

反义寡脱氧核苷酸抑制大鼠肝细胞载脂蛋白 B 的表达

唐其东 林碧莲 林曙光

(广东省心血管病研究所, 广州 510100)

主题词 反义寡脱氧核苷酸; 载脂蛋白 B; 聚合酶链反应; 细胞培养; 基因表达; 肝; 大鼠

摘要 为探讨反义寡脱氧核苷酸对大鼠肝细胞载脂蛋白 B 基因的表达是否具有调控作用, 并探索其作用机制。以合成的载脂蛋白 B 基因正、反义寡脱氧核苷酸加入培养的肝细胞, 测量载脂蛋白 B100 含量; 用反转录聚合酶链反应评价载脂蛋白 B 基因的表达。结果发现, 载脂蛋白 B 基因反义寡脱氧核苷酸可明显下调载脂蛋白 B100 的 mRNA 表达, 5、10、15 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 的反义寡脱氧核苷酸, 可分别降低肝细胞载脂蛋白 B 浓度的 26.6%、34.2%、34.2% 和 45.8%, 抑制效果呈剂量依赖性。此结果说明, 载脂蛋白 B 基因反义寡脱氧核苷酸能抑制载脂蛋白 B 基因的表达, 降低载脂蛋白 B100 水平, 其可能的作用机制是针对 mRNA 的合成, 进行转录和翻译水平上的阻断。

The Inhibitory Effect of Antisense Oligodeoxynucleotides on Apolipoprotein B Expression in Liver Cells of Rat

TANG Qi- Dong, LIN Bi- Lian and LIN Shu- Guang

(Guangdong Cardiovascular Institute, Guangzhou 510100; Department of Pharmacy, School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

MeSH Oligodeoxynucleotides, Antisense; Apolipoprotein B; Polymerase Chain Reaction; Cell Culture; Gene Expression; Cells, Liver; Rat

ABSTRACT **Aim** To reduce the level of apolipoprotein B (Apo B) via the inhibitory effect of antisense oligodeoxynucleotides (AODN) on expression of Apo B gene in cultured liver cells and search its mechanism. **Methods** The cultured liver cells were treated with synthesized Apo B gene antisense, sense ODN (SODN) and 0.9% salt solution respectively. Apo B100 concentration was measured by Auto-

biochemical Instruction. The mRNA level was observed by using of reverse transcription- polymerase chain reaction (RT- PCR). **Re-**

sults Apo B gene AODN 5, 10, 15, and 20 $\mu\text{mol/L}$ inhibited Apo B concentration 26.6%, 34.2%, 34.2%, and 45.8% respectively.

The inhibitory effect appeared in a concentration- dependent manner. RT- PCR showed that Apo B gene AODN downregulated Apo B mRNA expression obviously. **Conclusions** The ApoB gene AODN inhibited Apo B gene expression obviously and reduced Apo B concentra-

tion. The possible mechanisms are to downregulate Apo B mRNA level and inhibit translation of Apo B gene.

流行病学调查和动物实验研究表明, 血浆载脂蛋白 B (apolipoprotein B) 和低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 增高是动脉粥样硬化的高度危险因素^[1]。LDL 和极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 的主要构成蛋白是载脂蛋白 B100 和载脂蛋白 B48, 两者是同一个载脂蛋白 B100 基因的不同表达产物。研究结果提示, 载脂蛋白 B100 基因对致动脉粥样硬化的脂蛋白 LDL 和 VLDL 有强烈的调节作用^[2]。

近年来发展起来的寡脱氧核苷酸反义技术, 能特异性地封闭特定基因的表达而不影响其它基因^[3]。从而可以按需要抑制某些基因的表达, 影响其生物学功能。因此, 我们设想, 通过反义寡脱氧核苷酸对载脂蛋白 B 基因表达的调控, 有可能治疗高胆

固醇血症和预防动脉粥样硬化的发生。

1 材料与方法

1.1 载脂蛋白 B100 基因寡脱氧核苷酸的合成

以人载脂蛋白 B100 基因翻译起始区域 20 个碱基序列为模板, 用 DNA 合成仪 (Pharmacia), 合成载脂蛋白 B100 基因反义寡脱氧核苷酸 (antisense oligodeoxynucleotide, AODN)、正义寡脱氧核苷酸 (sense oligodeoxynucleotide, SODN), 在合成过程中, 对碱基进行硫代磷酸化修饰。AODN 序列如下: 3' TACCTGGGCGGCTCCGGGCG 5'; SODN 序列为: 5' ATG-GACDDGCGGAGGCCCCG 3'。用紫外分光光度计 (Japan Shimadu) 进行浓度测定。

