

doi: 10.3969/j.issn.1673-4807.2013.01.020

# Abcg4 基因在小鼠组织中的表达及其 RNA 干涉的研究

王雪芳, 李锡海, 吴金美

(江苏科技大学 生物与化学工程学院, 江苏 镇江 212018)

**摘要:** 利用半定量 RT-PCR 的方法研究基因 Abcg4 在小鼠组织的表达情况, 发现 Abcg4 基因在小鼠脑、眼睛和脾中表达, 其中脑和眼睛中表达较高. 为进一步研究 Abcg4 基因的功能, 采用 RNA 干涉(RNAi) 技术抑制脑中 Abcg4 基因的表达, 通过体内实验了解其对 Abcg4 基因的沉默效率. 设计合成针对 Abcg4 基因的小干扰 RNA(siRNA), 不同剂量 siRNA 注射小鼠侧脑室内, 于小鼠注射后不同时相点, 采用半定量 RT-PCR 法检测脑内 Abcg4 基因的表达量. 结果表明, 特定靶序列的 siRNA 注射剂量 6 $\mu$ g, 注射 48 h 时, 对 Abcg4 基因的抑制效率可达 85%. 研究表明, 脑注射 siRNA 可以显著抑制小鼠脑中 Abcg4 基因的表达.

**关键词:** Abcg4 基因; 组织表达; RNAi; RT-PCR; 侧脑室注射

中图分类号: Ts25

文献标志码: A

文章编号: 1673-4807(2013)01-0089-04

## Abcg4 expression in mouse tissues and its specific inhibition in the brain by RNA interference

Wang Xuefang, Li Xihai, Wu Jinmei

(School of Biology and Chemical Engineering, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang Jiangsu 212018, China)

**Abstract:** Abcg4 was found highly expressed in the brain, eye and spleen by means of semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), with higher expression in the first two organs. To further study the function of the gene, the effect of specifically designed small interference RNA (siRNA) on inhibiting this gene's expression was investigated in vivo. These siRNAs were synthesized and injected into the mouse lateral ventricle with different dosage. Brains were immediately removed at different time point after injection, and Abcg4 mRNA expression was measured by RT-PCR. The result shows that 6 $\mu$ g of the specific siRNA can inhibit the expression of Abcg4 significantly, with an inhibition rate up to 85% 48 hours after injection. The study concludes that the expression of Abcg4 can be inhibited by its specific siRNA in the mouse brain.

**Key words:** Abcg4; tissue expression; RNAi; RT-PCR; intracerebroventricular injection

三磷酸腺苷结合盒转运体 G4 (ATP binding cassette transporter G4, Abcg4) 是近年来发现的一介导胆固醇流出的整合膜蛋白, 为三磷酸腺苷结合盒转运体超家族(ABC) 成员. 近临床发现 Abcg4 在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD) 人脑中较正常人脑中高表达<sup>[1]</sup>. 阿尔茨海默病即老年性痴呆, 是老年人常见的神经系统变性疾病之一, 临床上以进行性智能减退和认知功能障碍为特征. 近来分子遗传学和细胞生物学的研究报道胆固醇在

AD 的发病机制中发挥一定的作用<sup>[2-4]</sup>, 那么对介导胆固醇流出的 Abcg4 是否参与 AD 的发病机制, 目前尚未见报道.

RNA 干涉(RNA interference, RNAi) 技术是使基因沉默的重要工具, 能够较快速度地使靶基因表达下调. 目前, 国内对 Abcg4 的相关报道甚少, 采用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 技术沉默活体中 Abcg4 基因的相关研究更尚未见报道. 本试验中, 向小鼠侧脑室注射 siRNA, 探讨有效沉默

收稿日期: 2011-06-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31272508); 江苏科技大学博士资金资助项目(635210503)

通讯简介: 吴金美(1963—), 女, 博士, 研究员, 研究方向为基因结构、功能与疾病. Email: jwuus@hotmail.com

Abcg4 基因的特异性序列,及其导入剂量和导入后发挥干扰作用的时间点.研究表明,Abcg4 基因得到有效表达下调,这为进一步研究该基因的功能奠定了基础,也可能为以 Abcg4 为靶标有效治疗 AD 提供依据.

## 1 实验材料与设备

### 1.1 实验动物与试剂

动物:健康昆明(KM)雌性小白鼠,5周龄,17~20g,购自江苏大学实验动物中心.

