

反义 ras 寡聚脱氧核苷酸对血管平滑肌细胞生物学行为的影响

李朝红 邓满平 尹小川 刘青 刘素红

(中山医科大学组胚教研室 心血管病分子生物学组, 广州 510089)

Antisense ras Oligodeoxynucleotides Influence Biological Behaviors of Rat Aortic Smooth Muscle Cells Stimulated by Basic Fibroblast Growth Factor

LI Chao-Hong, DENG Yi-Ping, YIN Xiao-Chuan, LIU Qing and LIU Su-Hong

(Division of Molecular Biology of Cardiovascular Diseases, Department of Histology & Embryology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

ABSTRACT

Aim In order to regulate the action of small molecular G protein (ras protein) for inhibition of smooth muscle cell (SMC) proliferation response to growth factor, basic fibroblast growth factor (bFGF).

Methods Antisense oligomers, modified to prevent their own degradations, were used in a concentration of 6 μmol/L introduced into the serum-free medium containing bFGF (100 mg/L) in which rat aortic SMC were cultured. By means of ³H-thymidine incorporation and immunocytochemistry methods, DNA synthesis and expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in SMC were detected.

Results These oligodeoxynucleotides (ODN), in a time-related manner, significantly lowered the DNA synthesis of SMC by more than 90% (compared with the control). When a same nucleotides sense ODN was used instead, showed only a little effect. Immunocytochemistry indicated that the antisense ODN can markedly reduce expression of PCNA protein which is necessary for SMC proliferation.

Conclusion Antisense G protein ODN strategies may be used to resolve clinical problems caused by

growth factors initiated cell proliferation.

KEY WORDS Antisense oligodeoxynucleotides; Ras proteins; Vascular smooth muscle cells; Restenosis; Basic fibroblast growth factor

摘要 为了研究调控小分子G蛋白(ras蛋白)以抑制血管平滑肌细胞对生长因子的反应机制,用合成的反义 ras 寡聚脱氧核苷酸作用于碱性纤维母细胞生长因子以刺激培养的大鼠血管平滑肌细胞,通过氟标胸腺嘧啶脱氧核苷酸掺入法及免疫细胞化学方法,来观察反义 ras 寡聚脱氧核苷酸对在碱性纤维母细胞生长因子刺激下的大鼠血管平滑肌细胞 DNA 合成和增殖细胞核抗原的影响。结果发现,反义 ras 寡聚脱氧核苷酸可明显抑制血管平滑肌细胞 DNA 的合成,作用 12 h 和 24 h 的抑制率分别为 92% 和 90%;而相同浓度的正义链组仅呈现较弱的抑制作用($P < 0.01$)。反义 ras 寡聚脱氧核苷酸亦可显著减少血管平滑肌细胞增殖细胞核抗原蛋白的表达。提示该策略的应用有可能解决以生长因子为始因引起的细胞增殖性疾病、经皮腔内冠状动脉成形术后再狭窄、动脉粥样硬化及高血压等问题的临床防治。

关键词 反义寡聚脱氧核苷酸; ras 蛋白; 血管, 平滑肌细胞; 再狭窄; 碱性纤维母细胞生长因子

研究表明,多种生长调节分子(growth regulating molecule, GRM)包括生长因子、血管活性多肽和细胞因子等同时作用于血管平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC),可引起 SMC 的表型改变、迁移、增殖及合成大量细胞外基质或者引起 SMC 持久收缩,这是目前还没有一种药物能有效地防治动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)、高血压和降低血管成形术后再狭窄发生率的根本原因之一^[1]。因此,同时阻断多种 GRM 对 SMC 的作用是防治上述疾病发生的

关键。近期资料显示,体内大多数生长因子可通过不同受体(跨膜一次受体)与 ras 蛋白偶联,并通过 ras 蛋白的“分子开关”作用将细胞外信号转导入细胞内^[1~3],阻断 ras 蛋白通道,有可能同时截止多种生长因子对 SMC 生物学行为的作用,从而达到抑制 SMC 增殖或收缩的目的。本研究以碱性纤维母细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)作用后增殖的 SMC 为模型,设计并合成了在真核类细胞中具有活性功能的三种 ras 蛋白反义寡聚脱氧核苷酸(oligodeoxynucleotides, ODN),观察其对增殖的血管 SMC DNA 合成及增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)表达的影响,旨在初步揭示 ras 蛋白在调控生长因子促细胞增殖的信号传导通路中的作用及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 反义 ras-寡聚脱氧核苷酸的序列设计与合成

