

引文格式:李婷婷,胡健艳,吴强. 靶向 G 蛋白偶联受体 91 的小发夹 RNA 慢病毒载体的构建及功能初步检测[J]. 眼科新进展,2014,34(8):705-709. doi:10.13389/j.cnki.rao.2014.0193

【实验研究】

# 靶向 G 蛋白偶联受体 91 的小发夹 RNA 慢病毒载体的构建及功能初步检测<sup>△</sup>

李婷婷 胡健艳 吴强

作者简介:李婷婷,女,1986 年 8 月出生,山东烟台人,硕士。联系电话:13818077871; E-mail: kaixindou-dou4872@163.com

About LI Ting-Ting, Female, born in August, 1986. Master degree. Tel: 13818077871; E-mail: kaixindou-dou4872@163.com

收稿日期:2014-02-15  
修回日期:2014-04-11  
本文编辑:付中静

<sup>△</sup>基金项目:国家自然科学基金(编号:81070738),上海市自然科学基金(编号:11JC1407702)

作者单位:215021 江苏省苏州市,苏州大学医学部(李婷婷);200233 上海市,上海交通大学附属第六人民医院眼科(胡健艳,吴强)

通讯作者:吴强, E-mail: wyan559@hotmail.com

Received date: Feb 15, 2014  
Accepted date: Apr 11, 2014

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No: 81070738); Key Basic Science Foundation of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (No: 11JC1407702)

From the Medical College of Soochow University (LI Ting-Ting), Suzhou 215021, Jiangsu Province, China; Department of Ophthalmology, the Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University (HU Jian-Yan, WU Qiang), Shanghai 200233, China

Responsible author: WU Qiang, E-mail: wyan559@hotmail.com

[Rec Adv Ophthalmol, 2014, 34(8):705-709]

## Construction and identification of shRNA lentiviral vector of G protein-coupled receptor 91

LI Ting-Ting, HU Jian-Yan, WU Qiang

【Key words】 small hairpin RNA; lentivirus; G protein-coupled receptor 91; diabetic retinopathy; vascular endothelial growth factor

【Abstract】 **Objective** To construct a lentiviral vector of small hairpin RNA (shRNA) of rat G protein-coupled receptor 91 gene (GPR91), and explore the regulative effects of GPR91 on the vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion induced by high glucose. **Methods** Four special single strand oligonucleotide were selected according to rat GPR91 mRNA sequence, and double strand DNA containing the target sequence was chemically synthesized, annealed, and inserted into the lentivirus expression vector pGCSIL-GFP by double digestion with Age I and EcoR I. After being identified by polymerase chain reaction and sequencing, these plasmids were cotransfected into 293T cells to package lentiviral particles. The titer of virus was tested. The lentiviral vector particles were transduced into RGC-5 cells. Western blot was used to assess the gene silencing efficacy of these recombinants. High glucose (45 mmol · L<sup>-1</sup>)-mediated VEGF expression was determined by ELISA in RGC-5 cells transduced with or without lentiviral vector. **Results** PCR and sequencing confirmed that lentiviral vectors had the correct structure and could express high titer of virus: 1.5 × 10<sup>9</sup> TU · mL<sup>-1</sup>, 1.5 × 10<sup>9</sup> TU · mL<sup>-1</sup>, 3.0 × 10<sup>9</sup> TU · mL<sup>-1</sup>, 3.0 × 10<sup>9</sup> TU · mL<sup>-1</sup>. After being transduced into RGC-5 cells, the expression of GPR91 had no obvious statistical difference between control group (0.62 ± 0.07) and blank vector control group (0.60 ± 0.08) (F = 49.03, P > 0.05). GPR91 expression was knocked down significantly by all of these lentiviral vectors (0.48 ± 0.05, 0.34 ± 0.06, 0.30 ± 0.04, 0.11 ± 0.06) at protein levels compared to the control group, the difference was statistically significant (F = 49.03, P < 0.01), and the pGCSIL-GFP-shGPR91-3 had the most efficient interference (F = 49.03, P < 0.01). ELISA showed the VEGF secretion of control group, high glucose group, high glucose + NC group and high glucose + pGCSIL-GFP-shGPR91-3 were (25.63 ± 4.52) pg · mL<sup>-1</sup>, (72.74 ± 8.24) pg · mL<sup>-1</sup>, (71.68 ± 8.31) pg · mL<sup>-1</sup> and (46.77 ± 6.21) pg · mL<sup>-1</sup>, respectively, the high glucose-induced VEGF expression was significant down-regulated after silencing GPR91 gene, the difference was statistically significant (F = 30.852, P < 0.01). **Conclusion** The lentivirus shRNA vector of GPR91 is constructed successfully. The lentivirus shRNA vector of GPR91 can decrease high glucose-induced VEGF expression in RGC-5 cells, which provides basement for assessing diabetic retinopathy mechanism and animal gene treatment via GPR91 gene.

