

三种反义 *c-myc* RNA 对血管平滑肌细胞凋亡的影响

曾 嵘 李 进 戴 云 刘小蓉 安 靛

(第一军医大学组织胚胎学教研室, 广州 510515)

主题词 细胞; 凋亡; 肌, 平滑; 血管; RNA, 反义; *c-myc*; 基因表达; 大鼠

摘 要 为了了解反义 *c-myc* 基因在平滑肌细胞中持续、稳定表达对细胞凋亡的影响, 将分别载有 *c-myc* 第 1、第 2 和第 3 外显子反义片段的三种重组逆转录病毒表达载体 aM1、aM2 和 aM3, 导入体外培养的大鼠主动脉平滑肌细胞, 并于持续筛选 1 个月后进行稳定表达检测。结果表明, aM3 的导入和稳定表达使平滑肌细胞的凋亡率达到对照组的 3.6 倍, 并伴有明显的细胞体积缩小, 而 aM1 和 aM2 的凋亡诱导作用则明显弱于 aM3。另外, 在超微结构的改变上, 转染了 aM3 和 aM1 的平滑肌细胞出现凋亡和自噬的改变, 而转染了 aM2 的平滑肌细胞则普遍出现明显的肌丝束。提示, 反义 *c-myc* 的稳定表达促进平滑肌细胞的凋亡, 而 aM3 载体在体外促使平滑肌细胞发生凋亡和自噬的能力最强。

Effects of Three Kinds of Antisense *c-myc* on the Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells

ZENG Rong, LI Jin, DAI Yun, LIU XiaoRong and AN Jing

(Department of Histology and Embryology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

MeSH Cells; Apoptosis; Muscle, Smooth, Vascular; RNA, Antisense; *c-myc*; Gene Expression; Rats

ABSTRACT **Aim** In order to see the effects of continued and stable expressive antisense *c-myc* on the apoptosis of vascular smooth muscle cell (VSMC). **Methods** Three recombinant retroviral expressive vectors, aM1, aM2 and aM3, which respectively loading reverse fragments of exon 1, 2 and 3, were transferred into rat artery SMC and assayed 1 month after their stable expression. **Results** Apoptosis ratios of aM3 group were increased to 360%, while those of aM1 and aM2 groups were significantly decreased. In addition, SMC transfected with aM1 and aM3 (especially aM3), emerged morphological features of apoptosis and autophagy, while aM2 commonly appeared bunches of myofilament in electron microscopy. **Conclusion** Stable expression of antisense *c-myc* can induce SMC into apoptosis in vitro, and aM3 has the most powerful ability to induce apoptosis and autophagy.

关于反义 *c-myc* 与体外培养的血管平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) 凋亡关系的研究, 文献检索未见报道。在此, 我们将反义 *c-myc* 逆转录病毒表达载体 aM1、aM2 和 aM3 (分别载有人 *c-myc* 基因组第 1、2 和 3 外显子的反义片段), 转入体外培养的 SMC, 并用流式细胞仪和透射电镜检查细胞凋亡的情况。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

160~180 g 雄性 SD 大鼠; α -SM actin 单抗 (Dako); LipofectAMINE (Gibco BRL); G418、RNase A、PI (Sigma); *neo* 基因引物: P1 5'TCC ATC ATG GCT GAT GCA ATG CGGC 3'; P2 5' GAT AGA AGG CGA TAC GCT GCG AAT CG 3' (北京赛百盛合成); FITC 标记羊抗鼠 IgG (Jackson Immunoresearch Lab, Inc); CO₂ 孵箱 (Heraeus); 透射电镜 (JEM1200-EX 型, Olympus); 流式细胞仪 (FACS Calibur, Becton Dickinson)。

1.2 方法

1.2.1 三种反义 *c-myc* 逆转录病毒表达载体的构建 通过两次亚克隆, 将人 *c-myc* 基因组的第 1、2 和 3 外显子片段, 分别反向连入逆转录病毒载体 pLNCX, 构建成载体 aM1、aM2 和 aM3^[1,2]。

1.2.2 平滑肌细胞培养、鉴定和稳定转染 取大鼠胸主动脉中膜组织, 剪成 1 mm² 左右小块, 种植于培养瓶, 待细胞长出后传代。取第 2~4 代 SMC 用 α -SM actin 单抗进行免疫组化标记, DAB 显色鉴定。参照 GIBCO BRL LipofectAMINE 使用说明书进行 SMC 稳定转染, 48 h 后细胞按 1:5 传代并加入 0.4~0.8 g/L 不等的 G418 进行筛选。同时设未转基因的阴性对照组。

