

· 论著 ·

整合稳定靶向高迁移率族蛋白 B1 基因 shRNA 载体的人脐静脉内皮细胞株建立

张晓娟 栾正刚 马晓春

【摘要】 目的 构建针对高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)基因的特异性 RNA 干扰载体,建立稳定转染该干扰载体的人脐静脉内皮细胞株(HUVEC)。方法 根据 HMGB1 基因的编码序列及短发夹 RNA(shRNA)设计原则,设计并合成针对 HMGB1 基因的特异性 shRNA,将其定向克隆到 pRNA-u6.1/Neo 载体中,同时设立阴性对照,重组载体经脂质体转染 HUVEC;转染细胞经类氨基糖抗生素物质 G418 筛选,采用实时荧光逆转录-聚合酶链反应检测 HMGB1 mRNA 表达,蛋白质免疫印迹法检测 HMGB1 蛋白表达。结果 酶切鉴定和测序证实,重组质粒 shRNA 序列与设计的片段完全一致。HMGB1 基因特异性 RNA 干扰载体能够显著抑制 HMGB1 在 HUVEC 细胞中的表达 (mRNA: 0.4635 ± 0.0342 比 1.0340 ± 0.0352 , 蛋白: 0.4510 ± 0.0200 比 1.0210 ± 0.0110 , 均 $P < 0.05$)。结论 成功构建了靶向 HMGB1 基因的 shRNA 真核表达载体 pRNA-HMGB1,并获得了稳定表达靶向 HMGB1 基因的 shRNA 的 HUVEC 细胞株,为进一步研究 HMGB1 在 HUVEC 细胞株中的生物学功能和作用机制奠定了基础。

【关键词】 高迁移率族蛋白 B1; 人脐静脉内皮细胞; 转染; 脓毒症; 短发夹 RNA

Construction of stable human umbilical vein endothelial cells line expressing short hairpin RNA (shRNA) targeting high mobility group box-1 gene ZHANG Xiao-juan, LUAN Zheng-gang, MA Xiao-chun. Department of Critical Care Medicine, the First Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China
Corresponding author: MA Xiao-chun, Email: xcma2972@sina.com

【Abstract】 Objective To construct the short hairpin RNA (shRNA) targeting high mobility group box-1 (HMGB1) and culture the stable human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) line expressing this shRNA. **Methods** Based on the HMGB1 gene sequence, shRNA was designed, synthesized and subcloned into the pRNA-u6.1/Neo vector, while negative controls were also established. Then the recombinant vector was transfected into HUVEC cell line and the cell was screened with G418 and assayed by using real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting. **Results** Restriction endonuclease digestion test and sequencing verification showed that the recombinant pRNA-u6.1/Neo vector expressing shRNA targeting HMGB1 was successfully constructed and the stable HUVEC cell line expressing this shRNA was developed. The real time RT-PCR and Western blotting was used to detect that recombinant plasmid in HUVEC cell effect on expression of HMGB1 was reduced (mRNA: 0.4635 ± 0.0342 vs. 1.0340 ± 0.0352 , protein: 0.4510 ± 0.0200 vs. 1.0210 ± 0.0110 , both $P < 0.05$). **Conclusion** The recombinant pRNA-u6.1/Neo vector expressing shRNA targeting HMGB1 was successfully constructed and the stable HUVEC cell line expressing this shRNA was developed, and therefore allowed further investigation regarding the function of HMGB1 gene in the HUVEC cell line.

