

•实验研究•

[文章编号] 1007-3949(2001)-01-0006-04

# 反义 c-jun 表达质粒对血管平滑肌细胞表型转化标志的影响

李琦, 温进坤, 韩梅

(河北医科大学基础医学研究所生物化学研究室, 河北省石家庄市 050017)

[关键词] 基因, jun; 核苷酸, 反义; 肌, 平滑, 血管; 表型; 遗传标志; 骨桥蛋白; 基因表达; 大鼠

[摘要] 为研究 c-jun 反义 RNA 对血管平滑肌细胞表型转化的影响, 本文应用可表达 c-jun 反义 RNA 的真核细胞表达载体转染大鼠血管平滑肌细胞, 采用 Northern 印迹、Western 印迹和氘标胸腺嘧啶核苷掺入实验, 观察反义 c-jun 对血管平滑肌细胞表型标志基因平滑肌  $\alpha$  肌动蛋白、平滑肌胚胎型肌球蛋白重链和骨桥蛋白表达和 DNA 合成的影响。结果发现, 在血管平滑肌细胞中表达的 c-jun 反义 RNA 可使血管平滑肌细胞去分化标志基因平滑肌胚胎型肌球蛋白重链和骨桥蛋白 mRNA 表达较对照分别下降 50% 和 95%, 骨桥蛋白水平较对照下降 75%, 同时血管平滑肌细胞的 DNA 合成受到显著抑制, 实验组氘标胸腺嘧啶核苷掺入值较对照降低 37%。c-jun 反义 RNA 对血管平滑肌细胞分化标志基因平滑肌  $\alpha$  肌动蛋白的表达无明显影响。提示 c-jun 基因表达产物在维持血管平滑肌细胞于去分化状态中起重要作用。

[中图分类号] Q527

[文献标识码] A

## Effects of c-jun Antisense Gene Expression Plasmids on Phenotypic Switch Markers of Rat Vascular Smooth Muscle Cells

LI Qi, WEN Jin-Kun, and HAN Mei

(Department of Biochemistry, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**MeSH** Genes, jun; Nucleotides, Antisense; Muscle, Smooth, Vascular; Phenotypes; Genetic Markers; Osteopontin; Gene Expression; Rats

**ABSTRACT** **Aim** To study the effects of c-jun antisense gene on phenotypic switch of vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** Eukaryotic expression vectors which could transcript into c-jun antisense RNA were transfected into rat VSMC, Northern blotting, Western blotting and  $^3\text{H}$ -TdR incorporation were used to observe the effects of c-jun antisense RNA on the expression of phenotypic marker genes SM  $\alpha$  actin, SMemb, osteopontin and DNA synthesis of VSMC. **Results** By the c-jun antisense RNA expressed in VSMC, compared with control group, the mRNA expression of dedifferentiated marker genes SMemb and osteopontin decreased 50% and 95% respectively, the osteopontin decreased 75%, and the DNA synthesis of VSMC was evidently inhibited, the  $^3\text{H}$ -TdR incorporation decreased 37%, but the effect of c-jun antisense RNA on differentiated marker gene SM  $\alpha$  actin had not been observed. **Conclusion** The expressive products of c-jun gene was important for VSMC to keep dedifferentiated.

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 异常增殖是许多心血管疾病的共同病理基础, 位于血管中膜的 VSMC 由分化型转变为去分化型是其增殖的前提。c-jun 产物是参与细胞增殖调控的主要转录因子之一。已经证明, 应用反义技术抑制 c-jun 基因表达可有效抑制细胞增殖<sup>[1,2]</sup>, 但该

基因表达变化对 VSMC 表型转化有无影响尚未见报道。本文应用可表达 c-jun 反义 RNA 的真核细胞表达载体转染 VSMC, 以平滑肌  $\alpha$  肌动蛋白 (smooth muscle  $\alpha$  actin, SM  $\alpha$  actin) 作为分化型 VSMC 的分子标志, 平滑肌胚胎型肌球蛋白重链 (smooth muscle embryonic myosin heavy chain, SMemb) 和骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 作为去分化型 VSMC 的分子标志<sup>[3~5]</sup>, 观察 c-jun 反义 RNA 对 VSMC 表型转化标志的影响。

