

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2001)-04-0294-04

转染血管紧张素 ET_1 型受体反义核苷酸对血管外膜成纤维细胞增殖的影响

周兴文, 杨永健, 张鑫, 朱峻, 李刚

(成都军区成都总医院心血管内科, 成都 610083)

[主题词] 血管紧张素 ET_1 受体; 反义核苷酸; 细胞增殖; 血管外膜成纤维细胞

[摘要] 为了评价转染血管紧张素 ET_1 型受体反义核苷酸对血管外膜成纤维细胞血管紧张素 ET_1 受体亚型 mRNA 表达, 及细胞内核酸蛋白质的合成水平的作用。采用逆转录—聚合酶链反应克隆血管紧张素 ET_1 型受体 cDNA 序列(476 bp), 将克隆 cDNA 反向插入 PLXSN, 构建一完整的含血管紧张素 ET_1 型受体的质粒, 并转染入培养的血管外膜成纤维细胞, 逆转录—聚合酶链反应和免疫印迹鉴定其转染后血管紧张素 ET_1 型受体 mRNA 和蛋白表达。比较血管紧张素 ET_1 10^{-7} mol/L 刺激 24 h 后的转染及非转染的血管外膜成纤维细胞血管紧张素 ET_1 受体各亚型 mRNA 表达、细胞内核酸蛋白质的合成水平。转染组血管紧张素 ET_1 型受体 mRNA 和蛋白表达量显著减少, 对照组相比差异显著 ($P < 0.01$)。血管紧张素 ET_1 10^{-7} mol/L 刺激 24 h 后, 与对照组血管外膜成纤维细胞相比, 转染组血管紧张素 ET_1 型受体 mRNA 表达明显减少, 血管紧张素 ET_1 受体 ET_2 型 mRNA 表达明显增加 ($P < 0.01$), 但两组间核酸和蛋白合成均无显著差异 ($P > 0.05$)。提示反义核苷酸封闭后, 血管外膜成纤维细胞血管紧张素 ET_1 型受体 mRNA 表达显著抑制, 同时血管紧张素 ET_1 受体 ET_2 型 mRNA 上调。单纯封闭血管紧张素 ET_1 型受体 mRNA 并不能有效阻断血管紧张素 ET_1 介导的血管外膜成纤维细胞生长。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effect of Transfected Angiotensin ET_1 Receptor Type iv Anti-Sense Nucleotide on the Proliferation of Cultured Rat Adventitial Fibroblasts

ZHUO Xir-Wen, YANG Yong-Jian, ZHANG Xin, and ZHU Jun

(Cardiology Department, General Hospital of Chengdu Army, Chengdu 610083, China)

MeSH Angiotensin ET_1 Receptors; Antisense Nucleotide; Cell Proliferation; Adventitial Fibroblasts

ABSTRACT **Aim** The purpose of the study is to evaluate the role of AT-1 anti-sense nucleotide (AT-1A) in expression of subtypes of angiotensin ET_1 (Ang ET_1) receptor mRNA, and syntheses of protein and nucleic acid in cultured rat adventitial fibroblasts. **Methods** AT-1 cDNA sequence (476 bp) was cloned with RT-PCR and inserted into PLXSN reversely to construct an intact plasmid containing AT-1A (PAT-1A). It was transfected into cultured rat adventitial fibroblasts, and identified by RT-PCR and Western blot. Syntheses of protein and nucleic acid by ^3H -Leu and ^3H -TdR incorporation, mRNA expressions of AT-1 and AT-2 by RT-PCR, were compared between transfected and nontransfected cultured rat adventitial fibroblasts after being stimulated for 24 h by Ang ET_1 10^{-7} mol/L. **Results** AT-1 mRNA and protein were expressed significantly less in cultured rat adventitial fibroblasts than that in control ($P < 0.01$). AT-1 mRNA expression was markedly decreased, and AT-2 mRNA obviously increased ($P < 0.01$); but no apparent difference was found in ^3H -Leu and ^3H -TdR incorporation between transfected and nontransfected cultured rat adventitial fibroblasts after stimulation for 24h of Ang ET_1 10^{-7} mol/L ($P > 0.05$). **Conclusion** After being blocked by AT1A, expression of AT-1 mRNA in cultured rat adventitial fibroblasts was markedly suppressed, while AT-2 mRNA up-regulated at the same time. It is shown that both syntheses of protein and nucleic acid in cultured rat adventitial fibroblasts mediated by Ang ET_1 could not be effectively interrupted simply by AT-1A blocking.

