

## • 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2001)-05-0394-04

血小板源生长因子 $\beta$ 受体反义寡核苷酸对血小板源生长因子诱导大鼠血管平滑肌细胞迁移的影响

顾春虎, 侯英萍, 李 焰, 乔宏庆

(第四军医大学西京医院核医学科, 西安 710032)

[主题词] 寡核苷酸, 反义; 再狭窄; 血小板源生长因子; 肌, 平滑, 血管

[摘要] 为研究血小板源生长因子 $\beta$ 受体反义寡核苷酸对血小板源生长因子诱导的大鼠血管平滑肌细胞迁移的影响和作用机制, 利用激光共聚焦显微镜观察平滑肌细胞对异硫氰酸荧光素标记的反义寡核苷酸的摄取和细胞内定位, 改良 Boyden's 小室法观察平滑肌细胞迁移。结果发现, 加入反义寡核苷酸培养 24 h 及 48 h 后荧光分别位于细胞浆内和细胞核内; 5  $\mu\text{mol/L}$  以上浓度反义寡核苷酸作用 36 h 后, 被血小板源生长因子诱导迁移通过 Boyden's 小室碳纤维膜膜的细胞数量少于空白对照组; 正义、错义寡核苷酸和 5  $\mu\text{mol/L}$  以下浓度反义寡核苷酸迁移抑制不明显。提示血小板源生长因子 $\beta$ 受体反义寡核苷酸在细胞核内呈时间和浓度依赖性抑制血小板源生长因子诱导的血管平滑肌细胞迁移。

[中图分类号] R338

[文献标识码] A

Effect of Platelet Derived Growth Factor  $\beta$  Receptor Antisense Oligonucleotide on Platelet Derived Growth Factor Induced Migration of Rat Vascular Smooth Muscle Cells

GU Chun-Hu, HOU Ying-Ping, LI Yan, and QIAO Hong-Qin

(Department of Nuclear Medicine, Xi Jing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

**MeSH** Oligonucleotide, Antisense; Restenosis; Platelet Derived Growth Factor; Muscle, Smooth, Vascular

**ABSTRACT** **Aim** To investigate the effect of platelet derived growth factor  $\beta$ -receptor (PDGFR- $\beta$ ) antisense oligonucleotides (AODN) on platelet derived growth factor (PDGF) induced migration of cultured rat vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** In vitro cultured rat VSMC model was established. Interactive Laser Cytometer (ILC) was used to investigate fluorescein isothiocyanate labeled PDGFR- $\beta$  AODN cellular uptake and localization. The migration of VSMC was assayed by a modification of Boyden's chamber method. **Results** Fluorescent AODN localized in the cytoplasm of VSMC at 24 hours and in the nucleus at 48 hours. Compared with control group, PDGFR- $\beta$  AODN at dose of 5  $\mu\text{mol/L}$  or higher can significantly decrease the number of cells which had migrated through the polycarbon filter induced by PDGF. PDGFR- $\beta$  AODN at dose of 2.5  $\mu\text{mol/L}$  or lower, sense oligonucleotide and scrambled oligonucleotide could not significantly inhibit PDGF induced migration of VSMC. **Conclusion** PDGFR- $\beta$  AODN can localize in the nucleus and significantly inhibit PDGF induced migration of cultured VSMC in a dose and time dependent fashion.

经皮腔内冠状动脉成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)和冠状动脉血管旁路移植术(coronary artery bypass graft, CABG)是目前冠心病治疗的重要手段,但是观察表明,患者在行PTCA或CABG术后3~6个月内分别有30%~50%和20%~40%的冠状动脉术后再狭窄率<sup>[1,2]</sup>。经大

量研究证实,再狭窄的主要原因是血管中层平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)向内膜下迁移和增殖<sup>[3]</sup>。血小板源生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)及其 $\beta$ 受体(platelet derived growth factor  $\beta$ -receptor, PDGFR- $\beta$ )在平滑肌细胞的迁移中起重要作用<sup>[4]</sup>。本实验欲通过体外培养的大鼠VSMC模型观察PDGFR- $\beta$ 反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, AODN)对PDGF诱导的细胞迁移的影响,并进行作用机理的初步探讨。

