

# 表达反义单核细胞趋化蛋白- 1 的重组逆转录病毒对家兔 动脉平滑肌单核细胞趋化蛋白- 1 基因表达的影响

李福生 王宗立 许漫 乔绘红 刘佩毛 张华 任国锋 赵三妹 余铭鹏

(中国医学科学院基础医学研究所 中国协和医科大学基础医学院病理学研究室, 北京 100005)

**主题词** 动脉粥样硬化; 单核细胞趋化蛋白- 1; RNA, 反义; 基因, 重组; 逆转录病毒; 基因转染; 基因表达; 基因治疗; 聚合酶链反应

**摘要** 为研究反义单核细胞趋化蛋白- 1 转基因表达对单核细胞进入动脉壁的作用, 首先构建了表达反义单核细胞趋化蛋白- 1 基因的逆转录病毒重组体, 并观察它在培养的细胞中的表达。将家兔单核细胞趋化蛋白- 1 cDNA 反向插入到 pLNCX, 构成 LNCX- anti- MCP- 1 重组病毒质粒。再将重组质粒转染  $\Psi$ - 2 细胞, 继以  $\Psi$ - 2 细胞产生的病毒上清感染 PA317 细胞, 取得 G418PA317 抗细胞克隆。上述细胞经扩增培养, 收集病毒上清并感染 NIH3T3 细胞后进行检测。结果发现, 病毒的滴度为  $5.6 \times 10^7$  CFU/L, 感染的 NIH3T3 细胞中有重组病毒的整合。重组病毒感染培养的家兔动脉平滑肌细胞后, 用聚合酶链反应检测发现, 感染的平滑肌细胞基因组 DNA 中有重组病毒整合; RNA slot 杂交结果显示, 感染的平滑肌细胞中有反义单核细胞趋化蛋白- 1 的表达, 与未感染的平滑肌细胞相比, 感染的平滑肌细胞中单核细胞趋化蛋白- 1 mRNA 的表达明显受到抑制。结果提示, 反义单核细胞趋化蛋白- 1 逆转录病毒表达载体在培养的动脉平滑肌中能表达反义基因并抑制靶基因的表达, 为进一步开展体内实验研究奠定了基础。

## The Effect of Antisense Monocyte Chemotactic Protein- 1 Expression Mediated by Retroviral Vector on Monocyte Chemotactic Protein- 1 mRNA Level in Rabbit Aortic Smooth Muscle Cells

LI Fu- Sheng, WANG Zong- Li, XU Man, QIAO Hui- Hong, LIU Pei- Mao, ZHANG Hua, REN Guo- Feng, ZHAO San- Mei and SHE Ming- Peng

(Department of Pathology, Institute of Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences and School of Basic Medicine, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

**MeSH** Atherosclerosis; Monocyte Chemoattractant Protein- 1; RNA, Antisense; Recombination, Genetic; Retroviridae; Gene Transfer; Gene Expression; Gene Therapy; Polymerase Chain Reaction

**ABSTRACT** **Aim** To investigate the inhibitory effect of antisense monocyte chemotactic protein- 1 (MCP- 1) expression mediated by recombinant gene transfer on the migration of monocytes into arteries in vivo, as a first step, a recombinant retroviral vector expressing antisense MCP- 1 gene was constructed and its expression was observed in vitro. **Methods** An antisense MCP- 1 recombinant vector was constructed by inserting rabbit MCP- 1 cDNA into LNCX plasmid in a reversed orientation. Recombinant viral DNA was transfected into  $\Psi$ - 2 packaging cells by lipofectamine transfecting procedure. The transiently produced viruses were used to transfer PA317 amphotropic packaging cells. G418 resistant positive PA317 clones were isolated and expanded. Virus supernatant from G418 resistant PA317 cells was used to determine virus titer and to infect aortic smooth muscle cells. After the selection with G418 medium, the integration and expression of recombinant gene in cells were measured. **Results** The highest retroviruses' titer was  $5.6 \times 10^7$  CFU/L. PCR result showed that recombinant viruses were integrated into genome of the infected NIH3T3 cells and cultured smooth muscle cells. RNA slot blot analysis showed that antisense MCP- 1 mRNA expressing was detected in the infected smooth muscle cells. There was obvious inhibition of MCP- 1 mRNA expression obtained in the infected smooth muscle cells in comparing to that the uninfected cells. **Conclusions** The recombinant retroviral vector containing antisense MCP- 1 could inhibit target gene expression in cultured smooth muscle cells and may be used for further experimental studies in vivo.