[基金项目] 国家自然科学基金 (39970274) 及河北省自然科学基金 (301358) 资助项目

[作者简介] 李琦, 男, 1967 年 1 月出生, 河北省保定市人, 博士研究生, 副教授。温进坤, 男, 1954 年出生, 医学博士, 生物化学教授, 博士研究生导师。韩梅, 女, 1961 年出生, 医学博士, 生物化学教授, 博士研究生导师。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

SD 大鼠由河北省实验动物中心提供。M199 培养基为 GIBCO 公司产品。按文献[2]方法,将  $\sigma$ -jun cDNA (6~ 2003 bp) 反向插入真核表达质粒 pB  $\oplus$ SK (-) 中,构成可表达反义  $\sigma$ -jun RNA 的 pB  $\oplus$ SK (-) SV-jun。SM  $\alpha$ -actin、SMemb 和 OPN cDNA 探针为本室合成<sup>[4]</sup>。随机引物标记试剂盒由 Promega 公司提供。 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 为北京亚辉公司产品。兔抗鼠 OPN 抗血清为本室自制。羊抗兔 IgG-HRP 购自中山公司。其他试剂为进口或国产分析纯。

## 1.2 大鼠血管平滑肌细胞的培养

取 5 周龄 SD 大鼠胸主动脉,按本室报道<sup>[6]</sup>的贴块法,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内,用含 10% 胎牛血清的 M199 培养液(含青霉素 100 ku/L,链霉素 100 mg/L)进行原代培养,待 VSMC 爬满培养瓶后,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,取 4~ 10 代细胞进行实验。

## 1.3 细胞转染

取 pB  $\oplus$ SK (-) SV-jun 质粒 30  $\mu$ g,按磷酸钙沉淀法转染生长至 80% 汇合度的 VSMC,对照实验以等体积的缓冲液代替质粒,每个实验重复 3 次。被转染的细胞经甘油休克后,换成含 10% 胎牛血清的 M199 培养液,继续培养 48 h 后,用异硫氰酸胍一步法<sup>[7]</sup>,分别从实验和对照 VSMC 中提取 RNA。同时,制备细胞裂解液,用改良酚试剂法测定蛋白含量,-20℃贮存待用。

## 1.4 Northern blot 分析

取从对照和转染反义  $\sigma$ -jun 质粒的 VSMC 中提取的 RNA 各 30  $\mu$ g,经 1% 琼脂糖-甲醛变性凝胶电泳分离及紫外灯下观察照相以 18 S 和 28 S rRNA 条带亮度相同确定各样品上样量一致后,将 RNA 转移、固定至尼龙膜上,按 Sambrook 等<sup>[8]</sup>方法于 42℃ 条件下,在含 50% 甲酰胺、6  $\times$  SSC、5  $\times$  Denhardt 溶液、0.5% SDS 和 100 mg/L 变性鲑精 DNA 的杂交液中,分别与  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 标记的  $\sigma$ -jun、SM  $\alpha$ -actin、SMemb 和 OPN cDNA 探针进行杂交,杂交膜先后用 1  $\times$  SSC、0.1% SDS 及 0.2  $\times$  SSC、0.1% SDS 漂洗,在 70℃ 放射自显影。

## 1.5 Western blot 分析

取从对照和转染反义  $\sigma$ -jun 质粒的 VSMC 中提取的蛋白各 13  $\mu$ g,经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(分离胶浓度为 10%)分离后,电转移至硝酸纤维膜上,经封闭后相继与兔抗鼠 OPN 抗体及羊抗兔 IgG-HRP 温育,最后以 4-氯-1-萘酚显色液显色。

## 1.6 氘标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入实验

血管平滑肌细胞被 pB  $\oplus$ SK (-) SV-jun 质粒转染 42 h 后,向培养液中加入 <sup>3</sup>H-TdR 至终浓度为 2 mCi/

L,继续培养 6 h,收集细胞,用液闪计数器测定 cpm 值,每组实验重复 3 次,取平均值,结果用均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,差异显著性分析用组间  $t$  检验。

## 1.7 密度扫描分析

采用美国 Kodak 公司 ID 数码成像分析系统软件对 Northern 杂交信号和 Western 区带进行定量分析,扫描灰度值用积分光密度值(IOD)表示。