通过基因库(genebank, 中山医科大学分子生物学中心)查出 G 蛋白基因的 cDNA 序列,通过计算机设计出可特异性结合到相应小分子 G 蛋白 mRNA 上的反义 ODN 序列 I、II 和 III,同时设置相应的正义 ODN 序列 IV、V 和 VI,以作对照。各序列如下:

I. 5'-AGCTTGATTTCTGTCATCG-3';

II. 5'-CAGTTTGTACTCAGTCAT-3';

III. 5'-CAAGTTTATACTCAGTCAT-3';

IV. 5'-CGATGACAGAATACAAGCT-3';

V. 5'-ATGACTGAGTACAACTG-3';

VI. 5'-ATGACTGAGTATAAACTTG-3'。

为确保 ODN 进入细胞后既不易被 RNA 酶降解,又使其能容易结合到相应的 mRNA 上,在 ODN 的两端分别进行了硫代磷酸化修饰。寡聚脱氧核苷酸由中国科学院上海细胞生物学研究所合成。

1.2 反义寡聚脱氧核苷酸稳定性的检测

血管平滑肌细胞用含 20%胎牛血清的 DMEM 培养基(Gibco BRL)培养。加入的反义或正义 ODN 终浓度均为 6 $\mu\text{mol/L}$,在培养 1、3、6 和 9 天后各取 20 μL 培养液,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(16%的微型胶)后银染。

1.3 细胞培养及鉴定

用贴块法培养血管平滑肌细胞。在无菌条件下分离 Wistar 大鼠的主动脉,去内膜和外膜,将中膜平滑肌组织块剪碎,用少量培养液一同种植到 25 mL 的培养瓶中。37°C 5%CO₂ 培养箱中静置培养。20 天左右细胞达融合。用 0.0625%胰蛋白酶消化传代。实验用第 3~10 代 SMC。

用倒置相差显微镜直接观察细胞,透射电镜观察的细胞按常规电镜制作方法制作。

1.4 实验分组及数据统计

实验共分四组:①阳性对照组, bFGF+PBS;②实验对照组, bFGF+正义 ras-ODN;③阴性对照组, 0.5%FCS 的 DME+PBS;④实验组, bFGF+正义 ras-ODN。

每组实验设 3 孔,重复 3 次。结果取其均值士标准差($\bar{x}\pm s$),先进行组间方差齐性检验,再进行 t 或校正 t' 检验。

1.5 氘标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入试验

参照孙丛梅等^[4]的方法。取 $2.5\times 10^5/\text{L}$ 细胞 100 μL 种植到 96 孔培养板中,20%FCS DME 培养 24 h 后,用 0.5% FCS DME 培养液培养 72 h,弃换含 bFGF (100 mg/L)的无血清 DME 培养液,同时加入反义或正义 ODN 至终浓度 6 $\mu\text{mol/L}$,分别继续培养 10 h 和 22 h 后加入 ³H-TdR (1 $\mu\text{Ci}/\text{孔}$),37°C 孵育 2 h 后,加 NaOH 和 HCl 使细胞破碎,置于闪烁液中用 LKB 液体闪烁计数仪测每分钟计数(counts per minute, cpm)值。按下式计算 DNA 合成抑制率:

$$\text{DNA 合成抑制率} = \left(1 - \frac{\text{实验组 cpm 值}}{\text{阳性对照组 cpm 值}}\right) \times 100\%$$

1.6 细胞生长抑制实验

细胞培养液换成 0.5%FCS DME 培养 72 h 后,换成含 bFGF(100 mg/L)的无血清 DME 培养液,同时加入反义或正义 ODN 分别至终浓度 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 、3 $\mu\text{mol/L}$ 、6 $\mu\text{mol/L}$ 和 9 $\mu\text{mol/L}$,分别培养 1 d、3 d、6 d 和 9 d 后计数细胞(每隔 48 h 加一次 bFGF)。按下式计算细胞生长抑制率:

$$\text{细胞生长抑制率} = \left(1 - \frac{\text{实验组净生长数}}{\text{阳性对照组净生长数}}\right) \times 100\%$$

1.7 增殖细胞核抗原蛋白表达

鼠抗 PCNA 抗体及 LSAB 试剂盒从 Dako 公司购买,细胞以 5 000/cm² 的密度种植到 96 孔培养板中,24 h 后弃换 DME(含 0.5%的胎牛血清及浓度为 6 $\mu\text{mol/L}$ 的正义或反义 ODN),对照组加等量的 PBS。72 h 后加 bFGF,继续培养 24 h,用免疫细胞化学检测。方法按 LSAB 试剂盒说明书进行:固定、正常兔血清(1:20 稀

释)封闭抗 PCNA 抗体(1:150 稀释)和兔抗鼠二抗体(1:400 稀释),SA(streptavidin)(1:400 稀释)免疫检测、DAB 显色,倒置镜下观察和拍照。

2 结果

2.1 血管平滑肌细胞鉴定

倒置镜下,SMC 呈梭形、“峰与谷”结构。透射电镜下,胞浆中含肌丝并见典型的 SMC 独有的密体和密斑(图 1,Figure 1)。



Figure 1. Identification of the cultured rat aortic smooth muscle cell (transmission electron microscopic picture, $\times 15\ 000$). Arrows show density body or plaque and filaments.

