

NRSF 慢病毒干涉载体的构建及功能初步检测 *

杨印祥 李艳华 刘庆斌 张赛男 陈琳 吕洋 白慈贤 南雪 裴雪涛 **

(军事医学科学院输血医学研究所干细胞与再生医学研究室, 北京 100850)

摘要 为研究神经元限制性沉默因子(NRSF)负调控神经元及胰岛细胞中神经特异性基因的表达, 拟通过 RNAi 的方法降低 NRSF 表达以进一步观察其调控的下游基因的表达情况. 构建含人胰岛素启动子-荧光素酶(HIP-LUC)的 pcDNA3.1 报告载体. 通过 RNAi 序列设计软件进行 NRSF 干涉片段及脱靶对照片段的设计, 然后构建慢病毒干涉载体. 包装产生慢病毒干涉毒液, 用其感染 HeLa 细胞获得稳定干涉 NRSF 的细胞株, 利用 RT-PCR、实时定量 PCR、蛋白质免疫印迹、免疫荧光染色等方法检测 NRSF 的干涉效果及其下游基因的表达情况, 观察干涉 NRSF 后胰岛素启动子报告载体荧光素酶活性的变化. 构建具有 NRSF 干涉效果的慢病毒干涉载体成功, 并获得了稳定干涉 NRSF 及脱靶对照的 HeLa 细胞株, RT-PCR 及实时定量 PCR 检测结果表明, NRSF 干涉片段的干涉效率为 56% ($n=6$, $P<0.01$), 蛋白质免疫印迹、免疫荧光染色方法检测证实干涉后 NRSF 蛋白表达水平明显降低. RT-PCR 实验表明干涉 NRSF 后下游基因开始表达, 荧光素酶活性分析表明, 干涉 NRSF 后胰岛素启动子活性增强了 2.4 倍 ($n=3$, $P<0.01$). 上述结果表明, 成功构建 NRSF 的慢病毒干涉载体并获得稳定干涉 NRSF 的 HeLa 细胞株, 干涉 NRSF 后, 其下游基因特别是胰岛素基因开始表达. 这一研究工作有助于我们进一步了解 NRSF 在胰岛细胞发育分化中的调控作用.

关键词 神经元限制性沉默因子, 神经元限制性沉默元件, RNA 干涉, 胰岛素

学科分类号 Q291, Q789

神经元限制性沉默因子 (neuron-restrictive silencer factor, NRSF/RE-1 silencing transcription factor, REST) 是一分子质量为 116 ku 的 Cys2/His2 型锌指蛋白, 属于 Gli-Kruppel 样转录因子家族^[1]. NRSF 最初是在神经系统中被广泛研究的, 它作为阻遏蛋白出现在胚胎、神经前体细胞及非神经细胞中并阻遏神经性基因的表达. 其作用机制是 NRSF 蛋白和靶基因的神经元限制性沉默元件 (neuron-restrictive silencer element, NRSE/repressor element-1, RE1)^[2, 3]相结合, 随后, NRSF 的 N 端结构域能结合 mSin3A/B^[4], C 端结构域能结合 CoREST^[5], 形成的共阻遏复合体将组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 及相关蛋白招募到靶基因的启动子区, 使靶基因的组蛋白发生去乙酰化, 从而对某些神经特异性基因的转录发挥阻遏作用. 除此之外, 也有报道甲基化机制参与实现 NRSF 的阻遏作用^[6]. 另外, 非编码 dsRNA(double-stranded RNAs)也能和 NRSF 相互作用从而调控 NRSF 靶基因的表达^[7].

大量研究结果表明, NRSF 蛋白在神经系统的发育过程中扮演着重要的角色, NRSF 抑制神经元

特异性基因在非神经元细胞中的表达^[8]. 在神经元分化过程中, NRSF 表达下降, 而受其调控的绝大多数基因随神经细胞分化而表达逐渐增多, 这些基因编码的蛋白质涉及离子通道、神经递质、生长因子、激素及调控轴突生长、囊泡运输及释放的因子等. NRSF 表达的下调是保证神经元正确分化的重要基础, 也是神经元表型维持所必需的, 用 REST-VP16 和 NRSF 竞争性结合 NRSE, 能直接激活 NRSF 所抑制的目标基因, 并有效诱导神经干细胞向神经元分化^[9].

尽管胚胎起源不同, 胰岛细胞和神经细胞却有着大量的相似性. 他们具有相似的发育机制及相似的表型及功能特点, 比如 β 细胞也存在电兴奋性, 其胞吐作用与神经突触小泡释放神经递质的过程相似, 两者对激素刺激的反应相似, 除了都表达转录

* 国家高技术研究发展计划(863)领域重大专项资助项目 (2006AA02A107), 国家重点基础研究发展计划 (973) (2005CB522702)和国家自然科学基金资助项目(30470831).

** 通讯联系人.

Tel: 010-66932240, Fax: 010-68164807, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2007-06-16, 接受日期: 2007-08-06

激活因子 Islet-1, Pax-6, Beta2 外, 两种细胞都不表达 NRSF 蛋白, 重要的是, 一些已知在神经元细胞中受到 NRSF 调控的基因如 II 型钠离子通道, 谷氨酸受体等在胰岛细胞中均有表达^[10]. 这两种细胞功能的相似提示着二者存在相似的转录调控机制, 不表达 NRSF 可能正是他们具有相似性的源泉^[10], NRSF 蛋白在胰岛细胞发育分化中可能也发挥重要的调控作用. 更新的研究表明, NRSF 参与调控胰岛 β 细胞中神经性基因的表达, 如 Pax4^[11]、PC2^[12]、Connexin36^[13]、IB1/JIP-1^[14]等. 我们前期研究结果表明, 人胰岛素基因启动子内也存在 NRSE 序列, 该序列通过与 NRSF 蛋白结合来抑制人胰岛素启动子的转录活性^[15].

