



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114958855 B

(45) 授权公告日 2024.03.29

(21) 申请号 202210715326.7

CN 107988228 A, 2018.05.04

(22) 申请日 2022.06.23

CN 108192925 A, 2018.06.22

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 113230393 A, 2021.08.10

申请公布号 CN 114958855 A

US 2017233744 A1, 2017.08.17

(43) 申请公布日 2022.08.30

ZHIPING LIU等. Deletion of sirtuin 6 accelerates endothelial dysfunction and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.《hijklmjmpkjmqrjrjst》.2016,第172卷材料与方法第1段.

(73) 专利权人 复旦大学附属中山医院

地址 200032 上海市徐汇区医学院路136号

Rong Liu等. Oxidative Stress Induces Endothelial Cell Senescence via Downregulation of Sirt6.《Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International》.2014,2.1节,讨论第1段.

(72) 发明人 李华 李鹏 郭振杨 葛均波

(74) 专利代理机构 上海申汇专利代理有限公司

31001

专利代理师 翁若莹

(51) Int. Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 15/66 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

ZHIPING LIU等. Deletion of sirtuin 6 accelerates endothelial dysfunction and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.《hijklmjmpkjmqrjrjst》.2016,第172卷材料与方法第1段.

审查员 李杏

(56) 对比文件

CN 102712925 A, 2012.10.03

权利要求书2页 说明书8页

序列表3页 附图3页

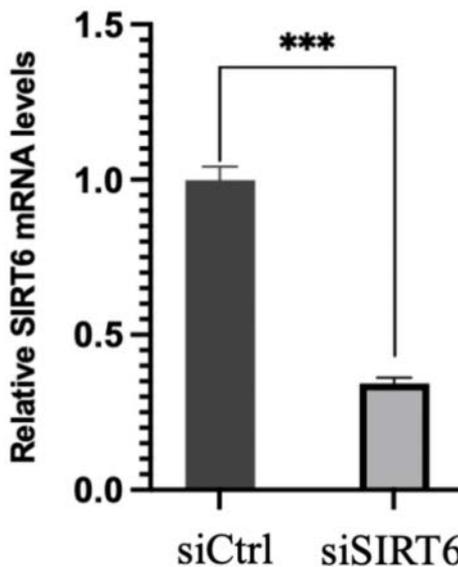
(54) 发明名称

一种促内皮细胞凋亡的siRNA及SIRT6低表达细胞系

(57) 摘要

本发明公开了一种促内皮细胞凋亡的siRNA及SIRT6低表达细胞系。本发明利用RNA干扰(RNAi)技术获得了SIRT6敲低的siRNA和shRNA, siRNA的序列SEQ ID NO:1-2所示, shRNA的序列如SEQ ID NO:5-6所示, SIRT6敲低后能够显著促进氧化应激诱导的内皮细胞凋亡。此外, 本发明构建了SIRT6低表达的微血管内皮细胞模型, 可用于研究SIRT6在内皮间凋亡发生发展中的作用, 这有助于揭示内皮凋亡发生发展的机制, 为治疗由内皮凋亡所致的心血管疾病提供有用的线索。本发明具有重要的应用价值。

CN 114958855 B



1. 一种能够抑制SIRT6表达的物质的应用,其特征在于,所述能够抑制SIRT6表达的物质为:

siRNA,所述siRNA为SEQ ID NO: 1所示的正义链和SEQ ID NO: 2所示的反义链;

或以所述siRNA为靶点,由shRNA表达系统合成的shRNA,所述的shRNA为SEQ ID NO:5所示的正义链和 SEQ ID NO:6所示的反义链;

所述应用选自下列A1) -A6)中的任意一项:

A1): 制备用于促进氧化应激条件下微血管内皮细胞凋亡的产品;

A2): 制备用于构建SIRT6低表达的微血管内皮细胞模型的产品;

A3): 制备用于构建SIRT6低表达于微血管内皮细胞的动物模型的产品;

A4): 体外促进氧化应激条件下微血管内皮细胞发生凋亡;

A5): 构建SIRT6低表达的微血管内皮细胞模型;

A6): 构建SIRT6低表达于微血管内皮细胞的动物模型。

2. 一种表达载体的应用,其特征在于,所述的表达载体包含如SEQ ID NO:1-2或 SEQ ID NO:5-6所示的目的序列;

所述应用选自下列B1) -B6)中的任意一项:

B1): 制备用于促进氧化应激条件下微血管内皮细胞凋亡的产品;

B2): 制备用于构建SIRT6低表达的微血管内皮细胞模型的产品;

B3): 制备用于构建SIRT6低表达于微血管内皮细胞的动物模型的产品;

B4): 体外促进氧化应激条件下微血管内皮细胞凋亡;

B5): 构建SIRT6低表达的微血管内皮细胞模型;

B6): 构建SIRT6低表达于微血管内皮细胞的动物模型。

3. 如权利要求2所述的应用,其特征在于,所述表达载体选自病毒、真菌或细菌表达载体。

4. 如权利要求2所述的应用,其特征在于,所述表达载体的制备方法包括如下步骤:

步骤1:将SEQ ID NO:5所示的单链DNA分子和SEQ ID NO:6所示的单链DNA分子退火形成带粘性末端的DNA双链片段;

步骤2:限制性内切酶1和限制性内切酶2将慢病毒载体pHBLV-U6-MCS-PGK-PURO进行酶切,将步骤1所得的DNA双链片段通过T4连接酶连入载体,得到重组慢病毒载体。

5. 一种SIRT6低表达的微血管内皮细胞系的应用,其特征在于,所述细胞系包含一种表达载体,所述表达载体包含如SEQ ID NO:1-2或 SEQ ID NO:5-6所示的目的序列;

所述应用选自下列C1) -C4)中的任意一项:

C1): 制备用于促进氧化应激条件下微血管内皮细胞凋亡的产品;

C2): 制备用于构建SIRT6低表达于微血管内皮细胞的动物模型的产品;