[基金项目] 第四军医大学创新工程项目(CX99A006)资助。

[作者简介] 顾春虎,男,1973年出生,医学硕士,心血管外科医师,主要从事血管再狭窄的研究。侯英萍,女,1960年出生,医学硕士,副教授,硕士研究生导师,主要从事心血管治疗学的研究。乔宏庆,女,1946年出生,医学硕士,教授,硕士研究生导师,主要从事冠心病发病机制及心脏影像医学的研究。

## 1 材料和方法

## 1.1 材料

4 周龄 SD 大鼠, 清洁级, 雌雄不限, 体重 250 g  $\pm$  20 g, 购于第四军医大学动物研究所; DMEM 培养基购于美国 Gibco 公司; 6 孔培养板和 Boyden's 小室 (碳纤维素膜孔径 5  $\mu$ m) 购于美国 Costa 公司; PDGFR- $\beta$  基因的反义寡核苷酸链 (18 bp) 5' TAT CAC TCC TGG AAG CCC 3'、正义链 (sense oligonucleotide, SODN) 5' GGG CTT CCA GGA GTG ATA 3'、错义链 (scrambled oligonucleotide, CODN) 5' GTG ATA GTA TGC CGA GCA 3' 及反义链的 FITC 标记由加拿大上海 Sagon 公司进行, 所有寡核苷酸均经硫代磷酸化修饰和电泳鉴定; 激光共聚焦显微镜 (Bio-Rad MRC-1024, 美国);  $\alpha$ -Smactin 兔抗大鼠单抗和 PDGF 购于 Sigma 公司; SABC 试剂盒购于武汉博士德公司。

## 1.2 血管平滑肌细胞的培养及鉴定

颈椎脱臼法处死大鼠后, 无菌条件下迅速打开胸腔, 取出胸主动脉。小心剥去外膜, 刮下内膜。组织块法、15% 胎牛血清 DMEM 培养基、37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 恒温孵育, 3 天换液, 7 天左右有细胞从组织块周围萌生, 约 3~4 周细胞生长融合。0.25% 胰酶消化传代培养, 经  $\alpha$ -Smactin 免疫细胞化学染色鉴定为 VSMC, 取 5~10 代细胞为实验对象。

## 1.3 实验分组

按实验目的将细胞分为以下几部分: 不同寡核苷酸对细胞迁移的影响: 对照组 (15% FBS)、PDGFR- $\beta$  反义寡核苷酸组、PDGFR- $\beta$  正义寡核苷酸组及 PDGFR- $\beta$  错义寡核苷酸组; ④不同浓度 PDGFR- $\beta$  反义寡核苷酸对细胞迁移的影响: 空白组、1  $\mu$ mol/L 组、2.5  $\mu$ mol/L 组、5  $\mu$ mol/L 组、10  $\mu$ mol/L 组及 15  $\mu$ mol/L 组; ⑤PDGFR- $\beta$  反义寡核苷酸作用于 VSMC 不同时间对细胞迁移的影响: 12 h 组、24 h 组、36 h 组、48 h 组及 60 h 组。

## 1.4 反义寡核苷酸的摄取及细胞内定位

细胞传至第 5 代, 将细胞制成  $2 \times 10^8$  个细胞/L 单细胞悬液接种于 6 孔培养板, 孔中预先放入盖玻片, 24 h 后细胞贴壁良好, 无血清 DMEM 培养基洗 1 次, 每孔加入含 FITC 标记反义寡核苷酸 (5  $\mu$ mol/L) 15% 胎牛血清 DMEM 培养基, 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 继续培养, 分别在实验预定时间停止培养, 弃去培养基, 用 0.01 mol/L PBS 洗两次, 丙酮 4  $^{\circ}$ C 固定 20 min, 将细胞爬片置载玻片上, 50% 缓冲甘油封片, 激光共聚焦显微镜观察。

