

## 胰岛素样生长因子-1受体中的寡核苷酸反义链对血管平滑肌细胞增殖的影响

孟晓萍 王智慧 崔健华<sup>①</sup> Patrick Delafotain<sup>②</sup>

(白求恩医科大学附属第二医院, 长春 130041; ①附属第三医院)

### Effects of Oligodeoxynucleotide Antisense in Receptor of Insulin-like Growth Factor-1 on Proliferations of Vascular Smooth Muscle Cells

MENG Xiao-Ping, WANG Zhi-Hui, CUI Jian-Hua and Patrick Delafotain<sup>②</sup>

(Department of Cardiology, The Second Hospital of Bethune Medical University, Changchun 130041, China; ①Emory University, USA)

#### ABSTRACT

**Aim** In order to study the role of insulin-like growth of factor-1 receptor (IGFR) in the growth of vascular smooth muscle cells(VSMC).

**Methods** Antisense and mismatch of oligodeoxynucleotides (ODN) of IGFR were used to study smooth muscle cell of mouse arteries.

**Results** The incorporation of <sup>3</sup>H-thymidine in VSMC handling by antisense of ODN decreased 64% compared with normal control group. The determination of the receptor number in binding experiment decreases 52% cell handling by as incubated different concentration of IGF-1(1~50 ng) caused a dose dependent increase in <sup>3</sup>H-thymidine incorporation stimulated by 20 μg/L IGF-1 was reduced by 62% in antisense treated cells the effect of cells incubation of angiotensin I in antisense handling cells was not altered, the receptor quantities didn't reduce.

**Conclusion** This experiment showed the importance of ligand-receptor system to VSMC. The density of receptor plays a key role to the growth of

VSMC the decreasing of IGF-1 receptor number caused by antisense was due to the decreasing of mRNA in IGF-1 receptor. This hypothesis has been proved in the experiment of nudease protection.

**KEY WORDS** Insulin-like growth factor -1 receptor; Oligodeoxynucleotides, antisense, mismatch; Vascular smooth muscle cell

**摘要** 为了研究胰岛素样生长因子-1受体在血管平滑肌细胞生长调节中所起的作用,用其寡核苷酸反义链和配链对鼠主动脉平滑肌细胞的作用进行研究。用寡核苷酸反义链处理的血管平滑肌细胞中,氘标脱氧胸腺嘧啶核苷的掺入率较对照组下降64%,用结合实验测定胰岛素样生长因子-1受体数目下降52%。在用反义链处理细胞时,随加入胰岛素样生长因子-1浓度的增加,氘标脱氧胸腺嘧啶核苷掺入率也与剂量成反比的下降。反义链的剂量为20 μg/L时,氘标脱氧胸腺嘧啶核苷掺入率下降64%。反义链处理的细胞对加入血管紧张素I无反应。受体数目无变化。这一发现提示了配体-受体系统对血管平滑肌细胞反应的重要性。受体的密度对血管平滑肌细胞的生长起到关键作用。用反义链能使胰岛素生长因子-1受体数目减少是由于胰岛素样生长因子-1受体的mRNA减少,这一假说在核酸酶保护实验中得到证明。

**关键词** 胰岛素样生长因子-1受体; 寡核苷酸,反义链,失配链; 血管平滑肌细胞

胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)是一种由70个氨基酸组成的多肽,它具有调节细胞生长与分化作用<sup>[1]</sup>。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)以自分泌和旁分泌方式分泌IGF-1<sup>[2]</sup>,而IGF-1必须与受体结合才能发挥生物学效应。很多生长因子,如血小板源生长因子

② 美国埃默里大学

(platelet derived growth factor, PDGF)、碱性纤维母细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和血管紧张素 I (angiotensin, Ang I), 均能增加 VSMC IGF-1 受体的数量, 因此, IGF-1 受体的数量在 VSMC 增殖过程中起到调控的作用。本文探讨 IGF-1 受体的反义链对 VSMC 的作用, 自分子水平拓宽对冠心病和高血压病病因的探讨和基因治疗前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