C3): 体外促进氧化应激条件下微血管内皮细胞凋亡;

C4): 构建SIRT6低表达于微血管内皮细胞的动物模型。

6. 如权利要求5所述的应用,其特征在于,所述SIRT6低表达的微血管内皮细胞系的构建方法包括如下步骤:

步骤1:将权利要求4所述的制备方法制备所得的重组慢病毒载体联合病毒包装辅助质粒pSPAX2与pMD2G构成三质粒慢病毒系统进行病毒包装,进而转染293T细胞,获得病毒液;

步骤2:用步骤1获得的病毒液感染微血管内皮细胞系,筛选获得SIRT6低表达的微血管内皮细胞系。

## 一种促内皮细胞凋亡的siRNA及SIRT6低表达细胞系

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种促内皮细胞凋亡的siRNA及SIRT6低表达细胞系,属于医学分子生物学和基因工程技术领域。

### 背景技术

[0002] 近些年来,尽管对心血管疾病的治疗手段得到飞速发展,但其仍是高死亡率的疾病,因此亟需新的治疗手段和干预措施来治疗心血管疾病并改善预后。血管内皮细胞是血管最内层的细胞,能够调节体液、营养物质和代谢物的交换,对维持血管健康至关重要。近些年来,越来越多的证据表明,内皮功能障碍是导致动脉粥样硬化、心肌梗死、高血压、糖尿病等疾病的主要因素。因此,维持内皮细胞功能,保护血管内皮屏障,是预防和治疗心血管相关疾病的重要手段。

[0003] 内皮细胞凋亡,是维持细胞内稳态的一种程序化死亡,以应对外界刺激并完成新旧细胞的更替。内皮细胞的生理功能涉及促凋亡信号和抗凋亡信号之间的平衡,而这种平衡的扰动是内皮功能障碍的重要始动因素之一,表现为血管通透性增强,炎症细胞浸润以及内皮依赖性血管舒张障碍。因此,维持内皮细胞凋亡和抗凋亡之间的平衡是预防和治疗多种心血管疾病的潜在靶点。然后,目前临床上尚缺乏针对内皮细胞凋亡的有效干预靶点。阐明涉及心血管疾病的内皮细胞凋亡的调控分子和信号通路,对预防和治疗心血管疾病具有重要意义。

[0004] Sirtuin6 (SIRT6), sirtuin蛋白家族中重要成员之一,具有NAD<sup>+</sup>依赖的去乙酰化,单-ADP核糖基化以及去长链脂肪酰化的多种催化活性。作为一种长寿蛋白,SIRT6已被证明可以维持基因组稳定,糖/脂代谢稳态以及抑制炎症和氧化应激,在年龄相关性疾病中发挥有益作用。最近的研究表明,SIRT6参与了动脉粥样硬化、心力衰竭、心肌肥厚以及心肌缺血再灌注损伤等多种心血管疾病的发生发展。重要的是,SIRT6可以抑制内皮细胞的凋亡、炎症以及衰老,维持内皮细胞及血管功能。然而,SIRT6在抑制内皮凋亡的具体机制及相关器官损伤中的作用尚不清楚。此外,发现SIRT6调控内皮凋亡的新靶点并探索相关的分子信号通路仍然是关键的挑战。

[0005] 小干扰RNA (Small interfering RNA, siRNA) 可以通过识别互补特定的mRNA而诱导其发生降解,从而诱导特异性基因沉默,抑制靶基因的表达。siRNA可以特异性降低或关闭特定基因的表达,故已被广泛用于探索基因功能和传染性疾病及恶性肿瘤的基因治疗领域。将编码短发夹RNA (short hairpin RNA, shRNA) 基因的质粒、慢病毒、腺病毒转染或感染细胞,从而在细胞内生成siRNA,达到靶细胞的有效递送,持续抑制靶基因的表达。相较于其它载体,病毒shRNA载体可以直接高效率感染细胞进行基因沉默的研究,转染效果稳定,可获得长期稳定的RNA干扰效应。

### 发明内容

[0006] 本发明旨在利用一种siRNA实现SIRT6低表达,从而促进内皮细胞在氧化应激条件

下发生凋亡,并构建稳定的SIRT6低表达的微血管内皮细胞系。

[0007] 为了实现上述目的,本发明提供了一种能够抑制SIRT6表达的物质,包括:

[0008] siRNA,所述siRNA包括SEQ ID NO:1所示的正义链和SEQ ID NO:2所示的反义链;

[0009] 或以所述siRNA为靶点,由shRNA表达系统合成的shRNA,所述的shRNA包括SEQ ID NO:5所示的正义链和SEQ ID NO:6所示的反义链。

[0010] 本发明还提供了一种表达载体,所述的表达载体包含如SEQ ID NO:1-2或SEQ ID NO:5-6所示的目的序列。

[0011] 优选地,该表达载体选自病毒、真菌或细菌表达载体。

[0012] 本发明还提供了一种包含上述的表达载体的细胞,所述细胞为人微血管内皮细胞HMEC-1。

[0013] 本发明还提供了一种重组慢病毒表达载体的制备方法,包括如下步骤:

[0014] 步骤1:将SEQ ID NO:5所示的单链DNA分子和SEQ ID NO:6所示的单链DNA分子退火形成带粘性末端的DNA双链片段;

[0015] 步骤2:限制性内切酶1和限制性内切酶2将慢病毒载体pHBLV-U6-MCS-PGK-PURO进行酶切,将步骤1所得的DNA双链片段通过T4连接酶连入载体,得到重组慢病毒载体。

[0016] 本发明还提供了一种SIRT6低表达的微血管内皮细胞系的构建方法,包括如下步骤:

[0017] 步骤1:将上述的制备方法制备所得的重组慢病毒载体联合病毒包装辅助质粒pSPAX2与pMD2G构成三质粒慢病毒系统进行病毒包装,进而转染293T细胞,获得病毒液;