为进一步研究 NRSF 对胰岛细胞中胰岛素及其他相关基因的调控作用, 我们通过 RNAi 技术降低 HeLa 细胞中 NRSF 的表达, NRSF 被干涉后, 一些 HeLa 细胞本身不表达的受到 NRSF 调控的基因, 如 Pax4, SCG10, BDNF 开始表达, 干涉 NRSF 后细胞中的胰岛素基因也开始表达, 同时通过荧光素酶报告系统定量分析进一步证明干涉 NRSF 后胰岛素基因启动子活性明显上升.

1 材料与方法

1.1 材料

293FT 细胞购自 Invitrogen 公司, HeLa 细胞本室保存. 细胞培养基及血清为 Gibco 公司产品. 丙酮酸钠、 β - 巯基乙醇、非必需氨基酸、L- 谷氨酰胺为 Sigma 公司产品. 携带人胰岛素启动子的质粒由德国 Knepel 教授惠赠. 慢病毒干涉载体 pSicoR 由 Andrea Ventura 博士惠赠, 慢病毒包装质粒 pLP1、pLP2 和包膜质粒 pLP/VSVG 购自 Invitrogen 公司. pcDNA3.1 载体为本室保存. pGL3-Basic 质粒购自 Promega 公司. pGL3-Control 质粒由国家生物医学分析中心惠赠. T 载体购自 Promega 公司. PCR 试剂盒、各种限制性内切酶、连接酶购自宝生物公司. 小量质粒抽提试剂盒购自北京道普公司. 转染级质粒抽提试剂盒购自 Qiagen 公司. 转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司. 核蛋白抽提试剂盒购自 Panomics 公司. BCA 蛋白定量试剂盒购自 Pierce 公司.

1.2 方法

1.2.1 质粒构建.

a. 携带人胰岛素启动子及萤火虫荧光素酶的 pcDNA3.1 载体构建: 用 PCR 方法从携带人胰岛素

启动子的质粒(德国 Knepel 教授惠赠, 启动子序列为胰岛素基因-339 到+112 的核苷酸序列, 将这段序列克隆至 pXP2 载体的 *Hind* III 位点而得到质粒)中扩增人胰岛素启动子序列(human insulin promoter, HIP), 在 PCR 引物前后分别加上 *Eco*R I、*Mlu* I 酶切位点, 引物序列为: HIP sense, CGACGCGT-CTGCAGCCTCCAGCTCTC, HIP antisense, CCG-GAATTCAGAGCTGGGGCCTGGG. 回收 PCR 产物后, 连接到 T 载体, 转化 DH5 α 感受态细胞后经蓝白斑筛选得到阳性克隆, 提取质粒经测序鉴定正确后, 用 *Eco*R I、*Mlu* I 双酶切, 回收胰岛素启动子序列片段, 同时用 *Eco*R I、*Mlu* I 双酶切 pcDNA3.1 载体, 回收大片段, 将回收的 2 个片段连接后, 转化 DH5 α 感受态细胞, 提取质粒, *Eco*R I、*Mlu* I 双酶切验证后经 *Xho* I、*Xba* I 双酶切后回收大片段, 同时 pGL3-Basic 质粒经 *Xho* I、*Xba* I 双酶切后回收荧光素酶基因(luciferase, Luc)编码序列, 将回收片段连接, 转化 DH5 α 感受态细胞, 提取质粒, *Mlu* I、*Xho* I、*Xba* I 酶切验证, 最终获得 pcDNA-HIP-Luc 质粒.

b. 人 NRSF 基因的慢病毒干涉载体的构建: 由网络 RNAi 序列设计软件(<http://hydra1.wistar.upenn.edu/Projects/siRNA/siRNAindex.htm>)设计产生针对人 NRSF 基因的符合 RNA 干涉片段特征的 19 bp RNA 序列及相应的脱靶对照序列, 根据慢病毒干涉载体 pSicoR 插入序列要求, 设计正义链: 5' T(N19)TTCAAGAGA(19N)TTTTTTC 3'; 反义链: 5' TCGAG AAAAAA(N19)TCTCTTGAA (19N) A 3', 其中 N19 为长度为 19 bp 的 RNA 干涉序列, 19N 为其反向互补序列. 合成引物后, 经退火、磷酸化后连接到慢病毒干涉载体, 转化 DH5 α 感受态细胞, 挑选阳性克隆并提取质粒, 经 *Xho* I、*Xba* I 双酶切鉴定正确后测序鉴定.

1.2.2 包装病毒. 293-FT 细胞培养条件为: 高糖 DMEM 添加 10% FBS、0.1 mmol/L NEAA、2 mmol/L L- 谷氨酰胺、500 mg/L G418. 转染前撤除 G418. 制备慢病毒干涉载体, 慢病毒干涉脱靶对照载体. 慢病毒干涉载体或慢病毒脱靶对照载体及包装质粒 pLP1, pLP2, pLP/VSVG 质粒用 Lipofectamine 2000 共转染 293FT 细胞. 10 h 后更换含 1 mmol/L 丙酮酸钠的完全培养基. 转染 48~72 h 后收集上清于 15 ml 的无菌离心管中. 4℃, 3 000 r/min 离心 15 min 以去除细胞碎片, 病毒上清分装冻存于-70℃ 备用.

