

TGF- β_2 特异性 siRNA 载体干扰人结膜囊成纤维细胞表达的研究

乔芳,张芳婷,傅培,李明华

基金项目:深圳市科技计划资助项目(No. 2009036)
作者单位:(518036)中国广东省深圳市,北京大学深圳医院眼科
作者简介:乔芳,女,副主任医师,研究方向:小儿眼科。
通讯作者:张芳婷,主任医师,研究方向:肿瘤发生机制。
fangtingzhang@126.com
收稿日期:2011-09-15 修回日期:2011-11-28

Study on interference effect of siRNA for transforming growth factor β_2 on human Tenon's capsule fibroblasts

Fang Qiao, Fang-Ting Zhang, Pei Fu, Ming-Hua Li

Foundation item: Shenzhen Municipal Science and Technology Program, China (No. 2009036)
Department of Ophthalmology, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, Guangdong Province, China
Correspondence to: Fang-Ting Zhang, Department of Ophthalmology, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, Guangdong Province, China. fangtingzhang@126.com
Received: 2011-09-15 Accepted: 2011-11-28

Abstract

• **AIM:** To investigate the effects of siRNA for transforming growth factor β_2 (TGF- β_2) on the expression of TGF- β_2 mRNA in human Tenon's capsule fibroblasts.
• **METHODS:** Human Tenon's fibroblasts were transferred by TGF- β_2 siRNAs vector after separated, cultured and passaged three *in vitro*. RT-PCR was performed to evaluate the levels of TGF- β_2 mRNA at 24, 48 and 72 hours after transferred in transferred cells, and untransferred cells were as the controls.
• **RESULTS:** Separated human Tenon's fibroblasts attached in 4 hours and confluent monolayer cells formed in 36 hours. The adherent cells displayed fibroblast-like or spindle shape by microscope observation. The expression of TGF- β_2 mRNA of transferred group was reduced significantly in comparison with the control group, expression inhibition rates were 17.40%, 52.80% and 79.20% respectively in 24, 48 and 72 hours after transferred, and this interference function was strengthened with the time extending.
• **CONCLUSION:** The vector of siRNA specific for TGF- β_2 is of potent interference ability for TGF- β_2 mRNA expression in human Tenon's capsule fibroblasts.
• **KEYWORDS:** Tenon's capsule fibroblasts; transforming growth factor- β_2 ; siRNA

Qiao F, Zhang FT, Fu P, *et al.* Study on interference effect of siRNA for transforming growth factor β_2 on human Tenon's capsule fibroblasts. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(1):30-32

摘要

目的:探讨人转化生长因子 TGF- β_2 特异性 siRNA 真核表达载体转染人结膜囊成纤维细胞后对其 TGF- β_2 mRNA 表达的影响。
方法:体外分离并培养人结膜囊成纤维细胞,在培养后传代3次的细胞以 TGF- β_2 特异性 siRNA 真核表达载体进行转染,并以未转染细胞作为对照。转染后分别于24,48和72h收集细胞,采用 RT-PCR 技术检测 TGF- β_2 特异性 siRNA 真核表达载体对 TGF- β_2 mRNA 表达的影响。
结果:分离的人结膜囊成纤维细胞于接种约4h左右开始贴壁,同时细胞变长成为梭形,表现出明显的成纤维细胞特性,约36h后达到融合状态;RT-PCR 结果显示:与对照组相比,转染24,48和72h后的细胞 TGF- β_2 表达抑制率分别为17.40%,52.80%和79.20%,抑制效率呈现随时间延长有所加强的趋势。
结论:TGF- β_2 特异性 siRNA 真核表达载体能抑制人结膜囊成纤维细胞 TGF- β_2 mRNA 的表达。
关键词:结膜囊成纤维细胞; TGF- β_2 ; siRNA
DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.01.09