[0018] 步骤2:用步骤1获得的病毒液感染微血管内皮细胞系,筛选获得SIRT6低表达的微血管内皮细胞系。

[0019] 本发明还提供了上述的能够抑制SIRT6表达的物质在下列A1)-A6)中的任意一项中的应用:

[0020] A1):制备用于促进氧化应激条件下微血管内皮细胞凋亡的产品;

[0021] A2):制备用于构建SIRT6低表达的微血管内皮细胞模型的产品;

[0022] A3):制备用于构建SIRT6低表达的动物模型的产品;

[0023] A4):体外促进氧化应激条件下微血管内皮细胞发生凋亡;

[0024] A5):构建SIRT6低表达的微血管内皮细胞模型;

[0025] A6):构建SIRT6低表达的动物模型。

[0026] 本发明还提供了上述的表达载体,上述的制备方法制备所得的重组慢病毒表达载体在下列B1)B6)中的任意一项中的应用:

[0027] B1):制备用于促进氧化应激条件下微血管内皮细胞凋亡的产品;

[0028] B2):制备用于构建SIRT6低表达的微血管内皮细胞模型的产品;

[0029] B3):制备用于构建SIRT6低表达的动物模型的产品;

[0030] B4):体外促进氧化应激条件下微血管内皮细胞凋亡;

[0031] B5):构建SIRT6低表达的微血管内皮细胞模型;

[0032] B6):构建SIRT6低表达的动物模型。

[0033] 本发明还提供了上述的细胞在下列C1)C4)中的任意一项中的应用:

[0034] C1):制备用于促进氧化应激条件下微血管内皮细胞凋亡的产品;

- [0035] C2):制备用于构建SIRT6低表达的动物模型的产品;
- [0036] C3):体外促进氧化应激条件下微血管内皮细胞凋亡;
- [0037] C4):构建SIRT6低表达的动物模型。
- [0038] 本发明还提供了上述的构建方法构建的SIRT6低表达的微血管内皮细胞系在下列D1)D4)中的任意一项中的应用:
- [0039] D1):制备用于促进氧化应激条件下微血管内皮细胞凋亡的产品;
- [0040] D2):制备用于构建SIRT6低表达的动物模型的产品;
- [0041] D3):体外促进氧化应激条件下微血管内皮细胞凋亡;
- [0042] D4):构建SIRT6低表达的动物模型。
- [0043] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于:
- [0044] 本发明应用RNAi技术将SIRT6基因敲低,发现能够促进HMEC-1在氧化应激条件下的内皮细胞凋亡;本发明利用重组慢病毒载体构建的SIRT6低表达的微血管内皮细胞模型,可用于研究SIRT6在内皮间凋亡发生发展中的作用,这有助于揭示内皮凋亡发生发展的机制,为治疗由内皮凋亡所致的心血管疾病提供有用的线索;因此,本发明具有重要的应用价值。

#### 附图说明

- [0045] 图1为RT-qPCR鉴定SIRT6 siRNA对SIRT6基因的干扰效果;
- [0046] 图2为RTqPCR鉴定SIRT6 shRNA对SIRT6基因的干扰效果;
- [0047] 图3为Western blot鉴定SIRT6 shRNA对SIRT6蛋白的抑制效果;
- [0048] 图4为RT-qPCR鉴定在氧化应激下SIRT6 shRNA对HMEC-1凋亡标记物的基因表达情况;
- [0049] 图5为Western blot鉴定SIRT6 shRNA干扰的HMEC-1在发生氧化应激时内皮凋亡的生物标记物的蛋白表达情况;
- [0050] 以上各图中,\*\*\*表示经过统计学分析,两组间具有显著性差异, $P<0.001$ 。

#### 具体实施方式

- [0051] 为使本发明更明显易懂,兹以优选实施例,并配合附图作详细说明如下。
- [0052] 实施例1:靶向SIRT6基因mRNA的siRNA(简称SIRT6 siRNA)的设计和合成
- [0053] 通过查找NCBI GenBank数据库([www.ncbi.nlm.nih.gov/gene](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene))中的人源SIRT6的序列,设计靶向SIRT6基因的siRNA,设计原则如下:(1)在SIRT6的cDNA序列上设计干扰目标区域应位于起始密码子(AUG)下游50-100nt,同时避开内含子序列设计;(2)从人SIRT6的转录本起始密码子(AUG)开始,找寻AA(N<sub>19</sub>)TT或NA(N<sub>21</sub>)或NAR(N<sub>17</sub>)YNN,其中N代表任一核苷酸,R代表嘌呤(A或G),Y代表嘧啶(C或U);(3)避开5' UTR和3' UTR即转录本的非编码区进行设计;(4)避开起始密码子和终止密码子50-100bp范围内的区域进行设计;(5)避开4个或更多相同碱基的延伸进行设计;(6)避开G或C碱基含量<30%或>60%的区域进行设计;(7)避开单核苷酸多态性位点;(8)利用NCBI BLAST([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/))对基因库数据进行同源性比对以避免脱靶效应。
- [0054] 根据以上原则,分别设计SIRT6 siRNA和对照siRNA(siRNA NC)的正义链和反义

链,并由上海擎科生物科技有限公司合成了上述双链siRNA。

[0055] SIRT6 siRNA和siRNA NC的纯度均大于99%,20D/管。使用无核酸酶水溶解,可直接用于细胞转染。SIRT6 siRNA和siRNA NC的正义链和反义链的核苷酸序列见表1。

[0056] 表1SIRT6 siRNA和siRNA NC的核苷酸序列

siRNA 名称		核苷酸序列	序列表对 应编号
SIRT6 siRNA	正义链	5'-GCUACGUUGACGAGGUCAUGA dTdT-3' (dTdT 为悬垂修饰)	SEQ ID NO: 1
	反义链	5'-UCAUGACCUCGUCAACGUAGC dTdT-3'	SEQ ID NO: 2
siRNA NC	正义链	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUAA dTdT-3'	SEQ ID NO: 3
	反义链	5'-AUUACGUGACACGUUCGGAGAA dTdT-3'	SEQ ID NO: 4