【Key words】 High mobility group box-1; Human umbilical vein endothelial cell; Transfection; Sepsis; Short hairpin RNA

脓毒症及相关的感染性休克是重症监护病房(ICU)患者的主要死因,是目前临床治疗的难点,近年来病死率无明显下降^[1]。高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)是含量最丰富的高迁移率族蛋白^[2],属于非组蛋白,存在于真核细胞核中,分子量小,序列高度保守^[3],1999 年首次报道了 HMGB1 是脓毒症发病过程中新的晚期炎症介质^[4]。血管内皮细胞的

损伤和功能障碍是脓毒症的发病机制及后续器官功能损伤的中心环节^[5]。血管内皮细胞受到炎症刺激时可以释放大量 HMGB1,进一步促进细胞因子和黏附分子的表达^[6]。在全身性炎症反应时,血管内皮细胞可能是 HMGB1 分泌的一个重要源泉,抑制血管内皮细胞表达和释放 HMGB1 对于控制炎症反应有重要意义^[7]。RNA 干扰(RNAi)是双链 RNA 被特异的核酸酶降解,产生小干扰 RNA(siRNA),这些 siRNA 与同源的靶 RNA 互补结合^[8],特异性酶降解靶 RNA,从而抑制和下调目的基因表达^[9]。本研究针对 HMGB1 基因,设计合成了 HMGB1 基因的

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.09.005

基金项目:国家自然科学基金项目(30901438)

作者单位:110001 辽宁沈阳,中国医科大学附属第一医院重症医学科

通信作者:马晓春,Email:xcma2972@sina.com

特异性短发夹 RNA(shRNA)真核细胞表达载体,克隆到 pRNA-u6.1/Neo 载体中,并且转染脐静脉内皮细胞,抑制 HMGB1 的表达,从而为进一步研究 HMGB1 在脓毒症发病机制中的作用和 HMGB1 基因功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料:人脐静脉内皮细胞株(HUVEC)购于南京凯基生物公司;pRNA-u6.1/Neo 载体购自美国 Invitrogen 公司。高糖 DMEM、胎牛血清(FBS)购于美国 Hyclone 公司;BamH I / Hind III 限制性内切酶、T4 连接酶、LB 培养基、氨苄(AMP)、琼脂糖(日本 Takara 公司);DH5 α 感受态(本室保存);质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒(美国 Axygen 公司);引物合成、DNA 测序由上海生物工程有限公司完成。

1.2 siRNA 的设计、合成:根据 GenBank 中 HMGB1 基因核苷酸序列(NM_002128.4),参考 siRNA 设计原则进行设计,得出 HMGB1 基因的有效靶点,引物序列:正义链 5'-GTAACCAAAGCGCGGCTAA-3',反义链 5'-TTAGCCGCGCTTTGGTTAC-3'。

1.3 pRNA-u6.1/Neo HMGB1 shRNA 载体构建:正义链 5'-CGCGTCGTAACAAAGCGCGGCTATCCAA GGATTAGCGCGCTTTGTTACCTTTTTTCCAC-3',反义链 5'-TCGAGTTGGAAAAAGTAACCAAAGCGCGCAATCTCTGAATTAGCCGCGCTTTGTTACGA-3',序列两端各包含 BamH I 和 Hind III 酶切位点,取寡核苷酸链制备退火双链 DNA,接入经 BamH I 和 Hind III 双酶切的 pRNA-u6.1/Neo 载体,转化 DH5 α 感受态细胞,涂布于含卡纳霉素的 LB 培养板,挑取单菌落测序验证。

1.4 细胞转染及单克隆细胞株的筛选:转染前 24 h 收获处于对数生长期的 HUVEC,以 5×10^4 个 / 孔接种于 6 孔培养板中,次日按转染试剂说明书进行转染,以转染 pRNA-u6.1/无效序列的 HUVEC 为阴性对照,以转染 pRNA-u6.1/Neo HMGB1 shRNA 的 HUVEC 为实验组。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO $_2$ 环境中培养 24 h,细胞长至 80%~90%融合时,1:10 传代,加类氨基糖抗生素样物质 G418(300 $\mu\text{g}/\text{ml}$)筛选,每 3 d 更换 1 次 G418。非转染细胞死亡,而转染细胞出现明显细胞克隆生长时,将单克隆细胞传至 6 孔板中,扩大培养,继续用 G418(150 $\mu\text{g}/\text{ml}$)维持培养。

