

反义 *c-myc* RNA 的表达对大鼠血管平滑肌细胞 *c-myc* mRNA 和 c-Myc 蛋白水平的影响

王家宁^① 胡大一 陈文彦 高天祥

(首都医科大学附属北京红十字朝阳医院心脏中心, 北京 100020)

Effect of Antisense *c-myc* RNA on *c-myc* mRNA and c-Myc Protein Expression in Rat Aortic Smooth Muscle Cells

WANG Jia-Ning, HU Da-Yi, CHEN Wen-Yan and GAO Tian-Xiang

(The Heart Center, Beijing Red Cross Chaoyang Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100020, China)

ABSTRACT

Aim Antisense *c-myc* retrovirus vector was constructed and was introduced into smooth muscle cell (SMC) by Lipofection. The effect of antisense *c-myc* RNA on *c-myc* mRNA and c-myc protein expression in SMC was investigated, exploring the new strategy for gene therapy for diseases of *c-myc* overexpression.

Methods 1.53 kb *c-myc* fragment including a part of the first intron, the second exon and first 8 bp of the second intron was placed under 5'LTR downstream of P^{LSN} in inverted orientation. Antisense *c-myc* retrovirus vector was introduced into PA317 packaging cells by Lipofection and selected by G418. SMC were infected with this recombinant retrovirus. Northern blot, and Western blot hybridizations were performed in SMC transfected by antisense *c-myc* retrovirus vector to observe whether it was integrated into SMC genomic DNA, whether antisense *c-myc* RNA expressed in SMC and whether the expression of antisense *c-myc* RNA reduced *c-myc* mRNA expressed in SMC and whether the expression of antisense *c-myc* RNA re-

duced *c-myc* mRNA and c-Myc protein levels.

Results Southern blot analysis confirmed the integration of the antisense *c-myc* retrovirus vector into SMC genomic DNA. Northern blot analysis demonstrated the expression of antisense *c-myc* RNA and the latter reduced the level of *c-myc* mRNA. Western blot analysis showed antisense *c-myc* RNA inhibited the translation of c-Myc protein, whereas sense *c-myc* RNA didn't have such effect.

Conclusion Antisense *c-myc* RNA inhibited the expression of *c-myc* mRNA and c-Myc protein in a sequence-specific manner. Antisense *c-myc* RNA is an efficient tool to inhibit the expression of *c-myc* gene expression. This investigation provides a basis for future study using antisense *c-myc* RNA for gene therapy for diseases of *c-myc* overexpression inducing malignant tumors and some cardiovascular diseases.

KEY WORDS Smooth muscle cells; *c-myc* antisense; c-Myc protein

摘要 为探讨反义 *c-myc* 逆转录病毒载体是否影响血管平滑肌细胞表达 *c-myc* mRNA 和 c-Myc 蛋白水平,用基因重组方法,将第二外显子及其两侧部分内含子共 1.53 kb 序列的 *c-myc* 基因片段反向连接于 P^{LSN} 的 5'末端重复序列下游,通过 Lipofectin 将反义 *c-myc* 逆转录病毒导入 PA317 包装细胞系,并经 G418 筛选获得抗性克隆。反义 *c-myc* 逆转录病毒上清液转染的平滑肌细胞经 DNA 印迹杂交和 RNA 印迹杂交及蛋白印迹杂交证实其是否整合于平滑肌细胞基因组中,有无反义 *c-myc* RNA 表达及表达的反义 *c-myc* RNA 对平滑肌细胞 *c-myc* mRNA 和 c-Myc 蛋白表达的影响。结果发现,反义 *c-myc* 逆转录病毒载体能整合于平滑肌细胞基因组中,RNA 印迹杂交和蛋白印迹杂交发现反义 *c-myc* RNA 显著抑制了平滑肌细胞 *c-myc* mRNA 和 c-Myc 蛋白的表达,而正义 *c-myc* RNA 对其无影响。

^① 现在郧阳医学院附属太和医院心内科,湖北省十堰市 442000

此实验结果说明反义 *c-myc* RNA 是以序列特异性方式抑制 *c-myc* 基因表达的有效工具, 这为 *c-myc* 基因过度表达的疾病的基因治疗提供了一种新的途径。