[0057] [0058] 实施例2:SIRT6 siRNA在人微血管内皮细胞HMEC-1中对SIRT6干扰效果的检测

[0059] 1、转染

[0060] (1) 将HMEC-1接种于6孔板内,在含10%胎牛血清的MCDB131培养基培养,待细胞密度约为70-80%时开始进行转染。

[0061] (2) 利用Lipofectamine™3000转染试剂(美国Invitrogen公司)将2种的siRNA(SIRT6 siRNA和siRNA NC)分别转染至HMEC-1细胞中,具体步骤如下:①取125μl Opti-MEM™ Medium和3.75μl Lipofectamine™3000 Reagent于EP管中,吹打混匀;②取250μl Opti-MEM™ Medium和5μg siRNA于另一EP管中,吹打混匀;③将①和②两管的体系混合,在室温下孵育10-15min后,将该转染体系加入每孔进行转染。

[0062] (3) 将细胞置于37℃,5%CO<sub>2</sub>的培养箱培养,持续转染48-72h。

[0063] 2、cDNA的获得

[0064] 用Trizol(日本Takara公司)分别提取上述经SIRT6 siRNA和siRNA NC转染的HMEC-1的总RNA,经过反转录得到cDNA。反转录的具体操作步骤如下:

[0065] (1) 消化DNA:将1μg经siRNA转染后的HMEC-1的总RNA、2μl 5×gDNA Eraser Buffer和1μl gDNA Eraser加入PCR管内,用无核酸酶水补齐至10μl。之后将该反应体系充分混匀并离心,在42℃金属浴孵育2min,以消化DNA。

[0066] (2) 配制逆转录反应体系:向步骤(1)消化DNA后的各管内加入4μl PrimeScriptRT Buffer 2、4μl RT primer Mix、1μl RNase Free dH<sub>2</sub>O和1μl PrimeScriptRT Enzyme Mix I,吹打混匀并离心。

[0067] (3) 将上述反应体系置于PCR仪中,按照37℃,15min,85℃,5s的条件进行逆转录反应,得到siRNA转染后的HMEC-1的cDNA,4℃保存。

[0068] 3、qPCR鉴定SIRT6 siRNA对SIRT6基因的干扰效果

[0069] 配制qRT PCR反应体系(10 $\mu$ l):0.3 $\mu$ l上游引物、0.3 $\mu$ l下游引物、5 $\mu$ l TB Green Premix Ex TaqII(Tli RNaseH Plus)、4 $\mu$ l RNase free dH<sub>2</sub>O和0.4 $\mu$ l步骤2获得cDNA模板组成。将配制好的反应体系置于荧光定量PCR仪上进行qPCR扩增反应。以 $\beta$ actin基因作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法,检测siRNA转染的人微血管内皮细胞HMEC-1中SIRT6基因的mRNA相对表达量。

[0070] 扩增SIRT6基因的上游引物为:5' GCCTGGTCATCGTCAACCTG 3' (SEQ ID NO:9),下游引物为5' TCATGACCTCGTCAACGTAGC 3' (SEQ ID NO:10)。

[0071] 扩增 $\beta$ actin基因的上游引物为5' GTTGTGACGACGAGCG 3' (SEQ ID NO:11),下游引物为5' GCACAGAGCCTCGCCTT 3' (SEQ ID NO:12)。

[0072] 4、实验结果

[0073] 检测结果如图1所示。结果表明,相较于siRNA NC,SIRT6 siRNA转染人微血管内皮细胞HMEC-1后,SIRT6 mRNA的表达量均显著下降。

[0074] 实施例3:靶向SIRT6基因的慢病毒载体构建及其对SIRT6基因干扰效果的鉴定

[0075] 1、SIRT6 shRNA和shRNA NC重组慢病毒载体的构建

[0076] (1) 确定干扰靶点和设计、合成引物

[0077] 鉴于实施例2中SIRT6 siRNA能对SIRT6表达的有明显的抑制效果,因此基于SIRT6 siRNA序列设计短发夹RNA(SIRT6 shRNA),其上游引物为:5' GATCCGCTACGTTGACGAGGTCATGACTCGAGTCATGACCTCGTCAACGTAGCTTTTTTG 3' (SEQ ID NO:5),下游引物为:5' AATTCAAAAA GCTACGTTGACGAGGTCATGACTCGAGTCATGACCTCGTCAACGTAGCG 3' (SEQ ID NO:6)。

[0078] 基于siRNANC序列设计短发夹RNA(shRNA NC),其上游引物为:5' GATCCGTTCTCCGA ACGTGTCACGTAATTCAAGAGATTACGTGACACGTTCCGAGAATTTTTTC 3' (SEQ ID NO:7),下游引物为:5' AATTGAAAAAATTCTCCGAACGTGTCACGTAATCTCTTGAATTACGTGACACGTTCCGAGAACG 3' (SEQ ID NO:8)。

[0079] (2) 引物退火形成带粘性末端的双链片段

[0080] 将上述两组引物分别稀释至100 $\mu$ M,然后配置反应体系(20 $\mu$ l):1 $\mu$ l上游引物、1 $\mu$ l下游引物、2 $\mu$ l 10 $\times$ oligo Buffer、16 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O。在95 $^{\circ}$ C 10min、75 $^{\circ}$ C 10min、55 $^{\circ}$ C 10min、35 $^{\circ}$ C 10min、15 $^{\circ}$ C 10min的退火程序中将(1)中合成的两对引物退火形成带粘性末端的双链片段。

[0081] (3) 重组慢病毒载体构建

[0082] ①载体酶切:依次加入一下试剂配置反应体系(40反应体系 $\mu$ l):1 $\mu$ l载体DNA(1 $\mu$ g/ $\mu$ l)、4 $\mu$ l 10 $\times$ buffer、32 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O、1.5 $\mu$ l限制性内切酶1、1.5 $\mu$ l限制性内切酶2。轻轻吹打混匀,置于37 $^{\circ}$ C水浴锅中反应1-2h,将载体pHBLV-U6-MCS-PGK-PURO进行酶切。结束之后进行琼脂糖凝胶电泳,回收目的片段。