1.2.3 获得稳定干涉 NRSF 的 HeLa 细胞. HeLa 细胞培养基为高糖 DMEM 添加 10% FBS, 50 U/ml 青霉素, 50 mg/L 链霉素. 去除 HeLa 细胞的培养基, 加入含 NRSF 干涉片段的慢病毒毒液或脱靶对照的慢病毒毒液及终浓度为 8 mg/L 的 Polybrene, 置 37℃, 5% CO₂ 的孵箱中培养过夜. 次日, 去除毒液, 添加完全培养液, 待细胞生长至 80%~90% 汇合时, 按 1:3 传代. 流式细胞术分选表达绿色荧光蛋白的细胞, 干涉 HeLa 细胞和脱靶对照 HeLa 细胞分别命名为 HeLa-siNRSF 和 HeLa-offtarget.

1.2.4 RT-PCR 和实时定量 PCR. 用 Trizol 试剂按照说明书方法提取 HeLa-siNRSF 和 HeLa-offtarget 细胞的总 RNA. 各取 1 µg RNA, 反转录成 cDNA. 用 PCR 方法检测 NRSF、SCG10、BDNF、pax4、insulin 等基因的表达情况, 以 GAPDH 为内参照. 所用引物序列为: NRSF sense, ACGCGTCGACCCAGCAACAAAGAAAAGTAGTCG, NRSF antisense, CCGCTCGAGAT CAGTTCTGCCATCTGTCT; SCG10 sense, AGCTGTCCATGCTGTCACTG, SCG10 antisense, TGCAGCCTCCAGTTCTTCTBDNF; Pax4 sense, GGGGCTCTTTGTGAATGG, Pax4 antisense, CCTGGTCCTCCTGTAA-TGC; insulin sense, GGAACGAGGCTTCTTCTCA-CA, insulin antisense, ACAATGCCACGCTTCTGC; BDNF sense, AAACATCCGAGGACAAGGTG; BDNF antisense, AGAAGAGGAGGCTCCAA-AGG; GAPDH sense, CTGACTTCAACAGCGAC-ACC; GAPDH antisense, TGCTGTAGCCAAATTCGTTGT. 用 SYBR GREEN 染料, 罗氏诊断产品(上海)有限公司 LightCycler2.0 型全自动荧光实时定量 PCR 系统进行实时荧光定量(Real-time)PCR 分析 NRSF 干涉效果.

1.2.5 Western blotting. HeLa-siNRSF 和 HeLa-offtarget 核蛋白用核蛋白抽提试剂盒按照说明书方法提取细胞核蛋白, BCA 法进行蛋白质定量. 两种细胞核蛋白各取 100 µg, 加入 6×上样缓冲液, 煮沸 5 min, 进行 SDS-PAGE, 电泳完毕, 用 iblot (Invitrogen)进行转膜, 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h 后, 加入兔抗人 NRSF 抗体(1:300), 4℃过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入 HRP 偶联山羊抗兔二抗(1:1000), 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 4 次, 每次 15 min, ECL 显影. 以 β-actin 为内参照.

1.2.6 免疫荧光染色. 细胞用 4%多聚甲醛固定 15 min 后, PBS 洗涤 3 次, 3% H₂O₂ 室温孵育 5~10 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 0.3% Triton X-100 破膜 30 min, 用山羊血清封闭 30 min. 兔抗人 NRSF (1:100, Santa Cruz) 4℃过夜, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入生物素标记二抗, 37℃ 20 min, PBS 洗涤 3 次, 滴加适当 cy3 标记的三抗, 室温 30 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 荧光显微镜下观察结果.

1.2.7 干涉 NRSF 后胰岛素启动子-荧光素酶活性的检测. 转染前一天于 24 孔板准备 HeLa-siNRSF 和 HeLa-offtarget 细胞, 保证转染时达到 90%的细胞汇合度. 细胞转染用 lipofectamine 2000, 按说明书方法进行. 转染 pcDNA-HIP-Luc 质粒或空 pGL3-basic 质粒(800 ng/孔), 同时共转染 pHRL-CMV 质粒(2 ng/孔)作为内参. 转染 6 h 后为细胞换液. 用完全培养液培养 48 h 后使用双重荧光素酶检测试剂盒 (Promega 公司) 检测萤火虫及海肾荧光素酶活性.

2 结 果

2.1 成功构建携带人胰岛素启动子及萤火虫荧光素酶的 pcDNA3.1 载体

我们通过 PCR 方法成功地克隆产生人胰岛素基因启动子序列(HIP, -339~+112, 图 1a), 序列凝胶回收后连接入 T 载体, 经测序鉴定正确, 将其替换掉 pcDNA3.1 载体的 CMV 启动子, *Mlu* I 和 *Eco*R I 酶切鉴定正确(图 1b). 然后用 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切 pGL3-Basic 质粒得到萤火虫荧光素酶基因(Luc)编码序列, 将其插入到胰岛素基因核心启动子下游, 经 *Mlu* I、*Xho* I 和 *Xba* I 酶切验证正确(图 1c), 表明成功构建 pcDNA-HIP-Luc 质粒(图 1d).