1.5 实时荧光逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 HMGB1 mRNA 表达:稳定表达细胞株经传代培养后收集细胞,按 TRIzol 说明书提取细胞总 RNA,经逆转录得 cDNA。用 HMGB1 特异引物进行扩增检

测,正义链 5'-GATATGGCAAAAGCGGACAAG-3',反义链 5'-TGGGCGATACTCAGAGCAGAA-3',扩增产物大小为 150 bp;内参照三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物序列:正义链 5'-GAAGGTGAAGTCCGGAGTC-3',反义链 5'-GAAGATGCTGATGGGATTTC-3',扩增产物大小为 226 bp。采用 SYBR Green I 荧光染料嵌合法,以正常 HUVEC 的 RNA 为标准品,分别对目的基因(HMGB1 基因)和管家基因(GAPDH)制作标准曲线,并对目的基因和管家基因分别进行定量。通过 GAPDH 的校正,检测各组样品中 HMGB1 目的基因的相对表达量。

1.6 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测 HMGB1 蛋白表达:提取稳定表达细胞株的总蛋白,经考马斯亮蓝定量后,将样品调成相同浓度,加入 $5 \times$ 十二烷基硫酸钠(SDS)凝胶加样缓冲液,沸水煮 5 min,取 20 μg 蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,5%脱脂奶粉封闭,一抗(兔抗人 HMGB1 抗体 1:1000 稀释)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,抗 GAPDH 1:10 000 稀释,用含 0.1%吐温 20 的磷酸盐缓冲液(PBST)洗膜,次日与辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10 000 稀释)在室温下孵育 1 h,PBST 洗膜,将膜与免疫荧光化学发光法(ECL)发光底物结合,曝光,显影。用 V2.03 分析软件测定积分吸光度(A)值。

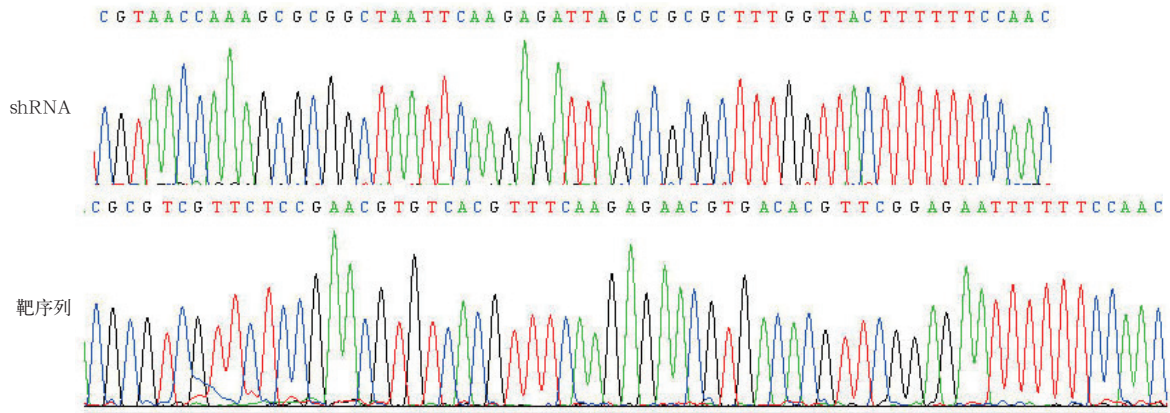
1.7 统计学处理:采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 测序鉴定(图 1):由上海生物工程有限公司进行测序鉴定,重组质粒 shRNA 序列与设计的片段完全一致,证明载体构建成功。