乔芳,张芳婷,傅培,等. TGF- β_2 特异性 siRNA 载体干扰人结膜囊成纤维细胞表达的研究. 国际眼科杂志 2012;12(1):30-32

0 引言

滤过泡的瘢痕化是青光眼滤过手术失败的主要原因,而瘢痕化是由成纤维细胞的异常增殖造成的,研究表明转化生长因子- β_2 (transforming growth factor-beta 2, TGF- β_2) 在这一过程中起关键作用^[1]。目前,临床上通常采用药物处理的方法来抑制成纤维细胞的增殖^[2,3],但是所使用的药物,如5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)、丝裂霉素C(mitomycin C, MMC)、环孢霉素A(cyclosporin A, CsA)均是非特异性药物,可能带来严重的副作用。因此寻找一种特异性阻断瘢痕化形成的方法是当前的一个研究热点。RNAi是近年来发展起来的一套研究手段,由于其可以特异性地抑制某个基因的表达,已被广泛应用于探索基因功能和传染性疾病及恶性肿瘤的基因治疗中^[4]。本实验利用已经构建用于干扰人 TGF- β_2 表达的 siRNA 质粒转染人结膜囊成纤维细胞并观察其干扰效果,为研究抑制青光眼术后滤过泡的瘢痕化和利用基因治疗提高青光眼滤过手术成功率奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 胰蛋白酶、胎牛血清、DMEM 培养基、Opti-MEM 培养基、100 × 青链霉素 (Gibco); LipofectamineTM 2000 (Invitrogen); 引物 (南京金斯瑞); 逆转录试剂盒、PCR 试剂盒 (Fermentas); 细胞培养板、细胞培养瓶 (Corning); CO₂ 恒温培养箱 (Thermo); 超净工作台 (苏净); 台式冷冻离心机 (Eppendorf); 倒置相差显微镜及照相系统 (Leica); PCR 仪、水平电泳系统、凝胶成像系统 (Bio-Rad)。

1.2 方法

1.2.1 人结膜囊成纤维细胞的分离及培养 将新鲜手术标本置于无菌培养皿中,以含有青链霉素的无菌 D-Hank's 冲洗 3 遍;加入 1mL DMEM 培养基,仔细分离并剪下结膜囊组织,用眼科剪将标本剪成 1 ~ 2mm³ 小块;加入 2.5g/L 胰蛋白酶 5mL,50mL/L CO₂,37℃ 孵箱消化 20min;用枪头轻柔吹打后,用 200 目滤网去除组织块,10mL D-Hank's 冲洗滤网;1000r/min 离心 5min,弃上清;以含有青链霉素和 100mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基重悬细胞,调整细胞密度至 1 × 10⁶ 个/mL 接种于细胞培养皿中,50mL/L CO₂,37℃ 孵箱中培养。每日观察细胞生长状态,每 2d 换 1 次液,当细胞融合度达到 80% 时传代。

1.2.2 人结膜囊成纤维细胞的转染 将处于对数生长期的人结膜囊成纤维细胞按 1 × 10⁵ 个/mL 的密度接种至 6 孔板,培养过夜;待融合度达到 90% 时吸去培养基,加入 1.5mL/孔的无血清的 Opti-MEM;按每孔 4μg siRNA 载体和 10μL LipofectamineTM 2000 转染细胞,将二者分别稀释到 250μL Opti-MEM 中,室温孵育 5min 后混合稀释液,室温孵育 20min;将混合物滴加到培养孔内,混匀后 50mL/L CO₂,37℃ 孵箱中培养;4h 后更换为含有 100mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养。

1.2.3 RT-PCR 检测人结膜囊成纤维细胞 TGF-β₂ RNAi 效果检测 分别于转染后 24,48 和 72h 收集细胞,未转染细胞为对照,以 Trizol 法提取总 RNA。按逆转录试剂盒说明将 2μg 总 RNA 反转录为 cDNA;以 cDNA 为模板,以 TGF-β₂ 上游引物 5'-CCATCCCGCCCACTTTCTAC-3',下游引物 5'-ATCCGTTGTTTCAGGC ACTCT-3' 进行 PCR 反应,产物 148bp; GAPDH 上游引物 5'-CTGAGAACGGGAAGCTTGT-3',下游引物 5'-CATGGTTCACACCCATGAC-3' 为内参,扩增产物 228bp;反应条件:94℃ 变性 30s,60℃ 退火 30s,72℃ 延伸 30s,30 个循环;PCR 产物经 10g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定并利用灰度分析软件对表达情况进行分析。

统计学分析:采用 SPSS 13.0 统计软件包,转染实验重复 3 次行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人结膜囊成纤维细胞的体外培养 分离的人结膜囊成纤维细胞于接种约 4h 左右开始贴壁,同时细胞变长成为梭形、表现出明显的成纤维细胞特性,约 36h 后达到融合状态;细胞生长状态良好,并表现出明显的成纤维细胞特性 (图 1),表明人结膜囊成纤维细胞得到了正确的分离并培养成功。