【关键词】 小发夹 RNA; 慢病毒属; G 蛋白偶联受体 91; 糖尿病性视网膜病变; 血管内皮生长因子

【摘要】 **目的** 构建靶向大鼠 G 蛋白偶联受体 91 (G protein-coupled receptor 91, GPR91) 基因的小发夹 RNA (small hairpin RNA, shRNA) 慢病毒载体, 探讨 GPR91 受体对高糖诱导下血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 释放的调节作用。 **方法** 设计合成 4 针对大鼠 GPR91 (NM\_001001518) 的特异性单链寡核苷酸链, 两端分别引入 Age I 和 EcoR I 酶切位点, 退火后得到小片段带黏性末端的双链 DNA, 克隆入慢病毒载体 pGCSIL-GFP, 行聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 和 DNA 测序鉴定重组体。将各慢病毒 shRNA 干扰载体和辅助包装载体共转染 293T 细胞, 收集病毒颗粒并行浓缩滴度检测。将各慢病毒载体转染 RGC-5 细胞后, Western blot 法筛选有效的慢病毒 shRNA 干扰载体。使用 45 mmol · L<sup>-1</sup> 的高糖刺激 RGC-5 细胞 24 h, 用 ELISA 法观察干扰 GPR91 后 VEGF 的表达情况。 **结果** PCR 及 DNA 测序结果均显示慢病毒载体 pGCSIL-

GFP-shGPR91 构建正确;包装病毒颗粒后,pGCSIL-GFP-shGPR91-1、2、3、4 组病毒浓缩液的滴度依次为  $1.5 \times 10^9$  TU · mL<sup>-1</sup>、 $1.5 \times 10^9$  TU · mL<sup>-1</sup>、 $3.0 \times 10^9$  TU · mL<sup>-1</sup>、 $3.0 \times 10^9$  TU · mL<sup>-1</sup>。将慢病毒颗粒感染 RGC-5 细胞后,Western blot 检测显示 NC 组 GPR91 蛋白( $0.60 \pm 0.08$ )空白组( $0.62 \pm 0.07$ )的表达无明显差异( $F=49.03, P>0.05$ )。而与空白组相比,4 个慢病毒载体组( $0.48 \pm 0.05$ 、 $0.34 \pm 0.06$ 、 $0.30 \pm 0.04$  和  $0.11 \pm 0.06$ )均能不同程度沉默 GPR91 的表达,差异有统计学意义( $F=49.03, P<0.01$ ),其中 pGCSIL-GFP-shGPR91-3 干扰效率最高。ELISA 结果显示空白组、高糖组、高糖+NC 组、高糖+pGCSIL-GFP-shGPR91-3 组 VEGF 蛋白表达分别为( $25.63 \pm 4.52$ )pg · mL<sup>-1</sup>、( $72.74 \pm 8.24$ )pg · mL<sup>-1</sup>、( $71.68 \pm 8.31$ )pg · mL<sup>-1</sup> 和 ( $46.77 \pm 6.21$ )pg · mL<sup>-1</sup>,表明 GPR91 病毒干扰载体可显著降低高糖引起的 VEGF 分泌,差异有统计学意义( $F=30.852, P<0.01$ )。结论 本实验成功构建了靶向大鼠 GPR91 的 shRNA 慢病毒载体并进行病毒颗粒包装。所构建的慢病毒载体能够降低高糖作用下的 VEGF 表达,为进一步研究 GPR91 基因在糖尿病视网膜病变中的作用机制和动物基因治疗奠定基础。

