

· 实验研究 ·

大鼠 *Slit2* 基因慢病毒干扰载体的构建及其对大鼠 RPE 细胞中 *Slit2* 基因的下调作用

蒋少秋 周希媛

400010 重庆医科大学附属第二医院眼科 重庆市眼科研究所 眼科学重庆市市级重点实验室

通信作者:周希媛, Email:zhouxiyuan2002@aliyun.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.08.003

【摘要】 背景 年龄相关性黄斑变性(AMD)是老年人致盲的首要原因。目前,AMD 的治疗方式在取得显著疗效的同时亦有一定的不足,寻找新的有效治疗靶点是当前的研究热点。**目的** 构建大鼠 *Slit2* 基因慢病毒干扰载体,筛选有效干扰序列以用于大鼠视网膜色素上皮(RPE)细胞中 *Slit2* 基因沉默,为大鼠相关体内实验奠定基础。**方法** 设计 2 条大鼠 *Slit2* 基因 siRNA 序列,退火形成 DNA,连接形成慢病毒干扰载体并进行测序鉴定。采用三质粒共转染 293T 细胞法收获慢病毒(Lv-r*Slit2*-siRNA),用药物筛选法测定病毒悬液滴度。将大鼠 RPE 细胞分为空白对照组、空病毒组、Lv-r*Slit2*-siRNA1 组和 Lv-r*Slit2*-siRNA2 组,根据分组分别用仅有病毒的载体和不同序列的 Lv-r*Slit2*-siRNA 载体转染细胞,分别采用实时荧光定量 PCR 法和 Western blot 法测定各组细胞中 *Slit2* mRNA 及蛋白的表达以确定 *Slit2* 基因的敲减率,筛选有效干扰序列。采用 0、100、200 和 400 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 孵育大鼠 RPE 细胞以制备缺氧细胞模型并转染筛选 Lv-r*Slit2*-siRNA2 干扰序列,采用实时荧光定量 PCR 法和 ELISA 法测定大鼠 RPE 细胞中血管内皮生长因子 A(VEGFA)表达变化及细胞上清液中 VEGFA 质量浓度。**结果** 成功构建 2 条大鼠 *Slit2* 基因慢病毒干扰载体,病毒滴度分别为 5×10^8 TU/ml 和 3×10^8 TU/ml,转染病毒后 72 h 于荧光显微镜下观察 RPE 细胞慢病毒转染率均在 70% 以上。Lv-r*Slit2*-siRNA1 组和 Lv-r*Slit2*-siRNA2 组大鼠 RPE 细胞中 *Slit2* mRNA 相对表达量分别为 0.67 ± 0.09 和 0.23 ± 0.11 ,明显低于空白对照组的 1.03 ± 0.31 和空病毒组的 0.92 ± 0.07 ;Lv-r*Slit2*-siRNA1 组和 Lv-r*Slit2*-siRNA2 组大鼠 RPE 细胞中 *Slit2* 蛋白相对表达量分别为 0.62 ± 0.07 和 0.49 ± 0.02 ,明显低于空白对照组的 1.00 ± 0.10 和空病毒组的 0.95 ± 0.11 ,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。0、100、200 和 400 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用后,空白对照组和 Lv-r*Slit2*-siRNA2 组大鼠 RPE 细胞中 VEGFA mRNA 的相对表达量明显不同,差异均有统计学意义($F_{\text{浓度}} = 127.998, P < 0.01$; $F_{\text{分组}} = 69.663, P < 0.01$),不同浓度 CoCl_2 作用后各组大鼠 RPE 细胞中 VEGFA 蛋白相对表达量均明显不同,差异均有统计学意义($F_{\text{浓度}} = 17.059, P < 0.01$; $F_{\text{分组}} = 91.791, P < 0.01$)。100、200 和 400 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用后 Lv-r*Slit2*-siRNA2 组大鼠 RPE 细胞中 VEGFA mRNA 表达量及蛋白质量浓度均明显低于空白对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。**结论** 大鼠 *Slit2* 基因慢病毒干扰载体构建成功并筛选出有效干扰重组序列,其能有效下调大鼠 RPE 细胞中 *Slit2* 基因的表达,并抑制缺氧环境下 VEGFA 在大鼠 RPE 细胞中的表达。

【关键词】 慢病毒; 转染技术; RNA 干扰; 视网膜色素上皮/基因; 血管内皮生长因子 A/代谢**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81170858); 重庆市科学技术委员会项目(cstc2015shmszx120068)

Construction of combined lentiviral vectors for rat *Slit2* gene RNA interfering and its down-regulation effects on *Slit2* gene in rat retinal pigment epithelial cells

Jiang Shaoqiu, Zhou Xiyuan

Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology, Chongqing Eye Institute, Chongqing 400010, China

Corresponding author: Zhou Xiyuan, Email: zhouxiyuan2002@aliyun.com

[Abstract] Background Age-related macular degeneration (AMD) is the leading cause of blindness in people over 50 years old, of which 90% cases are caused by choroidal neovascularization (CNV). Current treatments on AMD have gained great achievements, but there are still some drawbacks. So we need to search for new targets to cure CNV. **Objective** This study was to construct two combined lentiviral vectors for rat *Slit2* gene RNA interference (RNAi) and verify its interfering effects on *Slit2* gene in rat retinal pigment epithelial (RPE) cells.

