

# 碱性成纤维细胞生长因子反义寡脱氧核苷酸抑制胰岛素诱导动脉平滑肌细胞增殖

欧大明<sup>①</sup> 刘革修 刘江华<sup>①</sup> 唐振旺<sup>①</sup> 陈临溪 黄红林 廖端芳

衡阳医学院药理学教研室, 衡阳 421001)

**主题词** 成纤维细胞生长因子, 碱性; 寡核苷酸, 反义; 肌, 平滑, 血管; 细胞培养; 胸腺嘧啶; 胰岛素; 基因表达; 大鼠

**摘要** 为研究胰岛素诱导的动脉平滑肌细胞增殖作用和碱性成纤维细胞生长因子反义寡脱氧核苷酸对培养的 Wistar 大鼠主动脉平滑肌细胞生长的影响。采用胰岛素和碱性成纤维细胞生长因子反义寡脱氧核苷酸处理培养的 Wistar 大鼠主动脉平滑肌细胞, Northern blot 检测碱性成纤维细胞生长因子基因 mRNA 表达, 并测定氘标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入和细胞计数。结果发现胰岛素能明显诱导平滑肌细胞碱性成纤维细胞生长因子 mRNA 表达和增殖, 且呈浓度依赖性。胰岛素浓度由 0.001 mg/L 增加到 1.0 mg/L, 平滑肌细胞增殖率由 10% 增加到 53%。碱性成纤维细胞生长因子反义寡脱氧核苷酸 (5  $\mu$ mol/L) 能明显抑制胰岛素诱导的平滑肌细胞碱性成纤维细胞生长因子 mRNA 表达和增殖, 氘标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入被抑制 41.1% (与对照组比较,  $P < 0.01$ ), 细胞计数被抑制 30.2% (与对照组比较,  $P < 0.01$ )。提示胰岛素可通过诱导平滑肌细胞碱性成纤维细胞生长因子的表达而促进动脉平滑肌细胞增殖, 碱性成纤维细胞生长因子反义寡脱氧核苷酸能有效抑制胰岛素诱导的平滑肌细胞的 DNA 合成及其增殖。

## Basic Fibroblast Growth Factor Antisense Oligodeoxynucleotides Inhibited Proliferation of Smooth Muscle Cells Induced by Insulin

OU Da-Ming, LIU Ge-Xiu, LIU Jiang-Hua, TANG Zheng-Wang, CHENG Lin-Xi, WANG Hong-Lin and LIAO Duan-Fang

Department of Pharmacology, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China)

**MeSH** Oligonucleotides, Antisense; Fibroblast Growth Factor, Basic; Muscle, Smooth, Vascular; Cell Culture; Thymidine; Insulin; Gene Expression; Rats

**ABSTRACT** **Aim** To study effect of insulin and basic fibroblast growth factor (bFGF) antisense oligodeoxynucleotides (ODN) on the growth of cultured rat artery smooth muscle cells (SMCs). **Methods** Antisense and sense ODNs of bFGF were added into SMC medium, bFGF gene expression was detected by Northern blotting, cell hyperplasia was evaluated by [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation and cell counting.

**Results** Insulin induced proliferation of cultured vascular SMCs in concentration-dependent way and bFGF mRNA expression. Insulin increased from 0.001 mg/L to 1.0 mg/L, the rate of SMC hyperplasia from 10% to 53%. Antisense ODN (5  $\mu$ mol/L) of bFGF significantly inhibited proliferation of SMCs, [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation by 41.1% ( $P < 0.01$ ), and cell number by 30.2% ( $P < 0.01$  vs control) respectively. **Conclusion** Insulin may enhance SMC proliferation by inducing bFGF gene expression, antisense ODNs of bFGF inhibited partly DNA synthesis and proliferation of cultured vascular SMC induced by insulin.