2.2 设计 NRSF 干涉片段及脱靶对照片段并构建慢病毒干涉载体质粒

经 wistar 网站提供的 RNAi 序列设计软件设计, 我们获得了 2 条 RNA 序列用于实验研究, 同时, 利用该网站提供的脱靶对照片段设计了 2 条干涉序列的脱靶对照序列. 所得到的 RNAi 序列及各自的脱靶对照序列为: siNRSF1, GAAGAACAGT-TTGTGCATC, siNRSF2, GCTACAATACTAATC-GATA; offtarget1, GACAGAGTAATTCCGAGTT, offtarget2, TGTCAAGTAACACATAATC. 根据载体要求体外合成包含这些序列的 DNA 序列, 经引

物退火, 磷酸化, 连接到慢病毒干涉载体, 转化 DH5 α 感受态细胞, 挑选克隆扩大培养, 提取质粒并用 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定, 以未连接干涉片段的空干涉载体作为阴性对照, 酶切鉴定正确

(图 2), 然后经测序鉴定确实已经将所设计的片段连接到慢病毒干涉载体中, 表明慢病毒干涉载体及脱靶对照载体均成功构建.

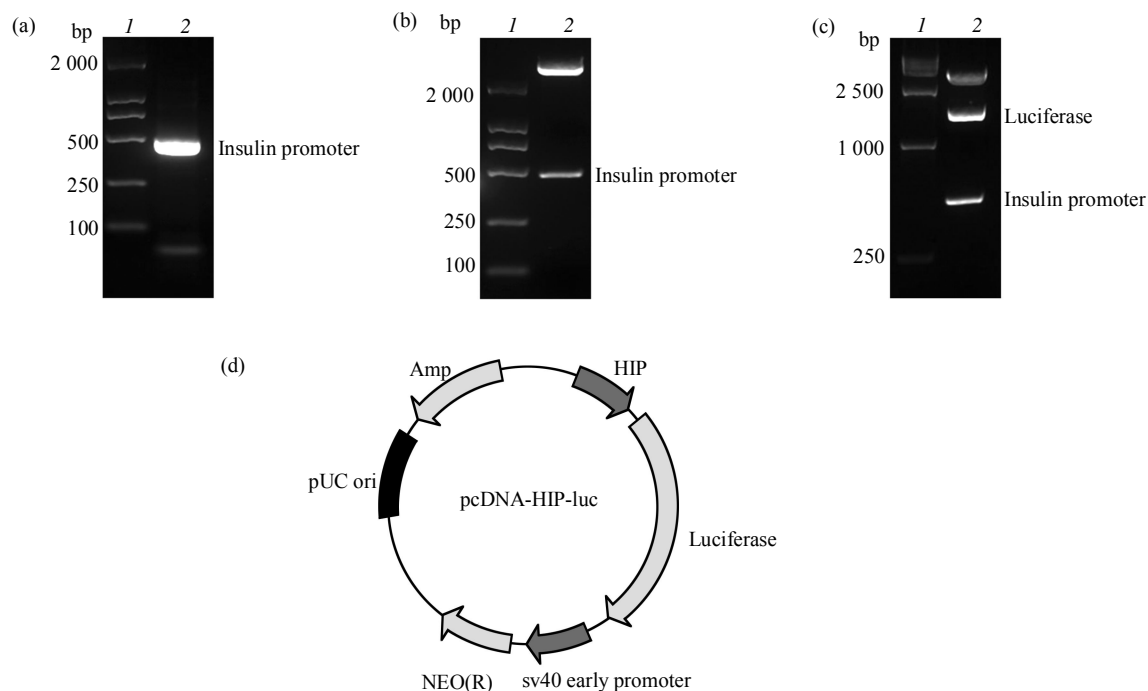


Fig. 1 Identification of pcDNA-HIP-Luc

(a) Cloning human insulin promoter (HIP) by PCR. 1: DL 2000 DNA marker; 2: PCR products of HIP fragment. (b) pcDNA-HIP plasmid digested by *Eco*RI / *Mlu*I. 1: DL 2000 DNA marker; 2: Digested fragments. (c) pcDNA-HIP-Luc plasmid digested by *Xho*I / *Xba*I / *Mlu*I. 1: DL 15000 DNA marker; 2: Digested fragments. (d) Chart of pcDNA-HIP-Luc plasmid.

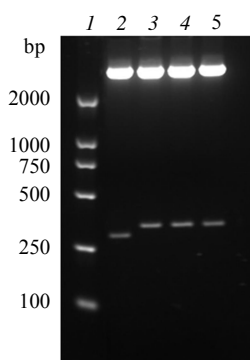


Fig. 2 Construct of si-NRSF lentiviral RNA interference vector and off-target lentiviral interference vector

Plasmid digested by *Xho* I / *Xba* I. 1: DL 2000 DNA marker; 2: Lentiviral interference vector (as negative control); 3 and 4: si-NRSF lentiviral RNA interference vector; 5: Off-target lentiviral interference vector.

2.3 慢病毒毒液的产生

将慢病毒干涉载体或慢病毒脱靶对照载体及包装质粒 pLP1, pLP2, pLP/VSVG 用 Lipofectamine

2000 共转染 293FT 细胞 48 h 后于荧光显微镜下观察: 大部分细胞强表达绿色荧光蛋白(图 3a), 并形成大量合胞体(图 3b), 病毒已开始进行包装. 转染 72 h 后收集细胞上清液并离心去除细胞碎片. 将毒液分装冻存或直接感染靶细胞.