重组人的 IGF-1 由 Dr HP Guler 生产, CLBA-GELGY-CRP, Summit NJ, <sup>3</sup>H-thymidine (20 kCi/mol), α-<sup>32</sup>P-utp (300 kCi/mol), <sup>125</sup>I-IGF-1 (~300 Ci/g) 和 <sup>125</sup>I sar I-IIe<sup>8</sup>-Ang I (220 kCi/mol) 由 Dupont New England Nuclear Boston MA 生产。Ang I 购于 Sigma 公司。

### 1.2 细胞培养

从鼠胸主动脉分离 VSMC, 经酶消化后传代<sup>[4]</sup>。细胞在加入 10% 胎牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺、青霉素 100 ku/L 和链霉素 100 mg/L 的 DMEM (培养液中培养, 培养温度 37℃, 饱和湿度 95%, 二氧化碳浓度 5%。实验选用 5~15 代细胞。培养板分别为 100 mm, 24 孔及 48 孔。当细胞生长达 80% 汇合时, 换用无血清的培养液 (serum free midume, SFM)。SFM 组成为 DMEM 和 HamSF<sub>12</sub> (1:1)、转铁蛋白、胰岛素、谷氨酰胺和抗菌素。

### 1.3 胰岛素样生长因子-1 受体寡核苷酸的合成

胰岛素样生长因子-1 受体相关的寡核苷酸在美国 Emory 大学微小生物化学实验室合成。长度是 20 碱基对 (basic pairs, bp)。IGF-1 受体的反义链和失配链从 ATG 位点 5' 上游 2 bp 开始合成。反义链的寡核苷酸序列为 5'-TCCGGAGCCAGACTTCATTC-3'; 失配链的寡核苷酸序列为 5'-AGCGGTCCCACTCTTGTTG-3'。核苷酸在使用前经过过滤, 使用浓度为 0.1~10 μmol/L。

### 1.4 DNA 合成检测

将含有氚标胸腺嘧啶脱氧核苷的培养液与细胞温育, 利用 <sup>3</sup>H-TdR 能掺入合成的 DNA 分子中, 从而检测 DNA 的合成速率。

#### 1.4.1 寡核苷酸反义链和失配链对血管平滑肌生长

**作用的影响** 将 VSMC 在 48 孔培养板中培养, 实验分为四组: ①SFM+反义链或失配链组; ②SFM 组; ③胎牛血清+反义链或失配链组; ④胎牛血清组。①组为实验组。当 VSMC 生长至 80% 时, 换用 SFM 并用反义链或失配链寡核苷酸处理细胞, 浓度为 0.1~10 μmol/L。②组为对照组。③组为实验组, 当 VSMC 长至 50% 时, 换用 10% 胎牛血清培养液并用反义链或失配链寡核苷酸处理细胞, 寡核苷酸剂量同①组。④组为对照组。四组 VSMC 经上述寡核苷酸处理后生长 48 h 均换用 SFM 并加入 1 Ci/L 氚标胸腺嘧啶脱氧核苷。继续培养 24 h 后用预冷的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 洗涤细胞二次, 加入三氯醋酸 (trichloroacetic acid, TCA) 冰育 10 min 吸出。在空气中将细胞干燥用 0.4 mol/L NaOH 200 μl 消化细胞, 加闪烁液 (scintillation 2 ml) 进行液体闪烁计数检测。

#### 1.4.2 经反义链处理的 VSMC 对 IGF-1 的反应

细胞培养方法同前, 不同之处在于实验组加入寡核苷酸反义链浓度是 5 μmol/L。VSMC 经寡核苷酸反义链处理 48 h 后与对照组 (不加寡核苷酸反义链) 同时加入剂量为 1~50 μg/L IGF-1, 24 h 后检测。实验操作同前。

#### 1.4.3 经寡核苷酸处理的 VSMC 对 Ang I 的反应

细胞培养方法同前, 实验组 VSMC 经寡核苷酸反义链 (浓度均为 5 μmol/L) 处理 48 h, 加入不同浓度的 At I (1~100 nmol/L) 细胞培养 24 h, 换培养液再加入同等剂量的 Ang I 继续培养 24 h 后检测方法同前。