# 2 结果

## 2.1 外源性反义 $\sigma$ -jun 基因在血管平滑肌细胞中的表达

以  $\sigma$ -jun cDNA 片段为探针,对从实验和对照细胞中提取的 RNA 进行 Northern 分析,检查 pB  $\oplus$ SK (-)SV-jun 能否在 VSMC 中进行瞬时表达。从图 1 (Figure 1)可见,转染反义  $\sigma$ -jun 基因的 VSMC 和对照 VSMC 中均有杂交带出现,其长度(约 2 kbp)与预期结果一致。两种细胞相比,被反义  $\sigma$ -jun 基因转染细胞的杂交信号明显增强,其 IOD 值(1.0)为对照(0.2)的 5 倍,说明反义  $\sigma$ -jun 基因在 VSMC 中得到明显表达。

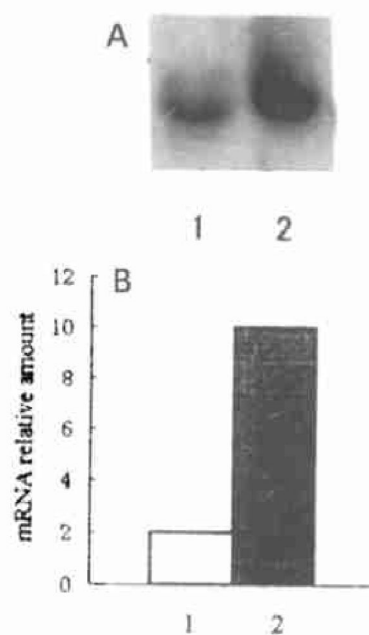


图 1 血管平滑肌细胞中  $\sigma$ -jun 表达产物 Northern 印迹分析  
Figure 1 Northern blot analysis of  $\sigma$ -jun expression in rat VSMC. A. Autoradiogram. B. Densitometric scanning. 1: Control group; 2: VSMC transfected by pB  $\oplus$ SK (-) SV-jun

## 2.2 $\sigma$ -jun 反义 RNA 对血管平滑肌细胞表型标志基因表达的影响

向 VSMC 中导入反义  $\sigma$ -jun 基因 48 h 后,与对照

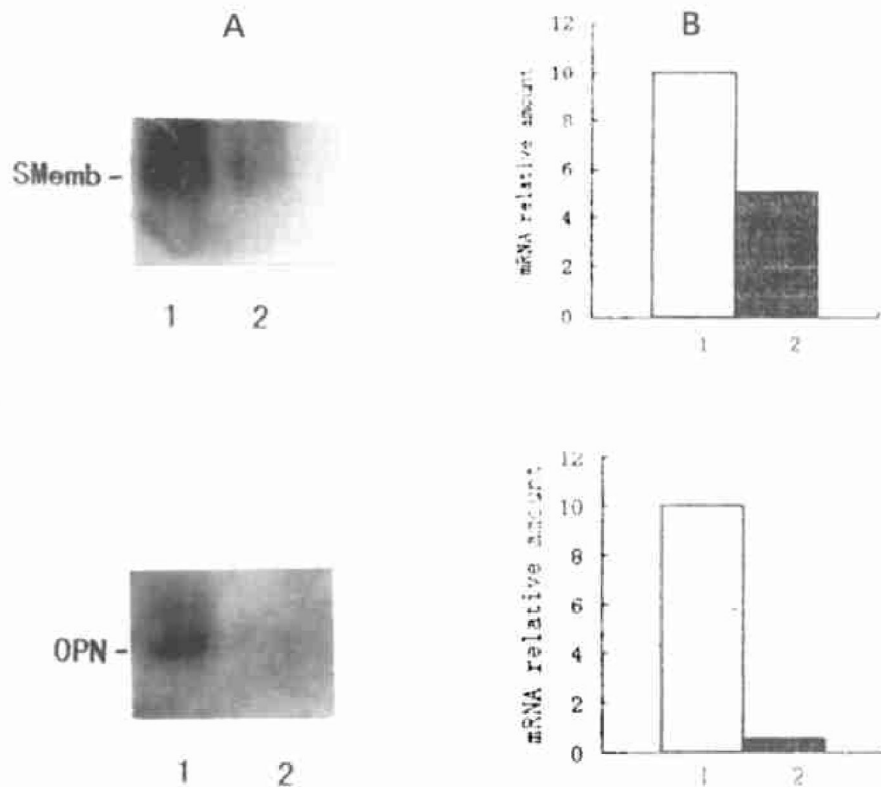


图2 血管平滑肌细胞中胚胎型肌球蛋白重链、骨桥蛋白 mRNA 的 Northern 印迹分析

**Figure 2 Northern blot analysis of expression of SMemb and OPN genes in rat VSMC.** A. Autoradiogram. B. Densitometric scanning. 1: Control group; 2: VSMC transfected by pB $\odot$ SK(-)SV-jun