[基金项目] 四川省科委资助项目(2000145)

[作者简介] 周兴文,男,1953年出生,医学硕士,主任医师,硕士研究生导师,成都军区总医院心内科主任。杨永健,男,1965年出生,重庆万州人,医学博士,主治医师。张鑫,男,1954年出生,山西榆社人,大学本科,副主任医师,成都军区总医院心内科副主任。

肾素—血管紧张素系统的关键物质血管紧张素 ET_1 (angiotensin ET_1 , Ang ET_1) 通过与特异的受体(angiotension receptor type 1, AT-1) 结合,引起一系列的生物效应,在心血管重塑的病理过程中起重要作用^[1,2]。血管外膜在血管重塑中的作用受到越来越多的重

视,近期有人提出在血管重塑过程中新生内膜并非来源于血管中层的血管平滑肌,而是由血管外膜和中层的成纤维细胞增殖迁移而成^[3,4]。近年来,血管重塑的逆转已成为研究的重要课题,因此我们构建了含 AT-1 反义核苷酸的真核表达质粒(PAT1A),转染培养的血管外膜成纤维细胞,观察对血管外膜成纤维细胞增殖的影响,旨在为血管重塑的防治提供更多的实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

逆转录病毒载体 PLXSN、包装细胞(PA317 细胞株)由第三军医大学大坪医院心血管内科胡厚祥博士提供, JM109 菌株为本实验室保存。主要酶和试剂: RNA 提取试剂盒(Boehringer Mannheim), AT-1(兔抗)、化学发光试剂等(Santa Cruz), 逆转录(RT)试剂盒、限制性内切酶 EcoR iv、Hind Ⅲ、T4 连接酶(Promega), Taq 酶(Sangon), M199(GIBCO), Ang Ⅱ(Sigma), ³H-Leu 和 ³H-TdR(北京原子能科学研究院)。

1.2 克隆血管紧张素 Ⅱ 型受体 cDNA 片段

采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法。引物设计如下: AT-1 cDNA 片段为 476 bp, 为便于 PCR 产物的亚克隆, 3' 引物的 5' 端加入 ECOR I 识别位点(GCG AATTCITGAACCTGTCACTCCACC), 5' 引物的 5' 端加入 Hind Ⅲ识别位点(GCA AGCTTATGTTCCCTTTCCTTATC)。RT-PCR 反应: 取 wistar 大鼠的血管组织提取 RNA, RT 按试剂盒说明书完成, (PCR 循环参数: 99℃ 12 min plus Taqase, 88℃ 3 min, step3 95℃ 2 min; 94℃ 5 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 循环 35 周期; 72℃ 延伸 10 min)。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 用 V 型槽回收所需 DNA 片段。

1.3 质粒的制备、纯化、酶切、连接^[5]

PLXSN 的转化与提取按常规方法进行。用限制性内切酶 EcoRI 和 Hind Ⅲ切开 PLXSN 成线性化质粒(PLXSN 酶切位点与 AT-1 cDNA 酶切位点方向相反), 回收线性质粒。将双酶切开的线性载体与克隆 AT-1 cDNA 片段按 1:3 混合, T4 连接酶连接, 构建成含 AT-1 反义核苷酸的质粒 PAT1A, 扩增后由北京美国赛百盛生物工程公司进行 DNA 测序。

1.4 血管外膜成纤维细胞培养与质粒转染

取 4 只 6 周雄性 Wistar 大鼠, 断头处死, 开胸游离主动脉降段(沿主动脉出口平至膈肌入口处), 置于 Hank's 液中洗涤血迹, 纵向剪开血管, 轻轻刮去

内膜, 并分离中层和外膜。将分离后的外膜剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小的组织块, 置于培养皿中加入 10% 胎牛血清的 M199 培养基进行组织贴块培养。细胞长至亚融合状态时, 用 0.125% trypsin-EDTA 消化、传代。取第 3~8 代细胞作实验材料。用脂质体包裹 PAT1A, 将该质粒导入 PA317 细胞株, 转染后 48 h 更换选择培养基^[5](G418, 400 mg/L, 筛选 3 周左右)。用构建的逆转录病毒清上清液感染无血清培养基培养的血管外膜成纤维细胞, RT-PCR 和 western blot 检测转染 24 h 血管外膜成纤维细胞 AT-1 mRNA 和蛋白表达。

1.5 实验分组

对照组(血管外膜成纤维细胞转染空质粒 PLXSN); 转染组(血管外膜成纤维细胞转染 PAT1A); Ang Ⅱ转染组(Ang Ⅱ 10^{-7} mol/L 刺激 24 h); Ang Ⅱ对照组(Ang Ⅱ 10^{-7} mol/L 刺激 24 h)。