1.2.3 基因组 DNA 提取和 *neo* 基因聚合酶链反应检测 按分子克隆常规方法进行。

1.2.4 DNA 流式细胞仪检测 1×10^6 细胞用胰酶消化, PBS 冲洗, 81% 乙醇固定, -20℃, 30 min。PBS 洗涤, 1 mL 0.05 g/L PI 染色 30 min, 过滤后上流式细胞仪。

1.2.5 透射电镜观察 在 SMC 稳定转染后一个

月,倾去培养瓶内培养液,戊二醛和锇酸固定和后固定,橡皮刮刮下,枸橼酸铅和醋酸铀双重染色,上透射电镜观察。

2 结果

2.1 平滑肌细胞的鉴定

采用特异的平滑肌 actin 单抗,经盖玻片培养原位组化染色后,可见胞浆中存在向细胞两极放射排列的肌丝,因细胞重叠生长,肌丝相互交错,而胞核呈阴性反应,且因未经苏木精复染而呈空泡状。在第2~4代 SMC 中,95%以上的细胞呈阳性反应(图1, Figure 1)。



图1. 第4代平滑肌 α -肌动蛋白的表达。肌丝放射排列,相互交错,核阴性 ($\times 40$)

Figure 1. α -SM actin expression in the 4th passage SMC ($\times 40$)

2.2 外源基因在平滑肌细胞中的稳定整合

在G418筛选的第4天,SMC开始死亡,第8天未转基因组全部死亡;各转基因组则有数目不等的细胞存活,并在第10天基本形成克隆,将克隆混合扩大培养,提取基因组DNA行 *neo* 基因PCR扩增,可见到如图2 (Figure 2)的430 bp条带,证实外源基因已在SMC中稳定整合。

2.3 流式细胞仪结果

由表1 (Table 1)可见,aM3稳定表达对SMC的凋亡诱导率最高,可达到对照组的3.6倍,并伴有明显的细胞体积缩小(前角散射光与细胞的直径成正比),而且aM3的凋亡诱导作用在瞬时表达时已显示出来。其次是aM1和aM2,二者作用比较接近,都明显弱于aM3。

2.4 透射电镜结果

未转染基因的SMC(第18代)断面呈椭圆形,胞膜有少量细小的锐性突起,核较大,呈圆形、椭圆形

或肾形,核膜完整,核染色质分布均匀,可见1~2个核仁,胞质中富含游离核糖体,线粒体多集中分布于胞质一侧,呈椭圆形,嵴较密集,粗面内质网不甚发达,难以见到高尔基复合体及肌丝。转染空载体的SMC未见明显改变,少量可见线粒体数目增多(图3, Figure 3)。

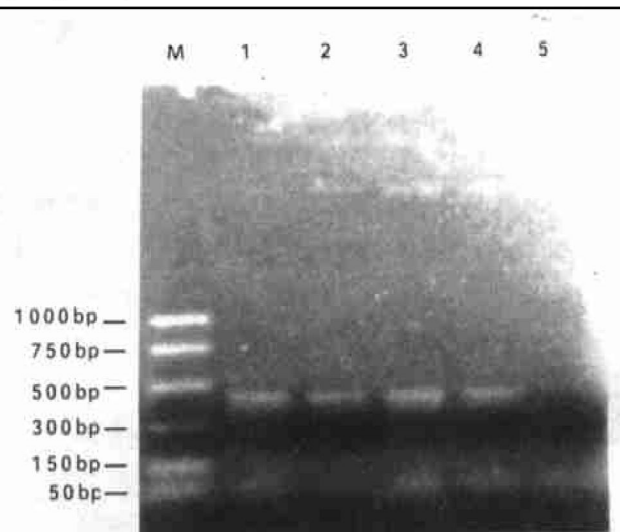


图2. *neo* 基因聚合酶链反应扩增。转基因组出现430 bp条带

Figure 2. PCR amplification of *neo* gene. M: PCR markers; 1: SMC/pLNCX; 2: SMC/aM1; 3: SMC/aM2; 4: SMC/aM3; 5: SMC

表1. 瞬时、稳定表达对平滑肌细胞凋亡率、细胞直径的影响

Table 1. Transient and stable expression effects on SMC apoptosis ratios and cell sizes