Methods Two specific siRNA sequences targeting towards rat *Slit2* gene were designed and were annealed to DNA

sequences. The DNA sequences and GV248-enhanced green fluorescent protein (EGFP) vectors were combined together as recombinant vectors and then were identified. The GV248-EGFP vector, helper 1.0 and helper 2.0 were transfected together into 293T cells and the two combined lentiviral vectors for rat *Slit2* RNAi were gained from the cell supernatant after 72 hours of transfection. The titers of the combined lentiviral vectors were measured. The cells were divided into blank control group, Lv-EGFP vector group, Lv-r*Slit2*-siRNA1 group and Lv-r*Slit2*-siRNA2 group. The interference efficacy of the combined lentiviral vectors targeting to rat *Slit2* gene were identified by real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot. The sequence with higher interference efficacy was transfected to rat RPE cells again. The transfected and nontransfected rat RPE cells were treated with 0, 100, 200 and 400 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 for the preparation of hypoxia models. The expression of vascular endothelial growth factor-A (VEGFA) mRNA in rat RPE cells was finally measured by real-time fluorescence quantitative PCR and the concentration of VEGFA protein in cell supernatant was assayed by ELISA. **Results** The recombinant lentiviral vectors for rat *Slit2* gene RNAi were successfully constructed. The titers of the two recombinant sequences were 5×10^8 TU/ml and 3×10^8 TU/ml, with the transfected rate $\geq 70\%$. The relative expression levels of *Slit2* mRNA in the Lv-r*Slit2*-siRNA1 group and Lv-r*Slit2*-siRNA2 group were 0.67 ± 0.09 and 0.23 ± 0.11 , respectively, which were lower than 1.03 ± 0.31 and 0.92 ± 0.07 in the blank control group and Lv-EGFP vector group (all at $P < 0.01$). The expression levels of *Slit2* protein in the Lv-r*Slit2*-siRNA1 group and Lv-r*Slit2*-siRNA2 group were 0.62 ± 0.07 and 0.49 ± 0.02 , respectively, which were lower than 1.00 ± 0.10 in blank control group and 0.95 ± 0.11 in Lv-EGFP vector group (all at $P < 0.01$). Significant differences were found in the expression of VEGFA mRNA and protein in RPE cells among different concentrations of CoCl_2 groups (mRNA: $F_{\text{concentration}} = 127.998$, $P < 0.01$; $F_{\text{group}} = 69.663$, $P < 0.01$. Protein: $F_{\text{concentration}} = 17.059$, $P < 0.01$; $F_{\text{group}} = 91.791$, $P < 0.01$), and the expression of VEGFA mRNA and the concentration of VEGFA protein were evidently lower in the Lv-r*Slit2*-siRNA2 group than those in the blank control group after being treated by 100, 200 and 400 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 (all at $P < 0.01$). **Conclusions** Recombinant lentiviral vector for rat *Slit2* gene RNAi is successfully constructed, which can effectively knockdown rat *Slit2* gene and inhibit the expression of VEGFA in rat RPE cells.

[Key words] Lentivirus; Transfer techniques; RNA interfering; Retinal pigment epithelium/genetic; Vascular endothelial growth factor A/metabolism

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81170858); Chongqing Science and Technology Commission Project (cstc2015shmszx120068)

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 是引起老年人视力障碍的主要原因之一^[1], 其主要病理基础是脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 形成。在 CNV 的发生和发展过程中, 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 发挥着重要作用。目前, CNV 的主要治疗方法为抗 VEGF 药物的玻璃体腔注射, 但治疗过程中需要重复注药, 一些患者甚至需要终身注药以维持视力, 易诱发注射操作相关的并发症, 此外部分患者抗 VEGF 药物治疗效果不佳, 故寻找新的有效治疗 AMD 的方法是当前的研究热点。*Slit2* 基因具有调控神经元轴突导向的作用, 参与肿瘤或器官血管的生成^[2-5]。本课题组前期的实验证实, 在化学缺氧模型中, 人视网膜色素上皮细胞株 (ARPE-19 细胞系) 中 *Slit2* 基因表达上调, 且同时上调 VEGF 的表达^[6-7], 推测 *Slit2* 基因能通过上调视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞中 VEGF 的分泌, 促进 CNV 疾病的发生和发展, 该发现为探索 *Slit2* 基因在 CNV 中的作用、机制及寻找新的治疗靶点提供

了思路与线索。但众所周知, 任何疾病的发生和发展均受到体内多种细胞及细胞因子及其代谢环境的影响, 而体外实验的细胞成分单一, 因此在体的相关研究对进一步探索 *Slit2* 基因在 CNV 中的影响及其机制十分重要。本研究旨在构建大鼠 *Slit2* 基因慢病毒干扰载体, 并筛选出有效干扰大鼠 *Slit2* 基因的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 慢病毒干扰重组序列, 以用于大鼠活体眼部 *Slit2* 基因干扰, 为 *Slit2* 基因在 CNV 中作用的探讨及其机制的在体研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

慢病毒干扰载体 (GV248)、病毒包装辅助质粒 pHelper1.0、pHelper2.0 以及大肠杆菌感受态细胞 DH5 α (上海吉凯基因化学技术有限公司); 限制性内切酶 Age I、EcoR I (北京 NEB 公司); DNA 聚合酶 (南京 Vazyme 公司); T4 DNA 连接酶 (美国 Thermo Scientific 公司); 质粒抽提试剂盒 (上海天根公司); 293T 工具细胞及大鼠 RPE 细胞株 (本实验室保存);

DEME 高糖培养基、DMEM 培养基(美国 Corning 公司);胎牛血清(德国 Capricorn 公司);RNA 提取试剂、逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒(日本 Takara 公司);兔抗大鼠 Slit2 单克隆抗体(ab134166, 美国 Abcam 公司);兔抗大鼠 GAPDH 单克隆抗体(bs-2188R)、辣根过氧化物酶标记小鼠抗兔二抗(bs-0925M-HRP)(北京博奥森公司)。荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);ABI3730 测序仪(上海美季生物公司);数显式稳压稳流电泳仪、凝胶成像仪(上海天能公司);细菌摇床(江苏华利达实验设备有限公司);Blue Par 隔水式恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);移液器(德国 Eppendorf 公司);高速离心机(美国 Thermo Scientific 公司);大鼠 VEGFA ELISA 试剂盒(武汉博士德公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 分别采用含体积分数 10% 胎牛血清、100 U/ml(商品单位)青霉素及 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM、DMEM 高糖培养基培养 293T 细胞以及大鼠 RPE 细胞,体积分数 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下培养,当细胞融合至 70% ~ 80% 时进行传代。