[0083] ②干扰片段与载体连接:配置连接反应体系(20 $\mu$ l):步骤(2)得到的双链片段(4 $\mu$ l)、步骤①得到的酶切载体( $\geq$ 50ng)、T4 ligase buffer(2 $\mu$ l)、T4ligase(1 $\mu$ l),用ddH<sub>2</sub>O定容至20 $\mu$ l,在16 $^{\circ}$ C过夜,将SIRT6 shRNA和shRNA NC对应的双链DNA目的片段连入酶切后的pHBLV-U6-MCS-PGK-PURO载体上,得到SIRT6 shRNA和shRNA NC重组慢病毒载体。

[0084] 2、病毒浓缩液的制备

[0085] (1) 在6孔板中接种293T细胞(美国ATCC细胞库),在37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>的培养箱中,用含有10%胎牛血清、1%双抗(链霉素和青霉素)的DMEM高糖培养基培养,待细胞密度达70-

80%后进行转染。

[0086] (2) 配置共转染体系:10 $\mu$ g pSPAX2、5 $\mu$ g pMD2G、10 $\mu$ g上述步骤得到的重组慢病毒载体SIRT6 shRNA或shRNA NC、75 $\mu$ l Lipofiter<sup>TM</sup>转染试剂,混匀后在室温下温育15min后缓慢滴加至步骤(1)的293T细胞中,于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养,转染后16h更换含10%胎牛血清FBS的新鲜完全培养基。

[0087] (3) 收集病毒:分别在转染后48h和72h收集两次病毒上清(48h收集后置换新鲜完全培养基)于50mL离心管中,4 $^{\circ}$ C,2000g离心10min,去除沉淀(细胞碎片);再将病毒原液上清置于超速离心管中,在4 $^{\circ}$ C,82700g离心120min条件下得到病毒沉淀,用完全培养基重悬病毒沉淀后将重悬液分装到灭菌处理的病毒管中,得到SIRT6 shRNA1和shRNANC病毒浓缩液,-80 $^{\circ}$ C冰箱保存。

[0088] 3、细胞感染

[0089] 用上述步骤2中制备的SIRT6 shRNA和shRNANC病毒浓缩液感染人微血管内皮细胞HMEC-1(美国ATCC细胞库)。具体步骤如下:

[0090] (1) 在6孔板中接种HMEC-1细胞,在37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>的培养箱中,用含有10%胎牛血清、1%双抗(链霉素和青霉素)的MCDB131微血管内皮细胞培养基培养,待细胞密度达70-80%后进行转染。

[0091] (2) 在上述步骤(1)的培养基中分别加入30 $\mu$ l SIRT6 shRNA和shRNA NC病毒浓缩液;12h后更换新鲜的完全培养基;在转染后48h后用嘌呤霉素进行阳性筛选48h,之后扩增培养。

[0092] 4、RT qPCR鉴定SIRT6 shRNA对SIRT6基因的干扰效果

[0093] (1) 用Trizol(日本Takara公司)分别提取经SIRT6 shRNA和shRNA NC病毒浓缩液感染后的人微血管内皮细胞(HMEC-1)的总RNA,经过反转录得到细胞cDNA。反转录的具体步骤如下:

[0094] ①消化DNA:将1 $\mu$ g经病毒感染后的HMEC-1的总RNA、2 $\mu$ l 5 $\times$ gDNA Eraser Buffer和1 $\mu$ l gDNA Eraser加入PCR管内,用无核酸酶水补齐至10 $\mu$ l。之后将该反应体系充分混匀并离心,在42 $^{\circ}$ C金属浴孵育2min,以消化DNA。

[0095] ②配制逆转录反应体系:向步骤①消化DNA后的各管内加入4 $\mu$ l PrimeScriptRT Buffer 2、4 $\mu$ l RT primer Mix、1 $\mu$ l RNase Free dH<sub>2</sub>O和1 $\mu$ l PrimeScriptRT Enzyme Mix I,吹打混匀并离心。

[0096] ③将上述反应体系置于PCR仪中,按照37 $^{\circ}$ C,15min,85 $^{\circ}$ C,5s的条件进行逆转录反应,得到经病毒感染后的HMEC-1的cDNA,4 $^{\circ}$ C保存。

[0097] (2) qPCR鉴定SIRT6 shRNA对SIRT6基因的干扰效果

[0098] 配制qRT PCR反应体系(10 $\mu$ l):0.3 $\mu$ l上游引物、0.3 $\mu$ l下游引物、5 $\mu$ l TB Green Premix Ex TaqII(Tli RNaseH Plus)、4 $\mu$ l RNase free dH<sub>2</sub>O和0.4 $\mu$ l步骤(1)获得cDNA模板组成。将配制好的反应体系置于荧光定量PCR仪上进行qPCR扩增反应。以 $\beta$ actin基因作为内参基因,采用2 $\Delta\Delta$ CT法,检测SIRT6 shRNA病毒感染的HMEC-1中SIRT6基因的mRNA相对表达量。

[0099] 扩增SIRT6基因的上游引物为:5' GCCTGGTCATCGTCAACCTG 3' (SEQ ID NO:9),下游引物为:5' TCATGACCTCGTCAACGTAGC 3' (SEQ ID NO:10)。

[0100] 扩增 $\beta$ actin基因的上游引物为:5' GTTGTCGACGACGAGCG 3' (SEQ ID NO:11),下游引物为:5' GCACAGAGCCTCGCCTT 3' (SEQ ID NO:12)。

[0101] (3) 实验结果

[0102] 检测结果如图2所示。结果表明,与shRNA NC病毒感染后的HMEC-1相比,SIRT6 shRNA病毒感染后的细胞中,SIRT6 mRNA的表达量显著下降,表明SIRT6 shRNA的干扰效果显著。