试剂:RNAiso<sup>TM</sup> Plus、M-MLV 反转录酶、RNA 酶抑制剂、oligo(dT)、dNTP 等,购自 TaKaRa 有限公司;氯仿、异丙醇、水合氯醛、乙醇等,为上海化学试剂有限公司生产;DEPC 购自上海申能博彩生物有限公司;基因特异性引物由上海生工合成.

### 1.2 实验仪器

紫外分光光度计、核酸凝胶电泳仪、PCR 仪、凝胶成像仪均购自 BIO-RAD; Y89-II 型电动玻璃匀浆机购自宁波新芝生物有限公司; DK-8D 数显恒温水浴锅购自金坛市医疗仪器厂.

## 2 实验方法

### 2.1 Abcg4 基因在小鼠中的组织表达

#### 2.1.1 总 RNA 的提取和鉴定

取 5 只健康昆明雌性小白鼠,颈椎脱臼致死,取适量肝、肾、脾、心、脑、眼、肺、胸腺组织,快速液氮冷冻保存.参照 RNAiso<sup>TM</sup> Plus 的试剂说明书提取总 RNA,步骤如下:取以上组织各 100 mg,分别加入 1 ml RNAiso<sup>TM</sup> Plus 试剂充分匀浆,转至 1.5 ml 离心管中,室温静置 5 min;加入 200  $\mu$ l 氯仿,剧烈震荡 15 s 后室温静置 5 min,分层;4 $^{\circ}$ C, 12 000 g 离心 15 min;取上层水相于一新的离心管中,加入 400  $\mu$ l 异丙醇,混匀后静置 10 min;4 $^{\circ}$ C, 12 000 g 离心 10 min;弃上清,沉淀用 1 ml 的 75% 乙醇洗涤后室温干燥,适量 0.1% DEPC 处理水溶解.用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的提取质量,并用紫外分光光度计测定总 RNA 浓度和纯度.

#### 2.1.2 半定量 RT-PCR 检测

M-MLV 反转录酶将总 RNA 反转录为 cDNA.具体过程如下:取每个样品总 RNA 1  $\mu$ g,oligo(dT) 2.5 pmol,dNTP (10 mmol/L each) 1  $\mu$ l,加 DEPC 处理水至 10  $\mu$ l,水浴锅上 70 $^{\circ}$ C 反应 10 min,迅速置于冰上冷却,加入 5 $\times$ 反应缓冲液 5  $\mu$ l,RNA 酶抑制剂 25 U,M-MLV 反转录酶 200 U,用 0.1% DEPC 处理水补至总体积为 20  $\mu$ l(以上操作均在

冰上进行),稍离心后置于水浴锅上反应,42 $^{\circ}$ C, 60 min;70 $^{\circ}$ C,15 min,迅速置于冰上,最后将所得 cDNA 产物置于 -20 $^{\circ}$ C 保存.

每个样品都以反转录所得 cDNA 体积的 1/10 为模板,用小鼠 Abcg4 基因特异引物扩增(扩增基因部分片段,504bp),引物序列如下:Abcg4-F,5'-CCCCACGCTGTTTCAGGGCTG-3'; Abcg4-R,5'-TGCTGCAGTACACCACTGGGC-3'.同时以小鼠 GAPDH 基因作为内参照,其引物序列如下:GAPDH-F,5'-AAATGGGGTGAGGCCGGTGC-3'; GAPDH-R,5'-TCTCCAGGCGGCACGTCAGA-3'.以上 PCR 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 4 min,以 94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,进行 25 次循环,72 $^{\circ}$ C 10 min.扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳并拍照.

### 2.2 Abcg4 基因在小鼠脑中的沉默

#### 2.2.1 合成以小鼠 Abcg4 基因为靶点的 siRNA (Abcg4-siRNA)

参照 NCBI 上登录的 C57BL 小鼠 Abcg4 基因序列(NM-138955.3),设计引物,RT-PCR 克隆出 Abcg4 基因并测序,根据测序结果,由广州锐博生物公司合成 3 个 siRNA,编号为 siRNA-001,siRNA-002,siRNA-003,其针对靶序列分别为:CCAGCAAAGTCTTCAACAA (1464-1482bp); CCACATTCATGAACATCTT (540-558bp); GTGAGAAGCAAGAGGTGAA (726-744bp).合成后的 siRNA 保存在 -20 $^{\circ}$ C,使用前用去无 RNAase 水配成 2  $\mu$ g/ $\mu$ l 浓度.