### 1.5 细胞生长分析

按上述培养细胞方法, 分别加入寡核苷酸反义链和失配链, 剂量在 0.1~10 μmol 之间。培养 96 h 后用 PBS/EDTA 消化细胞, 用细胞计数仪在显微镜下计数。

### 1.6 结合实验

#### 1.6.1 检测的寡核苷酸对 VSMC IGF-1 受体的影响

细胞培养方法同前, VSMC 经寡核苷酸处理 48 h 后用 Binding buffer 洗涤细胞二次 (Binding buffer 成分: 20 mmol/L HEPES、120 mmol/L NaCl、5 mmol/L KCl、1.2 mmol/L MgSO<sub>4</sub>、10 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>、1.3 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、1~2 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.25% bovine serum albumin, pH 7.4), 加入 10<sup>-10</sup> mol/L <sup>125</sup>I-IGF-1 和不同浓度的未标记的 IGF-1, 其浓度依次为 (0~2) × 10<sup>-7</sup> mol/L。在室温下放置 90 min。以预冷的 Binding buffer 再洗涤细胞二次。用 2 mol/L NaOH 500 μl 消化细胞。将细胞放置于 Gamma 测定仪进行 γ 计数。检测数据 Ligand 程度分析。

1.6.2 检测的寡核苷酸对 VSMC Ang I 受体的影响

细胞培养方法与检测方法同前。仅在用 Binding buffer 洗涤细胞二次后再加入标记的  $10^{-10}$   $^{125}$ Isar-Ile<sup>8</sup> Ang I 和未标记的 Ang I, 其浓度为  $0\sim 10^6$  mol/L。

1.7 核酸酶保护分析

用此实验方法检测寡核苷酸对 VSMC IGF-1 受体的 mRNA 水平的影响。利用分子克隆技术将大鼠 IGF-1 受体基因 203 bp 克隆至 PGEM<sub>3</sub>[<sup>5</sup>]载体。用 ECoRI 使之线性化。以此为模板,用 SP<sub>6</sub> RNA 多聚酶产生反义的 RNA 探针。将提取的总量为 30  $\mu$ g RNA 和已制备的  $5\times 10^5$  cpm P-UTP 标记的 IGF-1 受体探针进行杂交过夜。用 RNase A 和 T<sub>1</sub> 消化样品,将保护片断在 6% 聚丙烯酰胺/8 mol 尿素变性胶上进行电泳,IGF-1 受体探针全长 251 bp。保护片段 195 bp。实验结果经冲洗胶片后再用 KB<sub>2</sub> 维激光扫描,然后计算出准确的检测数据。

1.8 统计学处理

实验数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,差异的显著性用 *t* 检验。

2 结果

2.1 寡核苷酸对血管平滑肌细胞氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入的影响

加入胰岛素样生长因子-1 受体寡核苷酸后,与对照组相比较,反义链使氚标脱氧胸腺嘧啶核苷的掺入率呈浓度依赖性下降,当反义链的浓度为 10  $\mu$ mol/L 时,氚标脱氧胸腺嘧啶核苷掺入率下降了 64% ( $P<0.01$ )。而失配链使血管平滑肌细胞氚标脱氧胸腺嘧啶核苷掺入率无变化(图 1, Figure 1)。

2.2 细胞计数的检测结果

血管平滑肌细胞经寡核苷酸处理 96 h 后,与对照组相比较,当剂量为 10  $\mu$ mol/L 时,用反义链处理的细胞计数下降了 64% ( $P<0.05$ ); 而用失配链处理的细胞计数无变化(图 2, Figure 2)。

2.3 经寡核苷酸处理的血管平滑肌细胞对胰岛素样生长因子-1 的反应

在血管平滑肌细胞的培养中加入 IGF-1 后,对照组细胞和经寡核苷酸反义链处理的细胞氚标脱氧胸腺嘧啶核苷掺入率均增加,且有明显的剂量依赖性。但用寡核苷酸反义链处理

的细胞氚标脱氧胸腺嘧啶核苷掺入率增加的幅度明显低于对照组,当加入的 IGF-1 的浓度为 20  $\mu$ g/L 时,前者比后者低 62% ( $P<0.05$ ; 图 3, Figure 3)。