关键词 肌, 平滑; *c-myc* RNA, 反义; c-Myc 蛋白

反义核酸技术不仅是研究相应基因表达与调控的有力手段^[1~3], 而且为肿瘤、心血管疾病和病毒性疾病的治疗带来了新的希望。*c-myc* 基因的过度表达参与了心血管系统多种疾病的发生过程, 包括高血压、动脉粥样硬化和血管成形术后再次狭窄^[4]。推测抑制 *c-myc* 基因表达的反义战略有可能防治这些心血管疾病。为此, 将 *c-myc* 基因片段反向连接于逆转录病毒载体 P^{LXSN} 5' 长末端重复 (long terminal repeat, LTR) 序列的下游, 并导入 PA317 包装细胞和大鼠主动脉平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) 以观察反义 *c-myc* RNA 有无表达和表达的反义 *c-myc* RNA 对大鼠主动脉平滑肌细胞内 *c-myc* mRNA 和 c-Myc 蛋白水平的影响, 为采用反义 *c-myc* RNA 防治 *c-myc* 过度表达的心血管疾病打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒 P^{LXSN} 为逆转录病毒载体, 5.838 kb, 在 5'LTR 序列下游有一个含 9 种单一酶切位点的多克隆区域供外源基因插入, 具有氨苄青霉素和新霉素抗性; P^{bc-myc} 为 PBR322 中插入了人 *c-myc* 全长基因组, 经 *sacI* 酶切后可获得 1.53 kb 的 *c-myc* 基因片段。 P^{LXSN} 和 P^{bc-myc} 由北京市肿瘤防治研究所提供。

1.1.2 细胞系 病毒包装细胞 PA317 为噬双向性小鼠白血病病毒基因组 DNA 转染的 NIH3T3 细胞系而建株的, 由中国医学科学院肿瘤研究所免疫室提供。

1.1.3 酶类 *EcoRI*、*Hind III*、*Bgl II*、*Sac I*、*Kpn I*、*Xho I*、*BamH I* 和 DNA 聚合酶 I 大片段, *T₄* DNA 聚合酶、牛小肠碱性磷酸酶 (calf intestinal alkaline phosphatase, CIAP)、*T₄* DNA 连接酶均购自 Promega 公司。

1.1.4 抗体 抗 *c-myc* 单克隆抗体可与鸡、小鼠、大鼠和人 c-Myc 蛋白反应, 购自美国 Santa Cruz Biotechnology Inc。

1.1.5 探针 2.0 kb β -actin cDNA 探针购自华美生物工程公司, 1.53 kb *c-myc* 基因探针和 1.393 kb 基因探针自制。

1.1.6 其它试剂 DNA 标记和检测试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司, G418、Polybrene、MOPS 和异硫氰酸胍购自 Sigma 公司, DMEM、Lipofectin 和胎牛血清购自 GIB CO/BRL 公司。

1.1.7 实验动物 培养原代 SMC 所用的 Sprague Dawley 大鼠体重为 150~180 克左右, 月龄在 1 个月左右, 雄性, 购自首都医科大学动物室。

1.2 培养大鼠血管平滑肌细胞

参照文献[5], 采用贴块法培养大鼠主动脉平滑肌细胞并传代。

1.3 构建正义和反义 *c-myc* 逆转录病毒载体

P^{LXSN} 经 *BamH I* 酶切后, 低熔点琼脂糖回收, 经 Klenow 片段抹平 *BamH I* 酶切后突出的 5' 粘性末端, 经 CIAP 使载体去磷酸化。 P^{bc-myc} 质粒经 *Sac I* 酶切后, 低熔点琼脂糖回收 1.53 kb 的酶切片段, *T₄* DNA 聚合酶删去 3' 突出末端。经去磷酸化的 5.838 kb 的载体线片段与 1.53 kb *c-myc* 基因片段在 12℃ 连接 16 h 后, 转化感受态大肠杆菌, 培养 24 h, 挑选阳性克隆经小量扩增后, 快速提取质粒。提取的质粒经 *Xho I* 和 *Bal II* 酶切, 鉴定正义 *c-myc* 和反义 *c-myc* 的逆转录病毒载体。