1.2 细胞培养

SD 大鼠, 由中山医科大学实验动物中心提供。

主要试剂中 collagenase IV、EDTA、trypsin、葡聚糖、微载体 Cytodex 3、RPMI 1640 培养基为 Gibco 产品, CO₂ 培养箱及培养瓶皿分别为 Cellstar USA 和 Nunc 公司产品, 其它试剂及物品购于华美生物工程公司。

以体外两步灌注法分离肝细胞, 经台盼兰染色计数后, 按终浓度为 $4 \times 10^5/L$, 将肝细胞接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基内, 加入微载体 Cytodex 3 (5 mg/L) 置 37℃、5% CO₂、湿度 100% 条件下培养。每 15~30 min 旋转振荡一次, 至浮游的单个肝细胞明显减少为止, 每 24 h 更换相同培养基一次。收集微载体培养肝细胞, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 3 次, 以 3% 戊二醛固定 4 h, 1% 锇酸后固定 15 min, 系列丙酮脱水, 醋酸异戊酯置换, 临界点干燥后, 真空喷镀, AMRAY 1000B 型扫描电镜下观察。

1.3 载脂蛋白 B100 含量检测

同一批次培养肝细胞, 随机分成六组, 每组 13 瓶, 在 1.2 所述的条件下培养, 但不更换培养基, 分别加入生理盐水、SODN (20 μmol/L) 和 AODN (20 μmol/L、15 μmol/L、10 μmol/L 和 5 μmol/L)。三天后, 离心收集上清液, 以全自动生物化学检测仪 (Beckman) 测量各组载脂蛋白 B100 含量; 按如下公式计算抑制百分率: 抑制百分率 = (空白对照组载脂蛋白 B100 的浓度 - 处理组载脂蛋白 B100 的浓度) ÷ 空白对照组载脂蛋白 B100 的浓度 × 100%。收集肝细胞进行反转录聚合酶链反应检测。

1.4 反转录聚合酶链反应检测载脂蛋白 B 基因的表达

用 RNA 抽提试剂盒 (Pharmacia) 对 5×10^6 肝细胞进行总 RNA 抽提, 经反转录试剂盒 (Boehringer mannheim) 合成 cDNA, 用 DNA 扩增仪, 按照试剂盒提供的程序进行 cDNA 的聚合酶链反应扩增; 扩增引物如下: 载脂蛋白 B 引物 primer 1: 5' TGAGGT-TCTTCAGCCTGCTT 3', primer 2: 5' TCACCCAGAAT-CATGGCCTG 3'; β-actin 引物: 5' AAGGATTCCTAT-GTGGGC 3', 5' CATCTCTTGCTCGAAGTC 3'; β-actin 扩增 35 个循环, 载脂蛋白 B 扩增 36 个循环。扩增产物于含溴化乙啶的 2% 琼脂糖中电泳, Bio-Rad 1000 凝胶成像密度仪分析扩增结果。

1.5 统计学分析

所有资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 ANOVA 的 *t* 检验进行统计学差异分析, 以 $P < 0.05$ 作为有显著性差异的标准。

2 结果

2.1 扫描电镜观察结果

肝细胞呈半球形紧密贴附于圆球形微载体上, 似“仙人球”样。粘附于微载体上的肝细胞数量多寡不一、分布不均, 聚集成小团, 散在分布。肝细胞之间亦存在紧密连接, 并借此使微载体互相连接成团块状。

2.2 载脂蛋白 B 检测及统计结果

由表 1 (Table 1) 可见, SODN 组与空白对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。而不同浓度的 AODN 均表达了对载脂蛋白 B100 的抑制作用, 与空白对照组比较, 浓度有显著性或非常显著性差异 ($P < 0.05 \sim P < 0.001$), 其抑制百分率分别为 45.8%、34.2%、34.2% 和 26.6%。

表 1. 载脂蛋白 B 基因反义寡脱氧核苷酸对载脂蛋白 B100 浓度的影响

Table 1. Antisense Oligodeoxynucleotides of Apolipoprotein B gene effect on the concentration of of Apolipoprotein B100

Groups	Concentration (μmol/L)	Apolipoprotein B100 (mmol/L)	Inhibitory rate (%)
Control		0.4831 ± 0.06	
SODN	20	0.4346 ± 0.07 ^a	
AODN	20	0.2620 ± 0.08 ^d	45.8%
AODN	15	0.3180 ± 0.10 ^c	34.2%
AODN	10	0.3162 ± 0.10 ^c	34.2%
AODN	5	0.3546 ± 0.06 ^b	26.6%

