

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.07.016

PEI-Et 输送特异性 shRNA 对大鼠肝细胞 AGT 基因表达的影响 *

王玉强¹ 王 飞¹ 曹 青¹ 苏 靖² 盛 净³ 陈书艳^{1△}

(1 上海交通大学医学院附属新华医院老年科 上海 200092;

2 上海交通大学药学院 上海 200240; 3 上海交通大学医学院附属第九人民医院老年科 上海 200011)

摘要 目的:研究交联小分子量聚乙烯亚胺衍生物 PEI-Et 对大鼠肝细胞(BRL-3A)的细胞毒性、转染效率和携带高血压相关基因血管紧张素原(AGT)短发卡 RNA(shRNA)沉默 AGT 表达的能力。**方法:**MTT 法检测 PEI-Et/shRNA 复合物对 BRL-3A 细胞的毒性,流式细胞术检测 PEI-Et/shRNA 复合物对 BRL-3A 细胞的转染效率,RT-PCR 和 Western blot 检测 PEI-Et/shRNA 对 AGT 的基因沉默效果。**结果:**在相同质量比(w/w)时 PEI-Et/shRNA 的细胞毒性小于 PEI 25kDa/shRNA($P<0.01$),PEI-Et/shRNA 在 w/w 为 30 时达到最高转染效率,高于 PEI 25 kDa ($P<0.01$),PEI-Et/shRNA 能高效沉默 BRL-3A 细胞中 AGT 基因的表达。**结论:**PEI-Et 在 BRL-3A 细胞中是一种低细胞毒性、高转染效率的非病毒基因载体(与商业化的 PEI 25kDa 比较),能携带 AGT shRNA 高效沉默 BRL-3A 细胞中 AGT 基因的表达,通过用 PEI-Et/AGT shRNA 来抑制 AGT 的表达将为高血压的基因治疗提供一种新的思路。

关键词:AGT;RNA 干扰;BRL-3A;转染效率;细胞毒性**中图分类号:**Q813,R915 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)07-1267-04

Effects of Delivery of Specific shRNA using PEI-Et on AGT Gene Expression in Rat Liver Cells*

WANG Yu-qiang¹, WANG Fei¹, CAO Qing¹, SU Jing², SHENG Jing³, CHEN Shu-yan^{1△}

(1 Department of Geriatrics, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200092, China;

2 Shanghai Jiao Tong University School of Pharmacy, Shanghai, 200240, China; 3 Department of Geriatrics, Shanghai Ninth People's

Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200011, China)

ABSTRACT Objective: To synthesize cross-linked small-molecular-weight polyethylenimine derivative PEI-Et and investigate its cytotoxicity, transfection efficiency and ability to delivery hypertension related gene angiotensinogen (AGT) short hairpin RNA (shRNA) to silence AGT expression. **Methods:** MTT assay was used to measure the cytotoxicity of PEI-Et/shRNA complexes. Flow cytometry was performed to investigate transfection efficiency of PEI-Et/shRNA in BRL-3A cells. RT-PCR and Western blot were used to detect the AGT gene silencing effect of PEI-Et/shRNA. **Results:** PEI-Et/shRNA showed lower cytotoxicity than PEI 25kDa/shRNA at the same weight ratio (w/w). Transfection results indicated that PEI-Et/shRNA displayed the highest transfection efficiency at w/w 30, which was higher than PEI 25kDa/shRNA ($P<0.01$). PEI-Et/shRNA could efficiently inhibit the expression of AGT in BRL-3A cells. **Conclusion:** PEI-Et was a non-viral vector with much lower cytotoxicity and enhanced transfection efficiency than PEI 25kDa in BRL-3A cells, and it could delivery AGT shRNA to efficiently silence AGT expression in BRL-3A cells. Therefore, PEI-Et/AGTshRNA would be a promising tool for delivering AGT shRNA to BRL-3A cells for hypertension therapy.