1.2.2 大鼠 Slit2 siRNA 的设计、慢病毒载体的构建及测序鉴定 根据 Genbank 中大鼠 *Slit2* 基因编码序列(NM_022632),使用 Ambion 公司软件,根据 siRNA 设计原则设计 2 条针对大鼠 *Slit2* 基因靶位点的干扰序列(表 1),引物退火制备 DNA。限制性内切酶 AgeI 与 EcoRI 双酶切 GV248 获得双链线性载体,T4 DNA 连接酶催化双链线性载体与 DNA 连接过夜(表 2),经大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 转化,挑选阳性克隆,测序鉴定。

表 1 大鼠 *Slit2* 基因干扰序列

序号	5'	茎	环	茎	3'
Lv-rSlit2-siRNA1-a	CCGG	TGACAAAGGAGATGATAAA	CTCGAG	TTTATCATCTCCTTTGTCA	TTTTTg
Lv-rSlit2-siRNA1-b	AATTCAAAAA	TGACAAAGGAGATGATAAA	CTCGAG	TTTATCATCTCCTTTGTCA	
Lv-rSlit2-siRNA2-a	CCGG	CGACTAGACCTGAGTAATA	CTCGAG	TATTACTCAGGTCTAGTCG	TTTTTg
Lv-rSlit2-siRNA2-b	AATTCAAAAA	CGACTAGACCTGAGTAATA	CTCGAG	TATTACTCAGGTCTAGTCG	

注:Lv:慢病毒;siRNA:小干扰 RNA

表 2 慢病毒载体构建框架

序号	物种	靶序列(5'→3')	GC 含量(%)
Lv-rSlit2-siRNA1	大鼠	TGACAAAGGAGATGATAAA	31.58
Lv-rSlit2-siRNA2	大鼠	CGACTAGACCTGAGTAATA	42.11

注:Lv:慢病毒;siRNA:小干扰 RNA

1.2.3 慢病毒的包装、浓缩与滴度测定 转染前 24 h 将处于对数生长期的 293T 细胞接种于直径 10 cm 的培养皿,待细胞 60% ~ 70% 融合时,采用无血清 DMEM 培养基处理细胞 6 h,行病毒三质粒共转染包装病毒。挑选测序正确的阳性克隆菌液进行质粒抽提,取 GV248 20 μ g、病毒包装质粒 Helper1.0 15 μ g 及 Helper2.0 10 μ g 与转染试剂混合,调整总体积为 1 ml,在室温下孵育 15 min,缓慢滴加于 293T 细胞培养基,转染后 72 h 收获细胞上清。用离心机在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 4 000 $\times g$ 离心 10 min 以去除细胞碎片;取上清,离心半径 13.5 cm,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 25 000 r/min 离心 2 h,弃上清,PBS 重悬;1 000 r/min 离心 5 min,取上清,收获纯化后的慢病毒,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取 1 支慢病毒逐孔稀释,转染 293T 细胞 48 h,加入抗性药物 Puromycin,维持药物质量浓度为 3 μ g/ml,继续培养 1 d,观察细胞生长状况及增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent

protein,EGFP) 表达情况,计算慢病毒滴度。病毒滴度=活细胞数/病毒原液量。

1.2.4 Lv-rSlit2-siRNA 转染大鼠 RPE 细胞株 将生长状态良好的大鼠 RPE 细胞以 1×10^6 /孔的密度接种于 6 孔板,分为空白对照组、空病毒组、Lv-rSlit2-siRNA1 组和 Lv-rSlit2-siRNA2 组,每组设 3 个平行复孔,接种后 6 h 待细胞完全贴壁后更换为无血清培养基处理 24 h,将空白对照组、空病毒组、Lv-rSlit2-siRNA1 组和 Lv-rSlit2-siRNA2 组分别以新鲜完全培养基、空载病毒、Lv-rSlit2-siRNA1 以及 Lv-rSlit2-siRNA2 进行处理,空病毒组、Lv-rSlit2-siRNA1 组和 Lv-rSlit2-siRNA2 组中各组病毒均以感染复数(multiplicity of infection,MOI)100 进行转染,转染后 12 h 更换新鲜完全培养基,转染后 72 h 显微镜下观察转染情况,评估转染率。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 法和 Western blot 法分别检测各组大鼠 *Slit2* 基因的敲减效率 根据 Trizol 试剂说明书提取各组细胞总 RNA,根据 Takara 逆转录试剂盒将其逆转录为 cDNA,利用特异性引物进行扩增。GAPDH 上游引物:5'-AGGCTGTGGGCAAGGTCATCC-3',下游引物:5'-CCGCCTGCTTACCACCTTCTT-3',扩增产物长度为 153 bp;Slit2 上游引物:5'-

CCACCGGAATACACAGGCGAAC-3', 下游引物: 5'-CTTTGGCGTCAGGATGCACTT-3', 扩增产物长度为 102 bp。根据 Takara 荧光定量 PCR 试剂盒说明书加样, 扩增条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 62 °C 退火延伸 30 s, 共 40 个循环。利用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各组细胞中 Slit2 mRNA 相对表达量。弃去 6 孔板培养基, 4 °C 条件下 PBS 轻柔冲洗细胞 3 次, 弃去 PBS; 用 RIPA 与 PMSF 以 9:1 体积比配成 60 μ l 蛋白裂解液, 均匀铺于细胞表面, 冰上裂解反应 30 min, 收集裂解产物; 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清, BCA 法测蛋白浓度。取 50 μ g 总蛋白于质量分数 8% SDS-PAGE 胶上电泳, 250 mA 转膜 3 h; 质量分数 5% 脱脂奶粉室温下封闭 2 h, TBST 洗膜, 每次 10 min, 共 3 次; 滴加一抗孵育 4 °C 过夜, 洗膜 10 min, 共 3 次; 滴加二抗, 室温下孵育 1 h, 洗膜 10 min, 共 3 次, ECL 法显色。大鼠 RPE 细胞中 Slit2 蛋白相对表达量 = Slit2 蛋白表达量 / GAPDH 蛋白表达量, 并筛选出高效干扰序列用于后续实验。

