

基础研究

siRNA 干扰大鼠神经元 Nogo 受体 mRNA 表达的时程研究

张涛¹, 袁文¹, 刘百峰¹, 曹莉², 肖林², 陈公星³

(1 第二军医大学长征医院骨科 200003 上海市; 2 第二军医大学神经生物学教研室 200433 上海市;

3 浙江大学医学院附属第二医院肿瘤研究所 310009 杭州市)

【摘要】目的:观察大鼠 Nogo 受体(NgR)特异性小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)在原代神经元干扰其 mRNA 表达的时程效果。**方法:**体外培养大鼠原代皮层和海马细胞,应用阳离子脂质体转染试剂转染针对 2 个基因片段(199 和 964 位点)的大鼠 NgR 特异性 siRNA 和对照 siRNA,分别于转染后 24h、48h、72h 和 96h,应用实时荧光定量 PCR 检测 NgR mRNA 表达情况。**结果:**2 对 siRNA(siNgR199 和 siNgR964)均能够下调靶基因 mRNA 的表达水平,24h、48h、72h 和 96h,NgR mRNA 表达分别为对照 siRNA 组的 38.12%、12.47%、3.96%、18.4%(siNgR199) 和 49.54%、24.25%、13.17%、37.93%(siNgR964),与对照 siRNA 组比较有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:**NgR 特异性 siRNA 能够在原代皮层和海马细胞下调靶基因 mRNA 的表达水平,且基因沉默效果在转染后 3d 最显著。

【关键词】 Nogo 受体; RNA 干扰; 基因沉默; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: Q786, R683.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2005)-10-0588-04

siRNA knocks down mRNA expression of Nogo receptor in cultured rat neurons/ZHANG Tao, YUAN Wen, LIU Baifeng, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2005, 15(10):588-591

【Abstract】Objective: To observe the mRNA expression of Nogo receptor(NgR) in rat primary cortical and hippocampal cells at different timepoint after the NgR-specific siRNAs were transfected. **Method:** Two NgR-specific siRNAs were selected and transfected into rat primary cortical and hippocampal cells by using trans-messenger transfection reagent. Total RNA was harvested at 24h, 48h, 72h and 96h posttransfection by using Trizol reagent and was tested by using real-time PCR. **Result:** The mRNA expression of NgR was suppressed by the two NgR-specific siRNAs tested. Compared with the control group which was transfected with scramble siRNA, the mRNA expression of NgR interfered by siNgR199 and siNgR964 was 38.12%, 12.47%, 3.96%, 18.4%(siNgR199) and 49.54%, 24.25%, 13.17%, 37.93%(siNgR964) at different timepoint respectively, and the P values were significant compared with the control siRNA ($P < 0.05$). **Conclusion:** The siRNAs specific to NgR could knock down the endogenous expression of target gene, which is most effective at 3th day posttransfection in cultured cells.

【Key words】 Nogo receptor; RNA interfering; Genes silence; Real time PCR

【Author's address】 Department of Orthopedics Changzheng Hospital of the Second Military Medical University, Shanghai, 200003, China

中枢神经系统(CNS)中髓磷脂相关轴突生长抑制因子是引起脊髓损伤后轴突再生失败的主要因素之一。实验表明^[1], CNS 髓磷脂中三种轴突生长抑制性蛋白——Nogo-A、髓磷脂相关糖蛋白

(myelin-associated glycoprotein, MAG) 和少突胶质细胞髓磷脂糖蛋白(oligodendrocyte myelin glycoprotein, OMgp), 均通过 Nogo 受体(Nogo receptor, NgR)及与其相连的受体复合物发挥作用, 因此 NgR 似乎是 CNS 髓磷脂中各种轴突生长抑制性蛋白发挥作用的集中点, 倍受学者们的重视。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是由双链 RNA 介导的、在转录后 mRNA 水平关闭相应基因

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30471757)

第一作者简介: 男(1973-), 主治医师, 医学博士, 研究方向: 脊柱伤病(现在上海第六医院骨科 200025)

电话: (021)64369181-8061 E-mail: taozhangspine@163.com.cn

表达的过程——将与靶基因同源的双链 RNA(dsRNA)导入细胞,它在细胞内可与靶基因 mRNA 结合,并迅速将其降解,从而抑制该基因表达的过程。RNAi 最初发现于某些植物中,随后在线虫、果蝇、斑马鱼中相继发现存在 RNAi 现象。最近,在哺乳动物细胞中的研究也取得突破性进展^[2,3]。我们应用 RNA 干扰大鼠神经元 NgR 基因表达,探讨基因沉默的时程效果,试图阻断髓磷脂相关抑制物与其受体(NgR)的结合,为 SCI 后促进神经再生和基于 RNA 的药物治疗提供新的策略。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂