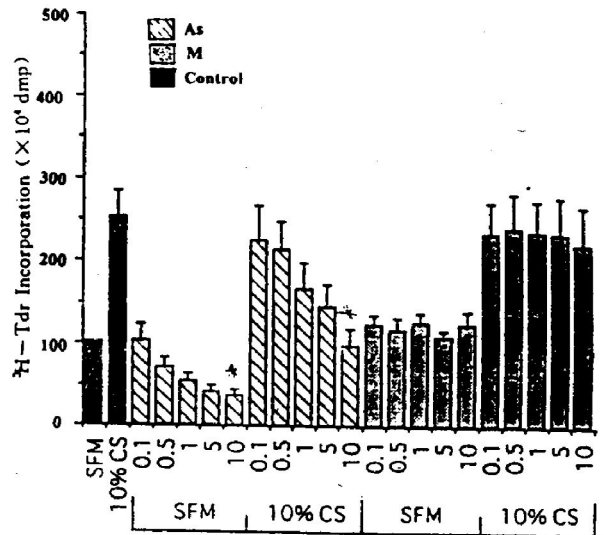


Figure 1. Influence of oligodeoxynucleotides of insulin-like growth factor-1 receptor on incorporation of H-TdR into vascular smooth muscle cells.

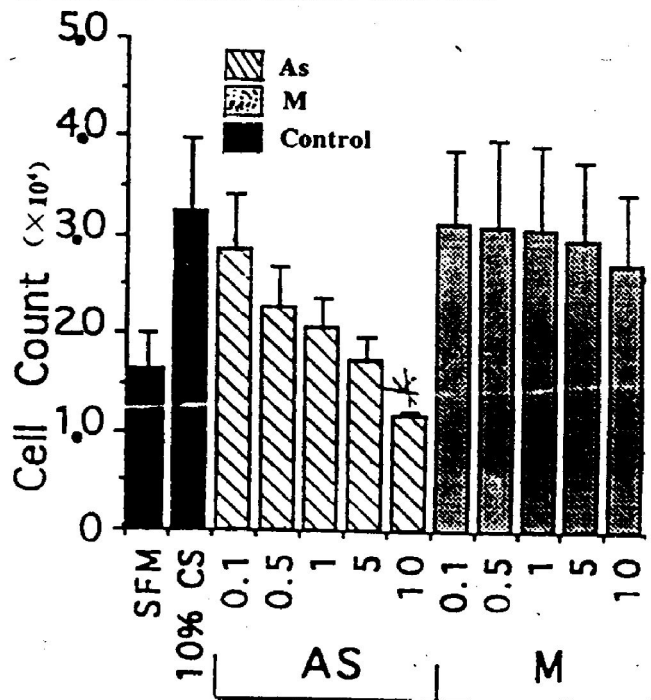


Figure 2. Influence of oligodeoxynucleotides of insulin-like growth factor-1 receptor into vascular smooth muscle cells.

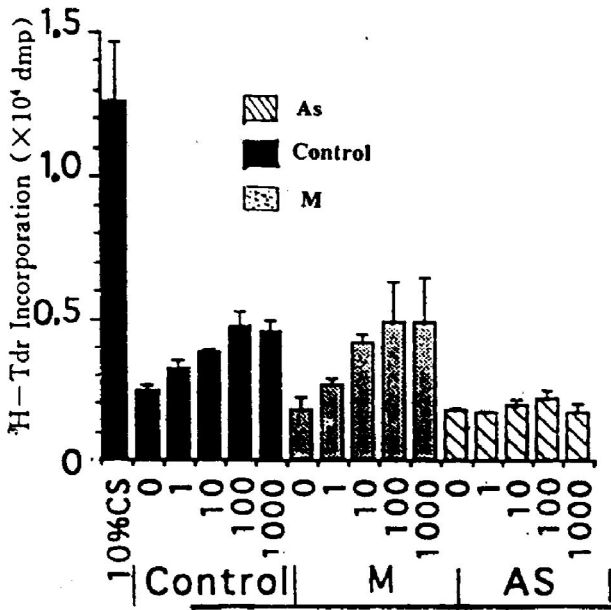


Figure 3. Effects of oligo nucleotides of insulin-like growth factor-1 receptor on the DNA synthesis of vascular smooth muscle cells induced with insulin-like growth factor-1.