Key words: AGT; RNA interference; BRL-3A; Transfection efficiency; Cytotoxicity**Chinese Library Classification:** Q813, R915 **Document code:** A**Article ID:**1673-6273(2014)07-1267-04

前言

肾素-血管紧张素系统 (rennin-angiotensin system, RAS) 作为一个重要的水电解质平衡调节系统,在高血压的发生发展中起重要作用^[1,2]。血管紧张素原(angiotensinogen, AGT)主要在肝细胞中合成,是 RAS 系统的重要组成成分,是血管活性物质血管紧张素 II 的唯一前体物质,对于血管抗性和血压的维持发挥着重要作用。目前对于高血压防治研究的最多、作用最重要

的易感基因正是 AGT 基因,成为高血压基因治疗的一个重要靶点^[3,4],而抑制 AGT 基因的表达有望成为高血压治疗的一种新策略。

由 RNA 干扰介导的基因沉默是基因治疗领域的一种新方法^[5]。然而直到今天,寻找低毒、高效的非病毒载体仍然是一个巨大的挑战^[6,7]。本课题组曾以小分子量 PEI 800Da 为骨架合成新型聚乙烯亚胺衍生物 PEI-Et,研究结果显示 PEI-Et 在三种细胞系中均比商业化的转染试剂 PEI 25kDa 具有更低的细胞毒

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81001416;81270205)

作者简介:王玉强(1985-),男,博士研究生,主要研究方向:基因靶向输送

△ 通讯作者:陈书艳,电话:021-25078999, shuyanchencn@yahoo.com.cn

(收稿日期:2013-07-20 接受日期:2013-08-24)

性和更高的转染活性^[9]。但是在以前的研究中用的只是报告基因荧光素酶质粒,作为一种新型的非病毒载体,其能不能携带治疗性的干扰 RNA 特异性沉默靶基因的表达尚不清楚。为此,本研究以 PEI-Et 作为输送载体,以 AGT shRNA 作为治疗性基因,考察 PEI-Et/shRNA 复合物对大鼠肝细胞 BRL-3A 的细胞毒性、转染效率以及 PEI-Et 携带 AGT shRNA 沉默 AGT 基因表达的能力,旨在为高血压的基因治疗提供一种新的思路。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

PEI 25kDa、MTT(Sigma 公司),胎牛血清、胰酶、DMEM 培养基(德国 PAA 公司),PEI-Et(本实验室前期合成),AGT shRNA、PCR 引物(上海吉凯基因技术有限公司合成),酶标仪(美国 Molecular Devices 公司),Trizol(中国上海 Invitrogen 公司),AGT 抗体(swant 公司),流式细胞仪(美国 Franklin Lakes 公司),BRL-3A(大鼠肝细胞,中科院上海生命科学院细胞资源中心)。

1.2 方法

1.2.1 细胞系培养 DMEM+10%胎牛血清的培养基培养 BRL-3A 细胞,培养条件为:37℃,5% CO₂,当细胞达到 90%左右融合率时用胰酶进行传代。

1.2.2 PEI-Et/shRNA 复合物细胞毒性分析 按照文献所述方法并加以改进^[9],将密度为 $8 \times 10^4/\text{mL}$ 的 BRL-3A 细胞以每孔 100 μL 的体积加到 96 孔板中。继续培养 24 小时后,加入不同质量比(2,5,10,20,30,50)的 PEI-Et/shRNA 和 PEI25kDa/shRNA,空白对照组加入 DMEM 培养基。培养 4 小时后移除培养基,加入 100 μL 无酚红 DMEM,同时加入 25 μL MTT 溶液(5 mg/mL)。6 小时后,移除培养基加入 150 μL DMSO。37℃ 摇床上摇晃 10 min 后用酶标仪测定在 570 nm 处的吸光度(OD 值),以样品组和对照组 OD 值的比值来表示细胞的相对存活率。

1.2.3 PEI-Et/shRNA 复合物转染效率分析 将密度为 $9 \times 10^4/\text{mL}$ 的 BRL-3A 细胞以每孔 2 mL 的体积加入到 12 孔板中培养 24 小时。转染时先除去含血清的 DMEM 培养基,用 500 μL PBS 洗一遍,再加入不含血清的 DMEM 培养基,将事先制备的 PEI-Et/shRNA 复合物按照特定质量比(5,10,20,30)加入细胞,阳性对照组用 PEI 25kDa(w/w 2:1)。4 小时后用 2 mL 含有血清的培养基替换含有复合物的培养基,继续培养 44 小时。随后在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达,流式细胞仪检测绿色荧光蛋白表达的阳性细胞占总细胞数的百分比。其具体方法为:每个细胞孔中加入 100 μL 0.25%的胰酶溶液,使细胞消化脱壁后,用 1 mL PBS 使孔中细胞完全混悬其中,置于流式细胞仪上检测,以未转染的阴性细胞作为对照,计数 10000 个细胞数。