#### 2.2.2 动物处理

试验中以小鼠脑为对象研究 siRNA 对 Abcg4 基因的沉默效果.将 KM 小鼠随机分成 siRNA 侧脑室干预组和 PBS 侧脑室对照组.干预组小鼠侧脑室内注射 Abcg4-siRNA,用 PBS 稀释;对照组小鼠侧脑室注射同等体积的 PBS.侧脑室注射方法:小鼠用 10% 水合氯醛(350 mg/kg)腹腔注射麻醉后,俯卧位,固定于脑立体定位仪,取右侧侧脑室进行穿刺,穿刺位置:以前囟为圆点,向后 2.2 mm,向右旁开 1.5 mm,深 1.3 mm.牙科钻颅骨钻孔,用微量注射器进行注射,注射后留针 5 min(侧脑室注射操作在南京医科大学完成).所有动物在注射后 24 h 内,麻醉苏醒,能够自由活动和进食者,进入下一步试验.

#### 2.2.3 取材及处理

在注射后适当的时间点,将小鼠迅速断头取脑,在冰浴上用锋利的刮胡刀片沿正中矢状线切开,分离两侧大脑半球,取右侧大脑半球,称约

100 mg 脑组织提取 RNA,半定量 RT-PCR 检测 Abcg4 表达的影响,方法同 2.1.

### 3 结果与分析

#### 3.1 Abcg4 组织表达

紫外分光光度仪测抽提的总 RNA 的 A260/280 值在 1.8~2.2 之间;经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析,可见清晰的 28,18,5 s 三条带,表明 RNA 完整性好,没有发生降解.以小鼠的肝、肾、脾、心、脑、眼、肺、胸腺各组织分别 1 $\mu$ g 总 RNA 的逆转录产物为模板,半定量 RT-PCR 扩增进行组织表达分析.结果表明 Abcg4 在小鼠眼睛、脑、脾中均有表达,其中眼睛和脑中表达量较高(图 1).

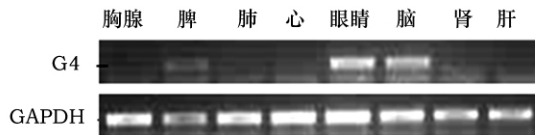


图 1 RT-PCR 检测 Abcg4 基因在小鼠多种组织内的表达情况

Fig. 1 Expression of Abcg4 in different tissues by means of RT-PCR

#### 3.2 不同靶序列对 Abcg4 基因的干扰作用

为了比较不同靶序列对 Abcg4 基因的干扰效果,分别注射小鼠侧脑室 siRNA-001,002 和 003 号各 6  $\mu$ g, PBS 稀释至 6 $\mu$ l;对照组注射同等体积 PBS. 注射 48 h 后取小鼠脑,半定量 RT-PCR 测定不同组 Abcg4 的表达量(图 2). 结果发现,注射 siRNA-001 后,小鼠脑内 abcg4 基因表达水平几乎没受到影响,与注射 PBS 组 Abcg4 表达量基本一致;注射 siRNA-002, Abcg4 基因的表达量受到一定程度的影响;注射 siRNA-003, Abcg4 基因的表达量显著下降. 实验结果表明, siRNA 对小鼠 Abcg4 基因的沉默作用有靶序列选择性. 经比较 siRNA-003 抑制效果较强,在后续实验中选择 siRNA-003 做进一步的研究.

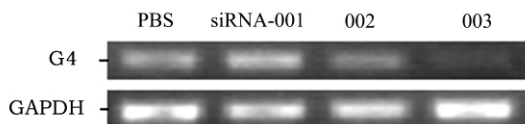


图 2 不同靶序列对小鼠脑内 Abcg4 基因的干扰作用

Fig. 2 Effect of different siRNAs on Abcg4 silencing in mouse brain

#### 3.3 注射后不同时间对 Abcg4 基因沉默作用的影响

为比较注射 siRNA 后不同时间对 Abcg4 基因的沉默作用,分别于小鼠注射 siRNA-003 后 24,

36, 48, 72 h 后取脑,半定量 RT-PCR 测定 Abcg4 的表达量(图 3). 发现注射后 24, 72 h 后,小鼠脑 Abcg4 基因的表达受到一定程度的影响;36, 48 h 时, Abcg4 基因表达量显著降低. 结果表明, siRNA 对小鼠脑 Abcg4 基因的沉默作用有着时效性,注射后 48 h 效果最好.