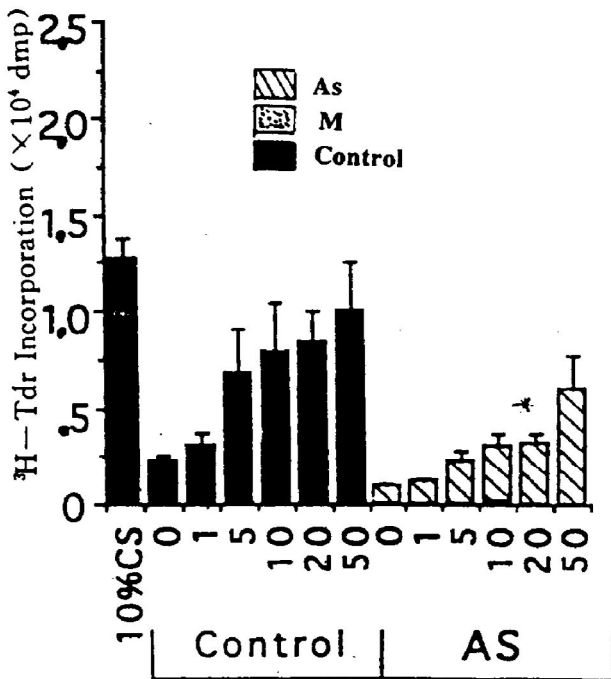


Figure 4. Effects of oligodeoxynucleotides of insulin-like growth factor receptor on the DNA synthesis of vascular smooth muscle cells induced with angiotensin I.

### 2.4 经寡核苷酸处理的血管平滑肌细胞对血管紧张素 I 的反应

在加入血管紧张素-I后,对照组细胞氘标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入率明显增加,且有剂量依赖性。而经 IGF-1 受体寡核苷酸反义链处理的细胞氘标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入率无变化(图 4, Figure 4)。

### 2.5 寡核苷酸对血管平滑肌细胞胰岛素样生长因子-1 受体的影响

为了观察寡核苷酸对细胞生长的作用与 IGF-1 受体的相关性。我们检测了寡核苷酸对血管平滑肌细胞 IGF-1 受体的数量的影响。结果发现,与对照组比较,寡核苷酸反义链处理组血管平滑肌细胞受体数量下降了 52%( $P < 0.01$ ),寡核苷酸失配链处理组血管平滑肌细胞 IGF-1 受体数目无变化。

### 2.6 寡核苷酸对血管平滑肌细胞膜血管紧张素-I 受体的影响

为了进一步研究寡核苷酸对细胞 IGF-1 受体的特异性,对经寡核苷酸处理的细胞同时加入血管紧张素 I 诱导,可见二种寡核苷酸介入组的血管紧张素 I 受体数与对照组相比均无变化。

### 2.7 寡核苷酸对血管平滑肌细胞胰岛素样生长因子-1 mRNA 水平的影响

核酸酶保护试验结果发现:寡核苷酸反义链介入组 mRNA 水平与对照组相比下降 48% ( $P < 0.05$ )。寡核苷酸失配链介入组 IGF-1 受体 mRNA 水平与对照组相比无变化。

## 3 讨论

胰岛素样生长因子-1 是一种很强的促生长因子<sup>[7]</sup>,在细胞的生长与分化中起重要作用。IGF-1 与 PDGF、bFGF、血管紧张素 I 在促进细胞的生长过程中有明显的协同作用。我们以前研究发现,PDGF 能使细胞 IGF-1 mRNA 表达水平升高和 IGF-1 释放增加<sup>[8]</sup>。而血管紧张素 I 增加 VSMC DNA 合成的作用又可被 IGF-1 抗体所抑制<sup>[6]</sup>。这些促生长因子的密切协同作用,导致了 VSMC 的增殖,从而影响许多心血管疾病的病理过程。体外实验表明 IGF-1 能刺激血管内皮细胞和平滑肌细胞的生