1.2.4 Real time PCR 检测 使用 Trizol 试剂盒提取 BRL-3A 细胞中的 RNA,使用 SYBR Prime Script RT-PCR 试剂盒进行反转录。AGT 扩增引物上游: 5'-CATCTTCCCTCGCTCTCTG-3',下游: 5'-GCCTCTCATCTTCCCTTGG-3',看家基因 β -actin 扩增引物上游 5'-CTGTCCCTGTATGCCTCTG-3',下游 5'-TGTCACGCACGATTTC-3'。以 β -actin 作为内参照,用相对定量

法计算 AGT 在实验组和对照组表达的差异,每个样本重复测定 3 次。

1.2.5 Western blot 检测 转染后 72 小时提取 BRL-3A 细胞中总蛋白,BCA 法测定蛋白含量。10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后用半干式电转印仪转移到 PVDF 膜上。一抗为 Mouse anti-AGT:1:500; Mouse anti- β -actin:1:5000;二抗为 Goat Anti-Mouse IgG:1:8000。以 β -actin 为内参,凝胶成像系统拍照。拍的图像用软件 ImageTool 3.0 测灰度值,并与内参相比得相对值,每个样本重复测定 3 次。

1.2.6 统计学分析 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两独立样本比较用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异有显著性统计学意义。

2 结果

2.1 PEI-Et/shRNA 复合物细胞毒性分析

不同 w/w 的 PEI-Et/shRNA 复合物对 BRL-3A 细胞的毒性情况用 MTT 法进行检测,细胞毒性大小以相对于未经处理的细胞的存活率表示。用 PEI25kDa/shRNA 作为阳性对照。由图 1 可知,在 w/w 为 2-50 范围内,PEI-Et/shRNA 的细胞存活率均在 90%以上,几乎没有细胞毒性。而 PEI25kDa/shRNA 的细胞毒性随着 w/w 的增大而增大,例如在 w/w 为 2 时,细胞存活率为 91%,而在 w/w 为 50 时,细胞存活率明显下降到 21%。但是在相同 w/w,PEI-Et/shRNA 的细胞毒性始终比 PEI25kDa/shRNA 小($P < 0.01$)。

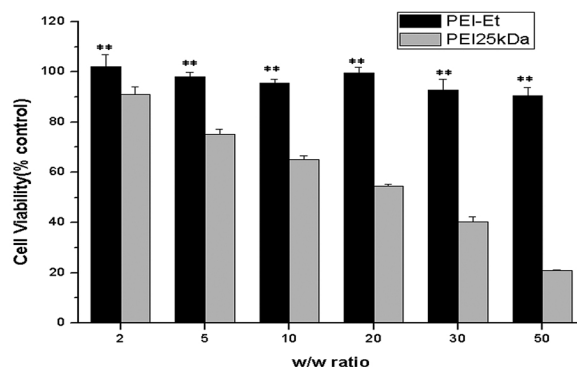


图 1 PEI-Et/shRNA 复合物对 BRL-3A 细胞的细胞毒性 (** $P < 0.01$ vs PEI25kDa)

Fig.1 Cytotoxicity of PEI-Et/shRNA complexes to BRL-3A cells (** $P < 0.01$ vs PEI25kDa)

2.2 PEI-Et/shRNA 复合物转染效率分析

转染效率用于检测 PEI-Et 对 shRNA 的输送能力。由于 shRNA 携带绿色荧光蛋白(GFP)序列,转染效率以表达 GFP 的细胞的阳性率来定量表示。图 2A 为绿色荧光显微镜照片,可以看出在 w/w 为 30 时,PEI-Et 组具有最多的绿色荧光点,并且多于 PEI25kDa 组。图 2B 流式细胞仪测定结果显示 PEI-Et 的转染效率随 w/w 的增加而增大,在 w/w 位 30 达到最大值为 57%,明显高于 PEI25kDa 组的 40%($P < 0.01$),且在 w/w 为 20-30 范围内均表现出比 PEI25kDa 更高的转染效率($P < 0.01$)。