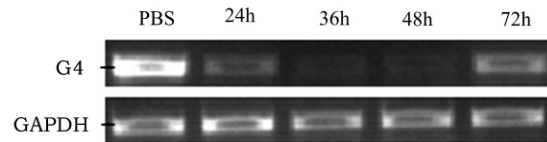


图 3 注射后不同时间对 Abcg4 基因沉默作用的影响

Fig. 3 Effect of RNA interference after injection at different time

#### 3.4 siRNA 注射剂量对 Abcg4 基因表达的影响

为研究 siRNA 注射剂量对 Abcg4 基因表达的影响,分别向小鼠侧脑室注射 1, 3, 6, 8  $\mu$ g siRNA-003, 于 48 h 后取出脑,半定量 RT-PCR 测定 Abcg4 基因的表达量(图 4). 发现 siRNA 注射量在一定范围内(1~6  $\mu$ g) 随注射剂量增加,抑制效果逐渐增强,但注射剂量达到一定水平后,抑制效果的增强趋势趋于平缓. 6~8  $\mu$ g 之间抑制效果变化不明显. 实验结果表明, siRNA 对小鼠脑 Abcg4 基因的沉默作用有剂量效应, 6  $\mu$ g 即可达到显著的抑制效果.

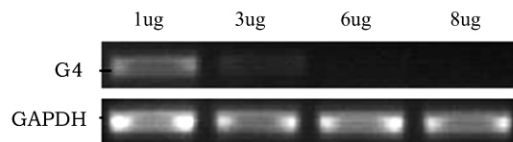


图 4 siRNA 注射剂量对小鼠脑内 Abcg4 基因表达的影响

Fig. 4 Dose-dependent interfering effect of siRNA on Abcg4 expression

## 4 讨论

本研究发现 Abcg4 基因在小鼠脑、眼睛和脾中表达,其中脑和眼睛中表达较高. 脑是 Abcg4 基因高表达部位之一,这可能与介导胆固醇流出的功能有关,因为脑是人体内胆固醇含量最高的器官,在脑组织中,胆固醇的作用尤为重要. 神经轴突的信号传递、神经生长、修复和重塑、神经元载体的功能及突触的发生,成熟及可塑性的维持都离不开胆固醇的参与<sup>[5]</sup>. 近来,流行病学、细胞学和动物实验证明,脑中胆固醇代谢异常可导致 AD 发生<sup>[6]</sup>, 2008 年,发现 Abcg4 在 AD 病人脑中老年斑附近的

微胶质细胞中高表达<sup>[1]</sup>. 担任胆固醇转运的 Abcg4 与 AD 关系如何, 目前还不清楚. 本研究利用 siRNA 介导的基因干涉使脑中 Abcg4 基因沉默, 为研究 Abcg4 在 AD 发病机制中的作用提供了新的方法. 近来研究报道, 将 siRNA 直接溶解于简单溶液中(即局部注射裸 siRNA) 可有效地使靶向基因沉默, 这种方法易于制备和使用, 操作简便, 但其应用还处于探索阶段, 相关报道比较少. 属于中枢神经系统的脑, 其结构和功能较复杂; 又因为 siRNA 的极性和不稳定性, 较难与靶基因结合, 且易被胞内核酸酶降解<sup>[7,8]</sup>, 并可能产生炎症反应<sup>[9]</sup>, 这些将给利用 siRNA 在脑中沉默 Abcg4 基因增加了一定的困难. 为此, 文中试验将裸 siRNA 直接导入小鼠侧脑室内, 做了大量的探索性工作, 经过多次重复实验确定借助脑定位仪准确将 siRNA 注射到小鼠侧脑室内, 能够有效抑制 Abcg4 基因的表达, 并在此基础上寻求 siRNA 干扰作用的最佳条件.

