

张泽英, 张 辉, 赵 昕, 等. shRNA 沉默 C5aR 对 LPS 诱导的大鼠肾小管上皮细胞损伤的影响[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(6): 1327-1332.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.06.019

shRNA 沉默 C5aR 对 LPS 诱导的大鼠肾小管上皮细胞损伤的影响

张泽英^{1,2}, 张 辉¹, 赵 昕¹, 黄爱妮¹, 蒋思婧²

(1. 武昌工学院食品与环境工程学院, 湖北 武汉 430065; 2. 湖北大学生命科学学院, 湖北 武汉 430062)

摘要: 为观察短发夹状 RNA (Short hairpin RNA, shRNA) 阻断大鼠 C5a 受体 (C5a receptor, C5aR) 基因表达对抑制脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 诱导的大鼠肾小管上皮细胞 (NRK-52E 细胞) 损伤的影响, 将构建好的针对大鼠 C5aR 基因的 shRNA 表达质粒转染 NRK-52E 细胞系, 经 G418 筛选后, 形成稳定的表达 C5aR shRNA 的细胞系。设置空白对照组 (NC 组)、正常对照组 (LPS 组)、阴性对照组 (LPS+shRNAc 组) 和处理组 (LPS+C5aR-shRNA 组)。采用荧光定量反转录 PCR (RT-PCR) 检测细胞中白介素-6 (Interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) mRNA 的表达, 酶联免疫吸附方法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测细胞上清液中 TNF- α 、IL-6 和髓过氧化物酶 (MPO) 活性, 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。结果显示, 与正常对照组和阴性对照组相比, 试验组中 C5aR shRNA 能有效抑制炎症因子 TNF- α 、IL-6 的释放, 降低细胞凋亡率和细胞中 MPO 活性 ($P < 0.05$)。可见, C5aR shRNA 能显著抑制由 LPS 诱导的 TNF- α 、IL-6 等炎症因子的释放, 改善大鼠肾脏功能, 对 LPS 诱导的肾脓毒症损伤有明显保护作用。

关键词: C5a 受体; 脂多糖; 基因沉默; 脓毒症

中图分类号: S852.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)06-1327-06

Effect of silencing C5a receptor expression with shRNA on rat kidney epithelial cells with acute injury induced by lipopolysaccharide

ZHANG Ze-ying^{1,2}, ZHANG Hui¹, ZHAO Xin¹, HUANG Ai-ni¹, JIANG Si-jing²

(1. College of Food and Environmental Engineering, Wuchang Institute of Technology, Wuhan 430065, China; 2. School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract: To investigate the effect of silencing C5a receptor (C5aR) expression with shRNA on rat kidney epithelial cells with acute injury induced by lipopolysaccharide (LPS), eukaryotic expression vector of small hairpin RNA targeting rat C5aR gene was constructed and transfected into rat renal tubular epithelial cell line NRK-52E, after G418 selection, stable cell line expressing C5aR shRNA was got. The experiment was designed as follows: blank control group (NC group), normal control group (LPS group), negative control group (LPS+shRNAc group), experimental group (LPS+C5aR-shRNA group). After incubation with C5aR shRNA, the expression of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-

alpha (TNF- α) mRNA were detected by fluorescence quantitative reverse transcription PCR, the content of TNF- α , IL-6 and myeloperoxidase (MPO) in the supernatant of cells were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the apoptosis ratio of each group was

收稿日期: 2017-03-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31070776)

作者简介: 张泽英 (1980-), 女, 四川泸州人, 博士, 副教授, 研究方向为食品科学与免疫学。 (E-mail) qianyezzy@163.com

通讯作者: 蒋思婧, (E-mail) jiangsijing@hubei.edu.cn

detected by flow cytometry. The results showed that *C5aR* shRNA in the experimental group could effectively inhibit the release of inflammatory factors $\text{TNF-}\alpha$ and IL-6, reduce the apoptosis rate and *MPO* content in cells ($P < 0.05$) compared with that in the normal control group and negative control group. In conclusion, specific short hairpin RNA targeting *C5aR* can significantly inhibit the release of inflammatory factors such as $\text{TNF-}\alpha$ and IL-6 induced by LPS, improve the renal function in rats and has obvious protective effect on renal sepsis injury induced by LPS.