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

2.3 载脂蛋白 B 基因 mRNA 表达检测结果

经 2% 琼脂糖电泳后, 显示出扩增结果均为单一条带, 与预测大小一致。随着反义寡脱氧核苷酸浓度的增大载脂蛋白 B 的表达逐渐降低, 且其任何一道都明显低于空白对照组及 SODN 组 (图 1, Figure 1)。

3 讨论

血脂紊乱导致动脉壁内沉积过多胆固醇是造成动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的重要原因^[4]。现已证实, 血浆载脂蛋白 B、低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 及脂蛋白 (a) 增高是动脉粥样硬化的高度危险因素^[1,8], 而 HDL 升高有利于抗动脉粥样硬化^[5,8]。因而降低 LDL 和载脂蛋白 B 的水平有可能防治 As 及其并发症。载脂蛋白 B 是 LDL 和 VLDL 的主要载脂蛋白。正常载脂蛋白 B 是以载脂蛋白 B100 和载脂蛋白 B48 两种形式存在, 是同一载

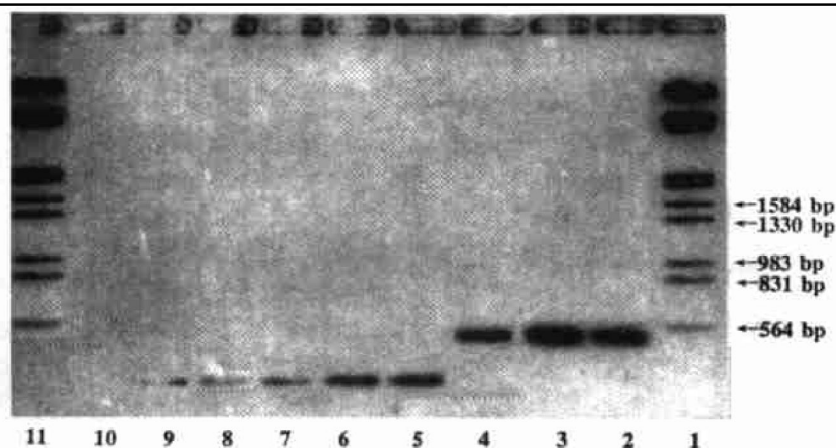


图 1. 不同处理后培养的大鼠肝细胞载脂蛋白 B 基因表达水平

Figure 1. The mRNA level of apolipoprotein B gene expression in cultured liver cells in different treated groups. Lane 1, and 11 were DNA Marker. Lanes 2, 3, and 4 were a 532 bp amplified product of β -actin gene in control group, sense treated group (20 μ mol/L), and antisense treated group (20 μ mol/L). Lane 5, and 6 were sense treated group (20 μ mol/L) and control group. Lane 7, 8, 9, and 10 were the amplified products of apolipoprotein B gene treated with antisense oligodeoxynucleotides in different concentration (5, 10, 15, and 20 μ mol/L), 415 bp.

脂蛋白 B 基因的翻译产物。载脂蛋白 B 基因的全长表达蛋白即载脂蛋白 B100, 在载脂蛋白 B 基因经历转录后的 C? U 转变, 使得密码在 CAA 处(谷氨酰胺, 2153)转变为终止密码子 UAA 后, 它就只能编码载脂蛋白 B48^[6]。载脂蛋白 B48 是组成 VLDL 的主要载脂蛋白^[6], 也是脂蛋白(a)的主要蛋白^[7]。而 LDL 亲水层中的蛋白质几乎均为载脂蛋白 B100^[6]。因此, 可以推测, 如果载脂蛋白 B100 缺失, LDL 将失去 95% 的蛋白来源, 无法形成亲水层, 降低 LDL 水平, 有利于治疗和预防动脉粥样硬化。

有关报道指出, 一个载脂蛋白 B 等位基因发生突变或缺失, 常常导致无症状的家族性低(脂蛋白血症, 使血浆总胆固醇降低^[3]。这提示: 载脂蛋白 B 基因缺失或部分缺失(或叫功能失活或部分失活)可明显下调血脂水平。最近 Farese 研究报道, 通过插入干扰基因导致鼠载脂蛋白 B 基因表达缺失, 血浆载脂蛋白 B、胆固醇、VLDL、LDL 浓度降低 20% - 70%^[2]。近年来的分子生物学方面的一重大进展是特异性抑制基因复制、转录、翻译的反义寡脱氧核苷酸的发现, A 寡脱氧核苷酸通过与双链 DNA 结合形成三链, 或与局部解链的 DNA 单链结合, 通过与相应的 mRNA 结合抑制 DNA 复制、转录和翻译, 达到失活基因的目的。因此, 在研究中, 我们通过 AODN 对载脂蛋白 B 基因的封闭, 下调载脂蛋白 B 基因的表达, 降低载脂蛋白 B100 的浓度, 从而, 有可能防治动脉粥样硬化的发生。但抑制载脂蛋白 B100 表达导致 LDL 形成受阻, 其结果对体内血脂转运的影响, 此方面研究正待进行。