Groups	Apoptosis%		FSC-H	
	Transient	Stable	Transient	Stable
SMC	4.15	4.56	576.37	528.82
SMC/LN	3.04	3.38	605.13	576.26
SMC/aM1	2.71	6.49	651.60	399.39
SMC/aM2	4.73	6.07	562.80	398.70
SMC/aM3	8.92	12.25	560.31	277.65

FSC-H: 前角散射光

稳定转染了aM3的SMC则出现了比较明显的改变:许多细胞胞膜内陷的同时,形成多处钝性不规则突起,胞膜完整并呈明显的胞质“出泡”现象,并可见“出泡”的胞质正在脱落或已经脱落,核染色质不均,但无明显的凝集;④部分细胞电子密度增高,核明显变小,核膜完整但核的褶皱加深加多,使核成为不规则的分叶花瓣状,核内出现高电子密度的点、块状染色质,并向核膜边聚,胞质中细胞器结构仍基本保存,游离核糖体分布均匀,内质网呈池状扩张,

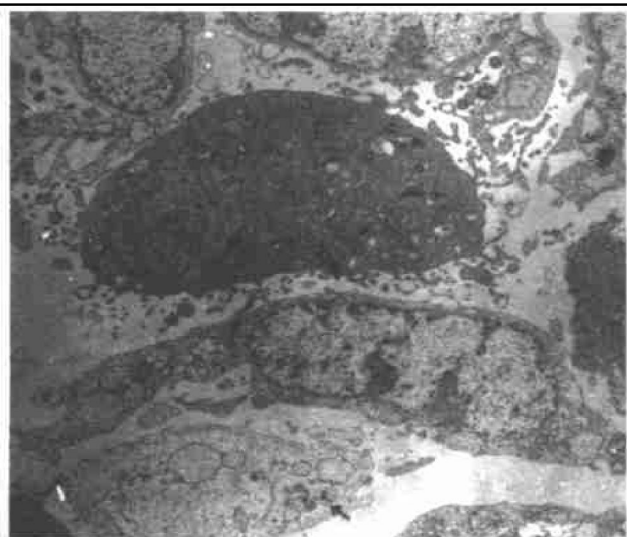


图 3. 转染 pLNCX 的平滑肌细胞超微结构 ($\times 6\,000$). 难以见到高尔基复合体及肌丝, 少量线粒体数目增多

Figure 3. Ultrastructure of pLNCX transfected SMC ($\times 6\,000$)

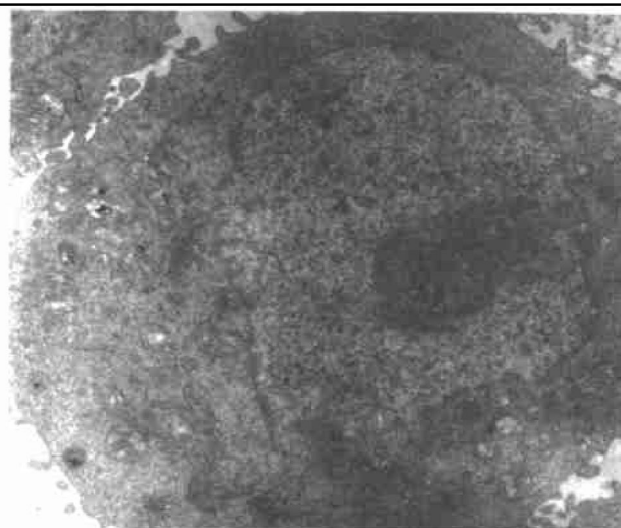


图 4. 转染 aM3 平滑肌细胞的超微结构 ($\times 2\,500$). 有大量的自噬体和自噬泡 (→)

Figure 4. Ultrastructure of aM3 transfected SMC ($\times 2\,500$)

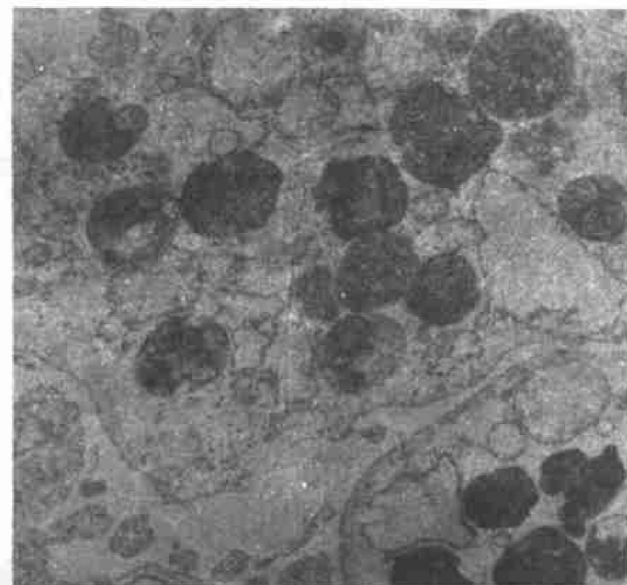


图 5. 转染 aM3 平滑肌细胞超微结构 ($\times 7\,500$). 凋亡小体中广泛出现大量的自噬体和自噬泡 (→)