单核细胞趋化蛋白- 1 (monocyte chemotactic protein- 1, MCP- 1) 是作用很强的单核细胞化学吸

引物质, 在动脉壁单核巨噬细胞募集过程中具有重要作用<sup>[1~3]</sup>。为阐明动脉粥样硬化发生过程中单核细胞粘附进入动脉内膜的机理并分析 MCP- 1 基因表达是否为单核细胞进入动脉内膜的重要或最重要

环节,本研究以逆转录病毒为载体将反义 MCP-1 cDNA 导入培养的家兔主动脉平滑肌细胞,观察反义 MCP-1 基因表达对平滑肌细胞 MCP-1 mRNA 表达的抑制作用,以期采用反义技术抑制或阻断基因表达的可行性提供体外实验依据,为进一步研究反义 MCP-1 转基因表达对单核细胞粘附进入动脉壁的抑制作用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

逆转录病毒载体质粒由美国华盛顿大学 Dr. Miller 提供<sup>[4]</sup>, 兔 MCP-1 cDNA pBluescript SK 质粒由美国 NCI Dr. Yoshimura<sup>[3]</sup> 赠送。

### 1.2 反义单核细胞趋化蛋白-1 逆转录病毒重组质粒的构建

逆转录病毒载体 LNCX 经 Cla<sup>iv</sup> 和 Hpa<sup>iv</sup> 酶切, MCP-1 质粒经 Cla<sup>iv</sup> 和 Sma<sup>iv</sup> 酶切, 分别回收 6.6 Kb 及 0.6 Kb 片断, 在 T<sub>4</sub> DNA 连接酶作用下进行连接反应, 反应产物转化 DH5 $\alpha$  菌, 小量制备重组质粒, 利用不对称限制酶切位点 EcoR<sup>iv</sup> 及 Hind<sup>iv</sup> 分别进行酶切电泳鉴定。

### 1.3 重组逆转录病毒质粒的包装和病毒滴度测定

重组质粒以 Lipofectamine 方法转染  $\Phi$ -2 包装细胞, 转染后第 3 天吸出上清, 感染 PA317 病毒包装细胞, 经 G418(400 mg/L) 筛选培养二周后, 得到 PA317 抗药性细胞克隆。提取 PA317 克隆细胞基因组 DNA, 以同位素标记 MCP-1 cDNA 探针及重组质粒特异引物分别进行 Southern 杂交和 PCR 扩增鉴定。将鉴定后的 PA317 细胞接种培养(5  $\times$  10<sup>5</sup>/60 mm 平皿) 24 h, 收集并以不同量病毒上清感染 NIH3T3 细胞, 37  $^{\circ}$ C 孵育 18 h 后进行 G418 选择培养, 两周后记录 NIH3T3 克隆数, 计算病毒滴度。滴度值以每升病毒上清形成多少 NIH3T3 细胞抗 G418 集落表示。

### 1.4 重组基因在家兔主动脉平滑肌细胞中的整合和转基因表达

按 Miller 等<sup>[4]</sup> 方法感染第 3~6 代培养的家兔主动脉平滑肌细胞(5  $\times$  10<sup>5</sup>/60 mm 平皿), 加入病毒上清 1 mL(含 polybrene 6~8 mg/L), G418 选择培养(400 mg/L) 约 3 周, 收集细胞, 分别提取 DNA 及 RNA, 检测重组基因的整合及表达。

1.4.1 聚合酶链反应鉴定重组基因整合 按 Aoki 等<sup>[7]</sup> 方法进行。根据重组 LNCX-anti-MCP-1 质粒的序列鉴定重组基因插入 PCR 引物, 用 Olig5 软件由 Cybersyn 公司协助设计和合成: P1: 5' -