1.2.6 CoCl₂ 处理转染和未转染最佳慢病毒重组载体的大鼠 RPE 细胞 将敲减效率较高的慢病毒干扰载体 (Lv-rSlit2-siRNA2 组) 再次转染大鼠 RPE 细胞, 将转染和未转染慢病毒重组载体的大鼠 RPE 细胞分别以 1×10^6 / 孔的密度接种于 6 孔板, 接种后 6 h 待细胞贴壁后更换为无血清培养基处理 24 h。将终浓度 0、100、200、400 μ mol/L CoCl₂ 分别加入各组大鼠 RPE 细胞, 培养后 24 h 收集细胞及细胞上清液。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 法和 ELISA 法分别检测 VEGFA mRNA 和蛋白的表达 根据 Trizol 试剂说明书提取各组细胞总 RNA, 根据 Takara 逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA, 大鼠 GAPDH 上游引物: 5'-AGGCTGTGGGCAAGGTCATCCC-3', 下游引物: 5'-CCGCCTGCTTACACACCTTCTT-3'; 大鼠 VEGFA 上游引物: 5'-TGGCCATCAAGCTCTCTCCTC-3', 下游引物 5'-GGAAGGGTAAGCCACTCACACA-3', 扩增产物长度为 252 bp。根据 Takara 荧光定量 PCR 试剂盒说明书加样, 扩增条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 62 °C 退火延伸 30 s, 共 40 个循环。利用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 VEGFA mRNA 相对表达量。取各组细胞上清液按照大鼠 VEGFA ELISA 试剂盒说明书加样, 37 °C 反应 90 min, 加生物素标记抗体, 37 °C 反应 60 min, 1 倍洗涤缓冲液洗涤 3 次, 加 ABC, 37 °C 反应 30 min, 1 倍洗涤缓冲液洗涤 5 次; TMB 37 °C 反应 15 ~ 20 min, 加入 TMB 终止液。计算细胞上清液中 VEGFA 的质量浓度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 进行统计分析。本研究中各检测指标的数据资料经 W 检验证实呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。基因敲除效率评估和有效序列筛选采用均衡分组单因素干预多水平分组研究设计, 空白对照组、空病毒组、Lv-rSlit2-siRNA1 组和 Lv-rSlit2-siRNA2 组间大鼠 RPE 细胞中 Slit2 mRNA 及蛋白相对表达量的总体差异比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。关于 VEGFA 表达量变化的评估采用析因设计, 空白对照组与 Lv-rSlit2-siRNA2 组在不同浓度 CoCl₂ 作用后 RPE 细胞中 VEGFA mRNA 表达和细胞上清液中 VEGFA 蛋白质量浓度的总体差异比较采用两因素方差分析, 多重比较采用 LSD-*t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒重组载体测序

将 2 条大鼠 Slit2 基因慢病毒干扰重组序列阳性克隆进行测序鉴定, 证实均插入正确, 无突变序列 (图 1)。

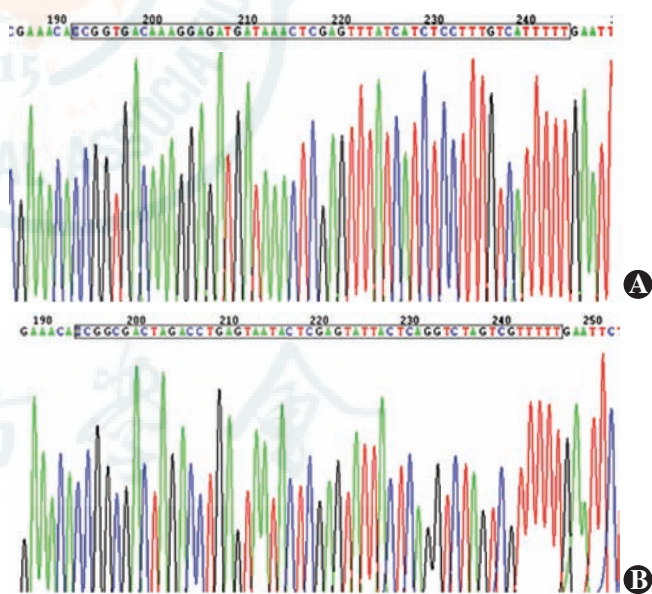


图 1 慢病毒重组载体测序 A: Lv-rSlit2-siRNA1 测序 B: Lv-rSlit2-siRNA2 测序 黑色方框内表示正确插入的 siRNA 序列

2.2 三质粒共转染 293T 细胞中 EGFP 的表达情况及病毒滴度

0.1 μ l 慢病毒原液感染后, 293T 细胞形态不规则, 贴壁性较好, EGFP 的表达率约为 30%。1 μ l 慢病毒原液感染后, 大部分细胞形态不规则, 少数细胞形态缩圆, 贴壁性较好, EGFP 的表达率约为 80%。10 μ l 慢病毒原液感染后, 部分细胞形态不规则, 部分细胞形

态缩圆,EGFP 的表达率近 100% (图 2)。培养后 24 h, Lv-rSlit2-siRNA1 和 Lv-rSlit2-siRNA2 的滴度分别为 5×10^8 TU/ml 和 3×10^8 TU/ml。