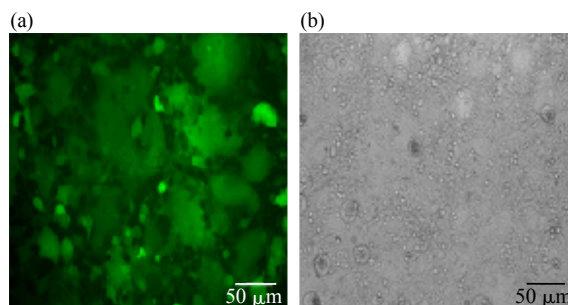


Fig. 3 Producing lentivirus in 293FT cells

(a) The EGFP expression of 293FT cells after transfection with lentiviral vectors. (b) The appearance of multinucleated syncytia of 293FT cells by the expression of the pLP/VSVG glycoprotein.

2.4 感染并获得稳定表达干涉 NRSF 片段及脱靶对照的 HeLa 细胞

由于 HeLa 细胞高表达 NRSF, 不表达受 NRSF 调控的基因, 因此我们选择 HeLa 细胞作为干涉效果验证的靶细胞. 感染前一天于六孔板中按照 2×10^5 个/孔的密度接种 HeLa 细胞, 感染时, 用添加有 8 mg/L Polybrene 的 1 ml 慢病毒毒液更换 HeLa 细胞培养基, 次日更换为生长培养基培养. 2 天后, 发现约 50% 细胞出现绿色荧光, 表明慢病毒已经整合到细胞基因组并开始表达 EGFP 和 NRSF 干涉片段. 经流式细胞术分选后, 所有的 HeLa-siNRSF 细胞和 HeLa-offtarget 细胞均表达 EGFP 蛋白(图 4b, 图 4d). 细胞呈现正常的 HeLa 细胞形态(图 4a, 图 4c).

2.5 NRSF 干涉效果的鉴定

分别提取 HeLa-siNRSF 细胞和 HeLa-offtarget 细胞总 RNA, 各取 1 μ g RNA 进行逆转录反应, 然后进行半定量 PCR 和实施荧光定量 PCR 分析. 半定量 RT-PCR 分析表明, 干涉后 NRSF 的 mRNA 表达水平明显下降(图 5a), 进一步的实时荧光定量 PCR 结果表明, 所设计的 2 条 RNA 干涉序列均能有效干涉 NRSF 的表达且未见脱靶效应, 2

号干涉序列相比具有更高的干涉效率, 干涉效率为 56% (图 5b, c).

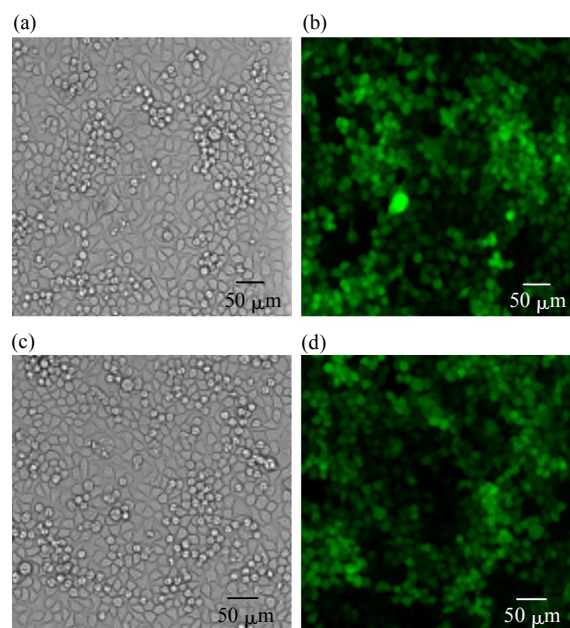


Fig. 4 The EGFP expression of HeLa cells after infected with lentivirus

(a), (b) HeLa cells infected with lentivirus containing off-target fragment. (c), (d) HeLa cells infected with lentivirus containing siNRSF fragment.

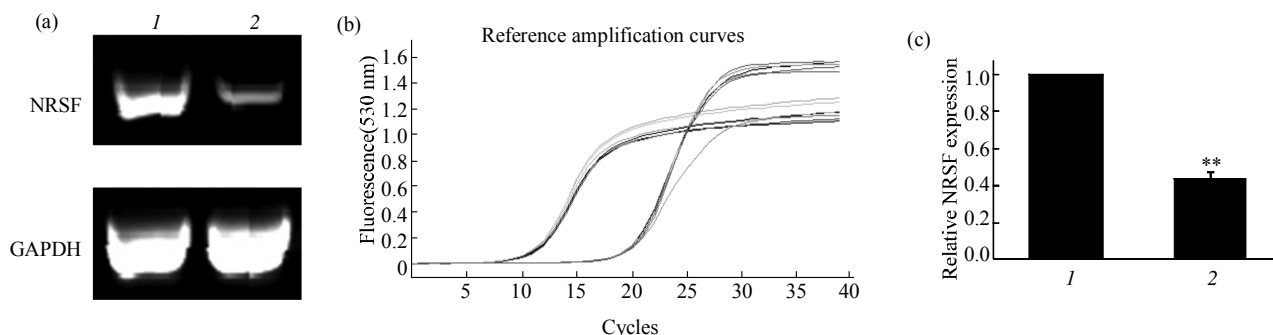


Fig. 5 Identification of RNAi efficiency by RT-PCR and real-time PCR

Identification of RNAi efficiency by RT-PCR (a) and real-time PCR (b), the interference efficiency is approximate 56% ($n = 6$, $P < 0.01$) (c) 1: HeLa-offtarget; 2: HeLa-siNRSF.