2.3 PEI-Et/shRNA 对 AGT 基因沉默效果检测

根据转染效率结果选取 w/w 为 30 的 PEI-Et/shRNA,通过

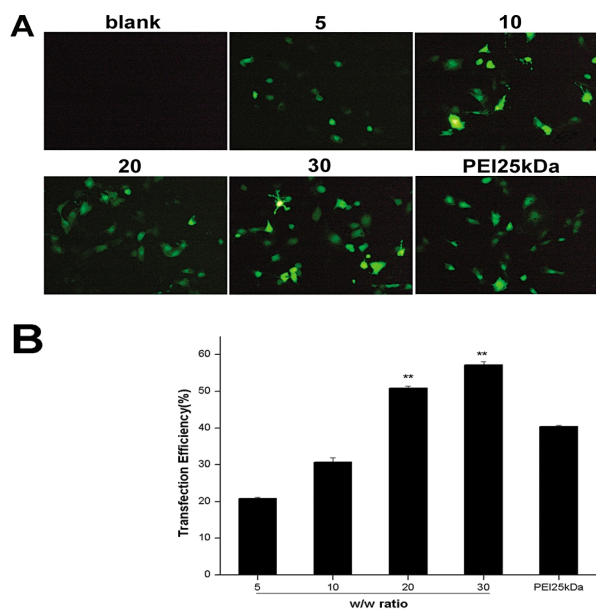


图2 PEI-Et/shRNA 在 BRL-3A 细胞中的转染效率.A:荧光显微镜图片

B:流式细胞仪定量分析转染效率(**P<0.01 vs PEI 25kDa)

Fig.2 Transfection efficiency of PEI-Et/shRNA in BRL-3A cells. A: fluorescence images observed with fluorescence microscopy. B: quantitative analysis of transfection efficiency using flow cytometry (**P<0.01 vs PEI 25kDa)

Real time PCR 和 Western blot 检测 PEI-Et/shRNA 对 BRL-3A 细胞 AGT 的基因沉默效果。同空白对照组和无序列对照组 (PEI-Et/nonsense shRNA) 相比, PEI-Et/antisense shRNA 组的 AGT mRNA(图 3) 和蛋白表达水平(图 4)显著下降(P<0.01), 而 PEI-Et/nonsense shRNA 和裸 shRNA 组的 AGT 表达却没受到影响。

3 讨论

原发性高血压是一种严重影响人类健康的、困扰全球的常见的心血管疾病。随着医学科技的发展, 降压药尤其是新型降

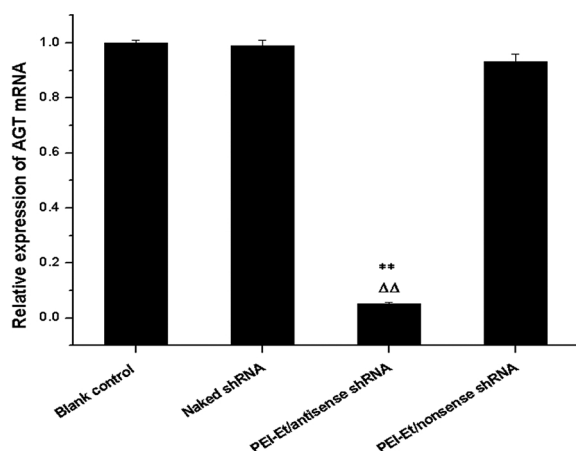


图3 Real time PCR 检测 BRL-3A 细胞中 AGT mRNA 表达(**P<0.01 vs Blank control, P<0.01 vs PEI-Et/nonsense shRNA)

Fig.3 Expression of AGT mRNA in BRL-3A cells detected by Real time PCR (**P<0.01 vs Blank control, P<0.01 vs PEI-Et/nonsense shRNA)

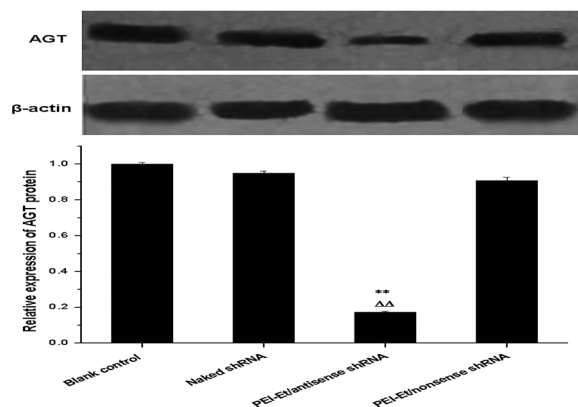


图4 Western blot 检测 BRL-3A 细胞中 AGT 蛋白表达 (**P<0.01 vs Blank control, P<0.01 vs PEI-Et/nonsense shRNA)