文中的外源 siRNA 是针对与 KM 小鼠靶基因 Abcg4 mRNA 所测序列完全配对而设计的, 这是使组织细胞内靶基因表达得到有效抑制的首要条件. 试验中设计了 3 个 siRNA 短链, 用 PBS 稀释, 应用脑定位仪注射一定剂量到小鼠侧脑室内, 初步研究结果表明, 与 PBS 对照组相比, 注射 siRNA-003 的小鼠脑中 Abcg4 基因的表达可被有效抑制, 可见, siRNA 对 Abcg4 基因的沉默作用有序列选择性. 我们比较了不同 siRNA 剂量对 Abcg4 基因沉默作用的影响, 发现 siRNA 对 Abcg4 基因的抑制效果也有着剂量依赖性, 在一定范围内, 抑制效果随剂量增加而增强, 但剂量达到一定水平后, 效果达到最强并趋于平稳. 另外, 比较注射后不同时间的效果, 选择有效的靶序列 siRNA 注射小鼠侧脑室, 发现于小鼠注射 36、48 h 后效果较显著, 定量分析 48 h 效果最好, 而注射 24、72 h 时, 脑内 Abcg4 基因的表达量影响不大, 这表明 siRNA 对 Abcg4 基因的抑制效果有着时间依赖性. 较短的时间 24 h 内, siRNA 可能还没完全被细胞摄取或与靶基因结合, 使得 siRNA 未能完全发挥对靶基因的抑制作用; 72 h 后, 时间过长, 则可能由于体内核酸酶的存在, siRNA 又被降解.

虽然 RNAi 生物学已经获得了巨大进展, 为生物医学研究带来了革命性的变化, 多项 siRNA 在用于治疗疾病的临床实验中也取得了重要成果, 现在已成长为确认药物靶标和研究基因功能的有力工具. 但是要使 siRNA 分子成功有效应用于生物体内, 并成为临床使用的常规途径, 目前还有一些

关键性问题需要解决, 如有效性, 要求增强 siRNA 对核酸酶的抗性, 增强靶细胞的摄取; 安全性, 减少肾脏排泄与非靶细胞摄取. 除此之外, 还要考虑方便制备、成份简单、质检容易, 临床给药途径和靶向细胞等要求. 所以在 RNAi 技术在临床疾病治疗研究中取得了突破和发展的基础之上, 研制出临床广泛应用的 siRNA 制剂及方便、高效、靶向性强的给药途径仍是今后研究的重点. 文中采用小鼠侧脑室注射技术, 在注射后适当的时间点, 适量 siRNA 可有效干扰 Abcg4 基因表达. 该研究首次系统地报道了运用合成的裸 siRNA 直接体内注射所产生的对靶基因 Abcg4 的干涉作用, 为 Abcg4 基因功能研究奠定了基础, 为研究阿尔茨海默病病理机制和建立阿尔茨海默病动物模型进行了探索, 也为研究开发阿尔茨海默病的新药物开拓了思路, 对于该疾病的进一步研究与药物开发有着重要的意义.

### 参考文献(References)

- [1] Yoshinari U, Tatsuo Y, Yasuhiko B. ATP-binding cassette transporter G4 is highly expressed in microglia in Alzheimer's brain[J]. *Brain Res*, 2008, 12(17): 239-246.
- [2] Kivipelto M, Solomon A. Cholesterol as a risk factor for Alzheimer's disease-epidemiological evidence[J]. *Acta Neurol Scand Suppl*, 2006, 185: 50-57.
- [3] Puglielli L, Tanzi R E, Kovacs D M. Alzheimer's disease: the cholesterol connection[J]. *Nat Neurosci*, 2003, 6(4): 345-351.
- [4] Wolozin B. Cholesterol and the biology of Alzheimer's disease[J]. *Neuron*, 2004, 41(1): 7-10.
- [5] 吴转斌, 吴金美. ABC 转运子 G 亚族与人类疾病[J]. *江苏大学学报: 医学版*, 2008, 18(3): 268-272.
- [6] Solomon A, Ngandu T, Winblad B, et al. Serum cholesterol changes after midlife and late life cognition twenty one year follow up study[J]. *Neurology*, 2007, 68(5): 751-756.
- [7] Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs[J]. *Nature*, 2004, 432(7014): 173-178.
- [8] Akhtar S, Benter I F. Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo[J]. *Clin Invest*, 2007, 117(12): 3623-3632.
- [9] Judge A D, Sood V, Shaw J R, et al. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA[J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(4): 457-462.

(责任编辑: 贡洪殿)