研究表明, 多种生长因子可引起血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的表型改变、迁移、增殖及合成大量细胞外基质, 从而导致动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 和血管成形术后再狭窄<sup>[1]</sup>, 其中尤以碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 作用重要<sup>[2]</sup>。高胰岛素血症是动脉粥样硬化的独立危险因素<sup>[3~5]</sup>。我们以前的研究显示胰岛素能促进 VSMC 增殖<sup>[6]</sup>。反义寡脱氧核苷

酸 (oligodeoxynucleotides, ODN) 能特异抑制 VSMC 的基因表达<sup>[7,8]</sup>, 故有可能成为动脉粥样硬化和血管再狭窄防治的新途径<sup>[9]</sup>。本研究以胰岛素诱导 VSMC 为模型, 研究 bFGF 反义 ODN 对其 bFGF 基因表达和增殖的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 反义寡脱氧核苷的合成及条件培养基的配制

碱性成纤维细胞生长因子反义和正义 ODN 设计位于 bFGF RNA 翻译起始区<sup>[10]</sup>: 5'-GGAGGGGC-CATG-3', 5'-CATGGCCCCTCC-3'。由上海生物

本文为国家自然科学基金资助课题 (99470809)

<sup>①</sup>衡阳医学院附属第一医院内科, 衡阳 421001

工程公司合成, HPLC 纯化。使用前用条件培养基配制 ODN, 终浓度为  $5 \mu\text{g/L}$ 。胰岛素 (北京生物制品药品检定所, 规格  $27 \text{ ku/g}$ ) 的标准液以生理盐水配制。实验时以含 5% 胎牛血清的 DMEM 配制成相应浓度的条件培养基。

## 1.2 实验分组

实验共分四组: ①胰岛素对照组; ②胰岛素 + 反义 ODN 实验组; ③阴性对照组; ④胰岛素 + 正义 ODN 实验组。每组实验设 6 孔, 重复 3 次。

## 1.3 细胞培养

用贴块法培养血管平滑肌细胞<sup>[6]</sup>。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, 种植到培养瓶, 10% 胎牛血清 (fetal calf serum, FCS) 的 DMEM,  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中静置培养。用 0.05% 胰蛋白酶消化传代。实验用第 3~4 代 VSMC, 传种于 24 孔培养板, 每孔约  $5.2 \times 10^4$  个细胞含 10% 胎牛血清的 DMEM。

## 1.4 氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入试验<sup>[6]</sup>

取  $4.5 \times 10^4/\text{L}$  细胞  $100 \mu\text{L}$  种植到 96 孔培养板中, 20% FCS DMEM 培养 24 h 后, 用 0.5% FCS DMEM 培养基培养 48 h, 弃换条件培养基, 同时加入反义或正义 ODN 至终浓度为  $5.0 \mu\text{mol/L}$ , 分别继续培养 10 h 和 22 h 后加氚标胸腺嘧啶脱氧核苷 ( $^3\text{H}$ -thymidine,  $^3\text{H}$ -TdR,  $37 \text{ kBq/孔}$ ),  $37^\circ\text{C}$  孵育 24 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值 (counts per minute, cpm)。按下式计算 DNA 合成抑制率:

$$\text{DNA 合成抑制率} = \frac{1 - (\text{实验组}^3\text{H-TdR 掺入})}{(\text{对照组}^3\text{H-TdR 掺入})} \times 100\%$$

## 1.5 细胞生长抑制实验

细胞培养基换成 0.5% FCS DMEM 培养 48 h 后, 换成条件培养基, 同时加入反义或正义 ODN 分别至终浓度为  $5.0 \mu\text{mol/L}$ , 分别培养 3 d 后计数细胞 (每隔 24 h 换液)。按下式计算细胞生长抑制率:

$$\text{细胞生长抑制率} = \frac{1 - (\text{实验组生长数})}{(\text{对照组生长数})} \times 100\%$$

## 1.6 Northern blot 分析

总 RNA 提取采用异硫氰酸胍酸酚一步法提取。紫外分光光度计 (PE 公司产) 测定 RNA 浓度。取  $15 \mu\text{g}$  RNA 作变性甲醛电泳、转印于硝酸纤维膜, 采用同位素 (福瑞同位素公司)<sup>32</sup>P-dCTP 随机引物标记探针杂交。操作见高等教育出版社出版的卢圣栋主编的《现代分子生物学实验技术》(1993 年, 第一版) 147 页的一步快速热酚抽提法、167 页的随机引物法和 198 页的膜上印迹杂交。