2.2 HMGB1 mRNA 表达(表 1):共挑取 3 株转染 HMGB1 shRNA 的细胞克隆,分别标记为 H1~H3,挑取 1 株转染阴性对照的细胞克隆,分别扩大以上细胞株,提取细胞总 RNA,逆转录为 cDNA 后,RT-PCR 检测 HMGB1 mRNA 表达,结果显示,与阴性对照及正常细胞相比, HMGB1 shRNA 转染组细胞中,H3 细胞株 HMGB1 mRNA 表达水平明显降低($P < 0.05$),对照序列无干扰效果。

2.3 HMGB1 蛋白表达(表 1;图 2):分别培养转染 HMGB1 shRNA 的细胞克隆 H1~H3 及阴性对照细胞株的蛋白质,取等量进行 Western blotting 检测,结果显示,H3 细胞株中内源性 HMGB1 蛋白表达量相对于阴性对照及正常细胞明显降低($P < 0.05$)。



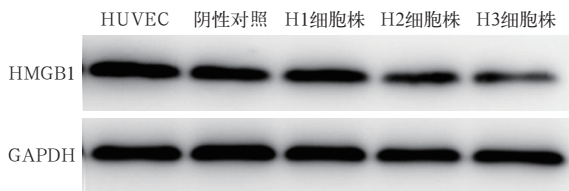
注:HMGB1:高迁移率族蛋白 B1,shRNA:短发夹 RNA

图 1 鉴定重组质粒 HMGB1 shRNA 序列与设计片段的一致性

表 1 稳定转染单克隆 HUVEC 中 HMGB1 mRNA 和蛋白的相对表达量

组别	样本数	HMGB1 (2 ^{-ΔΔCt})	
		mRNA	蛋白
HUVEC	3	1.0340 ± 0.0352	1.0210 ± 0.0110
阴性对照	3	1.0250 ± 0.4498	1.0527 ± 0.5620
H1 细胞株	3	0.6198 ± 0.0391	0.6023 ± 0.0321
H2 细胞株	3	0.6274 ± 0.0621	0.6150 ± 0.0413
H3 细胞株	3	0.4635 ± 0.0342 ^a	0.4510 ± 0.0200 ^a

注:HUVEC:人脐静脉内皮细胞, HMGB1:高迁移率族蛋白 B1, H1~H3:挑取的 3 株转染 HMGB1 短发夹 RNA 的细胞克隆;与 HUVEC 和阴性对照细胞株比较, ^aP<0.05



HUVEC:人脐静脉内皮细胞, HMGB1:高迁移率族蛋白 B1, GAPDH:三磷酸甘油酯脱氢酶, H1~H3:挑取的 3 株转染 HMGB1 短发夹 RNA 的细胞克隆

图 2 蛋白质免疫印迹法检测稳定转染的单克隆 HUVEC 中内源性 HMGB1 的蛋白表达

3 讨论

在人的组织细胞中, HMGB1 是广泛分布并且普遍存在的一种核蛋白^[10]。HMGB1 生物学功能丰富, 细胞中的不同定位有其不同的功能。细胞核内的 HMGB1 参与维持核小体的结构和基因表达的调控; 细胞外的 HMGB1 作为一种重要的晚期炎症介质, 是脓毒症发病机制的中心环节^[11], 促进了细胞因子、炎症介质、黏附分子的表达和释放^[12]。HMGB1 参与炎症反应的细胞信号过程是近年研究的热点。晚期糖基化终末产物受体(RAGE)与 HMGB1 具有高亲和力, 是 HMGB1 的主要受体^[13]。脓毒症时可以

检测到 RAGE 在内皮细胞中的表达明显增加, 提示 HMGB1 可能对血管内皮细胞有激活作用, 并且促成炎症反应的进一步“爆发”。前期有研究证实: 当机体受到炎症刺激时, 内皮细胞被激活, 可以释放 HMGB1, 从而促进炎症介质和黏附分子的表达增加, 进一步加重组织器官的损伤^[14-15]。因此我们推测, 血管内皮细胞可能是脓毒症时促进 HMGB1 分泌的重要源泉^[16]。抑制血管内皮细胞表达 HMGB1 可能为脓毒症的治疗提供新的思路。本研究中筛选出了针对人 HMGB1 基因的 shRNA 有效靶序列, 并成功筛选出稳定低表达 HMGB1 基因的 shRNA 的 HUVEC 细胞株。观察到, 在稳定建株的 HUVEC 细胞中 HMGB1 持久低水平表达, 为进一步探索 HMGB1 在脓毒症血管内皮细胞损伤或激活中的作用提供了有效工具细胞。