[0103] 5、Western blot鉴定SIRT6 shRNA对SIRT6蛋白的抑制效果

[0104] (1) Western blot具体步骤

[0105] 利用中性裂解液(RIPA;PMSF=100:1)分别提取经SIRT6 shRNA和shRNANC病毒浓缩液感染后的HMEC-1细胞总蛋白,99°C 10min变性后,恒压120V,60min SDS-PAGE电泳;恒流300mA,60min将蛋白转至PVDF膜上;利用快速封闭液在室温下封闭PVDF膜40min;加入用一抗稀释液经1000:1稀释后SIRT6兔一抗(美国abcam公司)和 $\beta$ actin兔一抗(美国abcam公司)4°C孵育封闭后的PVDF膜过夜;回收一抗,用1×TBST溶液在摇床上洗膜3次,每次15min;加入用二抗稀释液经5000:1稀释后的兔二抗(美国Cell Signaling Technology公司)在室温下孵育1h;用1×TBST溶液于摇床上洗膜3次,每次15min;配置化学发光显影液,利用Bio-Rad化学发光成像系统显影。

[0106] (2) 实验结果

[0107] 检测结果如图3所示。结果表明,SIRT6 shRNA病毒浓缩液感染后的HMEC-1中,SIRT6的蛋白含量出现了明显的下降。

[0108] 实施例4:SIRT6敲低对氧化应激诱导的人微血管内皮细胞HMEC-1发生凋亡的影响

[0109] 1、人微血管内皮细胞HMEC-1氧化应激造模

[0110] 将实施例2中构建的SIRT6敲低的人微血管内皮稳定细胞系和对照细胞系在5% CO<sub>2</sub>,95%N<sub>2</sub>,在无血清培养基条件下培养12小时后,更换含10%胎牛血清的新鲜培养基,并加入400 $\mu$ M浓度的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,培养6小时。

[0111] 2、RTqPCR鉴定SIRT6shRNA干扰的HMEC-1在发生氧化应激时内皮凋亡的生物标记物的变化

[0112] (1) 用Trizol(日本Takara公司)分别提取经SIRT6 shRNA和shRNA NC病毒浓缩液感染后的人微血管内皮细胞(HMEC-1)的总RNA,经过反转录得到细胞cDNA。反转录的具体步骤如下:

[0113] ①消化DNA:将1 $\mu$ g经病毒感染后的HEMC-1的总RNA、2 $\mu$ l 5×gDNA Eraser Buffer和1 $\mu$ l gDNA Eraser加入PCR管内,用无核酸酶水补齐至10 $\mu$ l。之后将该反应体系充分混匀并离心,在42°C金属浴孵育2min,以消化DNA。

[0114] ②配制逆转录反应体系:向步骤①消化DNA后的各管内加入4 $\mu$ l PrimeScriptRT Buffer 2、4 $\mu$ l RT primer Mix、1 $\mu$ l RNase Free dH<sub>2</sub>O和1 $\mu$ l PrimeScriptRT Enzyme Mix I,吹打混匀并离心。

[0115] ③将上述反应体系置于PCR仪中,按照37°C,15min,85°C,5s的条件进行逆转录反应,得到经病毒感染后的HMEC-1的cDNA,4°C保存。

[0116] (2) qPCR鉴定在氧化应激下SIRT6 shRNA对HMEC-1凋亡标记物表达情况的影响

[0117] ①配制qRT PCR反应体系(10 $\mu$ l):0.3 $\mu$ l上游引物、0.3 $\mu$ l下游引物、5 $\mu$ l TB Green

Premix Ex TaqII (Tli RNaseH Plus)、4 $\mu$ l RNase free dH<sub>2</sub>O和0.4 $\mu$ l步骤(1)获得cDNA模板组成。

[0118] ②将配制好的反应体系置于荧光定量PCR仪上进行qPCR扩增反应。以 $\beta$  actin基因作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法,检测SIRT6 shRNA病毒感染的HMEC-1中SIRT6基因的mRNA相对表达量。

[0119] 扩增Bax基因的上游引物为:5' CCCGAGAGGTCTTTTCCGAG 3' (SEQ ID NO:13),下游引物为:5' CCAGCCATGATGGTTCTGAT 3' (SEQ ID NO:14);

[0120] 扩增Caspase-3基因的上游引物为:5'

[0121] CATGGAAGCGAATCAATGGACT 3' (SEQ ID NO:15),下游引物为:5'

[0122] CTGTACCAGACCGAGATGTCA 3' (SEQ ID NO:16);

[0123] 扩增 $\beta$  actin基因的上游引物为:5' GTGTGCGACGACGAGCG 3' (SEQ ID NO:11),下游引物为:5' GCACAGAGCCTCGCCTT 3' (SEQ ID NO:12)。

[0124] (3) 实验结果

[0125] 内皮凋亡的生物标记物的表达情况如图4所示(SIRT6为SIRT6敲低的人微血管内皮稳定细胞系,shSIRT6 NC为对照细胞系)。结果表明,经H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧化应激处理后,相较于shSIRT6 NC,SIRT6 shRNA病毒浓缩液感染后的HMEC-1中,凋亡生物标记物Bax和Caspase-3的mRNA表达明显升高,即SIRT6 shRNA能明显促进氧化应激诱导的内皮细胞的凋亡。