Figure 5. Ultrastructure of aM3 transfected SMC ($\times 7\,500$)

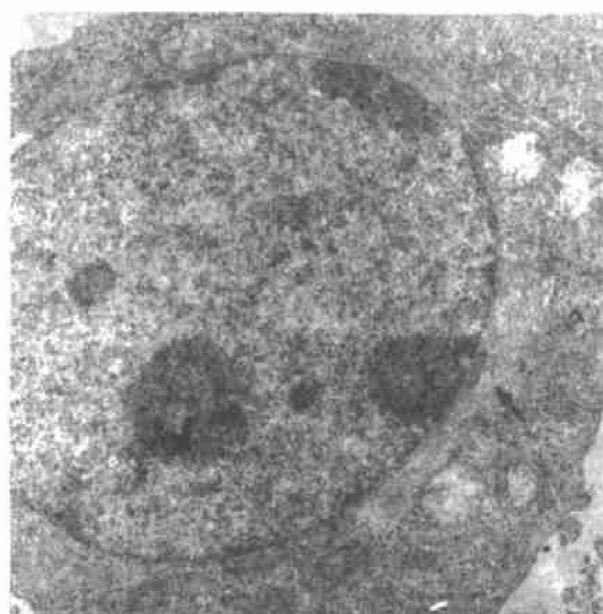


图 6. 转染 aM2 平滑肌细胞的超微结构 ($\times 6\,000$). 合成细胞器发达, 重现大量的肌丝 (→)

Figure 6. Ultrastructure of aM2 transfected SMC ($\times 6\,000$)

线粒体偏多, 部分退化为髓样结构, 退变的细胞器随着胞膜的内陷而逐渐脱落(图 4, Figure 4), 呈现凋亡征象。另外, 还可见到凋亡小体(图 5, Figure 5)。值得注意的是, 在上述两类细胞及凋亡小体中还广泛出现大量的自噬体和自噬泡(→)。

转染了 aM1 的 SMC 中部分细胞也出现了类似 aM3 的改变。

转染 aM2 的 SMC 也可见到少量的凋亡细胞, 但更普遍的改变是合成细胞器发达, 出现大量的肌丝(图 6, Figure 6)。

3 讨论

凋亡是一种普遍存在的正常的生理性自身平衡调控机制, 它在胚胎形成和成年中都起着调节组织物质和结构的作用。动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的形成不仅与斑块中细胞的增殖而且与它们的死亡有关。凋亡普遍参与了高胆固醇喂养的动物 As 模型的形成、内膜损伤后血管的再生和人 As 斑块的形成, 尤以病变区域中的炎性细胞(如巨噬细胞和 T 细胞)为甚。据报道, As 硬化区细胞的凋亡率为 10%, 而在巨噬细胞富集区高达 40%; 在内膜剥脱的血管, 损伤后 9 天新生内膜中 40% 的细胞发生凋亡, 14 天时凋亡率 20%, 28 天时仍有 10%^[3]。上

述数据说明凋亡在血管平滑肌细胞病变中是高发的, 不仅如此, 凋亡的形态学模式已越来越多地出现于对广泛刺激的反应, 包括吡咯烷二硫代甲酸 (pyrrolidinedithiocarbamate, PDTC)、N-乙酰基半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC)、氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)、紫外线 C (ultraviolet C, UVC)、一氧化氮 (nitric oxide, NO)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和 γ -干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 等^[4-7]。