1.4 Lipofectin 介导的 DNA 转染 PA317 包装细胞

参照文献[6], 将贴壁生长的细胞 (5×10^5) 接种于直径为 60 mm 的平皿中, 37℃ 5% CO_2 培养至 80% 相互接触时换新鲜培养液继续培养 2~3 h 用于转染。用无血清培养基将 20 μ g DNA 稀释至 50 μ L, 然后与 50 μ L (1 g/L) Lipofectin 在一个无菌的 Eppendorff 管中混合, 室温静置 17 min。以无血清培养基洗培养皿二次, 然后加入 3 mL 无血清培养液, 将 DNA-Lipofectin 混合液缓慢均匀加入培养液中, 37℃ 5% CO_2 孵育约 24 h, 加等体积含双倍血清的培养液, 继续培养约 72 h, 换液并传代, 并加 G418 (400 mg/L) 选择培养, 筛选出阳性克隆。

1.5 病毒上清液感染靶细胞

参照文献[7], 以 PBS 洗培养细胞一次。按 1:1 感染强度加入病毒上清液、8 mg/L polybrene 和无血清培养液至 2 mL, 37℃ 孵育约 3 h, 孵育时每隔 15 min 轻摇一次, 使之充分接触。然后加入双倍胎牛血清新鲜培养液稀释, 37℃ 5% CO_2 孵育至 48 h, 细胞按 1:10 传代, 并加入 400 mg/L G418 筛选, 每隔 3~4 天换液一次,

直至阳性克隆出现。

1.6 探针的制备与标记

参照文献[8],用 Sac I 酶切 P^{hsc-myc} 后经低熔点琼脂糖回收获得 1.53 kb *c-myc* 基因片段;经 Kpn I 和 Hind III 酶切获得 1.393 kb neo 基因片段。所有基因探针均采用地高辛标记试剂盒进行标记,并进行敏感性和特异性检测。

1.7 DNA 印迹杂交

参照文献[8],真核细胞基因组 DNA 提取后,经 Kpn I 酶切或 Kpn I /Hind III 双酶切后,进行琼脂糖凝胶电泳,真空转膜,与地高辛标记的 *c-myc* 基因探针杂交,免疫检测,显色,照相。

1.8 RNA 印迹杂交

参照文献[9],细胞总 RNA 提取后,经甲醛变性琼脂糖凝胶电泳,真空转膜,杂交,显色,照相。

1.9 蛋白印迹杂交

参照文献[10],培养细胞总蛋白质提取后,经不连续十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,再转移至硝酸纤维素膜上,免疫化学显色,照相。

2 结果

2.1 正义 *c-myc* 和反义 *c-myc* 逆转录病毒载体的酶切鉴定

提取的质粒 DNA 经 Xho I 和 Bgl II 酶切后电泳发现反义 *c-myc* 逆转录病毒载体出现 7.346 kb 和 23 bp 两个片段,正义 *c-myc* 逆转录病毒载体酶切后出现 5.852 kb 和 1.517 kb 两个片段(图 1, Figure 1)。

2.2 DNA 印迹杂交结果

正义 *c-myc* 和反义 *c-myc* 逆转录病毒载体和 P^{LXSN} 转染的 SMC 的基因组提取后经 Kpn I 或 Kpn I /Hind III 酶切后都出现了一条大于 7 kb 的内源性 *c-myc* 杂交带。而在正义 *c-myc* 和反义 *c-myc* 逆转录病毒载体转染的 SMC 的基因组 DNA 经 Kpn I 或 Kpn I/Hind III 酶切后出现了 2.878 kb 的杂交带(图 2, Figure 2)。为了证实外源基因在 SMC 中未发生重排,以 1.393 kb 的 neo 基因探针进行杂交, P^{LXSN}、正义 *c-myc* 和反义 *c-myc* 逆转录病毒载体转染的 SMC 基因组 DNA 经 Kpn I/Hind III 酶切后出现了 1.393 kb 的杂交带,而经 Kpn I 酶切后分别出现

了 2.741 kb、4.271 kb 和 4.271 kb 的杂交带。此结果说明外源性 *c-myc* 基因片段完全整合于 SMC 基因组中,未发生重排与丢失。



Figure 1. Identification of sense *c-myc* and antisense *c-myc* retrovirus vectors by endonuclease digest analysis. A. λ DNA Hind III marker. B. purified 1.53 kb *c-myc* gene fragment. C. a 5.838 kb purified P^{LXSN} fragment digested by BamHI. D. sense *c-myc* retrovirus vector digested by Xho I / Bgl II, 5.852 kb, 1.517 kb. E. antisense *c-myc* retrovirus vector digested by Xho I / Bgl II, 7.346 kb, 23 bp. F. P^{hsc-myc} treated by Sac I. G. λ DNA EcoRI/Hind III marker.