孕 18d SD 大鼠,由第二军医大学动物实验中心提供。上海生物工程公司合成实时荧光定量 PCR 反应 NgR 荧光探针和引物:FAM 标记 5'-TCTGCATGGCAACCGTATCCCCA-3';NgR 上游引物为 5'-GGGCAACCTCACGCATCT-3';NgR 下游引物为 5'-GGAAAGCGTGCTCAGGAACA-3';GAPDH 探针和引物应用“TaqMan Rodent GAPDH control reagent kit-VIC labelled”(PE Applied Biosystems)。实时荧光定量 PCR 常规试剂及 PCR 反应仪(7700 Sequence Detector ABI)由杭州新瑞佳生物制药有限公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 siRNA 的设计合成 根据 Elbashir 的设计原则^[4],应用杭州新瑞佳生物制药有限公司优化的设计软件,查找大鼠 NgR 基因序列并设计 4 个小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)序列,经过前期实验选择出抑制效率最高的两个进行实验(根据靶序列起始位置命名为 siNgR199 和 siNgR964),同时化学合成阴性对照 siRNA(scramble siRNA)和作为阳性对照的 MAP2 特异性 siRNA^[5]。化学合成时在有义链的 3'端要加上 TT(在靶基因 mRNA 中的相应位点不能配对),每条链的 5'端为磷酸盐,3'羟基化,有两个碱基外悬(合成时经退火形成双链 siRNA):

siNgR199 正义链:5'-CCGAAUCUCU-UACGUGCCATT-3';反义链:5'-UGGCACGUAA-GAGAUUCGGTT-3';

siNgR964 正义链:5'-UCAGCUCACUGAU-GAGGAGTT-3';反义链:5'-CUCCUCAUCAGU-

GAGCUGATT-3';

siMAP2 正义链 5'-CGAGAGGAAAGAC-GAAGGAUU-3';反义链 5'-UCCUUCGUCUUUC-CUCUCGUG-3'。

1.2.2 皮层和海马细胞的培养和转染 孕 18d SD 大鼠通过颈椎脱臼法杀死,取出大脑皮层和海马,0.25%胰蛋白酶消化 15min。在含 DMEM 及 5%FBS 种植培养基中,将细胞以 30 000 个/cm² 的浓度种植在多聚赖氨酸包被的 24 孔细胞培养板中,接种后移入 37℃、5%CO₂ 培养箱,3h 后,将培养基换为 Neurobasal。3d 更换 1 次培养液,所有实验在细胞种植后 5~8d 开始。在这些培养物中几乎观察不到神经胶质细胞。

内源靶基因 NgR、MAP2 和对照 siRNA 的转染用 TransMessenger 转染试剂(Qiagen, Chatsworth, CA)。根据厂家说明书,siRNA(24 孔培养板中每孔 0.8μg)通过 Enhancer R 试剂浓缩并与 2μl TransMessenger 形成复合物。转染复合物稀释到 300μl Neurobasal 中,与细胞混合,2h 后转染复合物被 Neurobasal 替代。转染 48~72h 后进行 MAP2 细胞染色分析;72h 后提取细胞总 RNA,实时荧光定量 PCR 检测 NgR mRNA 表达水平。每个实验样本分析结果通过三个独立的复孔证实。

1.2.3 皮层和海马细胞的免疫荧光分析 转染 48~72h 后对 MAP2 进行免疫荧光标记。转染对照 siRNA 和 MAP2 特异性 siRNA 的神经元用 PBS 冲洗,4%多聚甲醛固定,0.25% Triton X-100 穿透,再用 PBS 洗两次以上,用 10%山羊血清封闭。细胞用 MAP2 的小鼠单抗(1:200 稀释到含 1%山羊血清的 PBS 中;购自 NeoMarkers 公司)4℃孵育过夜,PBS 洗三次。通过与罗丹明偶连的山羊抗小鼠的二抗(Molecular Probes 公司)检测。最后,细胞用 PBS 洗,在同等的曝光条件下拍摄特异抗体的图像。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 分析 细胞总 RNA 提取和逆转录 cDNA,按照 cDNA 合成试剂盒推荐的方法进行。实时荧光定量 PCR 反应过程如下:50μl 反应体系中含有基因的逆转录产物、NgR 基因上、下游引物各 0.3μM、探针 0.2μM、GAPDH 基因上、下游引物各 0.3μM、探针 0.2μM;25μl PCR master mix、2μl NgR cDNA。然后在实时荧光定量 PCR 反应仪上进行检测,反应条件为:50℃预