## 1.7 数据统计

结果取其均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ), 组间进行  $t$  或校正  $t'$  检验或成组设计方差分析。  $P < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 碱性成纤维细胞生长因子基因表达

胰岛素刺激的 VSMC 培养 12 h 后 bFGF mRNA 显著增高 (与无胰岛素刺激的 VSMC 相比)。bFGF 反义 ODN  $5 \mu\text{mol/L}$  能明显抑制胰岛素诱导的 VSMC bFGF mRNA 的表达; bFGF 正义 ODN  $5 \mu\text{mol/L}$  抑制胰岛素诱导的 VSMC bFGF mRNA 的表达作用不明显 (图 1, Figure 1)。

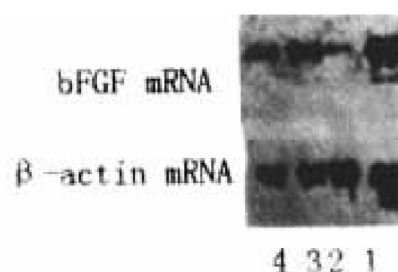


图 1. Northern 杂交检测 bFGF mRNA 表达

**Figure 1. Detection of bFGF mRNA expression by Northern blot.** 1. Insulin-treated VSMC RNA; 2. Insulin + bFGF antisense ODN-treated VSMC RNA; 3. Insulin + bFGF sense ODN-treated VSMC RNA; 4. untreated VSMC RNA to normalize the amount of RNA loaded into each lane, the membrane was rehybridized with  $\beta$ -actin cDNA probe

### 2.2 胰岛素诱导血管平滑肌细胞增殖

图 2 (Figure 2) 显示胰岛素能明显诱导 VSMC 增殖, 且呈浓度依赖性。胰岛素浓度由  $0.001 \text{ mg/L}$  增加到  $1.0 \text{ mg/L}$ , VSMC 增殖率由 10% 增加到 53%。胰岛素浓度  $0.1 \text{ mg/L}$  时, 在本实验中 VSMC 增殖率达到最大 (53%)。表 1 (Table 1) 显示血管平滑肌与  $^3\text{H}$ -TdR 及不同浓度胰岛素共同孵育 24 h, 胰岛素呈浓度依赖性刺激 VSMC 的 DNA 合成, 胰岛素浓度由  $0 \text{ mg/L}$  增加到  $1.0 \text{ mg/L}$ ,  $^3\text{H}$ -TdR 掺入由  $307 \text{ Bq/孔}$  增加到  $653 \text{ Bq/孔}$ 。胰岛素浓度  $0.1 \text{ mg/L}$  时, 在本实验中 VSMC 的  $^3\text{H}$ -TdR 掺入达到最大 ( $677 \text{ Bq/孔}$ )。所以后续实验以  $0.1 \text{ mg/L}$  作为胰岛素标准浓度。

### 2.3 碱性成纤维细胞生长因子 mRNA 反义寡脱氧核苷抑制胰岛素诱导的动脉平滑肌细胞增殖

由于合适浓度 ( $< 10 \mu\text{mol/L}$ ) 反义 ODN 的主要作用是通过抑制其相应基因的转录和翻译, 大于 10

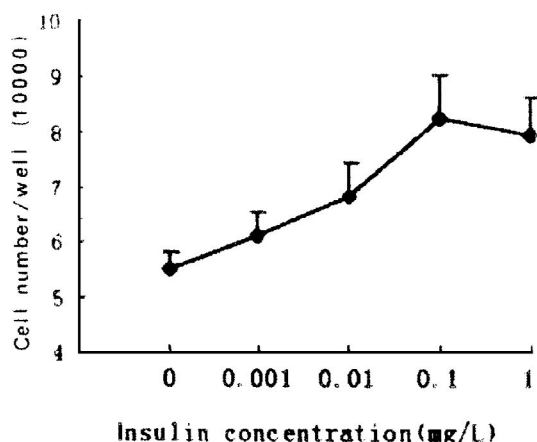


图 2. 胰岛素对血管平滑肌细胞增殖的作用

**Figure 2. Effects of insulin on cultured VSMC hyperplasia.**  
 $n = 6$ ,  $P < 0.01$  all, compared with control group (0 mg/L)