2.2 反义寡聚脱氧核苷酸的稳定性

5',3'端硫代磷酸化的反义 ODN(终浓度 $6\ \mu\text{mol/L}$)在 DME 培养基中 6 天是稳定的,9 天时,仍有反义 ODN 未完全被降解(图 2, Figure 2)。在加入正义的 ODN 培养液中亦可获得类似结果。

2.3 对血管平滑肌细胞 DNA 合成的影响

$6\ \mu\text{mol/L}$ 反义 ODN 作用于 SMC 12 h 和 24 h 后对细胞 $^3\text{H-TdR}$ 掺入的影响见图 3(Figure 3)。经计算,对 DNA 合成的抑制率分别为 95%和 90%;相同的对照组正义 ODN 对 SMC $^3\text{H-TdR}$ 掺入的抑制率仅为 41%和 26%,其差异极具显著性($P < 0.001$)。

2.4 对血管平滑肌细胞增殖的影响

加入反义 ODN 后第 3、6 和 9 天,对 SMC 的抑制率分别为 90%、61%和 21%。而相同浓度的正义 ODN 抑制率分别为 36%、19%和 9%

(图 4, Figure 4)。



Figure 2. Stability of antisense ODN modified with phosphorothioate (arrow shows AS-ODN). lane 1, PBS; Lane 2~6, electrophoresis results at 0 h, 1 d, 3 d, 6 d and 9 d after adding ODN into medium respectively.

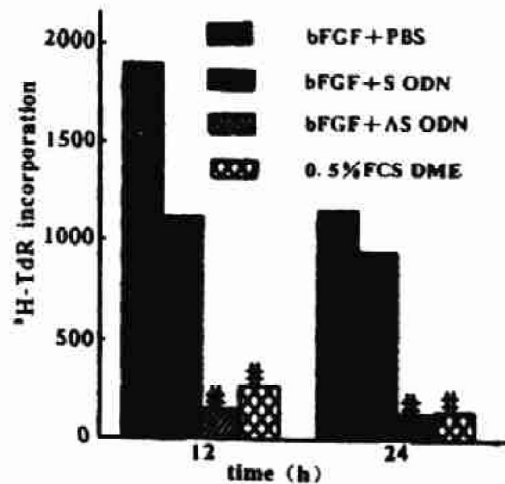


Figure 3. The time-related effects of ODN ($6\ \mu\text{mol/L}$) on $^3\text{H-TdR}$ incorporation in SMC. #: $P < 0.001$, compared with control group.

2.5 对血管平滑肌细胞中增殖细胞核抗原蛋白表达的影响

光镜下,SMC PCNA 蛋白表达阳性的细胞核呈棕黄色,阴性细胞核不着色或着色很浅。如图 5(Figure 5)所示,反义 ras-ODN 可减少 SMC PCNA 蛋白的表达,细胞 PCNA 蛋白表达基本呈阴性(A),与阴性对照组结果相似。正义 ODN 对照组 SMC PCNA 蛋白表达阳性的细胞很多(B),与阳性 bFGF 组 SMC PCNA 蛋白表达阳性的细胞数基本相同。

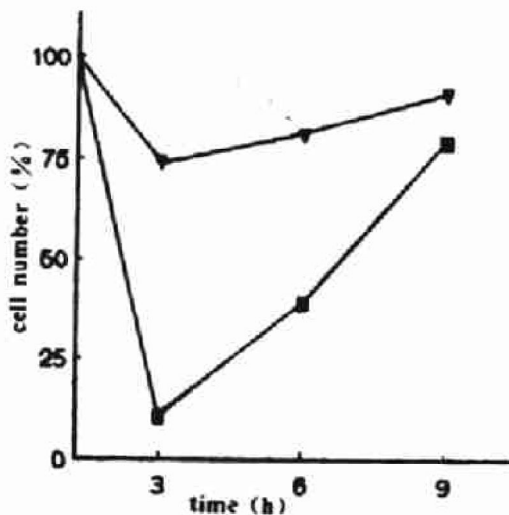


Figure 4. The time-related effects of ODN (6 μmol/L) on inhibitory rate of SMC proliferation. —□—: bFGF+AS ODN; —▼—: bFGF+S ODN.