CGTGTGTTCTTGGGTTGTGG-3' (与插入片断上游相邻载体模板某一片断互补), P2: 5' - CAGGTGGGGTCTTTCATTCC-3' (与插入片断第 310~330 编码序列互补)。

PCR 扩增片断长度为 415 bp。PCR 反应体积为 30  $\mu$ L, 含 1  $\times$  PCR buffer, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 及 200  $\mu$ mol/L dNTPs, 模板 0.5  $\mu$ g, Taq 2 u, 引物浓度各 50 pmol/L, 反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 变性 4 min, 加入 Taq 酶后, 52.5  $^{\circ}$ C 60 s, 72  $^{\circ}$ C 80 s, 循环 35 次, 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

### 1.4.2 RNA slot blot 分析

按分子克隆操作手册进行。总 RNA 样品经 OD 260/280 定量测定及 1% 琼脂糖电泳后, 进行定量 slot blot 分析, 用  $\alpha$ -<sup>32</sup>P 标记的单链 RNA 探针杂交, 放射自显影后用扫描仪检测各样本的积分吸收光度值(A)。正反义单链探针按 Promega Riboprobe Gemini Core system Kit 操作手册合成。

### 1.5 动脉平滑肌细胞的培养

按常规方法<sup>[18]</sup> 培养动脉平滑肌细胞。

## 2 结果

### 2.1 重组逆转录病毒载体的构建

#### 2.1.1 pMCP-1 和 pLNCX 质粒的扩增与鉴定

pMCP-1 质粒转化 XL1-Blue 菌, pLNCX 质粒转化 DH5 $\alpha$  菌, 扩增后小量制备, 用 EcoR<sup>iv</sup> 酶切, pMCP-1 出现 112 bp、517 bp 和 2.9 Kb 三条片断, pLNCX 出现 1.6 Kb 和 5.0 Kb 两条片段(图 1, Figure 1)。

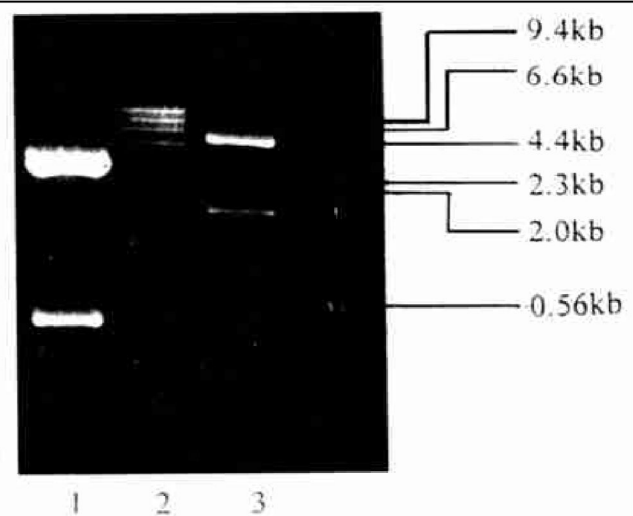


图 1. pMCP-1 和 pLNCX 质粒的酶切鉴定

Figure 1. Identification of the plasmid pMCP-1 and pLNCX with restriction enzymes. Lane 1: pMCP-1 digested by EcoR<sup>iv</sup>; Lane 2: DNA marker  $\lambda$ DNA/Hind<sup>iv</sup>; Lane 3: pLNCX digested by EcoR<sup>iv</sup>

2.1.2 反义单核细胞趋化蛋白-1 重组逆转录病毒载体的构建和鉴定

表达反义 MCP-1 mRNA 的重组质粒 LNCX-anti-MCP-1 构建 (图 2, Figure 2) 及扩增后,用

Hind III 限制性内切酶酶切,再用 0.8% 琼脂糖电泳,出现 0.6 Kb 和 6.6 Kb 两条区带;用 EcoRI 酶切后出现 517 bp、1.6 Kb、2.0 Kb 和 3.0 Kb 四条区带(图 3, Figure 3)。根据重组逆转录病毒的结构计算,完全符合反义 MCP-1 cDNA 插入的酶切图。