变性 2min;95℃变性 10min;95℃变性 30s;60℃退火 1min,扩增 40 个循环。

1.3 数据分析和统计学处理

实时荧光定量 PCR 数据分析根据看家基因 GAPDH 对 NgR mRNA 表达水平进行原始数据转换。应用微软 EXCEL 软件进行统计学分析。两组间数据的比较应用组间 t 检验分析。

2 结果

2.1 免疫荧光分析结果

荧光显微镜观察发现几乎所有转染的神经元中 MAP2 的表达明显被 siRNA 特异性抑制,而不被阴性对照 Scramble siRNA 所抑制(图 1、2,后插页 IV)。

2.2 实时荧光定量 PCR 分析结果

在同一反应体系中,GAPDH 基因和 NgR 基因的 cDNA 被同时扩增。NgR mRNA 表达水平经过数值转换,并经 GAPDH 内参照校正,结果显示转染后不同时间点 NgR 的 mRNA 表达水平下调($P<0.05$),在对照 siRNA 组中,NgR 的 mRNA 水平均无明显变化(表 1)。结果显示 24h、48h、72h 和 96h,NgR mRNA 分别表达对照的 38.12%、12.47%、3.96%、18.4%(siNgR199)和 49.54%、24.257%、13.17%、37.93%(siNgR964)。

这些实验结果证实:(1)RNAi 能有效地抑制原代皮层和海马细胞内源 NgR mRNA 的转录水平;(2)转染后 24h 至 72h 基因沉默效果逐渐增加,且转染后 72h RNAi 的效果最明显;96h 后基因沉默效果减弱。

表 1 siRNA 转染后不同时间点 NgR mRNA 表达含量的变化
($n=3, \bar{x} \pm s$)

时间 (h)	对照组 siSCR	siRNA 治疗组	
		siNgR199	siNgR964
24	0.00354±0.00085	0.00135±0.00016 ^①	0.0017±0.00047 ^①
48	0.02257±0.00242	0.00281±0.00044 ^①	0.00547±0.00085 ^①
72	0.02630±0.00128	0.00104±0.00025 ^①	0.00346±0.00020 ^①
96	0.02253±0.01311	0.00500±0.00237 ^①	0.00918±0.00246 ^①

注:①与对照组比 $P<0.05$

3 讨论

目前,针对髓磷脂相关抑制物的研究主要是在细胞外应用单抗、疫苗、竞争性肽段等方法中和髓磷脂抑制物和细胞内途径通过增加 cAMP 水

平、灭活 GTP 酶等手段阻断其作用信号的传递^⑤。这些方法都在一定程度上促进了实验动物轴突再生及功能恢复。但是,在分子方法中存在的问题是:应用 Nogo 单克隆抗体和疫苗治疗时不能排除其它磷脂相关抑制物及瘢痕中抑制物的影响,且存在单克隆抗体如何通过血脑屏障的问题;应用髓磷脂疫苗时存在的其它抗原可能诱发自体免疫性疾病;而在细胞内增加 cAMP 和灭活 Rho 途径由于影响多种细胞反应,缺乏特异性。CNS 髓磷脂相关轴突生长抑制因子主要是 Nogo、髓磷脂相关糖蛋白(MAG)与少突胶质细胞髓磷脂糖蛋白(OMgp),三者均通过 NgR 及与其相连的受体复合物发挥作用。由于 NgR 与其三个配体结合的高亲和性、高效性以及神经特异性,倍受学者们的重视^①。

RNAi 作为新兴的基因阻断技术,理论上可用于治疗任何由于单个基因高表达引起的疾病,如:病毒、癌症和感染性疾病。在组织培养模型中,应用 RNAi 技术沉默肿瘤、HIV、流感和灰质炎病毒已经取得重大进步^⑥。双链 RNA(double strand RNA, dsRNA)能够以化学合成、体外转录、载体表达小发卡 RNA(small hairpin RNA, shRNA)或两个单链等多种方式转入细胞。化学合成的 siRNA 因其易于合成、高效率、易于转染且不会引起病毒载体的干扰素样反应等优点,具有更广泛的潜在诊断和治疗价值。转染有丝分裂后期的原代神经元通常效率较低且转染试剂对细胞具有毒性。Krichevsky 等^⑦报道了 RNA 能够被阳离子脂类试剂转入单个神经元,且化学合成的 21-nt dsRNA (siRNAs)与质粒 DNA 相比很容易被阳离子脂质试剂 TransMessenger 转染入原代皮层和海马神经元,因而没有必要导入报告载体作为标记。