3 讨论

动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄的发病机理十分复杂,除了与多基因遗传有关外,与内外环境因素的关系亦甚为密切。其病变的重要病理基础主要表现为血管平滑肌的张力增高和细胞异常增殖。许多研究显示,生长因子和血管活性多肽分别通过酪氨酸激酶受体途径和G蛋白偶联受体途径促进细胞增殖,而两条代谢途径均受G蛋白控制^[1~3]。前者主要由小分子G蛋白(ras蛋白)的“分子开关”作用控制^[1]。这些生长因子主要有:血小板源性生长因子(PDGF)、纤维母细胞生长因子(FGF)、表皮生长因子(EGF)和胰岛素样生长因子(IGF)等,它们都是很强的致SMC增殖的有丝分裂源。但到目前为止,对ras蛋白调控生长因子的分子机制仍不清楚,很少有关于可通过调控ras蛋白截止生长因子信号以抑制SMC增殖的报道。本实验使用生长因子bFGF刺激SMC增殖为模型,施加反义ras-ODN,试图通过减少ras蛋白而中断生长因子的信号通道,初步探讨抑制SMC增殖的可能性。实验发现反义的ras-ODN对bFGF作用下的SMC DNA合成具有明显的

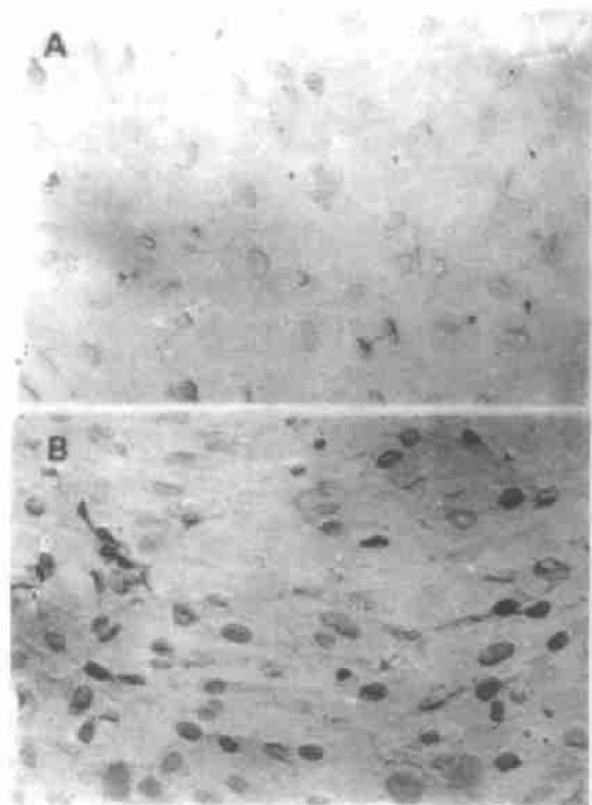


Figure 5. Effect of oligodeoxynucleotides (6 μmol/L) on the expression of PCNA protein in SMC (LSAB method, ×200). Arrow shows PCNA protein positive cell.

抑制作用。与阳性对照组相比,12 h实验组对SMC DNA合成的抑制率达92%($P < 0.001$); 24 h抑制率仍然达90%($P < 0.001$),细胞计数显示反义ras-ODN对SMC增殖的抑制率分别达90%和61%,呈剂量和时间依赖性。提示反义ras-ODN可以明显阻断bFGF对SMC的促DNA合成作用从而抑制了SMC的增殖。以往研究用ras蛋白抗体注入静止期的纤维母细胞,可同时拮抗多种生长因子对细胞的促增殖作用^[4]。我们在联合应用反义ras-ODN和三聚体G蛋白ODN抗血清刺激SMC增生的研究中也得到了类似的结果^[7]。进一步说明了ras蛋白在生长因子信号通道中的“分子开关”作用。

为了解反义ras-ODN对SMC抑制作用的分子机制,本实验观察了SMC PCNA蛋白表达。结果显示:反义ras-ODN可使SMC中PCNA蛋白表达减少。文献[8]报道,PCNA在细胞周期中促使细胞由G1期进入S期,并在S