Key words: *C5a* receptor; lipopolysaccharide; gene silence; sepsis

脓毒症是目前世界上感染致死的最主要原因,据全球脓毒症联盟(Global Sepsis Alliance, GSA)在2012年首个世界脓毒症日公布的数据,在2012年前的10年时间里,脓毒症发病率在发达国家以每年8%至13%的速度剧增,而在发展中国家,营养不良、贫穷、疫苗缺乏等原因导致脓毒症死亡率居高不下^[1]。脂多糖(LPS),临床上又称内毒素,是G⁻菌生长或死亡时裂解释放出来的主要成分。由G⁻菌引发的脓毒症占50%~60%,而LPS与其发病机制密切相关^[2]。LPS能激活补体系统,进而启动机体内的炎症反应,导致各种炎症因子的释放,包括IL-1、 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-2、IL-6和IL-8等。补体片段5a(Complement fragment, C5a)是最重要的补体活化产物之一,它与相应的C5a受体(C5aR)结合被激活后,参与脓毒症等多种疾病的病理过程。如何阻断C5a信号的下传,从而减轻炎症反应一直是免疫学研究的热点问题^[3]。本研究通过构建针对大鼠*C5aR*基因的特异性发卡结构RNA(shRNA)表达质粒,并转染大鼠肾小管上皮细胞NRK-52E细胞系,研究*C5aR*基因干扰对LPS诱导的大鼠肾脓毒症的抑制作用,为进一步研究减轻急性肾脓毒症导致的肾功能衰竭等病理过程奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 NRK-52E细胞,购自美国ATCC公司。

1.1.2 主要试剂 抗大鼠C5aR多克隆抗体,美国SantaCruz公司产品;GAPDH抗体,杭州贤至生物有限公司产品;RQI无Rnase活性的DNA酶,Promega公司产品;脂质体2000、Rat $\text{TNF-}\alpha$ 、Rat IL-6 ELISA Kit,美国Invitrogen公司产品;LPS,美国Sigma公司产品;反转录酶,日本TaKaRa公司产品;Realtime PCR Master Mix,日本Toyobo公司产品;ECL底物发光试剂盒,美国Pierce Biotechnology公司产品;An-

nexinV-FITC/PI细胞凋亡双染试剂盒,以及MPO、BUN、Creatine检测试剂盒,碧云天生物公司产品。

1.1.3 主要仪器设备 荧光倒置显微镜,德国Olympus公司产品;RT-PCR仪,美国Invitrogen公司产品;MRX酶标仪,DYNEX Technologies公司产品;BIO-RAD转膜仪,广东浩瀚仪器有限公司产品;PVDF膜,美国Millipore公司产品; CO_2 细胞培养箱,美国Thermo Scientific公司产品;凝胶成像系统,英国SYNGENE公司产品;聚丙烯酰胺凝胶电泳仪,北京六一仪器厂产品。

1.2 方法

1.2.1 试验分组 空白对照组(NC组):未经LPS处理,未转染任何表达质粒的NRK-52E细胞;正常对照组(LPS组):未转染任何表达质粒,但经LPS处理24 h的NRK-52E细胞;阴性对照组(LPS+shRNAc组):转染阴性质粒shRNAc后经LPS处理24 h的NRK-52E细胞;处理组(LPS+C5aR-shRNA组):转染C5aR shRNA表达质粒后经LPS处理24 h的NRK-52E细胞。

1.2.2 脂质体转染 将肾上皮细胞接种至24孔板(每孔约 1×10^4 个细胞),用含10%小牛血清的DMEM培养基于37℃、5% CO_2 的培养箱中培养,使转染时细胞的融合度为40%~50%,在无血清的DMEM培养基中加入C5aR shRNA表达质粒,室温孵育5 min,在另一无血清的DMEM培养基中加入脂质体2000,室温孵育5 min。将上述两者混合,室温孵育20 min,将上述混合液轻轻加入各细胞孔中,混匀,放入培养箱中在37℃、5% CO_2 培养箱中培养,转染6 h后,加入含25%小牛血清的DMEM,使培养基中小牛血清终浓度为10%,继续培养,转染48 h后,将大肠杆菌LPS加入培养基,刺激24 h。