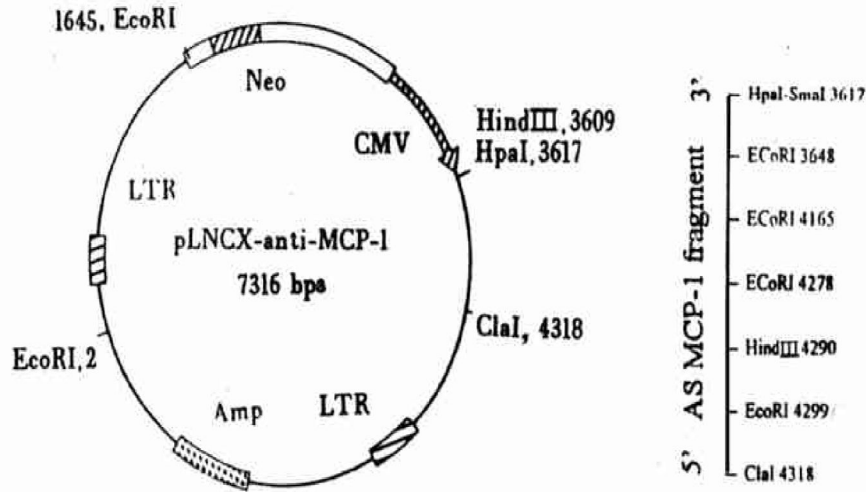


图 2. 重组逆转录病毒载体构建的物理图谱

Figure 2. The map of recombinant retroviral vector (pLNCX-anti-MCP-1). The fragment of antisense MCP-1 cDNA show as AS MCP-1 in the right of the figure was inserted into the vector in ClaI and HpaI in 3'-5' direction

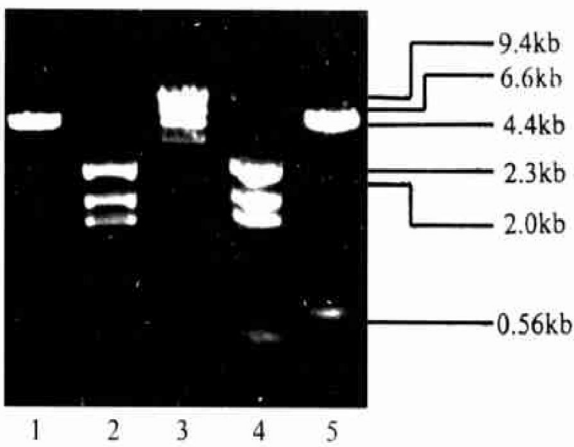


图 3. 重组病毒的酶切鉴定

Figure 3. Identification of the plasmid pLNCX-anti-MCP-1 with restriction enzymes. Lane 1 and 5: Recombinant vector digested by Hind III; Lane 2 and 4: Recombinant vector digested by EcoRI; Lane 3: DNA marker λDNA/Hind III

2.2 重组病毒包装和病毒滴度测定

重组质粒经 Φ-2 细胞包装后,感染 PA317 细胞,得到 PA317 抗 G418 克隆,用 PA317 抗药性克隆细胞培养物上清感染 NIH3T3 细胞的方法检测重组病毒的病毒滴度为  $5 \times 10^7$  CFU/L。