表 1. 胰岛素对血管平滑肌细胞 DNA 合成的影响

**Table 1. Effects of insulin on DNA synthesis of cultured VSMC ( $\bar{x} \pm s$ ).**

Insulin (mg/L)	n	[ $^3$ H] Thymidine (Bq/well)
0 (control)	6	307 $\pm$ 331
0.001	6	393 $\pm$ 47 <sup>a</sup>
0.01	6	468 $\pm$ 61 <sup>b</sup>
0.1	6	677 $\pm$ 76 <sup>c</sup>
1.0	6	653 $\pm$ 75 <sup>c</sup>

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , c:  $P < 0.001$ , compared with control group

表 2. 反义寡核苷酸对血管平滑肌细胞 DNA 合成和增殖的作用

**Table 2. Effects of bFGF antisense ODN on DNA synthesis and hyperplasia of cultured VSMC ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )**

Groups	$^3$ H-Thymidine (Bq/well)	Cell number ( $\times 10^4$ cells/well)
Control	314 $\pm$ 51	53 $\pm$ 4
Antisense (5 $\mu$ mol/L)	185 $\pm$ 41 <sup>a</sup>	37 $\pm$ 4 <sup>a</sup>
Sense (5 $\mu$ mol/L)	343 $\pm$ 65	57 $\pm$ 6

a:  $P < 0.01$ , compared with control group

$\mu$ mol/L ODN 则对细胞产生毒性作用,所以我们在本实验中使用 5  $\mu$ mol/L ODN。结果发现 5  $\mu$ mol/L bFGF 反义 ODN 使胰岛素诱导的 $^3$ H-TdR 的掺入降低 42% ( $P < 0.01$ ),使细胞增殖降低 26% ( $P < 0.01$ ) (表 2, Table 2)。

### 3 讨论

血管平滑肌细胞增殖在动脉粥样硬化形成过程中具有重要的作用 [1~13]。而高胰岛素血症和胰岛

素抵抗常常与高血压和动脉粥样硬化密切相关 [4]。体外研究显示胰岛素在生理浓度即可促进 VSMC 增殖,且在胰岛素非依赖性糖尿病病人血浆胰岛素水平升高,血管平滑肌增殖与血浆胰岛素水平显著相关 [5]。锻炼和饮食在降低血浆胰岛素水平同时也降低其血管平滑肌细胞增殖 [3]。然而胰岛素促进 VSMC 增殖的确切作用尚不清楚。有丝分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 是细胞增殖的内调节因子。研究显示胰岛素在体外对血管平滑肌细胞具有促进有丝分裂活性,且呈剂量依赖性增加自发性高血压大鼠有丝分裂原活化蛋白激酶活性 [3]。胰岛素刺激的 VSMC 生长被抑制时,其有丝分裂原活化蛋白激酶活性也降低。该作用被认为是糖尿病病人动脉粥样硬化形成的重要原因 [2]。动脉粥样硬化和血管成形术后狭窄的重要病理基础是血管平滑肌细胞异常增殖和分泌细胞外基质。研究表明 bFGF 是强烈的 VSMC 有丝分裂剂 [6,5]。抑制 VSMC 增殖可以预防再狭窄的发生。我们以前的实验显示胰岛素可刺激 VSMC 增殖。本文以胰岛素诱导 VSMC 为模型,研究 bFGF 反义 ODN 对其基因表达和增殖的影响,以探索再狭窄的防治方法。结果显示胰岛素能明显诱导 VSMC bFGF mRNA 表达和增殖,且呈浓度依赖性。胰岛素浓度由 0.001mg/L 增加到 1.0 mg/L, VSMC 增殖率由 10% 增加到 53%。bFGF 反义 ODN (5  $\mu$ mol/L) 能明显抑制胰岛素诱导的 VSMC bFGF mRNA 表达和增殖, $^3$ H TdR 掺入被抑制 41.1% (与对照组比较,  $P < 0.01$ ),细胞数被抑制 30.2% (与对照组比较,  $P < 0.01$ )。提示胰岛素可通过诱导 VSMC bFGF 的表达而促进动脉平滑肌细胞增殖, bFGF 反义 ODN 能有效抑制胰岛素诱导的 VSMC 的 DNA 合成及其增殖。以上结果说明, bFGF 反义 ODN 有可能发展用于再狭窄 VSMC 增殖抑制的防治。

