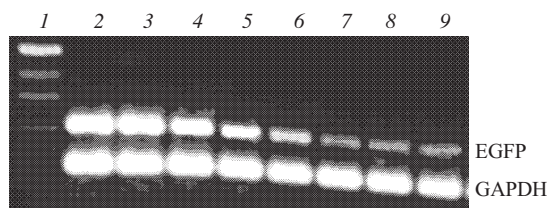


Fig.11 Dose-dependent RNA interference validated by RT-PCR

The expression of EGFP mRNA was detected in HEK293H cells cotransfected with a series of dose-proportional pd1EGFP and psh-d1EGFP, indicated as lane 3~9. Lane 2 represented 48 hours' transfection of pd1EGFP only, lane 1 represented PUC19 DNA/*Msp* I marker. GAPDH set as internal control.

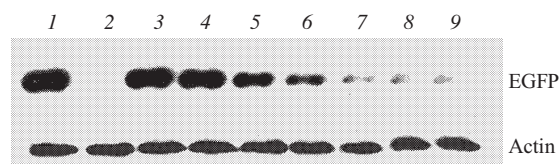


Fig.12 Dose-dependent RNA interference validated by Western blot

The expression of EGFP was detected in HEK293H cells cotransfected with a series of dose-proportional pd1EGFP and psh-d1EGFP, indicated as lane 3~9. Lane 1,2 represented 48 hours' transfection of pd1EGFP and pAVU6+27 respectively. Actin set as internal control.

2.6 psh-pGL3 介导的时间和剂量依赖性的 RNAi 效应

为进一步验证哺乳动物中 RNAi 的上述效应, 我们通过干扰荧光素酶报告基因并检测其 RNAi 效率. 为排除转染效率等因素对 RNAi 的影响, 实验中同时测定 luciferase 及 β -gal 活性, 其结果以两者

比值大小表示. 阴性组测定的比值标准化为 1, 各实验组 / 阴性组测定结果可代表各组 RNAi 作用效率大小. 在转染 HeLa 及 HEK293H 细胞的不同时间点 (12, 24, 48, 60, 72, 96 h) 裂解细胞, 照度计 (luminometer) 上读取 Luciferase 光强度值, 并同时测定 β -gal 活性. HEK293H 细胞中, 24 h Luciferase

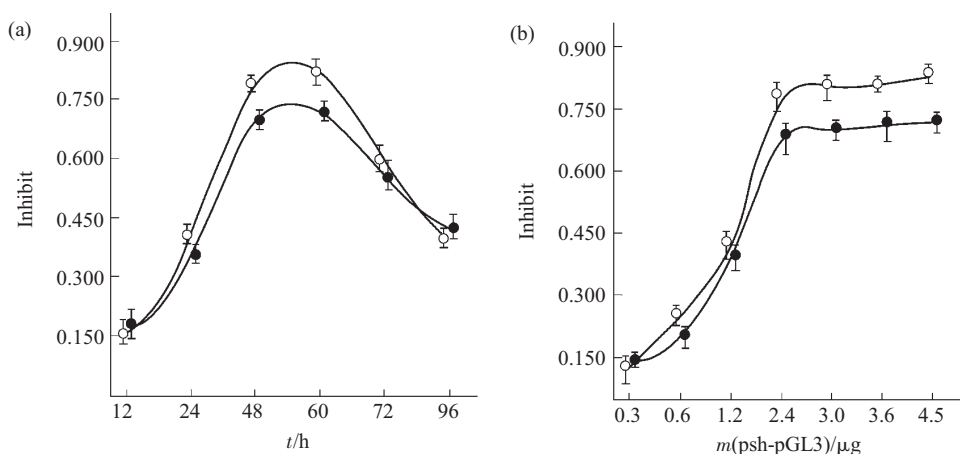


Fig.13 Time- and dose- dependent RNA interference mediated by psh-pGL3

Inhibitory efficiency of RNA interference targeting luciferase gene in HEK293H and HeLa cell, described as means $\pm 95\%$ confidence interval. (a) Time-dependent effect, (b) Dose-dependent effect. $\circ$ — $\circ$: HEK293H, $\bullet$ — $\bullet$: HeLa.

表达抑制率为 41.0%，48、60、72 h 分别达 79.2%、82.0%、60.0%，至 96 h 已明显下降为 40%；在 HeLa 细胞中，12、24、48、60、72、96 h 抑制率分别为 18.0%、36.2%、70.0%、72.3%、56.0%、42.7%。此外，我们运用一系列剂量梯度的 psh-Luciferase 共转染 HeLa 及 HEK293H 细胞，48 h 后检测结果表明，0.2 μg 的 psh-luciferase 仅引起 Luciferase 的轻度抑制，随着剂量加大，抑制效应逐步增强，1.6 μg 剂量的干扰载体抑制率已达 68.4%(HeLa)、78.2%(HEK293H)，随后的剂量 (2.0 ~ 4.0 μg) 抑制效应呈现类似的“平台效应”，Luciferase 抑制率维持在 80.1%~83.5%(HEK293H)、70.0%~71.8%(HeLa)。结果见图 13。