[眼科新进展,2014,34(8):705-709]

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)的发生主要是由于长期高糖作用下引起视网膜缺血、缺氧,进一步诱导形成新生血管,最终导致视力严重下降甚至丧失。其中,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)被认为是 DR 形成和发展中关系最为密切的一类促血管生长因子<sup>[1-2]</sup>。近期研究发现,缺氧条件下视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)中 G 蛋白偶联受体 91(G protein-coupled receptor 91, GPR91)基因的激活可引起 VEGF 的表达增加并诱导视网膜新生血管的形成<sup>[3]</sup>。GPR91 是琥珀酸的特异性受体,可参与细胞的信号传递,对维持细胞稳态环境具有不可替代的作用。本研究尝试使用 RNA 干扰机制并借助病毒载体技术将 RGC-5 细胞上的 GPR91 基因沉默,以减少琥珀酸的特异性结合,阻断琥珀酸的作用路径从而降低对下游 VEGF 的影响,为 GPR91 的后续基因治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 RGC-5 细胞购自美国 ATCC,293T 细胞购自中国科学院上海细胞所,DMEM 培养液、体积分数 10% 胎牛血清、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)购自美国 Hyclone 公司,大肠杆菌 DH-5α、脂质体 Lipofectamine™2000 购自美国 Invitrogen

Table 1 Nucleotide sequences of primers

DNA oligo	5'	STEMP	Loop	STEMP	3'
1 forward	Ccgg	aaCCTTTCCATCTCTGACCTT	CTCGAG	AAGGTCAGAGATGGAAGGtt	TTTTTg
reverse	aattcaaaaa	aaCCTTTCCATCTCTGACCTT	CTCGAG	AAGGTCAGAGATGGAAGGtt	
2 forward	Ccgg	gaCCTTAGAAGTTCTACCTAT	CTCGAG	ATAGGTAGAACTTCTAAGGtc	TTTTTg
reverse	aattcaaaaa	gaCCTTAGAAGTTCTACCTAT	CTCGAG	ATAGGTAGAACTTCTAAGGtc	
3 forward	Ccgg	aaCCCTAAATACAGTCTCATT	CTCGAG	AATGAGACTGTATTTAGGGtt	TTTTTg
reverse	aattcaaaaa	aaCCCTAAATACAGTCTCATT	CTCGAG	AATGAGACTGTATTTAGGGtt	
4 forward	Ccgg	taGCATAGACCGATATCTGCT	CTCGAG	AGCAGATATCGGTCTATGc	TTTTTg
reverse	aattcaaaaa	taGCATAGACCGATATCTGCT	CTCGAG	AGCAGATATCGGTCTATGc	

1.3 RNAi 慢病毒包装及滴度测定 取对数生长期 293T 细胞,按照每孔  $1.2 \times 10^6$  个细胞接种于 6 孔板中。转染前 2 h 将细胞培养基换成无血清培养基,待细胞密度达 (60 ~ 70)% 时用 Lipofectamine™2000 共转染 pGCSIL-GFP 载体和两种辅助包装原件载体质粒 pHelper1.0 载体、Helper2.0 载体。转染后 48 h 在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白(green florescence protein, GFP)的表达,收集细胞上清液,进行慢病毒