为了解反义 ras-ODN 对 SMC 抑制作用的分子机制,本实验观察了 SMC PCNA 蛋白表达。结果显示:反义 ras-ODN 可使 SMC 中 PCNA 蛋白表达减少。文献[8]报道,PCNA 在细胞周期中促使细胞由 G1 期进入 S 期,并在 S 期时作为 DNA delta 多聚酶的复合因子促进 DNA 的复制和转录,导致细胞的增殖。因此在 S 期时 PCNA 蛋白表达是增加的,可用作细胞增殖的标志^[9]。我们的实验进一步证实了上述结论,反义 ras-ODN 可使 SMC 中 PCNA 蛋白表达明显减少,同时 SMC DNA 合成亦被抑制,而相应的阳性对照组和实验对照组呈强 PCNA 蛋白表达阳性反应。

本实验设计的反义小分子 G 蛋白为 18 和 19 个碱基对组成的寡聚脱氧核苷酸,分别与其相应的 cDNA 转录起始区互补,可在复制、转录等水平上抑制 ras 蛋白的表达,相应实验对照组的正义寡聚脱氧核苷酸与 cDNA 起始序列无互补性,以衡量寡聚脱氧核苷酸对本实验系统的非特异影响。为确保寡聚脱氧核苷酸被摄入细胞后既不易被 RNA 酶降解,同时又能与相应的互补序列结合牢固,在寡聚脱氧核苷酸的 3' 和 5' 端均进行了硫代磷酸化修饰,在 DME 培养液中 9 天后仍然是稳定的,证明这种修饰是有效的。

与 bFGF 组相比,加入正义 G 蛋白 ODN 也显示出对 SMC 有一定的抑制作用,可能是 ODN 本身对细胞产生的非特异性的毒副作用,在其它的一些反义 ODN 的研究中也发现有高的非特异性毒副作用^[4],因此有学者认为非特异性作用可能也是 ODN 的作用机制之一^[10],这将成为以后 ODN 应用研究中急待解决的重要的理论问题。

以上结果说明,反义 ras-ODN 能明显抑制在 bFGF 作用下 SMC 的 DNA 的合成和 SMC 增殖,同时对调控细胞生长的 PCNA 蛋白表达也有抑制作用。反义 ras-ODN 对 SMC 基因的表达及其它生物学行为也有重要的影响(另文

发表)。该策略的应用有可能解决一大批以生长因子增生为主的增生性疾病的临床问题,同时为新药的开发提供广阔的前景。

参考文献

- 1 李朝红, 邓漪平. G 蛋白在调节血管平滑肌功能活动中的作用. 国外医学·生理病理科学与临床分册, 1997, 2: 109~111.
- 2 Fantl WJ. Signaling by receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem*, 1993, 62: 453~481.
- 3 Watanabe T, Wagal, Honda ZI, et al. Prostaglandin F₂ α stimulates formation of P21^{ras}-GTP complex and mitogen-activated protein kinase in NIH-3T3 cells via Gq-protein-coupled pathway. *J Biol Chem*, 1995, 270(15): 8984~990.
- 4 Storozhevychk TP. The effect of endothelin-1 on vascular adrenergic reactivity: The participation of G-proteins and protein kinase C in vascular constriction under the action of endothelin-1. *Biull-Eksp Biol Med*, 1993, 1116(10): 374~376.
- 5 孙丛梅, 王东, 周爱儒. TGF α 反义寡聚核苷酸对膀胱癌 BIU87 细胞株的作用. 生物化学与生物物理进展, 1994, 21(5): 377~381.
- 6 Shaw LA, Rudin M, Cook NS. Pharmacological inhibition of restenosis; learning from experience. *Tips*, 1995, 16: 401~404.
- 7 Mulcahy LS, Smith MR, Stacey DW. Requirement for ras protooncogene function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells. *Nature*, 1985, 313: 241~244.
- 8 李朝红, 邓漪平. 反义 G 蛋白对大鼠血管平滑肌增殖的影响. 中山医科大学学报, 1997, 18(增刊): 9~13.
- 9 Speir E, Epestin SW. Inhibition of smooth muscle cell proliferation by an antisense oligonucleotide targeting the messenger RNA encoding proliferating cell nuclear antigen. *Circulation*, 1992, 86: 538~547.
- 10 Bravo R, Macdonald-Bravo H. Induction of the nuclear protein cyclin in quiescent mouse 3T3 cells stimulated by serum and growth factors; correlation with DNA synthesis. *EMBO J*, 1984, 3: 177~181.
- 11 Jansen B, Wadl H, Inoue SA, et al. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides reduce melanoma growth in a SCID-hu mouse model by a nonantisense mechanism. *Antisense Res Dev*, 1995, 5(4): 271~277.

(1996-08-04 收到, 1997-08-13 修回)