Fig.4 Expression of AGT protein in BRL-3A cells detected by Western blot (**P<0.01 vs Blank control, P<0.01 vs PEI-Et/nonsense shRNA)

压药的出现使高血压治疗效果明显改善。但是这并不能从根本上治疗高血压, 并且还存在着患者依从性差、药物不良反应大、患者需终身服药等缺点。RNA 干扰技术作为一种重要的基因治疗手段在许多先天性和获得性疾病的治疗中具有广阔的应用前景^[10,11]。基因治疗的一个重要瓶颈就是安全、高效的基因输送载体^[12,13]。与病毒载体相比, 非病毒载体以其制备简单、易于进行化学修饰、无免疫原性、基因携带量大等优点越来越受到重视^[14-16]。本研究就是应用一种新型的聚乙烯亚胺衍生物 PEI-Et 作为非病毒载体, 以与高血压发生发展密切相关的 AGT 作为靶基因设计 AGT shRNA, 观察 PEI-Et 输送 shRNA 沉默 AGT 基因表达的能力。

高细胞毒性是聚乙烯亚胺类聚阳离子的共同特点^[17]。而本实验结果显示, 在 w/w 2-50 范围内, PEI-Et/shRNA 对 BRL-3A 细胞几乎没有细胞毒性, 并且毒性远低于商业化的转染试剂 PEI 25kDa, 这体现出其今后应用的安全优越性。同时在适当 w/w(20-30)时, PEI-Et 在 BRL-3A 细胞中的转染效率明显高于 PEI 25kDa, 这说明 PEI-Et 是一种安全性好、转染效率高的基因载体, 结合 PEI-Et/shRNA 能够高效的沉默 AGT 基因的表达, 我们有理由认为通过用 PEI-Et 输送 AGTshRNA 来抑制 AGT 的表达将为高血压的基因治疗提供一种新的思路和方法。进一步可以进行动物实验验证 PEI-Et/AGTshRNA 对高血压的治疗作用, 还可以对 PEI-Et 修饰以靶向基团以实现靶向基因输送^[18,19]。

参考文献(References)

- [1] Ferrario CM, Strawn WB. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease [J]. Am J Cardiol, 2006, 98(1): 121-128
- [2] Santos PC, Krieger JE, Pereira AC. Renin-angiotensin system, hypertension, and chronic kidney disease: pharmacogenetic implications[J]. J Pharmacol Sci, 2012, 120 (2): 77-88
- [3] Leckie BJ. Targeting the renin-angiotensin system: what's new? [J]. Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents, 2005, 3(1): 23-32
- [4] Raizada MK, Der Sarkissian S. Potential of gene therapy strategy for the treatment of hypertension[J]. Hypertension, 2006, 47(1): 6-9
- [5] Arthanari Y, Pluen A, Rajendran R, et al. Delivery of therapeutic