我们的实验结果显示,转染特异的 siRNA 能够抑制大鼠原代神经元内源性 NgR mRNA 的表达,且 RNAi 具有特异性、高效性,且基因沉默效果在转染后 3d 最显著。目前,我们对决定 RNAi 诱导的转录后基因抑制作用的速率和强度的因素还不完全清楚。其中,靶 mRNA 序列中导致一些 RNAi 失效的“防卫性”二级结构和结合的转录因子以及蛋白的不同的生命周期影响着 RNAi 的效果。此外,细胞特异性因子可能参与不同细胞类型中不同 siRNA 运输和 RNA 干扰的调节,因而 RNAi 具有细胞特异性。

大鼠脊髓背根神经节神经元的纯化培养

禹晓东¹, 罗卓荆¹, 张琳², 李亮³, 白崇峰³

(1 第四军医大学西京医院全军骨科研究所; 2 第四军医大学航空航天生理学教研室;

3 第四军医大学西京医院全军心血管外科研究所 710032 西安市)

【摘要】目的:建立一种简单、稳定、高效的大鼠脊髓背根神经节神经元原代纯化培养方法。**方法:**取新生 SD 大鼠的脊髓背根神经节, 采用胰蛋白酶消化法, 制成单细胞悬液, 加入阿糖胞苷以纯化细胞, 培养于含 10% 胎牛血清与重组人胶质细胞源性神经营养因子的 DF12 培养基中, 观察神经元生长状况, 用细胞计数和神经元特异性烯醇化酶(NSE)免疫细胞化学染色测定细胞纯度。**结果:**培养的脊髓背根神经节神经元生长状态正常, 有神经突起生长和标记蛋白的表达, 可达到 90% 左右的纯度。**结论:**本培养方法简单、稳定、高效, 为对神经元进一步的深入研究提供了实验模型。

【关键词】细胞培养; 纯化; 免疫细胞化学; 背根神经节; 神经元

中图分类号: Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2005)-10-0591-03

Purification of dorsal root ganglion neurons in rat/YU Xiaodong, LUO Zhuojing, ZHANG Lin, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2005, 15(10): 591-593

【Abstract】 Objective: To establish an easy, practical, reliable method for the purification culture system of dorsal root ganglion neurons derived from rats. **Method:** Dorsal root ganglions harvested from newly-born rats were digested with trypsin and produced into single cell suspension, then plated in DF12 media containing 10% FBS and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). Cultured dorsal root ganglion neurons were purified by cytosine arabinoside for 48 hours. The purification rates were evaluated according to cell count and neuronal specific enolase (NSE) immunocytochemistry stain. **Result:** Cultured dorsal root ganglion cells could survive healthily. The purification rate of neurons was 90% or so. **Conclusion:** The dorsal root ganglion neurons cultivated in the DF12 media with fetal bovine serum and GDNF can survive with normal cell phenotype, neurite synapse growth and the expression of neurofilament protein is available. Which is a useful model for the further studies.

【Key words】 Cell culture; Purification; Immunocytochemistry; Dorsal root ganglion; Neurons

【Author's address】 Institute of Orthopaedics, Xijing Hospital, Xi'an, Shanxi, 710032, China

基金项目: 国家“863”计划项目, 编号: 2002AA216101

第一作者简介: 男(1979-), 医师, 硕士研究生, 研究方向: 脊柱脊髓损伤与修复

电话: (029)83375285 E-mail: yxdall@fmmu.edu.cn

体外神经细胞培养是神经科学研究的基础工作, 建立一个稳定、高效的体外神经元培养模型对于深入研究神经元的形态、功能以及神经生物学

4 参考文献

1. Woolf CJ, Bloechlinger S. It takes more than two to Nogo[J]. Science, 2002, 297(5584): 1132-1134.
2. Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99 (9): 6047-6052.
3. Krichevsky AM, Kosik KS. RNAi functions in cultured mammalian neurons [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99 (18): 11926-11929.
4. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs [J]. Genes Dev, 2001, 15(2): 188-200.
5. David S, Lacroix S. Molecular approaches to spinal cord repair [J]. Annu Rev Neurosci, 2003, 26: 411-440.
6. Damm-Welk C, Fuchs U, Wossmann W, et al. Targeting oncogenic fusion genes in leukemias and lymphomas by RNA interference [J]. Semin Cancer Biol, 2003, 13(4): 283-292.

(收稿日期: 2005-04-18 修回日期: 2005-08-08)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 彭向峰)