3 讨 论

RNAi，即双链 RNA 介导的同源 mRNA 特异性降解过程。其机制为，暴露于细胞内的 dsRNA 首先被加工成 21~23 nt 的 siRNA，随后形成的 RNA 诱导沉默复合物则介导了 mRNA 的特异性降解^[2]。然而在哺乳动物体细胞中，长度大于 30 bp 的 dsRNA 将诱导产生干扰素反应，表现为广泛的蛋白质合成抑制、诱发细胞凋亡^[16,17]。2002 年，Tuschl 等^[8]报道 21~25 nt 长度的 siRNA 可以诱导基因特异性的沉默。但瞬时转染所致的沉默效应持续时间短 (约 5~7 天)，不便于得到基因功能的完整信息。此后，多个研究小组则运用含有 RNA 聚合酶 III U6 或 H1 启动子的表达载体，它在细胞内可转录 shRNA，最终导致了靶基因的特异性抑制。由此介导的 RNAi 效果显著，流程设计简便，而且经过合适的抗药性筛选，可以获得稳定表达株并用于长期功能缺失研究。

本研究运用 pAVU6+27 表达载体，其转录本包含人类 U6 RNA 前 27 个核苷酸，在细胞内可被 γ - 甲基磷酸盐“修饰”而维持较高的水平^[9]。参考文献[12,18,19]，我们利用了针对绿 / 红色荧光蛋白、海肾荧光素酶 (luciferase) 基因的高效 RNAi 靶序列，并构建了相应的 pAV-shRNA 表达载体。对于报告基因，我们选用了半衰期仅 1 h 的非稳定型 d1EGFP。d1EGFP 快速诱导表达变化能防止蛋白质的沉积，使细胞具有较低的荧光背景^[20]；该载体灵敏度高，结合半定量 RT-PCR 及蛋白质印迹检测，能实时、准确地反映基因表达的动力学变化。由于共转染涉及多种因素，即使每一组转染等量的质

粒，也可能由于转染效率的差异、细胞类型的不同而使进入细胞的质粒数量不同。因此，我们首先对转染条件进行了优化，确定了 HEK293H、HeLa 细胞中脂质体和 DNA 量的合适比例。其次，转染实验中为确保细胞接受靶质粒的同时也能接受 RNAi 质粒，靶质粒 / 效应质粒按 1:8 或更高比值，经验证能介导显著的干扰效应。

我们在 HEK293H 细胞中共转染 pd1EGFP 及 psh-d1EGFP，以量化的指标动态反应 mRNA 及蛋白质表达变化。通过检测发现，RNAi 效应最早可在转染后 12 h 出现。表明 psh-d1EGFP 的表达需要一定时间的诱导，该过程可能涉及细胞核内 shRNA 的转录及胞质运输过程。转染 24~48 h 后，随着细胞内干扰载体表达量增加，表达 EGFP 的细胞数量减少，荧光强度也相应降低。48~72 h 内，这种 RNAi 作用进一步增强，抑制效率达一峰值。此后，EGFP 表达水平较前有所恢复，可能系干扰质粒随细胞分裂而稀释。由此可见，基于载体表达的 RNAi 具有明显的时间效应，其抑制基因表达不仅取决于转染因素，还可能与 shRNA 转录效率及 RNAi 转录体的核定位及运输有关。此外，RNAi 的剂量效应结果表明，在一定剂量范围内，RNA 干扰载体所介导的抑制效应与其剂量有关，即转染的 RNAi 质粒越多，抑制效果越强，这与 Paddison 等^[12]报道的结论基本一致，当转染的 RNAi 载体量进一步增加，细胞内累积的 RNA 干扰载体可转录更多的 shRNA，足以抑制外源基因表达时，mRNA 抑制效应则维持在一“平台期”。为进一步验证上述效应，在 HEK293H 或 HeLa 细胞中针对 Luciferase 基因进行 RNAi 研究。结果表明，Luciferase 活性在 12 h 即有降低，此后这种抑制作用逐渐增强，至 60 h 达一峰值后抑制逐渐减弱，表达水平逐步恢复。剂量效应实验也表明，在一定剂量范围内，抑制效应与载体的剂量成线性增加，超过一定界限，抑制效应呈现类似的“平台效应”，得出与上述针对 EGFP 基因 RNAi 相类似的结论。

总之，以上实验结果表明，RNAi 效应不仅取决于转染效率，还与细胞类型、转染时间及载体剂量等因素有关。值得注意的是，shRNA 表达质粒在细胞内转录生成 siRNA，其介导的 RNAi 效应可能具有一定的累积效应，并具有分子药物代谢动力学特点。在基于载体表达的 RNAi 应用研究中，这种时间及剂量依赖性的 RNAi 效应具有一定的实际运

用价值及意义.

致谢 感谢 Michigan 大学 Engelke 教授惠赠 pAVU6+27 及 pCMV β -gal 载体, 感谢哈佛大学医学院 Krichevsky 教授惠赠 pdsRed2 载体.