细胞相比, 被转染细胞中去分化型标志基因 SMemb 的表达活性明显降低, 其 IOD 值(0.5)为对照(1.0)的 50% (图 2, Figure 2), 说明  $\sigma$ -jun 反义 RNA 使 VSMC 去分化标志基因表达发生变化。在转染和对照细胞中均有 SM  $\alpha$ -actin mRNA 特异性杂交带出现, 且信号强度无显著差别, 提示  $\sigma$ -jun 反义 RNA 对分化型标志基因 SM  $\alpha$ -actin 表达无明显影响。

从图 2 (Figure 2) 可见, 对照细胞中有明显的 OPN mRNA 特异性杂交带出现, 而转染细胞中 OPN mRNA 只有微量表达。说明  $\sigma$ -jun 反义 RNA 通过抑制内源性  $\sigma$ -jun 基因表达可有效抑制 OPN 基因的表达。Western 印迹分析结果表明, 在被反义  $\sigma$ -jun 基因转染的 VSMC 中, OPN 条带的 IOD 值为 0.25, 仅是未转染细胞( IOD 值为 1.0) 的 25% 左右(图 3, Figure 3)。

### 2.3 $\sigma$ -jun 反义 RNA 对血管平滑肌细胞 DNA 合成的影响

氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入实验结果如表 1 (Table 1) 所示, 加入 $^3$ H-TdR 6 h 后, 被反义  $\sigma$ -jun 基因转染的细胞, 其 $^3$ H-TdR 掺入值(cpm)比对照细胞降低 37%, 其差异具有显著性, 说明反义  $\sigma$ -jun 基因的

导入抑制了 VSMC 的增殖。

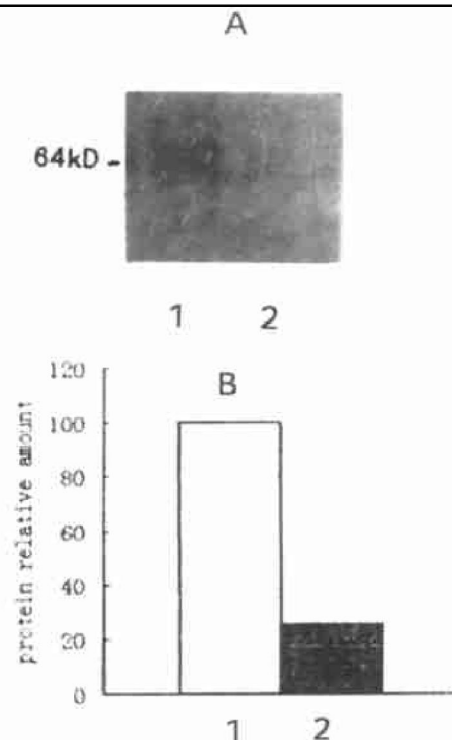


图3 血管平滑肌细胞中骨桥蛋白的 Western 印迹分析

**Figure 3 Western blot analysis of OPN in rat VSMC.** A. Western blot. B. Densitometric scanning. 1: Control group; 2: VSMC transfected by pB $\odot$ SK(-)SV-jun

表 1  $\sigma$  jun 反义 RNA 对血管平滑肌细胞氚标胸腺嘧啶核苷掺入的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effect of  $\sigma$  jun antisense RNA on rat VSMC  $^3$ H-TdR incorporation

Groups	n	cpm
Control	5	2668.7 $\pm$ 73.36
$\sigma$ jun	5	1755.0 $\pm$ 31.56 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.05$ , compared with control group