[0126] 3、Western blot鉴定SIRT6shRNA干扰的HMEC-1在发生氧化应激时内皮凋亡的生物标记物的变化

[0127] (1)Western blot具体步骤

[0128] 利用用中性裂解液(RIPA:PMSF=100:1)分别提取经SIRT6 shRNA和shRNANC病毒浓缩液感染后的HMEC-1细胞总蛋白,99 $^{\circ}$ C 10min变性后,恒压120V,60min SDS-PAGE电泳;恒流300mA,60min将蛋白转至PVDF膜上;利用快速封闭液在室温下封闭PVDF膜40min;加入用一抗稀释液经1000:1稀释后Bax兔一抗(美国abcam公司)、Caspase-3兔一抗(美国abcam公司)以及 $\beta$ actin兔一抗(美国abcam公司)4 $^{\circ}$ C孵育封闭后的PVDF膜过夜;回收一抗,用1 $\times$ TBST溶液在摇床上洗膜3次,每次15min;加入用二抗稀释液经5000:1稀释后的兔二抗(美国Cell Signaling Technology公司)在室温下孵育1h;用1 $\times$ TBST溶液于摇床上洗膜3次,每次15min;配置化学发光显影液,利用Bio-Rad化学发光成像系统显影。

[0129] (2) 实验结果

[0130] 内皮凋亡的生物标记物的表达情况如图5所示(SIRT6为SIRT6敲低的人微血管内皮稳定细胞系,shSIRT6 NC为对照细胞系)。结果表明,经H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧化应激处理后,相较于shSIRT6 NC,SIRT6 shRNA病毒浓缩液感染后的HMEC-1中,凋亡生物标记物Bax和Caspase-3的蛋白表达明显升高,即SIRT6 shRNA能明显促进氧化应激诱导的内皮细胞的凋亡。

[0131] 本发明构建的SIRT6敲低的人微血管内皮稳定细胞系为SIRT6低表达细胞株,为深入研究内皮细胞凋亡的分子机制奠定基础。

[0132] 上述实施例仅为本发明的优选实施例,并非对本发明任何形式上和实质上的限制,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员,在不脱离本发明的前提下,还将可以做出若干改进和补充,这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 复旦大学附属中山医院
- [0003] <120> 一种促进内皮凋亡的siRNA及SIRT6低表达的细胞系
- [0004] <160> 16
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 21
- [0008] <212> RNA
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] gcuacguuga cgaggucaug a 21
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 21
- [0014] <212> RNA
- [0015] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0016] <400> 2
- [0017] ucaugaccuc gucaacguag c 21
- [0018] <210> 3
- [0019] <211> 21
- [0020] <212> RNA
- [0021] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0022] <400> 3
- [0023] uucuccgaac gugucacgua a 21
- [0024] <210> 4
- [0025] <211> 22
- [0026] <212> RNA
- [0027] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0028] <400> 4
- [0029] auuacgugac acguucggag aa 22
- [0030] <210> 5
- [0031] <211> 60
- [0032] <212> DNA
- [0033] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0034] <400> 5
- [0035] gatccgctac gttgacgagg tcatgactcg agtcatgacc tcgtcaacgt agcttttttg 60
- [0036] <210> 6
- [0037] <211> 60
- [0038] <212> DNA

- [0039] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0040] <400> 6  
[0041] aattcaaaaa agctacgttg acgaggtcat gactcgagtc atgacctcgt caacgtagcg 60  
[0042] <210> 7  
[0043] <211> 64  
[0044] <212> DNA  
[0045] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0046] <400> 7  
[0047] gatccgttct ccgaacgtgt cacgtaattc aagagattac gtgacacgtt cggagaatth 60  
[0048] tttc 64  
[0049] <210> 8  
[0050] <211> 64  
[0051] <212> DNA  
[0052] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0053] <400> 8  
[0054] aattgaaaaa attctccgaa cgtgtcacgt aatctcttga attacgtgac acgttcggag 60  
[0055] aacg 64  
[0056] <210> 9  
[0057] <211> 20  
[0058] <212> DNA  
[0059] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0060] <400> 9  
[0061] gcctggtcat cgtcaacctg 20  
[0062] <210> 10  
[0063] <211> 21  
[0064] <212> DNA  
[0065] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0066] <400> 10  
[0067] tcatgacctc gtcaacgtagc 21  
[0068] <210> 11  
[0069] <211> 17  
[0070] <212> DNA  
[0071] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0072] <400> 11  
[0073] gttgtcgacg acgagcg 17  
[0074] <210> 12  
[0075] <211> 17  
[0076] <212> DNA  
[0077] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0078] <400> 12  
[0079] gcacagagcc tgcctt 17  
[0080] <210> 13  
[0081] <211> 21  
[0082] <212> DNA  
[0083] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0084] <400> 13  
[0085] cccgagaggt ctttttccga g 21  
[0086] <210> 14  
[0087] <211> 21  
[0088] <212> DNA  
[0089] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0090] <400> 14  
[0091] ccagcccatg atggttctga t 21  
[0092] <210> 15  
[0093] <211> 22  
[0094] <212> DNA  
[0095] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0096] <400> 15  
[0097] catggaagcg aatcaatgga ct 22  
[0098] <210> 16  
[0099] <211> 21  
[0100] <212> DNA  
[0101] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0102] <400> 16  
[0103] ctgtaccaga ccgagatgtc a 21