公司,Real-time PCR 试剂盒购自日本 Takara 公司,pGCSIL-GFP 载体、Helper1.0 载体、Helper2.0 购自上海吉凯基因化学技术有限公司, AgeI、EcoRI、T4 DNA ligase 缓冲液购自美国 New England Biolabs (NEB)公司,质粒抽提试剂盒购自德国 Qiagen 公司,GPR91 抗体购自美国 Novus Biologicals 公司,GAPDH 抗体购自北京康为世纪生物科技有限公司,二抗购自美国 ProteinTech Group 公司。

1.2 构建表达 shRNA 慢病毒载体 针对大鼠 GPR91 基因 mRNA 序列(NM\_001001518),使用 Ambion 公司的设计软件,设计、合成 4 对含干扰序列的双链 DNA oligo(表 1)。合成的 shRNA-oligo DNA 两端分别用 AgeI、EcoRI 双酶切连接入 pGCSIL-GFP 载体。将连接好的产物转入 DH-5α 感受态细胞,37 ℃ 过夜培养。每组克隆从菌板上挑 3 个单菌落,37℃ 过夜培养,提取质粒 DNA。采用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)进行阳性克隆鉴定,设计引物:正义链:5'-CTATTTCCCATGATTCCTTCATA-3';反义链:5'-GTAATACGGTTATCCACGCG-3'。阳性克隆 PCR 初步鉴定,连接入 vshRNA 片段的阳性克隆 PCR 片段大小为 343 bp;没有连接入 vshRNA 片段的空载体克隆 PCR 片段大小为 306 bp。挑选阳性克隆菌液送测序,对测序正确的重组质粒进行菌体扩增。

滴度测定。

采用逐孔稀释滴度测定法。测定前 1 d,对 293T 细胞进行传代,96 孔板每孔加入约  $40 \times 10^3$  个细胞。病毒原液用无血清培养基按 1 : 10 稀释,选取所需的细胞孔,弃 90 μL 培养基,加入 90 μL 稀释好的病毒溶液于 37 ℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。24 h 后,加入完全培养基 100 μL。4 d 后观察荧光表达情况。荧光细胞数随稀释倍数的增加而减少。换算

公式为:滴度( $\text{TU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) = 观察到带有荧光的细胞个数/病毒原液量。

**1.4 RNAi 慢病毒感染 RGC-5 细胞及 GPR91 基因表达的鉴定** RGC-5 细胞置于  $37^\circ\text{C}$ 、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养,按  $150 \times 10^3$  个细胞种于 6 孔板内。当 RGC-5 细胞汇合至 50% 以上时,按最佳感染复数(multiplicity of infection, MOI)值为 20 分别加入适量携带有 pGCSIL-GFP-shGPR91-1、pGCSIL-GFP-shGPR91-2、pGCSIL-GFP-shGPR91-3、pGCSIL-GFP-shGPR91-4 或空白对照载体的慢病毒进行转染,共分为 6 组:空白组(未转染病毒载体)、pGCSIL-GFP-shGPR91-1 组、pGCSIL-GFP-shGPR91-2 组、pGCSIL-GFP-shGPR91-3 组、pGCSIL-GFP-shGPR91-4 组和 NC 组(转染空白对照载体),培养 9 h 后更换培养液。感染 2 d 后观察荧光表达情况,确定感染率。感染 3 d 后收集蛋白,用 Western blot 法观察 GPR91 在蛋白水平的表达情况。相应的蛋白灰度值使用 Gel-Pro analyzer 软件进行分析。

**1.5 ELISA 测定 VEGF 蛋白含量** 将未转病毒载体的 RGC-5 细胞和转染空白对照载体及转染 pGCSIL-GFP-shGPR91-3 慢病毒的 RGC-5 细胞分别按  $200 \times 10^3$  个细胞种于 6 孔板内,置于  $37^\circ\text{C}$ 、体积分数 5% 的  $\text{CO}_2$  培养箱中用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养。培养 1 d 后分别加  $45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葡萄糖进行刺激,共分为 4 组:空白组、高糖组、高糖 + NC 组和高糖 + pGCSIL-GFP-shGPR91-3 组。其中,空白组细胞不作任何处理。于 24 h 后收集细胞上清,离心后弃沉淀,按照 VEGF 试剂盒说明书进行 VEGF 蛋白含量测定。