参 考 文 献

- 1 Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998, **391**(6669): 806~811
- 2 Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous gene in trans. Plant Cell, 1990, **2** (4): 279~289
- 3 Ravi S K, Andrew G F, Yan D, *et al.* Systematic functional analysis of the caenorhabditis elegans genome using RNAi. Nature, 2003, **421** (16): 231~237
- 4 Lawrence L, Shenqin Y, Brian M, *et al.* Identification of Hedgehog pathway components by RNAi in *Drosophila* cultured cells. Science, 2003, **299** (5615): 2039~2045
- 5 Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. Cancer Cell, 2002, **2** (3): 243~247
- 6 Jean M J, Karine T, Mario S. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. Nature, 2002, **418** (25): 435~438
- 7 Song E, Lee S K, Wang J, *et al.* RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. Nat Med, 2003, **9** (3): 347~351
- 8 Elbashir S M, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22- nucleotide RNAs. Genes & Dev, 2001, **15** (2): 188~200
- 9 Paul C P, Good P D, Winer I, *et al.* Effective expression of small interfering RNA in human cells. Nat. Biotechnol, 2002, **20** (5): 505~508
- 10 Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. Science, 2002a, **296** (5567): 550~553
- 11 Sui G, Soohoo C, Affarell B, *et al.* A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci, 2002, **99** (8): 5515~5520
- 12 Paddison P J, Caudy A A, Bernstein E, *et al.* Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. Genes & Dev, 2002, **16** (8): 948~958
- 13 McManus M T, Petersen C P, Haines B B, *et al.* Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. RNA, 2002, **8** (6): 842~850
- 14 Barbara A K, Kriton K, Martin T, *et al.* Inhibition of telomerase activity in human cancer cells by RNA interference. Molecular Cancer Therapeutics, 2003, **2** (3): 209~216
- 15 Naoki K, Yumi M, Atsushi K, *et al.* Vector-based *in vivo* RNA interference: dose- and time-dependent suppression of transgene expression. J Pharmacol Exp Ther, 2004, **308** (2): 688~693
- 16 Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature, 2001, **411** (6836): 494~498
- 17 Caplen N J, Parrish S, Imani F, *et al.* Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrates and vertebrate systems. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, **98** (17): 9742~9747
- 18 Yu J Y, Deruiter S L, Turner D L. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, **99** (9): 6047~6052
- 19 Anna M K, Kenneth S K. RNAi functions in cultured mammalian neurons. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, **99** (18): 11926~11929
- 20 Living colors destabilized EGFP vectors. CLONTCHniques, 1998, **XIII**(2): 16~17

Time and Dose Effect of RNA Interference Mediated by Short Hairpin RNA*

HE Guo-Ping¹⁾, ZHANG Si-Zhong^{1)**}, WANG Ying-Cheng²⁾, XIAO Cui-Ying¹⁾, MA Yong-Xin¹⁾,
XU Wen-Ming¹⁾, DING Lan¹⁾, TAO Da-Chang¹⁾, SUN Yan¹⁾, CHEN Yu-Juan¹⁾

¹⁾Department of Medical Genetics, West China Hospital, Sichuan University,

Division of Human Morbid Genomics, Key State Laboratory of Biotherapy of Human Diseases, Chengdu 610041, China;

²⁾Department of Psychiatry, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract To investigate whether there exists the dose- and time- dependent effect of RNA interference (RNAi) when the introduced extraneous reporter gene was suppressed by RNAi in mammalian cell lines. The expression vectors carrying reporter component were cotransfected with the plasmids coding short hairpin RNAs (shRNAs) into HEK293H cell using lipofectamine 2000 reagent, and the consequent inhibitory effect mediated by RNA interference was observed. After transfection, the transient expression of shRNAs could specifically inhibit the extraneous reporter in mammalian cell. The expression of mRNA and protein of enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene was determined at 12, 24, 48, 60, 72, 96 h after transfection in HEK293 cell. The results showed that the decrease of EGFP mRNA or protein level was not obvious at 12 h, but gradually became more evident during from 24 to 48 h. The decrease achieved the maximal degree during from 48 to 72 h, then became weakened and restored subsequently. It indicated that the effect of RNA interference underwent a tendency of from weak to strong, then from strong to weak, and ultimately disappeared gradually. The efficiency of inhibition caused by RNAi was related to the dose of RNA interfering vector within a confined limit in HEK293H cell cotransfected with a series of dose-proportional vectors as pd1EGFP and psh-d1EGFP, whereas it nearly kept constant when the dose of interfering plasmid was sufficient to depress the expression of extraneous genes. Simultaneously, the variation of luciferase activity also displayed the similar effect when its expression was suppressed by RNAi in HEK293H or HeLa cell. It concluded that vector-based RNA interference took on time- and dose- dependent effect in mammalian cell, which provides certain theoretical reference or valuable clue to the utility of RNAi.

Key words RNA interference, short hairpin RNA, reporter gene, cotransfection, time and dose effect

*This work was supported by grants from The State 863 High Technology R&D Project of China (2001AA216091) and The National Natural Sciences Foundation of China (30470656, 30371491).

**Corresponding author. Tel: 86-28-85422749, Fax: 86-28-85501518, E-mail: szzhang@mcwccums.com

Received: September 27, 2004 Accepted: December 1, 2004