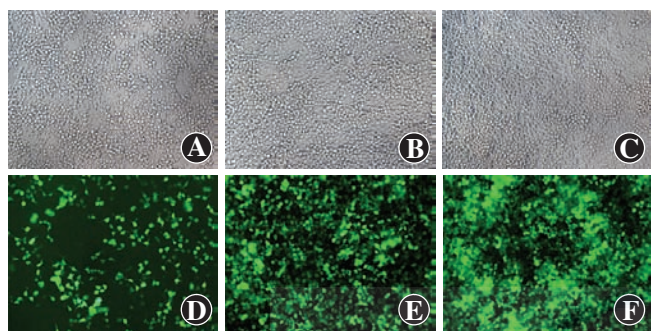


图 2 慢病毒转染 293T 细胞荧光图 ($\times 200$) A:0.1 μ l 慢病毒原液感染 293T 细胞白光视野图 可见细胞形态不规则,贴壁性较好,有较强的折光性 B:1 μ l 慢病毒原液感染 293T 细胞白光视野图 可见大部分细胞形态不规则,少数细胞形态缩圆,贴壁性较好,有较强的折光性 C:10 μ l 慢病毒原液感染 293T 细胞白光视野图 可见部分细胞形态不规则,部分细胞形态缩圆,有较强的折光性 D:0.1 μ l 慢病毒原液感染 293T 细胞荧光图 可见 EGFP 的表达率约为 30% E:1 μ l 慢病毒原液感染 293T 细胞荧光图 可见 EGFP 的表达率约为 80% F:10 μ l 慢病毒原液感染 293T 细胞荧光图 可见 EGFP 的表达率近 100%

2.3 Lv-rSlit2-siRNA 在大鼠 RPE 细胞中的转染效率

转染病毒后 72 h, Lv-rSlit2-siRNA1 组和 Lv-rSlit2-siRNA2 组大鼠细胞呈不规则形态,折光性较好,贴壁良好,慢病毒转染率均在 70% 以上。空病毒组细胞呈不规则形态,折光性较好,贴壁良好,部分大鼠 RPE 细胞表达 EGFP,表达率约为 80%。空白对照组细胞呈不规则形态,折光性较好,贴壁良好,未见细胞表达 EGFP (图 3)。

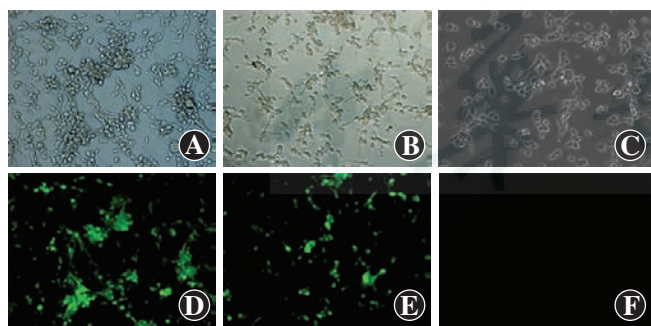


图 3 慢病毒感染大鼠 RPE 细胞后 EGFP 表达情况 ($\times 200$) A:Lv-rSlit2-siRNA 明场视野 可见细胞呈不规则形态,折光性较好,贴壁良好 B:空病毒组明场视野 可见细胞呈不规则形态,折光性较好,贴壁良好 C:空白对照明场视野 可见细胞呈不规则形态,折光性较好,贴壁良好 D:Lv-rSlit2-siRNA 组荧光视野 部分大鼠 RPE 细胞表达 EGFP,表达率约为 80% E:空病毒组荧光视野 部分大鼠 RPE 细胞表达 EGFP,表达率约为 80% F:空白对照组荧光视野 未见细胞表达 EGFP

2.4 各组大鼠 Slit2 mRNA 的相对表达量比较

实时荧光定量 PCR 结果显示,空白对照组、空病毒组、Lv-rSlit2-siRNA1 组和 Lv-rSlit2-siRNA2 组细胞

中大鼠 Slit2 mRNA 的相对表达量分别为 1.03 ± 0.31 、 0.92 ± 0.07 、 0.67 ± 0.09 和 0.23 ± 0.11 ,组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 15.320$, $P = 0.001$)。其中 Lv-rSlit2-siRNA1 组和 Lv-rSlit2-siRNA2 组细胞中大鼠 Slit2 mRNA 相对表达量均明显低于空白对照组,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$),空病毒组细胞中大鼠 Slit2 mRNA 相对表达量与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 4)。

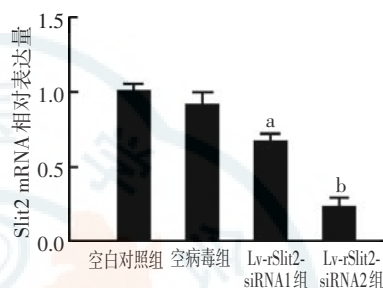


图 4 各组大鼠 RPE 细胞中 Slit2 mRNA 相对表达量的比较 $F = 15.320$, $P = 0.001$. 与空白对照组比较, $^a P < 0.05$, $^b P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 9$) Lv:慢病毒; siRNA:小干扰 RNA

2.5 各组大鼠 Slit2 蛋白相对表达量比较

Western blot 法检测显示,空白对照组和空病毒组大鼠 RPE 细胞中 Slit2 蛋白表达条带较强, Lv-rSlit2-siRNA1 组和 Lv-rSlit2-siRNA2 组大鼠 RPE 细胞中 Slit2 蛋白表达条带明显减弱,以 Lv-rSlit2-siRNA2 组减弱更为明显,故筛选其为最佳干扰序列。空白对照组、空病毒组、Lv-rSlit2-siRNA1 组和 Lv-rSlit2-siRNA2 组大鼠 RPE 细胞中 Slit2 蛋白的相对表达量分别为 1.00 ± 0.10 、 0.95 ± 0.11 、 0.62 ± 0.07 和 0.49 ± 0.02 ,组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 24.340$, $P = 0.000$),其中 Lv-rSlit2-siRNA1 组和 Lv-rSlit2-siRNA2 组大鼠 RPE 细胞中 Slit2 蛋白的相对表达量均明显低于空白对照组,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$),而空病毒组与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 5)。