1.6 Western blot 和 RT-PCR

取对照组和转染组的血管外膜成纤维细胞按 Bradford's 提取蛋白并定量, Western blot 按常规方法进行, 结果经凝胶成像系统分析光密度值(OD)。AT-1 引物同前, AT-2 (342 bp) 上游引物为 5'-TG-GCTTGTCTATCCTCATTG-3', 下游引物为 5'-ATCCAGGTCAGAGCATCC-3'; 内对照 GAPDH (21 bp) 上游引物为 5'-CGGCAAATTCAACGGCACAGTCA-3', 下游引物为 5'-TGGGGGCATCGGCAGAAGG-3', 以上引物均由 GIBCO 公司合成。将各组分别提取总 RNA, RT-PCR 条件同克隆部分, 产物经琼脂糖凝胶电泳及凝胶成像系统图象分析, 重复 3 次。

1.7 核酸与蛋白质的合成水平

将消化的血管外膜成纤维细胞配制成 3×10^5 /L 的细胞悬液, 接种于 24 孔板, 每孔 1 mL, 24 h 后加入无血清 M199 培养 24 h。对照组、Ang Ⅱ转染组、Ang Ⅱ对照组, 分别加入 ³H-Leu 或 ³H-TdR 18.5 kBq/孔, 每组重复 6 次, 24 h 后用 0.25% 的胰酶消化细胞, 多管细胞收集器将细胞吸附于玻璃纤维纸上, 烘干后加入闪烁液进行液闪计数, 以 Bq/well 表示。

1.8 统计学方法

数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 含血管紧张素 Ⅱ 型受体反义核苷质粒的构建及测序

聚合酶链反应(PCR)扩增的 AT-1 cDNA 3' 端加

入 *ECOR* I 识别位点, 5' 端加入 *Hind* III 识别位点, 插入真核表达载体 *PLXSN*, 构建含 *AT-1* 反义核苷酸的真核表达载体 *AT-1A*。对 *AT-1A* 中的插入片段进行序列测定, 插入片段与 *AT-1* cDNA 的片段序列完全一致且方向相反。

2.2 转染与非转染组血管外膜成纤维细胞血管紧张素 AT_1 型受体 mRNA 及蛋白表达

逆转录—聚合酶链反应 (RT-PCR) 结果经凝胶成像系统分析光密度值 (*AT-1*/*GAPDH*) 比值, 发现对照组为 1.134 ± 0.121 , 转染组为 0.586 ± 0.116 , 差异非常显著 ($P < 0.01$), 表明转染组 *AT-1* mRNA 表达明显减少 (图 1, Figure 1)。Western blot 结果经凝胶成像系统分析每平方毫米光密度值, 发现对照组为 3.89 ± 0.12 , 转染组为 2.11 ± 0.09 , 差异非常显著 ($P < 0.01$), 表明转染组 *AT-1* 蛋白表达量明显受抑制 (图 2, Figure 2)。

2.3 血管紧张素 AT_1 对血管外膜成纤维细胞血管紧张素 AT_2 受体亚型 mRNA 表达的影响

与对照组相比, Ang AT_1 刺激使 *AT-1* mRNA 表达明显增加 ($P < 0.01$)。两组间 *AT-2* mRNA 表达无显著差异 ($P > 0.05$); 与 Ang AT_1 对照组相比, Ang AT_2 转染组 *AT-1* mRNA 表达明显受抑制 ($P < 0.01$), *AT-2* mRNA 表达明显增加 ($P < 0.05$) (图 3 和表 1, Figure 3 and Table 1)。

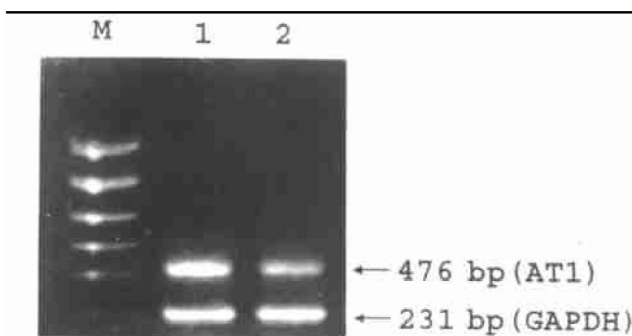


图 1. 正常对照血管外膜成纤维细胞与转染血管外膜成纤维细胞血管紧张素 AT_1 型受体 mRNA 表达

Figure 1. *AT-1* mRNA expression in cultured adventitial fibroblasts transfected with *AT-1A* and notransfected detected by RT-PCR.