1.2.3 荧光定量RT-PCR 检测细胞中炎症因子 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6 mRNA的表达 收集细胞后,提取RNA。用荧光定量RT-PCR法检测细胞中炎症因子 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6 mRNA的表达,每组样本重复3次,以

相对 Ct 值(即 $2^{-\Delta\Delta C_t}$)表示目的基因的相对表达量,以正常对照组细胞为对照。 $TNF-\alpha$ 表达量检测的上、下游引物分别为 5'-CCACCACGCTCTTCTGTC-TACTG-3'和 5'-CTTGCTGGTTTGCTACGACG-3'; $IL-6$ 表达量检测的上、下游引物分别为 5'-TGGAGTTC-CGTTTCTACCTGG-3'和 5'-GGTCCTTAGCCACTCCT-TCTGT-3'; $GAPDH$ 表达量检测的上、下游引物分别为 5'-CTGAGAGGGAAATCGTCGT-3'和 5'-CCA-CAGGATTCCATACCCAAGA-3'。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 收集细胞,用 4℃ 预冷 PBS 重悬细胞,2 000 r/min 离心 5~10 min,洗涤细胞,加入 Binding Buffer 悬浮细胞,加入 Annexin V-FITC 轻轻混匀后,室温避光孵育 15 min,加入 PI 轻轻混匀后,室温避光孵育 5 min,上机检测。

1.2.5 ELISA 法检测细胞培养上清液中 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 含量和髓过氧化物酶(MPO)活性 收集各组细胞上清液,1 000 r/min 离心 10 min,取上清。按照试剂盒操作说明,每孔各加入稀释成不同浓度的标准品或待测样品溶液,充分混匀后于 37℃ 保温 120 min,洗涤后每孔中加入一抗工作液,充分混匀后于 37℃ 保温 60 min。洗涤后每孔加酶标抗体工作液。将反应板置于 37℃ 保温 30 min,洗涤后每孔加入底物工作液,于 37℃ 避光保温 15 min,每孔加入终止液,混匀,并在 30 min 内用酶标检测仪测 OD_{450} 值。

1.2.6 细胞通透性改变的检测 按照文献[4]的方法,用 HRP 作为示踪剂检测肾上皮细胞通透性改变。将大鼠肾小管上皮细胞接种在 Transwell chamber 模型中,细胞接种密度为每孔 2×10^5 个。细胞融合成单层后,按试验分组处理细胞后,在上室加入 HRP 至终浓度 0.6 mg/L,37℃、5% CO_2 孵育 1 h。在每个双层小室的顶室和底室分别取样品 100 μ l,置于 96 孔板中,并向每孔中加入联苯二胺,显色后加入终止液,酶标仪检测 HRP 吸光度 OD_{450} 的变化。

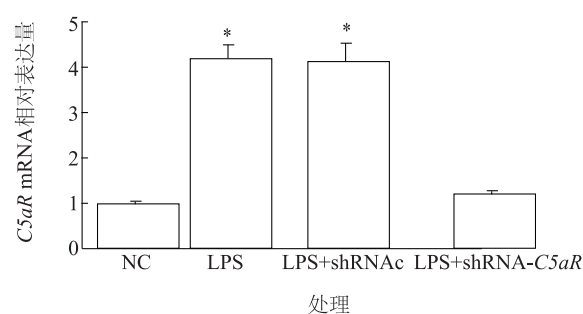
1.2.7 统计分析 所有计量数值均用平均数 \pm 标准差表示,应用 SPSS16.0 统计软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 C5aR 基因沉默对 C5aR mRNA 和 C5aR 蛋白表达的影响

收集各试验组 NRK-52E 细胞,提取 RNA 和总蛋白质,采用荧光定量 PCR 法检测 mRNA 水平的表达,采用 Western blot 检测 C5aR 蛋白的表达。结果