### 参考文献

- 1 Delafontaine P. Growth factors and vascular smooth muscle cell growth responses. *Eur Heart J*, 1998, **19** (Suppl G): G18-22
- 2 Lindner V, Lappi DA, Baird A, et al. Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation. *Circ Res*, 1991, **68**: 106-113
- 3 Villa AE, Guzman LA, Poptic EJ, et al. Effects of antisense c-myc oligonucleotides on vascular smooth muscle cell proliferation and response to vessel wall injury. *Circ Res*, 1995, **76** (4): 505-513
- 4 King GL, Goodman AD, Buzney S, et al. Receptors and growth-promoting effects of insulin and insulin-like growth factors on cells from bovine retinal capillaries and aorta. *J Clin Invest*, 1985, **75**: 1028-034

- 5 Reich Fujiwara, Tsuguhiko Nakai. Effects of glycose, insulin, and insulin-like growth factor-I on glycose transport activity in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 1996, **127**: 49-57
  - 6 刘江华, 刘宗汉, 陈国强, 等. 胰岛素对血管平滑肌细胞增殖和组织型纤溶酶激活剂及抑制物活性的影响. 中国动脉硬化杂志, 1998, **6** (1): 35-37
  - 7 Sirois MG, Simons M, Edelman ER. Antisense oligonucleotide inhibition of PDGF R-beta receptor subunit expression directs suppression of intimal thickening. *Circulation*, 1997, **95** (3): 669-676
  - 8 Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, et al. Intimal hyperplasia after vascular injury is inhibited by antisense cdk 2 kinase oligonucleotides. *J Clin Invest*, 1994, **93**: 1458-464
  - 9 Villa AE, Guzman LA, Poptic EJ, et al. Effects of antisense c-myc oligonucleotides on vascular smooth muscle cell proliferation and response to vessel wall injury. *Circ Res*, 1995, **76** (4): 505-513
  - 10 Shimasaki S, Emoto N, Koba A. Complementary DNA cloning and sequencing of rat ovarian basic fibroblast growth factor and tissue distribution study of its mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, **157** (1): 256-263
  - 11 Cruzado M, Risler N, Castro C, et al. Proliferative effect of insulin on cultured smooth muscle cells from rat mesenteric resistance vessels. *Am J Hypertens*, 1998, **11** (Pt 1): 54-58
  - 12 Avena R, Mitchell ME, Neville RF, et al. The additive effects of glucose and insulin on the proliferation of infragenicular vascular smooth muscle cells. *J Vasc Surg*, 1998, **28** (6): 1033-1038
  - 13 Absher PM, Schneider DJ, Baldor LC, et al. The retardation of vasculopathy induced by attenuation of insulin resistance in the corpulent JCR:LA-cp rat is reflected by decreased vascular smooth muscle cell proliferation in vivo. *Atherosclerosis*, 1999, **143** (2): 245-251
  - 14 Begum N, Song Y, Rienzie J, Ragolia L. Vascular smooth muscle cell growth and insulin regulation of mitogen-activated protein kinase in hypertension. *Am J Physiol*, 1998, **275** (Pt 1): C42-49
  - 15 Kihara S, Ouchi N, Funahashi T, et al. Troglitazone enhances glucose uptake and inhibits mitogen-activated protein kinase in human aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 1998, **136** (1): 163-168
- 此文 1999-01-13 收到, 1999-05-19 修回)  
此文编辑 胡必利)