- shRNA and siRNA by Tat fusion peptide targeting bcr-abl fusion gene in Chronic Myeloid Leukemia cells[J]. J Control Release, 2010, 145 (3): 272-280
- [6] Salcher EE, Wagner E. Chemically Programmed Polymers for Targeted DNA and siRNA Transfection [J]. Top Curr Chem, 2010, 296: 227-249
- [7] Yu H, Wagner E. Bioresponsive polymers for nonviral gene delivery [J]. Curr Opin Mol Ther, 2009, 11: 165-178
- [8] Wang YQ, Su J, Wu F, et al. Biscarbamate cross-linked polyethylenimine derivative with low molecular weight, low cytotoxicity and high efficiency for gene delivery [J]. Int J Nanomedicine, 2012, 7: 693-704
- [9] 王玉强, 臧怡, 蔡文玮, 等. 交联聚乙烯亚胺衍生物的构建及其转染 COS-7 细胞的研究[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(10): 1805-1807
Wang Yu-qiang, Zang Yi, Cai Wen-wei, et al. Construction of Cross-linked Polyethylenimine Derivative and Its Transfection in COS-7 Cells[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(10): 1805-1807
- [10] Ashihara E, Kawata E, Maekawa T. Future prospect of RNA interference for cancer therapies [J]. Curr Drug Targets, 2010, 11 (3): 345-360
- [11] Wu Y, Wang W, Chen Y, et al. The investigation of polymer-siRNA nanoparticle for gene therapy of gastric cancer in vitro [J]. Int J Nanomedicine, 2010, 5: 129-136
- [12] Srinivas R, Samanta S, Chaudhuri A. Cationic amphiphiles: promising carriers of genetic materials in gene therapy [J]. Chem Soc Rev, 2009, 38(12): 3326-3338
- [13] Park TG, Jeong JH, Kim SW. Current status of polymeric gene delivery systems[J]. Adv. Drug Deliv Rev, 2006, 58(4): 467-486
- [14] Mintzer MA, Simanek EE. Nonviral vectors for gene delivery [J]. Chem Rev, 2009, 109(2): 259-302
- [15] Thomas M, Klivanov AM. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 62(1): 27-34
- [16] Wang YQ, Su J, Cai WW, et al. Hepatocyte-targeting gene transfer mediated by galactosylated poly (ethylene glycol)-graft-polyethylenimine derivative[J]. Drug Des Devel Ther, 2013, 7: 211-221
- [17] Liang B, He ML, Xiao ZP, et al. Synthesis and Characterization of Folate-PEG-Grafted-Hyperbranched-PEI for Tumor-targeted Gene Delivery, Biochem[J]. Biophys Res Commun, 2008, 367: 874-880
- [18] Li SD, Huang L. Gene therapy progress and prospect: non-viral gene therapy by systemic delivery [J]. Gene Ther, 2006, 13(18): 1313-1319
- [19] Dobson J. Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticles-based gene delivery[J]. Gene Ther, 2006, 13(4): 283-287

(上接第 1384 页)

- [17] Zhao N, Qi J. Transfecting the hard-to-transfect lymphoma/leukemia cells using a simple cationic polymer nanocomplex [J]. J Control release, 2012, 159(1): 104-110
- [18] Opanasopit P, Tragulpakseerojn J. The development of poly-L-arginine-coated liposomes for gene delivery [J]. Int J Nanomedicine, 2011, 6: 2245-2252
- [19] Mehier-Humbert S, Guy RH. Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells [J]. Adv Drug Del Rev, 2005, 57(5): 733-753
- [20] Ikawa M, Kominami K, Yoshimura Y, et al. A rapid and non-invasive selection of transgenic embryos before implantation using green fluorescent protein (GFP)[J]. FEBS Lett, 1995, 375(1-2): 125-128
- [21] Gueroussov S, Tamawsky SP. Analysis of mRNA nuclear export kinetics in mammalian cells by microinjection [J]. J Vis Exp, 2010, (46): 2387-2395
- [22] Klein, RM, Wolf ED, et al. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells [J]. Biotechnology, 1992, 24: 384-386
- [23] Svarovsky S, Borovkov A, Sykes K. Cationic gold microparticles for biolistic delivery of nucleic acids [J]. Biotechniques, 2008, 45(5): 535-540
- [24] Uchida M, Li XW, Mertens P. Transfection by particle bombardment: delivery of plasmid DNA into mammalian cells using gene gun[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1790(8): 754-764
- [25] Inoue T, Krumlauf R. An impulse to the brain-using in vivo electroporation[J]. Nat Neurosci, 2001, 4 Suppl: 1156-1158
- [26] Zeng Qi, Xia Xiao-bo. Comparison of electroporation and lipofection efficiency in retinal Müller cells [J]. Int J Ophthalmol, 2010, 10(2): 247-249
- [27] Rita Arabsolghar, Mozghan Rasti. Optimal electroporation condition for small interfering RNA transfection into MDA-MB-468 cell line [J]. Iran J Med Sci, 2012, 37(3): 187-193
- [28] Elizabeth T Jordan, Michelle Collins. Optimizing electroporation conditions in primary and other difficult-to-transfect cells [J]. J Biomol Tech, 2008, 19(5): 328-334
- [29] Liu Yi-li. Compared ultrasonics [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2006: 247-256
- [30] Rodamporn S, Harris NR. HeLa cell transfection using a novel sonoporation system[J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2011, 58(4): 927-934
- [31] Barrett LE. Region-directed phototransfection reveals the functional significance of a dendritically synthesized transcription factor [J]. Nat Meth, 2006, 3(6): 455-460