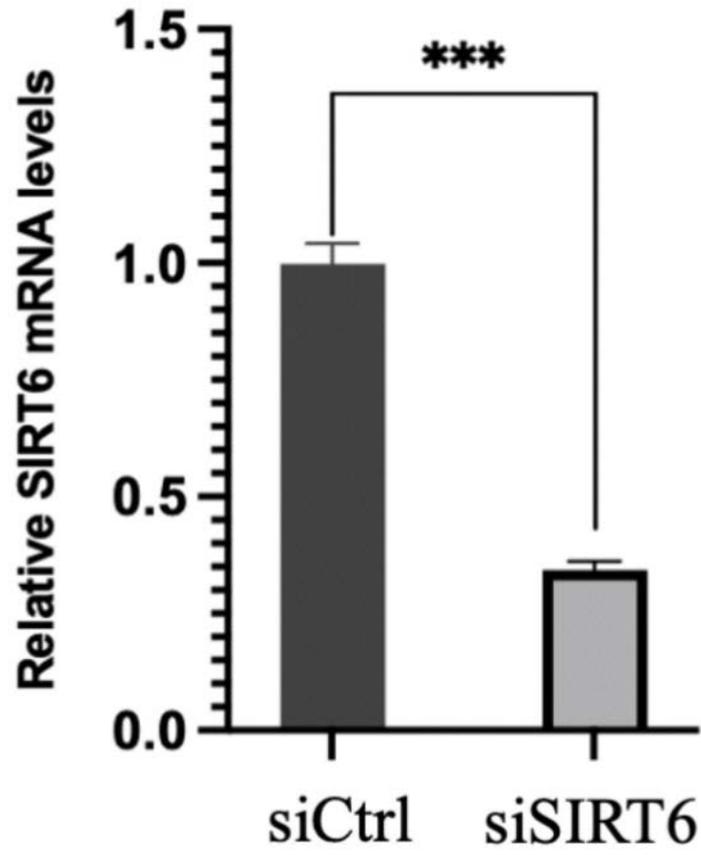


图1

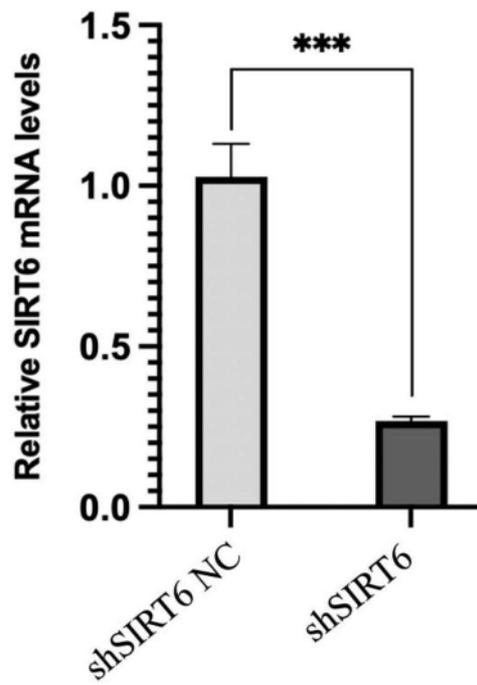


图2

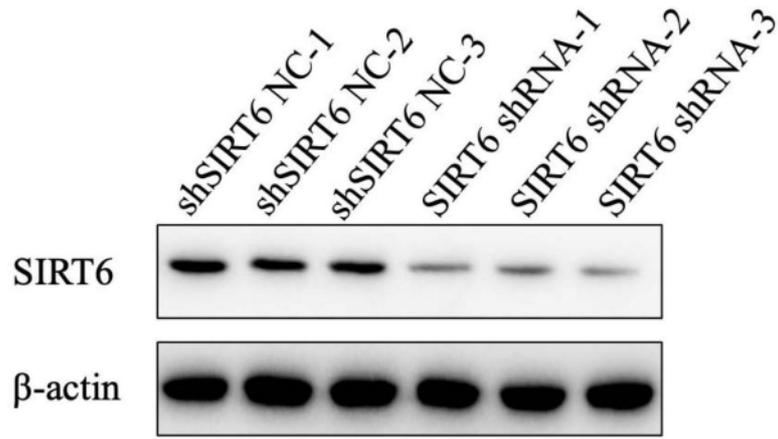


图3

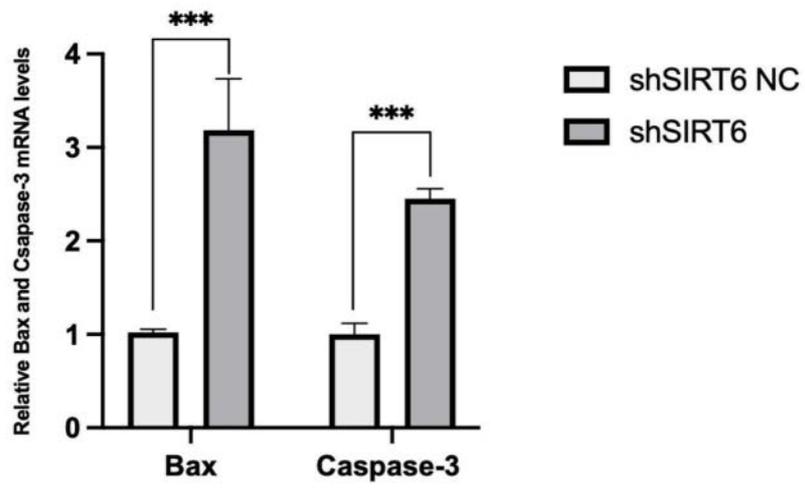


图4

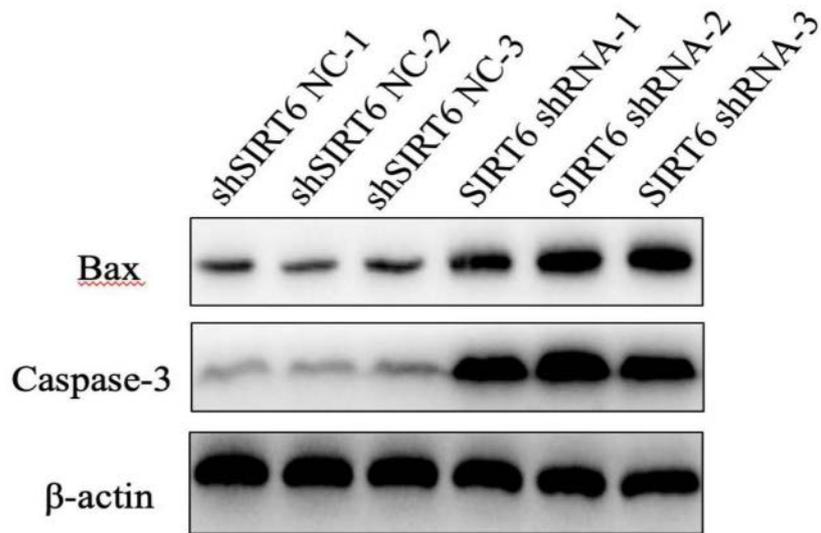


图5