## 1.5 反义寡核苷酸对血管平滑肌细胞迁移的影响

细胞传至第 5 代, 无血清 DMEM 培养基驯化 24 h, 使细胞周期同步化, 按实验目的向不同实验组施

加不同实验干预, 作用一定时间后停止培养, 将细胞制成  $5 \times 10^8$  个细胞/L 单细胞悬液, 向碳纤维素膜上方的每个小室内加入细胞悬液 50  $\mu$ L, 在碳纤维素膜下方的小室内加入含 PDGF (50 ng/L) 的 15% 胎牛血清 DMEM 培养基 100  $\mu$ L, 在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的条件下继续培养 5 h, 终止培养, 弃去培养基, 取出滤膜, 轻轻刮去碳纤维素膜上方的细胞, PBS 洗两次碳纤维素膜, 4% 多聚甲醛固定 20 min, HE 染色, 光镜下观察, 计算碳纤维素膜下方平均每个高倍镜视野下的细胞数。细胞迁移抑制率 = (对照组细胞数 - 实验组细胞数) / 对照组细胞数  $\times$  100%。

## 1.6 统计学处理

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用配对  $t$  检验,  $P < 0.05$  有显著性差异。

# 2 结果

## 2.1 血管平滑肌细胞对反义寡核苷酸的摄取及细胞内定位

在激光共聚焦显微镜下发现, PDGFR- $\beta$  反义寡核苷酸作用于 VSMC 12 h, FITC 荧光开始进入细胞浆; 24 h 细胞浆内有大量荧光, 细胞核内未见到荧光; 36 h 细胞浆内荧光达到最强, 细胞核内开始出现荧光; 48 h 细胞浆内荧光变淡, 荧光主要聚于细胞核内; 60 h 细胞浆内荧光基本消失, 细胞核内荧光开始减淡 (表 1, Table 1)。

表 1. 不同时间点血管平滑肌细胞浆及细胞核内的荧光强度 ( $n = 4$ )

Table 1. The fluorescecent intensity in cytoplasm and nucleus at different times

Groups	Cytoplasm	Nucleus
12 h	-	-
24 h	+	-
36 h	+++	+
48 h	+	+++
60 h	-	++

## 2.2 不同寡核苷酸对血管平滑肌细胞迁移的影响

与对照组相比, 10  $\mu$ mol/L PDGFR- $\beta$  反义寡核苷酸作用 48 h 后, PDGF 诱导通过碳纤维素膜的 VSMC 量明显减少 ( $P < 0.05$ ); 而 10  $\mu$ mol/L 浓度正义组和错义组与对照组之间通过碳纤维素膜的细胞量无明显差异 ( $P > 0.05$ )。反义组和正义组、错义组相比均有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 见表 2 (Table 2)。

表 2. 不同寡核苷酸对血管平滑肌细胞迁移的影响 ( $n=4$ )

Table 2. The effects of oligonucleotides in different sequences on PDGF induced VSMC migration

Groups	Number of migrated cells/HP	Rate of inhibition (%)
Control (15% FBS)	70.2 ± 2.2	0.0
SODN	67.8 ± 2.0	3.4 <sup>a</sup>
CODN	68.3 ± 3.2	2.7 <sup>a</sup>
AODN	10.1 ± 1.0	85.6 <sup>b</sup>

a:  $P < 0.05$ , compared with AODN group; b:  $P < 0.05$ , compared with control group.

### 2.3 不同浓度反义寡核苷酸对血管平滑肌细胞迁移的影响

当 PDGFR- $\beta$  反义寡核苷酸的浓度小于 5  $\mu\text{mol/L}$  时, 其对 PDGF 诱导的细胞迁移的抑制作用与对照组相比不明显; PDGFR- $\beta$  反义寡核苷酸浓度大于 5  $\mu\text{mol/L}$  并作用 VSMC 48 h 后, 细胞的迁移受到抑制 ( $P < 0.05$ ), 这种迁移抑制作用随药物浓度的增加而加强, 在加药浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  时达到最强 ( $P < 0.01$ ), 而当药物浓度大于 10  $\mu\text{mol/L}$  时迁移抑制作用不再明显增强(表 3, Table 3)。

表 3. 不同浓度反义寡核苷酸对血管平滑肌细胞迁移的影响 ( $n=4$ )Table 3. The effects of PDGFR- $\beta$  AODN in different dose on PDGF induced VSMC migration