**1.6 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 统计学软件进行统计分析,数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多样本均数比较采用单因素方差分析,其中均数间两两比较采用 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 GPR91 shRNA 慢病毒载体阳性克隆鉴定

GPR91 基因 shRNA 的寡核苷酸序列,经退火形成双链 DNA,与经 AgeI 和 EcoRI 双酶切后的载体 pGCSIL-GFP 连接,连接产物转化 DH-5 $\alpha$  大肠杆菌,挑取重组阳性克隆,行 PCR 鉴定阳性克隆。重组细菌克隆的 PCR 产物以经双酶切后没有连接干涉片段空载体作为阴性对照(图 1),清晰可见连接入 vshRNA 片段的阳性克隆 PCR 片段,大小为 343 bp;没有连接 vshRNA 片段的空载体克隆 PCR 片段大小为 306 bp。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成功构建。

**2.2 GPR91 shRNA 慢病毒载体的包装及滴度测定** 将各重组质粒与 pHelper1.0 载体、Helper2.0 载体

共转染 293T 细胞后,各孔中 GFP 的表达情况见图 2。根据荧光显微镜下观察带有荧光的细胞数,检测各重组慢病毒的滴度:pGCSIL-GFP-shGPR91-1 组、pGCSIL-GFP-shGPR91-2 组均为  $1.5 \times 10^9 \text{ TU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;pGCSIL-GFP-shGPR91-3 组、pGCSIL-GFP-shGPR91-4 组均为  $3.0 \times 10^9 \text{ TU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,说明有大量质粒转入细胞,病毒成功包装。

**Figure 1** PCR identification of recombinant plasmid (For example: pGCSIL-GFP-shGPR91-1). 1: Negative control (ddH<sub>2</sub>O); 2: Blank vector control; 3: Marker; 4-8: pGCSIL-GFP-shGPR91-1, 2, 3, 4, 5 segment 重组质粒 PCR 鉴定图(以 pGCSIL-GFP-shGPR91-1 为例)。1:阴性对照(双蒸水);2:空载体对照;3:标志;4~8:pGCSIL-GFP-shGPR91-1, 2, 3, 4, 5 片段

**2.3 RGC-5 细胞感染病毒后的荧光观察** 将病毒原液按 MOI = 20 感染 RGC-5 细胞后 48 h 观察发现,荧光表达趋于稳定,荧光显微镜观察并计数,各组病毒感染效率都  $> 80\%$  (图 3)。

### 2.4 感染 RGC-5 细胞后的 GPR91 基因表达效果

选择管家基因 GAPDH 作为校准基因,空白组作为阴性对照,RGC-5 细胞 GPR91/GAPDH 含量值定为 1,所有样本重复 3 次,计算其他各病毒转染组的 GPR91/GAPDH 比值。空白组、NC 组、pGCSIL-GFP-shGPR91-1 组、pGCSIL-GFP-shGPR91-2 组、pGCSIL-GFP-shGPR91-3 组和 pGCSIL-GFP-shGPR91-4 组中 GPR91 mRNA 表达分别为  $0.62 \pm 0.07$ 、 $0.60 \pm 0.08$ 、 $0.48 \pm 0.05$ 、 $0.34 \pm 0.06$ 、 $0.30 \pm 0.04$  和  $0.11 \pm 0.06$ 。空白组和 NC 组中 GPR91 的表达差异无统计学意义( $F = 49.03$ ,  $P > 0.05$ )。与 NC 组比较,pGCSIL-GFP-shGPR91-1 组、pGCSIL-GFP-shGPR91-2 组、pGCSIL-GFP-shGPR91-3 组和 pGCSIL-GFP-shGPR91-4 组中 GPR91 相对含量均有降低,差异有统计学意义( $F = 49.03$ ,  $P < 0.01$ );其中,pGCSIL-GFP-shGPR91-3 组的敲出效果最为显著。