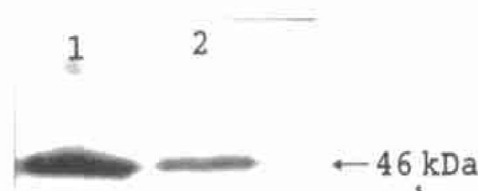


图 2. 正常对照血管外膜成纤维细胞与转染血管外膜成纤维细胞血管紧张素 AT_1 型受体蛋白表达 (western blot)

Figure 2. *AT-1* protein expression in cultured adventitial fibroblasts transfected with *AT-1A* and notransfected detected by Western blot

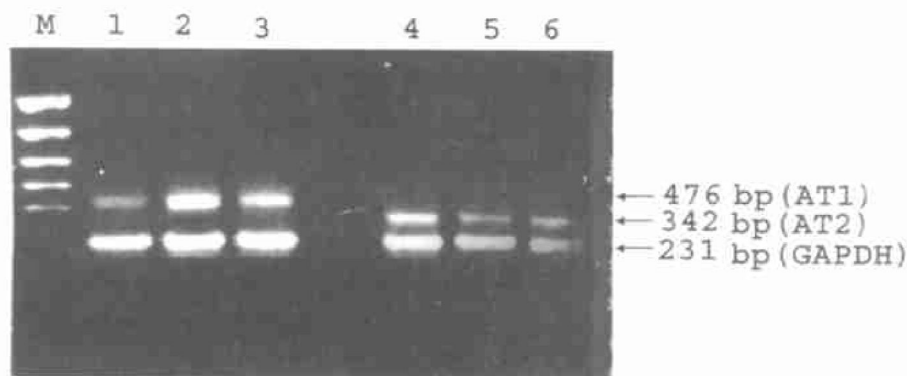


图 3. 血管紧张素 AT_1 受体亚型 mRNA 的表达

Figure 3. mRNA expression of angiotension AT_1 receptor Subtypes. M: PCR marker. 1: Control (*AT-1*). 2: non-transfected group stimulated by Ang AT_1 . 3: transfected group stimulated by Ang AT_1 . 4: transfected group stimulated by Ang AT_2 . 5: non-transfected group stimulated by Ang AT_2 . 6: control (*AT-2*).

2.4 核酸与蛋白质的合成水平

对照组 ^3H -Leu 掺入率为 32 ± 7 Bq/well, Ang AT_2 转染组为 82 ± 16 Bq/well, Ang AT_1 对照组为 80 ± 14 Bq/well ($P < 0.01$), Ang AT_2 转染组与 Ang AT_1 对照组间差异无显著性 ($P > 0.05$); 同样, 对照组 ^3H -TdR 掺入率为

1219 ± 71 Bq/well, 显著低于 Ang AT_2 转染组的 1718 ± 201 Bq/well 和 Ang AT_1 对照组的 1568 ± 106 Bq/well ($P < 0.01$), Ang AT_2 转染组与 Ang AT_1 对照组间差异无显著性 ($P > 0.05$)。

表 1. 血管紧张素 ① 受体亚型 mRNA 表达的光密度比值 (AT/GAPDH)

Table 1. OD Ratio of RT-PCR Expression of AT Subtype mRNA (AT/GAPDH)

Groups	AT-1	AT-2
Control	0.245 \pm 0.061	0.262 \pm 0.012
Ang ① + transfected	0.234 \pm 0.081	0.349 \pm 0.030 ^a
Ang ① + nontransfected	0.366 \pm 0.053 ^{bc}	0.251 \pm 0.011

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with control group. c: $P < 0.01$, compared with Ang ① + transfected group.

3 讨论

血管重塑是许多心血管疾病的共同病理过程,近年来越来越多的研究表明血管外膜成纤维细胞参与血管重塑。在 AT 的各亚型中,AT-1 占 90% 左右。Ang ① 引起心血管重构的主要机制是 Ang ① 与 AT-1 结合,激活以下几条与细胞生长有关的信号转导通路^[2,6,7]: (1) 通过磷脂酶 C 生成甘油二酯和三磷酸肌醇,进一步激活蛋白激酶 C 和细胞内 Ca^{2+} 释放; (2) 激活丝裂素活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK), 使 MAPK 磷酸化,再通过核转位调节核内转录因子,引起细胞增殖和生长反应; (3) Ang ① 还可通过磷脂酶 γ 引起酪氨酸激酶磷酸化,调节细胞生长。上述几条途径启动核转录,诱导血管外膜成纤维细胞增殖相关基因表达,使蛋白质核酸合成,最终导致血管外膜成纤维细胞增殖。本实验结果显示:与正常对照血管外膜成纤维细胞相比,Ang ① 10^{-7} mol/L 刺激 24 h 后的血管外膜成纤维细胞 AT-1 mRNA 表达、细胞内核酸蛋白合成速率明显增加,AT-2 mRNA 表达无显著差异。说明 Ang ① 介导的血管重构主要通过 AT-1 受体起作用。