Groups	Number of migrated cells/HP	Rate of inhibition (%)
Control(15% FBS)	70.2 ± 3.1	0.0
1.0 $\mu\text{mol/L}$	69.3 ± 2.8 <sup>a</sup>	1.2
2.5 $\mu\text{mol/L}$	65.6 ± 3.0 <sup>a</sup>	6.6
5.0 $\mu\text{mol/L}$	50.4 ± 2.7 <sup>b</sup>	28.2
10.0 $\mu\text{mol/L}$	10.5 ± 1.5 <sup>b</sup>	85.0
15.0 $\mu\text{mol/L}$	11.4 ± 2.0 <sup>b</sup>	83.8

a:  $P < 0.05$ , compared with 5  $\mu\text{mol/L}$  group; b:  $P < 0.01$ , compared with control group.

### 2.5 反义寡核苷酸对血管平滑肌细胞迁移抑制作用的时间关系

PDGFR- $\beta$  反义寡核苷酸对 VSMC 的迁移抑制作用从加药后 36 h 开始, 随药物作用时间的加长抑制作用也加强, 48 h 该抑制作用达到最强, 呈现明显的时间依赖性, 48 h 后该抑制作用不再增强(表 4, Table 4)。

表 4. PDGFR- $\beta$  反义寡核苷酸对 PDGF 诱导的 VSMC 迁移抑制作用的时间依赖性 ( $n=4$ )Table 4. The inhibition of PDGFR- $\beta$  AODN on PDGF induced VSMC migration in a time dependent fashion

Groups	Number of migrated cells/HP	Rate of inhibition (%)
Control(0)	68.3 ± 2.5	0.0
12 h	64.1 ± 2.7	6.1 <sup>ab</sup>
14 h	63.5 ± 1.9	7.0 <sup>ab</sup>
36 h	42.6 ± 1.8	37.6 <sup>a</sup>
48 h	12.5 ± 1.2	81.9 <sup>c</sup>
60 h	13.4 ± 2.0	80.4 <sup>c</sup>

a:  $P < 0.05$ , compared with 48 h group; b:  $P < 0.05$ , compared with 36 h group; c:  $P < 0.01$ , compared with control group.

## 3 讨论

血管平滑肌细胞向内膜下迁移及增殖是血管术后再狭窄的主要原因。PDGF 作为一种血管平滑肌细胞的强烈趋化因子和致细胞有丝分裂原, 主要存在于血管平滑肌细胞及血小板内, 当血管受损深达中膜时, PDGF 被大量分泌、释放入血, 与 PDGFR- $\beta$  相结合, 通过第二信号信使系统产生细胞迁移和增殖信号, 最终导致血管平滑肌细胞的迁移和迁移后增殖<sup>[5~7]</sup>。因此我们阻断 PDGF 与 PDGFR- $\beta$  相结合就能阻断血管平滑肌细胞迁移信号的产生。反义寡核苷酸可以特异性抑制目的基因的蛋白表达<sup>[8,9]</sup>。据文献[9]报道 PDGFR- $\beta$  反义寡核苷酸能抑制高达 95% PDGFR- $\beta$  基因的表达。因此我们假设 PDGFR- $\beta$  反义寡核苷酸可以通过抑制 PDGFR- $\beta$  基因的表达阻抑 PDGF 诱导血管平滑肌细胞迁移。这种假设在我们的实验中得到了验证。因为我们在实验中发现 PDGFR- $\beta$  反义寡核苷酸能明显抑制 PDGF 诱导的血管平滑肌细胞迁移, 并且这种抑制作用有明确的时间和浓度依赖性, 然而正义寡核苷酸和错义寡核苷酸却无明显的迁移抑制作用。

目前认为反义寡核苷酸抑制目的基因的表达有以下几种理论: ①干扰 mRNA 与核糖体的结合、翻译以及剪接; ②诱导核糖核酸酶 H 分解 mRNA 所致; ③反义寡核苷酸可以进入细胞核内, 防止 mRNA 前体或 mRNA 形成或阻滞 mRNA 向细胞核外转移<sup>[10]</sup>。另外也有少数人认为寡核苷酸的作用无需任何序列特异性, 而是与各种生长因子或膜蛋白相结合, 抑制细胞的迁移、增殖<sup>[11,12]</sup>。在实验中我们发现只有反义寡核苷酸对细胞的迁移有明显抑制作用, 而其它