2.3 重组质粒在家兔动脉平滑肌细胞中的整合与表达

聚合酶链反应(PCR)反应产物经电泳后出现预

期的特异的 415 bp 扩增片断(图 4, Figure 4),表明重组病毒基因 LNCX-anti-MCP-1 已成功地整合到感染的家兔平滑肌细胞基因组中。

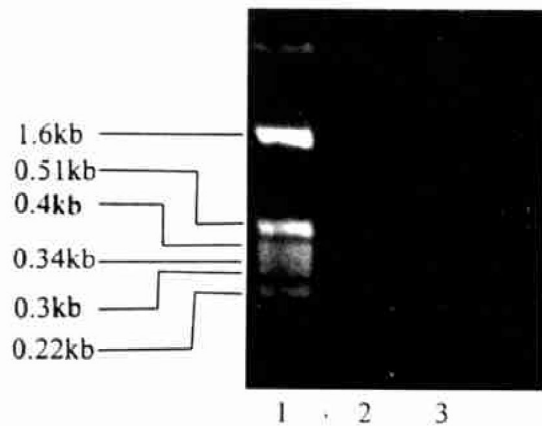


图 4. 重组病毒感染平滑肌细胞后重组基因整合的鉴定

Figure 4. Identification of integration of recombinant virus into infected rabbit aortic smooth muscle cells. Lane 1: DNA marker PBR 322/HinfI; Lane 2: Infected smooth muscle cells; Lane 3: Uninfected smooth muscle cells

感染的家兔平滑肌细胞总 RNA 经定量 slot blot 分析后,用  $\alpha$ - $^{32}$ P 标记的正义单链 MCP-1 RNA 探针杂交,放射自显影后观察到感染的家兔平滑肌细胞中有反义 MCP-1 mRNA 的表达,而未经感染的平滑肌细胞中未检测到其表达(图 5, Figure 5)。感

染的平滑肌细胞和非感染的平滑肌细胞总 RNA slot blot 分析,用同位素标记的单链反义 RNA 探针杂交并对杂交结果所得的放射自显影像通过密度扫描进行分析,观察到感染的平滑肌细胞中 mRNA 含量显著低于对照组,表明感染的细胞中的重组病毒基因介导反义 MCP-1 mRNA 的表达中和或部分阻断了内源性 MCP-1 mRNA(图 6, Figure 6)。

重组病毒感染对平滑肌细胞结构基因磷酸甘油醛脱氢酶表达无影响(图 7, Figure 7)。

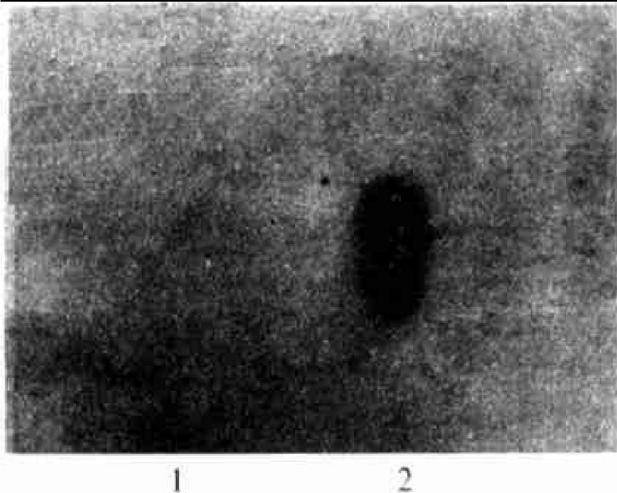


图 5. Slot 印迹分析反义单核细胞趋化蛋白-1 mRNA 在感染的平滑肌细胞中的表达

**Figure 5. Slot blot analysis with p labelled sense MCP-1 RNA for the presence of antisense MCP-1 RNA in infected smooth muscle cells.** Lane 1: Control cultured smooth muscle cells; Lane 2: Smooth muscle cells infected with recombinant viruses

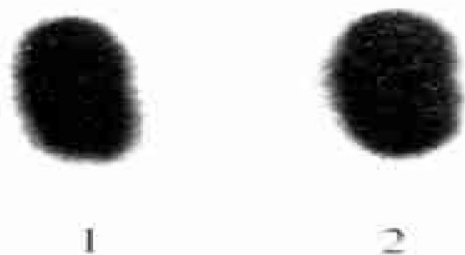


图 7. Slot 印迹分析反义重组病毒感染对平滑肌细胞磷酸甘油醛脱氢酶的影响

**Figure 7. Slot blot analysis of the effect of recombinant LNCX-anti-MCP-1 infection on the expression of GAPDH in smooth muscle cells.** Lane 1: Uninfected cells; Lane 2: Infected cells