2.3 RNA 印迹杂交结果

正义 *c-myc* 和反义 *c-myc* 逆转录病毒载体转染的平滑肌细胞 RNA 提取后以 1.53 kb *c-myc* 基因探针检测 *c-myc* mRNA 和外源性插入片段的表达。结果发现除了有一条内源性 *c-myc* mRNA 的杂交带外,尚有外源性插入的表达。反义 *c-myc* RNA 的表达显著降低了内源性 *c-myc* 的水平,而正义 *c-myc* RNA 的表达对内源性 *c-myc* mRNA 的表达无影响。此结果说明反义 *c-myc* RNA 的表达对内源性 *c-myc* mRNA 的表达抑制作用具有序列特异性(图 3, Figure

3)。

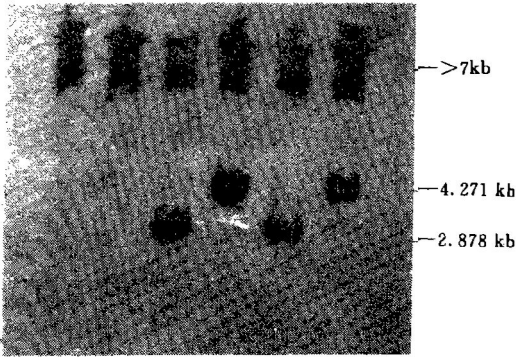


Figure 2. Southern blot hybridization with 1.53 kb *c-myc* probe demonstrating P^{LXSN}, sense *c-myc* and anti-sense *c-myc* retrovirus vectors integration into SMC genomic DNA. A >7 kb endogenous *c-myc* genomic DNA hybridization band appears in each group. There are exogenous hybridization by sense or antisense *c-myc* retrovirus, a 4.271 kb band appears when treated with Kpn I, a 2.878 kb band occurs when digested by Kpn I /Hind III.

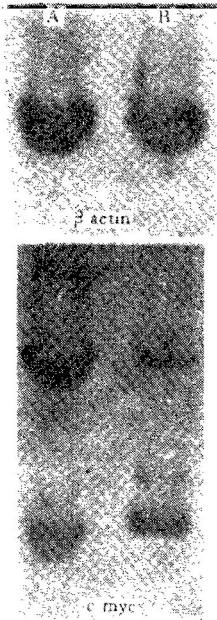


Figure 3. The inhibitory effect of antisense *c-myc* RNA on *c-myc* mRNA expression in SMC. A. SMC transfected by sense *c-myc* retrovirus vectors. B. SMC transfected by antisense *c-myc* retrovirus vectors.

2.4 蛋白印迹杂交结果

反义 *c-myc* 逆转录病毒载体转染的 SMC

中 c-Myc 蛋白水平明显降低,而正义 *c-myc* 逆转录病毒载体转染的 SMC 中 c-Myc 蛋白的水平无明显降低(图 4, Figure 4)。此结果说明反义 *c-myc* RNA 的表达显著抑制了 c-Myc 蛋白的表达。

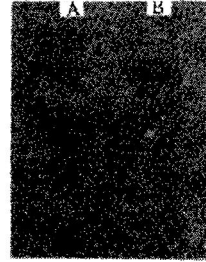


Figure 4. The inhibitory effect of antisense *c-myc* RNA on *c-myc* mRNA c-Myc protein expression in SMC. A. SMC transfected by antisense *c-myc* retrovirus vectors. B. SMC transfected by sense *c-myc* retrovirus vectors.

3 讨论

目前反义寡脱氧核苷酸(oligodeoxynucleotide, ODN)已用于肿瘤、病毒性疾病和心血管疾病的实验研究或临床试验。由于反义 ODN 容易降解,作用时间不持久,临床用量过大,合成费用昂贵,在某种程度上限制了它的临床应用。为克服上述困难,本研究尝试着构建了可表达反义 *c-myc* RNA 的逆转录病毒载体,将其导入 SMC 后,通过其表达的反义 RNA,观察反义 *c-myc* RNA 对内源性 *c-myc* mRNA 和 c-Myc 蛋白水平的影响,以期防治那些 *c-myc* 基因过度表达的疾病打下基础。