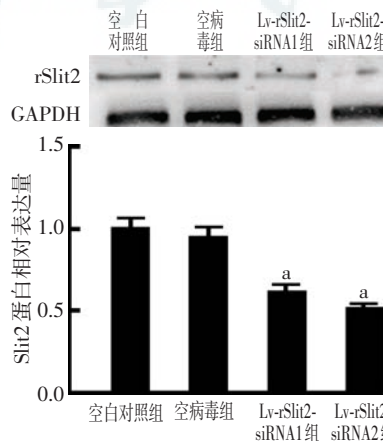


图 5 各组大鼠 RPE 细胞中 Slit2 蛋白相对表达量的比较 A: Western blot 法检测可见 Lv-rSlit2-siRNA1 组和 Lv-rSlit2-siRNA2 组细胞中 Slit2 蛋白表达条带较空白对照组和空载病毒组明显减弱 B: 各组大鼠 RPE 细胞中 Slit2 蛋白相对表达量的比较

$F = 24.340$, $P = 0.000$. 与空白对照组比较, $^a P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 9$) Lv:慢病毒; siRNA:小干扰 RNA

2.6 不同浓度 CoCl_2 作用后大鼠 RPE 细胞中 VEGFA mRNA 和蛋白表达变化

实时荧光定量 PCR 结果显示,不同浓度 CoCl_2 作用后各组大鼠 RPE 细胞中 VEGFA mRNA 的相对表达量明显不同,差异均有统计学意义 ($F_{\text{浓度}} = 127.998$, $P < 0.01$; $F_{\text{分组}} = 69.663$, $P < 0.01$), CoCl_2 浓度和组间存在交互作用 ($F_{\text{交互作用}} = 14.368$, $P < 0.001$)。ELISA 检测结果显示,不同浓度 CoCl_2 作用后各组大鼠 RPE 细胞中 VEGFA 蛋白相对表达量均明显不同,差异均有统计学意义 ($F_{\text{浓度}} = 17.059$, $P < 0.01$; $F_{\text{分组}} = 91.791$, $P < 0.01$), CoCl_2 浓度与组间不存在交互作用 ($F_{\text{交互作用}} = 1.825$, $P > 0.05$)。随着 CoCl_2 浓度的增加,空白对照组和 Lv-rSlit2-siRNA2 组大鼠 RPE 细胞中 VEGFA mRNA 表达量及其蛋白质量浓度均呈增加的趋势,100、200 和 400 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用后 Lv-rSlit2-siRNA2 组大鼠 RPE 细胞中 VEGFA mRNA 表达量及蛋白质量浓度均明显低于空白对照组,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (表 3, 4)。

表 3 不同浓度 CoCl_2 作用后各组细胞中 VEGFA mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同浓度 CoCl_2 作用后 VEGFA mRNA 相对表达水平			
		0 $\mu\text{mol/L}$	100 $\mu\text{mol/L}$	200 $\mu\text{mol/L}$	400 $\mu\text{mol/L}$
空白对照组	9	0.99 ± 0.04	1.07 ± 0.06	1.63 ± 0.16 ^a	2.22 ± 0.15 ^a
Lv-rSlit2-siRNA2 组	9	1.04 ± 0.13	0.64 ± 0.04 ^b	0.81 ± 0.16 ^b	1.86 ± 0.11 ^{ab}

注: $F_{\text{浓度}} = 127.998$, $P < 0.01$; $F_{\text{分组}} = 69.663$, $P < 0.01$; $F_{\text{交互作用}} = 14.368$, $P < 0.001$ 。与各自组内 0 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用后比较, ^a $P < 0.05$; 与各自的空白对照组比较, ^b $P < 0.05$ (析因设计两因素方差分析, LSD-*t* 检验) VEGF: 血管内皮生长因子; Lv: 慢病毒; siRNA: 小干扰 RNA

表 4 不同浓度 CoCl_2 作用后各组 VEGFA 蛋白质量浓度比较 ($\bar{x} \pm s$, $\text{pg}/100 \mu\text{l}$)

组别	样本量	不同浓度 CoCl_2 作用后 VEGFA 质量浓度			
		0 $\mu\text{mol/L}$	100 $\mu\text{mol/L}$	200 $\mu\text{mol/L}$	400 $\mu\text{mol/L}$
空白对照组	9	22.27 ± 19.07	59.80 ± 4.31 ^a	73.17 ± 1.99 ^a	93.96 ± 4.15 ^a
Lv-rSlit2-siRNA2 组	9	14.39 ± 5.24	37.62 ± 3.86 ^{ab}	54.34 ± 5.19 ^{ab}	89.93 ± 4.43 ^{ab}

注: $F_{\text{浓度}} = 127.998$, $P < 0.001$; $F_{\text{分组}} = 69.663$, $P < 0.001$; $F_{\text{交互作用}} = 14.368$, $P < 0.001$ 。与各自组内 0 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用后比较, ^a $P < 0.05$; 与各自的空白对照组比较, ^b $P < 0.05$ (析因设计两因素方差分析, LSD-*t* 检验) VEGF: 血管内皮生长因子; Lv: 慢病毒; siRNA: 小干扰 RNA

3 讨论

研究证实 Slit2 及其受体表达于 RPE 细胞中^[8-9], 在增生性糖尿病视网膜病变 (proliferative diabetic retinopathy, PDR) 模型中, Slit2-N 重组蛋白刺激 RPE 细胞能上调细胞中 VEGF 的表达, 促进 PDR 的发生和

