

反义 c-myc 寡聚核苷酸对动脉平滑肌细胞的 生长抑制及其 Myc 蛋白合成的抑制

衡阳医学院心血管病研究所

北京医科大学心血管基础研究所

中国预防医学科学院基因工程国家重点实验室

杨和平 刘革修 万腊香 涂玉林 杨永宗

董薇 李岱宗 周爱儒 汤健

黄曦

摘要 本文合成了反义和正义 c-myc 5'一端编码区的前6个密码子。分别导入培养的 WKY 大鼠主动脉平滑肌细胞(SMCs),同时用内皮素(ET)诱导 SMCs 增殖,反义 c-myc 寡核苷酸(ODNs)抗细胞增殖作用随浓度(6 μ mol/L 至 12 μ mol/L)增加而增加。用 12 μ mol/L 反义 ODNs 抗细胞增殖能力随时间延长而下降。免疫组化显示受抑制细胞 Myc 水平较同期对照组或正义 ODNs 组低。本研究为反义 ODNs 抑制外源性生长因子或细胞因子诱导靶基因的高表达和细胞增殖提供了新的线索,同时为探讨癌基因表达调控与动脉 SMCs 增殖的关系提供了一种新方法。

关键词 反义寡核苷酸; WKY; 平滑肌细胞; c-myc

Myc 基因与细胞生长调控有关。用血清或生长因子处理培养的静止期成纤维母细胞,约2小时后 c-myc mRNA 达高峰。已有报道表明,将 Myc 蛋白显微注射于静止期 NIH 细胞可使后者对生长因子如 PDGF、EGF 等更敏感,c-myc 过度表达能减少纤维母细胞和造血细胞对生长因子的需要。T 细胞暴露于反义 myc 寡核苷酸(ODNs)可抑制它们进入 S 期。反义 myc ODNs 可抑制人前髓细胞系 HL-60 的增生。动脉粥样硬化^①和高血压^②发生中,c-myc 表达伴随动脉平滑肌细胞(SMCs)表型转变和增殖的变化而变化,反义 myc ODNs 能抑制 SMCs 的增殖^③。在离体^④和在体条件下,血管内皮细胞和平滑肌细胞都可以分泌内皮素(ET),可促使动脉 SMCs 增殖。本实验用 ET 诱导 SMCs 增殖,同时用反义 myc ODNs 导入增殖的 SMCs 中,以进一步探讨反义 myc ODNs 拮抗 ET 诱导 SMCs 增殖的作用。

1 材料和方法

1.1 DNA 合成 反义 myc ODNs 由北京医科大学病理教研室合成,反义和正义 myc ODNs 均由 18-mer 组成,为 myc 基因 5'端编码区(图1)。

1.2 WKY 动脉 SMCs 培养和细胞转染

WKY 大鼠由中国医学科学院阜外医院实验动物部提供。WKY 细胞由北京医科大学心血管基础研究所提供,取传代 WKY 动脉 SMCs 接种在 6 孔板培养皿中(4×10^5 个细胞)培养(培养液为 1640 加上 10%胎牛血清)24 小时后,用 2%胎牛血清加 1640 培养细胞 2 小时,吸去培养液,按下列方法进行 DNA 转染:将 ODNs 溶于无菌 10mmol/L Tris-Cl, pH7.0 的缓冲液中,加入 63 μ l 的 2mol/L CaCl₂ 水溶液,终浓度为 250mmol/L,用水(pH7.0)补足,使总体积为 0.5ml。加入 0.5ml 2 \times HBS 液(50mmol/L Hepes/NaOH(pH7.0) + 25mmol/L NaCl + 1.5mmol/L Na₂HPO₄/NaH₂PO₄(pH7.0)),同时向管底吹气泡混匀,室温放置 10~20 分钟,待出现乳白色浑浊时(不能有肉眼可见的沉淀颗粒),即将该混合液逐滴加入准备好的细胞中,使其分布均匀,室温静置吸附 30 分钟(ODNs 终浓度为 6 μ mol/L 至 12 μ mol/L),弃培养孔内液体,用 Hanks 液洗一次,加入 10%胎牛血清 1640 培养液 2ml,37 $^{\circ}$ 培养 6h 后,加入 ET(10^{-7} mol/L)培养 12h、24h 和 48h。

1.3 细胞计数和免疫组化 细胞计数用的目镜玻璃测试网格由军事医学科学院提供,选择 3 个视野,计数方格内 SMCs 数。c-myc 蛋白的检测(免疫细胞化学):将 6 孔培养板内的细胞置于 2%