同时我们对其干涉效果在蛋白质水平上进行了进一步的分析. 蛋白质免疫印迹结果表明, 干涉后 NRSF 蛋白表达水平明显下降, 免疫荧光染色结果也表明 NRSF 蛋白在细胞核内表达明显降低(图 6). 从 RNA 水平和蛋白质水平均能说明所设计的 2 号干涉序列能够明显降低内源 NRSF 表达, 且未见脱靶效应.

2.6 干涉 NRSF 后受其调控的下游基因开始表达

为观察 NRSF 表达的变化是否引起其下游基因

表达的变化, 分别提取 HeLa-siNRSF 细胞和 HeLa-offtarget 细胞总 RNA, 各取 1 μ g RNA 进行逆转录反应得到 cDNA, 然后进行 PCR 分析. 实验中我们发现, HeLa 细胞中 NRSF 被干涉后, 受到 NRSF 调控的基因如 SCG10、BDNF、pax4 等开始表达, 表明 NRSF 下调表达后, 其负调控的靶基因开始表达(图 7a).

我们曾报道人胰岛素基因受到 NRSF 的调控, 在实验中我们发现, 干涉 NRSF 后, HeLa-siNRSF

细胞中有人胰岛素基因 mRNA 的表达, 这一研究结果进一步支持了我们前期的实验研究, 即 NRSF 蛋白对人胰岛素基因发挥转录调控作用.

同时, 我们用荧光素酶报告系统检测 NRSF 对

人胰岛素启动子转录活性的调控情况. 在 HeLa-siNRSF 细胞中, 胰岛素启动子活性比 HeLa-offtarget 细胞中提高了 2.4 倍 (图 7b).

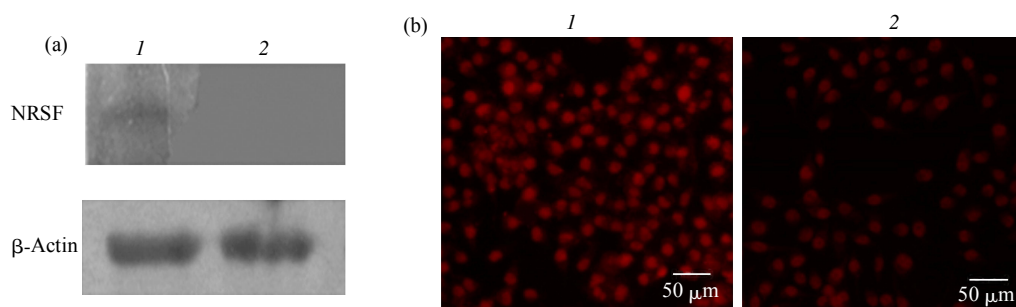


Fig. 6 Identification of RNAi efficiency by Western blotting (a) and immunofluorescence (b)
1: HeLa-offtarget; 2: HeLa-siNRSF.

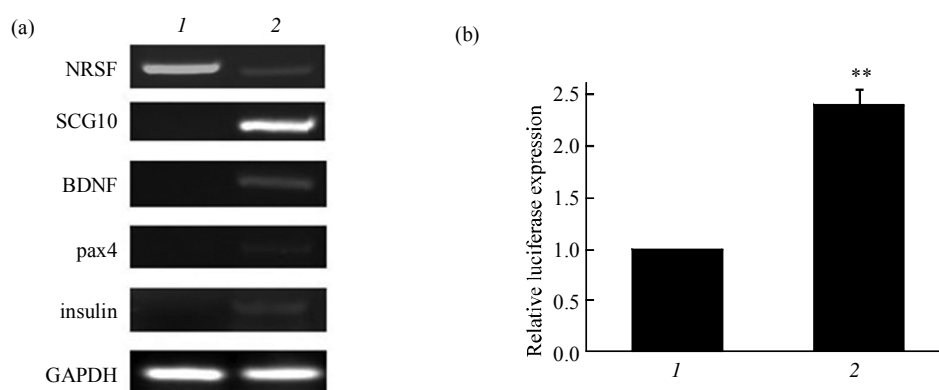


Fig. 7 Expression of genes regulated by NRSF after RNA interference

(a) The down-regulation of NRSF expression and up-regulation of the expression of genes regulated by NRSF, such as SCG10, BDNF, Pax4, insulin, after RNA interference. (b) The transcriptional activity of insulin promoter increased almost 2.4-fold after RNA interference ($n = 3$, $P < 0.01$). 1: HeLa-offtarget, 2: HeLa-siNRSF.