进展^[9], 与本课题组前期研究结果相符^[6-7]。RPE 细胞分泌的 VEGFA (VEGF 的一个重要亚型) 参与 CNV 的发生和发展^[10]。在体内探索 *Slit2* 基因沉默后对 CNV 的影响及其机制有助于寻找治疗 CNV 的新靶点。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是指生物在进化过程中高度保守的、由双链 RNA 诱发的、同源 mRNA 高效特异性降解的现象。本实验中采用 Ambion 公司软件针对大鼠 *Slit2* 基因设计了 2 条 siRNA, 遵循 siRNA 设计原则, 如靶点在基因所有 NM 转录本同源区, 研究已知靶点的 GC 碱基含量为 32% ~ 79%^[11-12], 本实验选取的 2 个靶点 GC 碱基的含量分别为 31.58% 和 42.11%, 均满足理论要求。在本实验中, 实时荧光定量 PCR 以及 Western blot 结果显示重组序列 Lv-rSlit2-siRNA2 较 Lv-rSlit2-siRNA1 对靶基因的敲除效力更强, 故筛选为有效干扰重组序列, 这可能与具有更多的 GC 碱基而与靶点结合更稳固有关。siRNA 在实际产生效应过程中对靶基因的干扰效率受多方面因素影响, 除了 siRNA 序列本身的敲减效力外, 还受到目标 mRNA 在胞内的二级结构、载体转染效率等因素的影响, 所以滴度高、安全性佳以及表达持续稳定的病毒载体是成功干扰基因的关键因素之一。

与其他转染方法相比, 慢病毒载体转染效率高, 持续稳定表达时间长^[13]。慢病毒载体不仅广泛应用于细胞水平的基因干扰, 近年来其作为安全、有效的基因载体工具在动物活体眼内转染的应用也受到广泛关注^[14-15]。眼球有血-视网膜屏障的保护作用及高度隔离的独特解剖结构, 可较大程度地发挥全身免疫隔离作用, 为动物活体眼部基因转染以及基因治疗提供了解剖优势。慢病毒载体本身具有安全、稳定的特点, 其对分裂及非分裂期细胞均有较强的转染能力, 已成为基因功能和治疗研究的有效工具^[16]。除上述优点外, 慢病毒在活体眼球内对 RPE 细胞的转染能力较其他转染载体更强^[17], 可作为我们下一步体内实验的目标载体工具。本实验构建的大鼠 *Slit2* 基因慢病毒干扰载体采用的是第 3 代慢病毒三质粒转染系统, 即 GV248、pHelper 1.0 和 pHelper 2.0 3 种质粒。pHelper 1.0 辅助质粒中包含 *gag*、*pol* 以及 *rev* 基因, 分别编码人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 的结构蛋白、病毒相关酶以及调节 *gag*、*pol* 和 *rev* 基因表达的调节因子; pHelper 2.0 辅助质粒中包含水疱性口炎病毒包膜蛋白基因, 编码病毒包装所需要的包膜蛋白, 其与传统的 HIV 包膜蛋白相比, 具有更强的感染能力, 并扩大了感染宿主的范围。此外, 本实验采用的第 3 代慢病毒三质粒转染系统剔除了 HIV 的

env、*vif*、*vpr*、*vpu* 和 *nef* 基因,不仅能够转染处于分裂期以及非分裂期的细胞,而且能够大大降低有复制能力的病毒复制,提高了转染的安全性^[18-20]。

本研究利用慢病毒载体对大鼠 *Slit2* 基因干扰序列进行包装,并筛选出有效干扰重组序列,在大鼠细胞水平进行转染及筛选的必要性主要有:(1)生产大鼠 *Slit2* 基因慢病毒干扰重组载体,其滴度分别达 5×10^8 TU/ml 和 3×10^8 TU/ml,荧光显微镜下估测的转染率均超过 70%,一定程度上为大鼠体内实验的成功转染奠定了基础。(2)大鼠 *Slit2* 基因编码区序列长达 7 135 bp,即便是理论上可行的 siRNA 序列也可能由于大鼠 *Slit2* 基因编码的 mRNA 空间结构复杂而造成 siRNA 序列在实际转染中难以有效下调靶基因的表达。因此,目的基因的 siRNA 序列若不经过大鼠细胞水平的筛选而直接进行体内基因干扰,则难以保证干扰序列的有效性,甚至因此导致大鼠体内实验失败。

本研究对缺氧诱导的 VEGFA 表达调控研究结果显示,随着 CoCl_2 质量浓度的增加,空白对照组和 Lv-r*Slit2*-siRNA2 组大鼠 RPE 细胞中 VEGFA 表达上调,相同质量浓度 CoCl_2 作用下 Lv-r*Slit2*-siRNA2 组大鼠 RPE 细胞中 VEGFA 表达水平均低于空白对照组,说明 Lv-r*Slit2*-siRNA2 能明显下调缺氧状态下大鼠 RPE 细胞中 VEGFA 的表达。

综上所述,本研究采用第 3 代慢病毒载体三质粒构建系统成功构建了 2 条大鼠 *Slit2* 基因慢病毒干扰重组载体,其中 Lv-r*Slit2*-siRNA2 对靶基因的敲减效率达 50% 以上,且能明显下调大鼠缺氧状态下 RPE 细胞中 VEGFA 的表达,为应用 Lv-r*Slit2*-siRNA2 进行大鼠眼部基因干扰研究提供了实验依据。本实验为探索 *Slit2* 基因在 CNV 发生和发展中的作用、机制及寻找治疗 CNV 新靶点的大鼠体内实验提供了新的思路。