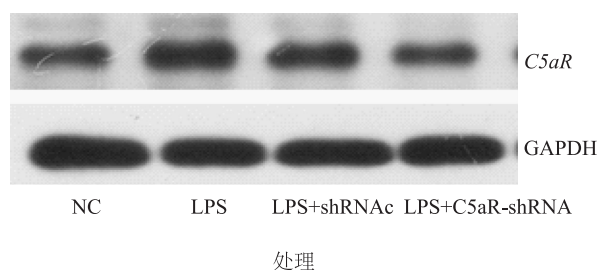
(图 1、图 2)显示:正常 NRK-52E 细胞中 C5aR mRNA 和 C5aR 蛋白的表达量相对较低,LPS 刺激后 C5aR mRNA 和 C5aR 蛋白的表达量明显增加($P < 0.05$);转染 C5aR shRNA 表达质粒后 C5aR mRNA 和 C5aR 蛋白的表达与未转染和转染阴性对照质粒的细胞相比明显下降,说明 C5aR shRNA 可明显抑制 LPS 刺激引起的 C5aR mRNA 和 C5aR 蛋白表达上调;阴性对照组 C5aR mRNA 和 C5aR 蛋白与空白对照组无明显差异($P > 0.05$),说明转染过程本身对细胞中 C5aR mRNA 和 C5aR 蛋白表达量无明显影响。



NC:空白对照组; LPS:正常对照组; LPS+shRNAc:阴性对照组; LPS+C5aR-shRNA:处理组。*表示与 NC 组相比差异显著($P < 0.05$)。

图 1 C5aR shRNA 干扰对 C5aR mRNA 表达的影响

Fig.1 Effects of C5aR shRNA interference on the expression of C5aR mRNA



各处理见图 1 注。

图 2 C5aR shRNA 干扰对 C5aR 蛋白表达的影响

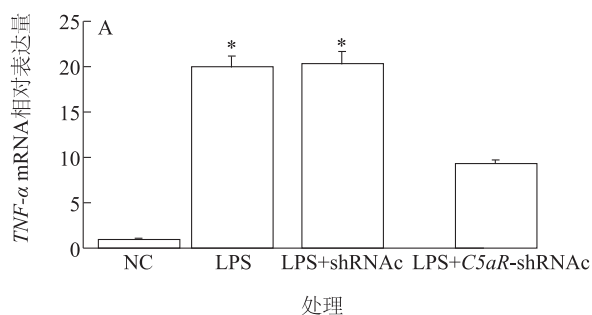
Fig.2 Effects of C5aR shRNA interference on the expression of C5aR protein

2.2 C5aR 基因沉默对 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ mRNA 表达的影响

由图 3 可见,正常 NRK-52E 细胞 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ mRNA 的表达量相对较低,LPS 刺激后其表达量明显增加($P < 0.05$), $TNF-\alpha$ 增加了约 20.0 倍, $IL-6$ 增

加了约 14.7 倍。重组质粒 *C5aR*-shRNA 转染入 NRK-52E 细胞后, *TNF- α* 、*IL-6* mRNA 的表达明显下调($P<0.05$), 可见 *C5aR* 基因沉默可明显抑制 LPS

刺激后 *TNF- α* 、*IL-6* mRNA 表达的上调。阴性对照组 *TNF- α* 、*IL-6* mRNA 与空白对照组无明显差异($P>0.05$)。



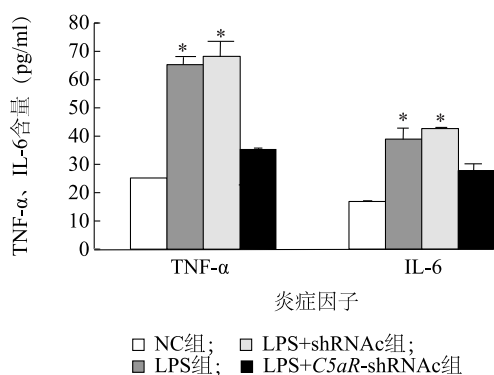
各处理见图 1 注。* 表示与 NC 组相比差异显著($P<0.05$)。

图 3 *C5aR* shRNA 干扰对 *TNF- α* 、*IL-6* mRNA 表达的影响

Fig.3 Effects of *C5aR* shRNA interference on the expression of tumor necrosis factor- α (*TNF- α*) and interleukin-6 (*IL-6*) mRNA