长<sup>[9]</sup>。用原位杂交的方法,在心外膜和冠状动脉壁发现了 IGF-1 mRNA<sup>[10]</sup>。在高血压鼠的主动脉壁发现 IGF-1 mRNA 明显增加<sup>[11]</sup>。IGF-1 与心血管疾病的关系如高血压病、冠心病的关系在国外屡有报道,但研究 IGF-1 受体的反义寡核苷酸对 VSMC 的作用在国外我为首次。我们研究发现 IGF-1 受体的寡核苷酸反义链能抑制 VSMC 的生长。而抑制效应主要是 IGF-1 受体数目,且并不影响 IGF-1 与受体结合的亲和力(kd 无变化)这一作用在结合实验中已得到证实。通过观察寡核苷酸反义链处理的细胞对 IGF-1 的反应,我们也发现了 IGF-1 受体在细胞增殖中的重要作用。由于寡核苷酸反义链能使受体的数目减少,尽管外源性地加入了 IGF-1 而 VSMC 增殖反应仍表现极弱。这一点在氘标脱氧胸腺嘧啶核苷的掺入实验中已得到进一步证实。寡核苷酸反义链使受体数目减少。进而抑制血管平滑肌细胞增殖这一作用是特异的。在实验中把血管紧张素 I 加入经寡核苷酸反义链处理的细胞,细胞对血管紧张素 I 无反应,而在结合实验中也发现了寡核苷酸反义链并不减少血管平滑肌细胞血管紧张素 I 受体。这一发现提示了配体—受体系统对于控制 VSMC 的反应是重要的。在 VSMC 对于 IGF-1 的反应过程中 IGF-1 受体的密度起到了关键作用。寡核苷酸反义链能使 IGF-1 受体数目减少,是由于 IGF-1 受体 mRNA 减少所致,我们在核酸酶保护实验中证实了这一假说。

上述研究给我们以下的提示:① 抑制 VSMC 增殖的关键环节是抑制 IGF-1 的分泌;② 减少 IGF-1 受体能抑制 IGF-1 对血管平滑肌的增殖作用;③ 在基因治疗某些心血管疾病方面寡核苷酸反义链可作为中心环节。

#### 参考文献

- 1 Lowe WL Jr. Biological actions of the insulin-like growth factor. In: *Insulin-like Growth Factors Molecular and Cellular Aspects*. Boca Raton Fla CRC press, 1991; 49~55.
- 2 Delafontaine P, Bernstein KE, Alexander RW. Insulin-like growth factor 1 gene expression in vascular cells. *Hypertension*, 1991, 17: 693~699.
- 3 Werner H, Woloschak M, Adamo M, et al. Development regulation of the rat insulin-like growth factor 1 receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 7 451~455.
- 4 Gunther S, Alexander RW, Ekstein S. Functional angiotensin I receptors in cultured vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol*, 1982, 92: 289~298.
- 5 Jie Du, Patrick Delafontaine. Inhibition of vascular smooth muscle cell growth through antisense transcription of a cDNA. *Circ Res*, 1995, 76: 963~967.
- 6 Delafontaine P, Lou H. Angiotensin I regulates insulin-like growth factor I gene expression in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 1993, 268: 16 866~870.
- 7 Scott CD. Production of insulin-like growth factor I and its binding protein by adult rat hepatocytes insulin primary culture. *Endocrinology*, 1985, 116: 1 094.
- 8 Delafontaine P, Lou H, Alexander RW. Regulation of insulin-like growth factor I messenger RNA levels in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 1991, 75: 1 028~36.
- 9 King GI, Goodman AD, Buzney S, et al. Receptors and growth-promoting effects of insulin and insulin-like growth factors. *J Clin Invest*, 1985, 18: 744.
- 10 Han VKM, D'Ercole AT, Lund PK. Cellular localization of somatomedin (insulin-like growth factor) messenger RNA in the human fetus. *Science*, 1987, 236: 193~197.
- 11 Fath KA, Alexander RW, Delafontaine P, et al. Abdominal coarctation increases insulin-like growth factor I mRNA levels in rat aorta. *Circ Res*, 1993, 72: 271~272.

(1996-10-17 收到, 1997-03-07 修回)