参考文献

- [1] Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med, 2001, 29: 1303-1310.
- [2] Bustin M. Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. Trends Biochem Sci, 2001, 26: 152-153.
- [3] Bianchi ME, Beltrame M. Upwardly mobile proteins. Workshop: the role of HMG proteins in chromatin structure, gene expression and neoplasia. EMBO Rep, 2000, 1: 109-114.
- [4] Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. Science, 1999, 285: 248-251.
- [5] Ait-Oufella H, Maury E, Lehoux S, et al. The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. Intensive Care Med, 2010, 36: 1286-1298.
- [6] Fiuza C, Bustin M, Talwar S, et al. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. Blood, 2003, 101: 2652-2660.
- [7] 党伟, 张宪, 姚咏明, 等. 早期胰岛素强化治疗对严重创伤后高迁移率族蛋白 B1 水平及患者预后的影响. 中国危重病急救医

- 学, 2011, 23: 173-175.
- [8] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391: 806-811.
- [9] Hannon GJ. RNA interference. *Nature*, 2002, 418: 244-251.
- [10] Li J, Kukkola R, Tabibzadeh S, et al. Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1. *Mol Med*, 2003, 9: 37-45.
- [11] Yang H, Wang H, Czura CJ, et al. The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol*, 2005, 78: 1-8.
- [12] 谭向龙, 王世斌, 姚咏明, 等. 高迁移率族蛋白 B1 在大鼠肝脏热缺血 / 再灌注损伤中的作用. *中国中西医结合急救杂志*, 2009, 16: 168-170.
- [13] Kukkola R, Andersson A, Mullins G, et al. RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages. *Scand J Immunol*, 2005, 61: 1-9.
- [14] Chen G, Ward MF, Sama AE, et al. Extracellular HMGB1 as a proinflammatory cytokine. *J Interferon Cytokine Res*, 2004, 24: 329-333.
- [15] Park JS, Svetkauskaite D, He Q, et al. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem*, 2004, 279: 7370-7377.
- [16] Mullins GE, Sunden-Cullberg J, Johansson AS, et al. Activation of human umbilical vein endothelial cells leads to relocation and release of high-mobility group box chromosomal protein 1. *Scand J Immunol*, 2004, 60: 566-573.

(收稿日期: 2012-03-20)

(本文编辑: 李银平)

• 病例报告 •

抢救大剂量氯化钡和氯化汞急性中毒 1 例

武燕萍 李海峰 赵士兴 刘晓亮 孙明莉

【关键词】 中毒; 氯化汞; 氯化钡; 治疗

介绍 1 例急性氯化汞(HgCl₂)和氯化钡(BaCl₂)中毒患者的救治体会如下。

1 临床资料

患者男性, 23 岁, 服 HgCl₂ 和 BaCl₂ 各约 5 g 后出现恶心、呕吐, 伴乏力、面部及四肢麻木、口咽部烧灼感, 30 min 后到吉林省人民医院洗胃, 为进一步诊治 2 h 后来本院。既往体健, 入院查体: 血压 135/85 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa), 呼吸频率 18 次 /min, 双肺呼吸音粗, 可闻及散在湿啰音, 心率 95 次 /min, 律整, 腹软, 无压痛, 四肢肌力 0 级, 病理反射未引出。血常规: 白细胞 24.36 × 10⁹/L, 中性粒细胞比例 0.884, 血 K⁺ 1.4 mmol/L, 肝、肾功能未见异常。心电图示 V₂ ~ V₄ 导联明显 U 波。临床诊断: 急性 BaCl₂、HgCl₂ 中毒, 电解质紊乱 (低钾血症)。给予监护及血气分析监测, 二巯基丙磺酸钠 (DMPS) 驱汞、硫代硫酸钠解毒, 血液灌流 (HP) 清除毒物, 导泻, 纠正电解质紊乱, 血必净注射液、乌司他丁清除毒素、抗炎症介质和保护器官功能, 以及对症