### 3 讨论

已经证明,原癌基因  $\sigma$  myc、 $\sigma$  fos 和  $\sigma$  jun 等所编码的核蛋白参与细胞丝裂信号的传递,与 VSMC 增殖密切相关。应用反义  $\sigma$  myc、 $\sigma$  fos 或  $\sigma$  jun 寡聚核苷酸可抑制细胞的增殖,但抑制上述原癌基因表达对 VSMC 表型转化是否产生影响尚未见报道。VSMC 的表型状态可通过表型标志基因的表达来鉴别,SM  $\alpha$  actin 为分化型 VSMC 特有的收缩蛋白,VSMC 由分化型向去分化型转化时该基因表达明显下调,是 VSMC 表型转化的最重要的标志之一<sup>[4]</sup>。SMemb 是平滑肌肌球蛋白重链的胚胎型,该基因在胚胎期的 VSMC 中高表达,分化型 VSMC 中不表达。但当 VSMC 从分化型向去分化型转变时,该基因又重新开放,因此被认为是去分化型 VSMC 的重要标志<sup>[4]</sup>。骨桥蛋白是一种粘附性糖蛋白,分化型 VSMC 中不表达,去分化型 VSMC 中高表达,是 VSMC 表型转化的另一重要标志物<sup>[5]</sup>。本研究将可表达  $\sigma$  jun 反义 RNA 的重组质粒导入体外培养的 VSMC,观察抑制内源  $\sigma$  jun 基因表达对 VSMC 表型标志基因表达的影响。

本实验室在研究  $\sigma$  jun 反义 RNA 对 VSMC 增殖的影响时发现,我们构建的可表达  $\sigma$  jun 反义 RNA 的真核表达质粒 pB  $\oplus$ SK(-)SV-jun 转染 VSMC 后 48 h,其表达效率及对细胞增殖的抑制作用最强<sup>[2]</sup>。因此,本研究选择转染后 48 h 这一时间点,观察  $\sigma$  jun 反义 RNA 对 VSMC 表型标志物表达的影响。结果

表明, $\sigma$  jun 反义 RNA 在 VSMC 中的瞬时表达,可显著抑制该细胞去分化标志基因的表达及 DNA 合成。我们推测  $\sigma$  jun 反义 RNA 可能通过抑制内源性  $\sigma$  jun 基因表达,使参与细胞丝裂信号转导的 Ap-1(FOS/JUN 二聚体)转录因子合成发生障碍。其结果一方面表现为被转染细胞的 DNA 合成速度变慢,即<sup>3</sup>H-TdR 掺入值显著降低;另一方面,使以 Ap-1 结合位点作为顺式元件的 OPN 基因表达活性降低,VSMC 的去分化特征减弱,另一去分化标志基因 SMemb 的表达活性也随之下调。 $\sigma$  jun 反义 RNA 造成 VSMC 去分化标志基因表达活性降低的原因除其直接抑制 OPN 表达外,是否还通过抑制细胞增殖间接对 VSMC 表型标志产生影响?这一问题尚待进一步研究。

### 参考文献

- [1] 冀群升,章静波.  $\sigma$  fos 原癌基因的研究进展 [J]. 国外医学分子生物学分册, 1994, 16: 152-156
- [2] 石 纛,温进坤. 反义癌基因  $\sigma$  jun 对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响 [J]. 生物化学杂志, 1996, 12 (2): 153-156
- [3] Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells [J]. Physiol Rev, 1995, 75: 487-517
- [4] 李 琦,温进坤,韩 梅. 血管再狭窄发生过程中 SM  $\alpha$  actin 和 SMemb 基因表达的变化及其影响机制研究 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16(6): 832-836
- [5] 石 纛,温进坤. 新生小牛血清、碱性成纤维细胞生长因子和肝素对大鼠血管平滑肌细胞骨桥蛋白基因表达的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 1999, 7: 1-3
- [6] 胡 静,温进坤,魏素珍,等. 甲基硝基亚硝基胍对血管平滑肌细胞增殖的影响 [J]. 中华物理医学杂志, 1994, 16: 211-213
- [7] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. Anal Biochem, 1987, 162: 156-159
- [8] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning A laboratory manual(2nd ed) [M]. New York: Cold spring harbor laboratory press, 1989

(此文 2000-12-05 收到, 2001-02-24 修回)

(此文编辑 胡必利)