逆转录病毒是目前应用最广泛的基因运载工具,它独特的生活周期使外源基因随机插入和整合到宿主细胞中,并随着细胞分裂增殖而持续有效地表达。反义 RNA 技术已被广泛用于特异性降低或封闭细胞中特定基因的表达^[2,3,11]。反义 RNA 可由人工构建的真核表达载体导入细胞所产生。反义 RNA 是与靶 mRNA 互补的 RNA,它将靶基因的原始转录产物限制于核内,以避免在细胞浆中需抑制极其巨

大数量的靶 RNA,而起到把问题解决在萌芽状态的独特作用。这种模拟真核生物天然存在的反义 RNA 封闭基因表达机制的高效方法,无疑开辟了一条抑制基因表达的新途径。

考虑到真核基因的起始密码区在基因转录和调控中起重要作用及内含子与外显子的拼接区对 mRNA 前体加工的重要性,包括第二外显子及其两侧部分内含子序列在内的 1.53 kb 的 *c-myc* 基因片段反向连接于逆转录病毒载体 5' LTR 序列下游,该基因受 5'LTR 序列中的启动子和增强子调控。反义 *c-myc* 逆转录病毒载体转染的 SMC 中,表达的反义 *c-myc* RNA 和 *c-myc* mRNA 互补,可阻断 mRNA 前体在第二、三外显子处的拼接,同时阻断其转运至胞浆中进行翻译。反义 RNA 和 mRNA 结合后,诱导 RNase H 的活性,导致靶 mRNA 降解,间接抑制翻译。这可能是反义 *c-myc* 逆转录病毒载体转染的 SMC 中表达的反义 *c-myc* RNA 降低 *c-myc* mRNA 和 c-Myc 蛋白的原因。为了证实反义 *c-myc* RNA 作用的特异性,本研究同时构建了正义 *c-myc* 的逆转录病毒载体,并观察了正义 *c-myc* RNA 对 *c-myc* 表达的影响。

增殖、分化和凋亡是细胞的基本生命现象,由众多基因在特定时空进行有序的调控而实现的。序列特异的 DNA 结合蛋白 c-Myc 与其它 DNA 结合蛋白协同,调控那些与细胞增殖、分化和凋亡有关基因的表达。在高血压、动脉粥样硬化及血管成形术后再狭窄有 *c-myc* 基因过度表达。因反义 *c-myc* RNA 可特异性抑制 *c-myc* 基因的表达,本研究为那些 *c-myc* 基因过度表达的疾病包括多种心血管疾病的基因治疗奠定了基础。

参考文献

- 1 Murray J, Crockett N. Antisense techniques: an overview. In: Murray J (ed). *Antisense DNA and RNA*. New York: Wiley-liss Inc, 1992; 1~49.
- 2 Weitraub H, Izant JG, Harland RM. Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis. *Trends Genet*, 1985, **1**: 22~35.
- 3 Green RJ, Pines O, Inouye M. The role of antisense RNA in gene regulation. *Ann Rev Biochem*, 1986, **55**: 569~579.
- 4 Miano JM, Tota RR, Vlasovic M, et al. Early proto-oncogene expression in rat aortic smooth muscle cells following endothelial removal. *Am J Pathol*, 1990, **137**: 761~765.
- 5 Ross R. The smooth muscle. **I**. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol*, 1971, **50**: 63~68.
- 6 Felger J, Martin M, Tsai T, et al. Cationic lipid-mediated transfection in mammalian cells: "Lipofection". *J Tissue Cult Meth*, 1993, **15**: 63~68.
- 7 Ray J, Gage FH. Production of genetically modified cells expressing specific transgenes by retroviral vectors for gene therapy. *J Tissue Cult Meth*, 1993, **15**: 108~115.
- 8 张平. 非放射性标记探针的 Southern 印迹杂交. 见: 王申五(主编). 基因诊断技术. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993; 119~127.
- 9 金坤林. 地高辛标记 DNA 探针的 Northern 印迹杂交. 见: 王申五(主编). 基因诊断技术. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993; 128~130.
- 10 刘强远, 缪时英. 外源基因在真核细胞中的表达. 见: 卢圣栋(主编). 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1993; 389~407.
- 11 Yokoyama K, Imamoto F. Transcriptional control of the endogenous myc proto-oncogene by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **94**: 7 363~367.

(1997-08-26 收到, 1998-02-27 修回)