### 2.5 ELISA 检测 RGC-5 细胞上清中 VEGF 蛋白的表达水平

高糖刺激 24 h 后,空白组、高糖组、高糖 + NC 组、高糖 + pGCSIL-GFP-shGPR91-3 组 VEGF 蛋白表达分别为  $(25.63 \pm 4.52) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $(72.74 \pm 8.24) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $(71.68 \pm 8.31) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $(46.77 \pm 6.21) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。高糖组 VEGF 蛋白表达较空白组明显上升,差异有统计学意义( $F = 30.852$ ,  $P < 0.01$ )。与高糖 + NC 组比较,高糖 + GC-SIL-GFP-shGPR91-3 组 VEGF 蛋白表达明显降低,差异有统计学意义( $F = 30.852$ ,  $P < 0.01$ )。由此可说明 GPR91 基因参与了高糖导致的 VEGF 分泌过程。

**Figure 2** Cytopathic effect of 293T cell after transfection ( $\times 100$ ). A, C, E, G, I, K; Visible light field; B, D, F, H, J, L; Green fluorescence field. A, B; Blank group; C, D; NC group; E, F; pGCSIL-GFP-shGPR91-1 group; G, H; pGCSIL-GFP-shGPR91-2 group; I, J; pGCSIL-GFP-shGPR91-3 group; K, L; pGCSIL-GFP-shGPR91-4 group 转染 293T 细胞后, 细胞内荧光表达情况 ( $\times 100$ )。A、C、E、G、I、K; 可见光视野; B、D、F、H、J、L: 绿色荧光视野。A、B: 空白组; C、D: NC 组; E、F: pGCSIL-GFP-shGPR91-1 组; G、H: pGCSIL-GFP-shGPR91-2 组; I、J: pGCSIL-GFP-shGPR91-3 组; K、L: pGCSIL-GFP-shGPR91-4 组

**Figure 3** Cytopathic effect of RGC-5 cell after transfection ( $\times 100$ ). A, C, E, G, I, K; Visible light field; B, D, F, H, J, L; Green fluorescence field. A, B; Blank group; C, D; NC group; E, F; pGCSIL-GFP-shGPR91-1 group; G, H; pGCSIL-GFP-shGPR91-2 group; I, J; pGCSIL-GFP-shGPR91-3 group; K, L; pGCSIL-GFP-shGPR91-4 group 转染 RGC-5 细胞后, 细胞内荧光表达情况 ( $\times 100$ )。A、C、E、G、I、K; 可见光视野; B、D、F、H、J、L: 绿色荧光视野。A、B: 空白组; C、D: NC 组; E、F: pGCSIL-GFP-shGPR91-1 组; G、H: pGCSIL-GFP-shGPR91-2 组; I、J: pGCSIL-GFP-shGPR91-3 组; K、L: pGCSIL-GFP-shGPR91-4 组

### 3 讨论

大量研究表明 VEGF 在 DR 发生发展过程中发挥着重要的作用<sup>[1-2]</sup>, 其表达的增加与血管渗漏及病理性新生血管的形成密切相关<sup>[4]</sup>。本研究利用高糖刺激 RGC-5 细胞体外模拟 DR 的高糖环境观察到高糖刺激下 RGC-5 细胞分泌的 VEGF 明显增加, 该结果与早先的报道一致<sup>[5]</sup>, 说明 DR 中高糖环境是引起 VEGF 分泌并导致病理损害的重要影响因素。近期的研究发现 GPR91 受体与缺氧状态下视网膜中 VEGF 的分泌增加密切相关。据此我们推测 GPR91 可能在 DR 引起的血管功能紊乱中也发挥重要调节作用。