支持等治疗。患者在中毒后约 8 h 内共补钾 6.5 g, 血 K⁺ 1.7 mmol/L, 出现呼吸骤停, 血压 90/60 mm Hg, 心率 122 次 /min。立即行气管插管、呼吸机辅助呼吸。中毒后约 9 h 出现多发室性期前收缩、室性心动过速, 予利多卡因治疗 45 min 后心律恢复正常。入院第 2 日血钾恢复, 给予脱机。共住院 8 d, 复查血常规、血 K⁺、血生化未见异常, 病情好转出院。现随访健康。

2 讨论

HgCl₂ 和 BaCl₂ 均属剧毒类无机物, 中毒致死量均为 1 g。本例患者服 HgCl₂ 和 BaCl₂ 各约 5 g, 远远超过致死量。

Hg²⁺ 与蛋白质巯基结合后, 使巯基酶失活; 攻击膜结构蛋白, 损伤其功能和结构, 从而阻碍细胞生物活性和正常代谢。Hg²⁺ 可致细胞内钙超载, 激活细胞内磷脂酶 A₂, 分解细胞内磷脂, 生成花生四烯酸与氧自由基等, 对细胞功能造成损伤^[1]。本例患者及早给予了 HP 治疗, 吸附血液中大中分子毒素, 改善了机体的氧化应激状态, 起到了器官保护作用^[2]。DMPS 具有抗氧自由基的功能, 巯基化合物通过形成硫中心自由基并清除之, 使机体的抗氧化还原反应机制得以恢复正常^[3]。

钡中毒可引起钾通道阻滞, 引起严重低钾血症^[4]。HgCl₂ 和 BaCl₂ 同时中毒时, 需积极补钾治疗, 同时还需密切监测尿量、心电、肾功能等, 超剂量、超常规补钾才能挽救生命^[5-7], 还可通过血液净化进行补钾。

参考文献

- [1] 陈灏珠, 林果为. 实用内科学. 13 版. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 827-829.
- [2] 蒋文勇. 血液灌流对尿毒症患者氧化应激状态的影响. *中国危重病急救医学*, 2009, 21: 629.
- [3] 韩国强, 邱俏檬, 卢中秋, 等. 二巯丙磺酸钠对百草枯急性中毒大鼠肺组织基质金属蛋白酶 -9 mRNA 及其金属蛋白酶组织抑制剂 -1 mRNA 表达的影响. *中国药理学与毒理学杂志*, 2010, 24: 25-29.
- [4] 金惠铭, 王建枝. 病理生理学. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 33-34.
- [5] 张自立, 王德荫. 常规与微量泵补钾方法纠正严重低钾并发生心律失常的比较. *中国急救医学*, 2008, 28: 445-446.
- [6] 张畔, 高红梅. 深静脉补钾救治严重低钾血症 9 例临床分析. *中国中西医结合急救杂志*, 2002, 9: 91.
- [7] 郑秀萍, 潘新丽. 静脉快速补钾治疗重度低钾血症 1 例. *中国危重病急救医学*, 2001, 13: 702.

(收稿日期: 2012-06-04)

(本文编辑: 李银平)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.09.006

作者单位: 130000 长春, 吉林大学第一医院二部急救医学科

通信作者: 孙明莉, Email: sunmingli_1972@163.com

钡可改变细胞膜通透性, 使钾大量