应用反义 mRNA 进行心血管病的基因治疗,是近年发展起来的一项新技术。本研究试图用 AT-1A 在分子水平封闭 AT-1 mRNA,以评价 AT-1 在血管外膜成纤维细胞增殖中的作用。我们用的载体 PLXSN 为逆转录病毒载体,插入的片段为 cDNA,不会影响病毒的转录和效价,且包装成假病毒有较强的转染能力^[5,7];因此将构建的 PAT1A 转染入培养的血管外膜成纤维细胞,RT-PCR 和 western blot 结果显示转染组血管外膜成纤维细胞 AT-1 mRNA 和蛋白明显受抑制,为进一步探讨 AT-1A 在血管外膜成纤维细胞增殖中的作用打下了基础。

血管紧张素 ① 受体 (AT) 的阻断在逆转心血管重构中起重要作用^[8]。其常用方法为血管紧张素转换酶抑制剂 (ACEI) 和特异受体拮抗剂如氯沙

坦^[9,10]。反义核苷酸技术可有效地抑制目的基因的转录、翻译或诱导目的基因的降解,进而抑制目的基因的表达。本研究结果表明,Ang ① 10^{-7} mol/L 刺激 24 h 后的转染血管外膜成纤维细胞与非转染血管外膜成纤维细胞相比,前者 AT-1 mRNA 表达明显受抑制,AT-2 mRNA 表达明显增加,细胞内核酸蛋白合成速率差异均无显著性。我们设想封闭 AT-1 mRNA 后,Ang ① 介导的血管外膜成纤维细胞生长相关信号转导可通过 AT-2 上调来代偿,AT-2 mRNA 上调的机理目前尚不十分清楚。本研究提示血管外膜成纤维细胞生长受多个途径控制,仅封闭 AT 某一亚型受体并不能有效地抑制 Ang ① 介导的血管外膜成纤维细胞增殖,其他受体亚型可能起代偿作用。

参考文献

- [1] Regitz-Zagrosek V, Neuss M, Wamecke C, et al. Subtype 2 and atypical angiotensin receptors in human heart [J]. *Basic Res Cardiol*, 1996, **91** (Suppl 2): 73-77
- [2] Zhu Z, Zhang SH, Wagner C, et al. Angiotensin AT-1B receptor mediates calcium signaling in vascular smooth muscle cells of AT-1a receptor deficient mice [J]. *Hypertension*, 1998, **31**(5): 1171-1177
- [3] Zhu DL, Herembert T, Marche P. Increased proliferation of adventitial fibroblast from spontaneous hypertensive rat aorta [J]. *Hypertension*, 1991, **6**: 1161-1168
- [4] Zhu DL, Herembert T, Caruelle D, et al. Involvement of calcium channels in fibroblast growth factor-induced activation of arterial cells in spontaneous hypertensive rats [J]. *J Cardiovas Pharmacol*, 1994, **23**(1): 395
- [5] 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1998; 17-287
- [6] Nickenig G, Strehlow K, Roeling J, et al. Salt induces vascular AT-1 receptor overexpression in vitro and in vivo [J]. *Hypertension*, 1998, **31**(6): 1272-1277
- [7] Sherry B, Torres J, Blum MA. Reovirus induction of and sensitivity to beta interferon in cardiac myocyte cultures correlate with induction of myocarditis and are determined by viral core proteins [J]. *J Virol*, 1998, **72** (2): 1314-1323
- [8] Sander GE, McKinnin JJ, Greenberg SS, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin ① receptor antagonists in the treatment of heart failure caused by left ventricular systolic dysfunction [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 1999, **41** (4): 265-300
- [9] Everett AD, Heller F, Fisher A. AT-1 receptor gene regulation in cardiac myocytes and fibroblasts [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1996, **8** (8): 1272-1276
- [10] Regitz-Zagrosek V, Neuss M, Holzmeister J, et al. Molecular biology of angiotensin receptors and their role in human cardiovascular disease [J]. *J Mol Med*, 1996, **74** (12): 233-251

(此文 2001-04-02 收到, 2001-07-29 修回)

(此文编辑 胡必利)