GPR91 受体又称作琥珀酸受体 1, 能特异性结合柠檬酸循环的中间代谢产物琥珀酸。GPR91 主要表达在血供丰富的组织如肝、肾、脾、视网膜和胎盘, 提示其可能具有调节血管生长以适应组织代谢需要的重要作用<sup>[6]</sup>。有研究发现增生型 DR 患者的玻璃体内 GPR91 的特异性配体——琥珀酸的含量显著增加, 提示高糖环境引起的琥珀酸异常蓄积可能通过结合更多的 GPR91 受体参与 DR 的调控过程<sup>[7]</sup>。本实验中我们观察到 RGC-5 细胞中也存在 GPR91 受体的表达, 同时我们利用 RNAi 技术构建了靶向大鼠 GPR91 基因的慢病毒载体, 以减少琥珀酸的特异性结合, 阻断琥珀酸与 GPR91 基因的作用路径。本

实验中我们观察到转染 pGCSIL-GFP-shGPR91 慢病毒载体的 RGC-5 细胞中 GPR91 可明显低于空白组, 说明 RNAi 技术可高效沉默 GPR91 的表达。同时, 我们的研究还发现高糖刺激 24 h 后的 RGC-5 细胞中 VEGF 的表达可随 GPR91 表达的下降明显下调, 而转染空载体的细胞内 VEGF 的表达未见明显改变, 说明 GPR91 通过调控 VEGF 的分泌在 DR 的血管病变过程中发挥着重要作用, 与 Sapieha 等<sup>[3]</sup>的研究结果相似。目前, GPR91 在 DR 中的研究仍缺乏相关报道, Vargas 等<sup>[8]</sup>的研究中发现 GPR91 与糖尿病肾病的病理过程密切相关。由此可见, GPR91 在糖尿病病的病理改变中发挥着重要调控作用。

RNAi 技术是一个特异性 RNA 序列降解的过程, 与靶基因同源的双链 RNA (dsRNA) 合成小分子干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA), 再进一步诱导细胞同源基因 mRNA 降解, 从而特异性抑制靶基因表达<sup>[9-10]</sup>。目前, 以病毒载体为目的基因的转移工具已被广泛应用于基因功能的研究, 主要包括逆转录病毒、腺病毒及慢病毒等<sup>[11]</sup>。其中, 慢病毒载体来源于人类免疫缺陷病毒 I 型, 不仅能感染分裂期细胞, 还可高效率感染非分裂期的细胞<sup>[12]</sup>。与逆转录病毒和腺病毒相比, 慢病毒本身对宿主几乎不产生免疫原性, 具有更高的安全性, 同时慢病毒载体通过整合入靶细胞基因组的目的基因上来实现长期稳定且高效的转录后沉默作用<sup>[13]</sup>。为排除干扰

片段本身存在的效率差异,设计了4组序列来对GPR91进行干扰,在转染RGC-5细胞后观察到pGC-SIL-GFP-shGPR91-3的干扰效率最为明显,可显著降低细胞内GPR91基因的表达。本研究中转染慢病毒载体的细胞未出现生长状态和生长速度的异常改变,由此可见,慢病毒载体作为一种高效、稳定的基因转移工具有着较高的可靠性和安全性。

本研究成功构建了携带GPR91基因shRNA的慢病毒载体,并能有效下调RGC-5细胞中GPR91的表达,显著降低高糖导致的VEGF分泌,有助于研究GPR91在DR引起的血管损伤中的作用,也为进一步研究GPR91基因在DR中的作用机制和动物基因治疗奠定基础。GPR91基因的发现为今后DR的病理研究和诊断治疗提供了新的研究方向。同时,针对GPR91基因的靶向治疗也将可能成为有效预防和控制DR的重要路径之一。

参考文献

1 Ozturk BT, Bozkurt B, Kerimoglu H, Okka M, Kamis U, Gunduz K. Effect of serum cytokines and VEGF levels on diabetic retinopathy and macular thickness [J]. *Mol Vis*, 2009, 15: 1906-1914.