3 讨 论

在神经元的发育中, 神经元限制性沉默因子 (neuron-restrictive silencer factor, NRSF/RE-1 silencing transcription factor, REST) 对基因的转录起着非常重要的负调控作用. 作为神经元基因的转录抑制因子, NRSF 在非神经细胞中抑制了很多神经性基因的表达, 如 SCG10^[3], BDNF^[16]等. 在神经系统发育中, 随着神经元的分化, NRSF 表达逐渐降低, 而神经元相关基因表达升高. 研究发现, 尽管胚胎起源不同, 胰岛细胞和神经元具有大量的相似性, 酪氨酸羟化酶, 多巴胺 β 羟化酶, II 型钠离子通道, NMDA 受体, 神经丝蛋白均表达于胰岛 β 细胞

和神经元中, 其中包括一些已知在神经元细胞中受到 NRSF 调控的基因如 II 型钠离子通道, 谷氨酸受体, NMDA 受体^[17]等, 表明胰岛细胞可能拥有和神经元类似的转录调节机制, 而不表达 NRSF 或许正是它们拥有众多相似性的基础, 因此相似的 NRSF 表达模式可能也存在于胰岛细胞的分化成熟过程中, 在胰岛细胞中可能还有更多的受 NRSF 调控的基因有待发现. 我们曾报道过人胰岛素基因受到 NRSF 的调控, 本文中我们进一步发现, 通过 RNA 干扰技术降低 NRSF 表达的确能诱导胰岛细胞发育分化相关基因的表达.

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是指在进化过程中高度保守的、由双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 诱发的同源 mRNA 高效特异性降

解, 从而导致基因的转录后沉默现象. RNAi 已经成为基因沉默的重要手段, 在治疗肿瘤及病毒感染方面也展现了相当积极的前景^[8]. 慢病毒载体是一种新型病毒载体, 具有获得病毒周期短, 滴度高, 可以感染分裂、非分裂细胞, 能整合入宿主基因组从而稳定表达目的基因等特点. 慢病毒干涉载体将 RNAi 技术和慢病毒载体的特点结合到一起, 使得其能够整合进宿主基因组从而发挥稳定的 RNA 干涉效果, 拓宽了 RNA 干涉技术在基因功能研究中的重要作用. 我们所用的慢病毒干涉载体采用 RNA 聚合酶 III U6 启动子, 在人细胞内能够使下游 400 bp 内的序列有效地进行转录, 同时, 在 RNA 干涉片段序列后加上 TTTTTT 序列以中止转录^[9].

我们设计了特异针对人 NRSF 基因的干涉 RNA 片段, 通过构建慢病毒干涉载体, 利用 293FT 细胞包装慢病毒, 可获得具有感染力的能够稳定干涉人 NRSF 的慢病毒毒液. HeLa 细胞内源性高表达 NRSF、不表达 NRSF 调控靶基因, 是检测我们设计的 NRSF 干涉片段干涉效果的理想细胞, 同时是进一步验证人胰岛素基因受 NRSF 调控的理想细胞. 我们用慢病毒毒液感染 HeLa 细胞, 感染后, 不论是 mRNA 水平还是蛋白质水平, 均成功地稳定干涉了 HeLa 细胞内源 NRSF 基因的表达 (干涉效率为 56%). 稳定干涉 NRSF 细胞的获得为进一步验证 NRSF 对靶基因的调控奠定了基础.

在胰岛细胞发育过程中, 转录因子 Pax4 发挥了重要作用. 研究发现, 在 pax4 基因启动子区域存在能结合 NRSF 的 NRSE 序列, 并且证实 pax4 的表达受到了 NRSF 的调控^[10]. 早期研究发现, SCG10 受到 NRSF 的调控, 后来进一步研究发现, BDNF 等基因的表达也受到 NRSF 的调节, 干涉 NRSF 后, NRSF 的 mRNA 表达水平和蛋白质表达水平均降低, 同时我们观察到了 NRSF 靶基因如 SCG10、BDNF、pax4 等基因的表达上调. 表明所构建的 NRSF 慢病毒干涉载体能够下调 NRSF 表达并且行使了功能, 其结果表现为 NRSF 的 mRNA 和蛋白质水平下降, 受 NRSF 调控的基因开始表达.

我们曾经报道, 人胰岛素启动子中存在 NRSE 序列, 并且其表达受到 NRSF 的调控, 本文中我们进一步用 RNA 干涉技术结合人胰岛素启动子 - 荧光素酶报告系统验证了这一结果. 荧光素酶报告系统具有检测方便, 且能相对定量显示表达量的特点而被广泛用于启动子功能活性分析等方面. 前期的

工作显示, 人胰岛素启动子中含有 NRSE 样序列, 该序列通过与 NRSF 蛋白结合从而抑制人胰岛素启动子的转录活性. 为了定量检测胰岛素表达情况, 我们构建了人胰岛素启动子 - 荧光素酶报告系统以显示干涉 NRSF 后 HeLa 细胞中胰岛素启动子活性变化. 实验结果表明: 与稳定感染脱靶对照慢病毒的 HeLa 细胞相比, 稳定感染干涉 NRSF 慢病毒的 HeLa 细胞中报告载体荧光素酶活性上升了 2.4 倍, 同时, RT-PCR 结果也显示, 干涉 NRSF 后 HeLa 细胞中内源性胰岛素基因开始表达, 与荧光素酶报告系统结果相符. 这一研究结果进一步说明了 NRSF 对人胰岛素基因具有转录调控作用.

综上所述, 我们通过构建慢病毒干涉载体的方法, 稳定干涉了 HeLa 细胞内源 NRSF 表达, 干涉结果使得 HeLa 细胞中本身不表达的受 NRSF 调控的基因开始表达, 同时通过胰岛素启动子 - 荧光素酶报告系统及 RT-PCR 显示干涉 NRSF 后能启动胰岛素基因转录并使内源性胰岛素基因开始表达. 这一工作将有利于我们进一步开展 NRSF 在胰岛细胞发育成熟过程中调控作用的研究.