寡核苷酸作用不显著。反义寡核苷酸可以顺利进入细胞核内,并且进入细胞核的时间正好与反义寡核苷酸开始对细胞迁移起抑制作用的时间点相符,而且反义寡核苷酸浓聚于细胞核的时间和反义寡核苷酸迁移抑制作用达到最强的时间都是加药后 48 h。从以上结果我们可以这样认为,寡核苷酸对目的基因的抑制作用有严格的序列特异性。反义寡核苷酸主要是在细胞核内通过阻止 mRNA 或其前体形成、阻滞 mRNA 向细胞核外的转移等手段抑制目的基因的表达,但是该抑制作用在细胞核内的作用机制尚待进一步探讨。

有人认为血管平滑肌细胞的迁移在再狭窄的发生和发展过程中起着比增殖更重要的作用,是造成再狭窄的主要原因<sup>[13]</sup>。本实验显示,全硫代修饰的 PDGFR- $\beta$  反义寡核苷酸通过在细胞核内对 PDGFR- $\beta$  基因表达的抑制,在体外对 PDGF 诱导的血管平滑肌细胞迁移具有抑制作用,因此有望成为抑制血管损伤后血管平滑肌细胞迁移和再狭窄形成的新手段。

#### 参考文献

- [1] Espinola Klainc, Rupprecht HJ. Impact of restenosis 10 years after coronary angioplasty [J]. *Eur Heart J*, 1998, **19**: 1 047-053
- [2] Gonsalves C, Bandyk DF, Acino AJ. Duplex features of vein grafts stenosis and the success of percutaneous transluminal angioplasty [J]. *J Endovasc Surg*, 1999, **6**: 66-72
- [3] Gentile AT, Mills JL, Westerband A, et al. Characterization of cellular matrix constituents in human lower extremity vein graft stenoses [J]. *Cardiovasc Surg*, 1999, **7**: 464-469
- [4] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s [J]. *Nature*, 1993, **362**: 801-809
- [5] Jurro Deguchi, Masatoshi Makuuchi, Takashi Nakaoka, et al. Angiotensin II stimulates platelet derived growth factor  $\beta$  chain expression in newborn rat vascular smooth muscle cells and neointimal cells through ras, extracellular signal-regulated protein kinase, and c-jun N-terminal protein kinase mechanisms [J]. *Circ Res*, 1999, **85**: 565-574
- [6] 杨永健, 朱峻, 周文兴, 等. 钙激动剂介导血管平滑肌细胞增殖的信号转导途径 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (1): 37-39
- [7] Charles EH, Alexander W, Clowes MD. Platelet derived growth factor and arterial response to injury [J]. *Circulation*, 1997, **95**: 555-556
- [8] 李琦, 温进坤, 韩梅. 反义 c-jun 表达质粒对血管平滑肌表型转化标志的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (1): 6-9
- [9] Martin GS, Michael S, Elazer R, et al. Antisense oligonucleotide inhibition of PDGFR- $\beta$  receptor subunit expression directs suppression of intimal thickening [J]. *Circulation*, 1997, **95**: 669-676
- [10] 成凤玲. 反义寡核苷酸在动脉粥样硬化研究中的应用 [J]. *基础医学与临床*, 1996, **16** (4): 21-23
- [11] Wang WZ, Chen HJ, Allan Schwartz, et al. Sequence-independent inhibition of in vitro vascular smooth muscle cell proliferation, migration, and in vivo neointimal formation by phosphorothioate oligodeoxynucleotides [J]. *J Clin Invest*, 1996, **98** (2): 443-450
- [12] Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands [J]. *Nature*, 1990, **346**: 818-822
- [13] Charles EH, Larry WK, Selina V, et al. PDGF- $\beta$  receptor blockade inhibits intimal hyperplasia in the baboon [J]. *Circulation*, 1999, **99**: 564-569

(此文 2001-04-29 收到, 2001-11-06 修回)

(此文编辑 文玉珊)