多聚甲醛固定 20 分钟,再用 0.1% 小牛血清白蛋白 (PBS) 孵育 30 分钟,将抗 c-myc 蛋白多克隆抗体 (购自 onco gene 公司) 按 1:100 稀释,滴于培养板上,37℃ 下孵育 1 小时,洗去抗体,用 Avidin/biotin/peroxidase 放大显示信号。在显微镜下,每个处理因素计数 500 个细胞,用 (-)、(±)、(+)、(++)、

(+++),表示 c-myc 蛋白表达的强度,用下列公式计算每个处理因素 SMCs 内 c-myc 蛋白表达总量:

$$\text{总的 c-myc 蛋白表达量} = (\pm) \text{细胞} \% \times 0.5 + (+) \text{细胞} \% \times 1 + (++) \text{细胞} \% \times 2 + (+++) \text{细胞} \% \times 3$$

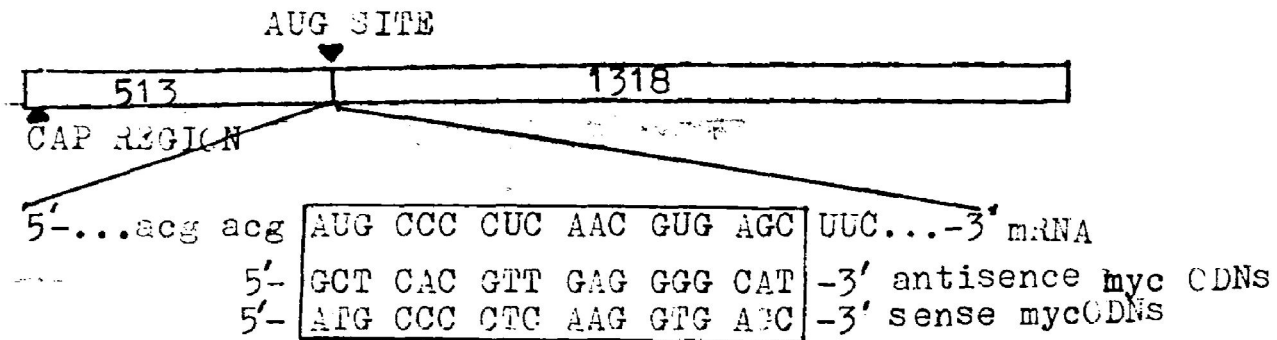


Fig1 The sequences of c-myc messenger RNA targeted by the antisense oligodeoxynucleotides (ODNs). The inhibitory protency of the antisense ODNs was related to a small shift in the sequence targeted

2 结果

2.1 反义 myc ODNs 对 SMCs 增殖的抑制作用

用 ET 能诱导 WKY SMCs 的增殖,但反义 myc ODNs 能拮抗 ET 促 SMCs 增殖的效应。在加入反义 myc ODNs 12 小时后,6μmol/L、9μmol/L 和 12μmol/L 对内皮素诱导 WKY SMCs 增殖的生长抑制率分别为 24%、37%和 42%;对未用内皮素诱导 WKY SMCs 增殖的生长抑制率分别为 8%、12%和 16%(图 2);而正义 myc ODNs 对细胞增殖无拮抗作用。

2.2 生长抑制率与反义 myc ODNs 加入时间的关系 反义 ODNs 对 WKY SMCs 的生长抑制率还与时间有关。12μmol/L 反义 ODNs 在 36h 后的抑制情况见图 3,12μmol/L 反义 ODNs 随着时间的延长,抑制内皮素诱导的 WKY SMCs 的作用下降,其抑制率在 12h、24h 和 36h 分别为 42%、38%和 34%,对未加内皮素诱导的 WKY SMC 生长抑制率分别为 16%、14%和 13%。

2.3 反义 myc ODNs 对细胞中 myc 蛋白合

成的抑制作用 c-myc 癌基因蛋白位于细胞核内。ET 能诱导 WKY SMCs 增殖(图 5),并促进 myc 蛋白高表达(图 5)。加入正义 c-myc ODNs,细胞核内仍然有 c-myc 蛋白的高表达(图 4)。加入反义 myc ODNs 能明显地抑制 ET 诱导的促细胞增殖效应(图 7),并能抑制 Myc 蛋白的高表达(图 6)。定量结果显示:加入反义 myc ODNs (12μmol/L) 的 SMC 中 c-myc 阳性细胞数为 26%,c-myc 蛋白总量为 78;加入正义 myc ODNs,则 c-myc 阳性细胞数为 93%,c-myc 蛋白总量为 216。未加入反义和正义 c-myc ODNs,则 c-myc 阳性细胞数为 95%,c-myc 蛋白总量为 223。