2.3 *C5aR* 基因沉默对大鼠肾上皮细胞上清液中炎症因子含量的影响

用 ELISA 法检测 LPS 刺激 12 h 后各处理细胞培养上清中炎症因子 *TNF- α* 、*IL-6* 含量。结果(图 4)显示, 与正常细胞组及对照转染组相比, 重组质粒 PLVX-*C5aR*-shRNA 转染入 NRK-52E 细胞后, 上清液中炎症因子 *TNF- α* 、*IL-6* 含量均显著下降($P<0.05$)。



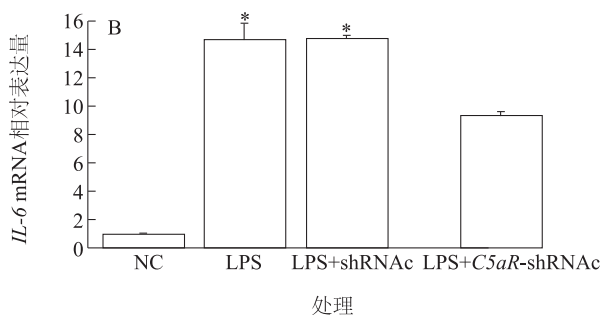
各处理见图 1 注。* 表示与 NC 组相比差异显著($P<0.05$)。

图 4 *C5aR* shRNA 干扰对大鼠肾上皮细胞上清液中炎症因子含量的影响

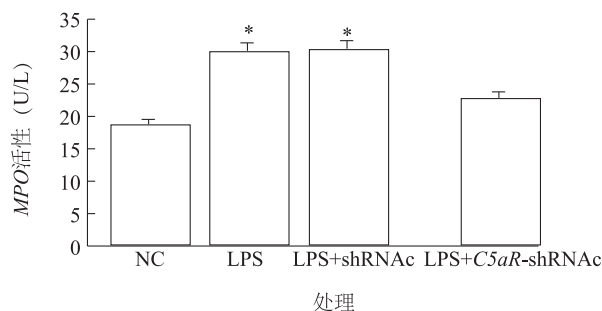
Fig.4 Effects of *C5aR* shRNA interference on inflammatory factors content in supernatant of rat renal tubular epithelial cells

2.4 *C5aR* 基因沉默对大鼠肾上皮细胞中 MPO 活性的影响

中性粒细胞是炎症反应可溶性介质的来源, 在



炎症发生过程中, 一般都伴随着中性粒细胞的浸润。髓过氧化物酶 (*MPO*) 是中性粒细胞嗜天青颗粒产生的一种重要的过氧化物酶, 其含量的增高可以反映中性粒细胞在某一组织中的增高, 间接反映炎症的存在^[5]。图 5 显示, NRK-52E 细胞在受到 LPS 刺激后, 细胞 *MPO* 活性显著升高($P<0.05$), 而 *C5aR* 基因沉默对 LPS 诱导 NRK-52E 细胞 *MPO* 活性有显著的抑制作用($P<0.05$)。



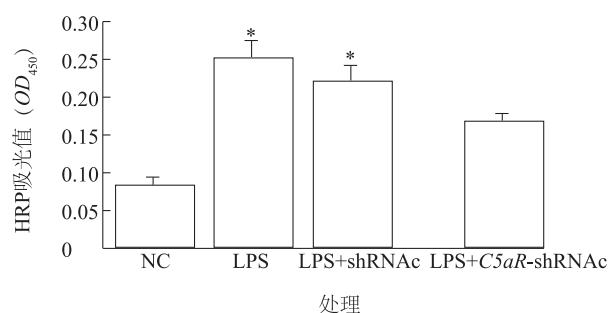
各处理见图 1 注。* 表示与 NC 组相比差异显著($P<0.05$)。

图 5 *C5aR* shRNA 干扰对大鼠肾上皮细胞中 *MPO* 活性的影响

Fig.5 Effects of *C5aR* shRNA interference on myeloperoxidase (*MPO*) activity in rat renal tubular epithelial cells