参考文献

- [1] Shao J, Choudhary MM, Schachat AP. Neovascular age-related macular degeneration[J]. Dev Ophthalmol, 2016, 55(3): 125-136. DOI: 10.1159/000438969.
- [2] Youngblood V, Wang S, Song W, et al. Elevated Slit2 activity impairs VEGF-induced angiogenesis and tumor neovascularization in EphA2-deficient endothelium[J]. Mol Cancer Res, 2015, 13(3): 524-537. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0142.
- [3] Cai H, Xue Y, Li Z, et al. Roundabout4 suppresses glioma-induced endothelial cell proliferation, migration and tube formation *in vitro* by inhibiting VEGFR2-mediated PI3K/AKT and FAK signaling pathways[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(5): 1689-1705. DOI: 10.1159/000373982.
- [4] Rama N, Dubrac A, Mathivet T, et al. Slit2 signaling through Robo1 and Robo2 is required for retinal neovascularization[J]. Nat Med, 2015, 21(5): 483-491. DOI: 10.1038/nm.3849.
- [5] Yu J, Zhang X, Kuzontkoski PM, et al. Slit2N and Robo4 regulate lymphangiogenesis through the VEGF-C/VEGFR-3 pathway[J/OL]. Cell Commun Signal, 2014, 12(1): 25 [2017-01-22]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4122147/. DOI: 10.1186/1478-811X-12-25.
- [6] 梅雨, 周希媛. Slit2 基因转染对人视网膜色素上皮细胞 VEGF 表达的影响及其作用机制[J]. 重庆医科大学学报, 2014, 39(11): 1594-1599. DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000389.
- [7] Mei Y, Zhou XY. Effect of Slit2 gene transfection on vascular endothelial growth factor in retinal pigment epithelium cells and its mechanism[J]. J Chongqing Med Univ, 2014, 39(11): 1594-1599. DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000389.
- [8] 张明慧, 周希媛. 腺病毒介导 slit2 基因转染人视网膜色素上皮细胞对 RF/6A 细胞迁移及管腔形成的影响[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(16): 1619-1623. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201411197.
- [9] Zhang MH, Zhou XY. Retinal pigment epithelial cells with adenovirus-slit2 transfectin improve migration and tube formation in choroidal vascular endothelial cells *in vitro*[J]. J Third Mil Med Univ, 2015, 37(16): 1619-1623. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201411197.
- [10] Huang L, Xu Y, Yu W, et al. Effect of Robo1 on retinal pigment epithelial cells and experimental proliferative vitreoretinopathy[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(6): 3193-3204. DOI: 10.1167/iov.09-3779.
- [11] Zhou W, Yu W, Xie W, et al. The role of SLIT-ROBO signaling in proliferative diabetic retinopathy and retinal pigment epithelial cells[J]. Mol Vis, 2011, 17: 1526-1536.
- [12] Schwesinger C, Yee C, Rohan RM, et al. Intrachoroidal neovascularization in transgenic mice overexpressing vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium[J]. Am J Pathol, 2001, 158(3): 1161-1172. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64063-1.
- [13] Motoyama K, Mitsuyasu R, Akao C, et al. Design and evaluation of thioalkylated mannose-modified dendrimer (G3)/ α -cyclodextrin conjugates as antigen-presenting cell-selective siRNA carriers[J]. AAPS J, 2014, 16(6): 1298-1308. DOI: 10.1208/s12248-014-9665-9.
- [14] 许德晖, 黄辰, 刘利英, 等. 高效 siRNA 设计的研究进展[J]. 遗传, 2006, 28(11): 1457-1461.
- [15] Xu DH, Huang C, Liu LY, et al. New progress of the highly efficient siRNA design[J]. HEREDITAS (BEIJING), 2006, 28(11): 1457-1461.
- [16] Mátrai J, Chuah MK, VandenDriessche T. Recent advances in lentiviral vector development and applications[J]. Mol Ther, 2010, 18(3): 477-490. DOI: 10.1038/mt.2009.319.
- [17] Yu YJ, Mo B, Liu L, et al. Inhibition of choroidal neovascularization by lentivirus-mediated PEDF gene transfer in rats[J]. Int J Ophthalmol, 2016, 9(8): 1112-1120. DOI: 10.18240/ijo.2016.08.05.
- [18] Du J, Zhao W, Wang Y, et al. Lentivirus vector-mediated knockdown of erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma receptors B4 inhibits laser-induced choroidal neovascularization[J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2013, 29(1): 14-22. DOI: 10.1089/jop.2012.0077.
- [19] Han Z, Conley SM, Naash MI. Gene therapy for Stargardt disease associated with ABCA4 gene[J]. Adv Exp Med Biol, 2014, 801: 719-724. DOI: 10.1007/978-1-4614-3209-8_90.
- [20] Askou AL. Development of gene therapy for treatment of age-related macular degeneration[J]. Acta Ophthalmol, 2014, 92(7): 1-38. DOI: 10.1111/aos.12452.
- [18] 张艳君, 贾秀红, 李建厂, 等. 病毒及非病毒载体对 U937 单核细胞的转染效果[J]. 重庆医科大学学报, 2013, 38(2): 161-164. DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2013.02.013.
- [19] Zhang YJ, Jia XH, Li JC, et al. Transfection efficiency of virus and non-viral vectors against U937 monocytes[J]. J Chongqing Med Univ, 2013, 38(2): 161-164. DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2013.02.013.
- [19] 李妍, 杜红延, 李红卫. 慢病毒载体及其在 RNA 干扰技术中的应用与发展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2013, 5(1): 55-60.
- [20] Li Y, Du HY, Li HW. Lentiviral vector and its application and development in the RNA interference technology[J]. J Mol Diagn Ther, 2013, 5(1): 55-60.
- [20] 徐思慧, 宋春敬, 潘晔. 腺病毒载体与慢病毒载体感染骨髓间充质干细胞的比较[J]. 生命科学研究, 2013, 17(6): 543-547.
- [20] Xu SH, Song CJ, Pan Y. Gene Transfer into mesenchymal stem cells: a comparison between the adenoviral and lentiviral vector delivery systems[J]. Life Sci Res, 2013, 17(6): 543-547.

(收稿日期: 2017-04-17)

(本文编辑: 刘艳)