参 考 文 献

- 1 Chong J A, Tapia-Ramirez J, Kim S, *et al.* REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell*, 1995, **86** (6): 949~957
- 2 Maue R A, Kraner S D, Goodman R H, *et al.* Neuron-specific expression of the rat brain type II sodium channel gene is directed by upstream regulatory elements. *Neuron*, 1990, **4** (2): 223~231
- 3 Mori N, Stein R, Sigmund O, *et al.* A cell type-preferred silencer element that controls the neural-specific expression of the SCG10 gene. *Neuron*, 1990, **4** (4): 583~594
- 4 Roopra A, Sharling L, Wood I C, *et al.* Transcriptional repression by neuron-restrictive silencer factor is mediated via the Sin3-histone deacetylase complex. *Mol Cell Biol*, 2000, **20** (6): 2147~2157
- 5 You A, Tong J K, Grozinger C M, *et al.* CoREST is an integral component of the CoREST human histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (4): 1454~1458
- 6 Roopra A, Qazi R, Schoenike B, *et al.* Localized domains of G9a-mediated histone methylation are required for silencing of neuronal genes. *Mol Cell*, 2004, **14** (6): 727~738
- 7 Kuwabara T, Hsieh J, Nakashima K, *et al.* A small modulatory dsRNA specifies the fate of adult neural stem cells. *Cell*, 2004, **116** (6): 779~793
- 8 Schoenherr C J, Anderson D J. The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science*, 1995, **267**(5202): 1360~1363
- 9 Su X, Kameoka S, Lentz S, *et al.* Activation of REST/NRSF target genes in neural stem cells is sufficient to cause neuronal

- differentiation. *Mol Cell Biol*, 2004, **24**(18): 8018~8025
- 10 Atouf F, Czernichow P, Scharfmann R. Expression of neuronal traits in pancreatic beta cells. Implication of neuron-restrictive silencing factor/repressor element silencing transcription factor, a neuron-restrictive silencer. *J Biol Chem*, 1997, **272** (3): 1929~1934
- 11 Kemp D M, Lin J C, Habener J F, *et al.* Regulation of Pax4 paired homeodomain gene by neuron-restrictive silencer factor. *J Biol Chem*, 2003, **278** (37): 35057~35062
- 12 Mbikay M, Raffin-Sanson M L, Sirois F, *et al.* Characterization of a repressor element in the promoter region of proprotein convertase 2 (PC2) gene. *Mol Brain Res*, 2002, **102**(1~2): 35~47
- 13 Martin D, Tawadros T, Meylan L, *et al.* Critical role of the transcriptional repressor neuron-restrictive silencer factor in the specific control of connexin36 in insulin-producing cell lines. *J Biol Chem*, 2003, **278**(52): 53082~53089
- 14 Tawadros T, Martin D, Abderrahmani A, *et al.* IB1/JIP-1 controls JNK activation and increased during prostatic LNCaP cells neuroendocrine differentiation. *Cell Signal*, 2005, **17**(8): 929~939
- 15 刘庆斌, 李艳华, 杨印祥, 等. 神经元限制性沉默因子对人胰岛素基因转录调控作用的研究. *生物化学与生物物理进展*, 2007, **34** (9): 952~959
- Liu Q B, Li Y H, Yang Y X, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2007, **34** (9): 952~959
- 16 Tabuchi A, Nakatani C, Nakaoka R, *et al.* Silencer-mediated repression and non-mediated activation of BDNF and c-fos gene promoters in primary glial or neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **261**(2): 233~237
- 17 Qiang M, Rani C S, Ticku M K. Neuron-restrictive silencer factor regulates the N-methyl-D-aspartate receptor 2B subunit gene in basal and ethanol-induced gene expression in fetal cortical neurons. *Mol Pharmacol*, 2005, **67**(6): 2115~2125
- 18 Behlke M A. Progress towards *in vivo* use of siRNAs. *Mol Ther*, 2006, **13**(4): 644~670
- 19 Ventura A, Meissner A, Dillon C P, *et al.* Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(28): 10380~10385

Construction and Function Study of NRSF Lentiviral RNA Interference Vector*

YANG Yin-Xiang, LI Yan-Hua, LIU Qing-Bin, ZHANG Sai-Nan, CHEN Lin,
LÜ Yang, BAI Ci-Xian, NAN Xue, PEI Xue-Tao**

(Stem Cell and Regenerative Medicine Laboratory, Beijing Institute of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract The transcriptional repressor RE1 silencer transcription factor (NRSF/REST) is an important factor that restricts some neuronal traits in neurons. It has been confirmed that the insulin gene was regulated by NRSF via NRSE. Here, the relationship between NRSF and insulin gene was investigated by means of RNA interference (RNAi). The expression of NRSF was down-regulated by lentiviral RNA interference vector, and the interference efficiency is 56% ($n = 6$, $P < 0.01$). When the expression of NRSF was down-regulated, genes regulated by NRSF, such as SCG10, BDNF, pax4 and insulin, began to express in HeLa cells. The human insulin promoter activity was up-regulated 2.4-fold after RNA interference ($n = 3$, $P < 0.01$), confirmed by dual-luciferase assay.

Key words neuronal restrictive silencer factor (NRSF), neuronal restrictive silencer element (NRSE), insulin, RNA interference

*This work was supported by grants from National Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA02A107), National Basic Research Program of China (2005CB522702) and The National Natural Science Foundation of China (30470831).

**Corresponding author .

Tel: 86-10-66932240, Fax: 86-10-68164807, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

Received: June 16, 2007 Accepted: August 6, 2007