2.5 *C5aR* 基因沉默对大鼠肾上皮细胞通透性的影响

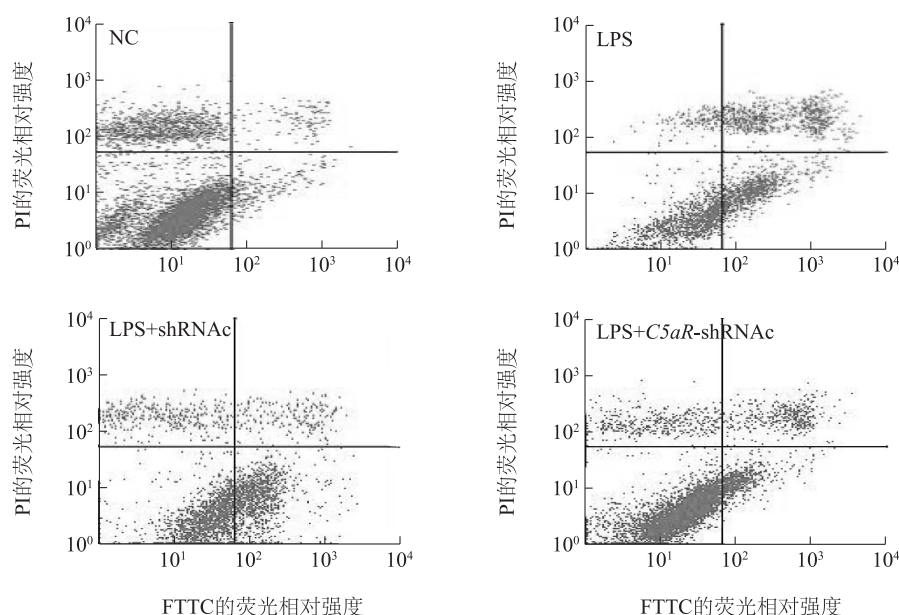
由图 6 可见, LPS 刺激 NRK-52E 细胞后, 其通透性增加($P<0.05$), 与未转染和转染阴性对照质粒的 NRK-52E 细胞相比, 转染 *C5aR* shRNA 表达质粒后, 细胞通透性显著下降($P<0.05$)。



各处理见图1注。*表示与NC组相比差异显著($P<0.05$)。

图6 C5aR shRNA 干扰对大鼠肾上皮细胞通透性的影响

Fig.6 Effects of C5aR shRNA interference on permeability of rat renal tubular epithelial cells



各处理见图1注。

图7 各处理细胞流式细胞图

Fig.7 Flow cytometry of cells of each experimental group

3 讨论

肾脏是代谢产物及毒素排泄的主要途径。在肾脏中,C5aR 主要在肾脏系膜细胞、近曲小管上皮细胞、血管平滑肌细胞、内皮细胞、远曲小管和输尿管、膀胱的移行上皮细胞中表达,其在肾损伤中的作用一直是研究的热点。C5aR 可介导肾小球和肾小管细胞的损伤,诱导细胞释放 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 等多种细胞因子,其表达量与肾脏损伤的严重程度呈

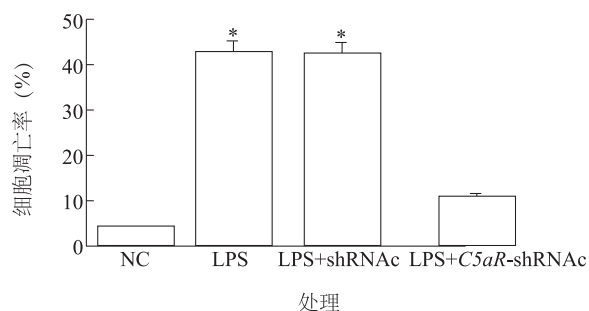
2.6 C5aR 基因沉默对 RNK-52E 细胞凋亡率的影响

采用 Annexin V-FITC/PI 双标记流式细胞术检测 RNK-52E 细胞凋亡率,得到二维散点图(图7),二维散点图中横坐标为 FITC 的荧光相对强度,纵坐标为 PI 的荧光相对强度,采用对数形式。