3 讨论

内皮素在分子结构上与蛇毒、蝎毒蛋白有 60%~80%的氨基酸同源,它们具有相似的生物学效应。在生理情况下,它主要通过旁分泌和自分泌的方式为局部激素调节心血管功能。Maddala 等报道大鼠冠状动脉注射 ET,可见心外膜下冠状动脉弥散性狭窄,动脉主干闭塞^⑥。ET 能促进心血管细

胞的 c-myc 基因表达,进而促进细胞增殖^⑦。本实验观察到加入反义 ODNs 至 ET 诱导的 WKY SMCs 增殖中,能拮抗 ET 诱导 SMCs 的 c-myc 蛋白表达和细胞增殖。因此,利用反义 ODNs 技术,导入与靶基因互补的核苷酸片段,可以抑制外源性生长因子或细胞因子诱导靶基因的高表达和细胞增殖,从而达到基因治疗的目的。

从目前用于 SMCs 研究结果来看,以设计 mRNA5' 端编码区,主要是起始密码 AUG 的反义 ODNs 较为多见。本实验设计了 c-myc mRNA5' 端前 18mer 的反义 ODNs,同时以正义 c-myc ODNs 作为对照,结果表明反义 ODNs 对 ET 诱导的 WKY SMCs 有较好的抑制作用。Biro 等^⑧用 AUG 起始 15 个反义 myc ODNs 也能明显地抑制 SMCs 增殖。这些为探讨癌基因表达调控与动脉 SMC 增殖的关系提供了一种新方法。

现在国外采用反义 ODNs 技术,一般经过硫代化,以提高转染效率。上海医科大学采用了 ABI 公司最近发展的方法,先按亚硫酸酰胺法合成亚磷酸三酯键,再用 TETD 硫化得到硫代磷酸三酯 DNA。本实验人工合成的反义 ODNs 未经化学修饰,所以导入 SMCs36 小时后可见抑制效应降低。

参 考 文 献

1. 杨和平,等. 动脉硬化斑块和斑块旁中膜 c-sis, c-myc 基因检测和细胞表型的比较研究. 中华病理学杂志 1992;21(6): 349
2. Heping Y, et al. Wild-type P53 gene expression in cultured smooth muscle cells from SHR and WKY rats. Chinese Medical Journal 1992;106(6): 471
3. Biro S, et al. Inhibitory effects of antisense oligodeoxynucleotides targeting c-myc mRNA on smooth muscle cell proliferation and migration. Proc Natl. Acad Sci USA 1993;90: 654
4. Liang X, et al. The role of proto-oncogenes in hypertension. Chinese Medical Sciences Journal 1991;6(3) suppl: 77
5. Muddle, et al. Effect of endothelin on regional hemodynamics and renal function in awake normotensive rats. J Cardiovasc Pharmacol 1989;14: 818
6. Chaoshu T, et al. Effect of endothelin on cardiac function. Chinese Medical Sciences Journal 1991;6(3 suppl): 79
7. 杨和平,等. 血管内皮素和血管紧张素 I 释放的相互关系. 中国病理生理杂志 1992;8(6): 610

An Oligomer Complementary To C-myc-encoded mRNA

Inhibits Proliferation of Arterial Smooth Muscle

Cells And Production of myc Protein

Yang Heping, et al

(Institute of cardiovascular research, Hengyang Medical College, Hengyang, 421001)

When antisense myc oligodeoxynucleotide (ODNs) (18-mer) were introduced into the medium of the smooth muscle cells (SMCs) of WKY in concentrations ranging from 6 to 12 μM , the 18-mer ODNs, in a concentration-related manner, decreased SMCs growth induced by endothelin (10^{-7} mol/L). The inhibitory effect ($12 \mu\text{mol/L}$) was about 43% in 12h, 33% in 24h and 27% in 36h. Sense ODNs had little effect. Meanwhile, the anti c-myc had inhibitory effect on production of Myc protein of the SMCs. Our results demonstrate that an antisense ODNs directed at the messenger RNA of myc decreases the expression of myc gene product and reduces SMCs proliferation induced by endothelin.