### 3 讨论

单核巨噬细胞粘附进入动脉内膜并在内皮下间隙吞噬脂质变为泡沫细胞是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)最早期最重要的病理学改变。为什么血液中为数众多的白细胞成分在 As 发生过程中进

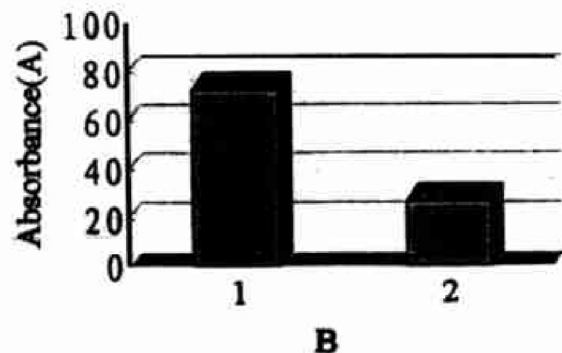
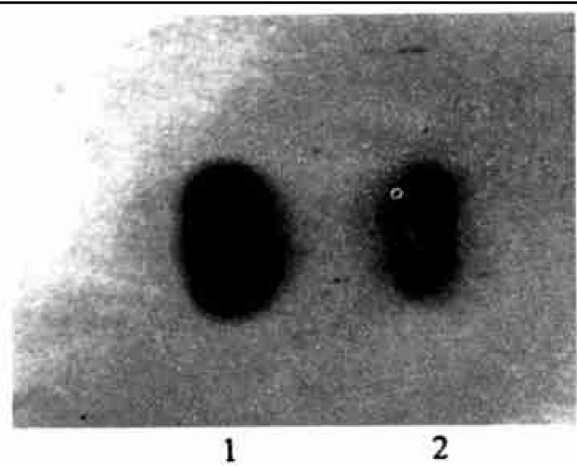


图 6. Slot 印迹分析单核细胞趋化蛋白-1 mRNA 在平滑肌细胞中的表达

**Figure 6. Slot blot analysis of MCP-1 mRNA lever in smooth muscle cells.** A: Total mRNA slot blot with p labelled antisense RNA probe; B: Densitometric scanning analysis of mRNA lever. Lane 1: Uninfected cells; Lane 2: Infected cells

入动脉壁的主要是单核细胞和少量淋巴细胞,其分子机理至今仍不了解。MCP-1 是一种作用很强的单核细胞趋化因子,不仅可吸引单核细胞移动,而且对血管内皮细胞粘附分子(如 VCAM 和 ICAM 等)的表达有调节作用,在单核细胞粘附进入动脉壁中起重要作用<sup>[1,6]</sup>。通过细胞实验及对人和实验性 As 病变的研究发现,在不同致病因子作用或诱导下,动脉壁的各种正常或病理细胞成分(包括内皮细胞、平滑肌细胞、淋巴细胞和巨噬细胞)均可分泌 MCP-1<sup>[1,6-9]</sup>。虽然近年的大量研究发现许多物质(如 PDGF、IL-1、TXA<sub>2</sub>、凝血酶和胶原蛋白等)均具有单核细胞趋化作用,但其中 MCP-1 被认为最重要<sup>[1,10]</sup>。Graves 和 poon 等<sup>[10,11]</sup>在实验中观察到,当向含有单核细胞趋化活性的多种细胞和动脉壁细胞的培养液中加入 MCP-1 单抗后,单核细胞的趋化活性大部分被阻断,这表明 MCP-1 是起主要作用的物质,也提示尚有其他趋化因子存在,但 MCP-1