由图7、图8检测结果可知,经 LPS 处理后,转染 C5aR shRNA 的 RNK-52E 细胞凋亡率为 $11.13\% \pm 1.45\%$,而未转染的 RNK-52E 细胞和转染阴性质粒的 RNK-52E 细胞凋亡率分别为 $42.95\% \pm 1.26\%$ 和 $42.54\% \pm 0.98\%$,与未转染的 RNK-52E 细胞和转染阴性质粒的 RNK-52E 细胞相比,转染 C5aR shRNA 的 RNK-52E 细胞凋亡率显著下降($P<0.05$)。

正相关。在严重创伤、烧伤、休克、重症感染等应激状态下,来自于感染部位的 LPS 大量进入体内,并引起炎症介质的合成、释放,如 TNF- α 、IL-6、MCP-1 等,在急性损伤的发生、发展起着不可忽视的作用^[6]。TNF- α 、IL-6、IL-6 等被认为是脓毒症病情发展的重要介质。

为了研究在肾脏脓毒症中 LPS 是否激活了补体系统,促使 C5a 与 C5aR 结合,诱导炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 等的合成和释放,加速炎症反应,我



各试验组见图 1 注。* 表示与 NC 组相比差异显著 ($P < 0.05$)。

图 8 *C5aR* shRNA 干扰对大鼠肾上皮细胞凋亡率的影响

Fig.8 Effects of *C5aR* shRNA interference on apoptosis rate of rat renal tubular epithelial cells

们设计了针对大鼠补体受体 *C5aR* 作为抑制肾脏损伤的靶位点,进一步探讨 *C5aR* 对肾脏脓毒症的影响,研究短发夹状 RNA (shRNA) 基因沉默 *C5aR* 抑制 LPS 诱导的肾脏脓毒症的作用机制。在试验中观察到,LPS 能引起大鼠肾小管上皮细胞的损伤,经 LPS 刺激 24 h 后,在未转染的 RNK-52E 细胞、转染阴性质粒 PLVX-shRNAc 的 RNK-52E 细胞和转染 PLVX-*C5aR*-shRNA 的 RNK-52E 细胞均出现 *C5aR* mRNA 及蛋白质的表达,而与未转染的 RNK-52E 细胞和转染阴性质粒的 RNK-52E 细胞相比,转染 PLVX-*C5aR*-shRNA 的 RNK-52E 细胞中 *C5aR* mRNA 和蛋白质表达量显著降低,细胞活性升高,细

胞凋亡率下降,炎症因子的表达显著下调。研究结果表明,LPS 诱导的细胞损伤与 *C5aR* 的表达上调有关,*C5aR* 基因沉默可以明显抑制肾脏上皮细胞的凋亡和炎症因子的释放,对其损伤起到一定的抑制作用。进一步探讨了补体系统在肾脏脓毒症损伤中的作用机制,采用基因沉默的方式干扰 *C5aR* 的表达可以减轻肾脏损伤,这为肾脏脓毒症的预防和治疗提供了新的研究思路。

参考文献:

- [1] REINHART K, KISSOON N T, DANIELS R, et al. What we learned from the first World Sepsis Day [J]. Critical Care, 2012, 27 (6): 735-736.
- [2] 于冬梅,张铁铮,周 锦. 右美托咪定对内毒素血症大鼠急性肾损伤的保护作用[J]. 实用药物与临床, 2014, 17 (12): 1545-1547.
- [3] 王会会,陈国江,黎 燕,等. 补体 *C5a*、*C5a* 受体及其拮抗剂的研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2010, 37 (3): 181-186.
- [4] 闫承慧,于海波,张效林,等. 人脐静脉内皮细胞单层通透性改变的效应因子[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15 (46): 8609-8612.
- [5] 代国杰,朱建津,高琳琳,等. 褪黑素对脂多糖刺激小鼠体内炎症反应[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29 (1): 40-43.
- [6] 崔文瑶. 丙泊酚对内毒素血症大鼠肾损伤的保护作用及其机制的分析[D]. 辽宁: 中国医科大学, 2009.

(责任编辑:张震林)