2.2 TGF-β₂ RNAi 的结果 与对照组相比,转染 24,48,72h 后的细胞 TGF-β₂ mRNA 表达抑制率分别为 17.40%,52.80% 和 79.20% ($P < 0.01$),且抑制效率呈现随时间延长有所加强的趋势 (图 2,3)。

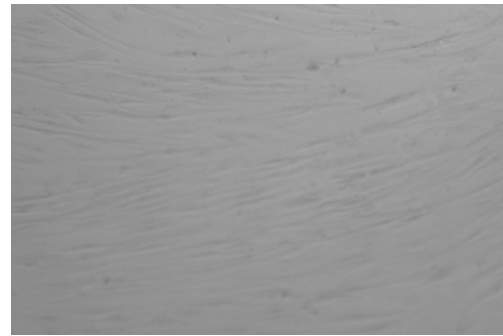


图 1 人结膜囊成纤维细胞形态。

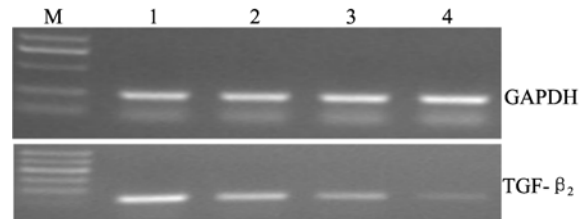


图 2 RT-PCR 鉴定 M: Marker; 1: 未转染; 2: 转染 24h; 3: 转染 48h; 4: 转染 72h。

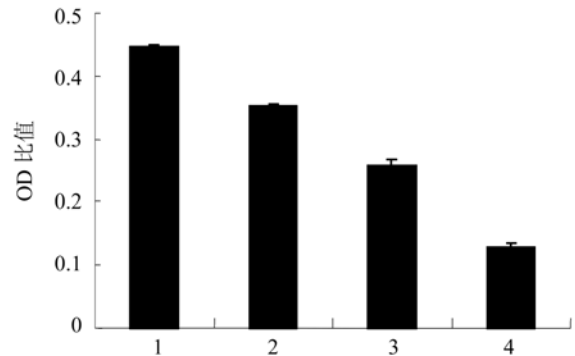


图 3 TGF-β₂ RNAi 的效果 1: 未转染; 2: 转染 24h; 3: 转染 48h; 4: 转染 72h。

3 讨论

青光眼是视功能减退和致盲的重要原因之一,其造成的视功能损害是不可逆的,后果极为严重。虽然近年来抗青光眼的显微手术和药物治疗取得了很大进展,但青光眼滤过手术的失败率仍达 15% ~ 30%,其主要原因是滤过泡失去滤过功能。失败的滤过性手术其手术区滤过口处巩膜表层、Tenon 囊和球结膜之间细胞增生,胶原合成增加,瘢痕形成而使伤口愈合,从而失去房水引流功能^[5]。近年来研究显示,TGF-β₂ 是伤口细胞外基质积聚、收缩和异常修复关键性调控因素,TGF-β₂ 在青光眼滤过泡瘢痕化中具有重要作用^[6,7]。

TGF-β 是一组具有多种生物学功能的蛋白家族,广泛参与细胞分裂、增殖、分化和迁移过程^[8-10]。目前在哺乳动物中已经证实的 TGF-β 有 3 种亚型,β₁,β₂ 和 β₃^[11]。在损伤的组织中,作为组织纤维化的主要调控者 TGF-β₂ 大量存在于上皮细胞中^[12]。大量的研究表明,TGF-β₂ 不仅对人 Tenon 囊成纤维细胞的增生和移行以及成纤维细胞介导的胶原收缩具有促进作用^[13];而且还可使结膜炎性细胞获得高峰前移及胶原沉淀,促进瘢痕的形成^[1];Esson 等^[14]进一步研究发现,滤过术后 TGF-β₂ 高表达,并且外源的 TGF-β₂ 可以促进瘢痕的形成。