2 Wang X, Wang G, Wang Y. Intravitreal vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1a in patients with proliferative diabetic retinopathy [J]. *Am J Ophthalmol*, 2009, 148(6):883-889.

3 Sapieha P, Sirinyan M, Hamel D, Zaniolo K, Joyal JS, Cho JH, et al. The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis [J]. *Nat Med*, 2008, 14(10):1067-1076.

4 Witmer AN, Blaauwgeers HG, Weich HA, Alitalo K, Vrensen GF,

Schlingemann RO. Altered expression patterns of VEGF receptors in human diabetic retina and in experimental VEGF-induced retinopathy in monkey [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43(3):849-857.

5 Lee JJ, Hsiao CC, Yang IH, Chou MH, Wu CL, Wei YC, et al. High-mobility group box 1 protein is implicated in advanced glycation end products-induced vascular endothelial growth factor A production in the rat retinal ganglion cell line RGC-5 [J]. *Mol Vis*, 2012, 18:838-850.

6 He W, Miao FJ, Lin DC, Schwandner RT, Wang Z, Gao J, et al. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors [J]. *Nature*, 2004, 429(6988):188-193.

7 Matsumoto M, Suzuma K, Maki T, Kinoshita H, Tsuike E, Fujikawa A, et al. Succinate increases in the vitreous fluid of patients with active proliferative diabetic retinopathy [J]. *Am J Ophthalmol*, 2012, 153(5):896-902.

8 Vargas SL, Toma I, Kang JJ, Meer EJ, Peti-Peterdi J. Activation of the succinate receptor GPR91 in macula densa cells causes renin release [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(5):1002-1011.

9 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669):806-811.

10 Abbas-Terki T, Blanco-Bose W, Déglon N, Pralong W, Aebischer P. Lentiviral-mediated RNA interference [J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13(18):2197-2201.

11 Manjunath N, Wu H, Subramanya S, Shankar P. Lentiviral delivery of short hairpin RNAs [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(9):732-745.

12 Nishitsuji H, Ikeda T, Miyoshi H, Ohashi T, Kannagi M, Masuda T. Expression of small hairpin RNA by lentivirus-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary non-dividing cells [J]. *Microbes Infect*, 2004, 6(1):76-85.

13 Robinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, et al. A lentivirus-base system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference [J]. *Nat Genet*, 2003, 33(3):401-406.



(上接第704页)

10 Evangelou A, Letarte M, Marks A, Theodore J, Brown TJ. Androgen modulation of adhesion and antiadhesion molecules in PC-3 prostate cancer cells expressing androgen receptor [J]. *Endocrinology*, 2002, 143(10):3897-3904.

11 Ashutosh S. Energetics of corneal epithelial cell-ocular mucous-tear film interactions; some surface-chemical pathways of corneal defense [J]. *Biophys Chem*, 1993, 47(1):87-99.

12 Van Horn DL, Schutten WH, Hyndiuk RA, Kurz P. Xerophthalmia in vitamin A-deficient rabbits. Clinical and ultrastructural alterations in the cornea [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1980, 19(9):1067-1079.

13 Kern TJ, Erb HN, Schaedler JM, Dougherty EP. Scanning electron microscopy of experimental keratoconjunctivitis sicca in dogs: cornea and bulbar conjunctiva [J]. *Vet Pathol*, 1988, 25(6):468-474.

14 Millar TJ, Tragoulias ST, Anderton PJ, Ball MS, Miano F, Dennis GR, et al. The surface activity of purified ocular mucin at the air-liquid interface and interactions with meibomian lipids [J]. *Cornea*, 2006, 25(1):91-100.

15 Mitchell S, Abel P, Madaan S, Jeffs J, Chaudhary K, Stamp G, et al. Androgen-dependent regulation of human MUC1 mucin expression [J]. *Neoplasia*, 2002, 4(1):9-18.