Key Words Antisense oligodeoxynucleotide; WKY; Smooth muscle cells; c-myc

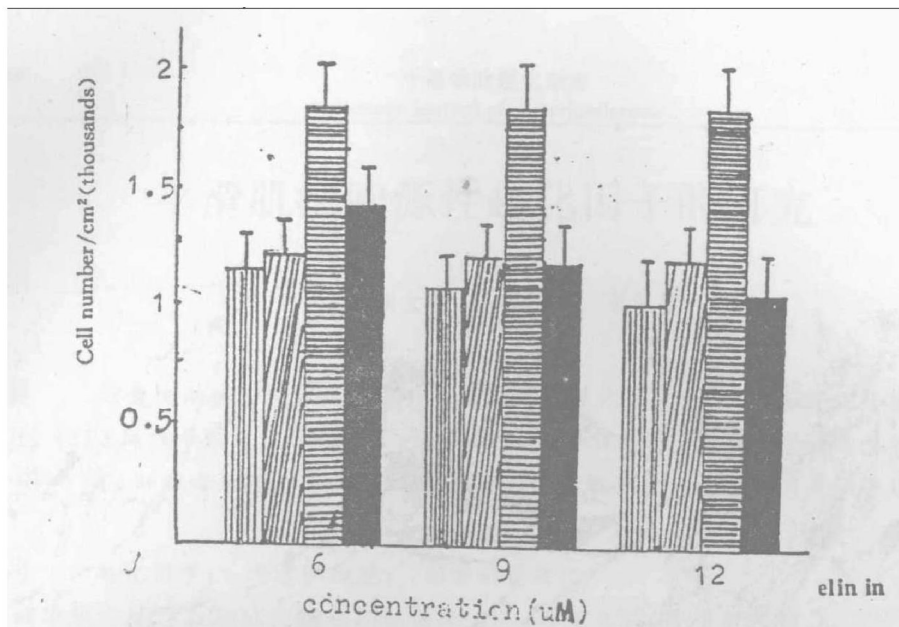


Fig2 Antisense myc ODNs inhibited WKY SMCs proliferation induced by endothelin in concentration-related manner

▨=cultured WKY SMCs

▤=cultured WKY SMCs induced by endothelin

▥=antisense myc ODNs inhibiting WKY SMCs proliferation

■=antisense myc ODNs inhibiting WKY SMCs proliferation which induced by endothelin

lin

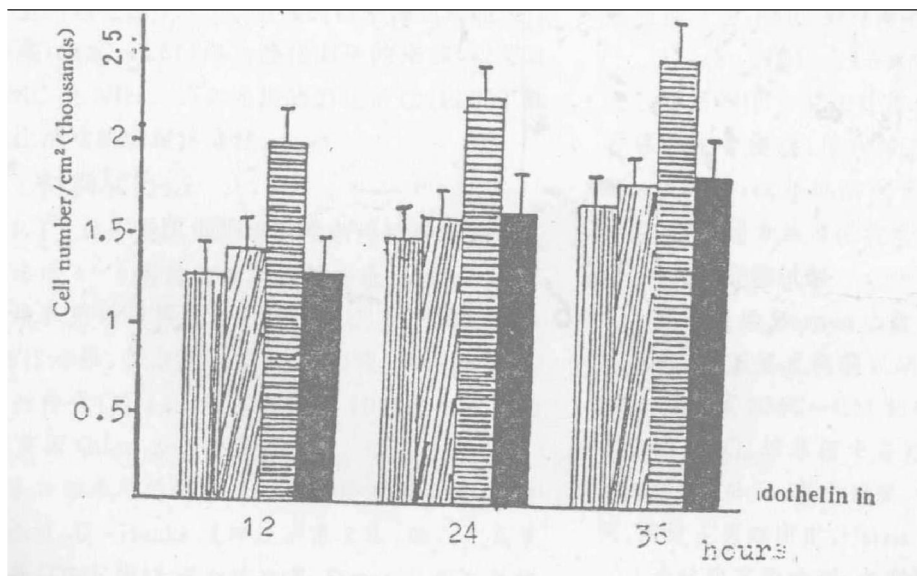


Fig3 Antisense myc ODNs inhibited WKY SMCs proliferation which induced by endothelin in time-related manner