在体内的作用仍未完全了解。由于高脂血症是 As 发病的一个重要因素, 目前临床普遍采用降脂治疗, 并取得显著疗效, 但从血管造影来看, 其对斑块的消退作用似乎是有限的<sup>[13-15]</sup>。因此 Schwartz 等<sup>[13-15]</sup>许多著名心脏病学者提出, 需探索包括基因治疗和药物在内的直指血管壁的新的干预治疗手段(如包括保护内皮细胞功能、防止白细胞进入和抑制平滑肌细胞增殖等)。巨噬细胞在受损部位的聚集是宿主防御反应所必需的, 如同许多炎症反应过程, 机体白细胞的过度反应可导致病变加剧。因此, 他们也将抑制巨噬细胞进入血管作为“As 防治策略”中一个重要的研究方向。利用单克隆抗体和激素, 国外一些学者已进行了一系列有关研究<sup>[16]</sup>。我室余铭鹏教授给高胆固醇饲养的家兔静脉注射抗巨噬细胞单克隆抗体, 用流式细胞仪分析主动脉细胞成分并结合病理学检查, 证明静脉注射抗巨噬细胞抗体可抑制单核细胞进入动脉壁并显著减轻 As 病变形成。采用基因分析法进一步评估 MCP-1 基因表达是否为单核细胞进入动脉壁的重要或最重要环节, 并研究观察阻断 MCP-1 基因表达对单核细胞进入动脉壁的抑制作用, 不仅对阐明 As 的发病机理有重要意义, 而且有可能为 As 的防治开发新的干预手段。在本研究中, 我们构建了反义 MCP-1 重组基因导入家兔主动脉平滑肌细胞, 结果发现重组基因可整合进培养的平滑肌细胞染色体 DNA, 并有反义重组基因的表达。与对照组平滑肌细胞相比, 感染重组病毒平滑肌细胞 MCP-1 mRNA 表达明显受到抑制。

#### 参考文献

- Schwartz CJ, Valente AT, Rozek MM, et al. Mechanisms of intima monocyte-macrophage recruitment: A special role for monocyte chemoattractant protein-1. *Circulation*, 1992, **86**: 20-28
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for 1990s. *Nature*, 1993, **362**: 801-809
- Yashimura T, Leonadr EJ. Identification of high affinity receptors for human monocyte chemoattractant protein-1 on human monocytes. *J Immunol*, 1990, **145**: 292-297
- Miller AD, Rosman GJ. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Bio Techniques*, 1989, **7**: 980-990
- Miller AD, Miller DG, Garcia JV, et al. Use of retroviral vectors for gene transfer and expression. *Methods in Enzymology*, 1993, **217**: 581-592
- Winner GD. Chemotactic response of monocyte to thrombin. *J Cell Biol*, 1983, **96**: 282-285
- Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, et al. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cell and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87** (13): 5134-5138
- Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, et al. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 5252
- Neiken NA, Coughlin SR, Gordon D, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest*, 1991, **88**: 112-119
- Graves DT, Jiang JL, Williamson MJ, et al. Identification of monocyte chemotactic activity produced by malignant cells. *Science*, 1989, **245**: 490-498
- Poon M, Hus WC, Bogdanov VY, et al. Secretion of monocyte chemotactic activity by cultured rat aortic smooth muscle cells in response to PDGF is due predominantly to the induction of JE/MCP-1. *Am J Pathol*, 1996, **149** (1): 307-317
- Fogelman AM, Navab M, Imes SS, et al. Monocyte transmigration induced by modification of lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein-1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest*, 1991, **88**: 2039-2045
- Brown BG. Lipid lowering and plaque regression. *Circulation*, 1993, **87**: 1781
- Schwartz CJ, Valent AJ, Spragne. Atherosclerosis: Potential targets for stabilization and regression. *Circulation*, 1992 (Suppl ④), **86**: 111-118
- Fuster V. Clinical-Pathological correlation of coronary disease progression. *Circulation*, 1992 (Suppl ④), **86**: 47-52
- Guzman LA, Whitlow PL, Geall CJ, et al. Monocyte chemotactic protein-1 antibody inhibit stenosis in the rabbit atherosclerosis model. *Circulation*, 1993, **88**: 371
- Kazunori Aoki, Teruhiko Yoshida, Takashi Sugimura, et al. Liposome-mediated in vivo gene transfer of antisense K-ras construct inhibits pancreatic tumor dissemination in murine peritoneal cavity. *Cancer Research*, 1995, **55**: 810-816
- Campbell JH, Campbell GR. What controls smooth muscle phenotype. *Atherosclerosis*, 1981, **40**: 347-357

(此文 1999-05-03 收到, 1999-10-27 修回)

(此文编辑 文玉珊)