有学者应用重组 TGF- β_2 单克隆抗体可以显著延长术后结膜滤过泡的存活期,其在 I/II 期的临床实验中也显示了较为满意的抗瘢痕化效果。所以认为抑制 TGF- β_2 活性将是有效抗瘢痕形成的途径之一^[15,16]。因此,如何阻断 TGF- β_2 表达以达到有效抑制滤过泡瘢痕的形成,提高手术的成功率^[14] 是目前研究的热点。RNAi 是近年来发展起来的一套研究手段,已被广泛应用于探索基因功能和传染性疾 病及恶性肿瘤的基因治疗中。这一技术可以非常特异地降解与之序列相应的单个内源基因的 mRNA,并且相对少量的 dsRNA 就可以使相应的基因表达受抑制。因此我们拟利用针对 TGF- β_2 的 siRNA 来阻断 TGF- β_2 表达,以期达到有效抑制滤过泡瘢痕的形成、提高手术成功率的目的。相对于抗体和反义寡核苷酸,siRNA 真核表达载体有其明显的优越性。重组 TGF- β_2 单克隆抗体术后需要反复注射,增加患者痛苦,并且获得耗时长,花费大。反义寡核苷酸持续性差,其半数最大抑制浓度是相应 siRNA 的 100~1000 倍,这会产生较大的毒性作用^[17]。本实验在体外分离并培养人结膜囊成纤维细胞,在培养传代 3 次后以 TGF- β_2 特异性 siRNA 真核表达载体进行转染,并以未转染细胞作为对照。转染后分别于 24,48 和 72h 收集细胞,采用 RT-PCR 技术检测 TGF- β_2 特异性 siRNA 真核表达载体对 TGF- β_2 mRNA 表达的影响。与对照组相比,转染 24,48 和 72h 后的细胞 TGF- β_2 表达抑制率分别为 17.40%,52.80% 和 79.20%,抑制效率呈现随时间延长有所加强的趋势。

TGF- β_2 特异性 siRNA 真核表达载体成功转染并抑制人结膜囊成纤维细胞 TGF- β_2 mRNA 的表达,为下一步利用 RNAi 技术来阻断 TGF- β_2 表达奠定了方法学基础,同时为利用基因治疗的方法提高青光眼手术成功率奠定了实验基础。

参考文献

1 Cordeiro MF, Reichel MB, Gay JA, *et al.* TGF- β_1 , - β_2 , and - β_3 *in vivo*: Effect on normal and mitomycin C-modulated conjunctival scarring. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(9):1975-1982
2 张欣,梁春玲,徐彦,等.非穿透性小梁手术中应用丝裂霉素 C32 例.国际眼科杂志 2005;5(1):107-111

3 张德秀,史传衣,刘思伟.小梁切除联合丝裂霉素术后晚期滤泡相关并发症的临床分析.国际眼科杂志 2005;5(6):1186-1189
4 Ameyar-Zazoua M, Guasconi V, Ait-Si-Ali S. siRNA as a route to new cancer therapies. *Expert Opin Biol Ther* 2005;5(2):221-224
5 马建民,赵家良.转化因子 β 及其在青光眼术后滤过泡瘢痕化中作用的研究进展.国外医学眼科学分册 2004;28(5):320-323
6 扬力,郭树忠.成纤维细胞与创伤修复的生物学过程.中国临床康复 2002;6(4):470
7 Khaw PT, Occlleston NL, Schuitz CS, *et al.* Activation and suppression of fibroblast activity. *Eye* 1994;8(pt2):188
8 Cordeiro MF, Mead AL, Wong TTL, *et al.* Evaluation of Anti-TGF- β_2 antibody as a new postoperative Anti-scarring agent in glaucoma surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(8):3394-3401
9 Laura B. RNAi: silencing never sounded better. *Nat Methods* 2004;1:79-86
10 Buzz B, Cavin C. RNAi in a postmodern, postgenomic era. *Oncogene* 2004;23(1):8336-8339
11 Cheifetz S, Hernandez H, Laiho M, *et al.* Distinct transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms. *J Biol Chem* 1990;265(33):20533-20538
12 Huh MI, Chang Y, Jung JC. Temporal and spatial distribution of TGF-beta isoforms and signaling intermediates in corneal regenerative wound repair. *Histol Histopathol* 2009;24(11):1405-1416
13 Cordeiro MF, Bhattacharya SS, Schultz GS, *et al.* TGF-beta1, -beta2, and -beta3 *in vitro*: biphasic effects on Tenon's fibroblast contraction, proliferation, and migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(3):756-763
14 Esson DW, Neelakantan A, Iyer SA, *et al.* Expression of connective tissue growth factor after glaucoma filtration surgery in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(2):485-491
15 Cordeiro MF, Gay JA, Khaw PT. Human anti-TGF β_2 monoclonal antibody: a new anti-scarring agent for glaucoma filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(10):2225-2234
16 Mead AL, Wong TTL, Cordeiro MF. Evaluation of anti-TGF β_2 antibody as a new postoperative anti-scarring agent in glaucoma surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(8):3394-3401
17 Far RKK, Sczakiel G. The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 2003;31(15):4417-4424