c-myc 在许多研究中已揭示与凋亡相关, 其表达失控在成纤维细胞、髓系细胞和淋巴细胞中都与凋亡率增高密切相关, 而 SMC 与成纤维细胞一样, 也可由 *c-myc* 推动增殖和凋亡的同时发生^[8]。我们通过流式细胞仪和电镜检测, 证实了反义 *c-myc* 的稳定表达对 SMC 的凋亡有促进作用, 而且该作用以第 3 外显子的反义 RNA 为最强。aM3 促凋亡是在促增殖的同时出现的, 但无以得知这两者之间是一种并存关系抑或存在着因果关系, 是否高增殖可以导致高凋亡, 而凋亡是对高增殖的一种对策。与此同时, 我们还观察到自噬现象的发生。在凋亡细胞和凋亡小体中, 存在着大量的自噬体和自噬泡。这虽然不能排除部分是由凋亡后期对凋亡小体的吞噬清除作用所造成, 但更可能是自噬性凋亡^[9] 和自噬现象的出现。在此之后, 我们在同样转染了反义 *c-myc* 的人白血病细胞 HL-60 中, 也不但观察到细胞凋亡率增加和超微结构中出现大量自噬体和自噬泡的现象, 而且发现反义 RNA 导入后 HL-60 细胞的 ACP 酶活性明显增高, 这些现象显然不是用凋亡所能够完全解释的, 因为凋亡的发生有蛋白酶、核酸内切酶和谷氨酰胺转移酶等的参与, 而无 ACP 酶的增高。结合自噬体(泡)的大量出现及 ACP 酶活性的明显增加, 我们推断反义 *c-myc* RNA 的导入不仅使细胞凋亡增加, 而且可能存在另一种更为广泛的影响, 即使细胞发生了自噬。与凋亡一样, 自噬也是细胞的一种自我保护反应, 其特征是形成大量自噬体和自噬泡, 早期自噬体中含可辨认的细胞器, 如线粒体、核糖体, 也可见到内质网。自噬体由损伤细胞器周围扩大的内质网池包绕多种细胞器和部分胞质等而成。反义 *c-myc* RNA 的导入引起自噬增强, 提示自噬现象可能也是一种受基因调控的自我保护行为。

另外, 在检测基因转导后是否发生了染色体整合上, 有两种方法可供选择: Southern 杂交和 PCR 扩增。Southern 杂交结果可靠, 但不够敏感, 操作过程繁琐, 且要接触同位素; PCR 扩增则敏感简便安全, 但容易出现假阳性。其次, 从检测基因的选择上分, 又有目的基因检测和载体基因检测两种。前者可直接观察靶基因的整合, 但若细胞基因组上存在靶基因的同源序列, 则易出现假阳性结果; 后者则以载体上某段序列为检测区域, 可用同一引物或探针检测外源构建体在细胞中的整合, 尤其适合于同种载体的不同构建体或正、反义构建体的检测。我们采用的是载体上的 *neo* 基因检测法, 不仅可以节省引物数量, 而且可以避免内源性同源序列引起的假阳性, 因为 *neo* 基因来源于原核细胞, 在真核细胞内没有同源序列。

参考文献

- 1 曾嵘, 李进. 人反义 *c-myc* 重组逆转录病毒表达载体 pLNC-aM1 的构建. 解剖科学进展, 1998, 4 (1): 60
- 2 曾嵘, 李进. 人反义 *c-myc* 重组逆转录病毒表达载体 pLNC-aM2 和 pLNC-aM3 的构建. 细胞与分子免疫学杂志, 1998, 3 (1): 103-105
- 3 Han DKM, Haudenschild CC, Hong MK, et al. Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol*, 1995, 147: 267-277
- 4 Tsai JC, Jain M, Hsieh CM, et al. Induction of apoptosis by pyrrolidinedithiocarbamate and N-Acetylcysteine in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 1996, 271: 3 667-670
- 5 Yang X, Galeano NF, Szaboles M, et al. Oxidized low density lipoproteins alter macrophage Lipid uptake, apoptosis, viability and nitric oxide synthesis. *J Nutr*, 1996, 126(4 Suppl): 1 072S-075S
- 6 Nishio E, Arimura S, Watanaba Y. Oxidized LDL Induces apoptosis in cultured smooth muscle cells: a possible role for 7-ketocholesterol. *Biochem Biophys Res Com*, 1996, 223: 413-418
- 7 Lopez Candales A, Holmes DR, Scott MJ, et al. Effects of ultraviolet light in vascular cells in vitro and in intact atherosclerotic explants: potential role of apoptosis in vascular biology. *Biochem Cell Biol*, 1996, 74 (3): 333-345
- 8 Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, et al. Induction of apoptosis in fibroblasts by *c-myc* protein. *Cell*, 1992, 69: 119-128
- 9 Piao YJ, Liu LP, Huang XX, et al. Radiation-induced autophagic apoptosis of rat splenic lymphocytes. *Acta Histochem Cytochem*, 1997, 30: 629-636

(此文 1999-07-06 收到, 1999-10-30 修回)

(此文编辑 朱雯霞)