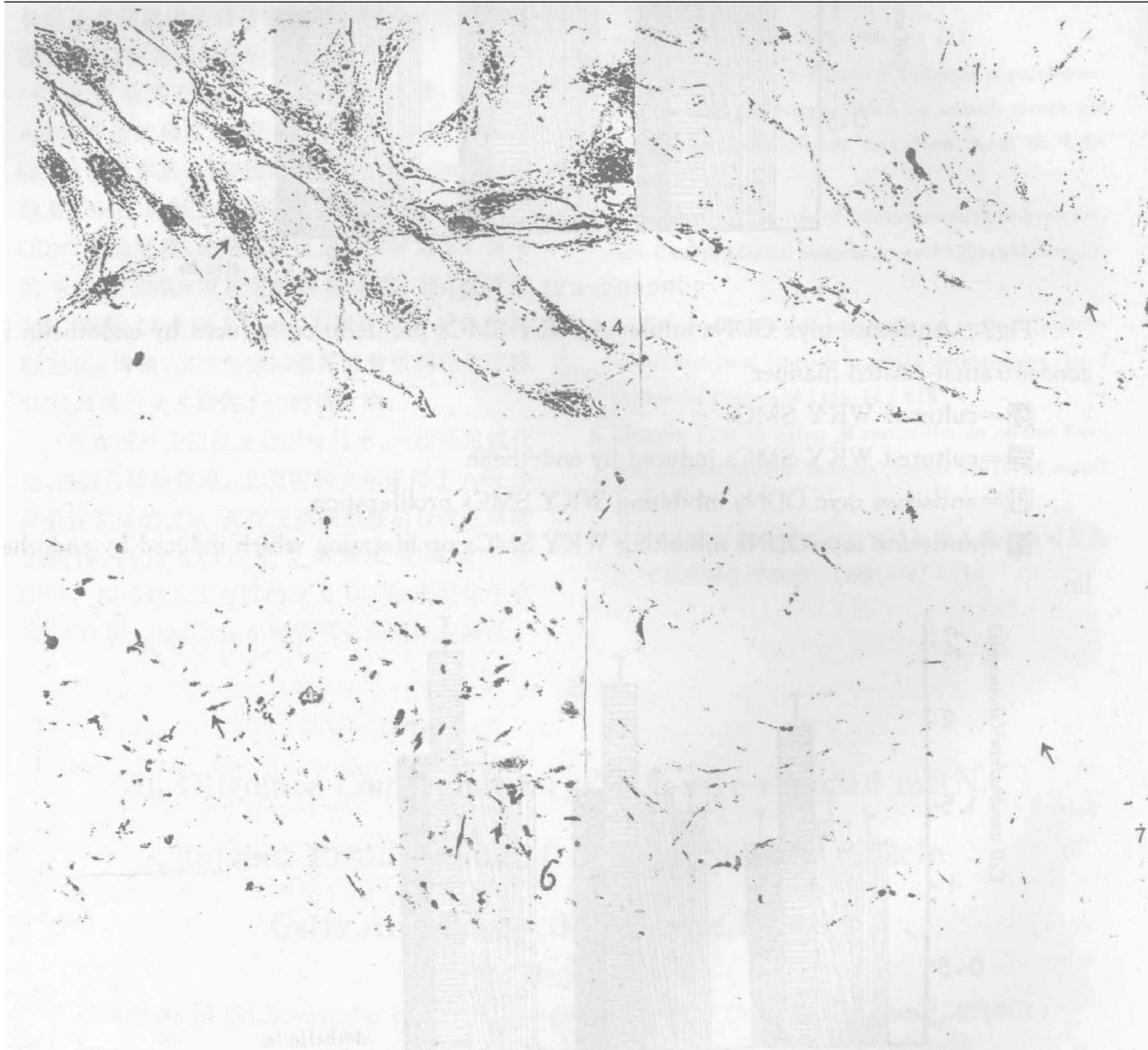
▨=cultured WKY SMCs

▤=cultured WKY SMCs induced by endothelin

▥=antisense myc ODNs inhibiting WKY SMCs proliferation

■=antisense myc ODNs inhibiting WKY SMCs proliferation which induced by endothelin

lin



Notes: Immunohistochemical staining for c—myc protein on SMCs

Fig4 Rapidly proliferated SMCs (induced with endothelin) showed strong nuclear immunoreactivity 40×

Fig5 SMCs (treated with antisense myc ODNs (12μmol/L) had less nuclear staining 30×

Fig6 SMCs induced with endothelin showed cell proliferation 10×

Fig7 SMCs treated with antisense ODNs diminished the amount of immunoreactive c-myc protein present 10×