本研究证明载脂蛋白 B 基因反义寡脱氧核苷

酸在调节血脂方面具有潜在的临床应用价值, 反义寡脱氧核苷酸能明显抑制载脂蛋白 B 基因的表达, 降低载脂蛋白 B 的浓度, 而且具有量效关系。但从实验抑制百分率来看, 效果不是很理想。实验中最大的抑制率只有 45.8%, 原因有三, 其一: 反义寡脱氧核苷酸是直接加在肝细胞群, 而它要发挥阻断基因表达作用, 必须进入细胞核。虽然寡脱氧核苷酸的分子量不高, 但在无任何载体包裹运输的情况下, 由于膜透过率、细胞摄取力、各种损失及其他未知的影响因素, 降低了真正到达细胞核内发生反应的反义寡脱氧核苷酸浓度; 其二: 从抑制率和剂量的相关性来看, 反义寡脱氧核苷酸浓度越高, 抑制率越高, 可见具有明显的剂量依赖性, 因而, 抑制率不理想也很有可能与反义寡脱氧核苷酸浓度不足有关; 其三: 从电泳结果发现, 反义寡脱氧核苷酸处理后, β -actin 表达相对于对照组有所下调, 是否我们的反义寡脱氧核苷酸序列的特异较低, 有待进一步研究。本次实验只是对反义寡脱氧核苷酸抑制载脂蛋白 B 基因表达有效性及可行性进行初步探讨, 而且合成寡脱氧核苷酸的原料及实验试剂十分昂贵, 无法实现大量分组, 造成实验结果的局限性。

本实验还初步探讨了反义基因的作用机制, 发现它能明显抑制 mRNA 的水平, 证明在转录水平上的抑制是反义寡脱氧核苷酸对载脂蛋白 B 基因调控作用的一个机制。同时, 载脂蛋白 B100 浓度的明显降低也提示了 AODN 在翻译水平上抑制的可能性, 这需要进一步研究证实。虽然反义技术抑制基因表达的研究已相当普遍, 对于动脉粥样硬化的治疗方法研究探讨也十分广泛深入, 但通过反义寡脱

氧核苷酸对载脂蛋白 B 基因表达的调控,降低载脂蛋白 B 含量和 LDL 水平,从基因水平上治疗高胆固醇血症和预防动脉粥样硬化的发生,国内外尚无报道。因而,这是一个很值得研究的空白领域。

参考文献

- 1 Tada Y, Nakase M, Adachi J, et al. Reduction of 14~ 16 kDa allergenic proteins in transgenic rice plant by antisense gene. *FEBS Lett*, 1996, **391**: 341- 345
 - 2 Farese RV Jr, Chiesa G, Grass DS. Transgenic mice expressing high plasma concentrations of human apolipoprotein B100 and lipoprotein (a). *J Clin Invest*, 1993, **6**: 3 029- 037
 - 3 Skeiky Yam, Peacock R, Dunning A, et al. Apolipoprotein B gene polymorphisms, lipoproteins and coronary atherosclerosis: A study of young myocardial infarction survivors and healthy population- based individuals. *J Mol Biol*, 1993, **213**: 53- 57
 - 4 Reichl D. Extravascular circulation of lipoproteins: their role in reverse transport of cholesterol. *Atherosclerosis*, 1994, **105**: 117- 129
 - 5 刘亚平. 94 例冠心病、93 例糖尿病患者血脂及载脂蛋白分析. 中日友好医院学报, 1997, **11**(3): 253- 256
 - 6 吕新跃. 载脂蛋白 B mRNA 编辑蛋白. 中国动脉硬化杂志, 1996, **4**(3): 221- 225
 - 7 冯学冠, 钱士匀, 邱辅佑, 等. 血脂正常的冠心病患者血清载脂蛋白 AI 和 B100 检测的临床意义. 现代诊断与治疗. 1996. **7**(4): 200- 201
 - 8 夏舜英, 秦光明, 程玲. 不同类型冠心病与脂蛋白及载脂蛋白异常. 中国动脉硬化杂志, 1998, **6**(4): 329- 332
- (此文 1999- 07- 02 收到, 1999- 11- 15 修回)
- (此文编辑 胡必利)